

3. METODOLOGIA

La major part dels resultats experimentals de la present tesi han estat publicats en revistes científiques en les que la limitació d'espai impedeix una descripció acurada de la metodologia emprada. Així doncs, s'ha cregut convenient addicionar una secció referent a consideracions metodològiques a fi de detallar els procediments experimentals emprats. En aquesta secció es referenciaran les taules (que es citen en nombres aràbics) de les solucions emprades que s'adjunten a l'*annex-I* al final d'aquesta secció.

I. OBTENCIÓ, MODIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE LIPOPROTEÏNES

I.1. Obtenció de LDL

Les LDL humanes (densitat entre 1,019 i 1,063 g/mL) s'obtingueren d'una mescla de sèrums de voluntaris normocolesterolèmics (Banc de Sang de l'Hospital de la Vall d'Hebron) mitjançant ultracentrifugació seqüencial (Havel R 1984), amb algunes modificacions. Procediment que es basa en la diferent densitat de les lipoproteïques del sèrum (*taula VI*). Es considerarà que la densitat inicial de la mescla de sèrum era d'aproximadament 1,006 g/mL.

Taula VI. Classificació de lipoproteïnes segons la seva densitat

Lipoproteïnes	Densitat
Quilomicrons	< 0,96 g/mL
VLDL	0,96 – 1,006 g/mL
IDL	1,006 – 1,019 g/mL
LDL	1,019 – 1,063 g/mL
HDL	1,063 – 1,210 g/mL

VLDL: lipoproteïnes de molt baixa densitat, IDL: lipoproteïnes de densitat intermitja, LDL: lipoproteïnes de baixa densitat, HDL: lipoproteïnes d'alta densitat.

El procediment experimental s'iniciava amb una primera ultracentrifugació, sense ajustar la densitat del sèrum, a 100.000x g (en rotor d'angle fix *Beckman 50.2 Ti*) durant 30 min a 4°C amb la que s'obtenien els quilomicrons. Seguidament es procedia a l'aïllament de les diferents lipoproteïnes ajustant en cada cas la densitat del sèrum segons la fórmula:

$$KBr(g) = \frac{\text{volum mostra}(\text{densitat final} - \text{densitat inicial})}{1 - (0,312 \times \text{densitat final})}$$

Es realitzava l'aïllament conjunt de les lipoproteïnes de molt baixa VLDL i les lipoproteïnes de densitat intermitja (IDL) portant el sèrum a una densitat de 1,019 g/mL per addició de KBr (segons la fórmula i considerant densitat inicial del sèrum de 1,006 g/mL). El sèrum es repartia en tubs de policarbonat (*Beckman*) i s'hi superposava un volum de 5 mL de la solució de densitat que es pretenia assolir (1,019 g KBr/mL) fins al volum màxim dels tubs emprats (20 mL). Les solucions de densitat requerides en cada cas es preparaven partint d'una solució mare de 1,006 g/mL per addició de la quantitat de KBr necessària (*taula 1.1*). Després de superposar la solució de densitat es procedia a l'ultracentrifugació a 100.000x g durant 18 h a 4°C. Les VLDL i IDL, de densitat inferior a la que es portava amb el KBr, suraven després de l'ultracentrifugació i podien separar-se fàcilment. Seguidament s'eliminava l'excés de solució densitat de KBr i la fase de sèrum es portava a la densitat de 1,063 g/mL a fi de procedir de la mateixa manera per obtenir les LDL.

Per conservar les LDL, s'eliminava el KBr dialitzant-les enfront un tampó A (*taula 1.2*) que alhora evitava la seva oxidació. El procés és realitzava, generalment, en membranes diàlisi (tamany de porus de 12-14 KDa, *Medicell*) dialitzant contra un volum 200 vegades superior al de les LDL i fent un canvi a les 2 h que es deixava tota la nit a 4°C, en agitació i protegit de la llum per evitar l'oxidació de les LDL. O bé, es realitzava la diàlisi emprant columnes de filtració *PD-10* (*Sephadex G-25, Amersham Pharmacia*) i passant les LDL dues vegades per la columna emprant el mateix tampó A. La mostra dialitzada es conservava a 4°C en el mateix tampó de diàlisi. Abans d'ésser emprada, es dialitzava de nou en NaCl 150 mM 2 h a 4°C, protegides de la llum, a fi d'eliminar l'àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA) present en el tampó A. Tot seguit les LDL s'esterilitzaven per filtració (filtres de 0,22 µm de diàmetre, *Millex-GV*). Les LDL així obtingudes, LDL_n, es caracteritzaven com s'indica a la *secció 1.3*.

1.2. Modificació *in vitro* de LDL

1.2.1. Modificació de LDL per agregació

Les LDL_n (veure *secció 1.1*) es portaren a una concentració de 2 mg proteïna/mL amb PBS (*taula 1.3*) (determinació de la concentració de proteïna, *secció 1.3.1*). La solució s'agitava intensament de manera continuada amb un agitador vibrador (*vòrtex*) durant 4 min a temperatura ambient (t_{amb}), obtenint-se una solució grogosa homogènia, tèrbola i sense

grumolls, fet indicatiu d'una bona agregació. Els agregats de LDL (LDLag) es separaren de la resta per centrifugació de la solució agitada a 10.000x g durant 10 min a t_{amb} . Els precipitats es resuspengueren en PBS atemperat. Seguidament les fraccions precipitables i no precipitables es caracteritzaren com s'especifica en la *secció I.3*.

I.2.2. Modificació de LDL per incubació amb versicà

El PGs usat fou un CSPG, el versicà. El versicà s'obtingué d'aortes porcines i fou cedit pel grup de la Dra. Hurt-Camejo (Wallenberg Laboratory for Cardiovascular Research, Goteborg University, Suècia) que disposa de les tècniques d'aïllament i caracterització necessàries. (^{a,b}Camejo G 1991, Hakala JK 2001). Els PGs aòrtics aïllats presentaven una composició variable en GAGs: entre 50 % - 65 % de condroitin-6-sulfat, entre 10 % - 25 % de condroitin-4-sulfat i entre 10 % - 20 % dermatan sulfat. Aquesta variabilitat és deguda a la composició en GAGs de l'aorta més que per influència del procés d'obtenció. La proporció GAGs:proteïna dels PGs aïllats oscil·lava entre 7:3 i 6:4. El pes molecular que presentaven els CSPG obtinguts per cromatografia líquida d'alta pressió així com la composició en GAGs eren indicatius que el principal PG de la preparació de CSPG era versicà.

A fi d'obtenir les LDL modificades per versicà (versicà-LDL), les LDLn i el versicà s'equilibraren individualment en el tampó A (*taula 1.4*) per diàlisi a 4°C, protegides de la llum, en agitació 24 h. Després de la diàlisi les LDLn es portaren a una concentració de 2 mg/mL en el mateix tampó. Una vegada diluïdes les LDLn s'incubaven amb el versicà en una proporció 100:1 (proteïna LDL:proteïna versicà) durant 2 h a 37°C, protegides de la llum i amb agitació periòdica suau, obtenint-se una mescla amb terbolesa homogènia (versicà-LDL). La fracció precipitable es separà de la fracció no precipitable per centrifugació a 10.000x g durant 10 min a t_{amb} i es resuspengué en la solució de tampó B (*taula 1.5*). Seguidament les fraccions precipitables i no precipitables es caracteritzaren com s'indica a la *secció I.3*.

I.3. Caracterització de lipoproteïnes

I.3.1. Determinació de la concentració proteica

La determinació proteica de les LDLn i de les LDL modificades (LDLag i versicà-LDL) es realitzava amb l'assaig de l'àcid bicinonínic (*kit BCATM protein assay reagent, Pierce*) que es basa en el mètode de *Lowry* (Lowry O 1951). Es seguia el protocol establert per la casa comercial. S'emprava una recta patró d'albumina bovina (BSA, *Pierce*) (0; 0,1;

0,2; 0,3; 0,4 mg BSA/mL en H₂O), en la que s'interpol·lava l'absorbància a 562 nm (*UV 2100, Shimadzu*) de les diferents mostres de lipoproteïnes, prèviament diluïdes en H₂O (1/20 i 1/40).

I.3.2. Determinació de la concentració de colesterol

La concentració de colesterol de les diferents lipoproteïnes s'analitzava amb un assaig comercial (*kit RefLab[®] Brand, 139-204*) basat en el mètode d'Allain (Allain CC 1974). El producte de la reacció, que absorbeix a 500 nm, permet calcular la concentració de colesterol de la mostra en anàlisi, emprant una solució patró de colesterol. L'assaig es portava a terme seguint les indicacions de la casa comercial. Les mostres de LDL es diluïen 1/5 abans de determinar-ne la concentració de colesterol. El contingut mitjà de colesterol trobat en les LDL humanes fou de ≈ 2 mg colesterol/mg proteïna.

I.3.3. Determinació del grau d'oxidació

El grau d'oxidació del lípid de les lipoproteïnes es mesurà indirectament analitzant la concentració de substàncies que reaccionen amb l'àcid tiobarbitúric (TBARS, *Thiobarbituric Acid Reactive Substances, Janssen Chimica*). L'assaig emprat es basa en la reacció del malondialdèhid (MDA), producte secundari de l'autooxidació dels àcids grassos que tenen tres o més dobles enllaços, amb l'àcid 2-tiobarbitúric (TBA) (*Thiobarbituric Acid*) per donar lloc a un cromòfor de color rosa que es detecta a 532 nm (Lunec J 1989).

El protocol usat és l'establert per (Mao SJ 1991) amb algunes modificacions, que consisteix en preparar una recta patró de MDA (de 2,5-100 μ M) partint d'una solució mare 4,046 M (*Janssen Chimica*) i una solució de TBA 1 % (p/v) en una solució aquosa d'àcid acètic 50 % (v/v). En tubs cònics de vidre que contenien 500 μ L d'àcid tricloracètic 20 % (v/v) s'hi addicionava la mostra de lipoproteïnes, la solució patró o el blanc (H₂O), seguidament s'hi afegien 500 μ L de TBA 1 % (p/v) a cadascun dels tubs i s'agitaven intensament amb un agitador vibrador i s'incubaven a 100°C durant 15 min. La reacció s'aturava mantenint els tubs a 4°C i tot seguint es precipitaven les lipoproteïnes per centrifugació a 1.000x g durant 10 min. Es determinava l'absorbància del sobrenedant a 532 nm (*UV 2100, Shimadzu*), i s'obtenia la concentració de la mostra interpol·lant en la recta patró. Es considera que les lipoproteïnes no estaven oxidades quan els nivells de TBARS mesurats eren $<1,2$ mmol MDA/mg de proteïna de LDL.

No es detectaren nivells d'endotoxina en les LDL aïllades (segons el test *Limulus Amebocyte Lysate*, *Bio Whittaker*).

I.3.4. Caracterització electroforètica

Es portaren a terme dos tipus d'electroforesi. A fi d'avaluar la mobilitat electroforètica es realitzà electroforesi en gels comercials d'agarosa. D'altra banda es valorà la grandària de les partícules de LDL emprant gels en gradient d'acrilamida del 2-16 % en condicions no desnaturalitzants. La caracterització per ambdós tipus d'electroforesi es realitzava sistemàticament en cada aïllament de LDLn, i en les fraccions precipitable i no precipitable de les LDL modificades (LDLag i versicà-LDL). A fi d'eliminar els agregats de major tamany de LDL, la fracció precipitable de versicà-LDL es filtrà (filtre de 0,22 µm de diàmetre) i les partícules del filtrat també es caracteritzaren electroforèticament.

Electroforesi en gel d'agarosa

L'electroforesi es portà a terme emprant gels comercials d'agarosa (*Paragon Lipoprotein Electrophoresis Kit*, *Beckman Coulter*), que permeten separar les lipoproteïnes segons la seva relació càrrega-massa. El procediment seguit fou el que estableix el fabricant i consisteix en una electroforesi de les mostres de les diferents lipoproteïnes (aplicació de 5 µL de mostra en el gel) en un gel d'agarosa 0,5 % que posteriorment és fixat i tenyit emprant-se les solucions del *kit comercial*. Les bandes de les lipoproteïnes s'evidencien en una coloració blau-grisosa sobre un fons transparent. La imatge dels gels es captà amb el sistema *Gel-Doc 1.000* (*Bio-rad*).

Electroforesi en gels en gradient d'acrilamida

La grandària de les partícules lipoproteïques es determinà mitjançant electroforesi en gels en gradient d'acrilamida al 2-16 % en condicions no desnaturalitzants, adaptant el mètode de Nichols (Nichols AV 1986). Caracterització portada a terme en el laboratori del Dr. Jordi Ordóñez (Departament de Bioquímica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau).

Es prepararen dues solucions de 2 % i 16 % d'acrilamida partint d'una solució mare d'acrilamida (*taula 1.6*). Les dues solucions es barrejaren de manera gradual mitjançant un sistema de dues bombes peristàltiques *P-1* (*Pharmacia*) obtenint-se un gradient d'acrilamida ascendent (del 2 al 16 %). Els gels es guardaren a 4°C fins al dia següent.

Les fraccions de les diferents lipoproteïnes (2,5-5 µg proteïna) es preincubaren durant 15 min amb 10 µL de negre de sudan (en etilenglicol 0,1 % (p/v)) i 5 µL de sacarosa 50 % (p/v). 10 µL d'aquesta mescla s'aplicaren en el gel d'electroforesi que es corregué (sistema *Mini-Protean II*, *Bio-rad*) en tampó borat a 4°C durant 30 min a 20 V, 30 min a 70 V i 16 h a 100 V. La quantificació de les bandes s'analitzà per densitometria en el sistema *Gel-Doc 1.000* (*Bio-rad*) i el tamany de les diferents lipoproteïnes es determinà usant com a estàndard una mescla de plasmes del que coneixíem el diàmetre de les seves partícules de LDL (24,5±0,2; 26,2±0,2; 28,4±0,4 nm).

I.3.5. Caracterització per microscòpia electrònica

Les diferents lipoproteïnes d'interès s'estudiaren per microscòpia electrònica de transmissió (*Hitachi 600 AB*) per tal d'analitzar-ne el seu diàmetre i morfologia.

Les fraccions de les diferents lipoproteïnes es tenyiren per incubació amb acetat d'uranil 2 % (p/v) durant 1 min a t_{amb} . La mostra tenyida s'aplicà directament a una reixeta de coure recoberta de plàstic (*Monsanto*), es deixà assecar i s'observà microscòpicament. Les imatges foren digitalitzades amb una càmera *Bioscan Gatan*. El diàmetre de les partícules es determinà mitjançant el software del programa *IMAT* (programa dissenyat pels *Serveis Centrals de la Universitat de Barcelona*).

II. CULTIUS CEL·LULARS

II.1. Cultius de cèl·lules musculars llises humanes

Els cultius primaris de CML s'obtingueren d'artèries coronàries humanes de cors extrets d'operacions de trasplantament realitzats a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau sota la supervisió del comitè ètic de l'hospital (protocol acceptat pel projecte *FIS 01/0354*).

