



IDIBAPS



LES METAL·LOPROTEINASES DE MATRIU EXTRACEL·LULAR EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL

Tesi doctoral presentada per

Sònia Solé i Tost

Barcelona, Maig del 2005

III PART

Mètodes

MÈTODES

A) IN VIVO:

A1. Tècniques de manipulació d'animals de laboratori:

La manipulació dels animals es va fer seguint en tot moment les normes de la legislació local, les directrius de la Comunitat Europea sobre l'experimentació amb animals i amb l'aprovació del Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona.

1.1 Animals:

Les rates (*ratus norvegicus*) emprades en els experiments van ser mascles, adults, de la soca Sprague-Dawley, de la casa Iffa-Credo (Lyon, França), entre 275-325g de pes.

Es va escollir aquesta soca perquè té menys variabilitat a nivell de l'anatomia cerebrovascular i tensió arterial que la soca Wistar, el que fa que les isquèmies siguin més reproduïbles. Tots els animals eren mascles per tal d'evitar les possibles variacions degudes a canvis hormonal en les femelles. El fet que siguin totes de pes similar també ajuda a produir infarts més homogenis.

Les condicions d'estabulació van ser: un cicle de 12 hores de llum i 12 hores de fosc, amb lliure accés a l'aigua i al menjar.



Figura 46: Fotografia d'una rata de la soca Sprague-Dawley, utilitzada en els experiments.

1.2 Tècnica d'isquèmia cerebral focal transitòria en la rata:

S'ha emprat una variant del mètode descrit per Karibe (Karibe i col., 1995), modificat en el nostre laboratori (Soriano i col., 1997) basat en l'oclusió mecànica intraluminal de l'ACM mitjançant un filament de niló amb l'extrem arrodonit.

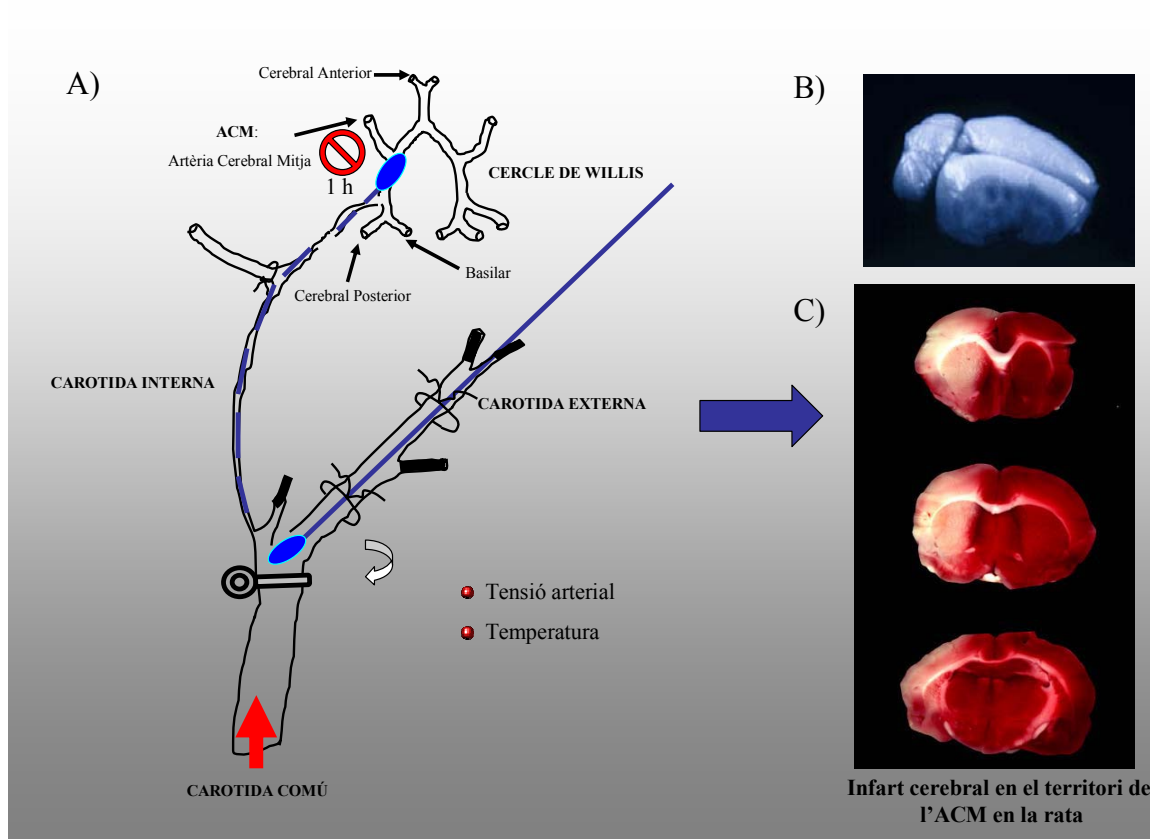


Figura 47: Dibuix que representa com l'oclusió de l'ACM amb el filament de niló provoca un infart en la rata.

A) Esquema de la tècnica **B)** Aspecte macroscòpic de l'infart cerebral (zona més fosca) produït en la rata. **C)** Tècnica del TTC, que mostra en blanc les zones infartades que presenten alteracions en la funció mitocondrial, les quals corresponen al territori de l'ACM.

Per realitzar aquesta tècnica s'ha de seguir els següents 8 passos:

1- Anestèsia de la rata i control de la temperatura:

S'anestesia la rata en una cambra d'inducció on es barreja halotà al 4% amb NO_2 i O_2 (70 i 30%, respectivament) durant aproximadament 2 minuts fins que la rata s'adorm. Un cop adormida la rata es col·loca sobre una manta tèrmica, en posició decúbit supí. Se li posa una màscara d'anestèsia per mantenir-la sedada mentre preparam la canul·lació

traqueal. Introduïm també una sonda rectal connectada a un sistema que permet registrar la temperatura i poder mantenir la rata al voltant dels 37° C modificant la intensitat de la calor produïda per la manta elèctrica.

2- Intubació de la tràquea:

Per mantenir l'animal amb respiració assistida es realitza una intubació oral. Primer es fa una incisió longitudinal entre el maxil·lar inferior i la caixa toràcica. Es separen les dues glàndules maxil·lars i es dissecciona longitudinalment el múscul esternohioïdal. Amb uns retractors separen els dos extrems del múscul esternohioïdal per mantenir la tràquea exposada. S'enretira la màscara d'anestèsia i s'introdueix una cànula a través de la boca fent una lleugera pressió ascendent i visualitzant el pas de la cànula a través de la tràquea (vigilant que no vagi cap a l'esòfag). Es connecta la cànula al sistema de ventilació i es disminueix la concentració d'halotà al 1-2%. Cal comprovar que la rata presenta una respiració sincronitzada amb el dispositiu de ventilació assistida.

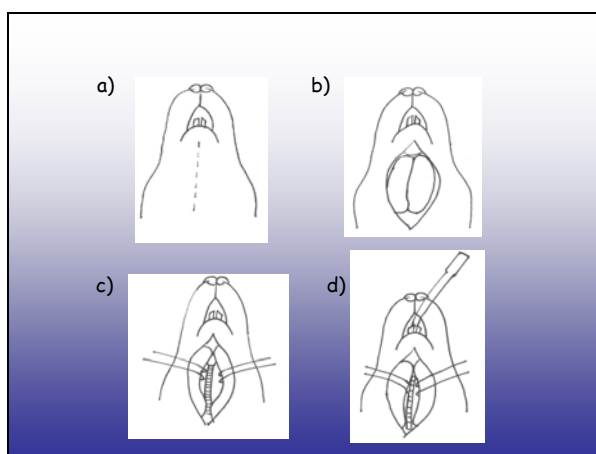


Figura 48: Esquema dels primers passos necessaris per intubar la rata.

3- Canulació de l'artèria femoral:

Es realitza la canulació de l'artèria femoral esquerra amb un catèter de polipropilè connectat a un sensor de pressió, que ens permet monitoritzar la pressió arterial sistèmica durant tota l'operació. A través d'aquesta via també es poden recollir mostres de sang arterial per controlar el pH i la pressió de gasos en sang.

4- Oclusió de l'artèria cerebral mitja (ACM):

Obrim el camp d'operació col·locant un retractor en el punt on es creuen els músculs esterno-mastoïdal i digàstric per enretirar-los cap a l'esquerra i un segon retractor separant la tràquea i el múscul esterno-hioïdal cap a la dreta.

Disseccionem la zona on es bifurca l'artèria caròtida comuna (ACC), l'artèria caròtida externa (ACE) i l'artèria caròtida interna (ACI), així com les branques laterals de l'ACE: l'artèria tiroïdal superior i l'artèria occipital. Electrocoagulem l'artèria tiroïdal superior i l'artèria occipital i les tallem.

Fem una lligadura de l'artèria pterigopalatina per la seva part més proximal amb un fil de seda, de manera que només queda oberta a la circulació la pròpia ACI. Per sota de la mandíbula trobem el punt on l'ACE es bifurca en l'artèria maxil·lar i lingual. Disseccionem i electrocoagulem aquestes artèries, després d'haver posat 2 clamatges: un en l'ACC just abans de bifurcar-se i un segon en l'ACE, el més proximal possible.

Per l'oclusió utilitzarem un monofilament de niló de 3/0 (Sutures Aragó) de 26mm. de llargada, l'extrem del qual arrodonim i engruixim amb un cauteritzador, de manera que quedi un diàmetre a la punta que dobli el diàmetre del monofilament. Li fem també una marca als 22mm, que és la distància fins on s'ha d'introduir.

Amb unes microtissores farem un tall en el punt on es bifurca l'ACE en maxil·lar i lingual. Per aquest orifici introduïm el monofilament de niló i l'asseguem amb un llaç perquè no se surti. Desclampem l'ACE. Fem avançar el filament fins a la bifurcació de l'ACC, aquí realitzem una rotació del filament per introduir-lo dins l'ACI i el fem lliscar fins notar una lleugera resistència que serà el punt on neix l'ACM. Comprovem que hem arribat just a la marca dels 22 mm, així ens assegurem que l'extrem del monofilament està exactament on neix l'ACM impedit la circulació de sang a partir d'aquest nivell.

Aleshores es lliga fort el nus de l'ACE perquè el filament no es mogui gens.

5- Clamatge de l'Artèria Cerebral Comú (ACC) contralateral:

Si el model d'isquèmia és transitori, després de l'oclusió de l'ACM amb el monofilament es col·loca un clamp en l'ACC contralateral. Es clampa l'ACC contralateral perquè s'ha vist que d'aquesta manera disminueix la variabilitat en els resultats (Oliff,1995 ; Soriano et al.,1997). Amb això aconseguim que l'aport sanguini provinent de la circulació col·lateral sigui mínim.

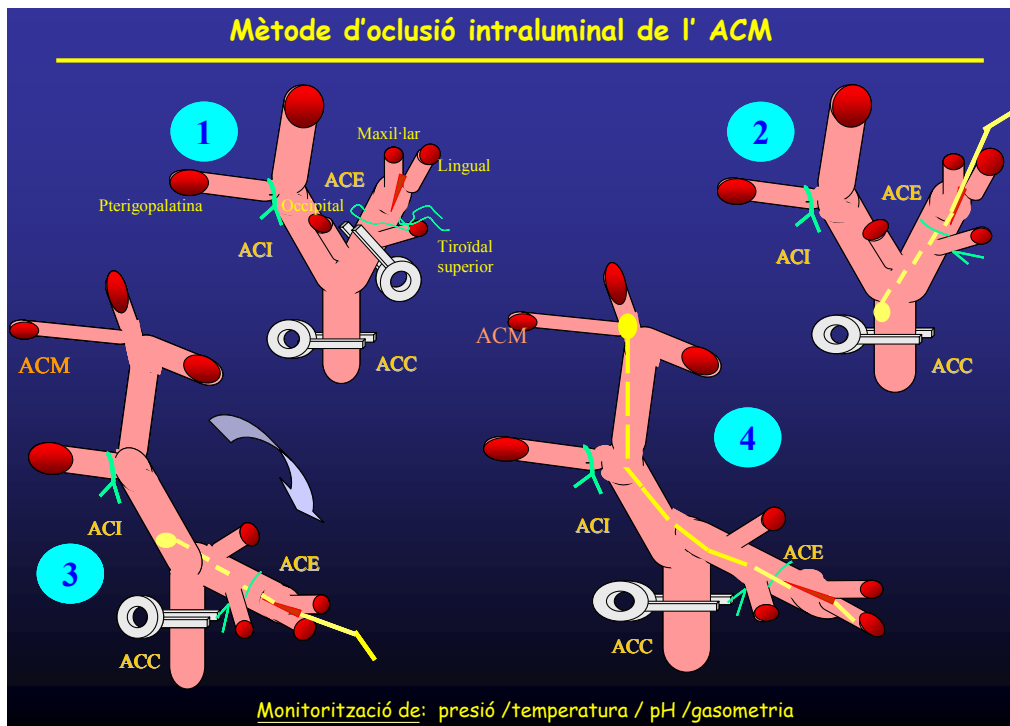


Figura 49: Esquema de la cirurgia necessària per realitzar l'oclusió de l'ACM on figura el nom de les principals artèries anomenades en el text. Els números indiquen l'ordre en que es fa cada pas.

