

Tesi doctoral presentada per En/Na

Yolanda CÁMARA NAVARRO

amb el títol

**"Estudio funcional de la proteína desacopladora
mitocondrial UCP3 en relación con la apoptosis y
las especies reactivas de oxígeno"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

BIOLOGIA

Barcelona, 25 de juliol de 2005.

Facultat de Biologia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular



UNIVERSITAT DE BARCELONA



I. CULTIVOS CELULARES

I.1 CUIDADO Y CONSERVACIÓN DE LAS CÉLULAS

En la realización de esta tesis se han utilizado diferentes líneas celulares como modelo experimental. Los cultivos celulares empleados se mantuvieron en todos los casos en condiciones estables de temperatura (37°C), humedad relativa (90%) y presión de CO₂ (5%). Toda manipulación de dichas líneas se realizó en campanas de flujo laminar, con material estéril, y en condiciones que garantizaran tanto la esterilidad del cultivo como la seguridad del experimentador, relevante especialmente en el manejo de líneas celulares de origen humano.

El **subcultivo o división** de las células se realizó mediante el procedimiento convencional:

- Lavar las células con tampón fosfato (PBS, *Phosphate buffered saline*)
- Añadir tripsina en cantidad suficiente para cubrir la superficie de cultivo.
- Incubar un par de minutos a 37°C
- Recoger las células
- Centrifugar las células 4' a 500 g aproximadamente
- Resuspender en el volumen deseado y replaquear.

Para la conservación de las células, éstas se **congelaron** en criotubos a -80°C durante periodos cortos de tiempo, y en N₂ líquido durante tiempo indefinido. En todos los casos el protocolo consistió en recoger las células (aproximadamente 1 millón de células por criotubo) y resuspenderlas en un volumen reducido (1-1,5 ml por criotubo) de *medio de congelación* consistente en:

- 40% suero fetal bovino (FBS)
- 10 % DMSO (Sigma) como crioprotector
- 50% Medio de mantenimiento (diferente en función de cada línea celular)

Una vez en contacto con el DMSO y dado que éste resulta tóxico a temperatura ambiente es conveniente proceder rápidamente al enfriamiento de los criotubos. La congelación, sin embargo, debe ser llevada a cabo lentamente. A tal efecto, se introdujeron los criotubos en un tanque de isopropanol que a su vez se deposita en el interior de un congelador, lo que permite un descenso gradual de la temperatura de los criotubos hasta alcanzar los -80°.

A su vez, la **descongelación** de los criotubos para recuperar las células conservadas debe ser lo más rápida posible. Ésta se realiza en un baño a 37°C y cuanto antes, se procede a la dilución o sustitución del medio de congelación (que contiene el DMSO), por el medio de mantenimiento adecuado.

I.2 SOLUCIONES Y MEDIOS UTILIZADOS

PBS (*Phosphate buffered saline*) pH 7,4 136 mM NaCl
 2.7 mM KCl
 8 mM Na₂HPO₄
 1.5 mM KH₂PO₄

Citrato Sódico pH 7,4 7,5 mM Tri-Sodio Citrato 2-hidrato
 7 mM KCl

DMEM 4.5 g/l glucosa, L-glutamina, Piruvato (Gibco)

Penicilina:Streptomycina 10.000:10.000(Gibco)

FBS *Fetal Bovine Serum* (Gibco)

Tet System Approved Fetal Bovine Serum (Clontech)

EDTA-Tripsina (Gibco)

I.3 LÍNEAS CELULARES

La línea celular **HeLa** se obtuvo a partir de un carcinoma cervical humano. Las HeLa son células epiteliales con una elevada capacidad proliferativa debido a su origen tumoral. Se mantuvieron en un medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Media*), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y un 1% de la mezcla de los antibióticos penicilina y estreptomycina. El procedimiento para realizar los subcultivos y plaqueo de las células fue el estándar.

La línea celular **293-HEK** (*293 cells, low passage, Microbix Inc.*) es también de origen humano y proviene de células embrionarias de riñón. Originariamente, las 293-HEK fueron transformadas para expresar la región E1 del adenovirus Ad 5 que permite la encapsidación de los viriones, por lo que se han empleado en la obtención, amplificación y titulación de vectores adenovíricos defectivos para E1. Para la construcción y amplificación de vectores adenovíricos es recomendable emplear líneas que hayan sido

sometidas a un bajo número de divisiones, por lo que con este propósito, se utilizaron siempre células con un número inferior a 40.

Se trata de una línea de origen tumoral, y por tanto, con una elevada capacidad proliferativa. No obstante, las 293-HEK son más delicadas que otras líneas (su adhesión a la placa es más débil, son más sensibles a los posibles cambios de pH, etc.) por lo que se extremó el cuidado en su manipulación. Algunas consideraciones especiales fueron el no diluir excesivamente las células al realizar los subcultivos ($\leq 1/10$), así como evitar centrifugarlas durante estos subcultivos o durante la descongelación de nuevos viales. En este caso, para realizar la división de las células se utilizó un tampón citrato sódico, ya que se sabe que la tripsina puede afectar a la distribución en membrana de los receptores para proteínas adenovíricas. Su cultivo se realizó en DMEM con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y un 1% de la mezcla de los antibióticos penicilina y estreptomina.

Las **293-TetOn** (Clontech) provienen de la transfección estable de la línea 293 HEK para la expresión constitutiva del transactivador reverso sensible a tetraciclina (rtTA). Esta línea fue diseñada para permitir la generación de sistemas de expresión inducibles por tetraciclina y derivados como la doxiciclina (Dox). Para ello se debe transfectar dicha línea de forma estable con un plásmido que dirija la expresión del gen de interés bajo el control de un promotor con elemento de respuesta a rtTA (pTRE, BD Biosciences). Con este fin, la Dra. Sibille generó en nuestro laboratorio una línea estable para la expresión inducible por doxiciclina (Dox) del cDNA humano de UCP3L. La selección de los clones positivos para la expresión de UCP3 (**293-UCP3**) se realizó gracias a la cotransfección de pTRE-UCP3L con un plásmido que confiere resistencia a la higromicina. El cultivo de los clones se realizó en un medio DMEM con un 1% de la mezcla de los antibióticos penicilina y estreptomina, y un 10% de FBS libre de tetraciclinas (*Tet System Approved FBS*, Clontech) para reducir al máximo la actividad basal del promotor. El medio contenía también 90 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina (Roche) para mantener la presión de selección sobre los clones y evitar contaminaciones con la línea original.

En los experimentos en los que se requería inducir la expresión de UCP3, se trataron las células con la concentración oportuna de doxiciclina durante 48 horas. En todos los experimentos se trabajó con cuatro grupos experimentales:

- **293-TetOn - Dox:** Control negativo para la presencia de Dox.
- **293-TetOn + Dox:** Control de los efectos del fármaco sobre las células.
- **293-UCP3 - Dox:** Control negativo para la expresión de UCP3 (No obstante, y aunque el sistema garantiza la ausencia de tetraciclinas en el medio, existía una pérdida menor de la dependencia de Dox en el promotor que dirige la expresión de UCP3).
- **293-UCP3 + Dox:** Para evidenciar los efectos específicos de UCP3 sobre la célula.

Con el fin de descartar efectos de origen clonal, todos los experimentos se realizaron en al menos dos clones independientes 293-UCP3.

La 293-TetOn y 293-UCP3 derivadas, son líneas aún más delicadas que las 293 HEK originales, por lo que se extremaron las precauciones en su manipulación en lo que respecta al “pipeteo”, dilución, pH del medio, etc. En este caso, los subcultivos y plaqueo de las células fue el mismo que para las 293 HEK.

En este estudio se han utilizado también líneas de músculo esquelético provenientes de diferentes especies. Al disminuir la concentración de FBS en cultivo, estas células mantienen cierta capacidad de diferenciación, se alinean y fusionan formando miotubos alargados hacia el segundo o tercer día de diferenciación.

Las **L6** son una línea de mioblastos derivados de músculo de rata. Son altamente proliferativas aunque conservan su capacidad de diferenciación espontánea a miotubos. Los **mioblastos** de L6 se cultivaron en medio de *mantenimiento* consistente en DMEM suplementado con un 10% de FBS y un 1% de la mezcla de los antibióticos penicilina y estreptomycinina. Para obtener **miotubos**, se sembraron los mioblastos y después de 48-72 h, al llegar a un 80% confluencia aproximadamente, se les substituyó el medio de mantenimiento por el de *diferenciación*, consistente en DMEM suplementado con un 2% de FBS y un 1% de la mezcla de los antibióticos penicilina y estreptomycinina.

Las **C2C12** son una línea de mioblastos derivados de músculo de ratón. Su capacidad proliferativa y de diferenciación es mayor que la que presentan las L6. El cultivo de los **mioblastos** de C2C12 se realizó en las mismas condiciones que el de L6.

Para obtener **miotubos**, se sembraron los mioblastos y después de 48–72 h, al llegar a un 80% confluencia aproximadamente, se les substituyó el medio de mantenimiento por el de *diferenciación* consistente en DMEM suplementado con un 2% de suero de caballo (HS) y un 1% de la mezcla de los antibióticos penicilina y estreptomina.

Para que las L6 o las C2C12 mantengan su capacidad de diferenciación, es imprescindible que los mioblastos mantengan un número bajo de divisiones (≤ 14) y que no lleguen a confluencia con anterioridad al momento de la diferenciación. Por ello, se sembraron siempre en una cantidad (ver Tabla 1) que asegurase que alcanzaban el momento de diferenciación en condiciones óptimas (aproximadamente a una confluencia del 80%).

DÍAS DE CRECIMIENTO	ÁREA DE CULTIVO (tamaño de placa)	L6 (n° de células)	C2C12 (n° de células)
2	10 cm diámetro ¹	600.000	440.000
	6 x well	150.000	110.000
3	10 cm diámetro	300.000	220.000
	6 x well	75.000	55.000

TABLA 1: Confluencia a la que sembrar los mioblastos de L6 y C2C12 según los días de crecimiento (previos a la diferenciación) y el área de cultivo.

II. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS MEDIANTE FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

Durante esta tesis se ha realizado el fraccionamiento subcelular partiendo tanto de muestras celulares en cultivo como de tejidos. Fue necesaria en ambos casos la obtención de extractos proteicos correspondientes a diferentes fracciones subcelulares (mitocondria, citosol, etc.), con el fin de detectar específicamente proteínas para las que resultaba importante su localización intracelular.

¹ Una placa de estas dimensiones equivale a una superficie de cultivo de 58.1 cm², mientras que una 6 x well equivale a 9.6 cm².

II.1 FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR A PARTIR DE CÉLULAS EN CULTIVO

SOLUCIÓN DE HOMOGENIZACIÓN: 10 mM Hepes pH 7.4, 250 mM Sacarosa, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, mezcla de inhibidores de proteasa *Complete-Mini Protease* (Roche) (1 pastilla hidrosoluble/10 ml)

PROCEDIMIENTO:

- Se separan las células de la superficie de cultivo con el método habitual (tripsina...)
- Sedimentar las células centrifugando a 400-500 g durante 5 min.²
- Se añade 1 ml de solución de homogenización a cada placa de cultivo (placas de 10 cm de diámetro) y se sitúa la superficie de las placas en contacto con hielo.
- Se homogenizan los extractos con un homogenizador de vidrio, realizando 50 golpes y manteniendo la muestra en contacto con hielo³.
 - Se reserva una fracción que se considera **Homogenado total**
- Se centrifugan las muestras a 1500 g 10 min. a 4°C para eliminar núcleos y otras fracciones densas.
- Se centrifugan los sobrenadantes a 10.000 g 10 min. a 4°C
- Resuspender el sedimento anterior en aproximadamente 30 µl de solución de homogenización
 - El sedimento se considerará la **Fracción Mitocondrial** (se trata de una fracción enriquecida, no pura, que también contiene otros orgánulos como pueden ser el retículo endoplasmático)
- Los sobrenadantes de la centrifugación anterior se someten a una ultracentrifugación de 1h a 100.000 g a 4°C para eliminar cualquier resto de membrana
 - Los sobrenadantes resultantes se consideran como **Fracción citosólica**

² Es posible realizar el mismo proceso partiendo de placas congeladas secas. En este caso se lavaron previamente a la congelación con PBS y se recogieron las células directamente de la placa descongelada con la solución de homogenización. Sin embargo, en aquellos procesos en los que resultaba importante la integridad de los orgánulos intracelulares, se evitó el congelar las células previamente.

³ En el caso de partir de **células musculares**, la homogenización se realizó manualmente con una jeringuilla de 22-G (15 aspiraciones) lo que favorece el rendimiento en la obtención de la fracción mitocondrial.

II.2 OBTENCIÓN DE FRACCIÓN MITOCONDRIAL DE MÚSCULO

SOLUCIÓN DE HOMOGENIZACIÓN: 440 mM Sacarosa, 20 mM Na⁺/MOPS, 1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, pH 7.2.

PROCEDIMIENTO:

- Se añaden a 100 mg⁴ de tejido (fresco o congelado) 4 ml de solución de homogenización. Es importante mantener en frío las muestras durante todo el proceso.
- Homogenizar el tejido con la ayuda de un politrón (velocidad intermedia) en tres periodos de 10 segundos (hasta lograr la completa disgregación del tejido).
 - Puede reservarse una fracción como **Homogenado total**
- Centrifugar las muestras a 1000 g 10 min. a 4°C
- Centrifugar el sobrenadante anterior a 1000 g 10 min. a 4°C
- Centrifugar el sobrenadante anterior a 10.000 g 10 min. a 4°C
- Resuspender el sedimento en unos 400 µl de solución de homogenización
- El sedimento se considerará la **Fracción Mitocondrial** de músculo

III. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

En la cuantificación de proteína de las muestras se han utilizado dos *kits* en dependencia de la naturaleza de las mismas (*BCA PROTEIN ASSAY KIT* (PIERCE) y *BRADFORD ASSAY KIT* (BIO-RAD)). Ambos se basan en reacciones colorimétricas entre diferentes colorantes y las proteínas. En los dos casos se siguieron las indicaciones del fabricante, y las consideraciones más importantes a tener en cuenta en su elección, se recogen en la tabla 2.

Aquellos extractos que presentan un elevado contenido en membranas, como mitocondrias y homogenados totales, pueden ser difíciles de solubilizar. Por este motivo, en las alícuotas a valorar de dichas fracciones, se añadió un detergente (0,1% final de Tritón x-100 (Roche)) que asegurase la correcta cuantificación de las proteínas presentes en la muestra.

⁴ 100 mg de músculo equivalen aproximadamente a un músculo gastrocnemio de un ratón adulto.

	<i>BCA PROTEIN ASSAY KIT</i> (PIERCE)	<i>BRADFORD ASSAY KIT</i> (BIO-RAD)
Rango de detección (μg proteína)	0-40	0-12
Longitud onda Lectura (nm)	562	595
Incubación previa a lectura	30 min. 37°C	10 min. a Temp amb.
Muestras con detergente	Lectura posible	No es posible (Interferencias)

TABLA 2: Características diferenciales entre dos métodos de valoración de proteína

Para las rectas patrón de proteína se utilizó una solución comercial de BSA (albúmina sérica bovina), a una concentración de 2mg/ml (Pierce).

IV. ANÁLISIS POR *WESTERN BLOT*

El *Western Blot* es una de las técnicas más comunes en la detección y análisis de proteínas. Consiste en una primera fase de **electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida** donde las proteínas desnaturalizadas son separadas en función de su peso molecular (Laemmli, 1970). En nuestro caso se ha utilizado un sistema de electroforesis *Mini-Protean II* (Bio-Rad).