II.1.1. Obtenció del cultiu primari i creixement de cèl·lules musculars llises

Les CML s'aïllaren de fragments de coronàries humanes que macroscòpicament es classificaren en àrees amb o sense lesió ateroscleròtica com es dedueix per l'absència d'estria de greix o de plaques ateroscleròtiques visibles. En els treballs experimentals portats a terme es treballà sempre amb CML procedents de fragments de coronàries sanes excepte en

l'experimental de l'*article IV* que es treballà en paral·lel amb cèl·lules de coronàries sanes i/o de regions ateroscleròtiques. Les cèl·lules s'aïllaren mitjançant la tècnica d'explants que el nostre grup té ben establerta, (Varela O 1998) i que es detalla breument a continuació. S'eliminava el greix i el teixit connectiu unit a l'artèria. S'obria longitudinalment i tot seguit la superfície interior del vas es raspava cuidadosament amb un bisturí a fi d'eliminar les cèl·lules endotelials. La capa mitja de la paret del vas era separada de l'adventícia, i seccionada en petits fragments (explants) d'aproximadament 2 mm² d'àrea que es col·locaven en plaques de cultiu amb medi de creixement (*taula 2.1*).

Els explants s'incubaven a 37°C en una atmosfera humida amb CO₂ 5 % i cada dos dies se'ls-hi adicionava medi fresc. Després d'una o dues setmanes les cèl·lules començaven a migrar de l'explant i proliferaven. Assolint un grau de confluència entorn dels explants, les cèl·lules es tripsinitzaven i es subcultivaven. Les cèl·lules es tripsinitzaven després d'ésser rentades amb PBS (*taula 1.3*) atemperat, emprant tripsina/EDTA (*Gibco Laboratories*) i controlant per microscòpia òptica com les cèl·lules se separaven de la superfície de la placa de cultiu. Després de retirà la tripsina, les CML es mantenien entre 1-2 min a 37°C per tal d'assegurar que es desadherien completament, seguidament, eren recollides amb l'ajuda d'un raspador i se'ls-hi adicionava medi de creixement (*taula 2.1*). El comptatge cel·lular es realitzava en una càmera de *Neubauer* i les cèl·lules es resembraven en flascons de 75 cm² (a la densitat de 10.000 cèl·lules/cm²) (passatge 1). Assolida la confluència les cèl·lules es tripsinitzaven novament, es comptaven, es centrifugaven (300x g durant 10 min a t_{amb}) i es congelaven (a -80°C i posteriorment en nitrogen (N₂) líquid fins a la seva utilització) a una densitat de 600.000 cèl·lules/mL en medi de congelació (sèrum fetal boví (FCS) – dimetilsulfòxid 7,5 %).

En tots els experiments portats a terme les CML s'usaren en baixos estadis de tripsinització (2n i 6è passatge). La viabilitat cel·lular es determinava per exclusió amb blau de tripà i el comptatge es portava a terme en un hemocitòmetre.

II.1.2. Caracterització de cèl·lules musculars llises

Les cèl·lules es sembraven (15.000 cèl·lules/pouet) i es creixien en portaobjecte especials (*Chamber slides de PermaxTM, Nunc*). Assolida la confluència, es caracteritzaven per immunofluorescència analitzants els nivells de α -actina, marcador de CML (veure *figura 5*). I per descartar la presència de fibroblasts i de cèl·lules endotelials en els cultius de CML,

s'empraren anticossos monoclonals específics (*taula VII*) per la proteïna de superfície de fibroblasts (FSP) i pel factor *von Willebrand* (vWF), respectivament.

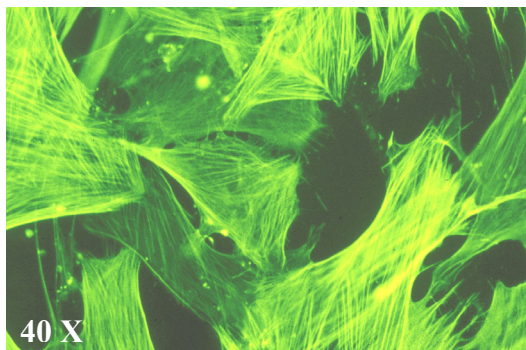
S'eliminava el medi de cultiu, i en fred es rentava la superfície cel·lular amb PBS (*taula 1.3*) i es fixaven durant 5 min amb metanol. L'excés de solució fixadora s'eliminava amb 3 rentats amb PBS atemperat i es bloquejaven les unions inespecífiques de l'anticòs primari amb dues incubacions de 5 min amb una solució de PBS- BSA 1 % a t_{amb} . Seguidament, es permeabilitzaven les cèl·lules incubant-les (4 min t_{amb}) amb PBS-BSA 1 %-Tritó X-100 0,1 % per afavorir l'entrada dels anticossos a través de la membrana cel·lular. Es bloquejava de nou amb dues incubacions de 5 min a t_{amb} i s'incubava amb l'anticòs primari corresponent (*taula VII*), diluït en la solució de permeabilització, durant 1 h a t_{amb} i sota agitació suau. L'excés d'anticòs primari s'eliminava amb un rentat de 5 min amb la solució de permeabilització i a continuació s'incubava amb l'anticòs secundari unit a fluoresceïna (*taula VII*), preparat en la mateixa solució, durant 30 min a t_{amb} protegit de la llum i amb agitació suau. Finalment, es rentava dues vegades amb PBS durant 5 min. Quan calia, els nuclis cel·lulars es visualitzaven per tinció amb el colorant *Hoechst 33258* (PBS 1 mg/mL) durant 5-10 min i l'excés s'eliminava amb tres rentats de 5 min amb PBS. Seguidament es col·locaven els cubreobjectes sobre les mostres emprant *glicergel* (DAKO) com a medi de muntatge. Les preparacions es guardaven a 4°C protegides de la llum fins a ésser observades per microscòpia de fluorescència (*Vanox AHBT3, Olympus*).

Taula VII. Anticossos per caracterització de CML

Anticossos primaris					
Antigen reconegut	Tipus		Proveïdor	Referència	Dilució
α -actina	Monoclonal		DAKO	M851	1/25
FSP	Monoclonal		SIGMA	F4771	1/250
vWF	Monoclonal		DAKO	M616	1/100
Anticòs secundari					
Espècie reconeguda	Origen	Característiques	Proveïdor	Referència	Dilució
Ratolí	Cabra	FITC	DAKO	F479	1/50

Les CML humanes obtingudes dels explants mostraven marcatge positiu per α -actina i no s'apreciava senyal amb els anticossos contra FSP ni vWF. Resultats que indiquen que les cèl·lules del cultius són CML i es descarta la presència de fibroblasts i de cèl·lules endotel·lials, respectivament.

Figura 5. Caracterització de les CML amb anticossos contra α -actina mitjançant immunofluorescència.



II.2. Cultius de fibroblasts

A fi d'analitzar la possible implicació de la MEC en la unió i internalització de les lipoproteïnes retengudes a l'íntima arterial, es treballà en paral·lel amb CML i amb fibroblasts de ratolí, donat que es disposava d'una línia cel·lular (ATCC, *American Type Culture Collection*) que expressava el receptor LRP (línia MEF: CRL-2214) i d'una deficient en aquest receptor (línia PEA13: CRL-2216). Ambdós tipus de fibroblasts es creixien en el medi indicat a la *taula 2.2*, a 37°C en una atmosfera humida amb 5 % CO₂ i cada dos dies se'ls-hi addicionava medi fresc. En arribar a confluència es tripsinitzaven i es subcultivaven seguint el mateix protocol que s'emprava per les CML (veure *secció II.1.1*).

II.3. Assajos en cultius cel·lulars

Els estudis tant en CML com en els fibroblasts es portaren a terme en cèl·lules que s'havien crescut fins assolir una subconfluència d'aproximadament un 70 % de la superfície del pouet canviant-los el medi cada dos dies. Les cèl·lules es portaven a quiescència per incubació durant 48 h en medi pobre en sèrum (medi sense sèrum humà i reduint el FCS fins a un 0,4 % (v/v)). Període durant el qual en alguns estudis s'incubaren les cèl·lules amb el tractament d'interès prèvia addició de les lipoproteïnes. Seguidament, es procedia amb el tractament d'incubació amb les lipoproteïnes en medi de cultiu sense FCS.

II.3.1. Incubació amb lipoproteïnes

Les LDLn emprades en els diferents experimentals havien estat aïllades 48 h abans d'ésser emprades i les diferents fraccions de lipoproteïnes modificades eren preparades immediatament abans d'addicionar-se a les cèl·lules.

Després del període de tractament de les cèl·lules amb medi pobre en sèrum i del pretractament corresponent (segons l'experimental oligonucleòtids contra LRP i lligants competidors, proteases,...), s'incubaren amb concentracions creixents de les diferents lipoproteïnes en estudi (20, 40, 50, 60, 100 µg proteïna LDL/mL, concentracions variables segons l'estudi) durant 18 h; període que s'allargava en aquests assajos en què es pretenia analitzar l'efecte de les lipoproteïnes al llarg del temps (0, 6, 12, 24, 48 h depenent de l'experimental). En tots els experimentals es processaren en paral·lel cèl·lules control sense tractar amb lipoproteïnes.

II.3.2. Assajos de competència de lligant

A fi d'establir el receptor implicat en la captació de les versicà-LDL, en una primera aproximació es portaren a terme assajos de competència de lligant. Es consideraren com a possibles receptors candidats: el receptor *scavenger*, el receptor asialoglucoproteic i dos receptors de la superfamília del rLDL (el propi rLDL i el receptor LRP).

Els assajos de competència de lligant es portaren a terme analitzant l'efecte dels diferents lligants sobre l'acumulació intracel·lular de CE derivada de les lipoproteïnes en estudi ja que aquests nivells reflecteixen la LDL que ha estat internalitzada per la cèl·lula. Extrapol·lació que pot fer-se donat que el contingut intracel·lular de CE en CML control (en absència de LDL) és negligible, i l'activitat de l'enzim HMGCoA reductasa és pràcticament inexistent en incubar les CML amb LDLn (Llorente-Cortés V 2000).

Prèvia addició de les lipoproteïnes, les cèl·lules s'incubaren durant 2 h amb els lligants indicat en la *taula VIII*.

A fi de perfilar la rellevància del rLDL en la captació de les diferents lipoproteïnes, en paral·lel amb els assajos de competència de lligant es bloquejà l'activitat del receptor amb un anticòs específic. De la mateixa manera que en els estudis de competència de lligant, l'anticòs contra el rLDL (12,5, 25 µg/mL) s'addicionà 2 h abans d'iniciar-se el tractament amb les lipoproteïnes. Es processaren en paral·lel cèl·lules control sense tractament amb els lligants i/o anticòs únicament, i amb o sense les diferents lipoproteïnes.

Taula VIII. Concentració dels lligants i tipificació dels seus receptors

Lligant	Receptor del lligant	Concentració del lligant en el cultiu
Lactoferrina	rLDL i LRP	50 µg/mL
Àcid poliinosínic	<i>Scavenger</i>	50 µg/mL
Galactosa	Asialoglucoproteic	9 mg/mL
Fetuïna	Asialoglucoproteic	100 µg/mL

Tots els lligants s'adquiriren de *Sigma*.

II.3.3. Incubació amb oligonucleòtids contra el LRP

Els estudis de competència de lligant posaren de manifest la implicació d'un receptor de la superfamília del rLDL en la unió i internalització de les versicà-LDL, així doncs, es bloquejà l'expressió del LRP a fi d'analitzar la seva possible implicació.

La manca d'un anticòs comercial eficaç en el bloqueig funcional del LRP ens portà a emprar una aproximació molecular per analitzar el paper del LRP en la internalització de lipoproteïnes (Llorente-Cortés V 2000). La transcripció de l'ARNm del LRP es bloquejà amb oligodeoxinucleòtids (ODNs) antisentit. Les CML es portaren a quiescència mantenint-les en medi deficient en sèrum durant 48 h, a l'inici d'aquest període foren tractades amb ODNs fosforotionats antisentit o ODNs sentit contra el LRP (10 µM) i es realitzà una segona addició 12 h abans de finalitzar aquest període. Tot seguit s'addicionaren a les cèl·lules les diferents lipoproteïnes. Es processaren en paral·lel cèl·lules control sense tractament amb els ODNs.

La seqüència d'ODNs escollida fou dissenyada per hibridar amb l'inici de transcripció de l'àcid ribonucleic missatger (ARNm) del LRP humà, a fi d'assegurar una millor eficiència en la inhibició de l'expressió del receptor LRP (Llorente-Cortés V 2000). S'empraren ODNs modificats en totes les bases, fosforotionats. Aquesta modificació augmenta l'estabilitat dels ODNs a l'interior cel·lular doncs els fa menys susceptibles a la degradació per nucleases cel·lulars i d'altra banda permet augmentar el rendiment en la internalització dins la cèl·lula ja que modifica la càrrega total de l'ODNs (Gewirtz AM 1998). S'escolliren seqüències de baix nombre de nucleòtids (15 nt) donat que són més fàcilment internalitzats (*taula IX*).

D'altra banda s'escollí una seqüència amb el màxim nombre de G i C donat que controlen la Tm i s'ha descrit que incrementat la Tm augmenta l'estabilitat dels ODNs segons l'equació:

$$T_m = n(2^\circ C) + m(4^\circ C) \quad n = A, T \quad m = G, C$$

Taula IX. Seqüència d'ODNs emprats

LRP sentit	5'-ATGCTGACCCCGCCG-3'
LRP antisentit	5'-CGGCGGGGTCAGCAT-3'

La seqüència d'ODN antisentit és complementària amb els nt del 466 al 481 de l'ARNm del LRP. Es corroborà (amb el programa *Genetic Computer Group*) que aquestes seqüències no hibridaven amb les seqüències de cap altra receptor (incluint el rLDL) analitzant a la base de dades del *GenBank*. Els ODNs foren sintetitzats usant química fosforamidita i purificats per cromatografia líquida d'alta pressió (*Roche*). El producte liofilitzat es resuspengué amb H₂O tractada amb dietilpirocarbonat (DEPC) (*taula 2.3*) i conservaren a -20°C fins a la seva utilització.

II.3.4. Tractament de les cèl·lules amb N-acetil-leu-leu-norleucinal (ALLN)

A fi d'analitzar la possible implicació dels SREBPs en el mecanisme de regulació del LRP, prèvia addició de les lipoproteïnes, les CML es preincubaven durant 24 h amb ALLN (25 µM, *Sigma*), un inhibidor del catabolisme dels SREBPs. L'extracte cel·lular es recollí amb *Tripure* per tal d'aïllar-ne l'ARN i la proteïna (*secció IV.1*).

II.3.5. Marcatge radioactiu de proteoglicans

Per tal d'estudiar la rellevància dels PGs en la captació de les lipoproteïnes es portà a terme un marcatge radioactiu dels PGs de nova síntesi i es purificaren els PGs del medi de cultiu, de la fracció cel·lular i de la MEC.

Es treballà en paral·lel amb tipus cel·lulars, CML i fibroblasts que expressen LRP (no tractades amb ODNs anti-LRP i cèl·lules MEF, respectivament) i cèl·lules que no expressen el LRP (tractades amb ODNs anti-LRP i cèl·lules PEA 13, respectivament). S'empraren

fibroblasts com a cèl·lules control donat que en nombrosos estudis previs s'ha emprat aquest tipus cel·lular per analitzar el paper dels HSPG i del LRP en la captació de diferents lligants.