6- Reperfusió del teixit:

Als 50 minuts es desclampa l'ACC contralateral. Deu minuts després (és a dir, quan fa una hora que hem fet l'oclusió de l'ACM) s'aflueix el nus de l'ACE i es retira molt suaument el filament de niló que oclueïa l'ACM, deixant sortir unes gotes de sang per garantir que hi hagi reperfusió i no quedi cap coàgul.

Es deixen 10 minuts entre desclampar l'ACC i desocluir l'ACM perquè la reperfusió no sigui massa sobtada, fet que incrementaria el risc d'hemorràgies.

Un cop fet això, la part del teixit cerebral corresponent al territori que irriga l'ACM es reperfundeix, ja que la sang ja no té impediments per arribar-hi.

7- Finalització de l'operació:

Suturem la ferida del coll i la de la femoral després d'haver retirat el catèter que registrava la pressió.

Aturem el sistema de respiració assistida i esperem que l'animal recuperi la seva pròpia respiració. Treiem les mucositats que l'animal pugui tenir a la tràquea amb una bomba de buit. Esperem que l'animal es recuperi abans de tornar-lo a la gàbia.

L'animal torna a la gàbia fins al moment de sacrificar-lo que dependrà de a quin temps volguem fer l'estudi: unes hores, uns dies, unes setmanes o uns mesos després de la isquèmia transitòria.

8- Observació:

Durant tota l'operació es monitoritza en tot moment : la pressió sanguínea, la temperatura , el pH i la presió de gasos ja que són factors que podrien influir en l'extensió de l'infart que es produirà posteriorment.

1.3 Microdiàlisis intracerebral en rata desperta

1.3.1 *Implantació de les sondes amb guia estereotàxica*

Les rates se sotmetien a microdiàlisi cerebral segons Adell i Artigas (1998), amb modificacions. El dia anterior a la isquèmia s'implantava a la rata la sonda de microdiàlisi. Primer, les rates s'anestesiaven amb una màscara amb halotà al 4% (Fluothane, Zeneca) en una barreja d'aire amb un 70% de N₂O i un 30% d'O₂. Es col·locaven en un aparell d'estereotàxia (Kopf Instruments) mantenint l'anestèsia de l'animal amb 1.5 - 2% d'halotà. Després d'una incisió en la línia mitja de la pell del crani, s'implantava una sonda de microdiàlisi (MAB2, Microbiotech, Estocolm, Suècia) a l'estriat dret a través d'un petit forat realitzat en el crani en les coordenades: 1.2 mm antero-posterior, 2.5 mm lateral i, 6 mm ventral del Bregma (segons l'atlas estereotàxic de Paxinos i Watson, 1986). Es va escollir aquesta sonda seguint les recomanacions del Dr. Albert Adell, expert en el tema, ja que les sondes varien en funció del pes molecular de la proteïna que interessa estudiar. La superfície activa de la membrana de diàlisi escollida pel mostreig de la zona diana tenia un diàmetre exterior de 0.6 mm i una llargada de 3 mm.

La sonda es fixava al crani amb dos cargols en miniatura i ciment dental. La ferida se suturava i a l'animal se li permetia recuperar-se durant 24 h. En la figura 50 es presenta una fotografia de la sonda de microdiàlisi utilitzada i un esquema detallant cadascun dels seus components.

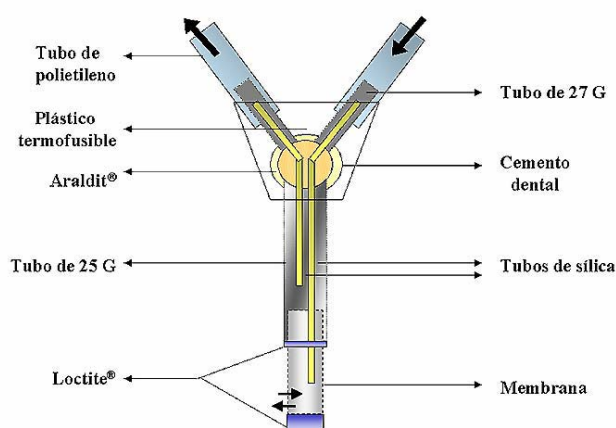


Figura 50: Esquema dels components d'una sonda de microdiàlisi i fotografia de la sonda de microdiàlisi MAB2, Microbiotech, Estocolm, Suècia, utilitzada en els experiments.

1.3.2 Obtenció de mostres per diàlisi

Després, es realitzava l'oclusió transitòria de l'artèria cerebral mitja (ACM) durant una hora en el mateix hemisferi en que s'havia implantat la sonda el dia abans. Es deixava a les rates que es recuperessin de l'anestèsia durant 30 minuts i es col·locaven en una gàbia de metacrilat especial per realitzar microdiàlisi en rates conscients (d'Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA, USA, gentilmente decidida pel Dr. Albert Adell). Aquesta gàbia tenia un sistema que pot girar amb el moviment de l'animal (ja que està connectat a aquest per un arnés) i que conté els tubs pels que passa el líquid de diàlisi, els quals es connecten a la sonda en el moment de començar a dialitzar. Aquest sistema permet realitzar la microdiàlisi en rates despertes que poden moures lliurement.

La microdiàlisi es feia bombant líquid cefaloraquidi artificial (LCR) de la següent composició (en mM): NaCl, 125 ; KCl, 2.5 ; MgCl₂, 1.18 ; CaCl₂, 1.26, que dona una solució amb un pH de 6.5. La infusió de LCR es va realitzar amb bombes de flux variable

conectades al tub d'entrada, el qual es conecta a l'entrada de la sonda de microdiàlisi. Durant el pas per la part activa de la membrana es produeix la diàlisi i la mostra obtinguda es recull en un vial de polietilè de 250 µl situat al final del tub de sortida.

Els primers 10 minuts de perfusió es realitzaven a un flux de 10 µl /min amb la finalitat de netejar els tubs i connexions d'impureses i establir un equilibri entre el LCR artificial i el teixit. A continuació el flux es reduïa a 1 µl /min i es procedia a recollir les mostres cada 10 minuts, obtenint-se volums de 10 µl / mostra.

En experiments preliminars, la perfusió i la recollida de les fraccions es feia de forma contínua durant aproximadament 10 h, però aquest procediment portava a un continu drenatge de la zona i no permetia veure l'acumulació significativa de MMPs en els dialitzats al llarg del temps.

En un grup de rates control, la microdiàlisi s'iniciava sense cap intervenció que no fos la implantació de la sonda el dia abans.

En les rates a les que es realitzava la isquèmia cerebral el rentat inicial de 10 minuts a 10 µl /min que es fa abans de recollir el dialitzat es feia als 30 minuts després de la isquèmia d'una hora amb reperfusió (a les 24 hores d'haver implantat la sonda) .

La microdiàlisi es feia llavors de forma discontinua en períodes de 40 minuts (en quatre fraccions de 10 min) en els temps següents: 0.5 h, 5.5 h, 10.5 h i 24 h després del rentat inicial de 10 min. Així, el primer dialitzat es prenia després d'1 h de reperfusió.

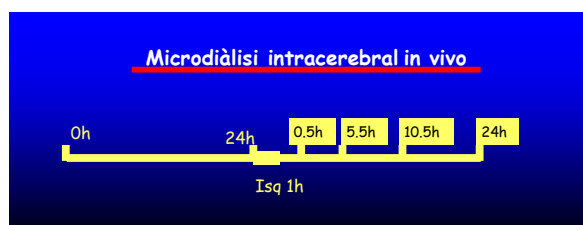


Figura 51: Time course de recollida de les fraccions de microdiàlisi

Després, certes rates sotmeses a microdiàlisi i els controls (rates no sotmeses a cap procediment quirúrgic) s'anestesiaven, es sacrificaven i se'n disseccionava el còrtex ipsilateral i contralateral. Els teixits i les mostres de microdiàlisi es congelaven immediatament en nitrogen líquid i es mantenien a -80°C fins al moment de l'anàlisi.

1.4 TRACTAMENTS:

1.4.1. INDUCCIÓ DE NEUTROPÈNIA EN RATES:

La inducció de la neutropènia en rates consisteix en eliminar els neutròfils circulants de la sang de la rata amb una droga.

S'administrava a les rates per via intravenosa sulfat de vinblastina (Sigma) diluïda en salí a una dosi de 0.5 mg/Kg pes de la rata el dia zero (Bateur-Parmentier et al., 2000), i 4 dies després s'indueïa la isquèmia amb reperfusió. Als controls negatius s'administrava salí.

Ja que desproveïr a les rates de neutròfils les fa vulnerables a agafar infeccions s'administrava el mateix dia que la droga o el salí els següents antibiòtics per via intramuscular: 150.000 U/Kg de benzatinabenzilpenicilina (Benzatizil, Antibiòtics Farma S.A.) i 10 mg /Kg de gentamicin (B. Braun S.A.).

Per comprovar que realment la droga elimina els neutròfils circulants s'extreïen mostres de sang arterial per fer recompte de neutròfils (Sysmex SE-9000) el dia de l'administració o dia zero i el dia 4 (abans de l'oclusió de l'ACM). També es portava un control del pes dels animals.

1.4.2. ADMINISTRACIÓ D'ANTICOSSOS ANTI-ICAM-1:

Ja que els neutròfils necessiten adherir-se a la proteïna endotelial ICAM-1 (entre d'altres) per poder infiltrar-se en el parènquima del cervell, vàrem bloquejar aquesta proteïna amb anticossos per intentar impedir així el pas dels neutròfils al teixit isquèmic.

Els anticossos utilitzats van ser: IgG1 de ratolí contra la proteïna ICAM-1 de la rata (1A29), i IgG1 de ratolí contra P-selectin (P23) humana (Al de et Ma., 1994), però no de rata (Panes et al, 1995; Sans et al., 1999) dels laboratoris farmacèutics Upjohn (Kalamazoo, MI, U.S.A.). El segon anticòs serveix com a control negatiu.

Els anticossos anti- ICAM-1 o anti-P-23 s' injectaven intraperitonealment (Sans et al., 1999) a una dosi de 2 mg/ kg durant l'oclusió de l'ACM 15 minuts abans de la reperfusió.

A2. Tècniques relacionades amb els neutròfils:

2.1 Aïllament dels neutròfils de la sang fresca de rata :

Aquesta tècnica dura unes dues hores.

- S'extreuen dos ml de sang a la rata per l'artèria femoral o per punció transcardíaca i es barregen 1800 µl de sang amb 200 µl de citrat (10 %) per evitar que es coaguli.

- Immediatament es posa la sang en una xeringa i s'afegeix el mateix volum de dextrà al 2% (Amersham) en solució salina. És important que sigui en solució salina perquè sino lisariem les cèl·lules sanguínies. Barregem suaument (sense agitar) i deixem reposar la xeringa verticalment 25 minuts a temperatura ambient .

- Es formen dues fraccions, en la part de baix han precipitat els hematies i en el sobrenadant estan la resta de cèl·lules sanguínies. Treiem el sobrenadant (1 ml) connectant una cànula de plàstic a l'extrem de la xeringa i empenyent la xeringa.

- Aquest sobrenadant (1 ml) s'afegeix a 0.5 ml de Ficoll (Biochrom KG, L6113, SeroMed) que ha de ser la meitat del volum del sobrenadant que afegim. Aquest pas s'ha de fer amb compte, molt a poc a poc i per les parets perquè no es barregin les fraccions.

- Llavors es centrifuga a 1000 g, durant 25 minuts a temperatura ambient. S'obtenen diverses fraccions: en la part superior queda el plasma, després els limfòcits, el ficoll i un pellet que conté els granulòcits .

- El pellet que conté els neutròfils es renta amb 2 ml de PBS i es centrifuga a 1.000 g, durant 10 minuts, a temperatura ambient. Per acabar d'eliminar alguns eritròcits contaminants que hagin pogut quedar, resuspenem el pellet en 2 ml de clorur d'amoni (NH₄ Cl) 0.15 M durant 10 minuts a 37 °C per tal de lisar els hematies. Centrifugem a 500 g, durant 7 minuts i rentem el pellet dues vegades amb PBS (igual que s'ha indicat abans). El pellet que conté els neutròfils es guarda congelat a -80°C fins a la seva utilització.

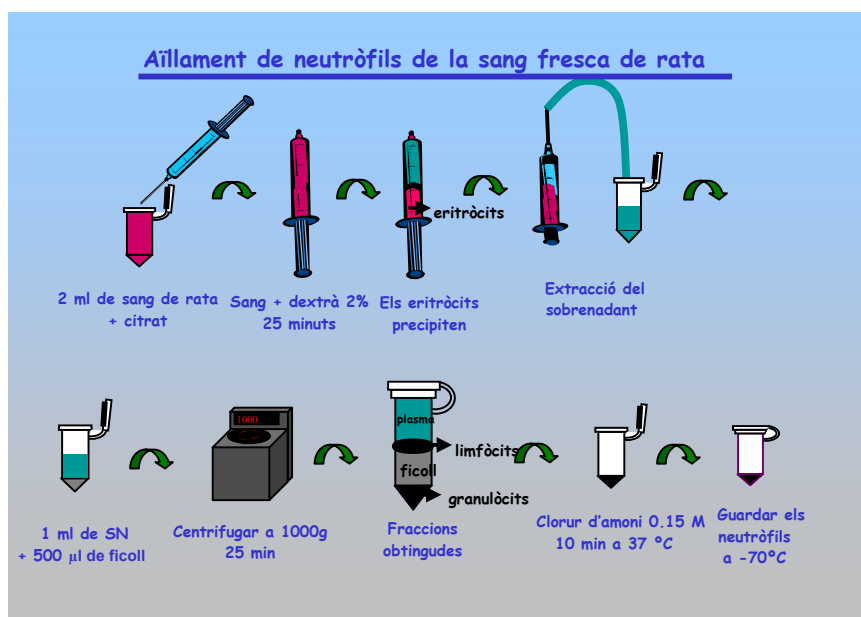


Figura 52: Esquema del mètode d'extracció de neutròfils de la sang fresca de rata.