Tras la electroforesis, las proteínas se transfieren a una matriz sólida apta para realizar la inmunodetección (membranas de PVDF, *Immobilon-P Transfer Membrane*, Millipore), utilizando un sistema de **electrotransferencia** (*TransBlot Cell*, Bio-Rad).

Sobre la membrana se realiza la **inmunodetección** de las proteínas de interés mediante los anticuerpos específicos correspondientes (ver apartado IV.1). A fin de evitar uniones inespecíficas del anticuerpo a la superficie de la membrana, se trató a la membrana con una *solución de bloqueo* (PBS 0,1% Tween 20 y 5% leche en polvo) rica en proteínas, previamente a la incubación con el anticuerpo primario. Tanto el bloqueo como la incubación con el anticuerpo primario, se realizó a temperatura ambiente durante 1 h o a 4°C durante una noche, y en agitación suave.

En todos los casos, los anticuerpos secundarios utilizados estaban conjugados con el enzima HRP (*Horse-Raddish Peroxidase*) y la detección se realizó mediante el sistema **ECL** (*Enhanced Chemiluminiscent System*, Amersham).

Cuando fue necesario precisar las diferencias en los niveles de proteína detectados para las diferentes muestras, se realizó un **análisis densitométrico** sirviéndose del programa informático *Phoretix* (Millipore).

IV.1 ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS

PROTEÍNA DE UNIÓN DEL ANTICUERPO	REFERENCIA COMERCIAL	OTRAS ESPECIES RECONOCIDAS	PESO MOLECULAR BANDA (KDa)	DILUCIÓN	ORIGEN ANTICUERPO	ASTRINGENCIA LAVADOS (%Tween 20)
UCP3 (humana)	Chemicon AB3046	Rata, ratón	34	1:1000	Conejo	0.1%
CO-I (humana)	Molecular Probes A6403	Rata	37 [#]	1:500	Ratón	0.1%
CITOCROMO c (paloma)	Pharmingen clon 7H8.2C12	Rata, ratón	15	1:500 ^{**}	Ratón	1%
BAX (humana)	Santa Cruz sc-493	Rata, ratón	23	1:350	Conejo	1%
Bcl-2 (humana)	Santa Cruz sc-509	---	26	1:500	Ratón	1%
CASPASA-9 (humana)	New England Biolabs 9505	---	37	1:1000 [*]	Ratón	0.1%
CASPASA-9 (rata)	New England Biolabs 9507	---	37.5	1:500 [*]	Ratón	0.1%
CAVEOLINA 3 (rata)	BD Pharmingen (610421)	Ratón	18	1:1000	Ratón	1%
α-TUBULINA (pollo)	Sigma clon DM-1A	Rata, humana	55	1:1000	Ratón	1%
PORINA O VDAC (humana)	Calbiochem Anti-Porin 3HL 529536	Rata, ratón	31	1:1000	Ratón	1%
β-ACTINA (ratón)	Sigma clon AC-15	Rata, humana	47	1:10.000	Ratón	1%

TABLA 3: Anticuerpos primarios utilizados en análisis por *western blot*

* Dilución del anticuerpo en una solución de PBS 0,1% Tween 20 y 5 % de leche en polvo

** Para la inmunodetección con este anticuerpo es necesario disminuir la astringencia, por lo que la dilución de del anticuerpo se realizó en PBS 0,05% Tween 20 y 5 % de leche en polvo, y la dilución del anticuerpo secundario en PBS y 1% de leche en polvo

El peso molecular predicho en base a la secuencia de aminoácidos es de unos 57 KDa. Sin embargo, esta proteína muestra una movilidad electroforética superior (37 KDa) en geles con un elevado porcentaje de acrilamida (superior al 10%) .

Las soluciones de anticuerpos primarios (Tabla 3) pueden conservarse congeladas (-20°C) durante meses y ser reutilizadas en varias inmunodetecciones, siempre en dependencia de la estabilidad del anticuerpo en concreto. De no especificarse lo contrario, todos los anticuerpos se disolvieron en una solución de PBS con un 0,1% Tween 20 y un 1% de leche en polvo.

La especificidad de unión del anticuerpo a la proteína está fuertemente influenciada por la dilución del anticuerpo y por el grado de astringencia que mantengamos durante el proceso de detección. En la mayoría de casos, los lavados se realizaron con una solución de PBS al 1% de Tween 20, lo que supone una elevada astringencia. En aquellos casos en que la unión era más frágil, se disminuyó la concentración de detergente para favorecer la unión (Tabla 3).

IV.2 ANTICUERPOS SECUNDARIOS UTILIZADOS

Como ya se ha mencionado anteriormente, los anticuerpos secundarios utilizados estaban conjugados a la peroxidasa de rábano (HRP). En todos los casos fueron diluidos 1:3000 en una solución de PBS 0.1% Tween 20 y 1% leche en polvo. Los anticuerpos fueron los siguientes:

- ANTI IGGs DE CONEJO (Santa Cruz): IgGs de cabra contra las cadenas pesadas y ligeras de las IgGs de conejo.
- ANTI IGGs DE RATÓN (BIO-RAD): IgGs de cabra contra las cadenas pesadas y ligeras de las IgGs de ratón.

IV.3 REUTILIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS

Una vez usadas, las membranas se reutilizaron directamente si el anticuerpo secundario requerido en la siguiente inmunodetección era diferente o el tamaño de banda esperado difería suficientemente del primero. De no ser así, se retiró el anticuerpo unido a la proteína en la membrana mediante un proceso denominado *stripping*. El *stripping* consiste en someter a las membranas a unas condiciones de astringencia (agentes reductores, detergentes, y temperatura) que favorezcan al máximo la disociación del

anticuerpo de las proteínas a las que estaba unido, sin afectar a las propiedades de la membrana.

Se utilizaron dos protocolos distintos, uno suave y otro de condiciones más extremas, en función de lo delicada que fuera la siguiente inmunodetección.

SOLUCIÓN DE *STRIPPING* SUAVE: 62.5 mM Tris HCl pH 6.8, 2% SDS, 14 mM β -mercaptoetanol.

SOLUCIÓN DE *STRIPPING* : 62.5 mM Tris HCl pH 6.8, 2% SDS, 100 mM β -mercaptoetanol

SOLUCIÓN DE LAVADO: PBS 1% Tween 20

PROCEDIMIENTO:

- *STRIPPING* :

- Incubar la membrana en 50 ml de *solución de stripping* durante 30 min. a 55 °C y en agitación fuerte

- Realizar tres lavados de la membrana con *solución de lavado* a temperatura ambiente y en agitación fuerte (si es necesario, incrementar el número de lavados hasta haber eliminado por completo el β -mercaptoetanol)

- *STRIPPING* SUAVE:

- Incubar la membrana en 50 ml de *solución de stripping suave* durante una noche a temperatura ambiente y en agitación suave

- Realizar tres lavados de la membrana con *solución de lavado* a temperatura ambiente y en agitación fuerte.

Al finalizar el *stripping* es necesario bloquear de nuevo la superficie de las membranas.

V. ENSAYOS DE CONSUMO DE OXÍGENO

Una forma de valorar la funcionalidad de las mitocondrias aisladas es la determinación de la tasa de consumo de oxígeno. Durante el proceso de aislamiento, las mitocondrias pueden ver afectada la integridad de sus membranas, lo que afecta a su actividad respiratoria. No obstante, existen protocolos de aislamiento de mitocondrias a

partir de tejidos que minimizan el riesgo de afectar a la funcionalidad mitocondrial (ver apartado XIX).

En el caso de partir de células en cultivo es necesaria gran cantidad de material de origen y aún así, el riesgo de afectar la integridad de las mitocondrias durante la manipulación es muy elevado. Por ello, la determinación del consumo de oxígeno en células se realizó sobre células permeabilizadas, evitando así el procedimiento de aislamiento (ver apartado V.3).

V.1 EL ELECTRODO DE OXÍGENO

La velocidad de consumo de oxígeno se determinó utilizando un electrodo de oxígeno tipo Clark (Rank Brothers). El electrodo de oxígeno realiza lecturas polarográficas de forma continua, del consumo de oxígeno en el interior de una cámara de incubación sellada. Éstas se transmiten a un sistema informático que transforma la señal eléctrica recibida, en valores relativos de la concentración de oxígeno presente en el medio (*PicoLog Recorder*, Pico Technology).

V.1.1 FUNCIONAMIENTO DEL ELECTRODO DE OXÍGENO

El electrodo de Clark consta de una sección superior que contiene una cámara transparente dónde se sitúa la muestra y una inferior dónde se encuentran el ánodo y cátodo del electrodo. El interior de la cámara se mantiene a una temperatura constante mediante una corriente externa y continua de agua proveniente de un baño fijado a la temperatura deseada. Dicha cámara se mantiene en contacto con el electrodo a través de una fina membrana de teflón, que separa el medio de incubación isotónico, del electrolito (KCl) situado en el compartimiento del electrodo. La membrana queda atrapada entre los dos compartimientos y la unión se fija externamente mediante una pieza de plástico que actúa como tornillo. La cámara se cierra mediante un tapón ajustable evitando la disolución del aire de la habitación en el medio durante las mediciones. El tapón incorpora un orificio estrecho en el centro, lo que permite la expulsión de las burbujas de aire, así como la adición de pequeños volúmenes de reactivo durante los experimentos mediante una micro-jeringuilla (Hamilton). El contenido de la cámara se agita continuamente mediante un agitador magnético, a fin de garantizar la correcta disolución de compuestos y gases en su interior (ver Figura 1).

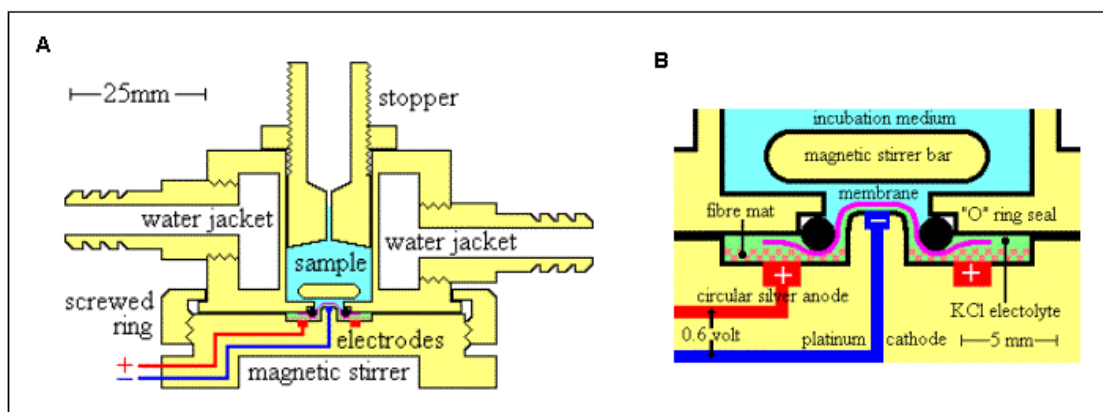
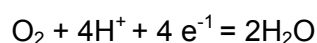
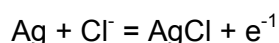


FIGURA 1: A. Electrodo de Oxígeno tipo Clark. **B** Detalle del electrodo en contacto con la cámara que contiene la muestra.

Un voltaje polarizante de 0.6 V se aplica entre el ánodo de plata (+) y el cátodo de platino (-). El oxígeno difunde a través del teflón de la membrana y es reducido a agua en el cátodo de platino:



El circuito se completa en el ánodo de plata, que es oxidado lentamente por el electrolito de KCl:



La corriente resultante es proporcional a la concentración de oxígeno en la cámara, y la señal eléctrica puede amplificarse y grabarse mediante un sistema informático. Por tanto, el proceso completo es dependiente del aporte de oxígeno. La tasa de difusión del oxígeno al cátodo, y por tanto, la corriente, depende de la concentración del oxígeno en la cámara dónde se encuentra la muestra. Otros factores que afectan a la solubilidad del oxígeno en el medio son la viscosidad del mismo, la permeabilidad de la membrana, la temperatura y la velocidad de agitación de la muestra.

V.1.2 CALIBRACIÓN Y MANTENIMIENTO DEL ELECTRODO DE OXÍGENO

El electrodo de oxígeno está diseñado para valorar la velocidad de un proceso físico-químico dinámico como es la respiración mitocondrial, lo que hace imposible una calibración interna. Por ello, periódicamente o ante cualquier desajuste del aparato (daño

de la membrana de teflón, etc.) es necesario recalibrarlo mediante un estándar conocido. En este caso se utilizó como estándar el aire disuelto en agua.

PROCEDIMIENTO:

- En primer lugar es necesario limpiar bien la superficie del electrodo con agua destilada⁵.
- Situar sobre el electrodo una cantidad de solución KCl 3M suficiente como para cubrir el ánodo y el cátodo evitando la formación de burbujas.
- Cubrir la superficie del electrodo con un trozo de membrana de teflón previamente lavada con agua destilada (Es muy importante que no se forme ninguna burbuja de aire entre la membrana y el electrolito).
- Situar el anillo de plástico que servirá para fijar la cámara sobre la membrana, en el centro del electrodo y situar la cámara encima, fijando la unión con el tornillo externo.
- Antes de conectar el electrodo a la fuente que le suministra la electricidad, determinar el 0 eléctrico pulsando el botón diseñado a tal efecto.
- Ajustar el voltaje polarizante a 0,6 V.
- Llenar la cámara con agua destilada y atemperar el baño a la temperatura deseada
- Una vez alcanzada la temperatura de trabajo, esperaremos unas horas hasta lograr que se equilibre la reacción redox que tiene lugar en el electrodo.
- Al lograr una lectura estable de la concentración de oxígeno fijaremos con la muestra en agitación, la referencia del 100% de concentración de oxígeno en la cámara. Para ello, podremos modificar la sensibilidad del aparato.
- Comprobar la respuesta del aparato. Al detener la agitación, la concentración debe descender rápidamente hasta alcanzar prácticamente el 0%. La recuperación del 100% al reanudar la agitación debe ser igualmente rápida y completa. En este punto podremos iniciar las valoraciones experimentales (ver figura 2).
- Cambiar el agua del interior de la cámara por el volumen necesario del tampón requerido y fijar el 100% de oxígeno para el nuevo medio ajustando de nuevo la sensibilidad del aparato.

⁵ Con el uso del aparato, el AgCl precipita sobre el ánodo de plata y dificulta la transmisión de corriente eléctrica. Por ello, es conveniente exponer el electrodo a una solución de amoníaco al 10% durante unos segundos, lo que permite retirar completamente los precipitados. Este paso es extremadamente delicado y debe realizarse rápidamente, ya que la solución de amoníaco podría dañar las estructuras del aparato. Inmediatamente después es conveniente lavar la superficie del electrodo con abundante agua destilada

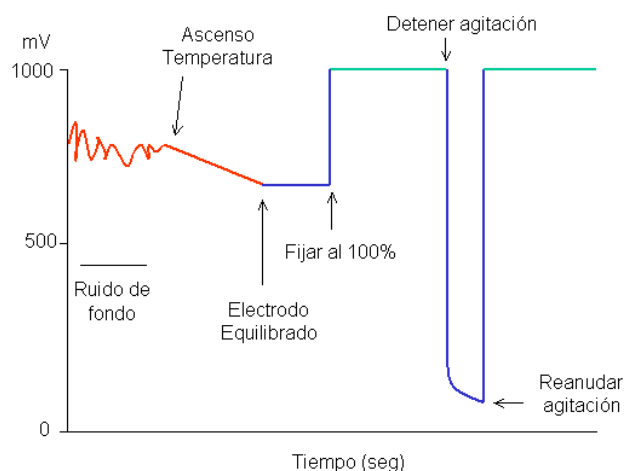


FIGURA 2: Efecto de los procedimientos habituales de calibración del electrodo sobre la concentración de oxígeno.