Per tal d'assegurar un rendiment semblant del marcatge dels PGs es treballà amb el mateix medi de cultius en ambdós tipus cel·lulars. Per tant, únicament en aquest tipus d'experimental es canvià el medi de creixement de les CML (*taula 2.4*). Les cèl·lules es portaren a quiescència en medi deficient en sèrum (únicament s'hi mantenia FCS 0,2 % (v/v)) durant 48 h. Seguidament el medi de cultiu s'eliminava i s'addicionava medi fresc amb FCS 10 % (v/v) (per afavorir la proliferació cel·lular) i amb [³⁵S]Na₂SO₄ 20 µCi/mL (*Amersham*) que es mantenia durant 72 h per tal que els PGs biosintetitzats quedessin marcats radioactivament (Sartipy P 1996).

II.3.6. Digestió de proteoglicans

Després de 72 h de preincubació de les cèl·lules amb el [³⁵S]Na₂SO₄ es procedia a la degradació dels PGs a fi d'estudiar el paper dels diferents PGs en la captació de lipoproteïnes. Les diferents cèl·lules es tractaren amb una mescla de heparinasa I i III (HSI&III) (4 U.I./mL cadascuna de les proteases) o condroitinasa ABC (ChABC) (2 U.I./mL) per tal de degradar els HSPG i CSPG, respectivament. La HSI (*heparin liasa I, EC 4.2.2.7*), la HSIII (*heparin liasa III, heparitinasa I; EC 4.2.2.8*) i la ChABC (*ChABC liasa, EC 4.2.2.4*) són de *Sigma*. Els enzims es mantingueren en el medi de cultiu 2 h o 18 h a 37°C. Es processaren en paral·lel cèl·lules control sense digestió enzimàtica dels PGs, amb i sense lipoproteïnes.

II.3.7. Estudis de proliferació cel·lular

Es mesurà la incorporació de [³H]timidina en les CML com a indicador de nova síntesi d'àcid desoxiribonucleic (ADN), marcador de proliferació cel·lular. Les CML es sembraren a una 20.000 cèl·lules/cm² i es deixaven créixer fins a confluència, moment en què es portaven a quiescència mantenint-les durant 24 h amb un medi depleccionat de FCS (0,2 %). Tot seguit, es canvià el medi per medi fresc (sense sèrum) en el que s'hi adicionaven les LDLn i les LDLag (100 µg/mL) que es mantien en el cultiu durant 24 h. Passat aquest temps, les cèl·lules eren exhaustivament rentades a t_{amb} i sota agitació orbital suau amb rentats consecutius de 5 min cadascun amb PBS (*taula 1.3*), PBS-BSA 1% (p/v), PBS-BSA 1 % (p/v)-heparina 100 U.I./mL i finalment un altre rentat amb PBS a fi d'eliminar l'excés de lipoproteïnes no internalitzades, i seguidament, s'addicionava medi fresc amb [³H]timidina

1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ en presència o absència PDGF-BB 10^{-9} M durant 24 h. Al final d'aquest període, les cèl·lules es rentaren amb PBS, es fixaven amb metanol al 95 % fred durant 5 min i s'incubaven amb àcid tricloracètic durant 10 min en gel. Llavors les CML es dissolen NaOH 0,01 M i es procedia al comptatge de la [^3H]timidina incorporada determinant les comptes per minut (cpm) en un comptador Microbeta 1450 (*Trilux*)

III. ANÀLISI D'ACUMULACIÓ LIPÍDICA INTRACEL·LULAR

L'estudi de l'acumulació lipídica intracel·lular induïda per les diferents lipoproteïnes d'interès es portà a terme mitjançant extracció lipídica de les mostres cel·lulars i posterior anàlisi per cromatografia en capa fina (CCF).

III.1. Recollida de mostres cel·lulars

En acabar cadascun dels tractament cel·lulars destinats a estudis d'acumulació de CE intracel·lular, les cèl·lules foren rentades exhaustivament (veure *secció II.3.7*).

Després dels rentats, que permetien eliminar les LDL que no havien estat internalitzades i que restaven unides a la superfície cel·lular, les cèl·lules (500.000 cèl) es recollien amb 1 mL de NaOH 0,1 M amb l'ajuda d'un raspall suau. La mostra es guardava a -20°C fins a ésser analitzada.

III.2. Extracció lipídica

L'acumulació intracel·lular de CL i CE es valorà quantitativament mitjançant CCF, a partir de l'extracte cel·lular (extracte en NaOH) obtingut després d'incubar les cèl·lules amb les diferents lipoproteïnes en estudi (*secció II.3.1*). Es portà a terme una separació dels lípids per extracció amb solvents orgànics. Per l'extracció lipídica s'empraren únicament 800 μL de la suspensió en NaOH i 100 μL es guardaren per tal de mesurar la concentració proteica (seguint protocol *secció I.3.1*) que s'emprà per normalitzar la concentració de CE de cadascuna de les mostres (Llorente-Cortés V 2000). El protocol d'extracció seguit és l'establert per (Bligh EG 1959) amb alguna modificació com es detalla a continuació.

En tubs de vidre pirex es col·locaven 800 μL de l'extracte cel·lular en NaOH i s'hi addicionaven 3 mL d'una solució $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (2:1 v/v) (el metanol afavoreix el lisat de les cèl·lules que inicia el NaOH i deixa accessible el contingut lipídic) i s'agitava enègicament amb un agitador vibrador. Seguidament s'hi addicionaven 1 mL d' H_2O i 1 mL de CH_2Cl_2 i s'agitava novament. La mescla es centrifugava a 1.500x g durant 15 min a t_{amb} obtenint-se una separació estable de la fase aquosa (fase superior) de la fase orgànica (fase lipídica) per una interfase blanquinosa (component proteic) que les separava clarament. Amb l'ajuda d'una xeringa *Hamilton* es separava la fase orgànica (fase inferior) que es traspassava a tubs de vidre cònics, es repetia de nou l'extracció (per augmentar el rendiment de lípid obtingut) addicionant 1mL de CH_2Cl_2 i repetint la centrifugació. Novament es recuperava la fase orgànica que s'adjuntava a la fracció separada anteriorment. L'extracte lipídic es concentrava per eliminació total del solvent orgànic mitjançant evaporació sota corrent de nitrogen (afavoreix l'evaporació i evita l'oxidació dels fosfolípids de l'extracte) treballant en condicions de poca llum per minimitzar l'oxidació dels lípids de la mescla. Les mostres una vegada evaporades es guardaven a 4°C durant una nit o bé es congelaven a -20°C fins a ésser analitzades.

III.3. Cromatografia en capa fina

L'extracte lipídic cel·lular s'analitzava per CCF, tècnica que permet analitzar el contingut de CL (que es manté constant i s'empra com a control intern dins de cada experiment) i el CE de la mostra.

El precipitat obtingut de l'evaporació es deixava atemperar i es resuspensia cada mostra en 100 μL de CH_2Cl_2 i s'agitava intensament amb un agitador vibrador a fi d'obtenir una completa dissolució de l'extracte lipídic i tot seguit s'aplicaren a la placa de cromatografia (plaques de sílica *gel G-25*, *Macherey-Nagel*). En la mateixa placa s'aplicaven tres concentracions conegudes d'una mescla de CL (69, 138, 276 mg/L) i CE (160, 320, 640 mg/L palmitat de colesterol) per tal de quantificar el contingut lipídic cel·lular de les mostres. Les plaques s'introdueixen en cubetes cromatogràfiques i s'utilitzava com a fase mòbil per la separació la solució orgànica heptà:dietilèter:àcid acètic glacial (74:21:4 (v:v:v)). Es deixava que la fase mòbil ascendís per capil·laritat per la placa cromatogràfica fins a assolir un primer front a 10 cm del punt d'aplicació de les mostres. Seguidament es retiraven les plaques de la cubeta cromatogràfica i es deixaven assecar a l'aire evitant l'exposició a la llum.

Posteriorment s'introdueixen en la cubeta amb una fase mòbil d'heptà que es deixava ascendir fins a un segon front a 14 cm del punt d'aplicació de les mostres. Novament es deixaven assecat completament les plaques i es tenyien durant 1 min amb la solució de colorant recentment preparada: 12,5 g d'àcid fosfomolibdic (*Fluka*) en 250 mL d'etanol i posteriorment s'addicionen 12,5 mL d'àcid sulfúric concentrat. Tot seguit es deixaven assecat completament a t_{amb} i s'introdueixen en un forn a 100°C durant 7 min. Transcorregut aquest temps les bandes de CL i CE presentaven una coloració blavosa sobre un fons groguenc que es quantificaven per densitometria (densitòmetre *Molecular Dynamics*). Els resultats obtinguts de la quantificació de les bandes de les mostres s'interpol·laven amb els valors de la recta patró.

IV. ESTUDIS D'EXPRESSION GÈNICA

IV.1. Obtenció de proteïna i ARN dels cultius cel·lulars

Acabats els tractaments cel·lulars es procedia a l'obtenció de la proteïna i l'ARN cel·lulars mitjançant el reactiu *Tripure* (*Roche*). El mètode d'aïllament del *Tripure* es basa en el mètode de Chomczynski P 1987 i permet l'aïllament de l'ARN total, l'ADN i proteïna des de la mateixa mostra cel·lular. El procés té lloc mitjançant una separació en fase líquida on la combinació de sals, urea, fenol i altres detergents del reactiu, que actuen com a agents desnaturalitzants, permet la separació de l'ARN, que resta en la fase aquosa, de l'ADN i les proteïnes que queden en la fase orgànica i en la interfase. L'ADN es separa de la proteïna per precipitació amb etanol. Es seguí el protocol establert per la casa comercial, seguidament es resumeix el procediment seguit, s'eliminava el medi de cultiu i es rentaven les cèl·lules amb PBS (*taula 1.3*) fred, a fi d'eliminar possibles restes de components del medi de cultiu o de proteïnes de secreció. A continuació s'addicionava el reactiu *Tripure* (1 mL reactiu / 30 cm² de placa), en fred, directament sobre la placa de cultius i mitjançant raspats es recollia l'extracte cel·lular que es transferia a un tubs eppendorf. S'addicionaven 200 µL de cloroform i s'agitava intensament amb un agitador vibrador. Per centrifugació a 12.000x g 15 min 4°C s'aconseguia separar la fase aquosa incolora (superior, contenia l'ARN) de la interfase i de la fase orgànica vermella (inferior, contenia l'ADN i proteïna). L'ARN es precipitava per addició de 1,5 mL d'isopropanol en fred i posterior centrifugació a 12.000x g 4°C 10 min, el

precipitat obtingut es rentava amb etanol al 75 % (v/v en H₂O-DEPC (*taula 2.3*) i obtenint-se l'ARN per centrifugació 7.500x g 20 min 4°C, s'eliminava l'etanol i es deixava assecar el precipitat que era resuspès en volum H₂O-DEPC convenient (10-15 µL) i es guardava a -80°C fins a ésser emprat. L'ADN s'obtenia per precipitació, amb 500 µL d'etanol al 100 %, de la interfase i la fase orgànica i centrifugació a 2.000x g 5 min 4°C. Del sobrenedant se n'obtenia la proteïna per precipitació amb 800 µL d'isopropanol i posterior centrifugació a 12.000x g 10 min a 4°C. El precipitat es rentava tres vegades amb hidrocloreur de guanidina 300 mM en etanol 95 % (v/v), precipitant-se cada vegada la proteïna per centrifugació a 7.500x g 5 min 4°C. Seguidament es rentava la proteïna amb 1,5 mL d'etanol al 100 % mantenint-lo a t_{amb} durant 20 min i es centrifugava a 7.500x g 5 min a 4°C. Tot seguit s'eliminava l'etanol i el precipitat de proteïna es dissolia amb dodecil sulfat sòdic (SDS) 1% (p/v) (50 - 100 µL). La proteïna així dissolta es conservava a -20 °C fins a ésser estudiada.

Es controlava sistemàticament la integritat de l'ARN i es quantificava paral·lelament amb la proteïna per estudiar-se per transcripció inversa associada amb la reacció amb cadena de la polimerasa (RT-PCR) (*secció IV.2*) i western blot (*secció IV.3*), respectivament.

IV.2. Anàlisi dels nivells d'ARNm per RT-PCR

L'estudi de l'expressió dels nivells d'ARNm dels gens d'interès es portà a terme per la tècnica de retrotranscripció de l'ARN total i posterior amplificació selectiva del fragment de la còpia d'àcid desoxiribonucleic (ADNc) del gen d'interès mitjançant PCR. Pel què fa a la PCR en els primers estudis (*Articles I i II*) es portà a terme per PCR semiquantitativa (*Aparell Techne, GENIUS*) i els últims amb el nou aparell de PCR a temps real (*Abiprism 7000, Applied Biosystems*).

IV.2.1. Reacció de la transcriptasa inversa

Mitjançant l'activitat de la retrotranscriptasa es sintetitzava una cadena d'ADN complementària a una molècula d'ARN emprant com a encebador un oligonucleòtid encebador de 12 a 18 timidines (*d(T)₁₂₋₁₈, Invitrogen*). A fi d'evitar la formació d'estructures secundàries de l'ARN i per assegurar una millor eficàcia de l'encebador, la mescla d'ARN total (0,5-1,5 µg), amb oligo dT (0,05 µg) es portava a un volum final de 5 µL amb H₂O-DEPC i s'escalfava a 70°C durant 5 min i tot seguit es refredava ràpidament en gel. A

continuació s'afegien a la mescla la resta de components de la reacció de RT i s'incubava a 42°C durant 1 h. La composició final de la reacció de RT es detallen a la *taula X*.

Taula X. Composició de la mescla de RT-PCR

Reactius	Concentració final
Tampó 5x (Invitrogen)*	1,3x
Ditiotreitol (DTT) (Invitrogen)	13 mM
ARNaseout™ Ribonucleasa (Recombinant) (Invitrogen)	1,3 U.I./μL
dNTPs (Roche)**	667 μM
Superscript™ II Transcriptasa reversa (Invitrogen)	13,3 U.I./μL
ARNm + d(T) ₁₂₋₁₈	10 μL
H ₂ O-DEPC	Vf = 15 μL

* Tampó 5x: Tris-HCl 250 mM, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM, pH 8,3.

** dNTPs: ATP, GTP, TTP i CTP cadascun d'ells es porta a la concentració final de 5 mM.

Finalitzada la reacció de RT s'escalfava la mescla a 75°C durant 10 min a fi d'inactivar l'enzim, i es guardaven els ADNc a -20°C fins a ésser emprats.

IV.2.2. PCR semiquantitativa

La reacció de PCR requereix de ADNc que serveix de motlle perquè la (*Taq*)-ADN polimerasa sintetitzi la cadena complementària. La (*Taq*)-ADN polimerasa, (ADN-polimerasa termoestable purificada de la bacteria *Thermus aquaticus* (*Taq*), té una temperatura òptima d'activitat de 72°C, Watson JD 1992) s'empra per sintetitzar una molècula d'ADN entre dos punts partint de dos oligonucleòtids que actuen com encebadors, per l'ADN-polimerasa, que són complementaris, cadascun d'ells, d'una determinada regió de l'ADN motlle.