2.2 Mesura de l'activitat mieloperoxidasa (MPO):

La MPO és un enzim present en els grànuls dels neutròfils polimorfonuclears (pot arribar a ser el 5% del pes de la cèl·lula) que es fa servir com a marcador de la presència d'aquestes cèl·lules en un teixit inflamat.

L'activitat mieloperoxidasa (MPO) es va determinar segons el mètode descrit en Bateau-Parmentier et al., 2000 i en Bradley et al., 1982. Les mostres de teixits congelades se pesen i s'homogeneïtzen (Politró PT3100) en 3 ml de 50 mM Tris-HCl pH 7.4 (a 10,000 rpm, 30 segons en gel). Un ml es barreja amb 5 ml de tampó fosfat (KH_2PO_4) 5 mM, pH 6 (a 4°C) i es centrifuga a 30.000 g, durant 30 minuts, a 4°C. El pellet es resuspen en 1 ml de tampó fosfat 50mM pH 6 amb un 0.5 % de bromur d'hexadeciltrimetilamoni (HTBA) a temperatura ambient.

La barreja es congela a -80 °C, es descongela a 37°C i es sonica durant 10 segons, aquest procediment es repeteix tres vegades. Les mostres es guarden en gel durant 20 minuts i es centrifuguen a 15.000 g durant 15 minuts. El sobrenadant es barreja amb dihidrocloridat d'o-dianisidina (Sigma) en tampó fosfat 50 mM pH 6 (concentració final de 0.167 mg/ml).

L'activitat de la MPO es determina amb un espectrofotòmetre a 460 nm (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech), a temperatura ambient, 3 minuts després de l'adició de H_2O_2 al 0.0005%. S'utilitza per a la calibració una corba estàndard amb MPO humana (Sigma). Els

resultats s'expressen com unitats de MPO per gram de teixit (U/gr teixit), entenent per una unitat de MPO la que degrada 1 mol de H_2O_2 / minut a 25°C.

MPO (U)	0	0.002	0.005	0.01	0.02	0.05
MPO (2U/ml)	0 σ l	1 σ l	2.5 σ l	5 σ l	10 σ l	25 σ l
o-dianisidina (2X)	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
PB 50 mM	0.5 ml	0.499	0.4975	0.495 ml	0.490	0.475
H_2O_2 0.12%	8.35 σ l	8.35 σ l	8.35 σ l	8.35 σ l	8.35 σ l	8.35 σ l

Taula 6. Corba patró de MPO:

Mostra	0.5 ml
o-dianisidina	0.5 ml
H_2O_2 0.12%	8.35 σ l

Taula 7. Lectura de les mostres.

Notes:

- La o-dianisidina (2X) està al límit de solubilitat. S'ha d'anar ràpid per tenir un tram de pendent recte per fer els càlculs.
- Hi ha altres substractes per substituir la o-dianisidina, com el TMB (tetrametilbenzidina), i la lectura es fa a una altra longitud d'ona.

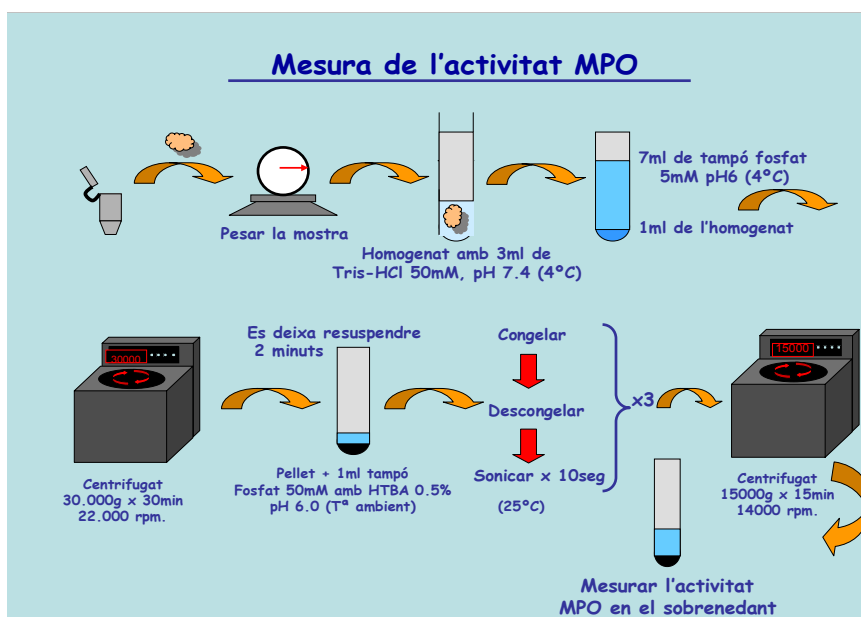


Figura 53: Esquema de la tècnica per mesurar l'activitat MPO d'un teixit.

A3. Tècniques d'Histologia:

3.1. Fixació del teixit

Per tal que el teixit conservi les seves propietats físico-químiques es fixa amb paraformaldehid al 4% dissolt en tampó fosfat 0.1M, pH 7.4.

Perfusió transcàrdíaca:

Es segueixen els següents passos:

- Anestesià l'animal en una campana amb halotà.
- Obrir la cavitat toràcica amb unes tisores.
- Canular el ventricle esquerre fins el punt on neix l'aorta.
- Connectar la cànula amb una bomba de perfusió a una velocitat de 5ml/min.
- Perfundir 50 ml de NaCl 0.9% heparinitzat per extreure la sang.
- Perfundir 200 ml de paraformaldehid al 4% en tampó fosfat 0.1 M pH 7.4 (100 ml /100 g de pes).
- Extracció del cervell.

Postfixació:

Un cop hem obtingut l'encèfal, si volem fer talls amb micròtom l'hem de submergir en la mateixa solució fixadora de PFA al 4%, durant 12 hores a 4°C. Si no l'hem d'incloure en parafina immediatament el guardarem en tampó fosfat 0.1 M pH 7.4 fins a una setmana. Si el volem guardar més temps caldrà deshidratar-lo fins al darrer alcohol de 70 %, llavors el podrem conservar indefinidament.

Solucions :Preparació del tampó fosfat sòdic 0.1 M:

- Solució A : Fosfat sòdic monobàsic (NaH_2PO_4) 0.2M

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.8 gr/ 1000 ml

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 31.2 gr/ 1000 ml

- Solució B: Fosfat sòdic dibàsic (Na_2HPO_4) 0.2M

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.6 gr/ 1000 ml

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.7 gr/ 1000 ml

- Preparació:

X ml de solució A + Y ml de solució B (segons taula 4) diluïts fins a 200 ml amb H_2O .

X	Y	pH
93,5	6,5	5,7
92,0	8,0	5,8
90,0	10,0	5,9
87,7	12,3	6,0
85,0	15,0	6,1
81,5	18,5	6,2
77,5	22,5	6,3
73,5	26,5	6,4
68,5	31,5	6,5
62,5	37,5	6,6
56,5	43,5	6,7
51,0	49,0	6,8

X	Y	pH
45,0	55,0	6,9
39,0	61,0	7,0
33,0	67,0	7,1
28,0	72,0	7,2
23,0	77,0	7,3
19,0	81,0	7,4
16,0	84,0	7,5
13,0	87,0	7,6
10,5	90,5	7,7
8,5	91,5	7,8
7,0	93,0	7,9
5,3	94,7	8,0

Taula 8. Relació entre volums X i Y amb el pH de la solució 0.2M final desitjada

3.2. Obtenció de talls amb criostat i amb micròtom :

* Obtenció de talls amb criostat:

Un cop extret el cervell es congela immediatament en isopentà a -40°C i es guarda a -20°C fins al seu procesament. Després es talla el cervell al criostat en seccions de $20\ \mu\text{m}$ que es col·loquen sobre portes gelatinats els quals es guarden a -20°C .

* Obtenció de talls amb micròtom:

Deshidratació i Inclusió en parafina:

- Tallar el cervell en seccions coronals de 2 mm de gruix amb l'ajut d'un motlle graduat
- Introduir les llesques en cassettes de plàstic.
- Rentar en un flux continu d'aigua de l'aixeta durant 30 minuts. És important que l'aigua contingui sals, ja que si es fes el rentat amb aigua destil·lada les cel·lules patirien un xoc osmòtic.
- Deshidratació en concentracions creixents d'alcohol. Actualment tot el procés de deshidratació es realitza de manera automàtica:
 - Etanol 70%, 2 x 30 minuts.
 - Etanol 96%, 2 x 30 minuts.
 - Etanol absolut, 2 x 30 minuts.
 - Xilol, 2 x 30 minuts.
- Bany de parafina a 58°C : Es fa un primer bany de 45 minuts i seguidament es fa un altre bany de 45 minuts fent el buit.
- Es fan els blocs amb ajut de motlles d'alumini. Quan es refreda es pot extreure el bloc, que ja està llest per fer talls amb el micròtom.

Tallar al micròtom:

- Després es tallen els blocs de parafina amb el micròtom amb un gruix de $5\ \mu\text{m}$, amb una ganiveta ben esmolada. Es dipositen en un bany d'aigua a $40-45^{\circ}\text{C}$ i es recullen en portaobjectes gelatinats. Finalment es deixen assecar durant 24 hores, com a mínim, per tal que quedin ben subjectes.

Preparació de portaobjectes gelatinats :

Emprats per talls de criostat i de parafina, aquest tractament permet incrementar l'adhesivitat del teixit als portes.

- Primer cal netejar i desengrasar bé els portes amb una solució d'àcid nítric al 20%. Es deixen un mínim d'1 hora . Després es renten amb aigua corrent, com a mínim 1 hora més. Finalment es fan un parell de rentats de 30 minuts amb H₂O d.
- Submergir-los en la solució de gelatina durant 5 minuts.

Solució de gelatina: Per preparar 300 ml cal disoldre en 300 ml de H₂O d, 1.95 g de gelatina (0.65%) calentant fins a 50°C i, un cop dissolta, afegir 150 mg de sulfat cròmic (0.05%).

- Deixar secar el portes verticalment.

3.3. Tinció d'hematoxilina:

Aquesta tinció s'utilitza en els contrastats de les tincions immunohistoquímiques, tenyeix els nuclis de les cèl·lules de color blau.

- H₂O destil·lada 5min.
- Hematoxilina (Sigma), prèviament filtrada. Temps aproximat: 1 minut.
- Aigua corrent per treure l'excés de colorant 2min.
- HCl 1%-etanol 96% fins que agafa un color ataronjat.
- Aigua amoniacal 0.1% fins viratge a blau
- Rentar en aigua corrent 2min.
- H₂O destil·lada 5min.
- Etanol 70° dipping
- Etanol 96° 2 x5min.
- Etanol absolut 2 x5min
- Xilol 3 x5min.
- Muntar en DPX (Fluka)

3.4. Immunohistoquímica i reaccions histoquímiques:

3.4.1. Immunohistoquímica per talls de parafina i de criostat:

Desparafinació : (Sols si són talls parafinats)

- Xilol, 3 x 5 min.
- Etanol Absolut, 3 x 5 min.
- Etanol 96%, 2 x 5 min.
- Etanol 70%, 5 min.
- H₂O, 5 min.
- PBS, 5 min.

Autoclavar els talls: (Si cal)

De vegades hi ha anticossos que sols reconeixen la forma desnaturalitzada de la proteïna i sols funcionen si prèviament s'aconsegueix això autoclavant els talls en tampó citrat 1/100 en PBS durant 20 minuts.

Bloqueig de les peroxidases endògenes:

- 1% H₂O- 30% Metanol- 70% PBS, 15 min.
- PBS, 3 x 5 min.

Tractament enzimàtic per permeabilitzar el teixit:

- Saponina 0.05%, 30 min.
- PBS, 2 x 5 min.
- Rentar amb PBS-tritó 0.5%, 3 x 5 minuts .

Bloqueig de les unions inespecífiques

Amb un 3% de sèrum diluït en PBS-0.2% Tritó X100 -0.2% gelatina. El sèrum depèn de l'anticòs secundari emprat. És habitual que els anticossos secundaris fets contra anticossos primaris monoclonals de ratolí estiguin ells mateixos fets en cavall, mentre que els anticossos secundaris contra els primaris policlonals de conill estiguin fets en cabra, per la qual cosa s'utilitza sèrum de cavall o de cabra, respectivament.