V.1.3 CONVERSIÓN DE LA SEÑAL ELÉCTRICA A CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO

Las lecturas obtenidas con el electrodo de oxígeno se transfieren al ordenador mediante un programa informático. Éste nos proporciona una señal eléctrica proporcional a la concentración de oxígeno, lo que nos permite calcular la velocidad de consumo de oxígeno o respiración (JO) según la fórmula:

$$JO \text{ (natO/min mg)} = \frac{\left(\frac{\Delta(\%O_2)}{\Delta t} \times 60 \text{ seg} \times FS(O) \right)}{\text{Prot (mg)}}$$

La temperatura y composición del medio afectan a la solubilidad del oxígeno y a su difusión. Por ello se emplearon los índices de difusión del oxígeno definidos para cada temperatura en un medio 0,25 M de sacarosa ($p=100 \text{ atm}$), que fue el empleado en los ensayos de respiración (FS) ⁶.

FS (25°C): 218 μM

FS (28°C): 208 μM

FS (37°C): 183 μM

⁶ Al hacer los cálculos hay que tener en cuenta que cada molécula tiene dos átomos de oxígeno: $FS(\mu\text{M}) \times 2 \text{ (át)} \times \text{volumen (L)}$. (micro-átomos de oxígeno)

V.2 DETERMINACIÓN DE LA RESPIRACIÓN EN CÉLULAS ENTERAS

Determinamos la tasa de consumo de oxígeno en células 293-HEK enteras utilizando como sustrato oxidativo la glucosa contenida en el medio de respiración (DMEM; HEPES 5 mM pH 7.4). Este ensayo está limitado por la necesidad de utilizar compuestos que sean capaces de atravesar las membranas celulares. En ensayos preliminares, es necesario ajustar el número de células incluidas en cada punto para conseguir una lectura adecuada en el electrodo de oxígeno. En nuestro caso fijamos la cantidad de células por punto en 5-15 millones. También es importante verificar la viabilidad de las células durante el proceso. Con este fin, realizamos una tinción con el colorante *trypan blue*, y determinamos que en las condiciones de incubación de nuestro ensayo, la viabilidad de las células no estaba significativamente alterada⁷.

En la realización de esta tesis se ha utilizado esta metodología para determinar el consumo de oxígeno en diferentes condiciones.

- JO_{basal} : tasa de consumo de oxígeno basal
- JO_{CCCP} : capacidad máxima de respiración (en presencia de 1 μM CCCP, agente desacoplante⁸)
- $JO_{\text{oligomycin}}$: respiración independiente de la síntesis de ATP (en presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de oligomicina, inhibidor específico de la ATP sintasa)

Los diferentes reactivos se añadieron 5 min antes de iniciar la lectura, en el caso de la oligomicina (para permitir la internalización del compuesto en la mitocondria), o poco antes de finalizar⁹, en el caso del CCCP. El tiempo en que se realiza la lectura es arbitrario y normalmente viene condicionado por el que es necesario para obtener una lectura regular y por tanto, fiable.

⁷ La tinción se realiza resuspendiendo a las células en una dilución 0.4% de *trypan blue*. La viabilidad celular transcurrida una hora era del 90-95%.

⁸ El CCCP disipa el gradiente electroquímico de protones a lo largo de la membrana mitocondrial y estimula así, la respiración hasta su máximo nivel. El CCCP es un agente protonofórico y en cantidad excesiva puede dañar la integridad de la membrana mitocondrial, provocando una inhibición de la cadena respiratoria, efecto opuesto al deseado. Por ello, es importante fijar la dosis de CCCP a la que obtenemos una velocidad de respiración máxima y no excederla. Dicha concentración puede depender del tipo celular, concentración de células en la cubeta etc. En experimentos preliminares fijamos la concentración máxima de CCCP en nuestras condiciones, en 1 μM .

⁹ El tapón de la cámara dispone de un estrecho orificio a través del cuál se pueden adicionar soluciones con la ayuda de una jeringuilla Hamilton. Este proceso se ha de realizar muy cuidadosamente a fin de evitar la entrada de aire en la cámara. Es conveniente reservar una jeringuilla para cada tipo de disolvente a utilizar (acuosos y orgánicos, por ejemplo).

TAMPÓN DE RESPIRACIÓN: DMEM suplementado con 5 mM de HEPES, pH 7.4

PROCEDIMIENTO:

- Equilibrar electrodo con el tampón de respiración.
- Lavar las células con PBS y recogerlas de la placa con citrato sódico (apartado I.2).
- Precipitar las células mediante una centrifugación suave (400 g, 2 min).
- Resuspender el precipitado celular en 1 ml de tampón de respiración.
- Se colocan las células en la cámara del electrodo de oxígeno manteniendo una agitación suave. Ajustar el tapón al volumen de la muestra (evitando dejar burbujas de aire que podrían interferir en la lectura)
- Se realiza la lectura continua de la concentración de oxígeno durante 10 min a 37°C con un electrodo de Clark acoplado a un ordenador (apartado V.1.1).
- Al final de la lectura, recoger el contenido de la cubeta y precipitar de nuevo las células (400g, 5 min). Los precipitados pueden conservarse a -20°C hasta el momento de proseguir valorando la concentración de proteína.
- Para asegurar la completa disrupción de las membranas, se adiciona un detergente (0.1% Tritón X-100 final).
- Centrifugar las muestras para eliminar restos insolubles (2 min a máxima velocidad). La valoración de la concentración de proteína se realiza sobre 10-30 µl de sobrenadante por el método de *BCA Protein Assay Pierce* (apartado III).

V.3 DETERMINACIÓN DE LA RESPIRACIÓN EN CÉLULAS PERMEABILIZADAS

Como hemos visto anteriormente, el estudio de parámetros bioenergéticos está muy limitado en células enteras debido a la variable permeabilidad de la membrana a los diferentes sustratos, inhibidores, etc. Por este motivo, la mayoría de estudios se realizan a partir de mitocondrias asiladas. Sin embargo, la preparación de mitocondrias a partir de células puede ser compleja y es fácil dañar las mitocondrias en el proceso. Además, en este tipo de preparaciones, es necesaria una gran cantidad de material celular de partida. Por ello, se han descrito diferentes técnicas para la valoración del consumo de oxígeno sobre células permeabilizadas. En este trabajo, hemos utilizado la digitonina, un detergente que interacciona con el colesterol, para permeabilizar la membrana plasmática de las 293-HEK, según lo descrito por Ouhabi et al. (Ouhabi et al., 1998).

Es importante utilizar una dosis de digitonina que no afecte a la integridad de la membrana mitocondrial. Por ello, se incubaron células en presencia de ADP y se valoró el aumento en la tasa de respiración, en respuesta a un sustrato que normalmente no atraviesa la membrana plasmática (succinato 6 mM). Así, se determinó la concentración mínima de detergente que permitía la entrada del sustrato, sin dañar a la función mitocondrial. Establecimos la dosis óptima de digitonina en 25 $\mu\text{g/ml}$ para las células 293-HEK.

Una vez fijada la dosis de digitonina, se puede analizar el consumo de oxígeno en diferentes condiciones. En nuestro caso, se valoró el consumo de oxígeno en estado 4 utilizando como sustrato 6 mM de succinato, y en presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de oligomicina, para determinar posteriormente la respuesta a palmitato (10 μM) y GDP (1 mM).

TAMPÓN DE RESPIRACIÓN: 250 mM sacarosa, 1 mM EDTA, 50 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4 , 25 mM Tris-HCl, pH 7.4

PROCEDIMIENTO:

- Equilibrar electrodo con el tampón de respiración.
- Lavar las células con PBS y recogerlas de la placa con citrato sódico.
- Precipitar las células mediante una centrifugación suave (400 g, 2 min).
- Resuspender el precipitado celular en 1 ml de tampón de respiración.
- Incubar las células en el interior de la cámara con la digitonina durante 5 min (manteniendo agitación suave y la cámara abierta).
- Añadir el sustrato de respiración y otros reactivos si es necesario (6 mM succinato; 10 $\mu\text{g/ml}$ oligomicina).
- Cerrar la cámara y realizar lectura continua de la concentración de oxígeno durante 10 min a 37°C.
- Adicionar los compuestos requeridos durante la lectura. En nuestro caso adicionamos dos pulsos de palmitato (5 μM) y un último de GDP (1 mM). Justo antes de finalizar la lectura, añadimos de 0.25-10 μM de CCCP, para tener el valor máximo de respiración en cada punto. Es importante esperar a adicionar cada nuevo pulso, a que la señal eléctrica dé una lectura estable.
- Al final de la lectura, recoger el contenido de la cubeta que puede conservarse a -20°C hasta el momento de proseguir valorando la concentración de proteína (según lo descrito en el apartado V.2).

V.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOCROMO C OXIDASA

La valoración de la actividad Citocromo c Oxidasa (Complejo IV) es un reflejo de la capacidad respiratoria mitocondrial. Por ello, las tasas de respiración en diferentes condiciones, obtenidas de células permeabilizadas, fueron referidas a dicha capacidad respiratoria máxima. Para determinar la actividad Citocromo c oxidasa, aprovechamos la existencia de un compuesto como el TMPD (*N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine), que dona sus electrones directamente al enzima, permitiendo la reducción del oxígeno. El ácido ascórbico a su vez, dona electrones al TMPD. De modo que la adición conjunta de estos compuestos (0.5 mM TMPD y 1mM Ascorbato) en un medio donde se inhibe la entrada de electrones habitual al complejo IV (en nuestro caso, mediante la adición de 0.25 µg/ml Antimicina A que inhibe el Complejo III), nos permite estimar la actividad máxima del enzima. Los ensayos se realizaron con el mismo procedimiento descrito anteriormente¹⁰ (apartado V.3).

VI. DETERMINACIÓN DE LA VARIACIÓN DE POTENCIAL MITOCONDRIAL

La **Rhodamina 123** (Sigma) es una sonda fluorescente que se transloca al interior de la mitocondria en función del $\Delta\Psi_m$ (potencial de membrana mitocondrial). Cuanto mayor es el $\Delta\Psi_m$ menos es la fluorescencia emitida por la sonda (hay menos sonda libre). En nuestro caso fue utilizada para determinar el efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial del palmitato (10 µM) y el GDP (1 mM) en células permeabilizadas 293-HEK y en estado 4 (succinato 6 mM y oligomicina 10 µg/ml).

TAMPÓN DE PERMEABILIZACIÓN: 0.5 µg/ml digitonina, 250 mM sacarosa, 1 mM EDTA, 50 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, 25 mM Tris-HCl, pH 7.4.

PROCEDIMIENTO:

- Lavado de las células con PBS
- Recoger la células con citrato sódico
- Contar el número de células con una cámara de Neubauer y precipitar (400 g, 5 min) 12 millones de células¹¹

¹⁰ El TMPD es un compuesto que adquiere un color violáceo cuando se oxida, por lo que conviene prepararlo justo antes de su utilización y reservar una parte de las muestras para valorar la concentración de proteína *a posteriori*.

¹¹ La fluorescencia emitida por la rhodamina dependerá de la cantidad de membranas que se hallen en la cubeta, por lo que resulta ,muy importante fijar esta cantidad en todos los puntos a comparar entre sí.

- Resuspender las células en 1.5 ml de tampón de permeabilización e incubar durante 5 min ¹² en agitación suave (en el interior del fluorímetro) y en presencia de succinato 6 mM y oligomicina 10 µg/ml.
- Añadir 0.5 µg/ml de rodamina 123
- Realizar la lectura de la fluorescencia a temperatura ambiente y en agitación suave, a una longitud de onda de emisión de 525 nm y una excitación de 485 nm (Fluorímetro Shimadzu RF-5001PC) y añadir los diferentes compuestos de interés durante el proceso. En nuestro caso, añadimos dos pulsos de palmitato (5 µM), uno de GDP (1 mM) y finalmente, CCCP (0.25-1 µM). Las variaciones de fluorescencia obtenidas en respuesta a los diferentes compuestos adicionados (palmitato, GDP etc) se referirán en cada caso al valor máximo de fluorescencia que se alcanza tras inducir un colapso completo del $\Delta\Psi$ con CCCP. Los aumentos de $\Delta\Psi_m$ se detectan como descensos en la fluorescencia emitida por la sonda.

VII. TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS

VII.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES PARA LA VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD CASPASA

Cuando la célula recibe una señal pro-apoptótica, se activan toda una serie de proteínas en cascada. Entre ellas, se encuentran las caspasas. La actividad caspasa se considera por ello, marcador del proceso apoptótico. En este caso, se ha valorado la actividad de dos enzimas, como son la caspasa-9 (implicada en eventos tempranos del proceso iniciado en la mitocondria), y la caspasa-3 (considerada efectora o implicada en eventos terminales del proceso apoptótico). Se han utilizado métodos distintos en la valoración de dichas actividades, en función de cuál nos permitía una detección óptima de las mismas. Así, mientras que la actividad enzimática correspondiente a la caspasa-3 pudo ser valorada fluorométricamente, la de la caspasa-9 se determinó a partir de anticuerpos específicos contra la forma activa de este enzima. En cualquier caso la obtención de los extractos celulares a partir de los cuales se realizó la valoración, fue la misma:

¹² En nuestro caso, el interés del experimento era medir las variaciones de potencial en estado 4, por lo que esta incubación se realizó en presencia de 6 mM succinato y 10 µg/ml de oligomicina.

TAMPÓN DE LISIS: 25 mM Hepes pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 2 mM PMSF (*phenyl methyl sulfonyl fluoride*), 10 µg/ml Leupeptina y 10 µg/ml Pepstatina A.

PROCEDIMIENTO:

- Lavado de las células con PBS (Se puede mantener la placa seca a -80°C hasta el momento de proseguir con el procedimiento)
- Se recogen las células con 200 µl de Tampón de lisis (Es importante mantener las muestras en frío durante todo el proceso)
- Se somete a las células a 3 ciclos de congelación-descongelación (-80°C/37°C). Con el fin de lograr la completa ruptura de las membranas celulares, en el caso de partir de células de origen muscular, se realizará previamente una homogenización (10-15 aspiraciones) con jeringuilla (22-G)
- Centrifugación durante 20 min a 4°C a 16.000 g. Descartaremos el precipitado siendo el sobrenadante el extracto celular deseado
- Valoración de la concentración de proteína utilizando el *Bradford Assay kit* (Bio-Rad) sobre 2-5 µl de muestra

VII.1.1 VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD CASPASA-3

La determinación de la actividad enzimática caspasa-3 se basa en la detección fluorimétrica del AMC (*amino-4-trifluoromethyl coumarin*) generado tras la proteólisis del sustrato sintético específico de la caspasa-3, Ac-DEVD-AMC (BD Pharmingen). Al liberarse, el AMC emite fluorescencia azul a 460 nm si se excita a una longitud de onda de 360 nm. De ese modo, la fluorescencia emitida será proporcional a la cantidad de sustrato procesado, y por tanto, a la actividad caspasa-3 presente en el extracto celular.

