

OBJETIVOS

Aunque los estudios cinéticos *in vitro* muestran que ADH1 y ADH4 presentan actividad etanol y retinol deshidrogenasa, varios aspectos de su función *in vivo* son totalmente desconocidos. De hecho, ADH1 y ADH4 muestran una especificidad similar para un amplio repertorio de sustratos fisiológicos, lo que sugiere su implicación en varios procesos metabólicos. Además, se dispone de una información limitada acerca de la expresión tisular de estas enzimas y de como esta expresión esta modulada por diferentes hormonas y procesos celulares. Especial interés presenta el sistema nervioso central ya que hasta el momento, no hay evidencias claras de la presencia de estas ADHs en el tejido nervioso, y el abuso del alcohol genera numerosos efectos neurológicos.

Por consiguiente, el objetivo general de esta Tesis Doctoral se enmarca en el estudio de la regulación de estas formas de ADH con actividad etanol y retinol deshidrogenasa, y de su distribución en los diferentes tejidos de rata y humano, con el fin de obtener más información acerca de su implicación en el metabolismo celular. A partir de este propósito general, se plantearon los siguiente objetivos:

- Investigar en detalle la distribución de ambas clases de ADH y su localización en diferentes tejidos de rata, especialmente en el sistema nervioso central y en el sistema digestivo. Establecer, a partir de la localización tisular, los niveles de expresión y las constantes cinéticas, su posible función *in vivo* en cada tejido, y cómo el abuso de alcohol puede alterar esas funciones biológicas.
- Investigar la regulación hormonal de ADH1 y ADH4 utilizando como modelo celular la línea de hepatocarcinoma de rata H4IIEC3.

MATERIAL Y MÉTODOS

Parte importante de este trabajo ha supuesto la puesta a punto de varias técnicas que hasta el momento no se habían llevado a cabo en el laboratorio. Por esta razón, esta parte de la memoria aparece especialmente detallada, en lo que se refiere a metodologías nuevas.

1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

1.1 Tejidos humanos

Las muestras de procedencia humana fueron suministradas por la Unidad de Anatomía Patológica del Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII. Las necropsias se obtuvieron de muestras aparentemente normales en autopsias de donantes, en un periodo variable que oscilaba entre las 2 y 24 h *post-mortem*, de individuos fallecidos por diversas enfermedades, generalmente de rápido desarrollo. Este procedimiento fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Tarragona.

1.2 Tejidos de rata

Las ratas de la cepa Sprague-Dawley, de diferente edad y sexo, se sacrificaron por decapitación, siguiendo el procedimiento animal aprobado por el Comité d'Ètica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

1.3 Cultivos celulares

Se han utilizado cultivos de la línea celular de hepatoma de rata H4IIEC3 (ATCC 1600) que fueron cedidos por el grupo de los Drs. Emili Itarte y Maria Plana, del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona. Esta línea celular se caracteriza por su cultivo en monocapa, de tal forma que las células crecen, sobreviven y mantienen su función únicamente cuando están adheridas a una superficie inerte como vidrio o plástico y, además, son capaces de poseer un número ilimitado de duplicaciones de la población, lo que significa que han adquirido la propiedad de proliferar en cultivo indefinidamente.

2 MÉTODOS DE TRABAJO CON CULTIVOS CELULARES

2.1 Trabajo en condiciones asépticas

El trabajo con cultivos celulares eucariotas exige minimizar el riesgo de contaminación por microorganismos. Así pues, se adoptaron una serie de precauciones en el trabajo con cultivos, tales como la manipulación en la cabina de flujo laminar vertical (Telstar) y el examen rutinario bajo el microscopio óptico invertido (CK2, Olympus, Japón), con el fin de detectar cualquier signo de contaminación o deterioro. Los medios de cultivo se prepararon con una mínima cantidad de antibiótico con el fin de detectar a tiempo cualquier signo de contaminación, las soluciones y medios de cultivo se esterilizaron por filtración o por autoclave, y el material de vidrio y plástico por autoclave.

2.2 Mantenimiento de células en cultivo

Las células se sembraron rutinariamente en frascos de cultivo de 25 cm² (5x10⁴ células/frasco, 5 ml/frasco), en medio de crecimiento DME F-12 suplementado con FBS 5% (v/v) o bien en un medio con bajo contenido en suero. Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera saturada de vapor de agua 5% CO₂ y 95% aire a 37°C. Cada dos o tres días se revisaron parámetros como la variación del pH y la densidad celular y, basándose en el conocimiento del comportamiento del cultivo, se evaluaba la conveniencia del cambio del medio.

Medio de crecimiento DME F-12 suplementado con FBS 5% (v/v) (Gibco): 15.6 g de medio DME Ham's F-12 en polvo (Sigma) sin bicarbonato sódico ni rojo de fenol, bicarbonato sódico 14 mM, antibiótico-antimicótico 1% (v/v) o gentamicina (Gibco) (1mg/ml), pH 7,0-7,2 en agua bidestilada y esterilizado por filtración. La glutamina (Sigma) es inestable en solución y tiene una vida media de 3 semanas aproximadamente, de forma que una vez al mes se añade la mitad de concentración de glutamina que ha de llevar el medio. Finalmente, se añade el suero previamente inactivado a 56°C durante 10 min.

Medio de crecimiento de bajo contenido en suero: Medio DME Ham's F-12, bicarbonato sódico 14 mM, antibiótico-antimicótico 1% (v/v) o gentamicina (1mg/ml), pH 7,0-7,2 en agua bidestilada y esterilizado por filtración. Suplementado con NCS 0,5% (v/v) (Sigma), 1% de ITS (v/v) (Sigma, mezcla de insulina, selenito sódico y transferrina), 1% de aminoácidos no esenciales (v/v) (Sigma), 1% de vitaminas (v/v) (Sigma).

2.3 Almacenamiento de células

La conservación se resuelve satisfactoriamente congelando y manteniendo los cultivos celulares en nitrógeno líquido en presencia de un agente crioprotector como es el DMSO. Éste protege a las células del daño físico y osmótico evitando la formación de cristales de hielo y el descenso de solubilidad de solutos, respectivamente. En estas

condiciones, las células no sufren pérdida de viabilidad ni de otras características después de un almacenamiento de incluso varios años.

2.3.1 Congelación de células

Las células se hicieron crecer en medio DME F-12 suplementado con un 5% (v/v) de FBS hasta llegar al 70% de confluencia. A continuación, se lavaron con PBS, se recogieron por tratamiento con tripsina (0,5 ml de tripsina-EDTA 0,05% (v/v) por frasco) o bien con un raspador y se dispersaron en medio de cultivo fresco. La suspensión celular se recogió por centrifugación a 500xg durante 5 min a 4°C. El sedimento celular se resuspendió en medio de congelación completo a 4°C hasta una concentración final de 1×10^6 células/ml. Seguidamente, se añadieron 1,5 ml de la suspensión celular a cada uno de los criotubos y se colocaron en una gradilla de poliestireno envueltos en algodón. Ello permitió aislarlos suficientemente para un enfriamiento lento (-1°C/min) al ser almacenados a -70°C durante 2 h, tiempo en que los cultivos alcanzan esta temperatura. A continuación fueron transferidos a nitrógeno líquido, donde se almacenaron hasta su uso. Esta última etapa se ha de realizar rápidamente para evitar que la temperatura aumente por encima de -50°C, puesto que en ese caso las células se deteriorarían rápidamente.

PBS (Solución Dulbecco-Vogt sin Ca^+ ni Mg^+): NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM. Se ajusta el pH a 7,4 y se esteriliza por autoclave.

Medio de congelación completo: Medio DME Ham's F-12 al que se le añade FCS 20% (v/v) y sólo antes de su utilización, DMSO 7% (v/v).

2.3.2 Descongelación de células

Los criotubos con la suspensión celular congelada se extrajeron del nitrógeno líquido y se introdujeron rápidamente en un baño a 37°C. Una vez descongeladas las células, los criotubos se limpiaron externamente con etanol 70% (v/v) y su contenido se transfirió a un tubo estéril. A continuación, se diluyó la suspensión celular en medio de crecimiento añadiéndose lentamente el medio, gota a gota, con el fin de diluir gradualmente las células y el conservador (DMSO). Éste es un paso crítico, puesto que la dilución súbita puede causar graves daños osmóticos y reducir la supervivencia celular. Al cabo de 24 h, se revisó el estado de las células y se cambió el medio.

2.4 Recuento de las células y determinación de la viabilidad celular

La monocapa de células se trató con solución de tripsina-EDTA 0,05% (v/v) (0,5 ml por frasco de 25 cm²) a 37°C y se dispersó en 1-2 ml de medio de crecimiento. La suspensión resultante se centrifugó a 500xg durante 2 min a 4°C. El sedimento celular se resuspendió en 0,1-0,5 ml de medio fresco sin suero o de PBS. En la cámara de

Neubauer, se hizo un recuento del número de células existentes en 25 cuadrados del área central, lo que equivale a una superficie de 1 mm^2 . Ya que la altura entre cubre y cámara es de 0,1 mm, el número de células/ml se obtuvo de multiplicar por 10^4 el número de células contadas. Teniendo en cuenta la dilución inicial y el volumen de la muestra se determinó el número de células/ml y el número total de células en la muestra.

La estimación de la viabilidad celular se llevó a cabo con el test de exclusión del colorante azul tripano (*Trypan Blue*, Sigma) que se basa en la premisa de que las células viables presentan la membrana plasmática intacta e impermeable al colorante mientras que, por el contrario, las células no viables absorben el colorante, quedando como resultado, el núcleo teñido de color azul. Para ello la suspensión celular se mezcló con un volumen igual de colorante azul de tripano al 0,5% (v/v) en PBS. Antes de colocar la mezcla en el hemocitómetro o cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania) se esperó unos minutos con el fin de permitir la penetración del colorante en las células muertas. La viabilidad se expresó como la relación entre el número de células no teñidas (viables) respecto al número total de células (teñidas y no teñidas).

2.5 Tratamiento de las células con retinoides

Las células se cultivaron en medio de crecimiento con bajo contenido en suero. En algunos casos, los cultivos celulares confluentes se incubaron con medio totalmente libre de suero durante 72 h, antes del tratamiento con las diferentes hormonas.

Los diferentes isómeros del AR (todo-*trans*-AR, 9-*cis*-AR y 13-*cis*-AR, disueltos en DMSO) se añadieron al medio exento de suero. Cada 24 h se reemplazó el medio de crecimiento y los diferentes isómeros.

3 PREPARACIÓN, ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE DNA

3.1 Purificación y concentración del DNA de soluciones acuosas

La obtención y manipulación del DNA implica una gran variedad de etapas que exigen la posterior purificación del DNA. Generalmente, se procedió a una desproteización de las muestras de DNA con una extracción con fenol. Así, a la solución de DNA se añadió 0,5 vol de fenol-Tris y 0,5 vol de la mezcla cloroformo/alcohol isoamílico (24:1, v/v). La mezcla se agitó vigorosamente con el fin de mezclar la fase acuosa, donde se encontraba el DNA, y la fase orgánica. La subsiguiente separación de las fases se realizó por centrifugación a 14000 rpm durante 10 min en una microcentrifuga. La fase acuosa, que quedó en la superficie, se recogió cuidadosamente y se dispensó en un nuevo tubo. La presencia de un precipitado blanco en la interfase indicaba contaminación de proteína, repitiéndose de nuevo la extracción con 1 vol de cloroformo:alcohol isoamílico. A continuación, se procedió a la precipitación del DNA añadiendo 0,1 vol de acetato de sodio 3 M, pH 5,2 a la fase acuosa y 2,5 vol

(calculados después de añadir la sal) de etanol absoluto frío (-20°C). Se dejó durante al menos 30 min a -20°C y se recogió el sedimento de DNA por centrifugación a 14000 rpm 10 min en una microcentrifuga. El DNA se lavó con etanol 70% (v/v) para eliminar los restos de fenol y sal y se resuspendió, una vez seco, en el volumen apropiado de agua o tampón TE [Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM (pH 8,0)] para continuar con las siguientes etapas de manipulación.

Fenol saturado en tampón (Fenol-Tris): Se funde el fenol (Sigma) a 60°C durante al menos 30 min y se añade 0,5 g de 8-hidroxiquinolina por cada 500 ml de fenol licuado. A continuación, se adiciona 0,5 vol de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8), se agita y se dejan separar las fases. Se elimina la fase acuosa, se añade más tampón y se agita nuevamente. Esta operación se repite un par de veces más. Una vez bien separadas, se elimina casi toda la fase acuosa superior y se almacena a 4°C .

3.2 Separación y obtención de fragmentos de DNA

La separación e identificación de los fragmentos de DNA de interés, así como su aislamiento a partir de una mezcla heterogénea fue posible gracias a las técnicas electroforéticas.

3.2.1 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Las electroforesis se realizaron sobre un soporte sólido de agarosa en tampón TBE. En estas condiciones, a pH neutro, el DNA presenta una carga neta negativa, de manera que, sometido a un campo eléctrico migra hacia el ánodo. Las moléculas de DNA lineal migran a través del gel a una velocidad inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. De este modo, pudo determinarse el tamaño de los fragmentos de DNA de interés en relación con marcadores comerciales de peso molecular conocido.

Se utilizaron geles nativos de agarosa horizontales, en los que el DNA migró en forma de doble cadena. En la mayoría de los casos, se prepararon geles al 1% (p/v) de agarosa Seakem[®] LE (FMC[®] Bioproducts) en tampón TBE 0,5x [TBE 5x: Tris 450 mM, ácido bórico 450 mM y EDTA 12,5 mM (pH 8,0)]. Se esteriliza por autoclave. La solución se calentó hasta fundir totalmente la agarosa. Una vez enfriada la solución hasta unos $50-55^{\circ}\text{C}$, se añadió bromuro de etidio hasta una concentración final de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (una dilución 1/100000 de la solución madre 10 mg/ml). El bromuro de etidio se intercala entre las bases del DNA y permite su visualización al emitir una fluorescencia anaranjada cuando se hace incidir luz ultravioleta (UV). Este es un agente mutagénico y tóxico, por lo que conviene manipularlo siempre con guantes. La disolución se vertió en el molde y se dejó solidificar. Las muestras de DNA se cargan en los pocillos del gel mezcladas con tampón de carga 10x [20% de Ficoll 400, EDTA 100 mM, 1% (p/v) SDS, 0,4% (p/v) de azul de bromofenol, 0,4% (p/v) de xilenocianol]. Los dos colorantes, el azul de bromofenol y el xileno cianol, en los geles de agarosa de 0,5-

1,4% (p/v) comigran con fragmentos de DNA de ~300 y ~4000 pb, respectivamente. Las condiciones de electroforesis fueron 8-10 V/cm.

Una vez finalizada la electroforesis, para la visualización de los fragmentos de DNA, los geles se colocaron sobre un transiluminador UV. La visualización de las bandas de DNA y la adquisición fotográfica se llevó a cabo con el Geldoc 1000 con un Software Molecular Analyst Version 1.5 (Bio-Rad).

3.2.2 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

La purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se llevó a cabo por electroelución en sacos de diálisis siguiendo el procedimiento que se describe a continuación. Las bandas de DNA de interés, visualizadas en un gel de agarosa, se recortaron con una hoja de bisturí. Cada taco de agarosa con el fragmento de DNA en su interior, se introdujo en un saco de diálisis y se añadieron 0,5 ml de tampón TBE 0,5x. Seguidamente, después de eliminar las burbujas de aire, el saco cerrado se colocó, entonces, en posición horizontal y perpendicular al campo eléctrico dentro de la misma cubeta de electroforesis en la que se había realizado el gel de agarosa. De esta forma, al aplicar un campo eléctrico de 100 V durante 20 min a 1 h, el DNA salía de la agarosa en dirección al ánodo, quedando en el interior de saco. Seguidamente, se invirtió la polaridad durante 15 s, se extrajeron los 0,5 ml de tampón y se dispensaron en un tubo Eppendorf. Con 0,5 ml de tampón se recogieron los restos de DNA del saco que se añadieron a los anteriores. El volumen total (1 ml) se repartió en dos tubos y se procedió a una extracción fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y una precipitación con acetato de sodio y etanol (tal como se describe en apartado 3.1). Finalmente, el sedimento de DNA se resuspendió en un volumen adecuado de tampón TE. Se combinaron las dos fracciones y se analizó una alícuota (1/10) mediante electroforesis en gel de agarosa.

Para la purificación de las bandas de DNA, también se utilizó el kit Concert™ Gel Extraction System (GIBCO BRL®, Life Technologies), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Este método se basa en la utilización de una columna con resinas de sílice para la captura y purificación de fragmentos de DNA.

3.3 Digestión con enzimas de restricción. Obtención de mapas de restricción

A la solución de DNA (0,1-4 µg) se añadió 0,1 vol de tampón de digestión 10x (específico para cada enzima) y de 1-5 U enzima /µg DNA. La mezcla de reacción se incubó a la temperatura óptima y durante el tiempo necesario para obtener una digestión total del DNA. Finalizada la reacción, se cargó una alícuota en un gel de agarosa para comprobar la digestión. Si era necesario, se procedía a la

desprotección de la muestra de DNA mediante una extracción fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y precipitación con acetato de sodio y etanol.