Incubació amb l'anticòs primari

Cada anticòs té una concentració òptima, que és aquella que ens donarà el màxim de senyal amb el mínim de fons (si la concentració d'anticòs és molt elevada pot haver unions inespecífiques). En funció de cada anticòs es calcula la dilució i es dilueix en una solució amb 1% del sèrum corresponent, PBS- 0.2% Tritó X100- 0.2% gelatina. Aquesta incubació es fa durant tota la nit a 4°C en una cambra humida.

Rentar amb PBS-tritó 0.2%. 3 x 5 minuts

Incubació amb l'anticòs secundari biotinitat

Es fan servir anticossos biotinitats: de cavall específic contra IgG de ratolí o de cabra específic contra IgG de conill, preabsorbits amb sèrum de rata, en una dilució 1:200, amb 1% de sèrum, en PBS-Tritó X100 0.2%- gelatina 0.2%. La incubació es fa durant 1 hora a temperatura ambient.

Rentar amb PBS-tritó 0.2%. 3 x 5 minuts

Incubació amb el complex Avidina-Biotina-Peroxidasa de rave (ABC):

S'incuba durant 1 hora a temperatura ambient amb la solució ABC (Vector, Vectastain). Aquesta solució s'ha de preparar 30 minuts abans d'utilitzar-se i es fa a partir dels compostos A i B del kit de Vector: 1:100 de solució A, 1:100 de solució B, en PBS -Tritó X100 0.2% - gelatina 0.2%.

Rentats amb PBS- Tritó X100, 3 x5 minuts.

Rentats amb PBS, 3 x5 minuts.

Revelat amb Diaminobenzidina(DAB):

Es sumergeix els talls en una solució de: 50 ml de PBS + 500 µl de Diaminobenzidina (Sigma) (1gr /40ml en H₂O_d, protegit de la llum) + 50 µl de H₂O₂ al 30%.El temps de revelat varia per a cada anticòs. S'ha de fer observacions al microscopi. La reacció s'atura amb PBS. S'ha d'anar amb compte ja que el DAB és cancerígen i s'ha d'inactivar amb lleugiu tot el que hagi contaminat.

Deshidratar i muntar amb DPX.

SOLUCIONS PER IMMUNOHISTOQUÍMICA:

PBS 0.1 M:

1.36 M NaCl
14.7 M KH₂PO₄
80 mM Na₂PO₄
26.8 nM KCl
en H₂O milliQ

3.4.2 Doble marcatge per immunohistoquímica.

Aquest mètode és una variació del mètode descrit per Levey (Levey i col., 1986). Breument, consisteix en fer dues immunotincions sencilles amb ABC en el mateix teixit però modificant el segon revelat. Aquest consisteix en emprar dihidroclorur de benzidina (0.01 %) en una solució amb nitroprussiat sòdic (0.025 %).

És molt important que la força iònica i del pH de la solució tampó emprada en el revelat sigui la adequada, per tal que el precipitat format adquirexi un aspecte granular i un color blau-verd. Per aquesta raó s'utilitza el tampó fosfat sòdic 0.01 M a pH 6 (veure taula per preparar fosfats en l'apartat de la fixació del teixit) enlloc de PBS.

Passos a seguir:

- Un cop s'ha revelat la primera immunotinció sencilla amb diaminobencidina, es renta amb PBS (5 rentats de 5 minuts).
- Si en la segona immunotinció sencilla s'utilitza un anticòs de diferent espècie que el primer, aleshores cal fer un segon bloqueig de les unions inespecífiques amb el sèrum adient (2 hores a temperatura ambient). No cal però, repetir el bloqueig de les peroxidases endògenes ni la permeabilització amb saponina.
- Es continua de la mateixa manera que s'ha descrit abans. Resumint: S'incuba amb l'anticòs primari tota la nit, després amb el secundari 1 hora, i amb el complex ABC una altra hora.
 - Rentats amb PBS-tritó X100 0.2%, 2 x 5 minuts.
 - Rentats amb PBS, 2 x 5 minuts.
 - Preincubació amb la solució de revelat (sense H₂O₂): tampó fosfat sòdic 0.01 M pH 6.0, durant 10 minuts.
 - Revelat amb *BDHC*: Es substitueix la solució anterior per una igual però amb H₂O₂ 0.005% (8 µl per cada 50 ml de solució de revelat).
 - S'aturar la reacció amb tampó fosfat sòdic 0.01 M pH 6.0., i es fan 3 rentats de 10 minuts.
- Deshidratar:
 - Etanol 70% 2 x 3 min.
 - Etanol 96% 2 x 3 min.
 - Etanol Absolut 2 x 3 min.
 - Xilol 2 x 5min.
- Montar en DPX.

SOLUCIONS:

Solució d'incubació i revelat amb dihidroclorur de benzidina (BDHC):

- S'ha de preparar 30 minuts abans d'utilitzar, intentant que no li toqui la llum.
 - Barrejar en la foscor durant 30 minuts: 10 mg de dihidroclorur de benzidina (BDHC) (Sigma) en 95 ml de H₂O de milliQ i filtrar.
 - Afegir 25 mg de nitroprussiat de sodi (Merck) i 5 ml de tampó fostat sòdic 0.2M pH 6.0, i agitar.
 - Dels 100 ml preparats, 50 ml són per la preincubació i els darrers 50 ml pel revelat.
- NOTA: S'ha d'anar amb compte amb el BDHC perquè és cancerígen. S'inactiva amb lligiu.

3.4.3 Marcatge de la microglia amb lectina de tomàquet biotinitalada:

La histoquímica de lectina marca la micròglia/macròfags del teixit. Es fa incubant la secció amb lectina de tomàquet (*Lycopersicon esculentum*) biotinitalada (Sigma), que s'uneix específicament a residus de poli-N-acetil lactosamina en cel·lules de la microglia ameboide i ramificada (Acarin i col., 1994). També detecta les cel·lules endotelials del cervell.

Els passos a seguir són els mateixos que en una immunohistoquímica senzilla, però no és necessari bloquejar les unions inespecífiques. Els talls s'incuben amb la lectina biotinitalada a una concentració de 2.5µl/ml de PBS-Tritó X100 0.2% - gelatina 0.2% durant tota la nit a 4°C. La resta de passos es fan com en el cas d'una immunohistoquímica senzilla.

Aquest marcatge pot combinar-se amb una immunotinció senzilla, utilitzant en un dels dos marcatges el revelat descrit en el protocol d'immunohistoquímica doble.

3.4.4 Marcatge de la substància blanca amb Luxol Fast Blue (Klüver Barrera):

Aquesta tinció tenyeix de color blau la mielina, un component de la substància blanca. Es sumergeixen les seccions en etanol al 95% i es tenyeixen amb una solució de Luxol Fast Blue al 0.1% en etanol al 95%, durant 2 hores a 60 °C. L'excés de colorant s'elimina fent un rentat amb etanol al 95%. S'esbandeixen les seccions amb aigua destil·lada i es diferencia la tinció per immersió en una solució de carbonat de liti al 0.05% durant 30 segons. Es continua la diferenciació en alcohol etílic al 70% i quan la

diferenciació està completa es poden distingir visualment la substància grisa de la blanca. Llavors, es fa un rentat amb aigua destil·lada, es deshidraten les seccions i es munten les preparacions.

B) IN VITRO:

B1. CULTIU DE LÍNIES CEL·LULARS DE NEUROBLASTOMA

1.1 Material:

Línia cel·lular de neuroblastoma SH-SY5Y

Aquesta línia de neuroblastoma humà (ECACC, European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire, U.K.) és una sublínia originada a partir de la línia de neuroepitelioma SK-N-SH, establerta el 1970 a partir d'una biòpsia de moll de l'os d'una nena de 4 anys amb neuroblastoma metastàtic (Biedler *et al.*, 1973). Les SH-SY5Y expressen un fenotip neuronal adrenèrgic (tirosina hidroxilasa, dopamina η -hidroxilasa) (Pahlman *et al.*, 1990).

Medis de cultiu

Fem créixer les cèl·lules SH-SY5Y en una barreja de medis MEM i Ham's F12 (1:1), suplementada amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS), 2 mM glutamina, un 1% d'aminoàcids no essencials i 50 μ g/ml de gentamicina.

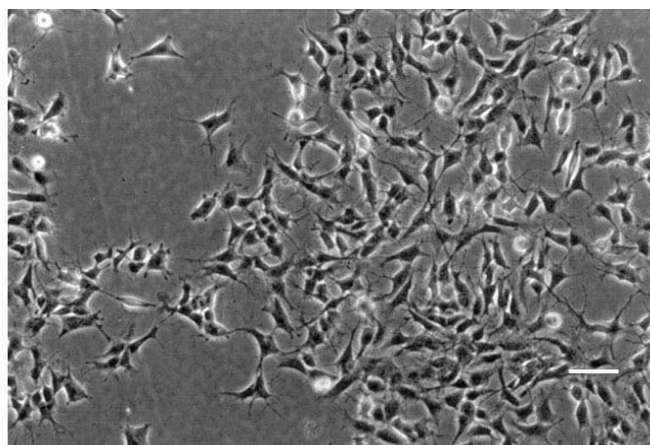


Figura 54: Fotografia amb un microscopi de contrast de fase d'un cultiu de la línia cel·lular de neuroblastoma SH-SY5Y.

1.2 Descongelació de línies cel·lulars

- S'agafa un criotub de cèl·lules del contenidor de N₂ líquid i es deixa a temperatura ambient durant 1 minut.
- Es submergeix el vial parcialment (sense arribar a la rosca) en un bany a 37°C durant 1-2 minuts fins que el contingut està descongelat. És important procedir molt ràpid i respectar aquests temps.
- Es transfereix el contingut del criotub a un tub de cultiu que conté 20 ml de medi prèviament atemperat a 37°C. (Així queda menys del 0.5% de DMSO, que a dosis superiors és tòxic per les cèl·lules).
- S'homogeneïtza suaument amb una pipeta de 10 ml.
- Sembrem la suspensió cel·lular en dues plaques de cultiu de 10 cm i les deixem créixer dins d'una incubadora de cultius a 37 °C, amb un 5% de CO₂, en una atmosfera humidificada.

1.3 Subcultiu de línies cel·lulars

- S'elimina el medi de les plaques de cultiu xuclant al buit. S'afegeix PBS per fer un rentat i es torna a xuclar.
- S'afegeix PBS + 0.02% EDTA + tripsina 25 µg/ml. Es deixa uns 2 minuts fins que observem que les cèl·lules es desprenen.
- Es recullen les cèl·lules amb una pipeta Pasteur i es transfereixen a un tub on s'afegeix sèrum de cavall (10%) per inactivar la tripsina.
- Es centrifuga 5 minuts a 900 rpm.
- Es descarta el sobrenadant i s'afegeixen 2 ml de medi de cultiu. Es disgrega el pellet amb una pipeta Pasteur i a continuació s'afegeix més medi.
- Es compta, si cal, la concentració de cèl·lules d'una petita alíquota i s'ajusta el volum total a la densitat desitjada.
- Es sembra la suspensió cel·lular en les plaques de cultiu corresponents.

1.4 Congelació de línies cel·lulars

- Realitzem els quatre primers passos igual que en el subcultiu.
- Es descarta el sobrenadant i es resuspèn el pellet en FBS.
- Es compta, si és necessari, la concentració de cèl·lules d'una petita alíquota i s'ajusta el volum total a la densitat desitjada.

- En cada criotub afegim 900 μ l de la suspensió cel·lular en FBS. A continuació es posen 100 μ l de dimetilsulfòxid (DMSO); s'inverteix el criotub per agitar suaument.
- La congelació ha de ser gradual (aproximadament 1°C/minut). Es guarden els criotubs protegits en contenidors de Porexpan i es posen en un congelador a -80°C. Al dia següent els criotubs ja poden ser transferits al contenidor de nitrogen líquid.

B2. CULTIUS PRIMARIS:

2.1. Cultius enriquits en neurones:

Els cultius cel·lulars es preparen a partir d'embrions de rata Sprague-Dawley (IFA-CREDO, Lyon, França) de 18 dies que s'extreuen de l'úter de la mare (en l'estadi E18 del desenvolupament embrionari):

- Es dissectionen els córtexs sobre gel i es treuen les meninges
- Es dissocien les cèl·lules en 5ml de tripsina al 0.05% i 0.53mM d'EDTA durant 15 min a 37°.
- Es ressuspenen les cèl·lules en Minimum Essential Medium (MEM) suplementat amb sèrum de fetus de bou al 10% i 100 μ g/ml gentamicina.
 - Les cèl·lules es sembren en plaques de 24 pous (Nunc, Roskilde, Dinamarca) pretractades amb poly-L-lisina (5 μ g/ml) a una densitat de 3680 cèl·lules/mm².
 - Afegim citosina arabinosa (ARA-C), per tal d'aturar la proliferació de les cèl·lules glials i enriquir el cultiu en neurones. En el dia 4 de cultiu in vitro (DIV), s'afegeixen només 6 μ M de citosina arabinosa (ARA-C) i en els dia 7 i 10 DIV s'afegeixen 3 μ M de citosina arabinosa (ARA-C) juntament amb MEM-B27 nou.