TAMPÓN DE INCUBACIÓN: 312.5 mM Hepes pH 7.5, 31.25% Sacarosa, 0.3125% CHAPS

PROCEDIMIENTO:

- Se preparan las **muestras** adicionando:
 - Extracto celular (Se añade 400 µg de los extractos celulares en el caso de células epiteliales, y 100 µg en el de células musculares)
 - 10 µl DMSO

- 10 mM DTT
- 160 μ l Tampón de Incubación
- Agua bidestilada (hasta un volumen final de 500 μ l)

Igualmente, se incluyó en cada ensayo, un **blanco** para establecer el nivel de fluorescencia basal en las muestras, con los mismos constituyentes que el resto de muestras salvo la proteína del extracto.

Para determinar la especificidad del sustrato, se incluyó un punto en cada ensayo en el que se adicionó a una muestra, un **inhibidor específico** de la familia de caspasas a la que pertenece la caspasa-3 (CPP32 inhibitor Ac-DEVD-CHO, Promega) a una concentración de 50 μ M

- Se pre-incubaron las muestras a 37°C durante 30 min
- Se añadió el sustrato Ac-DEVD-AMC a una concentración de 50 μ M
- Se incubaron las muestras a 37°C durante 1h protegidas de la luz
- Lectura de la fluorescencia emitida a 460 nm (excitación a 360 nm)

VII.1.2 VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD CASPASA-9

La actividad caspasa-9 se valoró a partir de anticuerpos específicos contra epítomos presentes exclusivamente en la forma activa de la proteína (ver apartado IV.1). Una vez obtenidos los extractos celulares (ver apartado VII.1), 75 μ g de los mismos, se analizaron mediante la técnica de *Western Blot* para determinar la cantidad de caspasa-9 activa presente en las muestras.

La forma activa o procesada de la proteína tiene un tamaño de 37 kDa en humanos y de 37.5 kDa en rata. En el primer caso, se emplearon geles de acrilamida al 12.8%, mientras que en el segundo, fue necesario reducir el porcentaje al 10% con el fin de obtener un patrón de bandas específicas limpio.

VII.2 ENSAYO DE LIBERACIÓN DE CITOCROMO C

El Citocromo c es una proteína que se encuentra normalmente asociada a la membrana mitocondrial interna y en el espacio intermembrana mitocondrial, participando en el transporte de electrones que tiene lugar durante la respiración. Sin embargo, ante determinadas señales pro-apoptóticas que actúan vía la mitocondria, el citocromo c se libera al espacio citosólico dónde mediante su interacción con otras proteínas, desencadena el proceso de apoptosis. Por tanto, la aparición de citocromo c en el

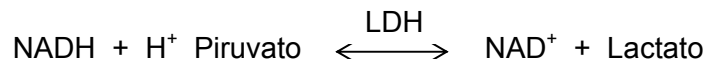
citoplasma se considera como marcador apoptótico, indicando además una implicación mitocondrial en el proceso.

Para la detección del citocromo c en el citosol de células 293-TetOn y 293-UCP3, se procedió al fraccionamiento subcelular tal y como se indica en el apartado II.1. En este caso, resulta primordial el partir de células intactas (sin congelar previamente), así como extremar el cuidado en las homogenizaciones, ya que cualquier ruptura de la membrana mitocondrial durante la manipulación, puede provocar la liberación artefactual del citocromo c a la fracción citosólica.

Las fracciones citosólicas (75 µg) se utilizaron en la detección por *western blot* del citocromo c. Al tratarse de una proteína pequeña de aproximadamente 15 KDa, se utilizaron geles al 15% de acrilamida.

VIII. CUANTIFICACIÓN DE NADH EN HOMOGENADOS DE CÉLULAS

Para realizar la cuantificación de NADH en células 293, utilizamos la reacción que cataliza la Lactato deshidrogenasa:



Así, la cantidad de NADH (moles), es equivalente a la del NADH oxidado en esta reacción. Dicha oxidación puede ser monitorizada espectrofotométricamente como el descenso en absorbancia a 340 nm según:

$$\Delta\text{DO} = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

ΔDO : variación de la absorbancia o densidad óptica a 340 nm ($\text{DO}_{\text{inicial}} - \text{DO}_{\text{final}}$)

ε : coeficiente de extinción molar ($6.317 \cdot 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ para el NADH)

c: concentración (M)

l: longitud arista de la cubeta (10 mm)

MATERIAL: - Tampón Tris-NaCl (81.3 mM Tris, 203.3 mM NaCl) para diluir los

reactivos.

- Solución de Homogenización: 10 mM Hepes pH 7.4, 250 mM Sacarosa, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, mezcla de inhibidores de proteasa Complete-Mini Protease (Roche) (1 pastilla hidrosoluble/10 ml)
- Piruvato 97,6 mM en Tris-NaCl.
- Lactato deshidrogenasa de corazón de cerdo (LDH, Roche).

PROCEDIMIENTO:

- Homogenizar las células mediante el protocolo descrito en el apartado II.1 (utilizando una homogenización con jeringuilla).
- Centrifugar a 1500 g 5 min.
- Lectura de la concentración de proteína (método *Bradford*, ver apartado III).
- Atemperar todos los reactivos a 30°C.
- Fijar las condiciones del ensayo enzimático:
 - 30°C en la cámara del espectrofotómetro
 - 360 seg
 - intervalos de lectura cada 60 seg
 - tiempo espera (*lag time*) 0.
- Establecer Blanco de la reacción con una muestra conteniendo:
 - 1 ml tampón Tris-NaCl
 - 3 M Piruvato (30 μ l)
 - 30 μ g/ml LDH
- Lectura 1-2 mg de proteína. Igualar el volumen de todas las muestras con tampón Tris-NaCl y adicionar en orden:
 - 350 μ l tampón Tris-NaCl
 - 3 M Piruvato (30 μ l)
 - 30 μ g/ml LDH
 - 600 μ l muestra
- Iniciar la lectura inmediatamente después de añadir la muestra, y transcurridos 6 min.

IX. CUANTIFICACIÓN ATP EN CÉLULAS

La valoración de ATP se realizó mediante el *ATP Bioluminescence Assay kit HS II* (Roche) sobre células 293-HEK.

X. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE CÉLULAS Y TEJIDOS

En la realización de esta tesis se han empleado varias técnicas para determinar perfiles de expresión génica en los diferentes modelos experimentales. Para ello, fue necesaria la purificación de RNA de las muestras. Se utilizaron métodos distintos en función del origen de la muestra, escogiendo en cada caso aquél que ofrecía mayor rendimiento en cuanto a la cantidad y calidad del RNA obtenido.

En todos los casos, se tomaron las precauciones oportunas a fin de evitar contaminaciones con Ribonucleasas (RNasas), como son las de utilizar material exclusivo al trabajo con RNA y siempre que fuese posible previamente esterilizado, trabajar siempre con guantes, mantener unas condiciones higiénicas de la zona de trabajo idóneas, etc. Es importante remarcar que las propias muestras contienen RNasas. Una vez la muestra es extraída del organismo de origen, estas RNasas propias del tejido empiezan la destrucción del RNA. Por ello, los tejidos se congelaron inmediatamente (N₂ líquido). Así, durante cualquier manipulación de las muestras (pesado de los tejidos, etc.), es importante no permitir su descongelación hasta que éstas no se hayan completamente embebidas en un tampón que incorpore un inhibidor de RNasas. En el caso de partir de células en cultivo, se adicionó directamente sobre la placa el tampón adecuado.

El RNA aislado se conservó congelado a -20°C hasta el momento de su utilización.

X.1 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE CÉLULAS Y TEJIDOS DE ORIGEN NO MUSCULAR

En el caso de partir de células o tejidos de origen no muscular se utilizó el sistema *Rneasy* (Qiagen) siguiendo las instrucciones y recomendaciones del fabricante. Este método permite el aislamiento de RNA total a partir de pequeñas cantidades de material de forma rápida y sencilla.

El sistema se basa en la adición de un tampón de **lisis celular** altamente desnaturizante conteniendo isothiocianato de guanidina, un eficaz inhibidor de un

amplio espectro de Ribonucleasas. Tras la adición del tampón, es necesario **homogenizar**¹³ las muestras a fin de reducir la viscosidad del lisado y liberar el DNA genómico. Podemos partir de material congelado e igualmente los lisados son estables durante semanas a -80°C .

Al lisado se le une etanol y la mezcla se incorpora en una **columna *microspin***. El tampón, que presenta un elevado contenido en sales, conjuntamente al etanol añadido, crean unas condiciones que permiten la unión de hasta 100 μg de RNA (de longitud superior a 200 pb) a una matriz de silica-gel situada en la columna. Con el fin de no saturar la columna de afinidad es necesario no excederse en la cantidad de material de partida. Por ello, se partió aproximadamente de un millón de células en cultivo¹⁴ o de 30 mg de tejido.

Los siguientes pasos están encaminados a la **eliminación de contaminantes**. Para ello, se eluyen en repetidas ocasiones, tampones de lavado destinados a la expulsión de DNA, proteínas, sales, etc. Estas columnas permiten realizar centrifugaciones sobre volúmenes muy pequeños de muestra, acelerando el proceso y aumentando el rendimiento de las extracciones.

En un último paso, se **libera al RNA** de la unión a la matriz eluyendo con agua (se realizaron dos eluciones de 30 μl de agua cada una, para asegurar la máxima recuperación de RNA de la columna). El RNA obtenido es apto para intervenir en reacciones enzimáticas.

X.2 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE CÉLULAS Y TEJIDOS DE ORIGEN MUSCULAR

La cantidad y calidad del RNA obtenido a partir de tejido muscular utilizando la metodología comentada en el apartado X.1 no era la deseada. Así pues, en el caso de partir de células o tejidos de origen muscular se utilizó un sistema de extracción basado en el uso del reactivo de aislamiento *TriPure* (Roche) siguiendo las instrucciones y recomendaciones del fabricante. Este método permite el aislamiento de RNA, DNA y proteína total a partir de células en cultivo o tejidos. El protocolo es una adaptación del clásico desarrollado por Chomczynski y Sacchi (1987) (Chomczynski and Sacchi, 1987).

¹³ En el caso de los tejidos, la homogenización se realiza con un politrón. Una vez finalizada la homogenización, es posible la aparición de grasas que es conveniente retirar con una jeringuilla, ya que podrían interferir con el proceso. Si se parte de células en cultivo, es suficiente la homogenización manual con una jeringuilla de 20-G.

¹⁴ Equivale aproximadamente a una monocapa de células recubriendo una superficie de 9.5 cm^2 .

El sistema se basa en el uso de un tampón de **lisis celular** altamente desnaturante que contiene isothiocianato de guanidina y fenol, por lo que se trabajó en una campana de extracción. Durante la lisis o la **homogenización** de las muestras (necesaria únicamente en el caso de partir de fragmentos de tejidos), el *TriPure* disruptora las células y desnaturaliza las nucleasas internas, preservando la integridad del RNA y DNA de la muestra. Podemos partir de material congelado, e igualmente, los lisados son estables durante semanas a -80°C .

La adición de cloroformo y posterior centrifugación de la muestra, permiten la formación de tres fases: una **fase superior acuosa** e incolora, una interfase blanca (que contiene el DNA y proteínas), y una fase rosa orgánica en la parte inferior del tubo.

La fase acuosa superior contiene el RNA que se recupera por **precipitación con isopropanol**. Tras un lavado con etanol, el precipitado de RNA se resuspendió en aproximadamente 30 μl de agua. El RNA obtenido es apto para intervenir en reacciones enzimáticas.

X.3 VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL RNA

La concentración de RNA se estima espectrofotométricamente valorando la absorbancia de las muestras a 260 nm y 280 nm.

La absorbancia a 260 nm (A_{260}) indica la concentración de la muestra en un rango de detección que va desde 0.1 a 1 unidades de densidad óptica. Mientras que lecturas inferiores a 0.1 no son fiables debido a que la escasez de RNA no permite su detección, las superiores son lecturas que pueden estar saturadas. Por tanto, se diluyeron las muestras habitualmente en una proporción 1/50 en agua, adecuando esta dilución siempre que fuese necesario a los límites de detección comentados. 1 unidad de densidad óptica equivale a una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$ de RNA.

Por otro lado, la absorbancia a 280 nm (A_{280}) es un índice de la pureza de las muestras. Así, una relación A_{260}/A_{280} entre 1.5 y 1.9 se considera indicativa de una buena calidad de los RNA. Cuando dicha relación es inferior a 1.5 puede existir una elevada contaminación proteica de las muestras, sin embargo, cuando ésta es superior a 1.9, a menudo revela una degradación de la muestra.

Las cubetas utilizadas en la lectura fueron de cuarzo ya que la lectura se realiza fuera del espectro visible y el cero del espectrofotómetro se estableció en todo un rango de lectura (240-320 nm), con el mismo agua en el que se habían disuelto las muestras¹⁵.

XI. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

El RNA purificado se utilizó para determinar el perfil de expresión de diferentes genes y en situaciones experimentales diversas. Para ello, se aplicaron diferentes técnicas siguiendo en cualquier caso las precauciones básicas a fin de evitar la contaminación con RNasas.

XI.1 ANÁLISIS POR TRANSFERENCIA *NORTHERN*

El análisis por transferencia *Northern* permite la detección de un RNA mensajero (mRNA) concreto mediante la hibridación con una sonda específica, y se realizó según las indicaciones descritas por Elisabet Estil-les en su Máster Experimental en Bioquímica (2002). Consiste en una primera etapa de **electroforesis desnaturalizante** en agarosa (1.5% agarosa; 2.6% formaldehído) dónde los RNA aislados se separan según su tamaño perdiendo cualquier estructura terciaria que afecte a su migración.

Una vez separados los RNA según su tamaño, se requiere transferir los mismos a un soporte apto para la hibridación, como es una membrana de nylon cargada positivamente a fin de unir ácidos nucleicos (Boehringer Mannheim). Dicha **transferencia *Northern*** se realiza por capilaridad.

La membrana se pone en contacto con una sonda específica para el RNA mensajero a detectar, que ha sido previamente marcada con [α -³²P] dCTP en el proceso de **hibridación**.

¹⁵ Es posible que una misma muestra proporcione lecturas diferentes en función del agua en la que se realicen las diluciones ya que el pH puede afectar a las lecturas, por lo que si se requiere precisión, es recomendable leer simultáneamente aquellas muestras que hayan de compararse entre sí.

XI.2 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

En la PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea. Mediante la detección de fluorescencia es posible valorar durante la amplificación, la cantidad de DNA sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.

El proceso completo incluye el aislamiento del RNA, su retrotranscripción a cDNA y la amplificación del cDNA mediante la PCR (*polimerase chain reaction*) final. El proceso de PCR clásico se basa en la amplificación de nuevos fragmentos de DNA a partir de cebadores o *primers* específicos para el cDNA concreto a analizar, además de un sistema de detección por fluorescencia de los productos de la reacción. Finalmente, la cantidad de cDNA amplificado, debe referirse a la cantidad de cDNA de un control endógeno presente en la muestra.

Los sistemas a tiempo real permiten cuantificar la concentración inicial de RNA presente en las muestras de forma más sencilla, más precisa y sobretodo en un rango mucho mayor que en los procedimientos convencionales, lo que la hace especialmente interesante en situaciones en que la muestra es limitante.

XI.2.1 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS CON DNASA

Ninguno de los métodos para el aislamiento del RNA descritos (ver apartado X) asegura completamente que el RNA esté libre de DNA, incluso cuando éste no es visible en un gel de agarosa. Por ello, para la utilización en técnicas extremadamente sensibles como la PCR a tiempo real, puede ser necesario eliminar el DNA contaminante.

