

Materiales y Métodos

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Slot-blots

Los ensayos “*slot-blots*” se realizaron para determinar la especificidad de unión de los anticuerpos policlonales anti-PDFG-AA y anti-PDFG-BB utilizados en el protocolo de inmunocitoquímica (apartado 3.2.3 y 3.3.3) para la detección de las isoformas de PDGF en los experimentos de “*binding*” en las células CHO y hASMC.

- Se probaron diferentes diluciones de las isoformas de PDGF: PDGF-AA_L, PDGF-AA_S, PDGF-BB_L y PDGF-BB_S: 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/ml y también del BSA como muestra control. Las muestras de PDGF se diluyen en ácido acético 1M.
- Se sumergen membranas de nitrocelulosa en agua desionizada y seguidamente se sumergen en Tris/HCl 0.02 mM (pH 7.5) que contiene NaCl 1M. Se dejan secar las membranas antes de aplicar las muestras.
- Se colocan las membranas en los aparatos de “*slot-blot*” y se aplican 25 µl de las diluciones de las isoformas de PDGF y BSA en los pocillos. Se aplica el vacío y se dejan secar.
- Las membranas de nitrocelulosa se incuban en una solución de bloqueo (Tris/HCl 0.02 mM, NaCl 1M, BSA 2%, Tween-20 0.1%) durante 30 min a temperatura ambiente.
- Las membranas se incuban en una solución del anticuerpo primario: anti-PDFG-AA o anti-PDFG-BB (Genzyme; dilución 1:500) en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Se hacen cinco lavados de las membranas en Tris/HCl 0.02 mM, NaCl 1M, Tween-20 0.1% (solución de lavado).
- Las membranas se incuban en una solución del anticuerpo secundario *swine anti-rabbit* conjugado con HRP (*Horse Radish Peroxidase*; Dakopatts, dilución 1:1000) en solución de bloqueo durante 30 min a temperatura ambiente.
- Se hacen cinco lavados de las membranas en la solución de lavado.
- Se revelan las membranas con el sistema ECL (3.1.1) para observar la aparición de las bandas sobre un film. El film se escanea y se cuantifica la intensidad de las bandas en el programa IMAT (Serveis científico-tècnics; UB).

3.1.1 Enhanced chemiluminiscence (ECL)

Se mezclan las soluciones A y B en la oscuridad y la membrana se incuba en esta mezcla durante 1-2 min. Se expone sobre la membrana un film Kodak X Omat.

- Solución A: 5ml Tris/HCl 100 mM (pH 8.5); ácido coumárico 90 mM, luminol 250 mM
- Solución B: 5ml 30% Tris/HCl 100 mM (pH 8.5); 3µl H₂O₂ 30%

3.2 Unión de las isoformas de PDGF a los glicosaminoglicanos de las células CHO

3.2.1 Cultivo celular de las células CHO

Las células CHO K1 y las células CHO 745 fueron proporcionadas por el Dr. J. Esko (*Department of Cellular and Molecular Medicine, University of California, San Diego*). Las células CHO 677 se obtuvieron de la ATCC (*American Type Culture Collection*). Los tres tipos celulares crecen con el medio de crecimiento Ham's F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina, 10 µg/ml de estreptomycin y 2mM de L-glutamina en una atmósfera a 37°C, 100% de humedad y 5% de CO₂.

3.2.2 Experimentos de “binding” o unión en la superficie celular de CHO

Los clones CHO se sembraron en cubre-objetos a una confluencia del 70% y se utilizaron para los experimentos de “binding” al segundo día de extensión celular.

- Las células se mantienen a una temperatura de 4°C durante 30 min para detener el metabolismo celular.
- Se preparan las soluciones de bLPL (Bengtsson-Olivecrona y Olivecrona, 1991) y de las isoformas de PDGF (Lustig et al. 1996; 1999) en medio Ham's F12 (sin suero)-Hepes 20mM (pH 7.4) -1% BSA (albúmina de suero bovino) a las concentraciones especificadas en cada experimento.
- Se añaden las soluciones de bLPL /isoformas de PDGF a las células sembradas en los cubre-objetos y se mantienen a una temperatura de 4°C durante 30 min para permitir la unión de la bLPL /isoformas de PDGF a la superficie celular.
- Se hace un lavado con medio Ham's F12 (sin suero)-Hepes 20 mM.
- Se fijan con una solución de 3% de paraformaldehído – 2% sacarosa-tampón fosfato 100 mM (pH 7.4) durante 15 min a temperatura ambiente.
- Se hacen dos lavados con PBS (tampón fosfato 10mM, NaCl 150mM; pH 7.4).

3.2.2.1 Concentración óptima de unión de bLPL /isoformas de PDGF en la superficie celular de CHO K1

Las células CHO K1 se siembran como se indica en el apartado 3.2.1. La bLPL y las isoformas de PDGF se diluyen en medio Ham's F12 (sin suero)-Hepes 20mM (pH 7.4) -1% BSA a las siguientes concentraciones: 0, 0.6, 1.2, 2.5, 5 y 10 µg/ml. Las diferentes diluciones de bLPL y de las isoformas de PDGF se aplican a las células a 4°C tal como se indica en el apartado 3.2.2.

3.2.2.2 Tratamiento con glicosidasas: Heparitinasa I y Condroitinasa ABC

Las células CHO K1 y las células CHO 677 se siembran como se indica en el apartado 3.2.1 y son tratadas con glicosidasas previamente a la incubación con la bLPL /isoformas de PDGF.

- La Heparitinasa I (EC 4.2.2.8; Seikagaku Ref. 100704) se diluye a una concentración de 0.1 U/ml y la Condroitinasa ABC (EC 4.2.2.4; Seikagaku Ref. 100330) se diluye a una concentración de 0.01 U/ml en una solución de D-PBS (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*) (Ca^{2+} , Mg^{2+}) - 0.2% BSA.
- Las células se incuban con las soluciones de glicosidasas durante 2h a 37°C, 100% de humedad y 5% de CO_2 . Al mismo tiempo, cubre-objetos de células control se incuban con la solución de D-PBS (Ca^{2+} , Mg^{2+}) - 0.2% BSA en ausencia de glicosidasas.
- Se procede a la incubación a 4°C con la bLPL (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) /isoformas de PDGF (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en medio Ham's F12 (sin suero)-Hepes 20mM (pH 7.4) -1% BSA y se fijan las células como se indica en el apartado 3.2.2.