2.2. Cultius glials enriquits en astròcits:

Es preparen a partir del còrtex cerebral de rates Sprague-Dawley en l'estadi P1-P2 postnatal tal i com es descriu en (Fauconneau B et al, 2002), amb modificacions lleugeres.

- Es dissectionen i es trossegueu amb unes tissores 10 còrtex cerebrals de 10 rates (P1-P2) en una placa de petri de 6 cm en gel, amb 3 ml (com a màxim) de medi DMEM.
- S'homogenitza la mescla en un falcon de 15 ml amb una pipeta de 10 ml, unes 10 vegades. Es repeteix l'homogeneïtzació amb una pipeta Pasteur, 20 vegades, fins a l'obtenció d'un líquid homogeni.

- Es filtra la suspensió amb un filtre de 70 μm en un falcon de 50 ml (vigilant de no apretar massa, agafant el filtre per la pestanya i afegint la suspensió amb una pipeta Pasteur), anem aclarint el filtre amb medi de cultiu.
- Dissociem amb una xeringa de 10ml i l'agulla. Recollim la suspensió cel·lular en un tub de centrífuga.
- Centrifuguem 5 minuts, a 1000 rpm, a temperatura ambient.
- Descartem el sobrenadant i resuspenem el pellet en medi DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco-BRL, Invitrogen, Paisley, l'UK) complementat amb un 20% de sèrum boví fetal (FBS) (Gibco-BRL), i un 0.4 % de penicil·lina/streptomicina ho homogeneïtzem tot bé i contem el nombre de cèl·lules col·locant uns 10 μL en la Cambra de Neubauer. Normalment per cada 10 animals el volum final de medi que s'ha d'afegir és de 110 ml per tal d'obtenir uns 20 flascons de 25 cm^2 (5 ml de medi per flascó).
- Sembrem el cultiu en flascons i posem el cultiu a l'incubador (37°C i 5% de CO_2).
- Canviem el medi de cultiu cada 2 o 3 dies (2 cops per setmana).
- Després d'una setmana, les ampolles es sacsegen a 200 rpm durant 2 hores per desplaçar la microglia. El medi es treu i es canvia per medi fresc que conté un 10% de FBS. Després, fins a la confluència, el medi de cultiu s'utilitza amb una concentració de 7% de FBS.

2.3. Cultius Microglics :

Es preparaven a partir de cultius glics primaris de rata de 7-8 DIV sacsejant les cèl·lules durant 2 hores a 200 rpm a 37°C, tapant la boca dels flascons amb parafilm per tal que la concentració de CO_2 es mantingui a l'interior del flascó.

Els astròcits queden agafats al flascó mentre que la microglia (cèl·lules molt brillants) queda flotant en el medi condicionat. S'extreu aquest medi i es centrifuga a 1200 rpm, durant 7 minuts, a temperatura ambient. Es treu el medi condicionat, però no es tira, sinó que s'utilitza per subcultivar la microglia a una concentració de 5×10^4 cèl·lules/ml. Aquest medi conté un 7% de FBS.

2.4 Cultius d'oligodendròcits:

Els cultius d'oligodendròcits de cervell de rates van ser proporcionats pel Dr. Eduardo Molina-Holgado i es van realitzar com es descriu en Molina-Holgado et al., 2003.

Els progenitors d'oligodendròcits es desenvolupen en cultiu durant 3 dies en medi lliure de sèrum amb: 2.5 ng / ml de factor de creixement de fibroblasts bàsic (b-FGF) i el factor de creixement derivat de les plaquetes recombinant humà α (PDGF- α) (PreproTech Inc, Rocky Hill , NJ, USA), els quals contribueixen a expandir el nombre de cèl·lules alhora que eviten la seva diferenciació, mantenint una població de cèl·lules bipolars homogènies.

Els oligodendròcits madurs s'obtenien cultivant les cèl·lules durant 10 dies en el mateix medi , complementat amb sèrum de vedell al 3% (Gibco-BRL). Aquestes cèl·lules adquirien una morfologia complexa amb processos ramificats.

B3. MÉTODES REALITZATS EN ELS CULTIUS CEL·LULARS:

3.1 Tractaments amb inhibidors de metal·loproteases

Les cèl·lules se sembraven a la densitat de $3-4 \times 10^3$ cèl·lules/cm² en plaques de 96 pous i es deixaven créixer dos dies, passats els quals (temps 0) afegíem al cultiu els inhibidors o el vehicle (DMSO).

Es van utilitzar dos inhibidors de la MMP-9: l'inhibidor A (MMP-2/MMP-9 Inhibitor II #444249, Calbiochem, Darmstadt, Alemanya) i l'inhibidor B (MMP-9/MMP-13 Inhibitor I #444252, Calbiochem) a diferents concentracions per estudiar les corbes de dosi-resposta .

Les dosis utilitzades van ser: de 5-30 μ M per l'inhibidor A, i de 1-35 μ M per l'inhibidor B, aquestes dosis es preparaven en dimetilsulfòxid (DMSO) que estava en el pou a una concentració final d' un 0.5%.

Dos o tres dies després de la incubació en presència o absència dels inhibidors es feien els estudis de creixement i viabilitat cel·lular.

Alguns experiments es van realitzar afegint 10 ng/ml de TGF- α recombinant humà (Calbiochem) dissolt en àcid acètic 10 mM en PBS (per tal de tenir un pH neutre) dos dies després de sembrar les cèl·lules, amb o sense inhibidor (però amb vehicle) i els estudis es realitzaven 2 o 3 dies després. En alguns experiments l'activitat de les tirosin-quinases del EGFR s'inhibien amb 10 mM de 4,5-dianilinophthalimide (DAPH) (RBI, Kcln, Alemanya).

3.2 Immunocitoquímica:

Es van realitzar estudis d' immunocitoquímica sobre cèl·lules de la línia cel·lular de neuroblastoma SHSY5Y i en fibroblasts de ratolí cedits pel Dr Joan Serratosa.

Es va fer una triple tinció : una immunotinció doble en verd per la MMP-9 (de dues cases comercials diferents) i en vermell per la β -tubulina i en blau la tinció amb bisbenzimidida per l'ADN.

Cal tenir en compte que si al primer anticòs li hem posat un secundari amb fluorescència verda, al segon anticòs li haurem de posar un secundari amb fluorescència vermella.

Per fer aquesta tècnica les cèl·lules es van sembrar en cambres de plàstic de 8 pous (Nunc, Dinamarca).

* Els anticossos primaris utilitzats van ser:

- Anticossos monoclonals de ratolí contra la MMP-9 (MAB 13421 de Chemicon International, Inc., Pacisa-Giralt, Barcelona, Espanya; o AB-10 d'Oncogen) en una dilució 1:50, i
- Anticossos policlonals contra β -tubulina (Boehringer Mannheim, Alemanya) en una dilució 1:50.

* Els anticossos secundaris utilitzats van ser:

- Antiratolí 1:200 fet en ase (Jackson Immunoresearch, Pennsylvania, USA) unit a cianina fluorescent vermella (Cy3TM) .
- Antiratolí 1:1000 fet en cabra unit a FITC fluorescent verd (Molecular Probes, Leiden, Els Països Baixos) .
- Anticonill: 1:200 fet en cabra (Sigma, Alcobendas, Madrid, Espanya) unit a TRIC de fluorescència vermella.

* Es van seguir els passos següents:

- Fixació del cultiu:

Els cultius es renten amb PBS i es fixen amb metanol fred (-20°C) durant 10 minuts.

- Rentats amb PBS (3 x 5 minuts)

- Bloqueig de les unions inespecífiques:

Incubar durant 1 hora a temperatura ambient amb la solució de blocatge que conté un 15% de sèrum de cabra o d'ase en PBS. Segons en quin animal estigui fet l'anticòs secundari.

- Incubació amb l'anticòs primari:

La incubació es feia tota la nit a 4 °C en PBS en presència d'un 3 % de sèrum de cabra o d'ase.

- Rentar amb PBS: 3 x 5 minuts

- Incubació amb l'anticòs secundari:

L'anticòs secundari s'incubava 1 hora a temperatura ambient en PBS en presència d'un 1% del sèrum corresponent (d'ase o cabra).

- Rentar amb PBS: 3 x 5 minuts

- Observació de la tinció al microscopi de fluorescència sota la llum adequada.

- Bloqueig de les unions inespecífiques (si cal) pel segon anticòs

- Tinció amb el segon anticòs primari

- Rentats amb PBS: 3 x 5 minuts

- Tinció amb el segon anticòs secundari

- Rentats amb PBS: 3 x 5 minuts

- Observació de la tinció al microscopi de fluorescència sota la llum adequada.

- Tinció de l'ADN amb bisbenzimidida (Hoechst): Es descriu més a baix.

- Rentats amb PBS: 3 x 5 minuts

- Muntar les preparacions amb Mowiol (Calbiochem).

- Examinar les preparacions al microscopi :

La tinció de color triple (Cy3TM-vermella, FITC-verda, i UV-blava) s'examinava en el microscopi confocal (SP2, Leica) del Parc científic que es l'únic proveït amb làser per llum d' excitació d'UV.

3.3 Tinció nuclear amb bisbenzimidida (Hoechst)

Aquesta tinció tenyeix l'ADN i permet veure els nuclis de les cèl·lules, podent-se observar fins i tot l'ADN condensat de les cèl·lules en divisió (les quals es poden distingir clarament de la resta).

És una tinció molt fàcil i que dóna molt bon resultat. Consisteix a afegir a les cèl·lules prèviament fixades amb metanol, 5mg/mL de bisbenzimidida (Hoechst 33258, Sigma) en PBS durant 20 minuts. Passat aquest temps es fa un rentat amb PBS i s'observen les

preparacions en un microscopi invertit de fluorescència (Olympus IX50/IX70) sota llum ultraviolada. L'ADN es veu de color blau.

Es va fer servir aquesta tinció sobre dobles immunocitoquímiques amb fluorescència vermella i verda, obtenint-se una tercera tinció blava.

3.4 Assajos de creixement cel·lular i citotoxicitat:

* MTT:

El mètode del MTT per mesurar la citotoxicitat i el creixement cel·lular desenvolupat per Mosmann (1983) es realitza seguint les modificacions de Hansen *et al.* (1989).

Aquest mètode es basa en el fet que les cèl·lules viables i metabòlicament actives redueixen la sal de tetrazoli (MTT), que és incolora, donant lloc a cristalls de formazan, de color blau fosc i insolubles en aigua. La formació de formazan té lloc bàsicament en les mitocòndries intactes, encara que també trobem certa activitat reductora al citoplasma.

Protocol:

- 2 hores abans del final de l'experiment, s'afegeix la solució de MTT (a una concentració final de 0.5 mg/ml) a les plaques de 96 pous (10 μ l per pou) i es retornen a l'incubador durant 2 hores.
- Per finalitzar la incubació, s'afegeix la solució d'extracció (100 μ l per pou). Llavors s'emboliquen les plaques amb Parafilm per evitar l'evaporació i s'incuben tota la nit a 37°C.
- La densitat òptica (DO) es mesura a 570 nm (longitud d'ona de referència 630 nm), emprant la solució d'extracció com a blanc, en un lector de plaques (iEMS Reader MF, Labsystems, Helsinki, Finlàndia).
- Els resultats es calculen de la següent manera: percentatge de reducció de MTT = $\frac{(DO - DO_0)}{(DO_c - DO_0)} \times 100$, on DO_c és la mitjana dels pous control i DO_0 la mitjana dels pous control sense MTT afegit per cada placa.

Solucions:

MTT:

El MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazoli bromidi) es dissol a una concentració de 5 mg/ml en PBS, s'esterilitza per filtració i es guarda (un mes com a màxim) a 4°C, protegit de la llum.

Solució d'extracció:

Es prepara una solució d'extracció per lisar les cèl·lules i dissoldre els cristalls de formazan. Es dissol un 20% de sodi dodecil sulfat (SDS) en una solució de N,N-dimetil formamida/aigua (1:1), ajustant el pH fins a 4.7.

***BLAU DE TRIPÀ:**

Aquest mètode permet fer un recompte del nombre de cèl·lules (per tant podem veure el creixement) i comprovar-ne la viabilitat . Els cultius estaven sembrats en plaques de 12 pous, alguns s'havien tractat amb inhibidors de MMP i altres amb el vehicle (0.5% de DMSO).

Es van seguir els passos següents:

- Recollir el medi dels pous una pipeta i col·locar-lo en un falcon de 15mL (cal numerar els falcons correctament, cada falcon correspon a un pou de la placa).
- Rentar cada pou amb 1ml de PBS 1x estèril, i tornar a recollir aquest PBS per endur-nos les cèl·lules que es trobin en suspensió dins el pou.
- Afegir 1ml de PBS amb 0.05% de Tripsina i 0.2 mM d'EDTA a cada pou. Incubem a 37°C fins que les cèl·lules es desenganxin, 5 minuts aproximadament (anar comprovant si perden l'adherència sota el microscopi).
- Afegir 1ml de sèrum FBS al 5% a cada pou per neutralitzar la tripsina .
- Recuperar els 2ml de cada pou amb la pipeta i afegir-los al falcon corresponent.
- Centrifugar 5 minuts a 1000 rpm a temperatura ambient.
- Descartar el sobrenadant i resuspendre el pellet en 100σL de PBS 1x a temperatura ambient. Homogeneïtzar la suspensió cel·lular amb una pipeta unes 10 vegades.
- En un eppendorf barrejar 50σL de la suspensió cel·lular amb PBS + 50σL de Blau de Tripà (filtrat, està al 0.4% (pes/volum)). Pipetejar 4 vegades per mesclar bé.
- Incubar en l'eppendorf durant 2 minuts a temperatura ambient.
- Contar les cèl·lules vives i les mortes (de color blau degut a que el colorant ha traspasat la membrana cel·lular) en un hemocitòmetre .Contar el quadrant central (25 quadrets) i si el número de cèl·lules totals en aquest quadrant és inferior a 100, contar per cada mostra els 4 quadrants de 16 quadrets.