El tratamiento de las muestras con DNasa es necesario siempre que las secuencias cebadoras que se han de emplear en la reacción de PCR a tiempo real no estén específicamente diseñadas para evitar la amplificación de DNA genómico. Si se amplificase DNA genómico paralelamente al DNA complementario proveniente del RNA, se obtendrían resultados artefactuales¹⁶.

¹⁶ En nuestro caso siempre fue necesario eliminar el DNA genómico, puesto que utilizamos como control endógeno el 18S (ver apartado XI.2.4).

Para extraer el DNA contaminante de la preparación de RNA se utilizó el *Ambion's DNA-free kit* (Ambion). Éste permite no sólo retirar el DNA sino también inactivar el enzima DNasa y eliminar los cationes divalentes incluidos en el tampón de reacción, que podrían interferir con reacciones posteriores. Se siguieron las indicaciones del fabricante.

El método permite el tratamiento de 25-100 μl de RNA en solución acuosa, reduciendo niveles moderados de DNA (menos de 10 $\mu\text{g/ml}$) hasta niveles indetectables por PCR.

Esta manipulación del RNA puede afectar a su absorbancia a 260 y 280 nm, por lo que se estimó la concentración de las muestras en base a la primera valoración realizada tras la extracción considerando la dilución a la que se sometieron para el tratamiento con Dnasa.

XI.2.2 COMPROBACIÓN DEL ESTADO DE LOS RNA

Pese a que la relación A_{260}/A_{280} no muestre aparentemente signos de degradación de las muestras (ver apartado X.3), conviene comprobar la integridad de los RNA antes de proceder a técnicas como el PCR a tiempo real, ya que incluir en el análisis muestras degradadas, aún parcialmente, podría conducir a interpretaciones erróneas de los resultados.

En el caso de realizar un tratamiento previo con DNasa (ver apartado XI.2.1), la comprobación de la integridad de las muestras está plenamente justificada, puesto que durante esa manipulación se podría ver afectado el estado de alguna de las muestras.

La integridad de los RNA puede ser comprobada en un gel de agarosa desnaturizante mediante al marcaje con bromuro de etidio (ver apartado XI.1).

XI.2.3 RETROTRANSCRIPCIÓN

Se realizó la retrotranscripción de 1 μg de RNA a cDNA utilizando la transcriptasa reversa *MultiScribe* y los *Random-hexamer* del *kit* TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante, y en un volumen final de 50 μl .

XI.2.4 PCR A TIEMPO REAL

La reacción de amplificación de cDNA se realizó utilizando los cebadores del sistema *Assays on Demand* (Applied Biosystems) y los reactivos reactivos TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante y en un volumen final de 25 µl. Los fragmentos de DNA utilizados como cebadores o *primers* y las sondas, están diseñados de forma que incluyen regiones específicas para el cDNA de interés. La casa comercial asegura la especificidad y calidad de los cebadores. El rendimiento de la reacción está también asegurado por el fabricante. Se utilizaron las mezclas de sondas y cebadores siguientes:

18S ribosomal RNA (Hs99999901_s1)¹⁷

RNA proveniente de células L6 (originarias de rata):

glutathione peroxidase-1 (Rn00577994_g1)

uncoupling protein-2 (Rn00571166_m1)

uncoupling protein-3 (Rn00565874_m1)

superoxide dismutase-2 (Rn00566942_g1)

superoxide dismutase-1 (Rn00584772_m1)

RNA proveniente de células C2C12 (originarias de ratón) o hígado de ratón:

uncoupling protein 3 (Mm00494074_m1)

uncoupling protein-2 (Mm00495907_g1)

myogenin (Mm00446194_m1)

PGC-1α (Mm00447183_m1)

glutathione peroxidase 1 (Mm00656767_g1)

glutathione peroxidase 4 (Mm00515041_m1)

heme oxygenase 1 (Mm00516004_m1)

superoxide dismutase 2 (Mm00449726-m1)

sequestosome 1 (Mm00448091_m1)

c-fos (Mm00487425_m1)

c-jun (Mm00495062_s1)

transformation related protein 53 (Mm00441964_g1)

¹⁷ Las sondas **m1** están diseñadas para que no haya riesgo de amplificar genómico porque se unen a secuencias separadas por un intrón; las **g1** hibridan en secuencias internas de un exón, con lo que existe riesgo de amplificar DNA genómico; las **s1** hibridan con cDNAs correspondientes a genes sin intrones.

nuclear factor of kappa b1 (p105) (Mm00476361_m1)

carnitine palmitoyl transferase 1b (Mm00487200_m1)

acetyl-Coenzyme A dehydrogenase medium chain (Mm00431611_m1)

peroxisome proliferator activated receptor α (Mm00440939_m1)

peroxisome proliferator activated receptor α (Mm00803186_g1)

Las sondas utilizadas en este sistema son de tipo TaqMan[®] marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador (*reporter*) y un aceptor (*quencher*) (Figura 3). Estas sondas son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia emitida por el donador. Para que esto ocurra ambas moléculas deben estar espacialmente próximas, y sus espectros de emisión y absorción respectivamente, se han de solapar. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación del DNA, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. La DNA polimerasa, al desplazarse por la cadena durante la reacción de síntesis, hidroliza la sonda gracias a su actividad 5'-3' exonucleasa. En disolución, los fluorocromos están lo suficientemente distantes como para que el aceptor no pueda ejercer su función, con lo que el equipo capta la emisión de fluorescencia del donador.

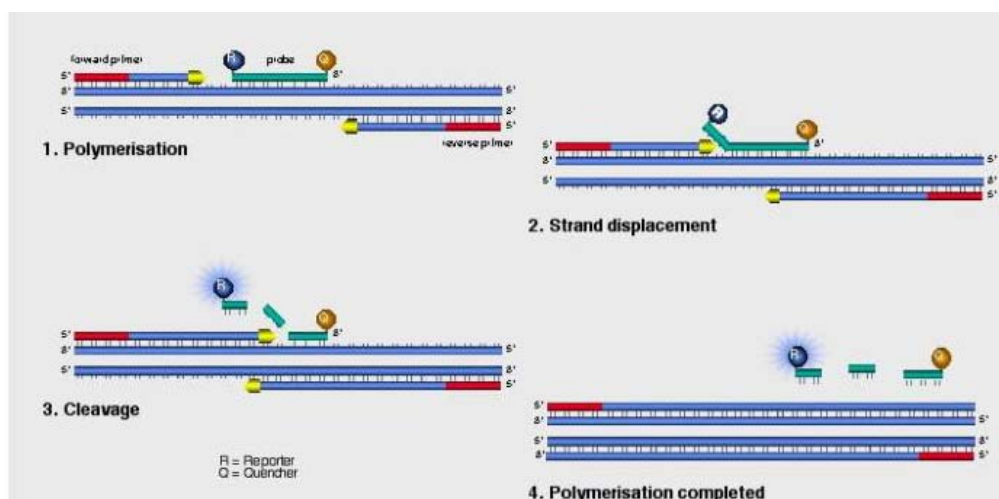


FIGURA 3: Funcionamiento de las sondas TaqMan[®]. El desplazamiento de la DNA polimerasa por la cadena de DNA conlleva la liberación de fluorocromos al medio y la captación de la fluorescencia emitida por el donador (*reporter*) en cada ciclo.

El incremento de DNA en cada ciclo, se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de estas sondas garantiza la especificidad de detección

que se realizó en el lector ABI PRISM 7700HT (Applied Biosystems) de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona.

Los controles adecuados se incluyeron en cada experimento (sin RNA, sin mix, sin retrotranscriptasa, etc). Cada muestra fue analizada por duplicado, y la media del duplicado fue utilizada para calcular el nivel de expresión del mRNA de interés. La cantidad de mRNA del gen de interés fue normalizada respecto a la cantidad de RNA ribosómico 18S (utilizando el método de comparación de $2^{-\Delta CT}$ de acuerdo a las indicaciones del fabricante), que fue considerado como el control endógeno.

XII. ENSAYO DE RETARDO EN GEL DE POLIACRILAMIDA O EMSA

El ensayo de retardo en gel o EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) es una técnica que permite la detección y caracterización de la interacción proteína-DNA, y resulta por tanto muy útil, en el estudio de factores de transcripción. El EMSA se utiliza para determinar, en extractos nucleares, la presencia de proteínas capaces de unirse a una secuencia específica de DNA, pero también para cuantificar de forma relativa, la afinidad y especificidad de dicha interacción.

El ensayo se fundamenta en la incubación de un fragmento de DNA marcado radioactivamente con extractos proteicos, generalmente extractos nucleares, en unas condiciones que permitan la unión entre DNA y proteína, seguida de una electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizante. Los complejos DNA-proteína tendrán una movilidad electroforética inferior al DNA libre (retardada) y se muestran como bandas discretas en una autoradiografía.

Es posible que se den uniones inespecíficas de proteínas al fragmento marcado de DNA. Para determinar la especificidad de las bandas observadas en el gel, se utiliza un oligonucleótido no marcado como competidor. El competidor se unirá a la proteína impidiendo su unión al fragmento marcado, por lo que solamente aquellas uniones inespecíficas seguirán apareciendo con la misma intensidad. Para identificar con total certeza las proteínas que generan las diferentes bandas de retardo, se añaden anticuerpos específicos contra las proteínas sometidas a estudio durante la reacción de unión DNA-proteína. La unión del anticuerpo a la proteína provocará una desaparición o un retardo mayor de la banda (*superretardo* o *supershift*), según si el epítipo de la proteína reconocido por el anticuerpo coincide o no con el de dominio de unión al DNA de la proteína.

XII.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS NUCLEARES

Los extractos proteicos nucleares fueron obtenidos a partir de mioblastos o miotubos de L6, sometidas a diferentes condiciones experimentales. El protocolo de extracción utilizado es una adaptación del anteriormente descrito por Zamora et al (Zamora et al., 2004). Esta metodología permite una extracción sencilla y rápida de una fracción enriquecida en núcleos, sin embargo, la fracción obtenida es bastante lábil y por ello, es aconsejable procesar los extractos rápidamente tras su obtención y no conservarlos durante períodos muy prolongados.

La cuantificación relativa de la cantidad de proteína unida a una determinada secuencia asume que la extracción de núcleos ha sido igualmente eficiente en todos los puntos, por lo que es recomendable realizar la extracción de todas las muestras a comparar entre sí, simultáneamente.

TAMPÓN A: 10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 5 µg/ml aprotinina, 5 µg/ml leupeptina, y 5 µg/ml pepstatina.

TAMPÓN C: 20 mM Hepes pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 5 µg/ml aprotinina, 5 µg/ml leupeptina, y 5 µg/ml pepstatina.

PROCEDIMIENTO:

- Lavado de las células con PBS (2 placas de 10 cm de diámetro por punto¹⁸)
- Se añaden de 400 µl de Tampón A sobre la superficie total de cultivo que constituye una muestra.
- Se recogen las células y las muestras se incuban en hielo durante 15 min.
- Se añaden 50 µl de Nonidet P-40 (10%) a cada muestra y se mezcla enérgicamente.
- Centrifugación de las muestras a 16.000 g a 4°C durante 1 min.
- El sedimento nuclear se resuspende en 50 µl de Tampón C (no mezclar con la pipeta, únicamente por agitación suave)
- Incubación durante 15-20 min en hielo (agitando suavemente de forma esporádica durante la incubación).

¹⁸ Aproximadamente 20 millones de células por punto.

- Centrifugación de las muestras a 16.000 g a 4°C durante 5 min.
- El sobrenadante obtenido constituye la muestra de extracto proteico nuclear. Dado la gran sensibilidad de este tipo de muestras, es recomendable alicuotar las muestras y congelarlas en el momento de su obtención. Pueden conservarse durante unas semanas a -80°C.

XII.2 OLIGONUCLEÓTIDO UTILIZADO

NF-κB es un factor de transcripción que normalmente se haya en citoplasma pero que en respuesta a determinados estímulos, se transloca al núcleo donde actúa induciendo la expresión de genes que incluyen en sus promotores una secuencia de respuesta específica. El ensayo EMSA permite cuantificar, utilizando una secuencia de DNA *consensus* para la unión de NF-κB, la cantidad del factor presente en el núcleo, y por tanto activo, en una determinada situación.

Para determinar la cantidad de NF-κB activo presente en las muestras de extractos nucleares de L6, se utilizó un oligonucleótido sintético que contenía una secuencia *consensus* para la unión al factor:

5'-CTAGAGTTGAGGGGACTTTCCAG-3'

Los oligonucleótidos se sintetizan químicamente en forma de cadenas sencillas de DNA (Roche). Antes de proceder al marcaje del DNA es necesario formar las dobles cadenas a partir de los oligonucleótidos complementarios, en una reacción de anillamiento o *annealing*:

MATERIAL: - oligonucleótido A
 - oligonucleótido B (antisentido)
 - NaCl 5 M

PROCEDIMIENTO:

- Se realiza una mezcla conteniendo: 5 ng/μl oligonucleótido A, 5 ng/μl oligonucleótido B, 50 mM NaCl y agua bidestilada hasta el volumen final deseado.

- La mezcla se incuba durante 5 min a 65°C.

XII.3 MARCAJE RADIACTIVO DEL OLIGONUCLEÓTIDO

Una vez anillado el oligonucleótido sintético NF- κ B, se marca radiactivamente según el método *end-filling* basado en la actividad 5'-3' DNA polimerasa que conserva el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I aislada de *E. coli*. Dicha actividad permite reparar los extremos 5' protuberantes con los que fue diseñado el oligonucleótido, conteniendo al menos un nucleótido de guanidina, lo que permite la incorporación del nucleótido radiactivo (α -³²P)-dCTP.

- MATERIAL:
- oligo anellado
 - Tampón Klenow 10x (Roche)
 - dNTPs (mezcla de dATP, dGTP, dTTP)
 - Klenow (Roche)
 - (α -³²P)-dCTP (Amersham)

PROCEDIMIENTO:

- Se realiza una mezcla conteniendo: 2.5 ng/ μ l oligo anellado, Tampón Klenow 1x, 0.1 mM dNTPs, 0.5 U/ μ l Klenow, 25 μ Ci de (α -³²P)-dCTP y agua bidestilada hasta el volumen final deseado.
- Incubación 1h a temperatura ambiente
- Para separar el oligonucleótido marcado de los dNTPs sobrantes, es necesario purificarlo. Para ello, se utilizaron las columnas *G-25 Microspin* (Amersham) siguiendo las indicaciones del fabricante .

XII.4 ENSAYO DE RETARDO EN GEL

XII.4.1 REACCIÓN DE UNIÓN DE LOS EXTRACTOS NUCLEARES O *BINDING* COMPETENCIA

La reacción de binding es necesaria para permitir la formación de los complejos DNA-proteína. Es necesario ajustar las condiciones de incubación a cada oligonucleótido y tipo de extracto nuclear. En nuestro caso las condiciones utilizadas fueron las especificadas a continuación:

TAMPÓN DE UNIÓN: 25 mM Hepes pH 7.6, 0.5 mM DTT, 12.5 mM ZnSO₄, 50 mM KCl, 1 mg/ml BSA, 5% glicerol, 0.1% Nonidet P-40.