Les condicions de la reacció de PCR emprades d'indiquen a la *taula XI*, cal dir, que en els nostres estudis s'empraren nucleòtids marcats amb digoxigenina (*DIG-11-Detection, DIGmix, Roche*) a fi d'obtenir els productes de la PCR marcats permetent, així, ésser detectats amb l'ajuda d'un kit (*Dig Luminiscent Detection kit, Roche*). Després d'una desnaturalització a 95°C durant 5 min, la reacció de PCR es portà a terme en el termociclador (*Techne GENIUS*) segons la seqüència que s'indica a la *taula XII*.

Acabada la seqüència de la reacció de PCR es seguia amb la reacció d'extensió final a 72°C durant 10 min. A la *taula XIII* s'indiquen els oligonucleòtids encebadors emprats per l'estudi dels gens d'interès així com les condicions hibridació, el nombre de cicles i el tamany del producte de PCR per cada gen en estudi. També s'indiquen els oligonucleòtids i condicions de PCR corresponents al gen gliceraldehid-3-P-deshidrogenasa (GAPDH), gen constitutiu, l'expressió del qual s'emprà per normalitzar l'expressió de la resta de gens.

Taula XI. Composició de la mescla de PCR

Reactius	Concentració final
Tampó 10x (Roche)*	1x
DIGmix 10x (Roche)**	1x
Encebador sentit (forward) (Roche)	4 ng/μL
Encebador antisentit (reverse) (Roche)	4 ng/μL
(Taq)ADN-polimerasa (Expand high fidelity) (Roche)	0.05 U.I./mL
ADNc (1:2 o 1:4 segons el gen)	2 μL
H ₂ O	Vf = 25 μL

*Tampó 10x: conté MgCl₂ 15 mM; ** DIGmix 10x: 2 mM dATP, dGTP, dCTP, 1,9 dTTP i 0,1 mM dig-11-UTP.

Taula XII. Condicions de la seqüència de la PCR semiquantitativa

Etapes PCR	Temperatura (temps)
Desnaturalització	94°C (30 s)
Hibridació	Temperatura i temps ajustats per cada gen (<i>taula XIII</i>)
Síntesi	72°C (1 min)
	* Nombre de cicles ajustat per cada gen d'interès (<i>taula XIII</i>)

Visualització dels productes de PCR

Els productes de la reacció de PCR es separaven mitjançant electroforesi en gels d'agarosa i posteriorment es transferien a membranes de niló que s'incubaven amb un anticòs contra la digoxigenina unit a fosfatasa alcalina i es procedia a un revelat per quimioluminiscència.

Taula XIII. Condicions de PCR pels gens en estudi

Gen	Encebador sentit	Encebador antisentit	Producte de PCR	Tm (temps hibridació)	Cicles
LRP	5'ccagaagattgatggcactg3'	5'tagacactgccactccgata3'	543 pb	Tm 55°C 40 s	20
rLDL	5'caatgtctcaccaagctctg3'	5'tctgtctcgagggtagctg3'	258 pb	Tm 58°C 1 min	25
SREBP1	5'atgtagtcatggccttgcg3'	5'tgtgacctgcagatccagc3'	330 pb	Tm 60°C 40 s	20
SREBP2	5'tgggaccattctgaccacaa3'	5'tgtgacctgcagatccagc3'	533 pb	Tm 60°C 40 s	22
GAPDH	5'ttcaccaccatggagaaggc3'	5'gcagggatgatgttctgggc3'	265 pb	Tm 56°C 45 s	20

LRP: proteïna relacionada amb el receptor de les LDL, rLDL: receptor de les LDL, SREBP: proteïna d'unió a elements regulats per esterols i GAPDH: gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa.

1. Electroforesi dels productes de PCR

10 µL del producte de la reacció de PCR amb el corresponent tampó de càrrega (*taula 4.1*, concentració final 2x) es sotmetien a electroforesi en gel d'agarosa en tampó TAE (*taula 4.2*) 1,5 - agarosa 2 %, segons el tamany del producte de PCR durant 1 h a 80 V emprant TAE com a tampó de recorregut.

Finalitzada l'electroforesi, el gel es transferia per capil·laritat a una membrana de niló (*NytranSuperCharge, Schleicher&Schuell*) emprant el tampó SSC 10x (*taula 4.3*). El sistema de transferència consistia en col·locar en una cubeta el tampó SSC 10x i es montava un pont amb 3 papers *Whattman*, prèviament humits amb el mateix tampó, sobre els quals es col·locava el gel i amb cura s'hi superposava la membrana de niló. Sobre la membrana s'hi col·locaven dos papers *Whattman* humitejats amb tampó i dos més de secs, sobre els quals s'hi adicionava un gruix considerable de papers de filtre i sobre d'ells un pes que facilitava la transferència. La transferència es deixava progressar tota la nit i tot seguit es fixava la membrana de niló amb llum ultraviolada (UV) amb una energia de 0,12 J/cm².

2. Detecció de l'ADN marcat amb digoxigenina

Després de la fixació de l'ADN a la membrana amb llum UV es procedia a realitzar un rentat ràpid amb SSC 2x (*taula 4.3*), a fi d'eliminar possible excés de sals a la superfície de la membrana i tot seguit s'equilibrava durant 5 min amb el tampó I (*taula 4.4*). A continuació es

bloquejava la membrana amb la solució de bloqueig al 1% (p/v) (*Blocking reagent 1363514, Roche*) en el tampó I durant 30 min i sota agitació orbital i tot seguit s'incubava amb l'anticòs antidigoxigenina unit a fosfatasa alcalina 1/10.000 (*kit 1363514, Roche*) en el tampó I durant 1 h a t_{amb} i agitació. Prèvia incubació amb el substrat de la fosfatasa portaven a terme tres rentats de 10 min cadascun amb TBS (*taula 4.5*) seguits d'un rentat de 5 min amb agitació amb tampó III (*taula 4.6*) per equilibrar el pH. Tot seguit s'incubava la membrana durant 5 min, sota agitació i protegida de la llum, amb el substrat de la fosfatasa alcalina CSPD (*Disodi 3-(4-metoxispiro(1,2-dioxetan-3,2'-15'-cloro)tricyclo[3.3.1.1.3⁷]decan)-4-il)fenilfosfat, Roche*) 0,6 % (v/v) en tampó III i a continuació es muntava sobre un suport rígid, es recobria amb plàstic transparent i s'incubava durant 15 min a 37°C, per intensificar la reacció de quimioluminiscència, i seguidament es posava a contactar amb una pel·lícula autoradiogràfica (*Curix RP2, AGFA*) el temps necessari per aconseguir una intensitat de les bandes adequada. La quantificació de la intensitat de les bandes es portà a terme per densitometria (densitòmetre *Molecular Dynamics*).

IV.2.3. PCR quantitativa

En els estudis més recents es disposà d'un aparell de PCR quantitatives (*AbiPrism 7000, Applied Biosystems*) també anomenades PCR a temps real. El fonament teòric d'aquest tipus de PCR és lleugerament diferent al de la PCR semiquantitativa.

Fonament teòric de la PCR quantitativa

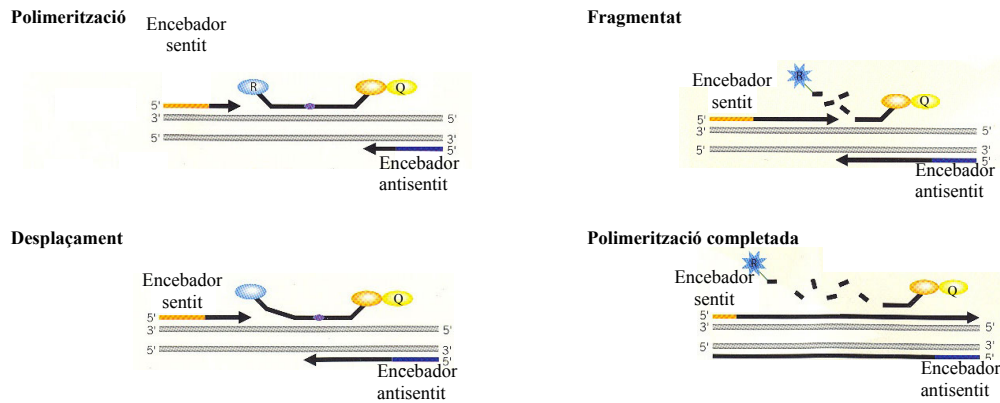
La principal diferència entre la PCR semiquantitativa i la PCR a temps real és que en aquesta última es compara el cicle a partir del qual es comença a observar amplificació del fragment d'ADN d'interès, mentre que en la PCR semiquantitativa es comparen els nivells de ADN assolits al final de la reacció de PCR. Concretant, en la PCR a temps real, mitjançant un marcatge amb fluorescència, es porta a terme un seguiment del procés d'amplificació del fragment d'ADN en estudi, obtenir-se una representació gràfica de la intensitat de fluorescència a cadascun dels cicles de la seqüència de la reacció de PCR. En el cas de la PCR semiquantitativa es fa una quantificació de la quantitat d'ADN al final de la corba, en què la reacció d'amplificació de l'ADN ha arribat a una saturació (aconseguint una baixa capacitat de discriminació de nivells d'ADN molt semblants). En el cas de la PCR a temps real, en obtenir-se la corba de tot el procés d'amplificació de l'ADN, es pot analitzar el cicle a partir

del qual s'inicia amplificació de l'ADN (*threshold cycle*, Ct). Aquest tipus de quantificació permet tenir una major exactitud en la comparació de nivells d'ADN entre diferents mostres doncs una diferència d'un cicle en l'inici de l'amplificació (Ct) suposa una diferència del doble en la concentració d'ADN. El mètode permet diferenciar fins a 0,01 de Ct.

La base de la reacció en cadena de la polimerasa per la PCR a temps real és semblant a la de la PCR semiquantitativa. També cal dissenyar uns oligonucleòtids encebadors pel gen en estudi, però a més és necessària una sonda, fragment d'oligonucleòtids complementari a una de les cadenes de l'ADN motlle i situat a la regió que s'amplificarà amb els encebadors dissenyats. La sonda és la que permet el seguiment de la reacció d'amplificació per fluorescència ja que està marcada en un extrem amb fluoresceïna (extrem anomenat *reporter*, marcat amb FAM) i en l'altre extrem amb rodamina (extrem anomenat *quencher*). Quan la sonda es manté íntegra l'energia que emet el *reporter* és absorbida pel *quencher* i aleshores no es detecta fluorescència. A l'inici de la reacció de PCR, els encebadors i la sonda hibriden amb la cadena d'ADN corresponent, però durant l'activitat de la polimerasa hi ha una extensió des de l'oligonucleòtid encebador fins que la polimerasa assoleix la regió de l'ADN on hi ha unida la sonda, aleshores l'ADN polimerasa és capaç de tallar el fluorocrom del *reporter* fet que provoca un allunyament del *reporter* respecte el *quencher* de manera que en aquest moment l'emissió de fluorescència del *reporter* no està inhibida i és detectable. Cal dir que per cada cadena d'ADN de nova síntesi s'allibera una molècula de *reporter* fet que permet fer una correlació entre intensitat de fluorescència i quantitat d'ADN (veure *figura 6*).

Una altra diferència substancial respecte la PCR semiquantitativa és l'optimització de les condicions per l'estudi dels diferents gens d'interès. Mentre que en la PCR semiquantitativa es seleccionen els encebadors i a continuació s'optimitza la temperatura d'hibridació i el nombre de cicles de la seqüència de la reacció de la PCR. En la PCR a temps real les condicions de temperatura d'hibridació dels encebadors i el nombre de cicles es mantenen constants doncs s'escullen sempre els encebadors i la sonda amb una T_m propera o igual a 60°C i es considera que la reacció de PCR de tots els gens en estudi es satura abans del cicle 40. Així doncs, les condicions de la PCR a temps reals estan ja preestablertes en el *software* de l'aparell (*taula XIV*).

Figura 6. Esquema teòric del procés que es desenvolupa en la PCR quantitativa (adaptat de pòster d'Applied Biosystems)



En la polimerització la sonda porta un senyal fluorescent anomenat *reporter* (R) i un anomenat *quencher* (Q) localitzats als extrems 5' i 3' de la sonda, respectivament. Durant el desplaçament al llarg de la cadena, la sonda resta intacta i l'emissió del *reporter* es troba bloquejada per la presència del *quencher*. El procés de fragmentació que produeix l'ADN polimerasa durant cada cicle d'extensió porta a la separació del *reporter* de la resta de la sonda. La polimerització és completada quan el *reporter* és separat completament del *quencher* i aleshores la senyal del reporter emet una fluorescència característica.

Taula XIV. Condicions de la seqüència de la PCR quantitativa

Etapes PCR	Temperatura (temps)
Desnaturalització	95°C 15 s
Hibridació	60°C 20 s
Extensió	72°C 30 s
	40 cicles

* No es requereix extensió final doncs la quantificació es fa per quantificació de fluorescència en cada cicle.

Optimització de les condicions de la PCR quantitativa

1. Disseny d'oligonucleòtids encebadors i sondes per la PCR quantitativa

El disseny dels oligonucleòtids encebadors i sondes per la PCR a temps real es portà a terme introduint la seqüència de ADN del gen en estudi en el programa *Primer Express®*, inclòs en el *software* de l'aparell de PCR. Aquest programa suggereix 200 combinacions possibles d'encebadors amb la sonda més adient en cada cas i cal perfilar la combinació que sembla més adequada.

Cal dir que en totes les PCR realitzades s'empraren sondes Taq-man amb hibridació de MGB (*Applied Biosystems*). Aquest tipus de sondes porten unida una molècula de MGB capaç d'intercal·lar-se en la doble cadena de l'ADN i permet així treballar amb sondes de

menor tamany i menor T_m i d'altra banda els múltiples anells aromàtics que la conformen eviten la fluorescència basal del *reporter*.

2. Optimització de les condicions de PCR

Dissenyats els encebadors i la sonda adients cal passar a optimitzar la concentracions d'ambdós a la mescla de reacció així com també cal establir una recta patró (emprant dilucions de ADNc) per poder quantificar els resultats. A la *taula XV* s'indiquen els components de la mescla de PCR.

Taula XV. Components de la mescla de PCR

Reactius*	Concentració final
Taqman Universal PCR Master Mix **	1x
Encebador sentit	50 – 900 nM
Encebador antisentit	50 – 900 nM
Sonda Taqman	125 – 250 nM
Mostra d'ADN (síntesi partint de 0,5 – 1,5 µg ARN)	2 µl (ADNc 1:2 – 1:8)
En H ₂ O	V _f = 50 µL

* Tots els reactius emprats en la realització de la PCR a temps real s'adquiriren d'*Applied Biosystems*.