En el caso de que el DNA debiera fragmentarse con más de un enzima de restricción, las digestiones se hacían simultáneamente siempre que los enzimas fuesen activos en el mismo tampón de digestión. En estos casos es importante tener en cuenta que el volumen final de reacción sea suficientemente grande para mantener la concentración de glicerol por debajo del 10% y así evitar la actividad *star* de los enzimas. Si el tampón de digestión no era el óptimo para todos los enzimas, las restricciones se realizan en serie empezando por la de requerimiento salino más bajo y rectificando la concentración salina, antes de proceder a la siguiente digestión. Si esta opción no es posible, se digiere el DNA con uno solo de los enzimas. Después se inactiva el enzima y se somete la mezcla de reacción a una extracción fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y precipitación con etanol, para seguidamente llevar a cabo la segunda restricción.

3.4 PCR

La técnica de PCR se ha llevado a cabo para la amplificación de secuencias concretas de DNA de los diferentes isoenzimas ADH a partir de un DNA molde que podía ser cDNA recién sintetizado a partir de RNA (una alícuota de la mezcla de síntesis de la primera cadena), cDNA clonado en un vector concreto o DNA genómico. También nos permitió la obtención de sondas de DNA marcadas con digoxigenina durante la amplificación (ver apartado 4.3.4.2.). Se utilizó un Termociclador PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ. Research, Inc.)

3.5 Clonación y secuenciación de DNA

En esta parte se describen los pasos esenciales para la construcción, clonación y selección de DNA recombinante.

3.5.1 Preparación del vector

3.5.1.1 Vectores

– *pBluescript II SK (+)*: Plásmido de 2961 pb derivado de pUC19. SK indica que el “polylinker” está orientado de manera que la transcripción de lacZ procede desde *SacI* a *KpnI*. La denominación (+) indica que el origen de replicación del fago filamentoso F1 (3-459) permite la obtención de la cadena sentido del gen lacZ. En este plásmido se clonaron la mayor parte de los fragmentos de cDNA de ADH1, ADH3 y ADH4 de rata y humano. Además, se clonaron los fragmentos de cDNA de ADH1 y ADH4 que sirvieron como molde para la síntesis de ribosondas por transcripción *in vitro*, puesto

que contienen los promotores de las RNA polimerasas de T3 y T7. Presenta el gen que codifica la β -lactamasa, lo que confiere resistencia a la ampicilina (amp^r).

– *pTAg*: Plásmido de 3816 pb, es portador del gen *lacZ α* y con el promotor de T7. Presenta los genes que confieren resistencia a ampicilina y kanamicina.

– *pGEX-4T-1*: Vector de expresión de, aproximadamente, 4900 pb. En este vector se clonó el cDNA completo de la ADH4 humana lo que permitió expresar el enzima como proteína de fusión con la glutatión S-transferasa (GST). El cDNA se insertó en el polylinker ubicado al final del gen de la GST, entre las dianas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI. El represor *lac*, producto del gen *lacI* se une al promotor p_{lac} , reprimiendo la expresión de la proteína de fusión-GST. La inducción con IPTG, anula la represión y permite la expresión de la proteína. Justo antes del lugar de multiclonaje, se encuentra la secuencia que codifica la secuencia de reconocimiento para la trombina, con el punto de corte ubicado entre la Arg y la Gly de la GST. Además, presenta el gen que codifica la β -lactamasa lo que confiere resistencia a la ampicilina.

3.5.1.2 Extracción del DNA plasmídico

La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo mediante lisis alcalina (Birboim y Doly, 1979) utilizando el *kit* GFX™ *Micro Plasmid Prep* (Amersham Pharmacia Biotech). Se partió de una única colonia seleccionada que fue inoculada en un tubo estéril con 3 ml de medio LB-ampicilina (50 μ g/ml) y se dejó crecer a 37°C a 200 rpm durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se recogió el sedimento celular por centrifugación y se inició la lisis alcalina de las bacterias con una solución que contenía SDS y NaOH. Por su parte, el detergente desnatura las proteínas, mientras que la sosa se desnatura el DNA tanto genómico como el plasmídico. La mezcla resultante es neutralizada con acetato potásico que permite la renaturalización del DNA plasmídico mientras que el DNA cromosómico y las proteínas bacterianas precipitan formando un complejo con el potasio que se elimina por centrifugación. El DNA plasmídico renaturalizado quedó en el sobrenadante que se pasó por la columna.

LB (Medio Luria-Bertani): 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g cloruro de sodio en 1 litro de H₂O. Se ajusta el pH hasta 7,2 con NaOH y se esteriliza la solución por autoclave durante 20 min a 121°C y 1kg/cm².

3.5.1.3 Desfosforilación del vector de clonación

Una vez digerido el vector, con el fin de mejorar la eficiencia de la etapa posterior de ligación DNA vector-DNA inserto, se desfosforilaron sus extremos 5' y evitar así la recircularización del vector linearizado por ligación de los extremos. Para ello, se añadieron 10 μ l de tampón de fosfatasa alcalina 10x (Tris-HCl 500 mM, pH 8, MgCl₂

10 mM, ZnCl₂ 1 mM y espermidina 10 mM) y la cantidad apropiada de fosfatasa alcalina (relación 1:1 pmol de vector:unidades de fosfatasa alcalina, Roche) y el volumen se ajustó hasta 100 µl. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 15 min. Seguidamente se añadió una nueva alícuota (igual a la mitad del volumen adicionado anteriormente) de fosfatasa alcalina pancreática y se incubó la mezcla a 55°C durante 45 min. Al final se paró la reacción añadiendo EDTA (a una concentración final de 20 mM) e incubando la mezcla a 75°C, 10 min, para inactivar el enzima. El vector desfosforilado se resuspendió en el volumen de agua o tampón TE apropiado.

3.5.2 Preparación del inserto de DNA

En general, los fragmentos de DNA utilizados para la construcción del DNA recombinante provenían de amplificaciones por PCR utilizando cebadores específicos para la amplificación de secuencias concretas de ADH, en las que el DNA molde tenía diferentes procedencias: la primera cadena de cDNA obtenido a partir de un pool de RNA poliA⁺ de un determinado tejido o bien una preparación de DNA genómico.

3.5.2.1 Procedencia del inserto

Dos fueron las fuentes potenciales de insertos para la clonación: 1. Segmentos de cDNA preparados a partir de RNA de hígado, estómago, vasos sanguíneos y células H4IIEC3, y amplificados por PCR con el fin de enriquecer las muestras con el fragmento de interés; 2. Fragmentos de DNA genómico de hígado de rata y amplificados por PCR.

La electroforesis, una vez más, permitió la separación de las mezclas de productos de PCR y la recuperación de los fragmentos de DNA de interés para su posterior clonación. Aunque no fue posible la obtención del fragmento de DNA puro, permitió disminuir el número de clones a examinar para encontrar el portador del segmento de DNA de interés.

A. Síntesis de cDNA. RT-PCR

La síntesis de la primera cadena de cDNA, se llevó a cabo a partir de 1 µg de RNA poliA⁺ utilizando el cebador –adaptador *NotI* y la transcriptasa inversa de AMV proporcionados por el *kit* RiboClone (Promega), siguiendo la instrucciones de la casa comercial (Promega, 1992). En algunos casos, se utilizó otro cebador, el cebador R₀R₁-(T)17 (Frohman, 1993). La reacción se detuvo sometiendo la mezcla a 95°C durante 3 min y enfriando rápidamente en un baño de hielo. El correcto desarrollo de la reacción de síntesis de cDNA se verificó marcando una alícuota de la reacción con 5 µCi de α-³²P dCTP (400 Ci/mmol), siguiendo el procedimiento de la casa comercial (Promega, 1992). El porcentaje de incorporación de radiactividad se midió mediante el

ensayo de precipitación por TCA y conteo en marcador de centelleo. Se comprobó la calidad y el tamaño de los productos de la reacción marcados por desnaturalización con NaOH 0,1 N durante 15 min y electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). Como patrón, se utilizó una mezcla de fragmentos de DNA de diferentes pesos moleculares (DNA del fago λ digerido con *Hind*III, Promega), marcando radiactivamente 1 μ g de este DNA con 2 mCi de α - 32 P (400 Ci/ml), en una mezcla de reacción con dATP y dCTP 0,2 mM y 2,5 U de DNA polimerasa *Klenow* en 25 μ l de tampón (Fig. 6). Se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y se detuvo la reacción con 2,5 μ l de EDTA 200 mM. Para eliminar los nucleótidos no incorporados, se utilizaron las minicolumnas Quick Spin™ Columns Sephadex® G25 Fine (Roche), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se colocó sobre un pedazo de papel Whatman® 3MM (Whatman International Ltd.), de forma que quedaran sobranes unos 2 cm de papel alrededor del gel. A continuación, se cubrió el gel con papel de plástico PVC adherente (Viky Film) y se colocó en un secador de geles (Gel Slab Dryer GSD-4, Pharmacia) conectado a una fuente de corriente continua (Bio-Rad 200/2.0 Power Suply, Bio-Rad) a 30 V durante 2 h. Una vez seco, el conjunto papel-gel-plástico se colocó, bajo luz roja, en un cassette de autorradiografía con dos pantallas intensificadoras y una película para autorradiografía. La exposición se realizó a -80°C . Los tiempos de exposición variaron de unos experimentos a otros, desde 3 h a dos días. La secuencia de revelado de la película, también bajo luz roja, fue: inmersión en líquido revelador LX24 (Kodak-Pathé) durante 1 min, lavado con agua, inmersión en líquido fijador AL4 (Kodak-Pathé) durante 1 min, lavado con abundante agua corriente y dejar secar.

Una pequeña alícuota de la mezcla de reacción (1 μ l de un total de 25 μ l de mezcla de reacción de la síntesis de la primera cadena de cDNA) se utilizó como DNA molde en una amplificación mediante PCR (ver apartado 4.3.4.1.). Los oligonucleótidos empleados en la mezcla de reacción y las condiciones de la PCR variaron en función de la secuencia de interés.

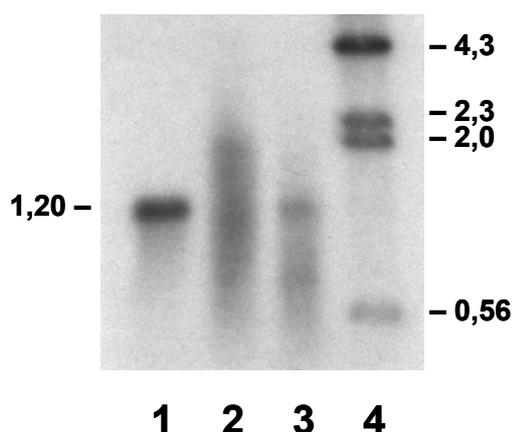


Figura 6. Comprobación de la reacción de síntesis de la primera cadena de cDNA. Autorradiografía del de agarosa de los productos de síntesis de la primera cadena de cDNA desnaturalizados de hígado (2) y estómago (3) de rata. Se utilizó como control el cDNA de un mRNA de 1,2 Kb (1) y como patrón de peso molecular de DNA, DNA de bacteriofago λ digerido con *Eco*RI (tipo II, Roche) (4).

– **ADH4 de rata:** Para ello, se utilizaron como cebadores oligonucleótidos específicos de ADH4 de rata: el cebador RataADH4-2, que corresponde a los aminoácidos 150-153, o el cebador RataADH4-3, complementario a la secuencia que codifica los aminoácidos 256-261. Como cebador antisentido se utilizó en ambos casos el R_0 complementario a una parte del cebador $R_0R_1-(T)17$, utilizado inicialmente para la síntesis del cDNA. Las condiciones óptimas de la mezcla de reacción para la amplificación por PCR fueron: 0,1 vol de tampón de PCR 10x concentrado suplementado con 15 mM $MgCl_2$ (Roche), 0,2 mM de cada dNTP, 1 μ M de los cebadores RataADH4-2 o RataADH4-3 y R_0 y 0,5 U de una mezcla enzimática Expand™ High Fidelity (3,5 U/ μ l, Roche). La reacción de PCR incluyó una etapa de desnaturalización a 94°C durante 45 s, una hibridación a 50°C durante 25 s y una extensión a 72°C durante 1 min 30 s. Se llevaron a cabo, un "hot start" a 95°C durante 2 min y 30 ciclos seguidos de una etapa final de extensión a 72°C durante 4 min. El resultado de esta primera reacción de PCR se separó en un gel del 1% de agarosa. Los productos de PCR resultantes se reamplificaron empleando una pareja de cebadores internos (PCR anidada). Así pues, se utilizó, en los dos tipos de reacciones realizadas, como cebador antisentido el R_1 complementario a una parte del primer $R_0R_1-(T)17$, que es interno al primer R_0 . Como pareja se empleó el cebador RataADH4-3 para el producto de la reacción RataADH4-2x R_0 o el cebador RataADH4-4 para el producto de la RataADH4-3x R_0 . Se utilizó como molde una dilución 1/20 de los productos de la primera reacción y las diferentes parejas de cebadores en una concentración de 1 μ M, siendo las condiciones de la PCR idénticas a las anteriores, a excepción de la etapa de hibridación (55°C durante 30 s).

– **ADH1 de rata:** El procedimiento seguido fue idéntico al de ADH4 de rata. En este caso, se utilizó una alícuota de la reacción de síntesis de la primera cadena de cDNA de hígado de rata. Se utilizó como cebador el oligonucleótido específico de ADH1 de rata: el cebador RataADH1-3, que corresponde a los aminoácidos 219-235 (Tabla 8), y como cebador antisentido el R_0 complementario a una parte del cebador $R_0R_1-(T)17$. Los productos de PCR resultantes, se reamplificaron, en una PCR semianidada, con el cebador RataADH1-3 y como cebador antisentido, un oligonucleótido interno al RataADH1-4 (Tabla 8), correspondiente de la ADH1 de rata. Se utilizó como molde una dilución 1/20 de los productos de la primera reacción.

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados como cebadores en la PCR de fragmentos de cDNA de ADH1 y ADH4 de rata y humano.

Oligo	Secuencia	Correspondencia con la secuencia de aminoácidos	Tm (°C)
RataADH4 - 1	5'-CARCAYTTYATGAAYAC-3'	138 → 142 ADH4 de rata	46
RataADH4 - 2	5'-ACGGTCCTGGATGAATC-3'	150 → 155 ADH4 de rata	52
RataADH4 - 3	5'-GACATGACAGGCAACCA-3'	256 → 261 ADH4 de rata	52
RataADH4 - 4	5'-GGAAAAGAAATTTGACC-3'	337 → 342 ADH4 de rata	46
RataADH4 - 5	5'-TTCGGACTGCCTGACATTTTG-3'	369 → 375 ADH4 de rata	64
RataADH4 - 6	5'-CCRTARTTCATRTGRCA-3'	282 ← 286 ADH4 de rata	48
5' RataADH4 - 1	5'- CAGACCACAAACCCAGG-3'	- 25 bases 5'UTR ADH4 de rata	54
3' RataADH4 - 1	5'-AGAGAGCTGGGTGTTCTGTG-3	+ 24 bases 3'UTR ADH4 de rata	62
3' RataADH4 - 2	5'-CTACATCTCTGCACATGCTTTG-3'	+ 457 bases 3' UTR ADH4 de rata	64
3' RataADH4 - 3	5'-AAATGGAGTTACTACTATGCC-3'	+ 746 bases 3' UTR ADH4 de rata	62
3' RataADH4 - 4	5'-GCCCTTAAGGACTTGTCTTCTAC-3	+ 728 bases 3' UTR ADH4 de rata	70
RataADH1 - 1	5'- GATGAGAGGGCATCAAC-3'	274 → 280 ADH1 de rata	52
RataADH1 - 2	5'-CGCTGGTCCCATAGTTC-3'	283 → 289 ADH1 de rata	54
RataADH1 - 3	5'-CTTCCTGCAGTTCTAGG-3'	219 → 235 ADH1 de rata	52
RataADH1 - 4	5'-CCGTTGGAGCCGCTCATT-3'	1062 ← 1083 ADH1 de rata	60
HumADH1 - 1	5'-CCRATKACTTCRAAYGA-3'	265 ← 269 ADH1 de humano	48
R₀, R₁ (T)17	5'-AAGGATCCGTCGACATCGATAATAC GACTCACTATAGGGA(T) ₁₇ -3'	Adaptador *	40
R₁	5'-GACATCGATAATACGAC-3'	Adaptador interno de R ₀ , R ₁ (T)17 *	48
R₀	5'-AAGGATCCGTCGACATC-3'	Adaptador interno de R ₀ , R ₁ (T)17 *	50

* Frohman, 1993. Degeneraciones: H = A o C o T; K = T o G; Y = C o T; N = A o C o G o T; R = A o G.

B. Obtención de extremos romos

La digestión con enzimas de restricción puede producir fragmentos de DNA con extremos 5' protuberantes, que fueron reparados por tratamiento con *Klenow*. El fragmento *Klenow* es el extremo carboxilo terminal de la DNA polimerasa I de *E. coli*, el cual mantiene su actividad polimerasa y exonucelasa 3'→5', pero ha perdido la

actividad exonucleasa 5'→3'. Por esta razón, se utilizó para reparar los extremos protuberantes convirtiéndolos en extremos romos necesarios para la posterior clonación del DNA. Para ello, a 200-500 µg de DNA purificado se añadieron: 1 µl de cada uno de los dNTPs 2 mM, 5 µl de tampón para Klenow 10x (Tris-HCl 500 mM, pH 7,4, MgCl₂ 100 mM, DTT 1 mM y BSA 500 µg/ml) y 2 µl del fragmento *Klenow* (~4 U) y H₂O hasta 50 µl de volumen final. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 15-20 min en un baño de agua termostatzado.