PROCEDIMIENTO:

- Se mezclan 2.5 µg de poly-(dl-dC) (*polyinosine-polycytidylic acid*)¹⁹ (Roche) con 10 µg de extractos nucleares en el tampón de *binding*, añadiendo agua bidestilada hasta un volumen de 20 µl (considerando el volumen de los reactivos que vayan a añadirse posteriormente).
- Se incuba la mezcla durante 30 min a temperatura ambiente.
- Se añade el nucleótido marcado (30.000 cpm).
- Se incuba la mezcla de unión durante 20 min más, a temperatura ambiente (reacción de unión).
- Se cargan las muestras en el gel de electroforesis

Para los experimentos de competencia, a la mezcla de unión se añade el nucleótido sin marcar o frío (2.5 ng/µl), durante la incubación previa a la reacción de unión.

XII.4.2 GEL DE POLIACRILAMIDA

El gel donde se realiza la electroforesis de las reacciones de unión, es un gel **no desnaturalizante** de acrilamida compuesto por:

- 5% Acrilamida/Bisacrilamida (37.5:1) (Amresco)
- Tampón TBE (90 mM Tris-Base, 90 mM Ácido Bórico, 2mM EDTA pH 8.0)
- 0.25% Nonidet P-40 (10%) (Sigma)
- 0.055% Persulfato amónico (Bio-Rad)
- 0.002% TEMED (Gibco BRL)

¹⁹ Sirve para disminuir la probabilidad de uniones inespecíficas al DNA.

XII.4.3 ELECTROFORESIS

PROCEDIMIENTO:

- Cargar las muestras (reacciones de unión) y en un pozo del gel una mezcla de azul de bromofenol (10%) y glicerol (5%) para visualizar el frente de electroforesis.
- Se realiza una pre-electroforesis (anterior a la carga de las muestras, para equilibrar el gel) a 130V durante por lo menos 30 min a 4°C.
- Electroforesis 1h a 130V a 4°C en TBE 0.5x.
- Elevar el voltaje de la electroforesis a 350V durante aproximadamente 45 min más y también a 4°C.
- Secar rápidamente los geles y obtener imagen por autoradiografía

XIII. CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CÉLULAS L6

Los ROS son compuestos inestables, con una vida media extremadamente corta, y son por tanto muy difíciles de identificar y cuantificar. Por ello, la mayoría de métodos utilizados para su determinación son indirectos y se basan en la valoración de las consecuencias de un estrés oxidativo, sin correlación directa con una especie reactiva en concreto. Sin embargo, en nuestro caso, hemos utilizado una sonda fluorescente que permite la detección directa de especies reactivas en el interior de las células. La sonda utilizada fue la *6-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, diacetoxymethyl ester*, o **H₂-DCFDA** (Molecular Probes) que es un derivado de la fluoresceína (Negre-Salvayre et al., 2002; Packer, 1997; Royall and Ischiropoulos, 1993). Este compuesto atraviesa la membrana celular gracias a su grupo éster. En el interior celular es hidrolizado por esterasas dando lugar al compuesto *dihydrochlorofluorescein* (H₂-DCF) que es atrapado en el interior celular. Esta molécula puede ser oxidada por los ROS intracelulares produciendo *dichlorofluorescein* (DCF) que es un compuesto fluorescente. Así, la determinación de la fluorescencia nos dará una estimación de la cantidad de ROS intracelulares, pero no nos permitirá distinguir cuál es el origen de éstos (mitocondria u otras fuentes intracelulares) ni tampoco el tipo, aunque las especies mayoritariamente detectadas son los peróxidos como el H₂O₂. Es importante considerar que la correcta determinación de ROS con esta sonda, dependerá de la actividad esterasa intracelular (Figura 4).

Utilizamos la sonda H₂-DCFDA para estimar la cantidad de ROS en el interior de células musculares L6.

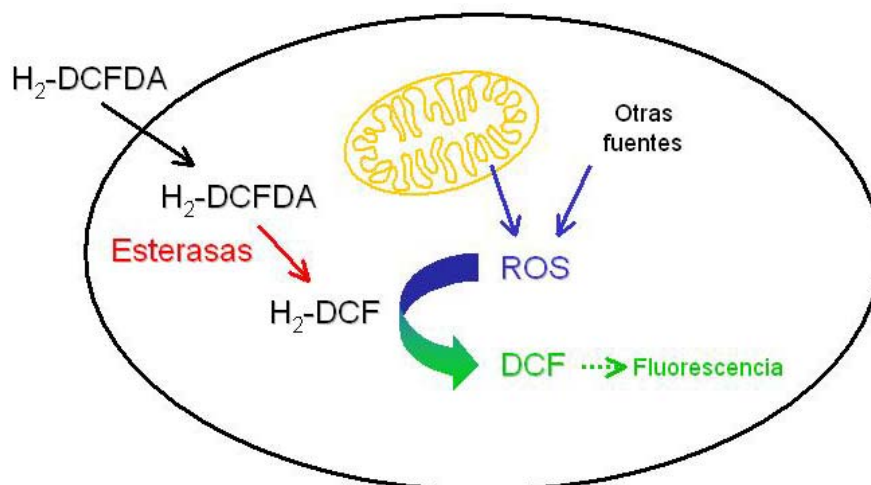


FIGURA 4: Funcionamiento de la sonda H₂-DCFHDA. La sonda es hidrolizada por esterasas una vez en el interior de la célula formándose el compuesto H₂-DCF. Éste es sensible a la oxidación, por lo que bajo la acción de los ROS intracelulares da lugar al compuesto DCF que emite fluorescencia.

PROCEDIMIENTO:

- Se incuban las células con 10µM de sonda H₂-DCFHDA (Molecular Probes) en medio DMEM sin Fenol/Red (Gibco) durante 1 h²⁰.
- Lavar las células dos veces con PBS.
- Añadir 1ml agua bidestilada (en el caso de un pozo de 6 x well, o hasta cubrir la superficie de la placa) y separar las células de la superficie con la ayuda de una pala (*scraper*) de plástico.
- Realizar un choque térmico a las muestras (congelación)²¹
- Agitar fuertemente las muestras para romper completamente las células (reservar una parte de la muestra para valorar la concentración de proteína posteriormente).
- Determinar la fluorescencia con el espectrofluorímetro (longitud de onda de excitación a 493 nm, y a 527 nm de emisión).

XIV. CUANTIFICACIÓN DE GLUTATIÓN REDUCIDO EN CÉLULAS L6

²⁰ La cantidad de sonda y tiempo de exposición necesarios se han de adecuar a cada tipo celular (cantidad de esterasas...). La determinación se realiza en medio sin Fenol/Red (colorante utilizado como indicador de pH) en el medio de cultivo a fin de evitar la posible oxidación de la sonda.

²¹ No es necesario si partimos de placas congeladas para el ensayo.

Para determinar la cantidad de glutatión reducido (GSH) en células L6, utilizamos la sonda *monochlorobimane* (Molecular probes). Esta sonda se une a el GSH formando un complejo fluorescente que puede medirse fluorométricamente. La reacción de formación de dicho complejo es catalizada por la Glutatión-S-transferasa celular.

PROCEDIMIENTO:

- Se recogen las células con agua bidestilada para obtener extractos celulares completos.
- Agitar fuertemente las muestras para romper completamente las células (Una parte del extracto se reserva para valorar posteriormente la concentración de proteína en el extracto).
- Incubación de los extractos celulares con 20 μ M de monochlorobimane durante 2h (reacción de marcaje)²².
- Determinar la fluorescencia con el espectrofluorímetro (longitud de onda de excitación a 380 nm, y a 460 nm de emisión).

XV. UTILIZACIÓN VECTORES ADENOVÍRICOS

Los adenovirus recombinantes han sido ampliamente utilizados como vectores de expresión de genes en células de mamífero. Son especialmente útiles en la infección de células en las cuáles es difícil la transferencia de DNA exógeno por otros métodos (transfección por fosfato cálcico, etc.). Algunas ventajas de este sistema de expresión son:

- Amplio espectro de infección, infectando tejidos o líneas celulares de origen humano y no humano.
- Eficiencia de infección elevada
- Baja patogenicidad
- Permiten la infección de células en estado proliferativo y no proliferativo
- El DNA permanece episómico, disminuyendo el riesgo de mutagénesis de la célula infectada.
- El uso de la línea 293-HEK para la producción de proteínas recombinantes, constituye un sistema de expresión homólogo.

Entre los principales inconvenientes del uso de estos vectores se encuentra el hecho de que resultan muy inmunogénicos, y que la expresión del transgen es transitoria.

²² En paralelo, podemos generar una curva patrón con cantidades conocidas de GSH (Sigma) a fin de conocer la concentración exacta de GSH que contienen los extractos celulares.

Los adenovirus son virus sin envoltura, con cápside icosaédrica y genoma de doble cadena lineal de DNA de 36 kb. Todos los adenovirus se reproducen mediante un **ciclo lítico**. La entrada del vector se realiza a través de receptores localizados en la membrana celular, la proteína *car* (*Coxsackie virus and Adenovirus Receptor*) e integrinas. Las partículas víricas son fagocitadas por la célula y liberadas en el citosol. La desencapsidación se produce de forma ordenada, y finalmente, el DNA migra al núcleo donde forma un complejo con el DNA e histonas celulares, permaneciendo ectópico (no se produce integración). La transcripción, replicación y empaquetamiento, tienen lugar en el núcleo celular. Seguidamente se produce la síntesis de proteínas víricas. Las primeras en formarse son las E1 (E1A y E1B) que son necesarias para la activación de la transcripción de los genes prematuros. La replicación se inicia 5 horas después de la infección, y es un proceso unidireccional. La secuencia de los extremos de cada una de las cadenas de DNA vírico contiene un origen de replicación o ITR (*inverted terminal repeats*). El inicio de la replicación requiere la proteína terminal, dos factores de transcripción eucariotas y la DNA polimerasa de la célula huésped. La encapsidación se produce en el núcleo, pero se inicia en el citoplasma, donde los monómeros se organizan dando lugar a las cápsides. En el núcleo, las cápsides inmaduras encapsidan el DNA y las proteínas víricas asociadas, constituyendo el núcleo del virión. Las células infectadas permanecen intactas y no se lisan espontáneamente. No obstante, el citoesqueleto se destruye y consecuentemente, las células adquieren una morfología redondeada que recibe el nombre de **efecto citopático (CPE, citopatic effect)**.

La construcción de adenovirus recombinantes se realiza en dos pasos: a) introducción del constructo deseado dentro de un **vector de transferencia** adenovírico (*shuttle vector*) con regiones homólogas al genoma viral y b) incorporación de dicho constructo en el **vector adenovírico recombinante** que contiene el genoma adenovírico completo, mediante una recombinación homóloga. El vector adenovírico recombinante tiene el genoma viral completo con una delección en las regiones E1 y E3, lo que le impide desarrollar el ciclo lítico en las células infectadas.

La línea celular 293-HEK es una **línea empaquetadora** proveniente de células embrionarias humanas de riñón. Estas células fueron modificadas para expresar la proteína E1 del Ad5, lo que permite que los vectores adenovíricos completen el ciclo lítico en ellas. Por eso se han utilizado en la obtención, y amplificación de estos vectores.

Con cada infección de la línea empaquetadora existe cierto riesgo de recombinación homóloga entre el DNA celular y el vector viral, que puede "complementarse", adquiriendo las secuencias E1 para las que era inicialmente defectivo, siendo entonces **competente para replicarse** en cualquier tipo celular. Por este motivo, es conveniente partir siempre de un stock viral que provenga de pocas etapas de infección en 293-HEK.

Los adenovirus son agentes patógenos del sistema respiratorio, de la mucosa gastrointestinal y de las membranas oculares. Es necesario por tanto, y pese a trabajar con vectores incapaces, en principio, de replicarse fuera de líneas empaquetadoras, trabajar en una sala condicionada para cumplir las **normas de seguridad** necesarias (ventilación independiente, campana de flujo laminar, material independiente, vestuario adecuado, etc).

XV.1 AMPLIFICACIÓN DE LOS VECTORES ADENOVÍRICOS RECOMBINANTES

Los vectores adenovíricos recombinantes utilizados en esta tesis (AdCMV-LAcZ; AdCMV-UCP3) fueron obtenidos y cedidos por la Dra. García-Martínez del Dept. de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Física y Química, Universidad de Barcelona. Una vez se dispone del vector adenovírico de interés es necesario amplificarlo para obtener una cantidad suficiente para su utilización en posteriores experimentos. La amplificación de los vectores adenovíricos se basa en la infección sucesiva de 293-HEK para su producción a gran escala. Es importante partir de células en buen estado y con un número bajo de pases, a fin de obtener una buena producción de virus.

PROCEDIMIENTO:

- Infección de una placa de 293-HEK con el vector adenovírico a una MOI (ver apartado XV.3) de 1 en 3 ml (volumen necesario para cubrir la monocapa) de DMEM suplementado con un 2% de FBS, 1%Penicilina-Streptomicina. La monocapa de células ha de estar a un 70-80% de confluencia para añadir el virus. Damos así tiempo suficiente para que se desarrolle el ciclo lítico del virus.
- Incubación de las células infectadas en las condiciones habituales durante 1-2h. Agitar suavemente la placa cada 15 min aproximadamente, para facilitar la infección.
- Completar el volumen de medio (8 ml) con DMEM 10% FBS, 1%Penicilina-Streptomicina.

- Transcurridas de 36 a 48h será aparente el efecto citopático (CPE). Es muy importante recoger las células en el momento justo en que empieza a manifestarse el CPE (antes de que los viriones se liberen al medio extracelular) porque es un importante condicionante del rendimiento de la amplificación. Las células adoptan una morfología redondeada y pierden la adherencia a la placa muy fácilmente (con un simple golpe en la pared de la placa, por ejemplo). Cuando se separan de la superficie lo hacen en grupos característicos que se asemejan a racimos de uvas. Se recogen en este momento las células (podemos precipitar las células mediante una centrifugación suave, 400g 4 min, para reducir el volumen de sobrenadante) y pueden conservarse a -80°C hasta el momento de su utilización.
- Las células recogidas se lisan mediante 5 ciclos de congelación-descongelación en hielo seco, y agitación fuerte entre los ciclos.
- La mezcla de lisis puede adicionarse directamente a nuevas placas de células para amplificar la producción de virus mediante infecciones sucesivas (Figura 5). Es importante no exceder la cantidad necesaria de virus, porque en este caso, la toxicidad puede provocar la muerte prematura de las células. Utilizamos la lisis de una placa de 10 cm para infectar 3 placas de 15 cm de diámetro. La lisis de estas 3 servirá para infectar 30 placas más (respetando esta proporción, podemos amplificar hasta el número de placas deseado²³). Es importante recoger las últimas células infectadas en un volumen de 5 ml finales aproximadamente.
- Para retirar los restos celulares de la última lisis se centrifuga a 7000 rpm durante 10 min en una ultracentrífuga (rotor vasculante TH641 Sorvall). El sobrenadante contiene ahora los virus recombinantes. Puede utilizarse directamente este sobrenadante para los experimentos de transducción *in vitro*, pero es preferible purificar los adenovirus a fin de retirar proteínas, toxinas etc. que también se encuentran en el sobrenadante tras la lisis celular.

²³ Si se desea utilizar los vectores para el trabajo *in vivo*, es necesario partir de un elevado número de placas (hasta 60 de 15 cm de diámetro), aunque el rendimiento depende de cada vector.