** La Taqman Universal PCR Master Mix conté la polimerasa i les sals requerides per l'enzim.

3. Optimització de la concentració d'encebadors i sondes

En primer lloc es procedia a l'optimització de la concentració dels encebadors. És important optimitzar la concentració dels encebadors doncs permet compensar les diferències en el grau d'hibridació dels dos encebadors en l'ADNc motlle fruit de possibles variacions en la T_m de cadascun d'ells. L'optimització de la concentració dels encebadors es realitzà creant una matriu de combinació de les possibles concentracions dels dos encebadors (*taula XVI*), mantenint fixada la sonda a la màxima concentració i emprant ADNc sense diluir (procedent de 1 µg ARN). S'escollien com a concentracions òptimes d'encebadors aquella combinació que permetia una amplificació de l'ADN a un Ct més baix donant una intensitat de fluorescència superior.

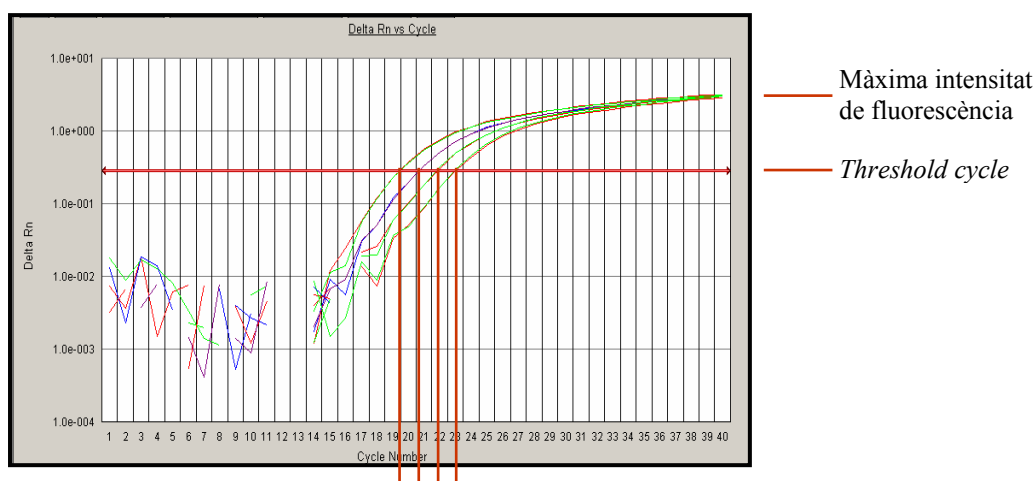
Seguidament, s'optimitzava la concentració de sonda tenint en compte la combinació optimitzada de les concentracions dels dos encebadors, emprant ADNc sense diluir. Es provaven tres concentracions de sonda: 125, 200 i 250 nM i s'escollia com a concentració

idònia aquella que permetia una amplificació de l'ADN a un Ct més baix sense excedir-nos de sonda. Optimitzats els encebadors i la sonda s'establia una recta patró, per cada gen en estudi, realitzant 4 dilucions (de 1/2 d'una respecte l'anterior) d'una mescla de ADNc (procedent de 1 µg ARN). S'establia la corba estàndard representant Ct vs log de la dilució (*figura 7*).

Taula XVI. Optimació concentracions d'encebadors

		Encebador antisentit		
		50 mM	300 mM	900 mM
Encebador sentit	50 mM	50 / 50	300 / 50	900 / 50
	300 mM	50 / 300	300 / 300	900 / 300
	900 mM	50 / 900	300 / 900	900 / 900

Figura 7. Corbes d'amplificació de diferents dilucions de ADNc



Ct de les dilucions 1;1/2;1/4 i 1/8 de l'estàndard

4. Encebadors i sondes emprats

Mitjançant el programa *Primer Express®* (*Applied Biosystems*) es dissenyaren els encebadors i sondes (6'FAM-MGB) pels diferents gens en estudi. Cal dir però, que actualment *Applied Biosystems* disposa de preparats d'encebadors i sondes per a mostres humanes (*Assays-on-Demand*) a les concentracions adequades per l'anàlisi de diferents gens, és el cas dels encebadors i sonda que hem emprat pel gen de la GAPDH, 18S ARNr, Bcl₂, Bax i CPP32. En la *taula XVII* s'indiquen els encebadors i sondes emprats en cada cas i les concentracions de treball més adients.

5. Valoració dels resultats de la PCR

Els valors de Ct dels diferents gens es determinaren i es normalitzaren amb el gen constitutiu GAPDH o amb el 18S ARNr, segons el cas. Quan l'eficiència d'amplificació dels gens en estudi era semblant a la del control endogen (les corbes estàndards del gen problema i la del control endogen (GAPDH o 18S ARNr) en l'interval de les concentracions de l'ADN en estudi), el mètode emprat per la comparació del Ct de les diferents mostres fou el delta delta Ct. En aquest mètode es compara el valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ d'entre mostres que s'obté d'aplicar la següent fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = \frac{Ct \text{ del gen} / Ct \text{ basal gen}^*}{Ct \text{ GAPDH} / Ct \text{ basal GAPGH}^*}$$

* Condicions basals = control negatiu del tractament provat en cada experimental

Taula XVII. Encebadors i sondes per la PCR dels gens d'interès

Gens	Encebador sentit (concentració final)	Encebador antisentit (concentració final)	Sonda (concentració final)	Producte PCR
LRP	5'gagctgaaccacgcctttg3' (300 nM)	5'ggtagacactgccactccgatac3' (300 nM)	5'ttgccatggtgacacag3' (200 nM)	79 pb
rLDL	5'tgacaatgtctcaccagctctg3' (900 nM)	5'ctcacgctactggcttcttct3' (300 nM)	5'tctgccagcaacgctcg3' (200 nM)	70 pb
Bcl₂	<i>Assay-on-Demand</i> Hs00153350			
Bax	<i>Assay-on-Demand</i> Hs00180269			
CPP32	<i>Assay-on-Demand</i> Hs00263337			
18S ARNr	<i>Assay-on-Demand</i> n° 4319413E			
GAPDH	<i>Assay-on-Demand</i> n° 4326317E			

Tots els encebadors i sondes són d'*Applied Biosystems*

IV.3. Anàlisi de proteïnes cel·lulars per western blot

L'anàlisi de l'expressió proteica dels diferents gens en estudi es realitzà per la tècnica d'electroforesi en gel de poliacríamida- SDS (SDS-PAGE) descrita per *Laemmli* (Laemmli UK 1970). Aquesta tècnica permet la separació de les proteïnes en funció del seu pes molecular ja que les mostres proteiques estant dissoltes en SDS, detergent que desnatura les proteïnes i neutralitza la seva càrrega. Un cop portada a terme l'electroforesi, les proteïnes es transferiren a membranes de nitrocel·lulosa en les què les proteïnes d'interès es detectaren amb els corresponents anticossos primaris i secundaris units a una molècula amb activitat enzimàtica que permet una detecció mitjançant quimioluminiscència.

IV.3.1. Electroforesi en gel d'acrilamida

Les mostres proteiques s'obtingueren mitjançant el protocol comercial *Tripure* (secció IV.1). Es determinava la concentració proteica (taula I.3.1) de les mostres en SDS 1% (p/v) i es carregaven en els gels entre 15 i 20 µg de proteïna total que es prepararen amb el tampó de càrrega de *Laemmli* (taula 4.7) i s'escalfaren a 100°C durant 5 min abans d'ésser carregades.

El sistema d'electroforesi emprat fou el sistema *Mini Protean-II* (*Bio-rad*), seguint les especificacions de la casa comercial. Es prepararen els gels concentrador i separador com s'indica a la taula 4.8. L'electroforesi es realitzà en el tampó d'electroforesi de *Laemmli* (taula 4.9) i a un voltatge de 60 V fins que les mostres entraven completament en el gel concentrador, seguidament es mantenia un voltatge d'entre 80-100 V.

IV.3.2. Transferència a membranes de nitrocel·lulosa

Finalitzada l'electroforesi es portà a terme la transferència de les proteïnes a una membrana de nitrocel·lulosa (*Bio-rad*), amb el sistema de transferència *Trans-Blot Apparatus* (*Bio-rad*) seguint les especificacions de la casa comercial. La transferència es portà a terme a 200 mA a 4°C durant tota una nit. El tampó de transferència emprat s'indica a la taula 4.10.

IV.3.3. Detecció de proteïnes

Es comprovava que la quantitat de proteïna carregada de les mostres fos constant entre elles mitjançant tinció de la membrana amb solució de Vermell de *Ponceau* (taula 4.11) durant uns 3 min i eliminant l'excés de colorant amb H₂O destil·lada. A continuació es saturava la membrana amb la solució de bloqueig (TBS (taula 4.12) -Tween 0,05 % (v/v) - llet desnatada en pols *Asturiana*®) 5 % (p/v)) durant tota la nit a 4°C o bé 2 h a t_{amb} i sota agitació suau. Seguidament s'incubaren les membranes amb l'anticòs primari pertinent (taula XVIII) preparat en la solució de bloqueig i es mantenia en agitació suau 1h a t_{amb}. Tot seguit es rentava la membrana amb TBS-Tween 0,05 % (2 X 15 min) i seguidament amb TBS (2 X 15 min) amb agitació vigorosa i a t_{amb}. Finalitzats els rentats s'incubaven les membranes amb l'anticòs secundari unit a peroxidasa (taula XVIII) 1 h a t_{amb} i en agitació suau i tot seguit es procedia amb els mateixos rentats que en el cas de l'anticòs primari.

Taula XVIII. Anticossos primaris i secundaris i condicions d'electroforesi

<i>Anticossos primaris</i>					
Antigen diana	Condicions d'electroforesi	Tipus	Proveïdor	Referència	Dilució
β-LRP (85 KDa)	No reductores	Monoclonal	Research Diagnostics	RDI 61067 (Clone 8B8)	1/40
α-actinina (100 KDa)	Reductores	Monoclonal	Chemicon International	MAB 1682	1/10.000
CPP32 (32 KDa)	Reductores	Monoclonal	Transduction Laboratories	clone 19	1/1.000
α-actina (42 KDa)	Reductores	Monoclonal	DAKO	clone 1A4	1/10.000
<i>Anticossos secundaris</i>					
	Espècie reconeguda	Origen	Proveïdor	Referència	Dilució
β-LRP (85 KDa)	Ratolí	Cabra	DAKO	P0161	1/20.000
α-actinina (100 KDa)	Ratolí	Cabra	DAKO	P0161	1/20.000
CPP32 (32 KDa)	Ratolí	Cabra	DAKO	P0161	1/10.000
α-actina (42 KDa)	Ratolí	Cabra	DAKO	P0161	1/20.000

Finalment, s'aplicava sobre la membrana (durant 7 min) la solució *Supersignal[®] West Dura* (Pierce) substrat que en reaccionar amb la peroxidasa unida a l'anticòs secundari dona lloc a un producte quimioluminiscent. Ràpidament s'exposava la membrana, col·locada sobre un suport rígid, a una pel·lícula autoradiogràfica (*Curix RP 2, AGFA*) durant un període de 30 s a 15 min o més, segons la intensitat de la senyal.

V. ESTUDI DE LA Matriu Extracel·lular

V. Caracterització per microscòpia òptica

L'adhesió de les LDLag a la superfície cel·lular s'analitzà per microscòpia òptica. Les cèl·lules (CML i fibroblasts) es fotografieren després d'eliminar les lipoproteïnes que no s'havien adherit a la superfície mitjançant un rentat amb PBS (*taula 1.3*).

V.2. Caracterització de l'ultraestructura de la matriu extracel·lular

A fi d'estudiar l'ultraestructura de la MEC de les CML i dels fibroblasts, les mostres cel·lulars s'estudiaren mitjançant la tècnica de *Freeze-etching* (Severs NJ 1995) que permet analitzar les característiques superficials d'una mostra biològica mitjançant microscòpia

electrònica. Aquesta tècnica es basa en la congelació ràpida de la superfície exposada de la mostra biològica, seguida d'una extracció de l'H₂O congelada mitjançant sublimació controlada en una càmera de buit, i posterior metal·lització i digestió del material biològic a fi d'obtenir-se un motlle exacte de la mostra que pot ésser estudiat per microscòpia electrònica.

Les cèl·lules (CML i els fibroblasts) es creixien en cubreobjectes i es tractaven o no amb HSI (4 U.I./mL) o ChABC (2 U.I./mL) a 37°C durant 2 h (*secció II.3.6*). Es fixaren les cèl·lules amb glutaraldehyd 1,6 % (p/v) en fosfat sòdic 0,1 M en H₂O pH 7,2 durant 45 min a 4°C i seguidament es portaven a terme tres rentats de 5 min amb H₂O seguits d'un rentat amb metanol al 10 % (v/v) durant 5 min. A continuació es procedia a la criofixació de les mostres.

V.2.1. Criofixació de mostres cel·lulars. *slam-freezing*

L'estabilització de la mostra, per evitar possibles artefactes en el seu estudi, es portà a terme mitjançant una criofixació per projecció de la mostra contra una superfície metàl·lica freda, tècnica que rep el nom de *slam-freezing*.

Es treballà amb el sistema de criofixació per *slam-freezing* en buit *Cryovacummblock Reichert-Jung (Leica)* que consta d'un bloc de coure polit refredat amb N₂ líquid (-196°C) situat a l'interior d'una càmera de buit i d'un sistema d'injecció electromagnètic que projecta la mostra contra el bloc a una pressió de 6 atm. Els cubreobjectes que contenen les mostres cel·lulars es fragmentaren, a fi d'obtenir duplicats interns de cada mostra. Cadascun dels duplicats es montaven en un portamostres que consta d'una peça metàl·lica (que s'adapta a l'injector) i d'una espuma amortidora sobre la que es situa una cinta adhesiva en la que es col·loca la mostra, seguidament s'elimina l'excés de líquid de mostra amb l'ajuda d'un filtre de nitrocel·lulosa. Una vegada montades les mostres es col·locaven a l'injector electromagnètic i es projectaven contra el bloc de coure prèviament refredat (-196°C) i ràpidament es separaven del portamostres i es submergien en N₂ líquid. Es guardaven en N₂ líquid fins a ésser analitzades.

V.2.2. Criofractura de mostres cel·lulars. *freeze-etching*

Consisteix en fracturar en fred (-150°C) una mostra congelada per criofixació i posterior metal·litzat amb platí-carboni (Pt-C) de la superfície fracturada a fi d'obtenir una rèplica exacte de la mostra que s'analitza per microscòpia electrònica.

L'equip de criofractura emprat fou un *BAL-TEC model BAF 060 (Leica)*, aparell que permet fracturar la mostra amb una ganiveta i tot seguit sublimar el gel superficial residual (*freeze-etching*) en una càmera de buit (10^{-7} mbar) a -90°C durant 90 min. Tot seguit mantenint la mostra dins la càmera de buit es procedia a l'obtenció d'una rèplica de la mostra mitjançant una dispersió unidireccional amb Pt-C en un angle de 24° de la mostra fins assolir un gruix de 2 nm seguida d'una dispersió de 20 nm de carbó a un angle de rotació de 75° respecte la mostra, que es mantenia girant a 136 rpm. durant el procés, per tal d'obtenir un motlle més endurit.

V.2.3. Observació microscòpica de mostres cel·lulars

El motlle generat pot separar-se fàcilment de la mostra i constitueix una rèplica exacta de la superfície fracturada que és la que s'observà realment al microscopi electrònic (*Hitachi HU-600*), treballant a 75 kV.