3.2.2.3 Tratamiento con clorato sódico

- Las células CHO K1 y las células CHO 677 se siembran en medio completo en presencia de clorato sódico (30mM) para inhibir la sulfatación de los GAGs. Paralelamente, se crecen células en las mismas condiciones pero en ausencia del clorato sódico.
- Al 2º día de extensión celular, las células son incubadas a 4°C con la bLPL (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) /isoformas de PDGF (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en medio Ham's F12 (sin suero)-Hepes 20mM (pH 7.4)-1% BSA- clorato sódico 30 mM. En el caso de las células control, se utiliza el medio Ham's F12 (sin suero)-Hepes 20mM (pH 7.4) -1% BSA (sin clorato sódico). Seguidamente se procede a la fijación de las células como se indica en el apartado 3.2.2.

3.2.2.4 Incubación de bLPL /isoformas de PDGF en presencia de heparina de bajo peso molecular (LMWH), heparán sulfato (HS), condroitín sulfato (CS) y dermatán sulfato (DS)

Las células CHO K1 se siembran como se indica en el apartado 3.2.1. La bLPL (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y las isoformas de PDGF (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se diluyen en medio Ham's F12 (sin suero)-Hepes 20mM (pH 7.4) -1% BSA en presencia de distintas concentraciones de LMWH (*average M_r = 3000*; Sigma); HS (*from bovine kidney*, Sigma); CS (*from shark cartilage*, Sigma) y DS (*chondroitin sulphate B from pig skin*, Sigma) : 0, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 1 mg/ml. A continuación, las soluciones se añaden a las células a 4°C y se fijan las células como se explica en el apartado 3.2.2.

3.2.3 Protocolo de inmunocitoquímica

3.2.3.1 Bloqueo

Los cubre-objetos con las células fijadas se incuban con una solución de bloqueo: PBS-glicina 20 mM- 1% BSA durante 10 min a temperatura ambiente.

3.2.3.2 Incubación con anticuerpos primarios

Las células fueron doblemente marcadas con anticuerpos específicos para la bLPL /isoformas de PDGF y para la membrana celular. Los anticuerpos primarios anti-bLPL (Oncogene), anti-PDGF-AA (Genzyme) y anti-PDGF-BB (Genzyme) se diluyeron en la solución de bloqueo a una concentración final de 10 µg/ml. El anticuerpo primario que detecta la bLPL es un anticuerpo monoclonal (clon 5D2) y los anticuerpos primarios que detectan las isoformas de PDGF son policlonales: anti-PDGF-AA que reconoce las isoformas PDGF-AA_L y PDGF-AA_S y el anti-PDGF-BB que reconoce las isoformas PDGF-BB_L y PDGF-BB_S (ver apartado 3.1). La membrana celular se marcó con concanavalina A biotilada (Sigma; concentración final: 16 µg/ml) que reconoce los residuos α-D-manósido y α-D-glucósido de la superficie celular. Las células se incubaron con los anticuerpos primarios y la concanavalina A biotilada durante 45 min a 37°C. A continuación, se hacen dos lavados con PBS-glicina 20mM.

3.2.3.3 Incubación con anticuerpos secundarios

Para detectar los anticuerpos primarios anti-bLPL, anti-PDGF-AA y anti-PDGF-BB las células se incubaron con anticuerpos secundarios. Las soluciones de anticuerpos secundarios se prepararon en la solución de bloqueo. Para visualizar el anticuerpo 5D2 que reconoce la bLPL, las células se incubaron con el anticuerpo secundario *rabbit anti-mouse* conjugado con FITC (Dakopatts; dilución 1:50). Para visualizar las isoformas de PDGF, se utilizó un anticuerpo secundario *swine anti-rabbit* conjugado con FITC (Dakopatts; dilución 1:50). Conjuntamente con los anticuerpos secundarios, se utilizó Estreptavidina- Texas Red (Amersham; dilución 1:150) para visualizar la concanavalina A biotilada. La incubación con los anticuerpos secundarios y la Estreptavidina-Texas Red se realizó durante 30 min a 37°C protegidos de la luz.

3.2.3.4 Montaje

Se hacen dos lavados con PBS-glicina 20mM y los cubre-objetos se montan (con la cara de las células hacia abajo) en porta-objetos con 5 µl de medio de montaje (Mowiol; Calbiochem).

3.2.4 Microscopía Confocal (CSLM)

Se utilizó un microscopio confocal Leica TCS 4D (Leica Lasertechnik GmbH, Mannheim, Alemania) adaptado a un microscopio invertido Leitz DMIRBE para la captación de imágenes correspondientes al doble marcaje de las células. Se utilizó un objetivo Leitz Plan-Apocromático de 63x (N.A 1.4, *oil*). Los fluorocromos utilizados: FITC y Texas Red fueron excitados con las líneas 488 nm y 568 nm de un láser argon-krypton de 75 mW. El tamaño de las imágenes es de 512 x 512 *pixels*. Se obtuvieron 9 secciones ópticas (*z-step* = 0.75 µm) a una velocidad de “*scanning*” o rastreo normal (*line*=2) y se generaron imágenes de proyección 3-D de tipo *extended focus* (Wilson, 1990).

3.2.5 Cuantificación de la fluorescencia

La intensidad de la fluorescencia se calculó a partir de las proyecciones 3-D de tipo *extended focus*. Para cuantificar la intensidad de fluorescencia, se utilizó el programa de análisis de imágenes: Metamorph Image Analysis System v. 4.0. La superficie (en *pixels*) que ocupa cada célula se definió como una región ROI (*region of interest*) a partir del marcaje de la concanavalina que reconoce la membrana celular (Figura 3.1).