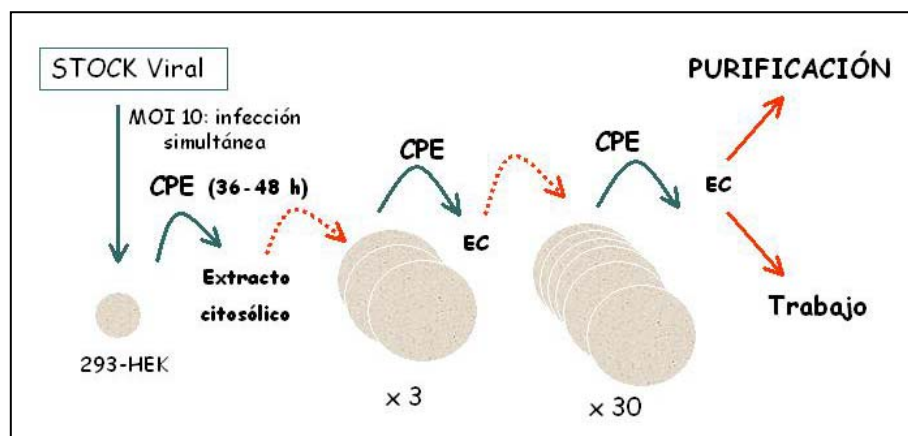


FIGURA 5: Proceso de obtención de vectores adenovíricos a gran escala, mediante infecciones sucesivas.

XV.2 PURIFICACIÓN DE LOS VECTORES ADENOVÍRICOS RECOMBINANTES

El proceso de purificación se basa en exponer los sobrenadantes resultado de la amplificación, a un gradiente de cloruro de cesio (CsCl) en el que los diferentes componentes, incluidos los virus, se separarán según su densidad.

MATERIAL: - SOLUCIONES CsCl

Las soluciones de CsCl utilizadas pueden prepararse en PBS (o en Tris-HCl 10 mM, pH 7.4 y 1mM MgCl₂) y deben ser filtradas antes de ser utilizadas.

<u>Densidad (g/ml)</u>	<u>Cantidad de CsCl (g)</u>	<u>Volumen solución (ml)</u>
1.25	27	73
1.33	34	66
1.40	39	61

- Sobrenadante (lisado celular)
- Tubos centrífuga 13.2 ml (Sorvall)
- jeringuillas (1 ml) y agujas (22 G) estériles
- TAMPÓN DIÁLISIS²⁴: 10 mM Tris pH 7.4, 1 mM MgCl₂, 10% (v/v) de glicerol (debe esterilizarse antes de ser utilizado).
- Membrana de Diálisis (Dialysis tubing, UltraPure, Life technologies).

²⁴ El tampón de diálisis puede ser también: 10mM Tris-HCl pH 8, 1 mM MgCl₂, 5% Sacarosa y estéril (recomendable en el caso de utilizar los vectores *in vivo*, ya que el glicerol puede resultar tóxico para el organismo).

PROCEDIMIENTO:

- El primer paso consiste en situar el sobrenadante sobre un "cojín" de CsCl creado colocando las siguientes soluciones en un tubo de centrifuga.
 - CsCl (densidad 1.25 g/ml) 3 ml
 - CsCl (densidad 1.40 g/ml) 3 ml
 - Lisado (sobrenadante) 5 ml
- Se coloca al fondo del tubo²⁵ la solución más densa y cuidadosamente encima (sin mezclar) la menos densa. Por último, el sobrenadante se sitúa encima de la menos densa.
- Ultracentrifugación de los tubos a 35.000 rpm (rotor vasculante TH641 Sorvall) y 20°C durante 1 h.
- Como resultado de la centrifugación aparecerán unas bandas opalescentes entre los restos celulares en la mitad inferior del tubo (Figura 5.2). La menos densa (superior) corresponde a los viriones defectivos y por tanto, no infectivos, mientras que la más densa (inferior), y normalmente más gruesa, corresponde a los adenovirus recombinantes infecciosos. Puede formarse un precipitado con los restos celulares de elevada densidad. Con una aguja y una jeringuilla recuperamos la banda opalescente inferior haciendo un orificio en la pared del tubo.
- En un nuevo tubo, colocar 8 ml de la solución de CsCl de 1.33 g/ml. Situar cuidadosamente encima (sin mezclar), la solución procedente de la punción del tubo anterior.
- Ultracentrifugar los tubos a 35.000 rpm y 20°C durante una noche²⁶. Se formará un gradiente de CsCl continuo que servirá para acabar de purificar el adenovirus de impurezas (componentes celulares...).
- Como resultado de la centrifugación aparecerán una banda opalescente en la mitad superior del tubo conteniendo los adenovirus recombinantes puros (Figura 5.3). Se recuperan de igual forma que anteriormente, teniendo especial cuidado en no captar volumen extra para concentrar al máximo el vector²⁷.
- Dializar la solución de adenovirus frente a un tampón de diálisis durante un día para retirar el CsCl (cambiar un mínimo de 3 veces el tampón durante el proceso).
- Alicuotar la solución dializada y mantenerla a -80°C hasta su uso²⁸.

²⁵ Es conveniente limpiar con etanol las paredes del tubo, exteriores e interiores, antes de colocar las soluciones de CsCl.

²⁶ En el caso de que no se haya formado una banda bien definida, la ultracentrifugación puede alargarse hasta 48h.

²⁷ La solución es estable en CsCl a 4°C durante un par de días.

²⁸ Es conveniente no someter a la solución viral a congelación-descongelación puesto que el título viral disminuye en cada proceso.

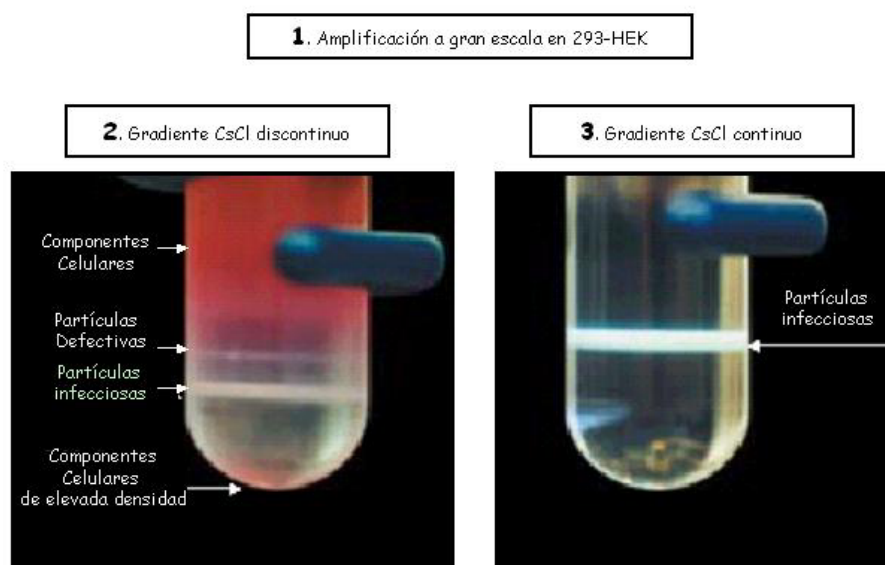


FIGURA 5: Aspecto de las bandas obtenidas tras la formación de los gradientes de CsCl

XV.3 TITULACIÓN DE LOS VECTORES ADENOVÍRICOS RECOMBINANTES

Existen diversos modos para estimar la concentración de virus en una determinada solución. De entre estos métodos, los hay que valoran la presencia de partículas víricas (VPs, *viral particles*), y los que estiman la cantidad de partículas infecciosas (PFUs, *plaque forming unity*). En nuestro caso, preferimos usar un método basado en la aparición del CPE, y por tanto, que contabiliza únicamente las partículas infecciosas. El método utilizado fue el de TCID₅₀ (*Tissue Culture Infectious Dose 50*). Éste se basa en realizar un banco de diluciones de la solución viral y encontrar la concentración límite que produce CPE en células 293-HEK.

PROCEDIMIENTO:

- Se siembran 293-HEK en 2 placas de 96 pozos a razón de 100 μl (10^5 células/ml) por pozo (en las condiciones habituales de cultivo). Las células se infectarán al día siguiente con el banco de diluciones.
- Banco diluciones (por duplicado):

10^{-1} : 20 μl virus *stock* + 180 μl DMEM 2% FBS; 1% P/S

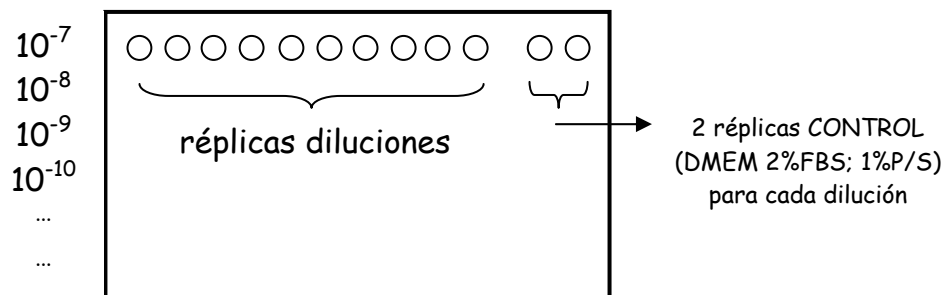
10^{-2} : 100 μ l 10^{-1} + 900 μ l DMEM 2% FBS; 1% P/S

10^{-3} : 200 μ l 10^{-2} + 1800 μ l DMEM 2% FBS; 1% P/S

....

10^{-n} : 200 μ l $10^{-(n-1)}$ + 1800 μ l DMEM 2% FBS; 1% P/S

- Aspirar el medio de la células y añadir las diluciones seriadas a las células según por ejemplo, el esquema siguiente²⁹:



- Añadir 100 μ l DMEM 2% FBS; 1% P/S a cada pozo.
- Se irá controlando la evolución de la infección. El CPE irá apareciendo progresivamente afectando primero a las diluciones más pequeñas. Realizaremos la lectura a los 7-8 días de la infección. Para considerar este proceso como válido, debemos observar CPE en todos los puntos de la dilución más pequeña, y en ningún punto de la dilución mayor.
- El título se calcula según la fórmula:

$$T = 10^{1 + d(S-0.5)}$$

dónde $d = \log_{10}$ de la dilución (en diluciones de 10 como en nuestro caso, $d=1$)

$S =$ suma de las relaciones CPEpositivos/CPEnegativos para cada dilución (considerando desde la dilución 10^{-1})

La diferencia entre los duplicados no puede ser superior a 0.7 para considerar válida la titulación.

De este modo, obtenemos la titulación en unidades de $TCID_{50}/100\mu$ l. Para pasar a pfu, unidad mucho más utilizada, se ha establecido un factor de conversión : **1 pfu = 0.7 $TCID_{50}$** .

²⁹ De todas las diluciones del banco, plaquearemos un total de 8, a elegir según el título esperado (normalmente 10^7 - 10^{14}).

XVI. INFECCIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES CON VECTORES ADENOVÍRICOS

En esta tesis doctoral, se han utilizado los vectores adenovíricos para transducir la expresión de genes exógenos en células musculares diferenciadas de rata (L6). Se trata de un procedimiento sencillo y con una elevada eficiencia. Se infectaron las células al tercer día de inducir la diferenciación (apartado I.3), y los procedimientos posteriores se realizaron a día 5 de diferenciación. El número de pases influye decisivamente sobre la capacidad de diferenciación de las células, y ésta, sobre la eficiencia de infección, por ello, se trabajó siempre con L6 con un número bajo de pases.

Es necesario determinar en el primer ensayo (mediante análisis *western blot*, por ejemplo), el número de vectores adenovíricos por célula, o **MOI**³⁰, necesaria para lograr los niveles de expresión deseados. La MOI depende de las condiciones experimentales, el tipo de vector, la preparación en concreto... Por tanto, debe ser fijada con cada nueva preparación viral.

PROCEDIMIENTO:

- Mezclar la cantidad deseada de virus con el volumen justo de DMEM (1% P/S) para cubrir la superficie celular (300 µl en el caso de un pozo de 6 x *well* o 3 ml en el caso de una placa de 10 cm de diámetro), a fin de favorecer el contacto de los adenovirus con los receptores celulares.
- Realizar dos lavados de las células con PBS (para retirar el medio completamente, ya que ciertas proteínas del suero pueden retener a los adenovirus).
- Añadir la mezcla de virus y medio a las células.
- Incubar las células durante 1h a 37°C (condiciones habituales de cultivo) e ir agitando periódicamente las placas.
- Añadir DMEM (1% P/S) (200 µl en el caso de un pozo de 6 x *well* o 2 ml en el caso de una placa de 10 cm de diámetro).
- Incubar las células durante 1h a 37°C (condiciones habituales de cultivo) e ir agitando periódicamente las placas.
- Añadir DMEM con 2% FBS y 1% P/S hasta completar volumen total (1.5 ml en el caso de un pozo de 6 x *well* o 5 ml en el caso de una placa de 10 cm de diámetro).

³⁰ **MOI** (*multiplicity of infection*): número de partículas víricas que se requieren para infectar una célula de un determinado tipo celular

XVII. TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS CON ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos libres, viajan por el torrente sanguíneo asociados a la albúmina. A fin de crear unas condiciones *in vitro* lo más próximas posible a la situación *in vivo*, los ácidos grasos utilizados utilizados, oleato y palmitato, se añadieron a las células en su forma conjugada con albúmina (libre de ácidos grasos). Las sales de ambos se prepararon siempre justo antes de su utilización.

A fin de potenciar el efecto de los ácidos grasos, en algunos experimentos se optó por utilizar como medio de tratamiento, un DMEM con una concentración de glucosa 3 mM.

PROCEDIMIENTO:

- Disolver los ácidos grasos en agua bidestilada conteniendo 1.2 equivalentes de NaOH. La disolución completa es muy difícil, y es necesario incubar la suspensión a 70°C en el caso del oleato y hervirla en el caso del palmitato durante 10 min.
- Preparar en paralelo una mezcla de DMEM, más albúmina (BSA) libre de ácidos grasos (Sigma) en una relación molar respecto al ácido graso (FA) que añadiremos posteriormente de FA:BSA de 5:1.
- Filtrar la mezcla una vez se consigue la disolución completa de la albúmina (utilizar un filtro de 0,2 µm).
- Cuando tenemos una disolución completa de los ácidos grasos (Sigma), éstos se añaden rápidamente a un volumen pequeño (0.5-1 ml) de medio de cultivo (DMEM sin suplementar) que ha sido hervido en paralelo³¹.
- La mezcla del ácido y el medio se añade a la cantidad deseada de DMEM sin conteniendo albúmina libre de ácidos grasos y en agitación constante para evitar la precipitación.
- Incubación de la mezcla de albúmina y el ácido graso durante 1 h a 37°C para permitir la conjugación.
- Aspirar el medio de cultivo y añadir la mezcla BSA:FA a las células.

XVIII. UTILIZACIÓN DE VECTORES ADENOVÍRICOS *IN VIVO*

Entre las principales ventajas del uso de vectores adenovíricos como vehículo de transferencia génica, se encuentra el hecho de que inducen una expresión del transgen

³¹ Evitamos así la precipitación de la sal al entrar en contacto con un volumen importante de medio que se encuentra a una temperatura muy inferior. Este paso puede obviarse en el caso del oleato, que no precipita tan fácilmente.

de forma muy eficiente aunque transitoria, y que es posible dirigir la expresión del transgen a una zona concreta del organismo, según la vía de administración utilizada. Experimentalmente, se ha determinado por ejemplo, que la inyección de vectores adenovíricos en la vena lateral de la cola de ratones, conlleva el acúmulo de los adenovirus en el hígado del organismo. Aprovechando esta característica, dirigimos la expresión de los transgenes utilizados, al hígado de ratones, con la finalidad de obtener mitocondrias funcionales de este órgano.