Les rèpliques de criofractura es separaven de la mostra cel·lular per flotació en àcid fluorhídric al 38 % (v/v) durant uns 5 min (per degradar el cubreobjectes de vidre), seguidament es rentaven dues vegades amb H_2O destil·lada i es degradava la mostra cel·lular per immersió durant 5-10 min amb hipoclorit sòdic 5 % (v/v). Posteriorment es rentaven les mostres tres vegades amb H_2O destil·lada i es fragmentaven els motlles per tal de col·locar-los en les reixetes de coure de 200 mesh amb membrana de *formvar (Monsanto)* sense carbonar i s'observaven al microscopi.

V.3. Anàlisi de PGs cel·lulars

L'estudi de la implicació de la MEC en la captació de lipoproteïnes es portà a terme mitjançant marcatge radioactiu dels PGs i posterior degradació amb proteases específiques com s'indica en les *seccions II.3.5, II.3.6*. A fi d'estudiar els possibles PGs implicats es procedí a l'obtenció dels PGs del medi de cultiu (PGs secretats), dels PGs cel·lulars i dels PGs de la MEC que caracteritzaren per SDS-PAGE.

V.3.1. Aïllament de PGs

Extracció de proteoglicans de cultius cel·lulars

Com s'ha esmentat es separen els PGs en funció de la seva procedència i mitjançant una tècnica de separació seqüencial a partir del cultiu cel·lular.

Finalitzat el tractament cel·lular (*secció II.3.5, II.3.6*), a fi d'aïllar els **PGs secretats**, es recollia el medi de cultiu de cadascuna de les mostres en el que s'hi adicionaven inhibidors de proteases (*taula 5.1*), per evitar la degradació proteica, i es guardaren a -20°C fins a ésser analitzats.

Eliminat el medi de cultiu, els possibles PGs residuals del medi retinguts en la superfície cel·lular s'eliminaren amb un rentat amb heparina $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS durant 30 min a t_{amb} seguit de tres rentats ràpids amb PBS (*taula 1.3*). Tot seguit s'obtingueren els **PGs cel·lulars** mitjançant dues extraccions de les cèl·lules, de 30 min cadascuna sota agitació suau, amb 5 mL (per extracció i per placa de cultius) del tampó d'extracció (*taula 5.2*) observant-se com la resta de components de la MEC restaven adherits a la superfície del pouet. L'extracte de PGs cel·lulars es conservava a -20°C fins a ésser analitzat.

Eliminats els PGs cel·lulars es rentava la mostra residual en la placa de cultiu, amb PBS i agitació suau a t_{amb} i tot seguit es procedia a l'obtenció dels PGs de la MEC per addició del tampó d'extracció de MEC (*taula 5.3*). Es realitzaven dues extraccions amb 5 mL del tampó de MEC que es deixava actuar durant 2 h i 24 h, respectivament, a 4°C i sota agitació. L'última extracció es realitzava amb l'ajuda d'un raspador. Els dos extractes obtinguts s'unien i es conservaven a -20°C fins a ésser analitzats.

Aïllament de PGs per cromatografia de bescanvi iònic

Recollides les fraccions de PGs (secretats, cel·lulars i de la MEC) es procedí a la seva caracterització per cromatografia de bescanvi iònic que permet la separació de compostos que difereixen en la seva càrrega.

Abans de passar les mostres per la columna cromatogràfica, totes les fraccions de PGs s'equilibraven per diàlisi a 4°C en el tampó d'unió (*taula 5.4*) i amb agitació durant 48 h fent un canvi de tampó a les 24 h.

Tot seguit les tres fraccions de PGs es filtraven (filtres de $0,22\ \mu\text{m}$) abans d'aplicar-les a la columna igual com el tampó d'unió que també s'emprà per l'equilibrat de les columnes (*HitrapTM a HP 17-1154-01, Amersham Pharmacia Biotech AB*). Les mostres s'aplicaven a les columnes i s'eluien amb un gradient de NaCl ($0,25\text{-}3\ \text{M}$, a $5\ \text{mL}/\text{min}$) recol·lectant-se fraccions de 2,5 mL, cal dir que els PGs s'eluien com un únic pic. Es portà a terme un comptatge del [^{35}S] de cadascuna de les fraccions de PGs abans d'ésser aplicades a la columna i de totes les fraccions recol·lectades de les columnes a fi de poder representar els

valors i localitzar el pic de les fraccions amb marcatge radioactiu. Seleccionades les fraccions corresponents als pics de marcatge radioactiu s'agrupaven i es dialitzaven en H₂O (per eliminar el NaCl de les mostres) tota la nit a 4°C en agitació i fent un canvi de l'H₂O passades les dues primeres hores. Seguidament les mostres es liofilitzaven, es resuspenien en SDS 1 % (p/v) i es guardaven a -20°C fins a analitzar-se per SDS-PAGE.

V.3.2. Caracterització de proteoglicans per SDS-PAGE

Les mostres obtingudes de la cromatografia una vegada dissoltes en SDS 1 % se'n determinava la concentració proteica (*secció 1.3.1*) i s'analitzaven per SDS-PAGE, en condicions reductores. Es carregaven en gels en gradient d'acrilamida del 4 % al 12 % Tris-glicina (*Bio-rad*) i es corren durant 2 h a 60 V en el tampó de correguda (*taula 4.9*). L'anàlisi dels resultats es realitzà en el propi gel d'electroforesi.

Els gels d'acrilamida es fixaven en una solució d'àcid acètic glacial 10 % (v/v), metanol 30 % (v/v) durant 1 h a t_{amb} i en agitació suau. Seguidament es controlà la càrrega proteica de les diferents mostres del gel mitjançant tinció dels gels amb la solució comercial *Sypro Ruby gel stain (170-3126, Bio-rad)* durant 1 h 30 min a t_{amb} i agitació. Seguidament els gels es rentaven en una solució aquosa d'àcid acètic glacial 7 % (v/v) i metanol 10 % (v/v) mantenint-los en agitació durant 30 min a t_{amb} . Els gels es visualitzen amb llum UV.

Una vegada fixats els gels es procedia al revelat del marcatge radioactiu impregnant-los amb la solució comercial *EN³HANCE (NEF981G, NEN Life Sciences)* durant 1 h 30 min a t_{amb} i sota agitació suau. Seguidament els gels eren rentats amb H₂O durant 30 min a t_{amb} i sota agitació de manera que s'induia la precipitació del material fluorescent sobre el gel donant-li una coloració blanquinosa. Tot seguit s'assecaven els gels i es contactaven amb una pel·lícula autoradiogràfica (*Curix RP 2, AGFA*) durant 14 dies a -80°C i posteriorment es realitzava el revelat. Les bandes corresponents als PGs es quantificaven densitomètricament (densitòmetre *Molecular Dynamics*).

VI. ESTUDIS *IN VIVO* EN MOSTRES HUMANES I PORCINES

VI.1. Estudis en model porcí. Tractament dels animals

Es realitzaren estudis *in vivo* amb animals amb hipercolesterolèmia induïda per dieta. El model d'experimentació animal emprat fou el porc, model que es caracteritza per

desenvolupar patologia cardiovascular i ateroscleròtica semblant a la que s'observa en humans, i d'altra banda permet controlar els factors externs que poden modificar la resposta al tractament. El procediment d'experimentació emprat fou acceptat pel Comitè d'Ètica i Experimentació Animal i Humana de la Universitat autònoma de Barcelona (CEEAH r203, número d'ordre del DARP: 1430). Els animals escollits foren porcs femelles de raça blanca, de creuament comercial, de pes corporal inicial 32 ± 4 Kg. Els animals es dividiren en dos grups: animals normocolesterolèmics, que foren alimentats amb una dieta de pinso comercial normal i animals hipercolesterolèmics, alimentats amb una dieta rica en colesterol (pinso comercial normal suplementat amb colesterol 2 % (p/p), àcid còlic 1 % (p/p) (afavoreix una major absorció intestinal del colesterol), greix de vedella 20 % (p/p)) durant 100 dies. Passat el temps de tractament els animals foren sacrificats amb una sobredosis de tiopental. Es mesuraren els nivells de colesterol plasmàtic i es controlaren els paràmetres hematològics basals i previs a la mort.

El colesterol plasmàtic total es determinà amb un analitzador automàtic (*Kodack Ektachem DT System*). El colesterol LDL plasmàtic s'analitzà emprant els mètodes validats pel Programa Clínic de Recerca Lipídica (Lipid 1974) i es quantificaren espectrofotomètricament (*Kontron Instruments*).

VI.2. Processat de mostres de teixit humà i porcí

L'anàlisi de l'expressió del LRP *in vivo* es realitzà en mostres de coronàries humanes procedents d'àrees amb o sense lesió ateroscleròtica. D'altra banda, donat que el model porcí d'aterosclerosi desenvolupa inicialment lesions a l'aorta abdominal, s'empraren anells d'aquest vas.

Immediatament després de l'extracció ambdós tipus de teixits es rentaren en DPBS (*taula 6.1*) i es fixaren en paraformaldehid al 4 % en DPBS de 18-24 h a 4°C en rotació. Després d'aquest temps els teixits es submergiren en la solució de crioprotecció (sacarosa 30 % (p/v) en DPBS a 4°C) i en rotació fins que els teixits s'enfonsava (6-8 h o un màxim de 3 dies). Seguidament, s'inclogueren els fragments de teixit en medi de congelació de teixits (OCT, *Jung*) sobre gel sec i es guardaren a -80°C fins a ésser emprats. Tot el procés de recollida i processat de les mostres es realitzà en condicions lliures de proteases que degraden l'ARN (ARNases).

VII. ESTUDIS IMMUNOHISTOQUÍMICS

VII.1. Caracterització de teixits per Tricròmic de Masson (Bradbury P 1990)

Per tal de caracteritzar el tipus de lesió de les mostres de coronàries humanes i d'aorta porcines es realitzà histologia convencional Tricròmic de Masson. S'analitzaren seccions de coronàries d'àrees amb o sense lesió ateroscleròtica i d'aortes porcines d'animals normocolesterolèmics i hipercolesterolèmics.

Les mostres de teixit una vegada fixades i crioprotegides (*secció VI.2*) es tallaren mitjançant un criostat (*JUNG CM3000, Leica*) a -35°C en seccions de $5\ \mu\text{m}$ i es montaren en portaobjectes prèviament gelatinitzats (gelatina 1 % - sulfat doble de crom (III) i potassi 0,25 %). Les seccions montades en els portaobjectes s'escalfaren en una planxa de 40°C i es fixaren en una solució de Bouin (solució saturada d'àcid pícric 71 % (v/v)- d'àcid acètic 5 % (v/v)- formalina 2,4 % (v/v)) durant 30 min a t_{amb} i a continuació es rentaren en H_2O . Seguidament, es tenyiren durant 12 min amb Blau Celeste (0,5 % (p/v) de Blau Celeste *C.I. B51050* - sulfat doble d'amoni i ferro (III) 5% - glicerina 14 % (v/v) en H_2O) i es rentaren breument amb H_2O destil·lada. Seguidament es tenyiren 12 min amb Hematoxilina de Mayer (Hematoxilina *C.I. 75290* 0,1 % (p/v)- sulfat doble d'alumini i potassi 5 %- d'àcid cítric 0,1 % (v/v) - hidrat de cloral 5 % (p/v) - iodat sòdic 0,02 % (p/v)). Posteriorment, es submergiren en H_2O fins observar-se un canvi de color (del vermell fosc de l'hematoxilina a un color blau fosc). Després de la tinció amb hematoxilina es portà a terme la diferenciació amb alcohol àcid (àcid clorhídric 1 % (v/v) en alcohol 70 % (v/v)) durant 30 s i seguidament es submergeix de nou en H_2O . Tot seguit es tenyiren amb una solució de Fucsina àcida (Fucsina àcida *C.I. 42685* 0,5 % (p/v) - àcid acètic glacial 0,5 % (v/v)) durant 20 min i es seguí amb un rentat breu i immersió durant 4 min en una solució d'àcid fosfomolibdic (*Fluka*) 1 % (p/v) de la qual es passà directament (sense rentat) a una solució de blau de metilè (blau de metilè *C.I. 42780* 2 % (p/v) - àcid acètic glacial 2,5 % (v/v)). Seguidament i després d'un rentat amb H_2O destil·lada, els portaobjectes es tractaven amb una solució d'àcid acètic 1 % (v/v) durant 2 min. Finalment es deshidraten per immersió en una sèrie de solucions cada vegada més concentrades amb alcohol (70 %, 90 % i 100 % (v/v), durant 2 min cadascuna) i 3 min amb Histoclear I i II (*National Diagnostic*) i els cubreobjectes es montaven mitjançant addició d'Histomount (*National Diagnostic*). Finalment s'observaven al microscopi. La tinció de tricròmic de Masson permeté classificar les lesions en grup I (lesions inicials, engruïment de

l'íntima arterial, (AIT)), grup II (lesions de creixement mitjà: tipus I-II i III), grup III (lesions avançades d'alt risc: tipus IV-V), grup IV (lesions severes: tipus VII-VIII).

VII.2. Estudis histològics

Els estudis d'histologia convencional de les mostres de coronàries humanes formen part de la tesi doctoral de Maria Berrozpe, conseqüentment en la present tesi únicament són esmentats, doncs formen part de l'*article IV*, però no es tracten amb detall.

L'anàlisi immunohistoquímic es portà a terme en seccions de 5 µm de gruix de mostres de coronàries humanes que es processaren com s'indica en la *secció VI.2*.

VII.2.1. Tinció ORO

El protocol de tinció emprat és el descrit per Bayliss O 1990. Breument: les seccions de coronàries es fixaven (paraformaldehid 4 % (p/v) - CaCl₂ 1 % (p/v)). Posteriorment es tenyien per immersió de 15 min en una solució saturada de *Vermell d'oli O (C.I.26125)* i s'eliminava l'excés per immersió amb isopropanol al 60 % (v/v). Seguidament es destenyien amb una solució de hematoxilina de Mayer (*secció VII.1*) i, després d'un rentat amb H₂O, es montaven els cubreobjectes en *glicergel (DAKO)*.

VII.2.2. Tècniques immunohistoquímiques (Larsson LI 1988)

Les seccions de teixits es bloquejaren amb DPBS-BSA 1 % (p/v) durant 1 h a t_{amb} i tot seguit després d'un rentat amb DPBS (*taula 6.1*) s'incubaven amb els anticossos primaris que s'indiquen a la *taula XIX* juntament amb les dilucions emprades. Acabada la incubació amb l'anticòs primari, les seccions es rentaven novament amb DPBS i es bloquejaven de nou prèvia incubació amb l'anticòs secundari corresponent *taula XIX*. Simultàniament en tots els estudis es realitzaven incubacions amb l'anticòs primari o secundari sols a fi de tenir controls negatius.

VII.3. Hibridació *in situ*

Els resultats de regulació de l'expressió del receptor del LRP en cultius cel·lulars de CML es corroboraren en un assaig *in vivo* en que es compararen els nivells d'ARNm del LRP en aortes entre animals normo i hipercolesterolèmics mitjançant hibridació *in situ* amb una sonda d'ARN marcada amb un agent químic.