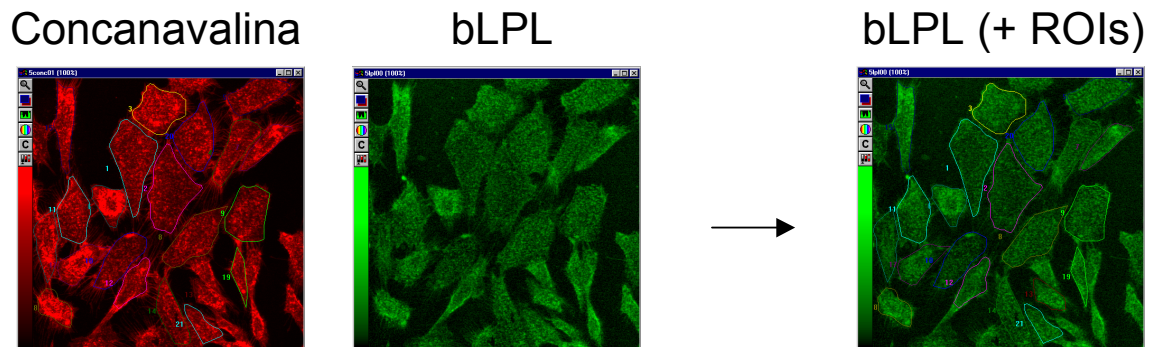


Figura 3.1. Las células CHO se marcaron doblemente para la unión de la bLPL /isoformas de PDGF (verde) y para la concanavalina (rojo). El marcaje de la concanavalina permite definir el perímetro de cada una de las células como ROI (*region of interest*). Las ROI se pueden aplicar directamente sobre las imágenes que representan el marcaje de la bLPL /isoformas de PDGF.

Para expresar la intensidad de fluorescencia, se utilizaron unidades arbitrarias: MFI (*Mean Fluorescence Intensity*) que se definen como el sumatorio de la intensidad de fluorescencia en escala de grises (IF) de todos los *pixels* que forman parte de la región ROI dividido por el sumatorio de todos los *pixels* que forman parte de la ROI:

$$MFI_{(ROI_i)} = \frac{\sum IF_{(ROI_i)}}{\sum pixels_{(ROI_i)}}$$

Se calcularon las MFI para un número aproximado de 50 células (ROI's \cong 50) por cada condición o tratamiento y se tomó como referencia el valor promedio del número total de células analizadas. Para comparar experimentos entre diferentes días, los valores de MFI se expresaron en porcentaje (%) y se normalizaron respecto al 100% que supone una condición control.

El análisis estadístico de los datos se realizó en el programa SPSS (v.9) mediante el análisis de varianza ANOVA. Se procedió a un análisis estadístico de comparación múltiple post-hoc (C-Dunnet) con una significatividad $p < 0.05$.

3.3 Colocalización del PDGF con Heparán sulfato y Condroitín sulfato en las hASMC

3.3.1 Cultivo celular de las hASMC

Las hASMC (*human arterial smooth muscle cells*) fueron proporcionadas por la Dra. Florentyna Lustig, del *Wallenberg Laboratory for Cardiovascular Research*, de la Universidad de Göteborg, Suecia. Las hASMC se aislaron a partir de arterias de útero humano (Fager et al. 1988). Para los experimentos con las hASMC se utilizan pases secundarios (del 5 al 10) de células no transformadas y libres de micoplasmas. Las hASMC crecen en medio Waymouth's MB 752/1 suplementado con 100 U/ml de penicilina, 10 µg/ml de estreptomina, 2 mM de L-glutamina, 2 mM de piruvato sódico (BM= medio basal) en presencia de 10% (vol/vol) de suero humano y 10% de suero bovino fetal (S-BM= medio completo) en una atmósfera a 37°C, 100% de humedad y 5% de CO₂.

Las hASMC se pueden diferenciar en distintos fenotipos o estadios según las condiciones de cultivo desde el momento de la siembra en medio completo en presencia de suero (S-BM) (Fager et al. 1988):

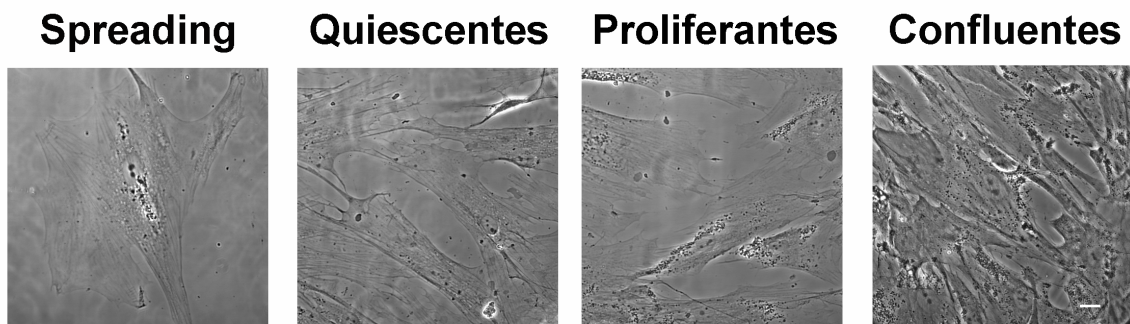
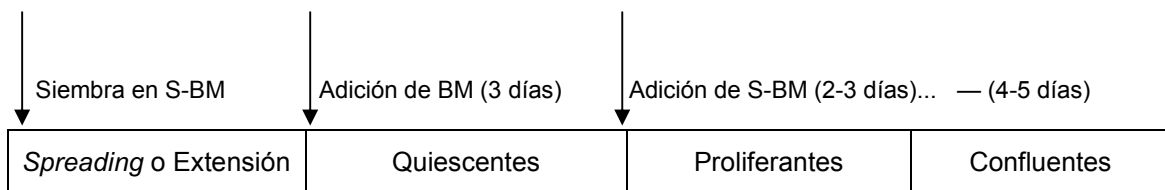


Figura 3.2. *Imágenes de contraste de fases de las hASMC en los distintos estadios fenotípicos.* En estas imágenes se pueden observar los cambios morfológicos entre las células que crecen en presencia de suero (fenotipo “sintético” : *Spreading*, *Proliferantes* y *Confluentes*) que se caracterizan por tener un retículo endoplasmático rugoso abundante y aparato de Golgi muy desarrollado, y las células en estadio quiescente (fenotipo “contráctil”) que presenta el retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi poco desarrollados (Barra= 20 µm).