Los productos obtenidos de PCR presentan extremos 3' protuberantes cuya reparación se llevo a cabo con el kit "SureClone™ Ligation" (Pharmacia Biotech) mediante la utilización de la DNA polimerasa de T4 (U/ml). Una vez finalizada la reacción, en ambos casos, se llevó a cabo la purificación y concentración del DNA (apartado 3.1).

C. Fosforilación de los extremos del inserto

Los fragmentos de DNA con los extremos romos, fueron fosforilados en su extremo 5' con la polinucleótido quinasa de T4, como tratamiento previo a la ligación con el vector. La polinucleótido quinasa cataliza la transferencia del fosfato terminal (γ) del ATP al grupo 5'-hidroxilo del DNA, lo que permite la fosforilación de ese DNA en su extremo 5'. Para ello, a 50 µl de DNA (una cantidad variable en función de la longitud del fragmento de DNA), se le añadieron: 6 µl de tampón de polinucleótido quinasa de T4 10x (Tris-HCl 700 mM, pH 7,6, MgCl₂ 100 mM, DTT 50 mM), 3 µl de ATP 10 mM y 1 µl de polinucleótido quinasa de T4 (10 U, Roche o Pharmacia Biotech). La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 30 min, seguido de tratamiento a 70°C durante 10 min para inactivar el enzima. La muestra se desproteinizó con una extracción fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y precipitación con acetato de sodio y etanol (apartado 3.1). El sedimento de DNA se resuspendió en un volumen apropiado de agua para la etapa de ligación posterior.

3.5.3 Ligación vector-inserto

Para la ligación del fragmento de DNA con el vector se utilizó la DNA ligasa de T4, la cual en presencia de ATP, que utiliza como cofactor, repara los cortes en las cadenas de la doble hebra de DNA y une los fragmentos de restricción de DNA doble hebra con extremos romos o cohesivos. Por tanto, a 100-200 ng de DNA vector linearizado, se le añadió la cantidad necesaria de DNA inserto para conseguir una relación molar 1:3 de vector/inserto, 2 µl de tampón de ligación 10x (Tris-HCl 300 mM, pH 7,8, MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM y ATP 5 mM), 2 µl de DNA ligasa de T4 FLPC^{pure}® (Pharmacia Biotech) y el volumen necesario de H₂O hasta 20 µl finales. La mezcla de reacción se incubó a 16°C durante toda la noche y se guardó a 4°C hasta su utilización. La mitad

de la mezcla de ligación se utilizó para la transformación de las células competentes de *E. coli*.

3.5.4 Preparación y transformación de células competentes de *E. coli*

Las construcciones de DNA recombinante se introdujeron en células hospedadoras para ser clonados y amplificados. Se prepararon y transformaron células competentes de la cepa DH5 α de *E. coli*. Para la preparación de células competentes (permeabilización de la pared y membrana de las células) se inoculó 1 colonia de la cepa deseada (en la mayoría de casos DH5 α) en medio LB y se dejó a 37°C y 300 rpm toda la noche. A la mañana siguiente, se inoculó 1 ml del cultivo de noche en 100 ml de medio LB fresco y se dejó a 37°C y 300 rpm durante 4-5 h hasta que el cultivo alcanzaba una densidad óptica entre 0,45 y 0,55. Llegado a este punto, el cultivo en fase de crecimiento exponencial, se transfirió a un tubo estéril y se incubó en hielo unos 15 min. El sedimento celular se recogió por centrifugación a 4000xg y 4°C durante 10 min, descartándose el sobrenadante y resuspendiéndose dicho sedimento en 50 ml de una solución estéril de CaCl₂ 0,1 M previamente enfriada en hielo. Se incubó de nuevo en hielo 15 min, se repitió la centrifugación y se resuspendió de nuevo el sedimento celular en 3,5 ml de CaCl₂ 0,1 M. Aunque las células competentes pueden ser almacenadas en glicerol 15% a -80°C hasta su utilización, es recomendable utilizarlas durante las primeras 12-24 h puesto que su eficiencia de transformación se ve incrementada en 4-6 veces.

Cada transformación se hizo con una alícuota de 200 μ l de la suspensión anterior, añadiéndose un máximo de 10 μ l (la mitad del volumen) de mezcla de ligación o del correspondiente control con agua, incubándose en un baño de hielo durante 30 min. Seguidamente, se aplicó un choque térmico durante 90 s a 42°C e inmediatamente después se transfirió a un baño de hielo durante 2 min. Tras aproximadamente 1 h de recuperación en 1 ml de medio LB a 37°C y en agitación a 200 rpm, las células transformadas se sedimentaron con un pulso de 15 s y el sedimento se resuspendió en unos 100 μ l de medio LB, al que se añadieron 20 μ l de X-gal al 5% en dimetilformamida. Inmediatamente, la siembra se realizó en placas de LB-agar con 75 μ g/ml de ampicilina, que se incubaron a 37°C durante 12-18 h hasta que las colonias se hicieron visibles.

3.5.5 Análisis de los transformantes y selección de clones

Una vez separadas las moléculas de DNA recombinante en clones individuales, se procedió a la selección de los clones deseados. Para ello, de entre todos los clones positivos, se seleccionaron unos pocos que se inocularon en 5 ml de medio líquido LB con ampicilina 75 μ g/ml. Los cultivos se mantuvieron en un incubador orbital a 37°C y 300 rpm durante 12-16 h. Se separó una fracción de 800 μ l de cada cultivo, a la que

se añadieron 200 μ l de glicerol al 87% estéril, (concentración final 15%), y la mezcla se almacenó a -80°C . Estos glicerizados son la reserva de los clones positivos con los insertos de interés. Del resto de cultivo, se procedió a la extracción del DNA plasmídico utilizando el método de minicolumnas de Amersham Pharmacia Biotech (apartado 3.5.1.2.).

La obtención de mapas de restricción permitió determinar el tamaño del inserto ya que la longitud del vector es conocida. Los productos de digestión fueron analizados en gel de agarosa al 1% (p/v) y tinción con bromuro de etidio, y el tamaño de los fragmentos de DNA fue determinado por comparación con patrones de peso molecular de DNA comerciales (apartado 3.2.1). Se seleccionaron los clones con insertos de DNA del tamaño esperado para su posterior secuenciación.

3.5.6 Secuenciación

El DNA plasmídico de los clones seleccionados se secuenció en el Servicio de Secuenciación de DNA de la Universidad Autónoma de Barcelona, por el método de terminación de la cadena con didesoxinucleótidos (Sanger y col., 1977), con los cebadores T3 y T7 marcados fluorescentemente y el “*kit*” de secuenciación mediante PCR que utiliza estos cebadores marcados, y la *Taq* polimerasa (Applied Biosystems), en un secuenciador de DNA (Applied Biosystems, modelo 373A).

3.5.7 Análisis de las secuencias en los bancos de datos genéticos

Para verificar la correspondencia de la secuencia de los fragmentos de DNA obtenidos con el DNA de la ADH de interés, las secuencias fueron comparadas con las de los bancos de datos EMBL, GenBank, utilizando el programa FASTA y BLAST(versión 3). Estos programas pertenecen a la versión 9.1 del “Genetics Computer Group Package”.

4 MÉTODOS DE DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ADH

4.1 Detección del enzima activo

4.1.1 Homogeneización de los tejidos

4.1.1.1 Tejidos humanos.

Los tejidos humanos proporcionados por el Hospital de Tarragona Joan XIII, fueron almacenados a -80°C hasta su procesamiento. Los tejidos, entonces, fueron descongelados, troceados en pequeñas fracciones y homogeneizados en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8,6, a 4°C . Los extractos fueron centrifugados a $28000\times g$ durante 1h a 4°C y los sobrenadantes fueron utilizados en los ensayos de actividad y gels de

almidón (Allali-Hassani y col., 1997). Estos estudios fueron aprobados por los Comités de Ética de la Universitat Autònoma de Barcelona y del Hospital de Tarragona Joan XXIII.

4.1.1.2 Tejidos de rata.

Los tejidos se extrajeron rápidamente de las ratas sacrificadas, se lavaron y se congelaron y almacenaron hasta su uso, a excepción de los tejidos gástricos y de cerebro que se procesaron inmediatamente después del sacrificio del animal. En el resto de casos, los tejidos se dejaron descongelar sobre una bandeja con hielo para seguidamente, cortarlos en pequeños trozos y homogeneizarlos en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, DTT 0,5 mM. Las suspensiones resultantes se centrifugaron a 9000xg durante 30 min a 4°C, para la obtención de los sobrenadantes correspondientes. Este protocolo fue aprobado por el Comité de Ética y Experimentación Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona.

4.1.1.3 Cultivos celulares.

La monocapa celular se lavó con PBS (5 ml/frasco de 25 cm²) por dos veces, para eliminar los restos de medio, y se recogió con un raspador (TPP Techno Plastic Products AG). El sedimento celular se consiguió por centrifugación a 500xg durante 5 min a 4°C, se resuspendió en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, DTT 0,5 mM y se procedió a romper las células por sonicación (sonicador Branson Sonifier 450) a mínima potencia mediante 4 pulsos de 5 s cada uno. Seguidamente, la suspensión se centrifugó a 9000xg durante 15 min a 4°C para obtener el sobrenadante.

4.1.2 Determinación cuantitativa de proteínas

La concentración de proteína soluble intracelular se determinó por el método del *Coomassie Blue* (Bradford, 1976), utilizando BSA como patrón.

4.1.3 Determinación de la concentración de DNA celular

La concentración de DNA intracelular se determinó por el método fluorimétrico utilizando el colorante Hoechst 33258 (Cesarone y col., 1979). Este método se basa en el hecho que es colorante fluorescente se acompleja con el DNA, lo que permite la cuantificación del DNA de la muestra biológica. Como patrón, se utilizó DNA de timo de ternera (Promega) en un rango de concentración de 0,25-10 µg. Las muestras fueron disueltas en 2 ml de tampón SSC [NaCl 0,15 M, citrato de sodio (Na₃H₅O₇·2H₂O) 0,015 M (pH 7,0)] a los que se añadió 1 ml de solución colorante Hoechst 33258 (Sigma, 1,5 µM en tampón SSC, pH 7,0). Los tubos fueron entonces agitados e incubados 10 min en la oscuridad. El incremento de fluorescencia se

determinó a 25°C en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer 650/40 con longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión de 450 nm. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

4.1.4 Ensayos de actividad ADH por espectrofotometría

La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo en un espectrofotómetro UV-VIS (Cary 219, Varian), de doble haz, con registro gráfico, y termostatzado. La medida de la actividad enzimática se determinó a partir del incremento en la absorbancia a 340 nm, debido a la reducción del NAD⁺. En todos los ensayos, la actividad enzimática se determina a partir de la velocidad inicial en cubeta de vidrio de 1 ml y de 1 cm de paso óptico y a 25°C. La actividad se expresó en Unidades Internacionales (U): una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima requerida para catalizar la reducción de 1 μmol de NAD⁺ por minuto bajo las condiciones de ensayo, considerando que el coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm es $6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

La actividad en presencia de alcoholes se determinó en tampón glicina 0,1 M, pH 10. La actividad ADH1 de rata se determinó con NAD⁺ (grade AA-1, Sigma) 2,4 mM y etanol 10 mM. La actividad ADH4 de rata se midió de modo análogo al del caso anterior, pero empleando NAD⁺ 4 mM y etanol 500 mM (1 M en algunos casos). En algunos casos, se añadió a la mezcla de reacción 4-metilpirazol 0,5 mM como inhibidor.

La actividad formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH o ADH3) se determinó en una mezcla de reacción que contenía formaldehído 1 mM (a partir de una solución madre de *paraformaldehído*), NAD⁺ 1,2 mM en tampón pirofosfato sódico 0,1 M, pH 8,0 en presencia de glutatión reducido 1 mM. En algunos casos, con el fin de determinar exclusivamente la actividad FALDH, se utilizó APAD (Sigma), en vez del NAD⁺, que aumenta la actividad FALDH entre 4-22 veces debido a que la velocidad de disociación de este coenzima reducido es más rápida que la del NADH (Uotila y Koivusalo, 1989). Se consideró un coeficiente de extinción molar de $9100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 363 nm para el APAD reducido.

Formaldehído (para actividad enzimática): Se prepara a partir de la hidrólisis de paraformaldehído sólido (Merck), una solución de paraformaldehído al 10% (p/v) en agua destilada que se deja a 100°C durante unas 16 h. Se determina enzimáticamente la concentración de formaldehído de la solución utilizando la formaldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.46) de *Pseudomonas putida* (Sigma). Determinar la concentración final de NADH generado en la reacción, después de añadir 10-15 μl de una dilución 1/1000 de la solución de formladehído madre a una mezcla que contenga NAD⁺ en exceso (4 mM) y unas 0,05 unidades de la FADH comercial en tampón pirofosfato sódico 0,1 M, pH 8,0 hasta 1 ml final. La cantidad de NADH producido es equivalente a la de formaldehído presente inicialmente en la mezcla de reacción siempre que se trabaje en exceso de NAD⁺ respecto al formaldehído.

4.1.5 Electroforesis en gel de almidón

La determinación del patrón enzimático de ADH de los diferentes tejidos de rata y humano y de los cultivos celulares, se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de almidón con tinción por actividad. Este método permitió el análisis de las formas enzimáticas en homogeneizados de tejido o células de hepatoma de rata, sin necesidad de purificación previa.

4.1.5.1 Preparación del gel y condiciones de electroforesis

El gel de almidón se preparó siguiendo el método desarrollado en nuestro grupo de investigación (Julià y col., 1987), con algunas modificaciones. Se preparó un gel de almidón de patata hidrolizado (Sigma) al 11% (p/v), NAD^+ (grade AA1, Sigma) 0,75 mM, y Tris-HCl 20 mM, pH 8,6. Se aplicaron 12-15 μl de cada muestra en tiras de papel de 6x3x0,25 mm de Whatman[®] 3MM (Whatman International Ltd.), que fueron insertados en la parte central del gel. Las condiciones de la electroforesis fueron 720 V, 25-35 mA y 15-25 w. La electroforesis se llevó a cabo a 4°C durante 5 h. El tampón de electroforesis fue Tris-HCl 300 mM, pH 7,6, pre-enfriado a 4°C, y se añadieron 0,2 g de NAD^+ (grade AA2) en el cátodo en el momento de iniciar la electroforesis. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se cortó longitudinalmente en dos láminas idénticas y se procedió a la tinción por actividad.

4.1.5.2 Tinción del gel por actividad enzimática

La tinción se basa en el hecho de que en el lugar donde hay actividad enzimática se produce la oxidación del sustrato y la reducción del coenzima (NAD^+). El poder reductor, generado al transformarse el NAD^+ en $\text{NADH} + \text{H}^+$, se acopla al PMS, que a su vez reduce el NBT, aceptor final de los electrones. La sal de tetrazolio es reducida a su formazán, insoluble y de color azul oscuro, que precipita en las zonas del gel donde se encuentra el enzima. El PMS actúa como un transportador de electrones que acelera la reacción.

Las tinciones se realizaron a 40°C (excepto para los enzimas termolábiles de la ALDH, que se realizaron a 20°C), en ausencia de luz, durante 1 h aproximadamente.

La incubación con etanol o 2-buten-1-ol (alcohol crotilico) permitió visualizar las formas enzimáticas de la ADH (Boleda y col., 1989). La composición de la solución de tinción fue Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, ácido pirúvico 11 mM, NAD^+ (grade AA1) 0,55 mM, NBT 0,24 mM, PMS 0,065 mM (todos los reactivos de Sigma). En presencia de etanol 200 mM sólo se detectaron ADH1 y ADH4, mientras que en presencia de alcohol crotilico 100 mM también se detectó ADH3.

La detección específica de FALDH (ADH3) se realizó en las mismas condiciones, aunque en presencia de cloruro potásico 500 mM y utilizando el fosfato monosódico 70 mM, pH 7,5, como tampón. Como sustratos se utilizaron formaldehído 4,8 mM

(apartado 4.1.4) y glutatión reducido 1 mM (Sigma). Era importante mantener el pH a 7,5 para evitar la precipitación indiscriminada del NBT en presencia del glutatión reducido (a pHs superiores), lo que aumentaba mucho la tinción de fondo.

Para detectar la actividad aldehído deshidrogenasa se utilizó propanal 111 mM como sustrato (previamente destilado). Se añadió 4-metilpirazol 30 mM para evitar la aparición de bandas debidas a la actividad ADH.

Una vez las bandas adquirieron la intensidad adecuada, la tinción se detuvo por lavados con agua corriente. Los geles teñidos se fotografiaron en un principio con una cámara Polaroid MP-4 Land Camera (Polaroid Corp) con película Polaroid Type 665. Recientemente, la adquisición de las imágenes se llevó a cabo en un densitómetro GS-700 (Bio-Rad) y se analizaron con el software Molecular Analyst (versión 1.4 y 1.5; Bio-Rad).