*** IODUR DE PROPIDI (IP):**

La tinció de IP s'utilitza per identificar la presència de cèl·lules mortes en cultius frescos (no fixats). El IP entra a les cèl·lules que tenen la membrana danyada i augmenta molt significativament la seva fluorescència en fixar-se als àcids nucleics. Per tant, el nucli de les cèl·lules danyades queda tenyit amb fluorescència vermella.

El IP s'afegia al medi dels cultius a una concentració final de 10 μ M i era incubat durant 30 minuts, a 37°C, protegit de la llum. Després de 2 rentats amb PBS a 37°C, les cèl·lules eren fixades amb paraformaldehid al 4% a 4°C i rentades amb PBS. Amb un microscopi de fluorescència invertit (Olympus IX50/IX70), es va contar les cèl·lules IP positives en 8 camps per pou i finalment es calculà la suma de les 8 mesures.

3.5 Anàlisi per citometria de flux de :

3.5.1. La quantitat de MMP-9 en les diferents fases del cicle cel·lular:

El contingut de MMP-9 al llarg del cicle cel·lular era analitzat marcant la MMP-9 de les cèl·lules amb anticòs anti-MMP-9, com si fos una immunocitoquímica però amb les cèl·lules en flotació.

Les cèl·lules eren recollides per tripsinització suau (tripsina al 0.01% en PBS amb 0.02% d'EDTA), es rentaven amb PBS i se resuspenien en 0.5 ml de PBS.

Es fixaven amb metanol a -20°C que s'afegia gota a gota fins a un volum de 5 ml. Després de 4 h de fixació, les cèl·lules eren permeabilitzades amb PBS amb un 2.5% de Tritó X-100 durant 5 minuts.

Llavors, es preincubaven durant 1 hora en PBS amb un 1% de BSA, i s'incubaven tota la nit a 4°C en un rodet giratori, amb un anticòs monoclonal de ratolí contra MMP-9 (MAB 13421, Chemicon International, Inc.), a una concentració 1:50 en PBS amb un 1% de BSA.

Les cèl·lules es rentaven dues vegades amb PBS i s'incubaven amb el d'anticòs secundari unit a FITC (1: 100) , de fluorescència verda , durant 1 hora.

Es tornaven a rentar dues vegades amb PBS i es portaven al Parc científic per fer l'anàlisi per citometria de flux.

L'ADN de les cèl·lules es tenyia durant 30 minuts amb 25 mg/ml de iodur de propidi en PBS amb un 0.1% de Tritó X-100 i 0.2 mg/ml de RNAsa (cal eliminar el RNA perquè podria interferir en l'experiment) just abans de fer les mesures amb el citòmetre de flux.

El citòmetre de flux quantificava de forma simultània la fluorescència verda i vermella, permetent relacionar la intensitat de la MMP-9 marcada amb FITC en relació a les diferents fases del cicle cel·lular (marcades pel IP).

3.5.2. L'efecte dels inhibidors de les MMPs en el cicle cel·lular:

Les cèl·lules de neuroblastoma SHSY5Y cultivades en plaques de 12 pous eren exposades a dos tipus d'inhibidors de les MMPs a diferents concentracions (com s'ha descrit abans). Es va estudiar si aquests inhibidors tenien algun efecte en el cicle cel·lular durant un temps que anava d'1 a 3 dies d'exposició a l'inhibidor.

El cicle cel·lular era estudiat mesurant el contingut d' ADN de les cèl·lules després d'incubar cèl·lules fresques amb un 0.1% Tritó X-100, 0.2 mg/ml RNAasa i 25 mg/ml de iodur de propidi (IP) 30 minuts abans de realitzar la citometria de flux amb el citòmetre de flux del Parc científic: Epics XL (Coulter Corporation, Hialeah, Florida).

El citòmetre analitza la fluorescència vermella del IP i amb el programa Multicycle (Sistemes de Flux de Phoenix, San Diego, CA) elabora uns histogrames on apareixen el percentatge de cèl·lules que estan en cada fase del cicle cel·lular segons el seu diferent contingut en ADN.

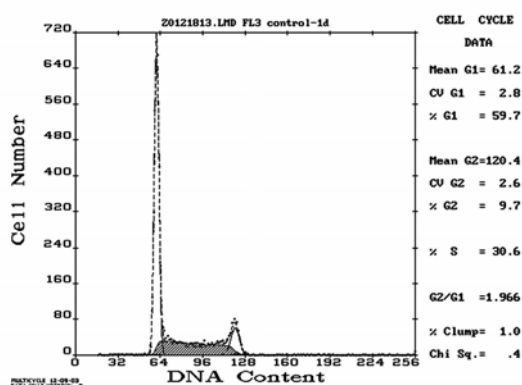


Figura 55 : Aspecte d'un histograma de les diferents etapes del cicle cel·lular estudiades per citometria de flux

C) TÈCNIQUES PER ESTUDIAR L'EXPRESSIÓ I L'ACTIVITAT DE LES MMPs I PROTEÏNES RELACIONADES :

C1. TÈCNIQUES RELACIONADES AMB EL WESTERN BLOT

Aquesta tècnica s'ha utilitzat amb l'objectiu de determinar quantitativament, mitjançant la utilització d'anticossos selectius, l'expressió de diferents proteïnes implicades en les vies de transducció de senyals estudiades.

1.1 Homogenització del teixit o de les cèl·lules del cultiu:

Del teixit:

Es fa la dissecció del cervell i es congela ràpidament a -80°C . Per extreure les proteïnes del teixit s'homogenitza en gel en tampó RIPA amb inhibidors de proteases (3 ml per gram de teixit) amb l'ajut d'homogenitzadors manuals de vidre o d'un politró. Es deixa reposar 30 minuts sobre gel, s'afegeixen inhibidors de proteases i es centrifuga a 12.000 xG a 4°C durant 20 minuts. S'obté un sobrenadant que és l'extracte proteic total, del qual se'n determina la concentració de proteïnes (fent una dilució 1/5 en tampó RIPA), se'n fa alíquotes i es guarda congelat a -80°C .

De les cèl·lules del cultiu:

El medi de cultiu sol contenir MMPs (en el sèrum) i per això es important rentar bé les plaques amb PBS a 37°C abans de recollir les cèl·lules (fer uns 3 rentats). Després es desenganxen les cèl·lules de la placa (tripsinitzant-les o amb un rascador) i es centrifuguen a 900 g 5 minuts. Les cèl·lules es resuspenen en tampó de lisi (250 ml per 2-4 plaques de 100 mm de diàmetre) i es soniquen.

Aquests homogenats es centrifuguen a 12000 g durant 5 minuts a 4°C obtenint-se un sobrenadant que és l'extracte proteic total. Separem una alíquota del sobrenadant per a fer anàlisis de Western Blot, li afegim inhibidors de proteases i la guardem a -80°C . Amb la resta del sobrenadant fem l'extracció de les gelatinases.

SOLUCIONS PER FER LES EXTRACCIONS PROTEIQUES:

			<u>Per preparar 100 ml</u>
- <u>TAMPÓ RIPA:</u>	1%	Igepal (AC-630)	1 ml
	0.5%	Deoxicolat sòdic	0.5 gr
	0.1%	SDS (duodecil sulfat sòdic)	0.1 gr
	0.01M	PBS 1X	100 ml
+ <u>COMPLET:</u>	Dissoldre una pastilla de cocktail d'inhibidors de proteases o Complet per cada 100ml de RIPA.		
			<u>Per cada 1 ml de (RIPA+ Complet)</u>
- <u>Inhibidors de proteases:</u>	0.1mM	PMSF	10 μl
	5 μg /ml	Aprotinina	3 μl
	2 μg /ml	Leupeptina (2X)	1 μl
	1 mM	Ortovanadat	1 μl

1.2 Determinació de la concentració de proteïnes:

La determinació de proteïnes es fa seguint el *mètode de Bradford* (1976), fent servir el reactiu comercial Bio-Rad Protein Assay (Bio Rad). L'assaig es basa en el fet que el reactiu de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250) canvia el seu màxim d'absorció desde 465 nm a 595 nm quan s'uneix a proteïnes. L'absorbància del complex que es forma és relativament estable durant 15-60 minuts.

Passos:

- € Es prepara la corba patró a partir d'una solució pura de BSA de 0.2mg/ml. Creem una recta de sis punts que corresponen a les següents concentracions: 0, 2, 5, 10, 15 i 20 ug/ml.

µg BSA	0	2	5	10	15	20
µl BSA	0	10	25	50	75	100
µl H ₂ O	800	790	775	750	725	700
µl Reactiu	200	200	200	200	200	200

Taula 9. Preparació d'estandards de BSA

- € Es preparen les mostres a analitzar: 2 µl de mostra + 800 µl d'aigua.
- € S'afegeixen 200 µl del reactiu de Bradford a tots els eppendorfs. Agitem i les deixem reposar a temperatura ambient.
- € Totes les lectures es realitzen als 30 minuts després de l'addició del reactiu de Bradford.

Es mesura l'absorbància a l'espectrofotòmetre, a la longitud d'ona (λ) de 590 nm. La concentració de proteïnes de cada mostra s'obté extrapolant el valor de densitat òptica de la mostra en la recta patró de BSA que es prepara a cada experiment.

1.3 Extracció de membranes cel·lulars:

Per obtenir la fracció membranal i separar-la de la citosòlica s' utilitza un mètode de gradients de sacarosa.

Breument, el teixit s'homogeneïtza amb un homogeneïtzador de vidre Dounce en un tampó (1:3 w/v) que conté 1 mM NaHCO₃ i 0.5 mM CaCl₂, pH 7.5.

L'homogenat es filtra i es centrifuga a 1000 g durant 20 minuts. El pellet es resuspén en el mateix tampó i es centrifuga a 1500 g durant 15 minuts dues vegades. Llavors es torna a resuspendre i es centrifuga a 1550 g . El pellet es resuspén llavors en sacarosa al 80% en un volum final de 10 ml i s'homogeneïtza amb l'homogenitzador.

Llavors, es prepara un gradient de sacarosa (les solucions es feien en tampó de tris-HCl 5mM, pH 7.5) seqüencialment afegint sacarosa al 8% de 80ml , sacarosa al 8% de 48ml , sacarosa al 8% de 47ml , i sacarosa al 6% de 41ml , i això se sotmetia a ultracentrifugació a 90.000 g durant 2 hores.

La fracció enriquida en membrana (troada entre sacarosa d'un 47-41%) es centrifuga a 100.000 g durant 30 minuts en tampó Tris-HCl 10 mM, pH 7.4 que conté 3 mM d'EDTA.

Finalment es resuspén el pellet en l'últim tampó i ja hem fet l'extracció de les membranes cel·lulars. El contingut de proteïna es determina pel mètode Bradford.

1.4 Western-Blot (WB)

Preparació del gel d'acrilamida:

- € Els vidres, prèviament desengreixats amb ETOH, es munten en el seu suport (equip Mini-Protean, BIO-RAD).
- € Es comproba que la cavitat on han de polimeritzar els gels no presenta cap tipus de fuga.
- € Es prepara la solució del gel d'acrilamida en funció de la concentració desitjada.
- € Afegim una capa d'aigua miliQ perquè la part superior del gel quedi recta.
- € Un cop el gel ha polimeritzat es llença aquesta capa d'aigua.
- € S'afegeix el gel concentrador i ràpidament es col·loca la pinta per formar els pous.
- € Esperem que polimeritzi.

Preparació de les mostres:

- € Les mostres es descongelen i es dilueixen en tampó DTT(x3) en una proporció 2:1.

- € S'escalfen al bany maria a 100°C durant 5 minuts per desnaturalitzar les proteïnes.
- € Es fa un spin de centrifuga perquè no quedin restes per les parets.
- € Sembrem les mostres en els pous amb una micropipeta Hamilton. Per cada pou carreguem uns 30 µg de proteïna.

Electroforesis: (S'utilitza el sistema Miniprotean de BIORAD).

- € S'omple la cubeta amb tampó electròlit.
- € Es fa córrer el gel. Primer a 80 V, quan les mostres han travessat el gel concentrador pugem el voltatge a 100V .
- € Aturem el sistema just abans que la línia blava arribi al final dels vidres. La duració aproximada és d'unes dues hores.