Los diferentes fenotipos de las hASMC aisladas a partir de las arterias son comparables a los cambios que se producen en el fenotipo de las células musculares lisas en la aterosclerosis y en la hipertensión (apartado 1.4.2). En estas situaciones, las células musculares lisas pasan de un fenotipo “contráctil” o diferenciado a un fenotipo “sintético” o desdiferenciado. Los cambios en la morfología y la presencia de orgánulos en fase de síntesis se correlaciona con las células que proliferan en presencia de S-BM. Además, estas células se caracterizan por la inexistencia de actina específica de las células musculares lisas y de isoformas de miosina de las fibras de stress que normalmente están presentes en las células quiescentes (Fager et al. 1989). En cambio, el fenotipo “contráctil” es comparable al estadio de quiescencia en el cual las células se mantienen diferenciadas en ausencia de suero.

3.3.2 Experimento de “*binding*” o unión del PDGF en las hASMC

Las hASMC se siembran en cubre-objetos y se utilizan al segundo-tercer día de extensión celular para el experimento de “*binding*” de las isoformas de PDGF tal como se explica en el apartado 3.2.2. Las isoformas de PDGF se incuban en las células a las concentraciones especificadas en el apartado 3.2.2.1 o a una concentración estándar de 10 µg/ml en el medio Waymouth’s-Hepes 20mM (pH 7.4)-1% BSA.

3.3.3 Doble inmunodetección de heparán sulfato/condroitín sulfato y las isoformas de PDGF

3.3.3.1 Bloqueo

Los cubre-objetos con células fijadas se incuban en una solución de bloqueo: D-PBS-glicina 20 mM- 1% BSA durante 10 min a temperatura ambiente.

3.3.3.2 Permeabilización con saponina

En el caso de la incubación con el anticuerpo anti-heparán sulfato, es necesario un previo paso de permeabilización con saponina para la detección del anticuerpo anti-heparán sulfato. Las células fijadas se incuban con una solución de D-PBS -glicina 20 mM-0.2% saponina durante 10 min a temperatura ambiente.

3.3.3.3 Incubación con anticuerpos primarios

Los anticuerpos primarios anti-heparán sulfato (Calbiochem Ref. 375080) /anti-condroitín sulfato (Sigma Ref. C8035) y los anticuerpos anti-PDGF-AA (Genzyme) y anti-PDGF-BB (Genzyme) se diluyeron en D-PBS -glicina 20 mM-0.2% saponina -1% BSA a una concentración final de 10 µg/ml. Los anticuerpos primarios que detectan las isoformas de PDGF son policlonales: anti-PDGF-AA que reconoce las isoformas PDGF-AA_L y PDGF-AA_S y el anti-PDGF-BB que reconoce las isoformas PDGF-BB_L y PDGF-BB_S. Los anticuerpos primarios que detectan el heparán sulfato (clon 10E4) y el condroitín sulfato (clon CS-56) son monoclonales. Las células se incubaron con los anticuerpos primarios durante 45 min a 37°C. A continuación, se hacen dos lavados con D-PBS -glicina 20 mM. En experimentos previos, las hASMC fueron tratadas con Heparitinasa I (apartado 3.2.2.2) e inmunodetectadas con el anticuerpo anti-heparán sulfato o tratadas con Chondroitinasa ABC (apartado 3.2.2.2) e inmunodetectadas con el anticuerpo anti-condroitín sulfato para verificar la especificidad de los anticuerpos.

3.3.3.4 Incubación con anticuerpos secundarios

Las soluciones de anticuerpos secundarios se prepararon en D-PBS -glicina 20 mM-0.2% saponina -1% BSA. Para visualizar el anticuerpo anti-heparán sulfato o anti-condroitín sulfato, las células se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor-546 *goat anti-mouse* (Molecular Probes; dilución 1:100). Para visualizar las isoformas de PDGF, se utilizó un anticuerpo secundario Alexa Fluor-488 *goat anti-rabbit* (Molecular Probes; dilución 1:100). La incubación con los anticuerpos secundarios se realizó durante 30 min a 37°C en la oscuridad.

3.3.3.5 Montaje

Se lavan dos veces con D-PBS -glicina 20 mM y los cubre-objetos se montan (con la cara de las células hacia abajo) en porta-objetos con 5 µl de medio de montaje (Mowiol; Calbiochem).

3.3.4 Marcaje directo de los anticuerpos monoclonales anti-heparán sulfato y anti-condroitín sulfato

El marcaje directo de los anticuerpos monoclonales anti-heparán sulfato y anti-condroitín sulfato se realizó con el fin de realizar una triple inmunodetección del PDGF, heparán sulfato y condroitín sulfato. El anticuerpo anti-heparán sulfato se marcó con el fluorocromo Alexa Fluor-546 utilizando un *kit* de marcaje para anticuerpos monoclonales (Molecular Probes Ref. A-20183). El anticuerpo anti-condroitín sulfato se marcó con el fluorocromo Alexa Fluor-647 empleando el *kit* de marcaje para anticuerpos monoclonales (Molecular Probes Ref. A-20186).

3.3.5 Triple inmunodetección de las isoformas de PDGF, heparán sulfato y condroitín sulfato

3.3.5.1 Bloqueo

Los cubre-objetos con células fijadas se incuban en una solución de bloqueo: D-PBS-glicina 20 mM- 1% BSA durante 10 min a temperatura ambiente.