4.1.6 Electroforesis analítica

Las proteínas de las fracciones celulares se separaron por isoelectroenfoque, tales como describe Robertson y col. (1987), con algunas modificaciones. Se utilizó el sistema PhastSystem™ IEF (Pharmacia LKB Biotechnology AB), siguiendo el manual de instrucciones proporcionado por la casa comercial. Se emplearon geles al 12,5% (p/v) de poliacrilamida con la mezcla de anfolitos Pharmalyte® incluida en el gel que cubría un rango de pH de 3 a 9 (Pharmacia Biotech). La electroforesis se desarrolló en el equipo electroforético PhastSystem™ (Pharmacia LKB Biotechnology AB) a 4°C durante 40 min a 500 V/h finales, siguiendo el programa descrito en el manual del equipo (Pharmacia LKB).

Tras el isoelectroenfoque, los geles fueron teñidos por actividad ADH o ALDH, tal como se describe en el apartado 4.1.5.2.

4.1.7 Tinción histoquímica

La tinción histoquímica permitió detectar la actividad ADH *in situ*, sobre las secciones de tejido. Así, la señal debida a la actividad ADH pudo localizarse en capas y tipos celulares específicos. Los tejidos de partida, por tanto, debían de conservar la proteína activa para poder detectar posteriormente la actividad enzimática en las secciones de tejido congeladas obtenidas en el criostato (Leica).

4.1.7.1 Fijación y crioconservación de los tejidos

Los órganos, una vez escindidos y lavados exhaustivamente, se cortaron en rodajas de unos 2 mm de grosor aproximadamente se introdujeron en un vial, y se incubaron en una solución de fijación de 12 a 24 h a 4°C. A continuación, se reemplazó por una solución de sacarosa al 10% (p/v) en PBS donde los tejidos se mantuvieron 30 min, seguida por una solución de sacarosa al 20% (p/v) durante 1 h. Finalmente, las

rodajas de tejido se dejaron en una solución de sacarosa al 30% (p/v) en PBS durante toda la noche a 4°C. Durante esta incubación, los tejidos deben acabar sedimentando en el fondo del vial, lo que indica que la sacarosa ha penetrado totalmente en el tejido. Seguidamente, cada una de las secciones de tejido se congeló en N₂ líquido. Para ello, se sumergieron en isopentanol, en un vial metálico, que a su vez se sumergió en otro que contenía N₂ líquido. De esta forma, el tejido se congeló por enfriamiento del isopentanol y no por contacto directo con el agente congelante.

4.1.7.2 Preparación de los cortes de tejido

Antes de proceder a seccionar los tejidos congelados, éstos se atemperaban a -20°C (temperatura del criotomo). Seguidamente, se colocó la pieza de tejido sobre el soporte del criostato en el que hay resina que permite la fijación sólida y segura del tejido al soporte. Se obtuvieron secciones de entre 10 y 20 µm que se recogieron en portas previamente tratados con poli-L-lisina (ver apartado 4.3.5.4.). Las secciones elegidas se guardaron en cajas que se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

4.1.7.3 Tinción de los cortes por actividad enzimática

Previamente a la tinción, las secciones de interés se dejaron descongelar a temperatura ambiente durante unos 30 min. Seguidamente se cubrieron con la solución de tinción (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, NAD⁺ 5 mM, piruvato 11 mM, NBT 3,4 mM, etanol 0,5-1 M, 4-metilpirazol 2 mM) y se dejaron a 42°C en completa oscuridad. La reacción enzimática se paró lavando con agua las secciones, las cuales seguidamente se fijaron en paraformaldehído 4% (p/v) en PBS durante 10 min, se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, y xileno y se montaron los cubreobjetos en medio de montaje ENTELLAN[®] neu (Merck). El análisis en el microscopio y adquisición de las imágenes de interés se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 4.3.5.10.

El procedimiento seguido para la detección de la actividad ADH se adaptó y optimizó a partir de la metodología descrita por Zimatkin y colaboradores (Zimatkin, 1991; Zimatkin y Dietrich, 1995) para la detección de actividad ALDH en secciones de tejido nervioso. Por esta razón, se utilizaron secciones de tejido para la tinción con ALDH como controles de cada experimento ADH. Los resultados obtenidos para la ALDH en las condiciones modificadas para la detección de la ADH, se correlacionaban con los publicados.

4.2 Detección de proteína ADH

4.2.1 Preparación de anticuerpos específicos anti-ADH4

Se procedió a la producción de anticuerpos policlonales contra la ADH4 humana para su posterior utilización en ensayos de inmunodetección de proteínas, tras la transferencia a membrana (“*Western blotting*”) e inmunohistoquímica sobre secciones de tejido.

4.2.1.1 Obtención y purificación de proteína ADH4 humana recombinante

La expresión y purificación de la ADH4 humana recombinante se basó en la utilización de un vector de expresión pGEX que permitió la producción de ADH4 como proteína de fusión con la glutatión-S-transferasa (GST) en un sistema bacteriano. Para ello, se utilizó el módulo de purificación por GST “Bulk and RediPack” (Pharmacia Biotech) siguiendo las instrucciones de la casa comercial con algunas modificaciones que se detallan a continuación. La cepa de *E. coli* BL21 (DE3)/plys que contenía la construcción pGEX-4T-1/ADH4 humana, fue tratada con IPTG, con el fin de inducir la expresión de la proteína de fusión (ver apartado 3.5.1.1). Seguidamente, las células se recogieron por centrifugación a 5000xg durante 20 min. El residuo sólido obtenido se congeló a -80°C para facilitar la lisis celular y se resuspendió en tampón Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7, sacarosa 10% (p/v), azida sódica 0,05% y β -mercaptoetanol (8 ml/g peso húmedo) y seguidamente se sometió a 5 periodos de congelación/descongelación en N_2 líquido. El lisado obtenido se incubó con DNasa (18 mg/g peso húmedo) con el fin de reducir la viscosidad de la muestra, a temperatura ambiente, durante 10 min y se centrifugó a 11000xg durante 20 min. El sobrenadante obtenido se aplicó a una resina Glutathione-Sepharose[®] 4B (Pharmacia Biotech), en una proporción de 0,375 ml de resina (previamente equilibrada con PBS) por 750 ml de cultivo o 37,5 ml de homogeneizado. La mezcla se incubó durante 90 min a temperatura ambiente y con agitación constante. A continuación, siguieron tres lavados sucesivos con 5 ml de PBS cada uno y se resuspendió finalmente en 0,475 ml de PBS (por cada 0,5 ml de resina), a los que se añadieron 25 μl de una solución de trombina (1 U/ μl) y se incubó entre 2 y 16 h. La digestión con trombina permite la liberación de la proteína ADH4 humana recombinante de la proteína de fusión GST. Finalmente, se centrifugó la mezcla a 500xg, 5 min a 4°C y se guardó el sobrenadante a -80°C .

4.2.1.2 Inmunización y obtención de sangrías

La inmunización de los conejos se llevó a cabo en el Servicio de Estabulario y Anticuerpos, del Centro de Investigación y Desarrollo del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Barcelona. Se inyectaron 5 dosis de antígeno

(ADH4 humana): 250 µg/inyección. Se utilizó el coadyuvante completo de Freund solamente en la primera inyección. Se realizaron tres sangrías, de aproximadamente 10 ml cada una, a los 7, 10 y 15 días después de la tercera inyección. La mezcla de suero y coágulo obtenida fue sometida a centrifugación a 10000xg durante 10 min, eliminándose el sedimento y quedando listo el antisuero para su posterior utilización. Cada antisuero procedente de una determinada sangría fue alícuotado en microtubos (Eppendorf) en fracciones de 250 µl que fueron almacenadas a -20°C. Como suero control se utilizó el obtenido antes de la inmunización de los conejos (el suero pre-inmune).

Una vez obtenidas las sangrías, se procedió a comprobar la existencia de reacciones cruzadas entre el antisuero anti-ADH4 y otras ADH u otras proteínas, su comportamiento frente a homogeneizados de estómago e hígado humanos, el límite inferior de detección, las diferencias entre los antisueros de diferentes sangrías y la incidencia de factores como el tipo de proteína bloqueadora, los tiempos de bloqueo, lavados e incubaciones, el uso o no de detergentes, etc. Para ello, se realizó la técnica de "*Western blotting*".

4.2.1.3 Purificación del anticuerpo

Los anticuerpos contra la ADH4 humana presentaban reactividad cruzada frente a otras formas de la ADH. Por esta razón, se procedió a la purificación del anticuerpo anti-ADH4 humana siguiendo un procedimiento descrito para la purificación de anticuerpos anti-ADH1 y anti-ADH4 de ratón (Haselbeck y col., 1997a), con alguna modificación. Primero, se eliminaron los anticuerpos no específicos mediante preadsorción y, seguidamente, se llevó a cabo una purificación del anticuerpo específico por afinidad.

4.2.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

La electroforesis de poliacrilamida con SDS se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Laemmli (1970). La electroforesis permitió determinar el peso molecular y el grado de pureza de la proteína recombinante (apartado 4.2.1.1.) y fue también el método de separación previo al de detección con anticuerpos específicos (*Western blotting*, apartado 4.2.3). Esta separación se consigue desnaturizando las proteínas en medio reductor a 95°C y en presencia de detergente SDS, y manteniendo las condiciones desnaturizantes durante el proceso de electroforesis. El SDS se une a las proteínas (previamente desnaturizadas por calor) impidiendo que éstas se reestructuren. Además, neutraliza los aminoácidos cargados de las proteínas, haciendo que se comporten como si tuvieran una relación carga-masa idéntica. Gracias a la presencia del detergente y al pH ligeramente básico del tampón de la

electroforesis, se consigue que todas las proteínas migren hacia el ánodo al someterlas a un campo eléctrico. El agente reductor, el β -mercaptoetanol, presente en el tampón de carga, rompe los puentes de disulfuro de las proteínas favoreciendo su desestructuración.

Este tipo de electroforesis se lleva a cabo con un gel compuesto por un gel superior o de apilamiento y un gel inferior o de separación. El primero es de un tanto por ciento de acrilamida bajo y un pH de 6,8: acrilamida 5% (p/v), bis-acrilamida 0,12% (p/v), Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, SDS 0,1% (p/v). El segundo es de un tanto por ciento de acrilamida superior y un pH de 8,7: acrilamida 11% (p/v), bis-acrilamida 0,3%(p/v), Tris-HCl 270 mM, pH 8,8, SDS 0,1% (p/v). Como tampón de la electroforesis: 0,2 M glicina, 25 mM Tris-.HCl, pH 8,8, 0,1%(p/v) SDS. Esta diferencia de pH entre los dos geles genera un gradiente de voltaje en el gel superior que provoca una aceleración de las proteínas y el consiguiente apilamiento de estas en el frente electroforético. Ello tiene un efecto concentrador, que llega su máximo justo antes de entrar en el gel inferior, obteniéndose la máxima resolución. Se utilizó un sistema de minigel vertical Mini-protean II dual slab cell (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Las muestras proteicas se incubaron a 95-100°C durante 2-5 min una vez diluidas con el tampón de carga desnaturalizante 5x: Tris-HCl 312,5 mM, pH 6,9, 10 mM EDTA, SDS 12% (p/v), azul de bromofenol 0,6% (p/v), β -mercaptoetanol 25%(v/v). Las condiciones de electroforesis fueron de 150 V durante 1 h.

Para revelar las bandas de proteína se realizó una tinción con *Coomassie Brilliant Blue R* (Bio-Rad) o *Ponceau S* [0,1% (p/v) de *Ponceau S* en ácido acético 5%(v/v), Sigma]. Mientras que la tinción con *Coomassie Blue* detecta hasta 5 ng de proteína ADH por banda, la tinción con *Ponceau S* sólo detecta cantidades superiores a 0,2 μ g de proteína ADH. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se sumergieron en la solución colorante (metanol 45%, ácido acético 10% y *Coomassie Blue* 0,25% (p/v)) durante unos 20 min o en *Ponceau S* unos 2 min. En el caso de la tinción con *Coomassie Blue*, para aumentar el contraste entre las bandas proteicas teñidas en azul y el fondo del gel, se procedió a la descoloración del gel sumergiéndolo varias veces en solución descolorante (metanol 45%, ácido acético 10%) hasta conseguir el resultado deseado. En el caso de la tinción con *Ponceau S*, la descoloración se llevó a cabo con agua.

4.2.3 Transferencia proteica a membranas e inmunodetección o “*Western blotting*”

La técnica de *Western blotting* se fundamenta en la separación de proteínas en un gel SDS-PAGE (apartado 4.2.2.) y en la posterior electrotransferencia a un soporte sólido de nitrocelulosa, apto para la inmunodetección. La inmunodetección se basa en la capacidad de un anticuerpo (al que se denomina anticuerpo primario) para reconocer

específicamente una determinada proteína, y en la capacidad de un anticuerpo comercial (denominado anticuerpo secundario) para reconocer específicamente el primero. Este anticuerpo secundario lleva unido un enzima que permitirá posteriormente su detección y el revelado de las bandas de proteína.

Se realizaron varios geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes tal y como se describe en el apartado 4.2.2. Se cargaron muestras para ensayar diferentes soluciones de antígenos: homogeneizados de diferentes tejidos de rata y humano, ADH humanas y de ratón recombinantes, a diferentes concentraciones. Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron pre-equilibrados durante 15 min en tampón de transferencia (glicina 40 mM, Tris-HCl 50 mM, 0,04% (p/v) SDS en una solución al 20%(v/v) metanol), previa eliminación del gel superior. Las proteínas resueltas en el gel por electroforesis fueron transferidas a una membrana de PVDF (Bio-Rad) o Immobilon-P (Millipore), previamente hidratada con metanol y, posteriormente, también equilibrada en tampón de transferencia. Para la electrotransferencia se utilizó el sistema Mini-Trans-Blot (Bio-Rad) a 4°C, con agitador magnético durante, 1 h a 100 V con un amperaje que oscilaba entre los 200 y 400 mA.

La presencia de proteínas sobre la membrana se comprobó por tinción reversible con *Ponceau S*, y se destiñó con agua. Posteriormente, la membrana se destiñó completamente con tampón de transferencia. En este punto, las membranas secas podían ser almacenadas a 4°C durante largos periodos de tiempo hasta su uso.

Para la inmunodetección, la membrana de interés se rehidrató en metanol (si se había guardado a 4°C) y después con TBS [TBS 10x: NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,1 M (pH 7.5)] y se incubó con una solución bloqueadora con 5% (p/v) de leche en polvo, Tween-20 0,1% (v/v) en TBS, durante al menos 30 min, y 30 min más con la misma solución que contenía el primer anticuerpo (leche en polvo 5% (p/v), Tween-20 0,1% (v/v) y la dilución correspondiente de anticuerpo anti-ADH4 en TBS). Se siguió con la incubación con el segundo anticuerpo, anti-IgG de conejo (Bio-Rad) que lleva unida la fosfatasa alcalina (leche en polvo 5% (p/v), Tween-20 (v/v) 0,1% y α -IgG (H+L)-Ap 1:3000 en TBS). Esta incubación se prolongó durante al menos 30 min. Después de cada paso de incubación con el anticuerpo, se realizaron unos 5 lavados con TTBS (Tween-20 0,1% (v/v) en TBS) de 10 min cada uno. Finalmente, las membranas se incubaron con la solución de detección, que contiene el sustrato de la fosfatasa alcalina (BCIP/NBT, el cual se preparó diluyendo 100 veces el reactivo A y el reactivo B en Tris-HCl 0,1 M, pH 9,5 y MgCl₂ 0,5 mM. Las bandas de proteína desarrollaron el color azul al cabo de 5-15 min. La reacción de revelado se paró con agua destilada. Si la tinción de fondo de la membrana era muy intensa debido a largas incubaciones, ésta podía aclararse lavando la membrana con metanol diluido.

4.2.4 Inmunocitoquímica o inmunohistoquímica

La inmunocitoquímica o inmunohistoquímica permite la detección de proteínas específicas en secciones de tejido, proporcionando información acerca de la ubicación de éstas a nivel tisular (IHC) y/o celular (ICC). En esta tesis, se ha llevado a cabo esta técnica con dos finalidades distintas: por una parte, la identificación de determinados tipos de células en tejidos como el SNC donde existe una enorme heterogeneidad celular y, por otra parte, la detección de una determinada clase de ADH en capas y/o tipos celulares de secciones de diferentes tejidos.