Transferència a la membrana de PVC:

- € S'activa la membrana de PVDF (Immobilon, Millipore) amb metanol durant uns 2 minuts
- € Es fa el muntatge tipus "sandwich" : amb paper Whatman, esponges i el gel en contacte amb la membrana de PVDF. Tenir en compte que la transferència va del pol negatiu al pol positiu.
- € S'afegeix el tampó de transferència.
- € Es deixa connectat a la font 1h a 60V, amb gel i amb agitació.

Immunoblot:

- € Activar la membrana amb metanol absolut durant 2 minuts, en agitació.
- € Rentar la membrana amb T-TBS 2 x 10 min.
- € Bloquejar la membrana amb T-TBS + 5% llet en pols + 5% de BSA: 1h a T^a ambient, i en agitació.
- € Rentar la membrana amb T-TBS 1 x 5 min.
- € Incubació de l' anticòs primari "overnight" a 4°C .
- € Rentar la membrana amb TBS-T, 2 x 10'.
- € Incubació amb l'anticòs secundari: 1 hora a T^a ambient..
 - anti-rabbit HRP, 1:2000, de BIO-RAD
 - anti-mouse HRP, 1:2000, de BIO-RAD
- € Rentats amb T-TBS, 2 x 10'.

Revelat per quimioluminiscència:

S'utilitza una solució de luminol en Tris-HCl que s'activa mitjançant una solució d'àcid cumàric dissolt en DMSO.

Solucions pel western-blot:€ SOLUCIONS PER FER EL GEL D'ACRILAMIDA:

- Solució 1 : 0.75 M Tris-base (Ajustar pH a 8.8 amb HCl)
0.2% SDS (Dodecyl sulfat sòdic)
en H₂O milliQ
- Solució 2 : 30 % d'acrilamida
0.8 % de bis-acrilamida
en H₂O milliQ
- Solució 3 : 0.25 M Tris-base (Ajustar pH a 6.8 amb HCl)
0.2 % de SDS (Dodecyl sulfat sòdic)
en H₂O milliQ
- Persulfat amònic (PSA) al 13 % (BIO-RAD).
- TEMED (BIO-RAD)

	gel 6 %	gel 8 %	gel 10 %	gel 12 %	gel 15 %	gel concentrador
Solució 1	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	-
Solució 2	1.6 ml	2.16 ml	2.68 ml	3.2 ml	4 ml	0.225 ml
Solució 3	-	-	-	-	-	0.975 ml
H₂O d	2.4 ml	1.84 ml	1.32 ml	0.8 ml	-	0.775 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 p.1	10 µl	5 µl
PSA 13%	40 µl	40 pl	40 µl	40 µl	40 µl	20 µl
Volum total	8 ml	8 o 12 ml	8 ml	8 o 12 ml	8 ml	2 ml

Taula 10. Preparació de gels d'acrilamida a diferents concentracions. Volum per preparar un gel. PSA = Persulfat amònic

€ TAMPÓ ELECTRÒLIT:

0.025 M Tris-Base
0.192 M Glicina
0.1% SDS
en aigua destil·lada

€ TAMPÓ DE TRANSFERÈNCIA:

0.025 M Tris-Base
0.192 M Glicina
20 %Metanol
en aigua destil·lada

€ TAMPÓ DE MOSTRA : Tampó DTT x 3

0.5 M Tampó fosfats (NaH_2PO_4 0.5M + Na_2HPO_4 0.5M)
20% Glicerol
4% SDS
0.05% Blau de bromofenol
10% DTT (2,4-dithiothreitol)
en aigua destil·lada.

€ SOLUCIONS PELS RENTATS: Tween-Tris buffered saline (T-TBS):

TBS: 20 mM Tris-HCl
150 M NaCl
en aigua destil·lada

T-TBS: Idem + 0.05% Tween 20

€ SOLUCIONS DE QUIMIOFLUORESCÈNCIA:

Luminol : 0.1 M Tris HCl
1.25 mM de Luminol sòdic
30% d' H_2O_2
Enhancer: 11 mg Àc p-OH-cumàric
en 10 ml de DMSO

Posar 10 μl d'enhancer per cada 50 ml de luminol.

1.5 Densitometria

L'anàlisi densitomètric de la intensitat de les bandes es va realitzar utilitzant una càmera Kodak (DC-120) i un software apropiat (Kds1D, Digital Science System). Es va considerar el valor de la intensitat de les bandes com el resultat de restar a la intensitat mitja de cada banda la intensitat del fons de cada banda. Els valors de cada mostra es van normalitzar per la intensitat corresponent a les bandes del control de càrrega basades en l'actina.

C2. TÈCNiques PER MESURAR L'ACTIVITAT DE LES MMPS:

2.1 Extracció de gelatinases (MMP-2 i MMP-9) d'un teixit o d'un cultiu cel·lular:

Aquest mètode està basat en els de Zhang i Gottschall (1997) i Gasche et al. (1999) i permet extreure d'un homogenat de teixit les gelatinases (MMP-2 i MMP-9) aprofitant la seva capacitat d'unió al que és un substrat seu natural: la gelatina. Aquest mètode permet purificar-les molt bé i obtenir així després zimografies de gelatina més clares, ja que hem eliminat totes les proteïnes que no s'uneixen a la gelatina. Dura aproximadament unes 2 hores.

Extracció d'un teixit:

El primer pas consisteix en homogeneïtzar les mostres de teixit en un homogeneïtzador de vidre en tampó de lisi sobre gel, posant per cada 0.25 gr de teixit (és el pes de la part del cervell que nosaltres estudiem: còrtex + estriat) uns 700 µl de tampó de lisi.

Una alíquota d'aquest homogenat (uns 30 µl) es guarda congelada a -80 °C per a futurs anàlisis de proteïnes per Western Blot, afegint-li prèviament inhibidors de proteases. (Aquesta fracció ens va permetre determinar la MPO posteriorment).

Es centrifuguen les mostres a 12.000 g, durant 10 min, a 4 °C i es separa el sobrenadant per continuar el procés. També agafem una alíquota (d'uns 20 µl) a la que afegirem inhibidors de proteases per si volem fer després Western Blots.

Llavors determinem la concentració de proteïna del sobrenadant utilitzant el reactiu Bradford (Biorad) i s'ajustem totes les mostres de manera que tinguin la mateixa quantitat de proteïna en el mateix volum (500 µl).

Per cada 500 µl de sobrenadant s'afegeixen 50 µl de gelatina-sefarosa 4B (Pharmacia, 50 ml) i s'incuba durant 1 hora a 4°C amb en un agitador orbital. Aquesta gelatina – sefarosa s'ha d'haver rentat prèviament tres vegades amb tampó de rentat a 500 g durant 2 minuts per tal d'eliminar l'etanol en que ve preparada. Durant aquest temps les gelatinases s'uneixen a les boletes de gelatina.

Es centrifuga a 500 g durant 2 minuts a 4 °C per tal de fer precipitar la gelatina-sefarosa que conté ja les gelatinases unides a ella.

El sobrenadant es pot guardar (conté tota la resta de proteïnes del teixit que no són gelatinases) i el pellet es renta amb tampó rentat (500 µl).

Es centrifuga a 500 g durant 2 minuts a 4°C i es resuspen el pellet (la gelatina-sefarosa + gelatinases) en tampó d'elució (150 σ l) durant 30 min en un agitador orbital a 4 °C. En aquest pas estem extreient les gelatinases de les boletes de gelatina-sefarosa.

Es centrifuga a 500 g durant 2 minuts i s'agafa el sobrenadant (uns 150 σ l) que denominem fracció E. En aquesta fracció tenim les gelatinases ja extretes. Es guarda a – 80 °C per fer després la zimografia de gelatina on carregarem de 3-5 σ l per pou. Així doncs el volum final d'extractes obtingut és de 150 σ l a partir de 0.25 gr de teixit de cervell inicial.

D'aquesta fracció es pot fer també Western Blot si fem el següent:

- 1) Agafem uns 75 σ l i fem precipitar les proteïnes amb 8 σ l de TCA 100% fred (10% del volum final) 30 minuts en gel.
- 2) Centrifuguem a 12000 g (10 min) a 4 °C.
- 3) Rentem amb 1 ml d'acetona (-20 °C) centrifugant a 12000 g, durant 15 minuts a 4°C.
- 4) Treiem l'acetona, evaporem el que quedi amb gas heli i resuspenem el pellet en tampó de càrrega del W.B.(uns 15 σ l). Si queda de color groc es que té el pH massa àcid i li haurem d'afegir 1-2 σ l de tampó tris-HCl 1 M pH=8 fins que es torni blau.

NOTA: Si en lloc de partir de 500 σ l de sobrenadant tenim una altra quantitat, simplement haurem d'ajustar les proporcions de gelatina (50 σ l) i de tampó d'elució (150 σ l) que farem servir. Exemple: 300 σ l de sobrenadant, 30 σ l de gelatina, 90 σ l de tampó d'elució.

Extracció d'un cultiu cel·lular:

El medi de cultiu sol contenir MMPs (en el sèrum) i per això es important rentar bé les plaques amb PBS a 37°C (fer uns 3 rentats). Després es desenganxen les cèl·lules de la placa (tripsinitzant-les o amb un rascador) i es centrifuguen a 900 g 5 minuts. Les cèl·lules es resuspenen en tampó de lisi (250 ml per 2-4 plaques de 100 mm de diàmetre) i es soniquen.

Aquests homogenats es centrifuguen a 12000 g durant 5 minuts a 4°C i una alíquota del sobrenadant es guarda per a fer anàlisis de Western Blot. Amb la resta del sobrenadant (un cop comprovat que totes les mostres tenen la mateixa concentració de proteïnes amb un Bradford) fem l'extracció de les gelatinases.

Incubem les mostres amb 25 σ l de gelatina-sefarosa 4B de gelatina (Pharmacia) durant 1 h a 4°C. Després de rentar, separem les MMPs de la piloteta de gelatina-

sefarosa incubant amb 30 ml de tampó d'elució durant 30 min a 4 °C. Centrifuguem i guardem el sobrenadant a -80 °C per fer després la zimografia de gelatina on carregarem de 3-5 σ l per pou.

NOTA: El mètode és igual que en el teixit però adaptat als cultius cel·lulars.

Solucions utilitzades per fer l'extracció de les gelatinases:

TAMPÓ DE LISI MMP 1X:

Concentració final	P.M. (mg/mmol)	stock	per preparar 100 ml
50 mill Tris-HCl pH 7.6	157.6	1M	5 ml
150mM NaCl	58.44	1M	15 ml
5 mM CaCl ₂	147	1M	0.5 ml
0.05% BRIJ-35		30%	0.17 ml
0.02% NaN ₃	65.01	1%	2ml
1% Triton X-100		100%	1 ml

TAMPÓ DE RENTAT MMP 1X

Concentració final	P.M. (mg/mmol)	stock	per preparar 250 ml
50 mM Tris-HCl pH 7.6	157.6	1M	12.5 ml
150mM NaCl	58.44	1M	37.5 ml
5 mM CaCl ₂		1M	1.25 ml
0.05% BRIJ-35		30%	0.425 ml
0.02% NaN ₃	65.01	1%	5 ml

TAMPÓ D'ELUCIÓ MMP 1X

Concentració final	P.M. (mg/mmol)	stock	per preparar 10 ml
50 mM Tris-HCl pH 7.6	157.6	1M	0.5 ml
150mM NaCl	58.44	1M	1.5 ml
5 mM CaCl ₂		1M	0.05 ml
0.05% BRIJ-35		30%	0.017 ml
0.02% NaN ₃	65.01	1%	0.2 ml
10 % Dimetilsulfòxid (DMSO)		100%	1 ml

5.1 Zimografia de gelatina i de caseïna:

*Zimografia de gelatina:

Aquesta tècnica permet veure l'activitat gelatinasa de les MMPs -2 i -9 d'una forma quantitativa i aporta una informació funcional d'aquestes. Dura aproximadament 3 dies.

Per realitzar-la s'han de seguir els passos següents:

1. Extracció de gelatinases de les mostres:

Es fa com s'ha explicat en l'apartat anterior. Permet augmentar la resolució de la zimografia al eliminar previament la resta de proteïnes que no són gelatinases. També es poden fer zimografies directament amb extractes proteics però no queden tan nets.

2. Preparació de les mostres per l'electroforesi:

Es carregaran al gel uns 5 µl de la fracció E, fruit de l'extracció de les gelatinases (ja sigui de mostres de teixit o de cultius cel·lulars) als que s'afegeix la mateixa quantitat (1:1) de tampó de càrrega per zimografies.

Sempre es carregarà també en un pou un *estàndar de gelatinases*, una barreja de MMP-9 i MMP-2 que conté 0.3 ng de gelatinasa (CC073, Chemicon International, Inc.) , com a control positiu per identificar les bandes d'activitat en les mostres. També podem carregar un *marcador de pes molecular* per veure millor el pes molecular de les diverses formes (dímers, proformes, formes actives) de les MMPs. Tots dos amb el mateix tampó de càrrega per zimografies.

3. Preparar el gel d'acrilamida afegint gelatina (substrats de les gelatinases):

Es tracta d'un gel d'acrilamida normal al que afegim un substracte de les gelatinases: la gelatina. Fem un gel del 10 % d'acrilamida que contingui 1mg/ml de gelatina porcina.

Primer preparem una solució de gelatina 10x (10 mg/ml) escalfant-la fins que es dissolgui en l'aigua destil·lada, sense passar mai dels 60°C.