3.3.5.2 Incubación con anticuerpos primarios anti-PDGF

Los anticuerpos primarios anti-PDGF-AA (Genzyme) y anti-PDGF-BB (Genzyme) se diluyeron en D-PBS -glicina 20 mM -1% BSA a una concentración final de 10 µg/ml. Los anticuerpos primarios que detectan las isoformas de PDGF son policlonales: anti-PDGF-AA que reconoce las isoformas PDGF-AA_L y PDGF-AA_S y el anti-PDGF-BB que reconoce las isoformas PDGF-BB_L y PDGF-BB_S. Las células se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios anti-PDGF-AA o anti-PDGF-BB durante 45 min a 37°C. A continuación, se lavan dos veces con D-PBS-glicina 20 mM.

3.3.5.3 Incubación con anticuerpos conjugados con fluorocromos

Las soluciones de anticuerpos se prepararon en D-PBS -glicina 20mM -1% BSA. Para visualizar las isoformas de PDGF, se utilizó un anticuerpo secundario Alexa Fluor-488 *goat anti-rabbit* (Molecular Probes; dilución 1:100). Las células se incubaron también con los anticuerpos monoclonales marcados directamente: el anti-heparán sulfato conjugado con Alexa

Fluor-546 (dilución 1:50) y el anti-condroitín sulfato conjugado con Alexa Fluor-647 (dilución 1:50). La incubación se realizó durante 30 min a 37°C protegidos de la luz.

3.3.5.4 Montaje

Se hacen dos lavados con D-PBS-glicina 20 mM y los cubre-objetos se montan (con la cara de las células hacia abajo) en porta-objetos con 5 µl de medio de montaje (Mowiol; Calbiochem).

Paralelamente en cada experimento se realizaron los respectivos controles de cada anticuerpo para comprobar la especificidad de unión de los anticuerpos, autofluorescencia, etc.:

- Control anti-PDGF: Incubación con anticuerpo primario anti-PDGF AA o anti-PDGF-BB seguido de la incubación con anticuerpo secundario Alexa Fluor-488 *goat anti-rabbit*.
- Control anti-heparán sulfato: Se incubaba directamente con el anticuerpo anti-heparán sulfato (ya sea en su forma conjugada con Alexa Fluor-546 en los experimentos de triple inmunodetección o sin conjugar en los experimentos de doble inmunodetección), sin añadir ningún otro anticuerpo primario. En los experimentos de doble inmunodetección, se añade el anticuerpo Alexa Fluor-546 *goat anti-mouse* para visualizar el anticuerpo anti-heparán sulfato y el anticuerpo secundario Alexa Fluor-488 *goat anti-rabbit* para observar la unión inespecífica de este anticuerpo secundario.
- Control anti-condroitín sulfato: Se incubaba directamente con el anticuerpo anti-condroitín sulfato (ya sea en su forma conjugada con Alexa Fluor-647 en los experimentos de triple inmunodetección o sin conjugar en los experimentos de doble inmunodetección), sin añadir ningún otro anticuerpo primario. En los experimentos de doble inmunodetección, se añade el anticuerpo Alexa Fluor-546 *goat anti-mouse* para visualizar el anticuerpo anti-condroitín sulfato y el anticuerpo secundario Alexa Fluor-488 *goat anti-rabbit* para observar la unión inespecífica de este anticuerpo secundario.

3.3.6 **Microscopía Confocal (CSLM)**

Se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Leica Lasertechnik GmbH, Mannheim, Alemania) adaptado a un microscopio invertido Leitz DMIRBE para la captación secuencial de imágenes correspondientes al triple y doble marcaje de las células. Se utilizó un objetivo Leitz Plan-Apocromático de 100x (N.A 1.4, *oil*) y un aumento (*zoom*) de 2.4 analizando una región intracelular. Los fluorocromos utilizados: Alexa Fluor-488; Alexa Fluor-546 y Alexa Fluor-647 fueron excitados respectivamente con la línea 488 nm de un láser Ar; con la línea 543 nm de un láser HeNe y con la línea 633 de un láser HeNe. La captación de las imágenes se realizó de forma secuencial y mediante el sistema de detección espectral que permite ajustar convenientemente los rangos de emisión para cada fluorocromo, evitando así los posibles problemas de cruzamiento entre fluorocromos. El formato de las imágenes es de 1024 x 1024 *pixels*. Se obtuvieron de 9 a 18 secciones ópticas según la célula analizada (*z-step*= 0.25 µm) a una velocidad de “*scanning*” o rastreo de 400 Hz (*line*=2).

3.3.7 Análisis de la Colocalización

Las imágenes de las secciones ópticas se analizaron en el programa Metamorph Image Analysis System v. 4.0 para estudiar el grado de colocalización entre el heparán sulfato, el condroitín sulfato y las isoformas de PDGF.

Las imágenes de las secciones ópticas se segmentaron para eliminar los valores de “background” o ruido de fondo, autofluorescencia o unión inespecífica de los anticuerpos conjugados con fluorocromos que se analizan con los respectivos controles de estos anticuerpos. Seguidamente, se analizó cuantitativamente sección a sección el grado de colocalización entre el marcaje de la isoforma de PDGF respecto al marcaje del heparán sulfato y del marcaje de la isoforma de PDGF respecto al marcaje del condroitín sulfato. También se analizó el grado de colocalización entre el marcaje de heparán sulfato y condroitín sulfato en los marcajes triples.