Se llevó a cabo la inmunocitoquímica (ICC) en secciones de tejido nervioso, con anticuerpos comerciales contra antígenos característicos de determinados tipos celulares. Este es el caso de anticuerpos anti-GFAP que nos permitieron identificar astroglia, en las secciones de cerebro utilizadas para la hibridación *in situ*. La GFAP (proteína ácida fibrilar de glía) es una proteína marcadora de macroglía, de astrocitos en particular (Bignami y col., 1972; Raff y col., 1979). Se partió de bloques de parafina donde estaban incluidos los tejidos de interés, a partir de los cuales se obtuvieron secciones de tejido que fueron incubadas con diferentes tipos de anticuerpo. Los procedimientos de preparación de bloques de parafina y obtención de secciones de tejido fueron idénticos a los que se llevaron a cabo para la técnica de hibridación *in situ* (apartados 4.3.5.2, 4.3.5.3 y 4.3.5.4). La preparación de las secciones para la incubación con el anticuerpo fue similar a la de la hibridación *in situ* con algunas modificaciones (apartado 4.3.5.5). El objetivo principal fue el de desparafinar los cortes de tejido y prepararlos para la etapa de incubación con el anticuerpo primario. Por lo tanto, las secciones se sumergieron dos veces en xileno durante 10 min, seguido de una hidratación progresiva de las secciones. Finalmente, se lavaron en TBS durante 10 min [TBS 10x: NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,1 M (pH 7.5)], seguido de una etapa en la que los cortes de tejido se incubaron con una solución de bloqueo (FCS 10%(v/v), BSA 0,1% (p/v) en TBS). A continuación, se eliminó el exceso de solución de bloqueo y se procedió a la incubación con el anticuerpo primario anti-GFAP (Dakopatts) a una dilución 1:400 en solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C, en una cámara húmeda en la que la solución humectante fue solución de bloqueo (Castellano y col., 1991). A la mañana siguiente, se dejaron las secciones durante 1 h a temperatura ambiente y, después, se procedió a tres lavados en una solución de Triton X-100 0,2% (v/v) en TBS de 5 min cada uno. Le siguió la incubación con el anticuerpo secundario de conejo biotinilado (Amersham), diluido 1:200 en una solución de bloqueo, a temperatura ambiente durante 1h y en cámara húmeda. Le siguió una nueva ronda de tres lavados con TBS de 10 min cada uno. Seguidamente, una incubación con el complejo avidina-peroxidasa (Sigma) en tampón de bloqueo a una dilución 1:400. Tres lavados más en TBS y finalmente, se llevó a cabo el revelado incubando las secciones en una solución de diaminobenzidina 0,05% (p/v) (Sigma) y

H₂O₂ 0,033% (v/v) en TBS. Una vez desarrollado el color, las secciones de lavaron con TBS y agua, se deshidrataron y se montaron los portaobjetos (apartado 4.3.5.9).

Por otra parte, se llevó a cabo la inmunohistoquímica (IHC) con anticuerpos específicos contra la ADH4 de rata o humana. Los anticuerpos utilizados para la detección de la ADH4 de rata fueron cedidos por el Dr. Gregg Duester del Burnham Institute (La Jolla, California). Su especificidad ha sido testada en varios trabajos (Haselbeck y col., 1997a). El procedimiento seguido fue similar al descrito anteriormente, puesto que también se basó en la utilización de anticuerpos secundarios biotinilados y la posterior detección con peroxidasa. En este caso, se utilizó el Kit Universal Elite Vectastain ABC (Vector Laboratories) siguiendo básicamente el procedimiento descrito por la casa comercial, que presenta algunas diferencias respecto al descrito anteriormente.

Los experimentos control incluyeron la omisión del anticuerpo primario, el uso de suero pre-inmune y de anticuerpo primario pre-incubado durante 1 h con 15-20 µg de proteína inmunogénica.

El análisis en el microscopio y adquisición de imágenes se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 4.3.5.10.

4.3 Métodos de detección de RNA

4.3.1 Manipulación en condiciones libres de ribonucleasas

Las ribonucleasas (RNAsas) son enzimas activos y resistentes incluso en condiciones extremas. Por esta razón, durante el proceso de purificación y manipulación del RNA, es importante trabajar con material, soluciones y reactivos libres de RNAsas. El material de vidrio, de porcelana o aluminio se ha de esterilizar por autoclave y tratar un mínimo de 4 h a 150-200°C. Las soluciones se prepararon a partir de reactivos para biología molecular libres de RNAsas.

Normalmente, no se utilizaron inhibidores de RNAsas porque teniendo precauciones en la preparación y en la manipulación posterior del material (siempre con guantes) no es necesario el DEPC, sumamente tóxico, que puede inhibir ciertas reacciones. De todas formas, en algunas etapas de la técnica de hibridación *in situ*, se utilizó agua tratada con DEPC con el fin de minimizar el riesgo de contaminación. Para ello, se añadió 1 ml de DEPC, disuelto en 9 ml de etanol absoluto, por cada litro de H₂O bidestilada (Milli-Q). Después de agitar vigorosamente, se dejó actuar toda la noche y finalmente se esterilizó por autoclave, para eliminar el DEPC por descomposición en etanol y dióxido de carbono.

4.3.2 Extracción del RNA

4.3.2.1 Extracción de RNA total con isotiocianato de guanidinio

Este método de extracción de RNA se basa en el descrito por Chomozynski y Sacchi (1987), con algunas modificaciones que se detallan a continuación. La homogeneización del material de partida varía en función de la naturaleza del espécimen. En el trabajo realizado en esta Tesis, se ha partido de tejidos de rata adulta y de cultivos celulares.

A. A partir de tejidos. Para la obtención de RNA de buena calidad todas las operaciones de extracción y limpieza de los tejidos extraídos fueron rápidas e inmediatamente después del sacrificio de los animales. Seguidamente, se sumergieron en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su uso. Para la homogeneización, cada tejido aún congelado, se trituró en un mortero, preenfriado en nieve carbónica, en presencia de nitrógeno líquido. La "harina" formada se transfirió, todavía congelada, a un tubo Corex de 15 o 30 ml en función de la cantidad de tejido. Rápidamente se añadió 1 ml de solución D por cada 100 mg de tejido y se llevó a cabo la homogeneización con el homogeneizador hasta conseguir una suspensión viscosa y homogénea.

B. A partir de cultivos celulares. Los frascos se dispusieron sobre una bandeja en un baño de hielo, y se eliminó el medio por aspiración. La monocapa celular se lavó 2 veces con PBS frío libre de RNasas (NaH₂PO₄ 19 mM, Na₂HPO₄ 81 mM, 2 g de KCl, NaCl 150 mM, pH 7,4), el cual se retiró totalmente por aspiración. Tras este paso, los frascos pueden almacenarse a -70°C hasta el momento de la extracción. La lisis de las células se realizó directamente en la placa o frasco de cultivo. Para ello, se añadió 1 ml de solución D por cada 10⁷ células, permitiendo que la monocapa se descongelase en la solución. Los frascos se inclinaron suavemente para que la solución cubriese completamente la base y entrase en contacto con todas las células de la placa. A continuación, se rascó la superficie del frasco con un raspador y la solución viscosa resultante se hizo pasar varias veces a través de una pipeta estéril, para finalmente transferirla a un tubo Corex de 15 ml.

La mezcla obtenida, en uno u otro caso, se agitó vigorosamente con un vórtex durante unos minutos. Seguidamente se añadieron por este orden: 0,2 vol de acetato de sodio 2 M, pH 4, 0,1 vol de fenol saturado con agua (fenol-H₂O) y 0,2 vol de cloroformo/alcohol isoamílico (49:1, v/v), agitando constantemente para asegurar una mezcla homogénea de los componentes. La suspensión resultante se incubó 15 min en hielo y el sobrenadante se recogió centrifugando a 10000xg (10000 r.p.m., rotor JS-13.1) 20 min a 4°C. La fase acuosa superior, que contenía el RNA, se transfirió a

un nuevo tubo Corex, procurando no arrastrar el material de la interfase. El volumen de la fase acuosa debía ser aproximadamente igual al volumen de la solución D utilizada para la extracción.

El RNA presente en la fase acuosa se precipitó añadiendo 1 vol de isopropanol e incubando al menos 30 min a -20°C . El sedimento de RNA se obtuvo centrifugando 10 min a $10000\times g$ a 4°C . A continuación, éste se resuspendió en $300\ \mu\text{l}$ de etanol 70% (v/v) y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml, donde se centrifugó de nuevo 10 min a $10000\times g$. El sedimento de RNA se disolvió en $300\ \mu\text{l}$ de agua libre de RNasas y se realizó una nueva extracción con cloroformo. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf y el RNA se precipitó con 0,12 vol de acetato sódico 2,5 M, pH 5,2 y 2,5 vol. de etanol absoluto, durante al menos 30 min a -20°C . El sedimento se volvió a lavar con etanol 70% (v/v), se centrifugó de nuevo 10 min a $10000\times g$ y se secó. Es importante no dejar secar totalmente el RNA puesto que entonces decrece considerablemente su solubilidad. Se disolvió el RNA en $50\ \mu\text{l}$ de H_2O , pasando la solución varias veces a través de la punta de pipeta. En los casos en que la solubilización era costosa, se incubó 10 min a 60°C . El RNA disuelto se almacenó a -70°C hasta su uso.

Solución D (Solución desnaturalizante): isotiocianato de guanidinio 4 M, citrato sódico 25 mM, sarcosyl 0,5%, β -mercaptoetanol 0,1 M. Se prepara la solución de isotiocianato de guanidinio, citrato sódico y sarcosyl, que puede conservarse a temperatura ambiente durante meses. Antes de usar se añaden $560\ \mu\text{l}$ de β -mercaptoetanol por cada 50 ml de solución.

Fenol saturado con agua (Fenol- H_2O): el procedimiento seguido es idéntico al del fenol saturado con tampón (ver apartado 3.1) pero en este caso se utiliza agua libre de RNasas (tratada con DEPC) y las alícuotas se almacenan a -20°C .

4.3.2.2 Purificación del RNA poliA⁺

La purificación del RNA poliA⁺ se llevó a cabo con el "kit" PolyAtract System 1000 (Promega). Se siguió el protocolo descrito en el manual de instrucciones proporcionado por la casa comercial (Promega, 1992). Este método se basa en la utilización de oligonucleótidos dT marcados con biotina que hibridan con la cola poliA⁺ de la población de mRNA del tejido. Después de la hibridación, los híbridos oligo(dT):mRNA son reconocidos por estreptavidina unida a partículas paramagnéticas que son capturadas posteriormente mediante un pie imantado proporcionado por la casa comercial. Finalmente, después de varios lavados, se consigue eluir RNA enriquecido en poliA⁺. En algunas ocasiones, para la síntesis de cDNA, también se utilizó el "kit" (Pharmacia). Se siguió el protocolo descrito en el manual de instrucciones del "kit" (Amersham Pharmacia Biotech).

4.3.2.3 Determinación de la concentración de RNA

La medida de la absorbancia a 230, 260 y 280 nm permitió determinar la concentración de ácido nucleico presente en una solución y el grado de pureza de la misma. El espectro de absorción del RNA tiene un máximo cercano a 258 nm y un mínimo a 230 nm, pero por razones prácticas las medidas espectrofotométricas se realizan a 260 nm. La absorbancia del RNA a esta longitud de onda es igual a 1 para una solución de 40 $\mu\text{g/ml}$ (Berger, 1987). Por otra parte, la relación de absorbancia A_{260}/A_{280} proporciona una estimación de la pureza de la muestra de ácido nucleico. Valores comprendidos entre 1,9 y 2,0 para soluciones de RNA son indicativos de una pureza aceptable. La presencia de proteína, que absorbe a 280 nm por los aminoácidos aromáticos, disminuye la relación, así como la presencia de fenol (Berger, 1987). También se ha de considerar la relación de absorbancia A_{260}/A_{230} , que para soluciones puras debe ser superior a 2,0. Valores inferiores indican presencia de proteína, puesto que a 230 nm se mide la absorbancia debida la enlace peptídico de las proteínas. En los casos de contaminación de las muestras con DNA genómico, se procedió a una digestión con U/ml de DNAasa libre de RNasa (Roche) durante 15 min a 37°C, en presencia de un tampón con MgCl_2 10 mM, seguido de fenolización.

4.3.3 Análisis por transferencia *Northern*

4.3.3.1 Electroforesis en gel de agarosa-formaldehído y transferencia a membrana

El RNA aislado se separó, en función de su tamaño, mediante una electroforesis en gel de agarosa. Esta electroforesis se lleva a cabo en condiciones que aseguren la desnaturalización del RNA, para minimizar la formación de estructuras secundarias y conseguir así que su migración electroforética sea inversamente proporcional (\log_{10}) a su masa molecular. Para ello, se recurre a agentes desnaturalizantes como glioxal, hidróxido de metilmercurio, urea o formaldehído, que son añadidos tanto al gel como a las muestras (Current Protocols in Molecular Biology).

Se preparó un gel horizontal de agarosa que contenía formaldehído. La composición del gel fue: 1,5 % (p/v) de agarosa en tampón MOPS 1x [MOPS 10x: MOPS 0,2 M (pH 7,0), acetato de sodio 50 mM, EDTA 10 mM (pH 8,0)] y formaldehído 2,2 M. Para la preparación de las muestras de RNA se ajustó el volumen final a 10 μl con H_2O y entonces se añadieron: 5 μl de tampón MOPS 10x, 9 μl de formaldehído 37% (p/v) o 12,33 M, 25 μl de formamida, 2 μl de tampón de carga y 0,5 μl de bromuro de etidio 2 mg/ml. Se preparó también una muestra a la que se añadieron 2 μg de un marcador de RNA (Promega o Roche), que sirvió como patrón de peso molecular. Todas las muestras se incubaron 10 min a 65°C para desnaturalizar el RNA y se dejaron en un baño de hielo hasta el momento de aplicar en los pocillos del gel. Mientras tanto al gel se aplicaron 60 V durante 10-15 min. Seguidamente, se cargaron las muestras en los

pocillos del gel y se separaron a 60 V durante unas 4-5 horas en MOPS 1x como tampón de electroforesis.

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se examinó en un transiluminador UV (MacroVue, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, California) para visualizar el RNA. El RNA de mamífero presenta varias especies de RNA ribosómico que migran aproximadamente a 4,7 kb (28S rRNA), 1,9 kb (18S rRNA) y 0,10-0,15 Kb (4S a 5S rRNA) (Noller y col., 1995). Estos últimos comigran con el RNA de transferencia, con un tamaño aproximado de 75-90 nucleótidos (tRNA) (Rich y col., 1976). Antes de la transferencia, el gel de electroforesis se fotografió y seguidamente, se sumergió en una cubeta con H₂O-DEPC y se agitó suavemente. Se efectuaron frecuentes cambios, con el fin de disminuir la concentración de formaldehído del gel, el cual podría reducir la eficiencia de la transferencia. Finalmente, el H₂O se reemplazó por SSC 20x [NaCl 3 M, citrato de sodio (Na₃H₅O₇·2H₂O) 0,3 M (pH 7,0)] y se dejó al menos 30 min en agitación suave. Mientras tanto, se cortó un pedazo de membrana de Nylon NY13N Nytran de 0,45 µm (Schleicher & Schuell GMBH, Dassel, Alemania) de forma que sobresaliera unos 2 mm de los extremos del gel. Ésta se sumergió en H₂O primero y, seguidamente, en el tampón de transferencia SSC 20x. Para la transferencia, se utilizó el sistema rápido TURBOBLOTTER™, comercializado por Schleicher & Schuell, siguiendo las instrucciones del manual proporcionado. La transferencia puede realizarse en 3 h, aunque, normalmente se dejaba toda la noche. Una vez finalizada la transferencia, se marcó la posición de los pocillos en la membrana y se lavó la membrana con tampón 2xSSC durante 5 min para eliminar el exceso de sal. Rutinariamente se comprobó en el transiluminador si la transferencia a la membrana había sido correcta; esto es, el RNA debía verse perfectamente en la membrana. Seguidamente, el RNA se fijó de forma covalente al filtro por unión de la molécula a la matriz de la membrana en presencia de luz UV. Para ello se utilizó el UV Stratalinker® 1800 (Stratagene®). La membrana puede almacenarse durante varios meses a 4°C hasta su utilización.

Sistema de transferencia rápido TURBOBLOTTER™ (Schuell & Schailer): Bandeja o molde de plástico donde se monta la transferencia ("stack tray"), membranas NY13N Nytran. 0,45 µm (Nucleic acid and protein transfer media), papeles absorbentes para la transferencia GB004 (grueso) y GB002 (fino).

4.3.3.2 Marcaje radioactivo de una sonda de DNA

En esta tesis, se ha marcado radiactivamente DNA, por el método de cebadores de secuencia al azar o "*random primer*" desarrollado por Feinberg y Vogelstein (1983). Este método se basa en la capacidad de la DNA polimerasa de sintetizar una nueva cadena de DNA complementaria a una cadena molde, que inicia la síntesis a partir de un extremo 3' hidroxilo suministrado por un oligonucleótido corto que se ha unido a ese DNA molde. La DNA polimerasa utilizada ha de carecer de actividad exonucleasa

3'→5', con el fin de preservar la integridad del cebador. Para ello se suele utilizar el fragmento grande de la DNA polimerasa I de *E. coli* o la polimerasa *Klenow*. Como cebadores, se utilizan hexanucleótidos de secuencia al azar, obtenidos por la digestión del DNA de timo de ternera con DNasa I o por síntesis de oligonucleótidos. Estadísticamente, cualquier fragmento de DNA para marcar, posee en su secuencia varias series de 6 nucleótidos complementarios a los cebadores con secuencias al azar. De este modo, se garantiza la formación de varios puntos de síntesis y la presencia de varios puntos de marcaje. Este método permite obtener DNA marcado con elevada actividad específica, de más de 10^9 cpm por μg de DNA con un único nucleótido marcado en la mezcla de reacción. Se consiguen sondas de baja concentración pero elevada actividad específica y el tamaño de los fragmentos de DNA generados oscila entre 100 y 200 nucleótidos.

El procedimiento llevado a cabo está descrito en el manual suministrado con el *kit* de marcaje "*Prime-a-Gene Labeling System*" (Promega). Como nucleótido marcado, se utilizó habitualmente $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (50 μCi , 3000 Ci/mmol) de Amersham Pharmacia Biotech. La reacción de marcaje está optimizada para 25 ng de DNA molde purificado. La eficiencia de la incorporación es inferior al 100%, por lo que al final de la reacción se dispone de una mezcla de DNA marcado y de nucleótidos no incorporados. Estos nucleótidos no incorporados se eliminaron de la mezcla, con una columna cromatográfica de exclusión molecular Sephacryl S-400 (Amersham Pharmacia Biotech Inc, New Jersey, EEUU), para evitar principalmente un fondo inespecífico durante la hibridación de la sonda.