A l'hora de fer el gel posem menys aigua per compensar el que afegim de gelatina i així mantenir el volum final constant. El 'stacking' es fa del 5%.

4. Electroforesi:

Fem una electroforesi normal durant 1 hora a 100 V .

5. Rentats del gel:

Treiem el gel d'acrilamida dels vidres amb compte, li treiem el 'stacking' i el posem dins d'un recipient ben net (millor si és sols per aquest ús) amb aigua destil·lada. Després fem 3 rentats de 15 minuts de durada cadascun en 150 ml d'una solució de tritó (X-100) al 2.5 % en aigua destil·lada.

6. Incubació del gel:

Rentem el gel en aigua destil·lada per eliminar el tritó i l'incubem en una estufa a 37°C durant 42 h en 250 ml de tampó d'incubació per zimografies. És molt important que aquest tampó contingui calci i que tingui un pH de 7.5 i que la reacció es faci a temperatura corporal perquè les gelatinases puguin degradar el seu substracte: la gelatina.

7. Tinció del gel:

Treiem el gel de l'estufa i el tenyim de blau durant una hora en 150 ml de tenyidor dins d'un recipient col·locat sobre un agitador que tingui una agitació suau i constant.

8. Destenyir el gel:

Treiem amb compte el tenyidor i passem a destenyir el gel durant 2 hores en 150 ml de destenyidor, també amb agitació suau. Fem quatre canvis durant aquest temps fins que veiem que apareixen en blanc en el gel les bandes de degradació de la gelatina. Llavors rentem el gel en aigua destil·lada durant 5 minuts per treure les restes de destenyidor.

9. Escanejar immediatament i assecar el gel:

S'escaneja el gel amb una càmera (Kodak) per fer posteriorment les anàlisis de les bandes. Si el volem conservar podem assecar-lo al buit en un assecador de gels (Biorad) durant 30 minuts.

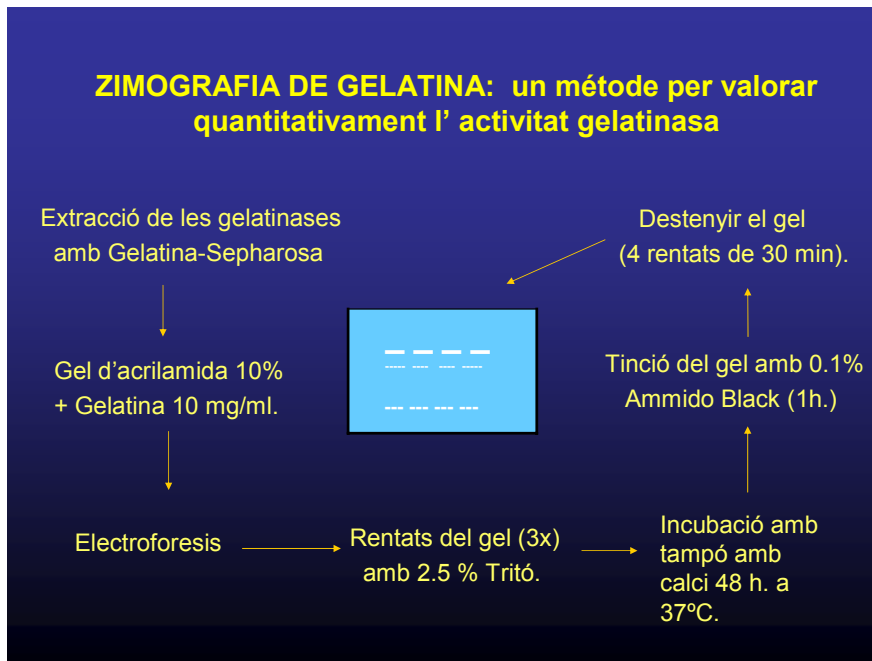


Figura 56: Esquema que resumeix la tècnica de la zimografia de gelatina.

***Zimografia de caseïna:**

Aquest mètode és molt similar a l'anterior, però permet detectar l'activitat de la MMP-3 mitjançant la degradació d'un substracte seu: la caseïna. Així doncs, consisteix en canviar el substracte i posar enlloc de gelatina, caseïna. Una diferència amb el mètode anterior és que com no coneixem cap mètode d'extracció de la MMP-3, hem de carregar en el gel directament els extractes proteics (10 µg proteïna/pou), i això fa que no quedin tan clares com les zimografies de gelatina.

La zimografia es realitza en gels de poliacrilamida al 10% que contenen caseïna (1 mg/ml). La solució de caseïna 10 mg/ml (des de llet bovina, Sigma) es prepara barrejant-se amb 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 durant 2 hores sota l'agitació d'un vòrtex. No s'ha de calentar perquè sinó es degrada la caseïna. La resta es segueix el mateix procediment descrit per a la zimografia de gelatina.

SOLUCIONS PER FER LES ZIMOGRAFIES:**TAMPÓ DE CARREGA ZIMO:**

Concentració final	stock	per preparar 10 ml
80 mM Tris-HCl (pH 6.8)	1M	0.8 ml
4 % SDS (sodium dodecyl)	10%	4 ml
10% glicerol	87%	1.15 ml
0.01 % blau de bromofenol	1%	100 µl

SOLUCIÓ DE GELATINA:

Concentració final	stock	per preparar 2 ml
Gelatina 10 mg /ml		20 mg 2 ml d'aigua Milli-Q

SOLUCIÓ DE RENTAT:

Concentració final	stock	per preparar 1 litre
2.5 % trito (X-100) en aigua	100%	25 ml

TAMPÓ D'INCUBACIÓ:

Concentració final	stock	per preparar 1 litre
50 mM Tris-HCl (pH 7.5)	1M	50 ml
10 mM CaCl ₂	1M	10 ml
0.02% azida sodica (NaN ₃)	1%	20 ml

TENYIDOR:

Concentració final	stock	per preparar 500 ml
0.1 % amido black	2%	25 ml
aigua destil·lada		275 ml
àcid acètic	100%	50 ml
metanol		150 ml

DESTENYIDOR:

Concentració final	stock	per preparar 1 litre
aigua destil·lada		600 ml
àcid acètic	100%	100 ml
metanol		300 ml

2.2.1 Activació in vitro amb organomercurials (APMA):

L' APMA (àcid 4-aminofenilmercuríic) s'utilitza per a activar les MMPs in vitro. Per fer-ho s'incuben 30 µl de la solució E (extracte de gelatinases) amb 1 mM d'APMA a 37°C durant 3 hores.

Cal preparar l'APMA 1 mM immediatament abans d'utilitzar-lo a causa de la inestabilitat de la solució i mantenir-lo protegit de la llum. Es fa dissolent-lo en 0.1N NaOH i ajustant el pH a 7-7.5 amb 0.1N HCl.

2.2.2 Inhibició amb EDTA i inhibidors de MMPs:

La incubació en presència d'EDTA 20-50 mM o d'inhibidors específics de MMPs es feia com a control per a garantir l'especificitat de l'activitat vista per zimografies per part de les MMPs i descartar l'acció d'altres proteïnes que poguessin tenir també activitat gelatinasa.

Incubàvem dos gels diferents amb les mateixes mostres en la presència o l'absència d'EDTA 20-50 mM en el tampó d'incubació. Ja que l'EDTA és un quelant de calci, impedeix que les MMPs puguin utilitzar el calci que necessiten per a realitzar la seva activitat i les bandes d'activitat en les zimografies desapareixen, tant de les de gelatina com de les de caseïna, ja que totes les MMPs són dependents de calci.

A més a més, utilitzàvem dos inhibidors específics en el tampó d'incubació: Per a la MMP-9: MMP-9/MMP-13 Inhibitor I (10 mM), i per a la MMP-9 i la MMP-2: MMP-2/MMP-9 Inhibitor II (30 mM) (Calbiochem, San Diego, CA, USA) per a garantir encara més la seva especificitat. Aquestes incubacions es feien amb fragments tallats del gel d'acrilamida i incubats en càpsules de petri de 50 mm per estalviar inhibidor.

2.3 Zimografia de gelatina in situ

La tècnica de la zimografia in situ consisteix en aplicar sobre capes fresques de teixit cerebral una gelatina (substrat de les gelatinases endògenes) acoblada a fluoresceïna. Quan les MMP de les cèl·lules degraden aquest substrat, la fluoresceïna s'allibera i es visualitza al microscopi. L'intensitat del senyal fluorescent augmenta amb l'activitat proteolítica neta, resultant de l'equilibri entre proteases i inhibidors endògens.

Aquesta tècnica permet veure amb una resolució cel·lular, les modulacions de l'activitat de les MMP permetent evaluar el balanç net de la coexpressió de proteases i dels inhibidors, i per tant és important per seu significat en l'aspecte funcional.

2.4 Assaig enzimàtic de l'activitat de la MMP-3:

L'activitat de la MMP-3 era avaluada incubant mostres de cervell de rates control i isquèmiques amb un substrat fluorogènic (Substrat de MMP-3 II, Calbiochem, els USA), que és degradat per la MMP-3 (Bickett et al, 1994).

El teixit congelat s'homogeneïtza en un tampó de lisi que contenia: 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.05% de Brij-35 , 0.02% d'azida sòdica (NaN₃), i un 1% Tritó X-100, i es centrifuga a 12.000 g durant 5 minuts a 4°C.

Els sobrenadants, contenint 200 gr de proteïna en un volum de 50 µl, es barregen amb tampó d'assaig (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 20 µM de ZnSO₄ i 0.05% de Brij-35) en un volum final de 200 µl als que s'afegeixen diferents concentracions del substrat fluorogènic de la MMP-3 (d'1, 2.5, 5, 10 i 30 µM).

Les mostres s'incuben durant deu minuts a 37°C i la fluorescència es mesura en un fluorímetre (Spectra Max GeminiXS, Molecular Device Corporation, CA, USA) a una λexc = 328 nm i una λem = 393 nm. Una barreja de tampó de lisi amb tampó d'assaig (sense mostres de teixits) s'incuba com a blanc de la reacció.

2.5 Degradació de l'agrina per la MMP-3

Els homogenats de teixits (com els utilitzats pel W.B) amb un contingut en proteïna de 300 µg en aproximadament 30 µl es barregen amb un volum final de 200 µl amb tampó d'incubació que conté: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM CaCl₂ i 0.02% d'azida sòdica (NaN₃) , en la presència o absència de 500 U de la MMP-3 recombinant humana (domini catalític, de Calbiochem amb 1.6 U/ µg de proteïna). La incubació es fa durant 18 h a temperatura ambient en un agitador orbital.

Posteriorment 40 µg de proteïna es desnaturalitzen i es carreguen en un gel de poliacrilamida al 6% per a l'anàlisi per Western Blot de l' agrina.

Mètodes

D) TAULA DELS ANTICOSSOS UTILITZATS :

D1. ANTICOSSOS PRIMARIS : WB: Western-blot IH : Immunohistoquímica

Nom	Ús	Dilució	Font	Casa comercial	PM aparent
Actina	WB	1:10000	Policlonal	Sigma	45 Kd
Agrin	WB/ IH	1: 250 1: 25	Policlonal	StressGen (Agr-520)	220 Kd 150 Kd
β -Tubulina	WB	1: 5000	Goat	Boehringer Mannheim	38 Kd
ED-1	WB	1: 300	Monoclonal	Serotec(MCA341)	90-100
GFAP	IH	1: 500	Monoclonal	Boehringer Mannheim	
GFAP	WB	1: 4000	Policlonal	DAKO	50 Kd
Hsp72	WB	1: 500	Monoclonal	Oncogene	72 Kd
ICAM	IH	1: 200	Monoclonal	1A29	46-48 Kd
Lectina de tomàquet	IH	1: 300		Sigma	
MPO	WB IH	1: 4000 1: 800	Monoclonal	DAKO (A0398)	46-48 Kd
MPO	WB	1: 500	Monoclonal	Menarini Diagnostics (M 1464)	46-48 Kd
NeuN	WB	1: 4000	Monoclonal	Chemicon	46-48 Kd
MMP-9	WB IH	1: 150 1: 50	Monoclonal	Chemicon Ab-1 (MAB 13421)	95-68 Kd
MMP-9	WB	1: 150	Monoclonal	Chemicon Ab-2 (MAB 13420)	92 Kd
MMP-9	IH	1: 50	Monoclonal	Oncogene Ab-10	92 Kd
MMP-2	WB	1: 100	Monoclonal	Neomarkers (CA-4001)	92 Kd
MMP-2	IH WB	1: 25 1 : 2000	Policlonal	Chemicon (AB 809)	92 Kd
MMP-3 hinge region	WB IH	1: 1000 1: 200	Policlonal	Sigma (M4802)	92 Kd
Sinaptofisina	WB	1:7000	Monoclonal	Dako (clone SY 38)	38 Kd

D2. ANTICOSSOS SECUNDARIS:

Western-Blot

Anti-mouse Ig peroxidase linked antibody 1:2000 Amersham
Anti-rabbit Ig peroxidase linked antibody 1:2000 Amersham

Immunohistoquímica

Anti-horse biotinilat HRP 1:200 Vector Laboratories
Anti-goat biotinilat HRP 1:200 Vector Laboratories