El grado de colocalización se analizó teniendo en cuenta las intensidades de los diferentes fluorocromos mediante el cálculo de los coeficientes de correlación de Pearson (Gonzalez y Wintz, 1987; Manders et al. 1993):

$$C_{(PDGF/HS)} = \frac{\sum_i PDGF_i(col)}{\sum_i PDGF_i} \leftrightarrow C_{(HS/PDGF)} = \frac{\sum_i HSi(col)}{\sum_i HSi}$$

$$C_{(PDGF/CS)} = \frac{\sum_i PDGF_i(col)}{\sum_i PDGF_i} \leftrightarrow C_{(CS/PDGF)} = \frac{\sum_i CS_i(col)}{\sum_i CS_i}$$

$$C_{(HS/CS)} = \frac{\sum_i HSi(col)}{\sum_i HSi} \leftrightarrow C_{(CS/HS)} = \frac{\sum_i CS_i(col)}{\sum_i CS_i}$$

Siendo C el coeficiente de correlación de Pearson entre dos marcajes (por ejemplo entre el marcaje de PDGF y HS: el numerador representa el sumatorio de la intensidad de los valores de grises de los *pixels* (*i*) del PDGF que colocalizan con el HS y el denominador representa el sumatorio de la intensidad de valores de grises de todos los *pixels* (*i*) del PDGF). **Los coeficientes de correlación de Pearson (C) presentan valores entre el 0 (colocalización nula) y el 1 (colocalización máxima).**

El resultado se expresó como coeficientes de correlación (C) entre el PDGF/HS (o HS/PDGF); entre el PDGF/CS (o CS/PDGF) y entre el HS/CS (o CS/HS). Se consideró el máximo valor C entre los dos marcajes por región celular analizada y en varias regiones celulares.

3.4 Mitogénesis de las hASMC con timidina-³H

Las hASMC crecen rápidamente en cultivo hasta 25 duplicaciones. Las células con pocos pases duplican su crecimiento en un mínimo de 2 días sembradas a alta densidad (aprox. 10^4 células/cm²). Se ha descrito que un 58% de las células incorporan la timidina -³H en un pulso de 24 horas (Fager et al. 1988).

3.4.1 Ensayo de mitogénesis con timidina-³H

- Las hASMC se siembran a una densidad de 1.3×10^4 células/cm² (subconfluentes) en placas Corning de 24 pocillos y se mantienen en S-BM durante 2 días.
- Se sustituye el medio S-BM por el medio BM para obtener hASMC quiescentes y se mantienen en BM durante 3 días.
- Se diluyen las isoformas de PDGF en BM a las concentraciones indicadas en cada experimento. Triplicados de pocillos con hASMC quiescentes se incuban con las diluciones de PDGF durante 20 h a 37°C. En el caso del control positivo del experimento, se añade el S-BM a las células durante 20 h a 37°C.
- Se elimina el medio y se incuban las hASMC con [6-³H]-timidina (1 µCi /ml) preparada en BM durante 4 h a 37°C.
- Se hacen dos lavados con D-PBS a 4°C.
- Se añade ácido tricloroacético (TCA) al 10% y se incuba a 4°C durante 20 min.
- Se aspira el TCA y se añade NaOH 0.1 M para provocar la lisis celular. La placa se mantiene en rotación durante 1h.
- Se recoge la solución de NaOH de los pocillos y se diluye en líquido de centelleo.
- Se cuenta la radioactividad (dpm= desintegraciones por minuto) en el contador de centelleo líquido Packard 2100 TR.

3.4.1.1 Concentración óptima de las isoformas de PDGF que inducen mitogénesis en las hASMC

Las hASMC se incuban en presencia de concentraciones crecientes de las isoformas de PDGF: 1, 5, 10 y 50 ng/ml. Seguidamente, se sigue el protocolo indicado en el apartado 3.4.1.

3.4.1.2 Efecto de la Heparina en la mitogénesis de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF

Las hASMC se incuban con una concentración constante de la isoforma de PDGF (10 ng/ml) o de S-BM en presencia de concentraciones crecientes de heparina (10 µg/ml, 100 µg/ml y 1 mg/ml). Paralelamente, pocillos control se incuban con las isoformas de PDGF o de S-BM sin añadir heparina. Así mismo, pocillos control se incuban con las diferentes diluciones de heparina en ausencia de PDGF. A continuación se sigue el protocolo indicado en el apartado 3.4.1.

3.4.1.3 Efecto del clorato sódico en la mitogénesis de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF

Las hASMC se siembran en las placas de 24 pocillos como se explica en el apartado 3.4.1. Al segundo día de extensión celular, se deprivan las células con BM en presencia de 10mM o 30mM de clorato sódico para inhibir la sulfatación de los GAGs. De forma paralela, se mantienen pocillos control en los cuales no se añade clorato sódico. En el momento de añadir los factores de crecimiento, las isoformas de PDGF o el S-BM se diluyen en presencia de clorato sódico 10mM o 30mM en los pocillos con células previamente tratadas con clorato sódico. A continuación se procede como se explica en el apartado 3.4.1.

3.4.1.4 Efecto del β -xilósido en la mitogénesis de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF

Las hASMC se siembran y se vuelven quiescentes tal como se describe en el apartado 3.4.1. Doce horas antes de la incubación con los factores de crecimiento, las hASMC se incuban con el 4-metilumbeliferil 7- β -D-xilósido (β -xilósido) en BM (2 mM) para inhibir la biosíntesis de GAGs. El β -xilósido se prepara en DMSO, por lo que también se incuban pocillos con la misma concentración final de DMSO. También se mantienen pocillos control que no se tratan con β -xilósido. Al añadir los factores de crecimiento, las isoformas de PDGF o el S-BM se diluyen en presencia de β -xilósido 2 mM en el caso de los pocillos previamente tratados con el β -xilósido. Seguidamente, se continúa el protocolo del apartado 3.4.1.

3.4.1.5 Ensayo de citotoxicidad del clorato sódico y del β -xilósido en las hASMC

Se valoró la citotoxicidad del clorato sódico y del β -xilósido en las hASMC con el reactivo de proliferación celular WST-1. El WST-1 se utiliza para cuantificaciones espectrofotométricas del crecimiento de las células y de su viabilidad.

El reactivo WST-1 es metabolizado por las enzimas mitocondriales de las células viables (con metabolismo activo), generando el formazan que es un compuesto que presenta un color rojizo. El color del formazan producido por las células viables es cuantificado mediante valoración de la absorbancia del color de la solución en un espectrofotómetro (lector ELISA) a una longitud de onda de 450 nm.