El porcentaje de incorporación de radiactividad al DNA se determinó utilizando filtros circulares de 2,3 cm de diámetro de celulosa DEAE DE 81 (Whatman®; Whatman International Ltd.). Para ello, se dispuso una alícuota de 1 μl de sonda purificada en el filtro (o 0,5 μl de la sonda marcada sin purificar) y se dejó secar totalmente. La membrana se introdujo en un vial de centelleo de 20 ml con líquido de centelleo biodegradable (BETAMAX™, ICN) y se realizó el recuento en un contador de centelleo 1211 Minibeta (LKB Wallac).

Prime-a-Gene® labeling system (Promega): *Kit* de marcaje que contiene labeling 5x buffer (Tris-HCl 250 mM, pH 8; MgCl₂ 25 mM; DTT 10 mM, HEPES 1 mM, pH 6,6, 26 UDO A₂₆₀/ml hexadeoxiribonucleótidos, solución de dNTPs 1,5 mM , BSA acetilada libre de nucleasa 10 mg/ml, fragmento *Klenow* de la DNA polimerasas I 5u/ μl .

4.3.3.3 Prehibridación e hibridación

La posición de las moléculas del mRNA de interés se determinó mediante la hibridación de la membrana con la sonda específica de DNA marcado. Se incubó la membrana con la sonda en condiciones que favorecieron la hibridación específica, puesto que la formación de los híbridos DNA-RNA es un proceso reversible en el que

intervienen varios factores. La estabilidad de esos híbridos específicos viene determinada por la temperatura de fusión (T_m), la cual está influida por la fuerza iónica (M , como concentración de Na^+ en mol/l), la composición de bases ($\%[\text{G+C}]$), la longitud de la cadena más corta en el dúplex (n) y la concentración de formamida:

$$T_m = 81,5 \text{ }^\circ\text{C} + 16,6 \log M + 0,41 (\%[\text{G+C}]) - 500/n - 0,7 (\% \text{ formamida})$$

En nuestro caso, se llevó a cabo una etapa de prehibridación a 68°C durante 1 h, como mínimo, para bloquear la unión inespecífica del RNA sobre la superficie de la membrana. Para ello, se utilizó la solución de prehibridación: fosfato de sodio 0,2 M, pH 7,2; EDTA 1 mM, BSA 1% (p/v), SDS 1% (p/v). A continuación, una etapa de hibridación a 68°C durante 16-20 h. Para ello, se reemplazó la solución de prehibridación con solución recién preparada conteniendo al menos 10^6 cpm/ml de sonda marcada radiactivamente y previamente desnaturalizada 5 min a 95°C .

4.3.3.4 Lavados post-hibridación

El exceso de sonda se eliminó mediante lavados sucesivos a 68°C durante 1 h aproximadamente (2 cambios cada 30 min), con una solución de fosfato de sodio 40 mM, pH 7,2, EDTA 1 mM, SDS 1% (p/v) previamente atemperada.

4.3.3.5 Cuantificación de la señal radioactiva

La posición de los híbridos mRNA-sonda marcada se determinó por exposición del filtro a película para autorradiografía, en contacto con una o dos pantallas intensificadoras durante un tiempo variable en función de la intensidad de la señal. La exposición se realizó a -80°C (tal y como se indica en el apartado 3.5.2.1.A).

Las bandas obtenidas indicaron la posición del RNA homólogo a la sonda y su movilidad se comparó con la del marcador de RNA. Además, este método permitió estimar la cantidad de RNA específico sintetizado en las células de que deriva, de forma que la intensidad de la banda en la película es proporcional a la cantidad de RNA homólogo. La intensidad de las bandas se determinó con el sistema Molecular Image GS-525 (Bio-Rad).

4.3.4 RT-PCR y detección no isotópica

Se basa en la transferencia de diferentes *pools* de cDNA de diferentes tejidos a una membrana, que es hibridada posteriormente con sondas específicas marcadas por métodos no radioisotópicos.

4.3.4.1 Síntesis de cDNA

Se sintetizó la primera cadena de cDNA a partir de RNA poliA⁺ de hígado, estómago, vasos sanguíneos y células H4IIEC3, tal como se describe en el apartado 3.5.2.1.A, con el uso del adaptador *NotI* (Promega). Una alícuota de la mezcla de reacción se utilizó como DNA molde en la amplificación por PCR de una secuencia específica de la ADH4 de rata. Para ello, se usaron como cebadores oligonucleótidos degenerados basados en la secuencia de aminoácidos de ADH4 de estómago de rata (Parés y col., 1994): el cebador RataADH4-1, 5'-CARCAYTTYATGAAYAC-3', que corresponde a los aminoácidos 138→142, y el cebador RataADH4-6, 5'-CCRTARTTCATRTGRCA-3', complementario a la secuencia que codifica los aminoácidos 282←286 (Tabla 8). Las condiciones óptimas de la mezcla de reacción para la amplificación por PCR fueron: tampón de PCR libre de MgCl₂ 10x (Roche), que se suplementó con MgCl₂ a una concentración final de entre 0,5 y 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 5 μM de los cebadores RataADH4-1 y RataADH4-6 y 0,5 U de una mezcla enzimática Expand™ High Fidelity (3,5 U/μl, Roche). La mezcla de reacción se cubrió con un volumen de aceite mineral (Sigma). Cada ciclo incluyó una etapa de desnaturalización a 95°C, 1 min, 46°C, 1 min y 72°C, 2 min. Se efectuaron 35 ciclos, con "hot start" a 95°C durante 7 min, y seguidos de una etapa final de extensión a 72°C durante 4 min.

4.3.4.2 Marcaje de sondas con digoxigenina mediante PCR

La digoxigenina-11-UTP fue la molécula que se utilizó para marcar sondas de DNA, mediante PCR. Se realizaron idénticas condiciones que para la amplificación de DNA sin marcar, a excepción de que en la mezcla de reacción estaba presente la DIG-11-UTP (Roche).

La comprobación del marcaje de la sonda se determinó fácilmente en un gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. La incorporación de digoxigenina en el DNA sintetizado de *novo* disminuye su movilidad electroforética con respecto al DNA no marcado (Fig. 7)

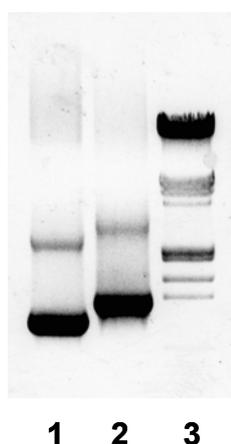


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) de los productos de PCR para comprobar la incorporación de la digoxigenina. (1) producto de PCR sin marcar, (2) producto de PCR que ha incorporado la digoxigenina (DIG-dUTP) en la reacción de amplificación y (3) patrones de peso molecular de DNA de tipo VII (Roche). El producto es un fragmento de unas 1200 pb que corresponde a la zona codificante de la secuencia de la ADH4 de rata.

4.3.4.3 Transferencia del DNA a filtros de Nylon

Los productos de la reacción de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1% (p/v) y tinción con bromuro de etidio. Una vez finalizada la electroforesis, se procedió a la transferencia a una membrana de Nylon cargada positivamente (Scheiler & Schuell), durante 10-16 h en tampón SSC 20x [NaCl 3 M, citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,3 M, pH 7,0]. Una vez finalizada, la membrana se lavó con SSC 2x y se dejó secar a temperatura ambiente para seguidamente fijar el DNA a 80°C durante 30 min o mediante el UV Stratalinker[®] 1800 (Stratagene[®]).

4.3.4.4 Hibridación con la sonda

Las sondas marcadas con digoxigenina permiten llevar a cabo condiciones de hibridación estándar, ya que la presencia del marcador no altera la cinética de hibridación de las sondas (Holtke y col., 1992). Las condiciones de hibridación fueron idénticas a las de la transferencia *Northern* (apartado 4.3.3.3) con algunas modificaciones: en la solución de hibridación se utilizó leche en polvo al 1% (p/v) o agente bloqueante (Roche) a una concentración de 0,5% (p/v), para bloquear la unión inespecífica; la sonda se diluyó en la solución de hibridación a una concentración final de 10 ng/ml, la concentración de SDS fue de 1% (p/v) en la solución de hibridación.

4.3.4.5 Detección quimioluminiscente y/o cromogénica

La detección de las sondas de DNA con digoxigenina se basa, al igual que en la hibridación *in situ*, en la utilización de anticuerpos antidigoxigenina que llevan acoplados fosfatasa alcalina. La dilución del anticuerpo anti-digoxigenina (75 mU/ml) fue de 1:10000 y la detección quimioluminiscente. En este caso la fosfatasa alcalina, unida de forma covalente al anticuerpo, actuó hidrolizando el grupo fosfato del dioxetano fenil fosfato del sustrato quimioluminiscente. El producto generado en la reacción es energéticamente inestable, de forma que rápidamente se descompone en dos moléculas, una de las cuales es un anión excitado (metil-6-hidroxinaftoato) que, al volver a su estado fundamental, emite luz a una longitud de onda de 480 nm. Los sustratos utilizados fueron el Lumigen PPD[®], AMPPD[®] y CSPD[®] (Roche). Para el proceso de revelado, la membrana, una vez equilibrada en el tampón de detección, se dispuso sobre un fragmento de plástico semirrígido en el interior de una bolsa de plástico y se cubrió con el reactivo quimioluminiscente, diluido (1:10000) en la solución de detección, evitando el exceso de líquido. La bolsa de plástico se incubó a 37°C durante unos 15 min y seguidamente se puso en contacto la membrana con una película para autorradiografía. El tiempo de exposición varió desde pocos segundos hasta varias horas, ya que la reacción quimioluminiscente se inicia inmediatamente, pero la emisión máxima no se consigue hasta las 8 h a temperatura ambiente, manteniéndose constante durante 8 h más. En algunas ocasiones, una vez realizada

la detección quimioluminiscente, la membrana se lavó con TBS durante unas 2 h a 4°C y se procedió a la detección cromogénica. Para ello, la membrana se equilibró en solución de detección unos minutos y seguidamente se incubó con los sustratos NBT/BCIP (ver apartado 4.3.5.1.C).

4.3.5 Hibridación *in situ*

La técnica de hibridación *in situ* con sondas no radiactivas permitió determinar la localización celular y los niveles relativos de expresión de transcritos específicos a nivel tisular y celular. El RNA de los especímenes previamente tratados es hibridado con una sonda marcada con digoxigenina o biotina. Estas sondas no isotópicas, son detectadas posteriormente por fluorescencia o por métodos enzimáticos utilizando fosfatasa alcalina o peroxidasa. Las sondas pueden ser de DNA, RNA u oligonucleótidos. El método de marcaje varía en función de la sonda elegida para llevar a cabo la hibridación (Fig. 8).

En este trabajo, se ha puesto a punto la técnica de hibridación *in situ* en bloques de parafina en los que están incluidos los tejidos y con sondas de RNA marcadas con digoxigenina por transcripción *in vitro*. Los híbridos RNA sonda-RNA transcrito han sido posteriormente detectados con anticuerpos anti-digoxigenina que llevan unidos de forma covalente fosfatasa alcalina. Esta técnica presenta claras ventajas al no utilizar isótopos radioactivos con todas las consecuencias que ello comporta. Además, las sondas marcadas con digoxigenina son estables durante meses y pueden utilizarse en varios experimentos de ISH.

4.3.5.1 Preparación de las ribosondas marcadas con digoxigenina

A. Linealización del plásmido con el inserto

El cDNA de interés debe estar clonado en un vector de transcripción que contenga los promotores de T3, T7 o SP6. Para linealizar el vector, se utilizan enzimas de restricción que dejen accesibles los promotores correspondientes a las respectivas RNA polimerasas. De esta forma, se consiguen las sondas de RNA “sentido” y “antisentido” para un mismo cDNA. La sonda sentido tiene idéntica secuencia a la del mRNA del tejido, por lo que no hibridará con éste y nos servirá como control de hibridación. Por el contrario, la sonda antisentido tiene la secuencia complementaria al mRNA del tejido y, por lo tanto, hibridará con éste en condiciones óptimas de hibridación en las secciones de tejido. La elección del enzima de restricción adecuado exige tener en cuenta: la ubicación del lugar de inicio para las RNA polimerasas (SP6, T7 o T3), que el enzima de restricción corte preferentemente en un sólo sitio, y que éste no genere extremos 3' protuberantes (deben ser extremos romos o 5'-protuberantes).

En este trabajo, los insertos de interés se clonaron en el vector de transcripción p-bluescript, que contiene los promotores de T7 y T3. En todos los casos, se utilizaron los enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III (Roche) para la linealización del plásmido (Fig. 9). La obtención de la ribsonda sentido u antisentido dependió de la orientación del inserto de DNA en el vector. Los insertos utilizados fueron un fragmento de cDNA de 650 pb de ADH1 de rata, correspondiente a los aminoácidos 59-271 de la secuencia proteica; un fragmento de cDNA de 1122 pb de ADH4 de rata, que comprendía toda la secuencia codificante (Crosas y col., 2000) y un cDNA de 1200 pb de ADH4 humana, que comprendía toda la secuencia codificante (Crosas y col., 2000).

Una vez realizada la digestión total del vector-inserto, se comprobó la linealización en un gel de agarosa al 1% (p/v) (apartado 3.2.1). El patrón típico del plásmido linealizado es el de una sola banda (si no se digiere del todo se visualizan en el gel unas 2-3 bandas). Si la digestión era completa, el DNA se purificaba del enzima de restricción por una extracción fenol-cloroformo y posterior precipitación con etanol. Finalmente, se resuspendía en H₂O-DEPC a una concentración aproximada de 1 µg/µl.

B. Transcripción *in vitro*

El marcaje de las sondas se llevó a cabo por transcripción *in vitro* siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Roche). En un tubo Eppendorf se añadieron por este orden los siguientes componentes: X µl H₂O hasta un volumen final de 20 µl, 2 µl de tampón de transcripción 10x (Tris-HCl 0,4 M, pH 8, MgCl₂ 60 mM, DTT 100 mM, espermidina 20 mM, Roche), 2 µl de mezcla de nucleótidos 10x (ATP, CTP, GTP 10 mM, DIG-11-UTP 3,5 mM, pH 7,5, Roche), 1 µg de DNA linealizado, 1 µl de inhibidor de RNasas (40 u/µl, Roche) y 1 µl de RNA polimerasa T3 o T7 (20 U/µl, Roche). La reacción se desarrolló durante 2 h a 37°C.

Con el fin de eliminar el DNA molde de la mezcla se procedió a la digestión con DNasa libre de RNasa. Este paso es opcional y depende de la relación DNA/RNA. Para ello, se añadieron a los 20 µl anteriores, 5 µl de MgCl₂ 0,1 M, 2 µl de Rnasin (Roche), 22 µl H₂O y entre 1-5 U DNasa libre de RNasa (10 U/µl, Roche). La mezcla de reacción se incubó 15 min a 37°C. El RNA de la fase acuosa se precipitó con 60 µl de acetato de amonio 6 M y 2,5 vol de etanol absoluto (-20°C) y se resuspendió finalmente en 50 µl H₂O libre de RNasas.

La comprobación de la transcripción y la posterior digestión se hizo mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v) con bromuro de etidio. Se obtenían unos 10 µg de RNA por cada reacción (en la que se partía de, aproximadamente, 1 µg DNA molde).