Taula XIX. Anticossos emprats en immunohistoquímica

Anticossos primaris					
Antigen reconegut	Tipus	Proveïdor	Referència	Dilució	
LRP α 2	Monoclonal	Research Diagnostica	RDI-PRO61065	1/50	
rLDL	Monoclonal	Amersham	RPN537	1/50	
α -actina	Monoclonal	DAKO	M851	1/50	
Apo B	Monoclonal	Biodesign Int.	M61526M	1/100	
Anticossos secundaris					
Antigen reconegut	Espècie reconeguda	Origen	Proveïdor	Referència	Dilució
LRP α 2	Ratolí	Conill	DAKO	P260	1/100
rLDL	Ratolí	Conill	DAKO	P260	1/100
α -actina	Ratolí	Cabra	DAKO	F479	1/50
Apo B	Ratolí	Conill	DAKO	P260	1/100

VII.3.1. Clonació de l'ADNc del LRP

Es partí d'un fragment de PCR (*figura 8*) clonat en el vector pGem en la diana Eco RI. 5 μ g de plasmidi amb insert es digeriren amb Eco RI. El producte de la digestió se li addicionà tampó de recorregut (*taula 7.1*) i es correu en gel d'agarosa 1 % (p/v) preparat en TBE (*taula 7.2*) i amb bromur d'etidi. Es retallà la banda amb el pes molecular de l'insert i es sotmeté al protocol comercial de neteja *kit Gean Clean II (Progenetics)*. L'ADN així obtingut es quantificà emprant un banc de dilucions que es carregà i es feu corre en un altre gel de les mateixes característiques que el descrit anteriorment.

Figura 8. Seqüència de l'ADN de LRP clonada per obtenir la sonda d'ARN

2221CCAGAAGATTGATGGCACGGAGCGGGAGACCATCCTGAAGGACGGCATCCACAATGTGGAGG
 GTGTGGCCGTGGACTGGATGGGAGACAATCTGTACTGGACGGACGATGGGCCAAAAAGACAATC
 AGGCTGGCCAGGCTGGAGAAAGCTGCTCAGACCCGCAAGACTTTAATCGAGGGCAAATGACACA
 CCCAGGGCTATTGTGGTGGATCCACTCAATGGGTGGATGTACTGGACAGACTGGGAGGAGGACC
 CCAAGGACAGTCGGCGTGGGCGGCTGGAGAGGGCGTGGATGGATGGCTCACACCGAGACATCTTT
 GTCACCTCCAAGACAGTGCTTTGGCCCAATGGGCTAAGCCTGGACATCCCGGCTGGGCGCCTCTAC
 TGGGTGGATGCCTTCTACGACCGCATCGAGACGATACTGCTCAATGGCACAGACCGGAAGATTGTG
 TATGAAGTCTGAGCTGAACCACGCCTTTGGCCTGTGTCA~~CCATGGCAACTACCTCTTCTGGACTG~~
 AGTATCGGAGTGGCAGTGCTA2764

En vermell s'indiquen els cebadors emprats pel seu clonatge en pGem. En verd s'indica la diana interna per BamHI, en blau la diana per ApaI i en lila la diana per NcoI.

Per clonar la seqüència descrita es digeriren 6,4 μ g de plasmidi *pBluescript SK (+/-)* phagemid amb Eco RI. Finalment, la solució es passà per columnes *Chroma spinTM* (*Clontech*) per netejar l'ADN de petites impureses com sals, solvents, nucleòtids, enzims i proteïnes. A la solució obtinguda (50 μ L totals) se li afegiren 10 μ L de LiCl 4 M i 250 μ L

d'etanol absolut i es precipitava tota la nit a -80°C . Seguidament es centrifugava a $14.000\times g$ 30 min i el precipitat es rentava amb etanol 70 % (v/v). Després d'una segona centrifugació a $14.000\times g$ 10 min el precipitat es resuspensia en $10\ \mu\text{L}$ d' H_2O -DEPC (*taula 2.3*).

Seguidament es portava a terme la lligació del plasmidi digerit amb el fragment d'ADNc del LRP. Donat que un factor molt important en les lligacions és la relació insert/vector, i s'observà un increment en el rendiment en treballar amb una proporció de 3/1, s'aplicà la fórmula següent a fi de calcular la quantitat d'insert necessària:

$$\text{ng d'insert} = \frac{\text{tamany de l'insert (kb)}}{\text{tamany del vector (kb)}} \times \text{ng vector} \times \text{relació insert/vector}$$

Així doncs, la lligació es portà a terme en un tub eppendorf on es col·locaren 50 ng del vector i la quantitat d'insert necessària per la relació insert/vector escollida, i s'hi adicionava $1\ \mu\text{L}$ de lligasa de T4 (*Promega*), $2\ \mu\text{L}$ del tampó de lligació 10x (proporcionat per la casa comercial) i l' H_2O -DEPC necessària fins a un volum final de $10\ \mu\text{L}$. Es mantingué la mescla durant tota la nit a 15°C o bé 2 h a t_{amb} .

VII.3.2. Preparació de bacteries competents

El mètode emprat per obtenir bacteries competents fou descrit per Hanahan D 1985. Les cèl·lules emprades foren *E. coli* (soca DH10B). En primer lloc es feu un precultiu de *E. coli* inoculant en un tub estèril $10\ \mu\text{L}$ de bacteries congelades en $10\ \text{mL}$ de medi SOB (*taula 7.3*) que deixaven créixer a 37°C tota la nit. S'inocularen $2\ \text{mL}$ del precultiu saturat en un erlenmeyer estèril de $250\ \text{mL}$ amb $50\ \text{mL}$ de medi SOB i s'incubava a 37°C en agitació orbital fins que assolir-se una absorbància de 0,5 a $650\ \text{nm}$ (aproximadament 2 h). Assolit el creixement adequat, es transferia el cultiu de bacteries a un tub estèril i es deixava reposar de 15-20 min en gel. A continuació es centrifugava a $1.000\times g$ durant 12 min a 4°C , i el precipitat es resuspensia en $16\ \text{mL}$ de solució RF1 (*taula 7.4*) i es deixava reposar 15 min en gel. Es repetia de nou la centrifugació i el precipitat es resuspensia en $4\ \text{mL}$ de solució RF2 (*taula 7.5*) i es refredava 15 min en gel. Finalment es realitzaven al·iquotes de $200\ \mu\text{L}$ que es congelaren en tubs estèrils submergint-los directament en N_2 líquid.

VII.3.3. Transformació de bactèries amb ADN plasmídic

El producte de la lligació s'introduí en bactèries competents a fi d'amplificar la quantitat de l'ADN plasmídic amb l'insert. S'addicionaren 4 µL de la mescla de lligació a 100 µL de bactèries competents i s'incubaren 30 min en gel. Tot seguit les bactèries se sotmetien a un *shock* tèrmic a 42°C durant 40 s seguit d'un refredament en gel durant 5 min. Es sembraven en una placa de petri amb medi LB-Agar (*taula 7.6*)- 0,3 mg/mL d'ampicilina a la que prèviament s'havien afegit 40 µL de la solució IPTG (100 mM) i 40 µL de solució X-gal (40 mg/mL) i s'incubaven a 37°C durant tota la nit.

En el creixement bacterià s'observaven dos tipus de colònies: unes blanques, de bactèries que han internalitzat el plasmidi sense l'insert i les altres blanques de bactèries que han internalitzat el plasmidi amb el promotor del gen lacZ interromput. Seguidament s'escolliren a l'atzar varies colònies blanques amb una punta de pipeta que es deixaven caure en un erlenmeyer amb medi LB - ampicilina 0,1 mg/mL i es creixien a 37°C durant la nit sota agitació orbital.

L'ADN plasmídic s'obtenia mitjançant el mètode alcalí (Birnboim HC 1979) que permet la desnaturalització de l'ADN genòmic, en medi alcalí, mantenint intacte l'ADN plasmídic pel fet d'estar "superenrotllat". L'ARN es degradava amb proteases que degraden l'ARN (ARNases), i per centrifugació s'eliminaven les proteïnes cel·lulars i l'ADN genòmic. L'ADN plasmídic es recuperava mitjançant columnes de sílica amb alta concentració de sals. Per la preparació de l'ADN a petita o gran escala s'empraren els *kit* comercials de *miniprep* o *maxiprep* (*Promega* i *Qiagen*, respectivament). Obtingut l'ADN plasmídic es comprovava la presència de l'insert digerint 5 o 10 µL de la mostra amb 1 µL EcoRI (*Roche*) amb 4 µL del tampó *one for all* (*Roche*) i ajustant fins a un volum de 40 µL amb H₂O-DEPC a 30°C durant 2 h. El producte de la digestió es sotmetia a electroforesi en gel d'agarosa 0,8%-TBE. El bromur d'etidi del gel permetia visualitzar amb llum ultraviolada en les mostres que contenien l'insert (513 pb, càlcul aproximat per comparació amb marcadors de pes molecular (1 kb *DNA ladder*, *Gibco*)). Per determinar la concentració d'ADN plasmídic així obtingut es determinà l'absorbància a 260 nm i 280 nm.

La lectura a 260 nm indica la concentració d'ADN segons la fórmula:

$$\text{Absorbància} \times 50 \frac{\mu\text{g}}{1\mu\text{L}} = \frac{X\mu\text{g ADN}}{\mu\text{L}}$$

La concentració d'ADN obtinguda habitualment era d'entre 0,10-0,25 µg/µL. Es comprova la puresa de la mostra llegint a 280 nm (Abs_{260}/Abs_{280} entre 1,8-2 indica ADN pur).

Seguidament a fi de deduir l'orientació de l'insert respecte als dos promotors T3 i T7 per tal de donar nom de cadena sentit (S) i cadena antisentit (AS), es realitzaren dues digestions de la *maxiprep* amb dos enzims amb dianes internes asimètriques en l'insert: KpnI i ApaI.

VII.3.4. Obtenció de la sonda marcada (Herrington GS 1992)

Prèviament a la realització de la transcripció, 2,5 µg del plasmidi amb l'insert del LRP es linealitzaren per digestió amb Hind III (per obtenir la cadena AS) o amb Xba I (per obtenir la cadena S). La reacció de digestió es portà a terme en un tub amb 2,5 µg del plasmidi amb l'insert del LRP més 2 µL de tampó comercial 10x i 1 µL del corresponent enzims de restricció portats a un volum final de 20 µL amb H₂O-DEPC. La reacció de digestió es deixava durant 2 h a 37°C i s'aturava a 85°C durant 20-30 min. L'eficàcia de la digestió es comprovava corrent els productes en un gel d'agarosa 1% (p/v) amb bromur d'etidi en TBE.

Seguidament es portà a terme la transcripció *in vitro* amb 10 µL de la mescla de digestió a la que s'addicionaven 5 µL del tampó de transcripció 10x, 1,25 µL de ARNaseoutTM Ribonucleasa (*Invitrogen*), 5 µL de la mescla d'oligonucleòtids (ARN) marcats amb DIG (*Roche N 1277073*), 1,5 µL de la polimerasa adient T3 (la diana Hind III, *Promega 2083*) o T7 (la diana Xba I, *Promega 2077*) i fins a un volum total de 50 µL amb H₂O-DEPC. La reacció de transcripció es deixava progressà durant 2 h a 37°C i tot seguit es separava la sonda d'ARN dels nucleòtids lliures i de les proteïnes mitjançant centrifugació a 2.500x g durant 5 min en columnes *ChromaTM Spin 100* (*Clontech PT 1300-1*). El producte de la transcripció (50 µL) es recuperava per precipitació amb 10 µL de LiCl 4 M i 250 µL d'etanol absolut i es deixava tota la nit a -80°C per incrementar el rendiment. Seguidament es centrifugava la mescla a 11.500x g durant 30 min a 4°C i es rentava amb etanol 70 % (v/v en H₂O-DEPC) centrifugant-se de nou a les mateixes condicions 5 min. S'eliminava l'etanol i es deixava assecar. La sonda obtinguda es resuspenia en H₂O-DEPC i es comprovava el seu estat amb un gel d'agarosa 0,8 % (p/v) amb bromur d'etidi en TBE. La quantificació del marcatge de la sonda es feia de manera semiquantitativa emprant un banc de dilucions (dilucions

successives de 1/5) partint d'una concentració inicial de 1 ng/ μ L d'ADN plasmídic. En paral·lel es realitzava un banc de dilucions semblant per una mostra de la que ja es coneixia la concentració de nucleòtids marcats. A continuació s'aplicava correlativament una gota de 1 μ L de cadascuna de les dilucions en un filtre de niló (*NytranSuperCharge*, *Schleicher&Schuell*) i es deixà assecà, es fixà l'ARN a la membrana per exposició a llum ultraviolada i es processa la membrana seguint el protocol indicat en la *secció IV.2.2* i emprant una dilució 1/2.000 de l'anticòs anti-digoxigenina.

VII.3.5. Hibridació (Herrington GS 1992, Komminoth P 1992)

La hibridació *in situ* amb sondes d'ARN es realitzà en seccions de 15-20 μ m tallades a -35°C amb un criostat (*Jung CM3000*, *Leica*) de teixit porcí processats com s'indica en la *secció VI.2*. Prèvia fixació immersió en la solució fixadora (*taula 7.7*) durant 30 min a t_{amb} , les seccions eren rentades amb PBS-DEPC (*taula 7.8*) en una placa de 12 o 24 pouets durant 5 min a t_{amb} i sota agitació suau. Les mostres una vegada fixades es rentaven amb PBS-DEPC i PBS-DEPC-Tritó 0,5 % (v/v) es procedia a la permeabilització de les membranes per tractament amb una solució de proteinasa K (*taula 7.9*) durant 30 min a 37°C. Posteriorment es realitzaven dos rentats amb TBS-DEPC (*taula 7.10*) a 4°C a fi d'inactivar la proteasa i es procedia a l'acetilació mitjançant incubació durant 10 min a t_{amb} amb la solució de TEA (*taula 7.11*) a la que se li addiciona àcid acètic anhidre 0,25 % (v/v) en el moment d'ésser emprat. Seguidament es realitzaven dos rentats de 5 min amb PBS-DEPC abans de fixar de nou durant 15 min a 4°C, es realitzaren tres rentats de 5 min amb PBS-DEPC i es bloquejaven les unions inespecífiques per immersió en la solució de PBS-DEPC-0,2 % (p/v) glicina durant 15 min a t_{amb} . S'ajustava la concentració de sals amb dos rentats de 5 min amb SSC 2x (*taula 7.12*). Posteriorment, les seccions s'incubaven amb la solució de prehibridació (*taula 7.13*) durant 2 h a 53,5°C. Passat el temps de prehibridació, s'hi addicionava la sonda d'ARN marcada amb digoxigenina (concentració final 1 μ g/mL) i es mantenia tota la nit a la mateixa temperatura de prehibridació. Al dia següent es portaven a terme dos rentats de 15 min amb SSC 5x a la mateixa temperatura d'hibridació, i tot seguit s'incubaven amb una solució TEN-ARNasa A (20 μ g/mL) (*taula 7.14*) després de la qual es portaren a terme sis rentats de 30 min amb formamida 50 % (v/v) en SSC 0,5x a la mateixa temperatura d'hibridació. Seguidament, es realitzava un altre rentat amb sarcosinat sodiurlaurílic 0,5 % (v/v) en SSC 0,1x durant 30 min a la mateixa temperatura i tres rentats de 10 min amb SSC 5x a t_{amb} . A continuació, es

bloquejaven les unions inespecífiques emprant una solució de bloqueig (*Blocking reagent 1363514, Roche*) 1% (p/v) en tampó I (*taula 7.15*) durant 45 min a t_{amb} . Acabat el bloqueig s'incubava amb l'anticòs antidigoxigenina unit a fosfatasa alcalina (*kit 1363514, Roche*) diluït en la solució de bloqueig al 1/2000, durant 2 h a t_{amb} . Es realitzaven tres rentats amb TBS de 15 min a t_{amb} i dos de 10 min amb Tris-HCl 100 mM pH 9,5 per canviar el pH. Es passava a revelar afegint el substrat per la fosfatasa alcalina *NBT/BCIP (Vector Laboratory N° SK5400)* que es mantenia protegit de la llum durant tota la nit i sense agitació. Al dia següent les seccions es rentaven tres vegades amb TBS-DEPC durant 10 min, es fixaven amb la solució fixadora i es rentaven amb H₂O. Amb l'ajuda d'una punta de pipeta es col·locaven en portaobjectes nets, un cop secs es montaven els cubreobjectes amb *glicergel (DAKO)*.