- Se sigue el mismo protocolo de siembra de las hASMC del ensayo de mitogénesis (apartado 3.4.1). Se preparan duplicados de los pocillos para todas las condiciones.
- Al segundo día de extensión celular, se deprivan las células en BM en presencia de clorato sódico 30 mM durante 48 horas (apartado 3.4.1.3). En otros pocillos, se procede como se indica en el apartado 3.4.1.4 (incubación con β -xilósido 2mM durante 12 horas). También tendremos pocillos control en los que las hASMC se deprivan con BM sin añadir ningún compuesto.
- Al cabo de este tiempo, se añade una solución de SDS 0.02% en alguno de los pocillos en los que no se había añadido ningún compuesto, como control positivo de citotoxicidad. Se añade a todos los pocillos el reactivo WST-1 (1:10) diluido en BM durante 4 horas. Las placas se mantienen durante este tiempo en la estufa a 37°C y 5% CO₂.

Se agita levemente la placa para que el color resultante de la reacción del WST-1 aparezca homogéneo. Se extraen 50 μ l de cada pocillo y se colocan en una placa de 96 pocillos. Se leen las absorbancias en el lector ELISA a 450 nm.

3.5 Quimiotaxis de las hASC

El ensayo de trans migración en *transwells* o insertos se realizó para estudiar la migración dirigida de las hASC hacia los factores de crecimiento (isoformas de PDGF o factores presentes en el S-BM).

3.5.1 Ensayo de trans migración

- Se siembran hASC deprivadas de suero durante 3 días a una densidad de 2×10^5 células/cm² en el compartimiento superior de *transwells* (Insertos Fluoroblok HTS, Beckton Dickinson Ref. 351158) que tienen una membrana (0.3 cm²) de PET (*Polyethylene terephthalate*) con poros de 8 μm (densidad de poros: 1×10^5 poros/cm²). El formato de los insertos es de una placa con 24 *transwells* que se coloca encima de una placa de 24 pocillos. En los pocillos se añade BM (compartimiento inferior).
- Tras un periodo de extensión celular de 1h, las hASC se marcan con el marcador fluorescente vital CMFDA (Molecular Probes Ref. C-7025) que tinte el citoplasma de las células. El CMFDA se diluye en BM (1 μM) y se aplica a las hASC durante 30 min.
- Se elimina el CMFDA del compartimiento superior del *transwell* y se reemplaza por BM. Se preparan las isoformas de PDGF en BM a las concentraciones indicadas según el experimento y se añaden al compartimiento inferior (pocillos) durante 24 h. En algunos pocillos, se añade sólo BM (control negativo) y en otros pocillos se añade S-BM (control positivo). Todos los tratamientos se hacen por duplicado.
- Se fijan con una solución de 3% de paraformaldehído- D-PBS las células que habrán migrado de la cara apical de la membrana del *transwell* a la cara basal del *transwell*.
- Se corta la membrana del *transwell* y se coloca en un porta-objetos con 10 μl de medio de montaje (Mowiol) con la cara basal de las células migradas hacia arriba. Se coloca un cubre-objetos cuadrado encima.
- Se procede a la cuantificación de las células migradas en el LSC (*laser scanning citometer*).

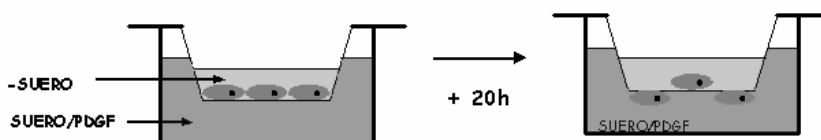


Figura 3.3. *Esquema del ensayo de trans migración.* Las hASC se siembran en la parte superior del *transwell* en medio sin suero (BM) y después de 1h, las células se marcan con el marcador fluorescente vital CMFDA. A continuación, se añaden las isoformas de PDGF o el medio completo con suero (S-BM) en la parte inferior del *transwell*. Las células migran a través de los poros de 8 μm hacia el compartimiento inferior en respuesta al estímulo producido por el factor de crecimiento quimioatrayente.

3.5.1.1 Concentración óptima de las isoformas de PDGF que inducen quimiotaxis en las hASMC

Las hASMC se incuban en presencia de concentraciones crecientes de las isoformas de PDGF (1, 10 y 100 ng/ml) en los pocillos (compartimiento inferior). A continuación se procede como se explica en el apartado 3.5.1.

3.5.1.2 Efecto de la Heparina en la migración de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF

Las hASMC se incuban con una concentración constante de las isoformas de PDGF (50 ng/ml) en presencia de heparina a las siguientes concentraciones: 100 $\mu\text{g/ml}$ y 1 mg/ml en los pocillos (compartimiento inferior). Paralelamente, pocillos control se incuban con las isoformas de PDGF en ausencia de heparina. Así mismo, pocillos control se incuban con las diferentes diluciones de heparina en ausencia de PDGF. Seguidamente, se continúa el protocolo del apartado 3.5.1.

3.5.2 **Laser Scanning Cytometer (LSC)**

Se utilizó un LSC adaptado a un microscopio Olympus (CompuCyte) para la cuantificación de las hASMC que habían migrado de la cara apical a la cara basal del *transwell* o inserto. Las membranas de los *transwells* fueron escaneadas utilizando un objetivo Olympus de 20x y la línea 488nm de un láser Argon (5 mW) para el CMFDA. También se registraron medidas de dispersión de luz (*scatter*). La platina se mueve en pasos de 0.5 μm en dirección x y el láser hace un rastreo de toda la membrana. Los datos adquiridos fueron analizados en el programa Wincyte v. 3.4. El LSC adquiere los datos de todas las partículas detectadas durante el rastreo con emisión de fluorescencia verde (530 /30 nm) y un área mínima de 20 μm^2 . Las células son seleccionadas (*threshold*) por software en un gráfico de fluorescencia respecto al área de la partícula con el fin de eliminar el debris detectado originado por restos celulares y otras partículas fluorescentes. Las células seleccionadas se confirmaron visualmente mediante una cámara CCD conectada al microscopio. La posibilidad de relocalización del aparato permite en todo momento comprobar la selección realizada y rechazar los falsos positivos.