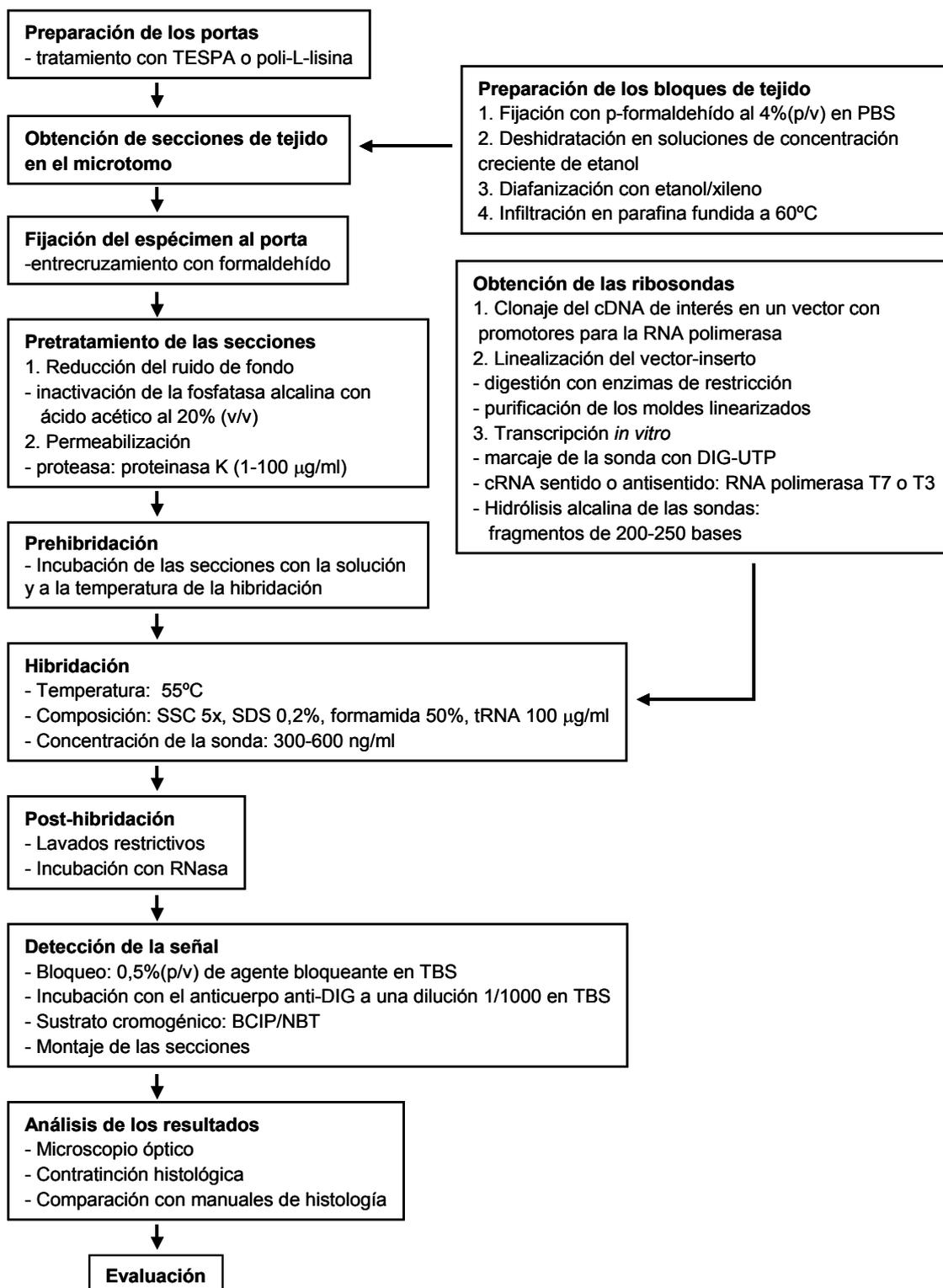


Figura 8. Etapas de la técnica de hibridación *in situ*.

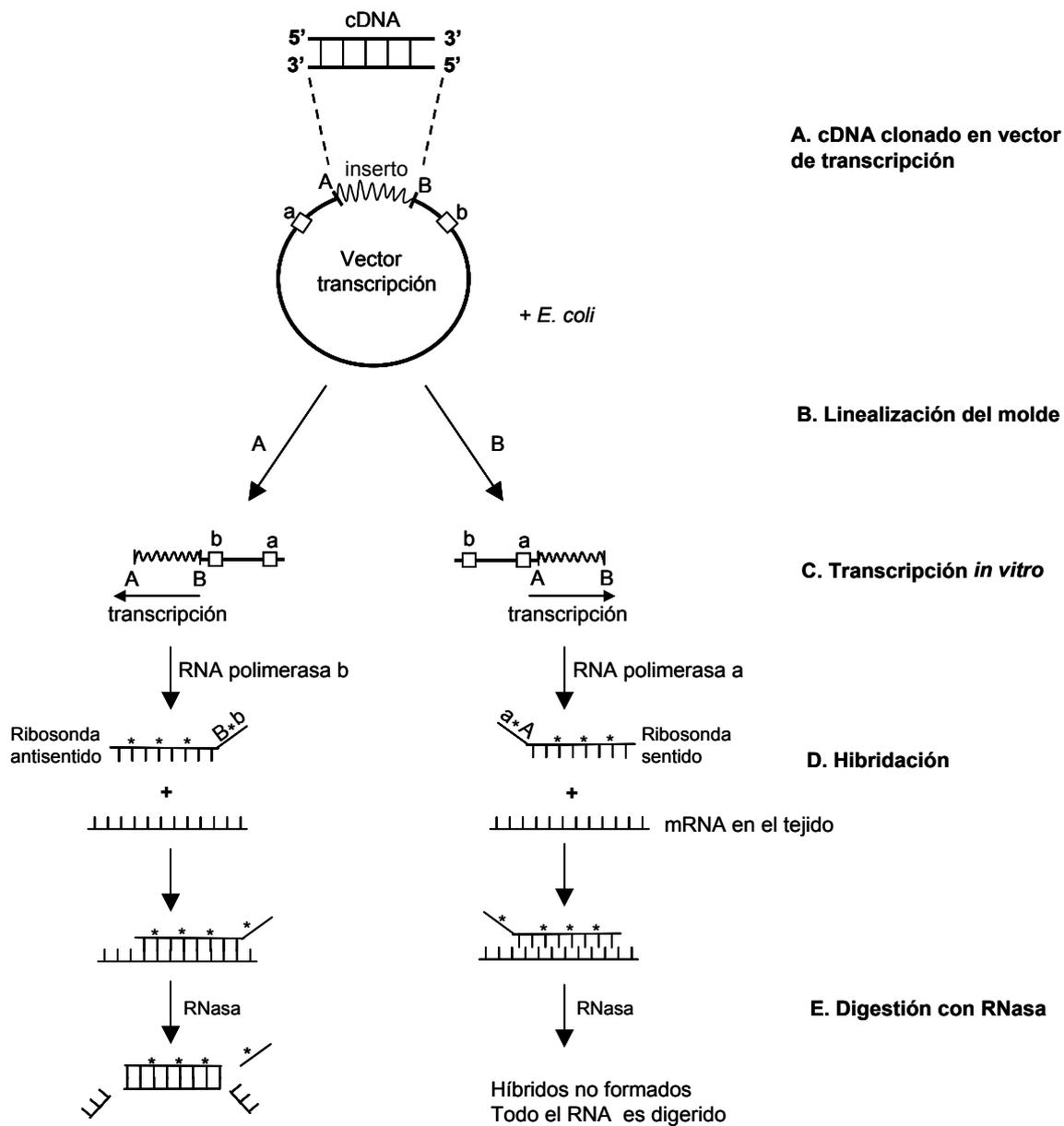


Figura 9. Esquema de la síntesis de ribosondas y la hibridación *in situ* en las secciones de tejido. El inserto de cDNA de ADH se ha clonado en un vector de transcripción con promotores específicos para las RNA polimerasas a y b que realizarán la síntesis a partir del DNA molde linealizado con enzimas de restricción específicos (A y B). La sonda antisentido complementaria al mRNA del tejido, hibridará con éste formando híbridos que permanecerán después de la digestión con RNasa. Por el contrario, la ribosonda sentido de igual secuencia al mRNA del tejido no podrá hibridar con éste y todo el RNA de las secciones será degradado por la RNasa. Insertos: cDNA de la ADH1 de rata, ADH4 de rata y ADH4 humana; enzimas de restricción: A, *Hind*III; B, *Bam*HI; promotores: a, T3; b, T7; *, digoxigenina.

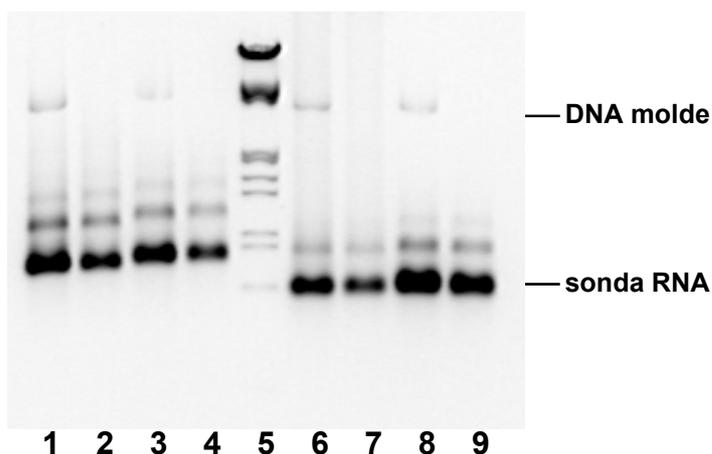


Figura 10. Sondas de RNA marcadas con digoxigenina por transcripción *in vitro* a partir de DNA molde linealizado. 1 y 2, ribosonda de ADH1 antisentido; 3 y 4; ribosonda de ADH1 sentido; 6 y 7; ribosonda de ADH4 antisentido; 8 y 9; ribosonda de ADH4 sentido. 1, 3, 6 y 8; se visualiza el DNA molde utilizado en la transcripción *in vitro* antes de digerirlo. 2, 4, 7 y 9; ribosondas después de la digestión del DNA molde con DNasa I libre de RNasa. 5, marcador de DNA de peso molecular VII (Roche).

Si la longitud de la sonda es superior a 1 kb es conveniente la hidrólisis alcalina de la misma, siendo imprescindible para longitudes superiores a las 1,5 kb. Para ello, se llevó a cabo el siguiente procedimiento: a los 50 μl de RNA purificados se añadieron 30 μl de Na_2CO_3 0,2 M y 20 μl de NaHCO_3 0,2 M, y se incubó la mezcla a 60°C durante t min. El tiempo de incubación (t) depende de la longitud inicial de la sonda de RNA, y se calcula con la fórmula:

$$t = (L_o - L_f) / K \cdot (L_o \cdot L_f)$$

L_o , longitud inicial de la ribosonda (kb)

L_f , longitud final de la ribosonda (kb); oscila entre las 0,2 y 0,75 kb

K, cte.; en este caso, $K = 0,11$ cortes/Kb/min

t, tiempo de hidrólisis (min)

La reacción se paró añadiendo 3,6 μl de acetato de sodio 2,5 M, pH 5,2 y 5 μl de ácido acético glacial. Para visualizar el RNA antes y después de la hidrólisis, se cargaron las alícuotas correspondientes en un gel de agarosa al 1% (p/v). Las muestras antes de la hidrólisis presentaban la banda de RNA de tamaño completo (Fig. 10), mientras que después de la hidrólisis aparecían como una estela de tamaño menor a las 200 bases (Fig. 11A). Finalmente, el RNA hidrolizado se precipitó con 60 μl de acetato de amonio 6 M, y 2,5 vol de etanol absoluto. El sedimento de RNA se

resuspendió en 100 μ l H₂O libre de RNasa. La ribosonda ya estaba lista para añadirse, previamente desnaturalizada, a la mezcla de hibridación.

C. Análisis del marcaje de la sonda

Con el fin de determinar la incorporación de digoxigenina al RNA sintetizado, las muestras visualizadas en el gel se transfirieron a una membrana de Nylon NY13N Nytran de 0,45 μ m (Schleicher & Schuell) siguiendo el mismo procedimiento descrito para la transferencia *Northern* (apartado 4.3.3.1).

Una vez fijado el RNA al filtro, se lavó con TBS al menos 5 min [TBS 10x: NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,1 M (pH 7.5)], y se incubó durante 30 min, en agitación constante a temperatura ambiente, con solución bloqueadora [0,5% (p/v) de agente bloqueador (Roche) en TBS] y durante 30 min con el anticuerpo anti-DIG (Roche) diluido 1:5000 en una solución 0,5% (p/v) de agente bloqueador en TBS. A continuación, se lavó dos veces con TBS durante 30 min y se incubó con la solución de detección [Tris-HCl 0,1 M (pH 9,5), NaCl 0,1 M, MgCl₂ 50 mM] durante unos 10-15 min. Esta última etapa se llevó a cabo a oscuras, con 10 ml de la solución de detección con NBT/BCIP [45 μ l de NBT (100 mg/ml en DMF, 70% (v/v); Roche) y 37,5 μ l de BCIP (4-toulidine salt, 50 mg/ml en DMF; Roche)]. En el momento en que aparecieron las bandas, se detuvo la reacción con un par de lavados en agua corriente (Fig. 11B).

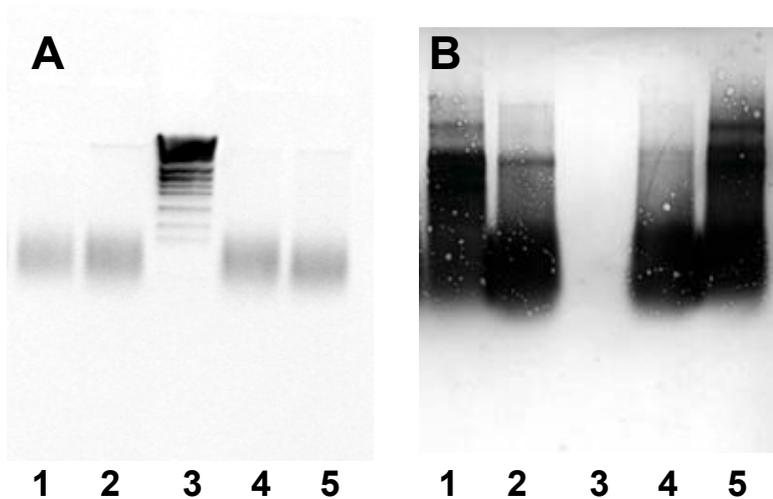


Figura 11. (A) Sondas de RNA hidrolizadas por hidrólisis alcalina. Gel al 1% (p/v) de agarosa donde se han separado las sondas de RNA después de la hidrólisis alcalina y una posterior precipitación con etanol. Estas sondas están listas para la solución de hibridación. Se observa una estela de fragmentos de entre 100-200 nucleótidos. **(B) Transferencia a membrana Nylon de las sondas de RNA hidrolizadas marcadas con digoxigenina.** Posterior detección cromogénica. **1 y 2**, ribosondas sentido y antisentido, respectivamente, de ADH1 de rata; **3**, marcador de DNA de peso molecular; **4 y 5**, ribosondas sentido y antisentido, respectivamente, de ADH4 de rata.

Por otra parte, para estudiar las condiciones de hibridación y la posible hibridación cruzada entre las diferentes sondas se llevaron a cabo “dot blots”, en los que se cargaron diferentes concentraciones de cRNA sentido ADH1 y ADH4, sintetizado por transcripción *in vitro* con nucleótidos sin marcar (Fig. 12). Las membranas fueron hibridadas en idénticas condiciones a las de la hibridación *in situ* (apartado 4.3.5.6) y con la misma concentración de ribosondas sentido o antisentido ADH4 o ADH1 marcadas con digoxigenina. Una vez finalizada la hibridación se hicieron los lavados correspondientes (apartado 4.3.5.7) y se procedió a la detección de los híbridos tal y como se ha descrito en el párrafo anterior.

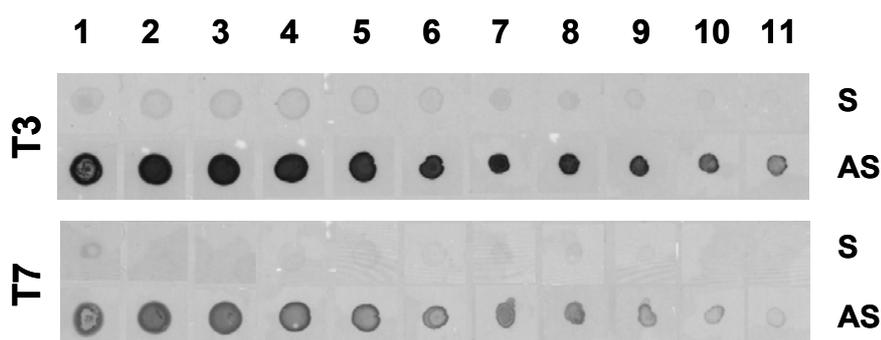


Figura 12. Comprobación de la especificidad de las sondas sentido y antisentido para ADH4. Dot blot en el que se inmovilizaron diferentes concentraciones de cRNA sentido (S) y antisentido (AS) sintetizado por transcripción *in vitro* utilizando NTPs sin marcar. La hibridación se llevó a cabo con las ribosondas sentido y antisentido marcadas e hidrolizadas en idénticas condiciones que las de la hibridación *in situ*. 1-11, concentraciones decrecientes de cRNA. T3 y T7, representan los cRNA sintetizados con la RNA polimerasa de T3 o T7, respectivamente. AS y S, el RNA , fijado en la membrana, es sentido y antisentido respecto a la sonda de RNA, marcada con DIG, con la que se híbrida.

4.3.5.2 Inclusión de los tejidos en parafina

El procedimiento de preparación de los tejidos para el examen microscópico fue el de inclusión en parafina. Para ello, las muestras fueron fijadas en una solución neutra de formaldehído durante un tiempo apropiado, deshidratadas en soluciones de concentración creciente de etanol y, finalmente, impregnadas en parafina fundida y colocadas en moldes para la obtención de bloques sólidos, en los que los tejidos quedaban incluidos y preservados.

A. Fijación de los tejidos

La inclusión de los tejidos en parafina exige previamente la exhaustiva y total fijación de éstos con el fin de mantener la morfología y las características del tejido inicial y destruir todos los microorganismos patógenos presentes. Para ello, los tejidos de interés se extrajeron rápidamente y se lavaron con H₂O y PBS. Los del tracto

gastrointestinal, fueron cuidadosamente vaciados y lavados. Las diferentes partes del cerebro se separaron con extremo cuidado puesto que este tejido es muy blando y delicado y cualquier manipulación brusca destrozaría la estructura del órgano. Cada pieza de tejido se colocó en un vial de vidrio libre de RNAsas (ver apartado 4.3.1.), de forma que quedase sumergido en unos 10-15 ml de solución de fijación (formaldehído 4% (p/v) en PBS, pH 7,0; Scharlau). Si la pieza era muy grande se cortaba en rodajas de pocos milímetros para facilitar la entrada de la solución de fijación y, posteriormente, de la parafina fundida. La solución de fijación se dejó actuar toda la noche (12 h, aproximadamente) a 4°C. De esta forma, la solución de formaldehído penetraba en el interior de los tejidos, coagulando sus constituyentes.