VII.4. Anàlisi d'imatge (Mize RR 1994, Prat WK 1991)

Totes les seccions processades mitjançant histologia convencional i hibridació *in situ* s'evaluaren amb un microscopi binocular de transmissió i/o de fluorescència (*Olympus model Vanox AHBT3*). En el cas que el tamany de les seccions fos massa gran s'emprà una lupa binocular (*Olympus*). La captació de les imatges es realitzà mitjançant una càmera digital en color *Sony 3CCD* i l'anàlisi de les imatges es portà a terme mitjançant el programa d'anàlisi d'imatges *Visilog 4.1.5 (Noesis)*

ANNEX I. TAULES DE SOLUCIONS**Taula 1.1. Solució de densitat 1,006 g KBr /mL:**

Reactius	Concentració	
Cloramfenicol	0,15 mM	
NaCl	150 mM	
EDTA	1 mM	
Gentamicina	80 mg/L	
Azida sòdica	500 mg/L	
En H ₂ O		pH 7,4

*Antibiòtics: cloramfenicol i gentamicina són antibiòtics, EDTA: evita l'oxidació de les lipoproteïnes i inhibeix les MMPs; l'azida sòdica: antioxidant i prevé el creixement microbià.

Taula 1.2. Tampó A:

Reactius	Concentració	
Trizma base	20 mM	
EDTA	1 mM	
NaCl	150 mM	
En H ₂ O		pH 7,4

EDTA: Evita l'oxidació de les lipoproteïnes.

Taula 1.3. PBS:

Reactius	Concentració	
KCl	2,7 mM	
NaCl	137 mM	
KH ₂ PO ₄	1,5 mM	
Na ₂ HPO ₄	20 mM	
En H ₂ O		pH 7,4

Taula 1.4. Tampó A:

Reactius	Concentració	
Hepes	5 mM	
NaCl	20 mM	
CaCl ₂	4 mM	
MgCl ₂	2mM	
En H ₂ O		pH 7,2

Taula 1.5. Tampó B:

Reactius	Concentració	
Hepes	5 mM	
NaCl	150 mM	
CaCl ₂	4 mM	
MgCl ₂	2mM	
En H ₂ O		pH 7,2

Taula 1.6. Solucions d'acrilamida:

Reactiu	Solució mare 2 %	Solució mare 16 %
Solució mare d'acrilamida*	1,65 mL	10,65 mL
Sacarosa 50 % (p/v)	250 µL	984 µL
Tetrametiletildiamida (TEMED)	16,5 µL	16,5 µL
Persulfat amònic 10 % (p/v)	100 µL	200 µL
Blau de bromofenol	200 µL	-
Tampó borat **	fins 25 mL	fins 20 mL

* Solució mare d'acrilamida: 30 % d'acrilamida total (acrilamida + bisacrilamida) i un 5 % de bisacrilamida.

** Tampó borat: Tris-HCl 9 mM, EDTA 300 mM, àcid bòric 8 mM, pH 8,3.

Taula 2.1. Medi de creixement per cultius de CML humanes:

Reactius	Concentració
M199- 25 mM Hepes (<i>Gibco Laboratories</i>)	76 % (p/v)
Sèrum fetal boví (FCS) (<i>Biological industries</i>)	20 % (p/v)
Sèrum humà*	2 % (p/v)
L-glutamina (<i>Gibco Laboratories</i>)	2 mM
Penicillina G (<i>Gibco Laboratories</i>)	100 U.I./mL
Estreptomicina (<i>Gibco Laboratories</i>)	0,1 mg/mL

* El sèrum procedent de donants sans del banc de sang de la Vall d'Hebron, prèvia addició al medi de cultiu se li eliminaven els quilomicrons per ultracentrifugació a 100.000x g 30 min a 4°C, i posteriorment s'inactivava el sistema del complement per incubació durant 30 min a 56°C.

Taula 2.2. Medi de creixement de fibroblasts de ratolí:

Reactius	Concentració
Dulbecco's MEM (DMEM) (<i>Gibco Laboratories</i>)	88 % (v/v)
Sèrum fetal boví (FCS) (<i>Biological industries</i>)	10 % (v/v)
L-glutamina (<i>Gibco Laboratories</i>)	2 mM
Penicillina G (<i>Gibco Laboratories</i>)	100 U.I./mL
Estreptomicina (<i>Gibco Laboratories</i>)	0,1 mg/mL

Taula 2.3. H₂O-DEPC

Reactius	Concentració
H ₂ O	1 L
Dietilpirocarbonat (DEPC)	0,5 mL

* S'incuba l'H₂O amb el DEPC un mínim de 4 h a 37°C i sota agitació orbital, seguidament la solució s'autoclava.

Taula 2.4. Medi de cultiu per les CML:

Reactius	Concentració
Dulbecco's MEM (DMEM) (<i>Gibco Laboratories</i>)	76% (v/v)
Sèrum fetal boví (FCS) (<i>Biological industries</i>)	20 % (v/v)
Sèrum humà (veure taula 2.1)	2% (v/v)
L-glutamina (<i>Gibco Laboratories</i>)	2 mM
Penicillina G (<i>Gibco Laboratories</i>)	100 U.I./mL
Estreptomicina (<i>Gibco Laboratories</i>)	0,1 mg/mL

Taula 4.1. Tampó de càrrega 6x per ADN:

Reactius	Concentració
Glicerol	30 % (v/v)
Blau de bromofenol	2,5 mg/mL
En H ₂ O	

Taula 4.2. TAE:

Reactius	Concentració	
Tris-HCl	40 mM	
EDTA	1 mM	
Àcid acètic glacial	20 mM	
En H ₂ O		pH 7,5

Taula 4.3. SSC 20x:

Reactius	Concentració	
NaCl	3 M	
Citrat sòdic	300 mM	
En H ₂ O		

Taula 4.4. Tampó I:

Reactius	Concentració	
Tris-HCl	100 mM	
NaCl	150 mM	
En H ₂ O		pH 7,5

Taula 4.5. TBS:

Reactius	Concentració	
NaCl	100 mM	
KCl	30 mM	
Tris-HCl	2,5 mM	
En H ₂ O		pH 7,4

Taula 4.6. Tampó III:

Reactius	Concentració	
Tris-HCl	100 mM	
NaCl	100 mM	
MgCl ₂	50 mM	
En H ₂ O		pH 9,5

Taula 4.7. Tampó de càrrega de Laemmli:

Reactius	Concentració	
Tris-HCl	125 mM	
SDS	2 % (p/v)	
Glicerol	5 % (v/v)	
Blau de bromofenol (C.I.62625-28-9)	0,003 % (p/v)	
β-mercaptoetanol *	1 % (v/v)	
En H ₂ O		pH 6,8

* Únicament en cas de treballar en condicions reductores.

Taula 4.8 Composició dels gels de poliacrilamida:

Reactius	Concentracions en gel separador	Concentracions en gel concentrador
Acilamida:bisacrilamida (30 %; 37,5:1)	5 - 15 % (p/v)*	4 % (p/v)
Tris-HCl	375 mM pH 8,8	125 mM pH 6,8
SDS	0,1 % (p/v)	0,1 % (p/v)
Persulfat amònic	0,075 % (p/v)	0,075 % (p/v)
TEMED	0,05 % (v/v)	0,05 % (v/v)
En H ₂ O		

* Segons el pes molecular de la proteïna en estudi.

Taula 4.9. Tampó d'electroforesi de Laemmli:

Reactius	Concentració
Tris-HCl	25 mM
SDS	0,1 % (p/v)
Glicina	192 mM
En H ₂ O	

Taula 4.10. Tampó de transferència:

Reactius	Concentració
Tris-HCl	48 mM
Glicina	386 mM
SDS	0,5 % (p/v)
Metanol	20 % (v/v)
En H ₂ O	

Taula 4.11. Solució de Vermell de Ponceau:

Reactius	Concentració
Vermell de Ponceau (EC N ^o .2283192, Fluka)	0,2 % (p/v)
Àcid acètic glacial	1 % (v/v)
En H ₂ O	

Taula 4.12. TBS:

Reactius	Concentració	
NaCl	100 mM	
Tris-HCl	10 mM	
En H ₂ O		pH 7,5

Taula 5.1. Concentracions d'inhibidors de proteases:

Inhibidors de proteases	Concentració final de l'inhibidor en la mostra
EDTA	10 mM
Benzamidina-HCl	1 mg/mL
Àcid ε-amino caproic	10 mM

Taula 5.2. Tampó d'extracció de PGs cel·lulars:

Reactius	Concentració en el tampó	
Tritó X-100	1 % (v/v)	
NaCl	150 mM	
Tris-HCl	10 mM	
MgCl ₂	5 mM	
EDTA	2 mM	
Ditiotreitol (DTT)	0,255 mM	
AEBSF *	0,001 mM	
En H ₂ O		pH 7,2

* 4-(2-aminoetil)benzenosulfamil fluorit.

Taula 5.3. Tampó d'extracció de PGs de la MEC:

Reactius	Concentració	
Tritó X-100	0,5 % (v/v)	
Tris-HCl	20 mM	
EDTA	2 mM	
Urea	8 M	
Benzamidine-HCl	1 mg/mL	
Àcid ϵ -amino-caproic	10 mM	
En H ₂ O		pH 7,5

Taula 5.4. Tampó d'unió:

Reactius	Concentració	
Tritó X-100	0,5 % (v/v)	
Tris-HCl	20 mM	
EDTA	2 mM	
Urea	8 M	
En H ₂ O		pH 7,5

Taula 6.1. DPBS:

Reactius	Concentració	
Na ₂ HPO ₄	80 mM	
NaH ₂ PO ₄	20 mM	
NaCl	100 mM	
En H ₂ O		pH 7,5

Taula 7.1. Tampó de recorregut:

Reactius	Concentració	
Blau de bromofenol	2,5 % (p/v)	
Cianol de xilè (C.I. 42135)	2,5 % (p/v)	
Glicerol	30 % (v/v)	
En H ₂ O		

Taula 7.2. TBE:

Reactius	Concentració	
Tris-HCl	890 mM	
Àcid bòric	890 mM	
EDTA	32 mM	
En H ₂ O		pH 8,0

Taula 7.3. Medi SOB:

Reactius	Concentració	
Bactotriptòfan	2 % (p/v)	
Extracte de llevat	0,5 % (p/v)	
NaCl	10 mM	
KCl	2,5 mM	
MgCl ₂	10 mM	
MgSO ₄	10 mM	
En H ₂ O		

* S'esterilitza per autoclavat.

Taula 7.4. Solució RF1:

Reactius	Concentració	
RbCl	20 mM	
MnCl ₂	10 mM	
Acetat de potassi	8 mM	
CaCl ₂	2 mM	
Glicerol	12 % (v/v)	
En H ₂ O		pH 5,8 (amb àcid acètic)

* S'esterilitza per filtració.

Taula 7.5. Solució RF2:

Reactius	Concentració	
RbCl	0,1 mM	
CaCl ₂	1 mM	
Glicerol	12 % (v/v)	
MOPS	10 mM	
En H ₂ O		pH 6,8

* S'esterilitza per filtració.

Taula 7.6. Medi LB-Agar:

Reactius	Concentració	
Bactotriptòfan	0,1 % (p/v)	
Extracte de llevat	0,5 % (p/v)	
NaCl	86 mM	
NaOH	1 mM	
Agar	1,5 % (p/v)	
En H ₂ O		

* S'esterilitza per autoclavat.

Taula 7.7. Solució fixadora:

Reactius	Concentració	
Paraformaldehid	4 % (p/v)	
Sacarosa	4 % (p/v)	
EDTA	5 mM	
MgCl ₂	200 mM	
PBS	1x	
NaOH 2 M	2 gotes	
En H ₂ O		pH 7,4

* Escalfar a 60°C fins a obtenir una solució completament incolora i transparent.

Taula 7.8. PBS-DEPC:

Reactius	Concentració	
NaH ₂ PO ₄	11,5 mM	
Na ₂ HPO ₄	8,7 mM	
KCl	2,7 mM	
NaCl	150 mM	
En H ₂ O-DEPC		pH 7,4

* S'autoclava.

Taula 7.9. Solució de proteinasa K:

Reactius	Concentració	
Proteinasa K	5 µg/mL	
Tris-HCl	20 mM	
EDTA	1 mM	
En H ₂ O-DEPC		pH 7,4

Taula 7.10. TBS-DEPC:

Reactius	Concentració	
NaCl	500 mM	
KCl	30 mM	
Tris-HCl	2,5 mM	
En H ₂ O-DEPC		pH 7,4

Taula 7.11. TEA:

Reactius	Concentració
Trietanolamina	0,4 % (v/v)
HCl concentrat	0,04 % (v/v)
En H ₂ O-DEPC	

Taula 7.12. SSC 20x:

Reactius	Concentració
NaCl	17,5 % (p/v)
Citrat sòdic	8,8 % (p/v)
En H ₂ O-DEPC	

* S'autoclava.

Taula 7.13. Solució de prehibridació:

Reactius	Concentració
Formamida	50 % (v/v)
SSC (<i>taula 7.12</i>)	5x
Heparina	50 µg/mL
Sulfat de dextrà	5 % (p/v)
SDS	0,01 % (p/v)
Solució Denhardt	5x
Poli A	100 µg/mL
ARN ^t	25 µg/mL
ADN d'esperma de salmó	25 µg/mL
En H ₂ O-DEPC	

Taula 7.14. TEN:

Reactius	Concentració	
Tris-HCl	10 mM	
NaCl	500 mM	
EDTA	5 mM	
En H ₂ O		pH 7,5

Taula 7.15. Tampó I:

Reactius	Concentració
Tris-HCl	100 mM
NaCl	150 mM
En H ₂ O	