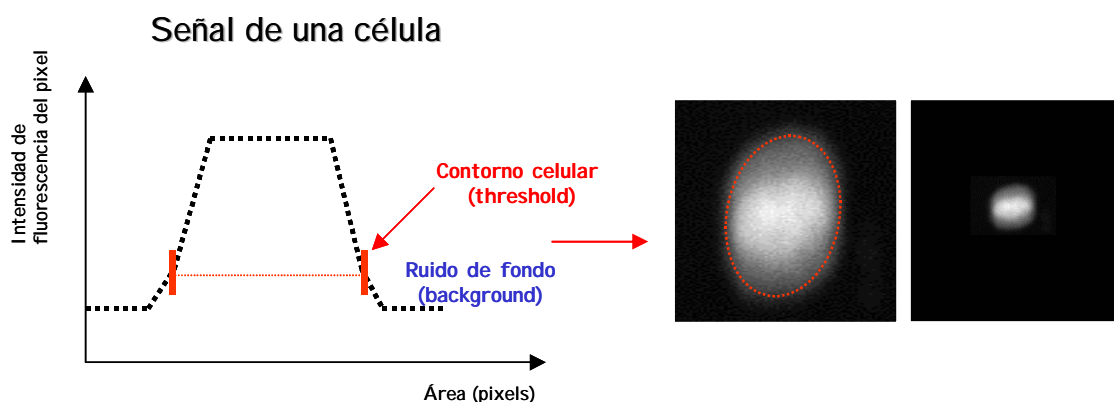


Figura 3.4 A. Las hASMC que habían migrado de la cara apical a la cara basal del *transwell* se segmentaron (*threshold*) para un determinado valor de intensidad de fluorescencia y de área (*pixels*).

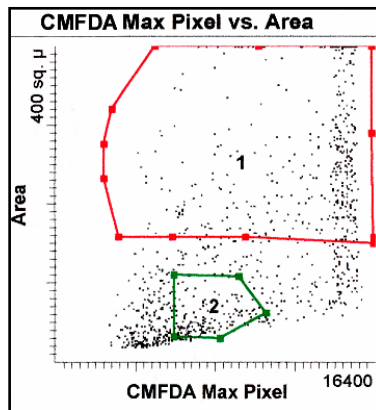


Figura 3.4 B. Se generaron regiones en los gráficos para contar el nº de células migradas que se definen por los valores de segmentación.

3.6 Quimiocinesis de las hASMC

Para estudiar la migración al azar de las hASMC inducida por los factores de crecimiento (isoformas de PDGF o factores de crecimiento presentes en el S-BM) se realizaron experimentos de “*time-lapse*” o tiempo retardado en el microscopio confocal y se analizó el movimiento inducido por estos factores sobre las hASMC.

3.6.1 **Sembrado de las hASMC**

- Las hASMC se tripsinizan y se resuspenden en BM. Se siembran en placas de 35 mm con fondo de vidrio (MatTek, Ref. P35G-1.5-14-C) a una densidad de 8000 células/cm². En algunos experimentos, las placas presentan un revestimiento o “*coating*” de colágeno-I (10 µg/ml).
- Tras 48h de extensión celular, las hASMC se marcan con el CMFDA (ver apartado 3.5.1) en BM (0.25 µM) durante 30 min. En los experimentos con las células sembradas en placas con colágeno-I, se reserva el medio de sembrado de las células para añadirle posteriormente los factores de crecimiento (isoformas de PDGF o FCS).
- Se extrae el CMFDA y se añaden las isoformas de PDGF a una concentración de 50 ng/ml en BM o en el medio reservado de las células sembradas en placas con colágeno-I. En el control negativo de estos experimentos, se añade BM sin ningún factor de crecimiento y en el control positivo, se añade S-BM o FCS (10%).

3.6.2 ***Time-lapse* CSLM (Confocal Scanning Laser Microscopy)**

Se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Leica Lasertechnik GmbH, Mannheim, Alemania) adaptado a un microscopio invertido Leitz DMIRBE con control de temperatura y CO₂ (Life Imaging Services). Se utilizó un objetivo Leitz Plan-Apocromático de 20x (N.A 0.7, imm) y la línea 488 nm de un láser Ar para la captación de la señal emitida por el CMFDA. El formato de las imágenes es de 512 x 512 *pixels* y la velocidad de “*scanning*” o rastreo es de 400 Hz. Se obtuvieron 6 secciones ópticas (*z-step*= 3.8 µm) de un campo que presentaba 15-20 células en intervalos de 10 min durante un período total de 21 horas.



Figura 3.5. Microscopio confocal Leica TCS SP2 adaptado al microscopio invertido Leitz DMIRBE con control de temperatura y CO₂ utilizado en los experimentos de *time-lapse* o tiempo retardado.

3.6.3 Análisis de la migración o “tracking”

- En el programa Leica TCS SP2 se aplica un Filtro Blur 2 a las imágenes y se obtiene la proyección máxima de las 6 secciones ópticas.
- En el programa Metamorph Image Analysis System v. 4.0 se segmentan las proyecciones máximas y se generan máscaras binarias de los valores de intensidad que representan el “background” o ruido de fondo de las proyecciones máximas. A las proyecciones máximas se le resta esta máscara binaria procedente de la segmentación.
- En el programa Metamorph Image Analysis System v. 4.0 se utiliza el método *Template Match* para obtener información del movimiento (posición en cada plano de cada célula, velocidad, distancia, velocidad angular, ángulo en cada movimiento, etc) para cada una de las células analizadas. Este método utiliza un algoritmo por el cual calcula para cada célula un centro de fluorescencia o centroide y se analiza la distancia de translocación de los centroides (para calcular la migración de cada célula) en intervalos de 10 min.