B. Deshidratación de los tejidos

Los tejidos deben ser totalmente deshidratados para que posteriormente puedan ser impregnados con parafina, sustancia totalmente insoluble en agua. Para ello, el tejido se introduce en soluciones de concentración creciente de etanol, hasta llegar al alcohol absoluto con la substitución total del agua. Por tanto, para que tal paso pueda llevarse a cabo, después de la fijación de la muestra, se descartó la solución de fijación y se reemplazó por una de etanol al 50% durante 5 min. Este último paso se repitió de nuevo dejándose los tejidos un tiempo de 30 min. Seguidamente, se reemplazó la solución de etanol al 50% por etanol al 60% y se dejó 30 min. Este proceso se repitió con soluciones de etanol al 70%, 85%, 95% y 100%. Finalmente, se reemplazó por una nueva solución al 100% que se dejó actuar toda la noche.

C. Diafanización e infiltración con parafina

Superada la etapa anterior, sería difícil aún impregnar el tejido con parafina ya que tampoco es miscible en alcohol. Por lo tanto, éste se sustituye por un agente diafanizante que es soluble tanto en el alcohol y como en la parafina fundida. Para ello, se eliminó la solución de etanol absoluto y se reemplazó por una mezcla de 25% xileno:75% etanol que se dejó actuar 30 min. Este proceso se repitió con las soluciones de 50% xileno: 50% etanol y 75% xileno: 25% etanol. Esta última solución se reemplazó por xileno, el cual se dejó actuar durante 1 h, repitiéndose este paso dos veces más. Finalmente, se reemplazó por 10 ml de xileno a cada vial, a los que se añadieron 20 pastillas de parafina (*Paraplast embedding media, paraplast plus*; temperatura de fusión: 56-57°C, Sigma) y se dejaron actuar toda la noche a temperatura ambiente. A la mañana siguiente, sólo parte de las pastillas se habían disuelto en el disolvente. En este momento, los viales se dejaron a 42°C para permitir que las pastillas se acabaran de fundir totalmente (lo que sucedió en aproximadamente 1 h). Seguidamente, se fueron añadiendo más pastillas e incubando a 42°C hasta la fusión de éstas (aproximadamente 1 h), agitando de vez en cuando. Este paso se repitió al menos dos veces más. Se preparó un recipiente de vidrio libre

de RNAsas lleno de pastillas de parafina que se colocó en el horno a 57-62°C para disponer de parafina fundida al día siguiente. Se añadió la parafina fundida a los viales con tejido/xileno/parafina hasta que estuvieron 3/4 llenos y se agitaron para mezclar la parafina fundida con el xileno. La mezcla se incubó a 42°C, al menos durante 4 h (también se puede dejar toda la noche). A continuación, se eliminó la solución de cada vial y se añadió parafina fundida, mezclando por agitación e incubando a 57-62°C, al menos durante 4 h. Este proceso se repitió al menos 6 veces más. Al final del proceso, la parafina había penetrado en el tejido, reemplazando por completo al agente diafanizante.

4.3.5.3 Preparación de los bloques de parafina

La elaboración de los bloques de parafina permitió posteriormente cortar el tejido en finas láminas (3-20 μm). Para ello, se colocaron moldes de papel o metálicos sobre una placa caliente a 40°C. Seguidamente se vertió el tejido junto con parafina fundida en el interior de los moldes pre-calentados de forma que la parafina cubriese totalmente cada pedazo de tejido, teniendo en cuenta que al solidificarse la parafina, el volumen se reduce considerablemente. Antes de que la parafina solidificase se colocó el tejido dentro de cada molde, con la ayuda de unas pinzas o pipeta *Pasteur* calientes. A continuación, se desconectó la placa y se dejó que los bloques solidificasen a temperatura ambiente durante toda la noche. A la mañana siguiente, los bloques ya solidificados se recogieron y se guardaron hasta su uso.

4.3.5.4 Obtención de los cortes de tejido.

Para la obtención de las secciones de tejido, los bloques se fijaron sobre un soporte de plástico adaptable al brazo del microtomo. Este soporte no es más que la mitad de un *Tissue-embedding cassette* suministrado por Leica. Se partió de bloques de parafina que se dejaron a -20°C durante unos minutos antes de empezar a cortar, lo que aumentó considerablemente la calidad de las secciones. Los bloques se colocaron en el microtomo RM 2045 (Leica) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se efectuaron cortes de entre 5-8 μm , que se depositaron con la ayuda de un pincel fino en un baño con H₂O-DEPC a 40-45°C con el fin de evitar la formación de pliegues que posteriormente dificultarían la visión de la preparación en el microscopio. cuando los bloques fueron enfriados unos minutos a -20°C antes de empezar a cortar. Las secciones se dejaron flotar, en la superficie de agua caliente, hasta que se estiraron completamente, y entonces se “pescaron” con la ayuda de portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina (según recomendaciones de la casa comercial, Sigma) o con TESPA (Wilkinson y Nieto, 1993).

Para la preparación de las laminillas de poli-lisina de los portaobjetos, éstos se limpiaron con HCl, se trataron con una solución de poli-L-lisina (Sigma, diluida en H₂O

Material y métodos

a una concentración final de 1mg/ml) durante 2 h a temperatura ambiente, y finalmente se lavaron con H₂O y se dejaron secar en una estufa a 37°C. Sin embargo, las laminillas de TESPA dieron mejores resultados. Este compuesto forma un derivado aminopropiólico de vidrio que actúa como un adsorbente. El procedimiento seguido se detalla a continuación:

1. Limpiar los portaobjetos con una mezcla de HCl 10%: etanol 70%
2. Lavar con H₂O 1 min, deshidratar en etanol 95% durante 1 min y dejar secar al aire.
3. Tratar los portaobjetos con TESPA (Sigma) al 2%(v/v) en acetona durante 10 segundos.
4. Lavar dos veces con acetona y una con H₂O.
5. Secar a 37°C

Estos portas, con las secciones ya recogidas, se colocaron sobre una placa calefactora a 37°C (Histoplate Jung, Leica) durante toda la noche, con el fin de eliminar por completo el agua remanente.

4.3.5.5 Tratamiento de los cortes de tejido

El objetivo es desparafinar los cortes de tejido y prepararlos para la etapa de hibridación, de forma que las sondas puedan acceder al RNA mensajero del tejido. Las secciones se colocaron sobre una placa calefactora a 60°C (Histoplate Jung, Leica), hasta que la parafina se fundía y se hacía transparente. Rápidamente, se sumergieron los portas en dos baños de xileno 100% de 10 min cada uno, para desparafinar los cortes de tejido, a lo que siguió una hidratación progresiva de las secciones (Tabla 9). Todas las incubaciones, a no ser que se especifique, se llevaron a cabo en cubetas de vidrio de 250 ml de capacidad (Shandon Lipshaw, EEUU), donde 20 portas soportados en gradillas de acero inoxidable (Shandon Lipshaw) quedaban totalmente sumergidos en las soluciones.

Llegada esta etapa, algunas de las secciones obtenidas se destinaron a la tinción histológica para poder más tarde identificar los diferentes tipos celulares. La tinción más utilizada fue con hematoxilina, que tiñe las estructuras basófilas de la célula en color azul o violeta púrpura. Para ello, una parte de los cortes de tejido hidratados, se cubrieron con hematoxilina durante 2 min. (Vector[®] hematoxilina nuclear counterstain; Gill's formula de Vector Laboratories) y se procesaron según el procedimiento sugerido por la casa comercial (Vector Laboratories). Finalmente, las secciones se montaron en unas gotas de medio de montaje ENTELLAN[®] neu (Merck).

Tabla 9. Deshidratación de las secciones a concentraciones crecientes de etanol

[Etanol]	Tiempo (min)	Etanol (ml)	Agua-DEPC (ml)
Etanol absoluto	2x 2	250	—
Etanol 90%	5	225	25
Etanol 70%	5	175	75
Etanol 50%	5	125	125
Etanol 30%	5	75	175
H ₂ O	2x 5	—	250

El resto de secciones destinadas a la hibridación *in situ*, fueron sometidas al siguiente proceso:

1. Incubación con HCl 0,2 M a temperatura ambiente 20 min (4,25 ml de HCl concentrado (35%)/ 250 ml).
2. 2 lavados sucesivos de 2 min con H₂O-DEPC.
3. Incubación de 5 min, a temperatura ambiente, en SSC2x.
4. Lavado de 5 min con H₂O-DEPC y eliminación del exceso de agua sobre un papel de filtro
5. Incubación con TE (Tris-HCl 100 mM, EDTA 50 mM, pH 8), a 37°C, durante 5 min.
6. Digestión con proteinasa K, dispensando unas 100 µl de solución de proteinasa K 10 µg/ml en TE (atemperado), sobre cada una de las secciones de tejido del portaobjetos. Incubación a 37°C durante 20-30 min, en cámara húmeda sin utilizar cubreobjetos. La digestión con proteinasa (o cualquier otra proteasa como pepsina, tripsina, etc.) es uno de los pasos críticos de la hibridación *in situ*. La concentración y el tiempo de incubación dependerán del tipo de tejido a analizar. Para cada tejido se han de optimizar estos dos parámetros si se quiere conseguir una buena permeabilización del tejido en la etapa de hibridación manteniendo, a la vez, intacta la estructura del tejido. La solución madre debe guardarse a -20°C en alícuotas que serán descongeladas en el momento de añadir la proteinasa K (10 mg/ml) a una concentración final determinada en función del tejido (Tabla 10).
7. Lavado breve con PBS a temperatura ambiente.
8. Lavado con glicina 2 mg/ml en PBS, durante 10 min, para detener la reacción de digestión.
9. Dos lavados, de 30 s cada uno, con PBS.
10. OPCIONAL: Tratamiento en ácido acético al 20% (v/v) a 4°C durante 15 s para reducir el nivel de fosfatasa alcalina endógeno, que en algunos tejidos

como en el hígado es elevado. En el caso de los tejidos nerviosos o del tracto gastrointestinal, no fue necesario.

11. Dos lavados con PBS, de 2 min cada uno.

12. Deshidratación y secado al aire. En el caso de los tejidos nerviosos, es recomendable no hacer esta última deshidratación.

Tabla 10. Concentraciones de proteinasa K óptimas en función del tejido

Tejido	Proteinasa K ($\mu\text{g/ml}$)
Células en monocapa	0,5-1
Pulmón	1
Hígado	2,5
Intestino	2,5
Estómago	5
Cerebro	5

4.3.5.6 Hibridación

Las secciones pueden ser hibridadas directamente, aunque nosotros preferimos hacer una etapa de prehibridación de 1 a 55°C. Justo antes de la hibridación, las ribosondas, en 100 μl de H_2O libre de Rnasa, se desnaturalizaron a 75°C durante 5 min y se añadieron 1,4 ml de solución de hibridación [formamida 50% (v/v), SSC 5x, SDS 0,2% (p/v), tRNA de levadura 20-40 $\mu\text{g/ml}$]. Se dispensaron en cada porta 150-200 μl de solución de hibridación (dependiendo del tamaño de las secciones) y se cubrieron cuidadosamente con Parafilm® (American Can Co.) o Duraseal™ (resistente a elevadas temperaturas, Sigma). Las secciones se incubaron a 55°C toda la noche en una cámara húmeda. Como cámara húmeda, sirvió un recipiente hermético, que se colocó en el horno a 55°C con la solución humectante, al menos, una hora antes de la etapa de pre-hibridación. Para humectar, se utilizó una solución con la misma osmolaridad que la solución de hibridación para evitar su dilución o concentración: formamida 50% (v/v) en SSC 5x. No se ha de utilizar agua para humectar.

4.3.5.7 Lavados post-hibridación

Los portaobjetos se sumergieron en un recipiente con solución de lavado SSC 1x/SDS 0,1% (p/v) 5 min a temperatura ambiente. Este primer lavado permitió que los cubres o el Parafilm® (American Can Co.) se desprendiesen de los portas sin dañar los tejidos. Se realizó un segundo lavado con solución nueva durante 5 min más. Seguidamente, se reemplazó por una segunda solución de SSC 0,2x/SDS 0,1% (p/v), previamente

atemperada a 55°C, en la cual se incubaron 30 min a 55°C. Se repitió este paso una vez más.

A continuación, se procedió a una digestión con RNasa A (Roche) para eliminar todo el RNA que no estaba formando híbridos con la ribosonda, evitando así señales inespecíficas. La RNasa A hidroliza el RNA que no ha hibridado, pero no afecta a los híbridos de RNA. Se dejaron las secciones en SSC 2x durante 10 min y, seguidamente, se reemplazó por una solución con RNasa A 10 µg/ml en SSC 2x, que se dejó a 37°C durante 20-30 min. **IMPORTANTE:** El material de laboratorio utilizado en este proceso se marcó y no se utilizó para ninguno de los pasos descritos con anterioridad, puesto que una contaminación con RNasa arruinaría el experimento de *in situ*.

4.3.5.8 Detección de los híbridos RNA-RNA

El proceso de revelado se llevó a cabo a temperatura ambiente y con agitación constante y suave, a excepción de la incubación con el anticuerpo y con el sustrato. Es aconsejable mantener los portas en posición horizontal y que la agitación sea muy suave, puesto que en este punto los tejidos podrían desprenderse de los portas, debido al proceso extremo que han sufrido. El procedimiento se resume de la siguiente forma: los portas se lavaron con TBS unos 10 min y seguidamente se incubaron en solución bloqueadora [agente bloqueador (Roche) 0,5% (p/v) en TBS] durante 1 h. Se volvió a lavar con TBS, para dar comienzo a la incubación con el anticuerpo anti-DIG diluido 1:400 en una solución BSA fracción V 0,5% (p/v) en TBS, durante toda la noche a 4°C. Este paso se efectuó en una cámara húmeda. Se colocaron los portas horizontales con unos 150 µl de solución en cada sección y se cubrieron con un pedazo de Parafilm® (American Can Co.), evitando la formación de burbujas. Al día siguiente, los portas se lavaron con TBS durante 1 h, realizando varios cambios de tampón con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo. Finalizados los lavados, los portas se incubaron con la solución de detección para fosfatasa alcalina [Tris-HCl 0,1 M, pH 9,5, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 50 mM] durante unos 10-15 min y, a continuación, se añadieron unos 200 µl de solución de detección NBT/BCIP por sección (ver apartado 4.3.5.1.C). Cuando empezaban a distinguirse señales de color azulado en las secciones hibridadas con la sonda antisentido pero no todavía en las incubadas con la sonda sentido, se paró la reacción con agua y se procedió al montaje de los portaobjetos.

4.3.5.9 Montaje de las preparaciones

Esta última fase constituye la manipulación final a la que se somete la preparación antes de pasar a la observación directa. Para ello, se extrae el agua residual de las secciones mediante una serie de tratamientos con alcohol-xileno. Después, se rocía la sección con una gota de medio de montaje y se coloca el cubreobjetos. El

procedimiento seguido se detalla como sigue: las secciones se deshidrataron en soluciones de concentración creciente de etanol, dejándolas 2 min en cada solución. Se incubaron en xileno 2 min y, por último se dispensaron unas gotas de medio de montaje ENTELLAN[®] neu (Merck) y se montaron los cubreobjetos sobre las secciones de tejido.

4.3.5.10 Análisis en el microscopio y adquisición de imágenes

Las secciones procedentes de histoquímica, IHC o ISH se examinaron en el microscopio óptico Leica DMRD *Fluorescence microscope*. Las imágenes de interés fueron captadas por una cámara Hamamatsu C5310 CCD. La adquisición de las imágenes se llevó a cabo con el software *Image ProPlus* y fueron importadas a Adobe Photoshop Version 5.5. La modificación de éstas sólo implicó la transformación de imágenes en color a blanco y negro, utilizando la función escala de grises y el ajuste de los niveles de brillo y contraste.

La consulta de tratados y atlas de histología adecuados (Hammersen, 1987; Kühnel, 1987; Wheater y col., 1987) resultó ser de gran utilidad para la identificación de las diferentes estructuras, capas y tipos celulares de los diferentes órganos analizados. Las secciones del SNC, en particular, fueron estudiadas y comparadas con las figuras y esquemas de un Atlas estereotáxico de cerebro adulto de rata (Paxinos y Watson, 1986). Los nombres en latín de las estructuras del SNC se asignaron de acuerdo a Paxinos (1995). La histología sólo proporciona imágenes bidimensionales de estructuras tridimensionales, de forma que la disposición espacial de los componentes históricos en la sección de tejido se hizo con precaución. Por esta razón, en esta memoria se incluyen esquemas de la estructura tridimensional de algunas regiones para poder relacionarla con la sección histológica.

Hay que destacar, también, que en el caso de las secciones de ISH y IHC, el proceso de deshidratación y clarificación del tejido, antes de la inclusión en parafina, lo endurece mucho, lo que produjo en algunas ocasiones artefactos tales como roturas y retracciones del tejido. Así, en algunas micrografías presentadas en este trabajo, se pueden observar hendiduras y roturas que, aún así, no interfirieron en la correcta interpretación de los resultados de ISH e IHC. Además, pueden también observarse algunos pliegues en las secciones, debidos a una extensión insuficiente sobre el porta.