XVIII.1 CONDICIONES DE ESTABULACIÓN DE LOS ANIMALES

Se utilizaron ratones macho de la cepa C57Bl/6 (Harlan Interfauna) de 6,5 semanas de edad³². Los ratones permanecieron en el estabulario de la Facultad de Biología hasta el momento de su sacrificio, dónde se mantienen en condiciones estándar de iluminación (ciclos de 12 h luz/oscuridad) y temperatura (21 ± 1 °C). Fueron alimentados con una dieta estándar compuesta por un 72% de carbohidratos, 6% grasas, 22% proteína (% energía bruta) (B.K. Universal, España).

XVIII.2 INYECCIÓN DE VECTORES ADENOVÍRICOS EN LA VENA LATERAL DE LA COLA DE RATONES

Para lograr un buen nivel de expresión del transgen, es necesario inyectar una cantidad elevada de adenovirus. En la realización del presente trabajo de Tesis, inyectamos del orden de $2 \cdot 10^9$ pfu. Dado que el volumen inyectable está limitado por la volemia del animal, es indispensable disponer de preparaciones de adenovirus de elevada concentración (idealmente del orden de 10^{11} pfu/ml). En nuestro caso inyectamos un máximo de 10 μ l de la solución viral, diluida hasta 150-200 μ l con salino³³ estéril.

Como anestésico se utilizó el isoflurano (2,5% para la inducción del sueño y 2% de mantenimiento). Éste se elimina rápidamente y preferencialmente vía respiración pulmonar con lo que se disminuye la posibilidad de afectar a algún proceso del metabolismo hepático.

³² Uno de los principales problemas que supone la utilización de adenovirus in vivo, es su elevada capacidad inmunogénica. Por ello, es preferible utilizar animales jóvenes en los que todavía no está plenamente desarrollada la respuesta inmunitaria.

³³ 9 g/l NaCl en agua bidestilada.

Las venas laterales son visibles en los ratones C57Bl/6 pese a que la cola es pigmentada. Para facilitar la inyección, se dilataron las venas laterales de la cola con agua caliente. La inyección se realizó con jeringuillas de 1 ml, y agujas de 27G.

Los animales se mantuvieron en el estabulario durante las 72h posteriores a la inyección del vector adenovírico. El sacrificio se realizó por decapitación sin anestesia, ya que los anestésicos pueden afectar a la estabilidad de las membranas mitocondriales objetivo de nuestro estudio. Inmediatamente después del sacrificio, se obtuvieron muestras de tejidos (TAM del depósito interescapular, músculo esquelético de la pata, corazón, bazo, y una porción del hígado (el resto se destinó a la obtención de mitocondrias funcionales (apartado XIX)) que se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido, y se conservaron a -80°C hasta su utilización (obtención RNA, etc). También se conservó la sangre para obtener plasma que se conservó a -20°C (5 μl de heparina se añadieron a la sangre, agitación suave por inversión, centrifugación a 2000 rpm (microfuga) y obtención del plasma como sobrenadante).

XIX. OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS FUNCIONALES DE HÍGADO Y DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO

Algunas consideraciones generales son importantes a fin de obtener una fracción mitocondrial en buen estado. El material utilizado en el proceso debe limpiarse únicamente con agua (evitando sobretodo el uso de detergentes, cuyos restos podrían afectar a las membranas). Antes de iniciar el proceso es conveniente lavar todos los utensilios con el tampón de homogenización para evitar el contacto de la muestra con el agua. Es también importante mantener una temperatura lo más próxima posible a 4°C durante el proceso (realizar la homogenización de los tejidos en una cámara fría, mantener las muestras y tampones en hielo, etc) y concentrar al máximo la fracción mitocondrial que obtenemos en la última precipitación (ver más adelante).

XIX.1 DESIONIZACIÓN DE LA SACAROSA

La sacarosa utilizada en el tampón ha de ser libre de cationes metálicos y otros iones que podrían afectar a la funcionalidad de los complejos respiratorios. Por ello, ésta ha de ser previamente desionizada, mediante la utilización de una resina de intercambio iónico AG 50W-X8 (Bio-Rad). La resina consiste en una mezcla de resinas de intercambio catiónico y aniónico. La desionización se consigue por intercambio de los cationes

solubles por H^+ y los aniones en solución por OH^- , con la consiguiente producción de agua neutra. La resina retendrá los iones de la solución.

XIX.1.1 DESIONIZACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE SACAROSA

El *stock* de sacarosa desionizada (1M en nuestro caso) puede conservarse congelado a $-20^{\circ}C$ hasta su utilización. Para su desionización, se siguió el proceso descrito a continuación.

PROCEDIMIENTO:

- Pesar 100 g de resina
- Lavar la resina con agua bidestilada
- Dejar precipitar la resina y retirar el agua
- 200 ml de la solución de sacarosa (1M) se ponen en contacto con la resina desionizante.
- agitar durante 5 min
- dejar que la resina sedimente
- retirar la sacarosa desionizada (utilizar un embudo con algodón para evitar arrastrar parte de la resina)
- lavar la resina con agua bidestilada y conservarla a $4^{\circ}C$.

La resina puede conservarse en frío durante meses, sin embargo, si pasa mucho tiempo tras su última utilización, es conveniente regenerarla.

XIX.1.2 REGENERACIÓN DE LA RESINA DESIONIZANTE

Para regenerar la resina, es necesario exponerla a un ácido y NaCl.

PROCEDIMIENTO:

- Lavar la resina con agua bidestilada
- Agitar la resina en presencia de 500 ml de HCl 2N 5 min
- Lavar repetidas veces con agua bidestilada hasta que la resina alcance un pH de 5-6.
- Agitar la resina en presencia de 500 ml de NaCl
- Lavar repetidas veces con agua bidestilada hasta que la resina alcance un pH de 7.
- Repetir todo el ciclo HCl-H₂O-NaCl-H₂O una vez más.

XIX.2 OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS DE HÍGADO

TAMPÓN DE HOMOGENIZACIÓN: 250 mM Sacarosa desionizada, 1 mM EDTA, 50 mM KCl, 25 mM Tris.

PROCEDIMIENTO:

- Sumergir el tejido en el tampón de homogenización inmediatamente después de su extracción (mantener en hielo las soluciones durante todo el proceso).
- Trocear bien el tejido para facilitar la homogenización
- Lavar un par de veces los fragmentos de tejido con el tampón para eliminar los restos de sangre (la hemoglobina puede interferir con las mediciones posteriores).
- Homogenizar bien hasta que no quede ningún trozo de tejido (homogenizador de vidrio grande).

➤ Se reserva una fracción (aproximadamente 400 μ l) que se considera

Homogenado total

- Distribuir en cuatro tubos de centrifuga con capacidad para unos 50 ml (llenar hasta el 80% del tubo con tampón de homogenización).
- Centrifugar a 700g durante 10 min a 4°C.
- Recoger el sobrenadante
- Centrifugar a 7000g durante 10 min a 4°C.
- Descartar el sobrenadante
- Añadir a los precipitados un pequeño volumen de tampón y resuspender suavemente con la ayuda de un pistón de goma.
- Homogenizar suavemente y repartir la solución resultante en dos tubos de centrifuga (Utilizar un homogenizador de pared lisa y con pistón de goma).
- Centrifugar a 7000g durante 10 min a 4°C.
- Descartar el sobrenadante y resuspender en el volumen mínimo (unos 400 μ l) los precipitados con tampón de homogenización. Es muy importante concentrar al máximo la fracción mitocondrial.
- Homogenizar ambos precipitados suavemente (homogenizador pequeño de vidrio y pistón de goma).

➤ La solución resultante estará enriquecida en la **fracción mitocondrial del hígado**.

- Recuperaremos una pequeña parte de la fracción mitocondrial (50 μ l) para su conservación a -80°C y posterior utilización en técnicas como el *western blot*. Centrifugamos a 10.000g a 4°C, y resuspendemos en tampón homogenización

suplementado con 2 mM PMSF, 2 $\mu\text{g/ml}$ de leupeptina, pepstatina, aprotinina y 2 mM de Benzamidina. La valoración de la concentración de proteína de las muestras se realiza tras diluir las muestras 1/10 en tampón de homogenización con un 0,3% Tritón X-100 mediante el método *BCA PROTEIN ASSAY*.

XX. ENSAYOS DE CONSUMO DE OXÍGENO A PARTIR DE MITOCONDRIAS DE HÍGADO

Los ensayos de consumo de oxígeno sobre mitocondrias aisladas se realizaron siguiendo esencialmente lo descrito previamente para las células enteras o permeabilizadas, aunque la temperatura de los ensayos se fijó en 25°C y el equilibrado del electrodo se realizó con el tampón de respiración descrito a continuación (apartado V).

TAMPÓN DE RESPIRACIÓN: 250 mM Sacarosa desionizada, 1 mM EDTA, 50 mM KCl, 25 mM Tris, 5 mM KH_2PO_4 , 0.3% BSA delipidada (Sigma).

La lectura del consumo de oxígeno se realizó sobre 0.5 mg/ml de fracción mitocondrial. El tampón contiene BSA delipidada a fin de captar los ácidos grasos que pueda contener la preparación, de modo que podamos valorar el efecto de una concentración de ácido grasos fijada experimentalmente.

En nuestro caso, realizamos dos tipos de ensayos. En el primero, valoramos el índice de control respiratorio (relación entre los consumos de oxígeno en estado 3/estado 4). El consumo de oxígeno en estado 4 se determinó utilizando como sustrato succinato 6 mM (en presencia de rotenona 5 μM), o una mezcla de Glutamato/Malato 6 mM. A continuación, se obtuvo la tasa de consumo de oxígeno en estado 3 tras la adición de 1 mM de ADP.

Al usar succinato como sustrato que dona directamente los electrones al complejo II de la cadena respiratoria, adicionamos rotenona a fin de evitar el transporte retrógrado de electrones hacia el complejo I.

También se valoró la respuesta a la adición secuencial de 300 μM de palmitato y 1 mM de GDP (utilizando como sustrato 6 mM succinato, en presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de oligomicina y 5 μM de rotenona). Al final de cada lectura se adicionó una concentración

de CCCP³⁴ determinando la capacidad máxima respiratoria al final de cada experimento (3-25 μ M) y verificando así el buen estado de la preparación.

XXI. DETERMINACIÓN DEL *SWELLING* MITOCONDRIAL

Al producirse el *swelling* o hinchamiento de las mitocondrias se da un descenso en la absorbancia de la solución mitocondrial a 540 nm y a 25°C, que podemos valorar espectrofotométricamente. Basándonos en el protocolo descrito anteriormente por Notario et al (Notario et al., 2003), determinamos el *swelling* mitocondrial a partir de mitocondrias aisladas de hígado.

El *swelling* puede darse por una transición en la permeabilidad mitocondrial como la que causa la apertura del MPTP. Para determinar si los efectos observados se debían a la apertura del MPTP, se utilizó una dosis 5 μ M de CsA, un conocido inhibidor de la apertura de dicho canal.

TAMPÓN DE HOMOGENIZACIÓN *SWELLING*: 213 mM manitol, 71 mM sacarosa, y 5 mM Hepes/Tris pH 7,8.

TAMPÓN DE *SWELLING*: 250 mM Sacarosa desionizada, 5 mM succinato, 10 μ M EGTA, 2 μ M rotenona, 1 mM KH₂PO₄, 10 mM TrisMOPS pH 7,4.

PROCEDIMIENTO:

- Obtención de mitocondrias aisladas de hígado según el procedimiento descrito en el apartado XIX, salvo que el precipitado final, correspondiente a la fracción mitocondrial, se resuspende en el tampón de homogenización *swelling*.
- Atemperar el tampón de *swelling* y el resto de reactivos a 25°C. Fijar la temperatura de la cámara del espectrofotómetro a 25°C.
- Adicionar 0.25 mg de proteína mitocondrial al tampón de *swelling* (1 ml de volumen final) y mezclar por inversión.
- Incubar durante 2 min (Adicionar la CsA en los puntos en que se requiera, en este punto, ya que es necesario una incubación para que penetre completamente en las mitocondrias).
- Adicionar los reactivos de interés y mezclar por inversión.

³⁴ La dosis de CCCP utilizada en el caso de trabajar con mitocondrias aisladas es superior a la requerida en células permeabilizadas, ya que este tipo de muestra está mucho más enriquecida en membranas mitocondriales.

- Realizar una lectura continua de la absorbancia a 540 nm durante 6 min (utilizamos el programa *kinetics* del espectrofluorímetro Shimadzu UV-160A).

Es importante realizar este procedimiento con mitocondrias recién aisladas y en ningún caso congeladas previamente, puesto que es fundamental mantener la integridad de las membranas mitocondriales.

XXII. VALORACIÓN PARÁMETROS CIRCULANTES

La valoración de metabolitos circulantes en plasma se ha realizado con los lectores *Accu-Chek® Sensor* (Roche) para la Glucosa, *AccuTrend®GCT* (Roche) para los triacilglicéridos y *AccuTrend®Lactate* para el Lactato según las indicaciones del fabricante.

Los cuerpos cetónicos y NEFA en plasma fueron valorados mediante los *kits* colorimétricos *β-hydroxybutyrate Liquid Color®* (Stanbio), y *NEFA C ACS-ACOD Method* (Wako).

XXIII. ESTADÍSTICA

Los datos se muestran como media + S.E. (*standard error*). Las comparaciones estadísticas se han realizado mediante el test de la t-student. Se ha considerado como significativos aquellos p-valor inferiores a 0.05.

XXIV. OTROS REACTIVOS

6-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, diacetoxymethyl ester (H₂-DCFDA) (Molecular Probes) sonda utilizada en la valoración de ROS.

Antimicina A (Sigma) antibiótico con capacidad de inhibir el flujo de electrones a nivel del complejo III de la cadena respiratoria.

Ascorbato (Sigma) También conocido como vitamina C, es un factor con propiedades antioxidantes.

Atractilato (Sigma): Inhibidor específico de la ANT.

Buthionine sulfoximide (BSO) (Sigma) es un inhibidor específico de la γ -glutamylcisteína-sintasa. La administración de BSO inhibe la síntesis que conlleva la depleción de los niveles celulares de GSH.

Carbonilcianida-3-clorofenilhidrazona (CCCP) (Sigma) ácido débil lipo-soluble que actúa como agente protonofórico y tiene una gran capacidad desacoplante.

Ciclosporina A (CsA) (Sigma) antibiótico con elevada capacidad inmunosupresora. Inhibe la transducción de señal del TCR (receptor células T) formando un complejo con la ciclofilina D. Conocido inhibidor de la apertura del MPTP.

Digitonina (Sigma) detergente que aumenta la permeabilidad de las membranas a través de su interacción con el colesterol.

Doxiciclina (Sigma) Antibiótico.

Etomoxir (Sigma) inhibidor específico de la carnitil-palmitoil transferasa.

Guanina difosfato (GDP) (Sigma) nucleósido difosfato de guanidina.

Higromicina (Roche) Antibiótico.

Monochlorobimane (Molecular Probes) sonda utilizada en la valoración del GSH.

Oligomicina (Sigma) Inhibidor específico de la ATP sintasa.

Rhodamina 123 (Sigma) sonda fluorescente que se internaliza en mitocondria en función del potencial de membrana.

Staurosporina (Stp) (Sigma) Antibiótico (inhibidor PKC) con capacidad de inducir apoptosis en diversos tipos celulares.

Trolox (Calbiochem) derivado hidrosoluble de la vitamina E.

Yoduro de propidio (IP) (Roche) sonda fluorescente que actúa como agente intercalante en DNA.