

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. CITOQUINAS Y COMPUESTOS

1.1. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL-ALFA (TNF- α)

PeproTech EC_{LTD} Cat# 315-01A Lote: 01154. Se utilizó TNF- α recombinante murino, siempre el mismo lote de la citoquina. Se reconstituyó en agua bidestilada (H₂O_{bd}) estéril y se repartió en alícuotas de 10 μ l de 100 ng/ μ l y 25 ng/ μ l. Dichas alícuotas se conservaron a -80°C y se permitió como máximo un ciclo de congelación y descongelación.

1.2. SP100030

Este compuesto fue donado por la empresa Signal Pharmaceuticals (San Diego). Su fórmula química es 2-cloro-4-(trifluorometil)pirimidina-5-N-(3', 5'-bis(trifluorometil)fenil)-carboximida. El compuesto se mantuvo liofilizado a 4°C hasta su utilización.

1.3. GW1929

Este compuesto, cuya fórmula es (N-(2-benzofenil)-O-[2-(metil-2-piridinilamino)etil]-L-tirosina), se obtuvo de la empresa Sigma (Cat# G5668). El compuesto se mantuvo liofilizado a 4°C hasta su utilización.

1.4. RU486

Este compuesto fue donado por el Dr. D. Philibert (Rousel Uclaf, Romain Ville, Francia). Se mantuvo liofilizado a 4°C hasta su utilización.

2. ESTUDIOS *IN VIVO*

2.1. ANIMALES Y CONDICIONES DE ESTABULACIÓN

Los experimentos presentados se realizaron con dos especies de animales diferentes: ratas Wistar (Interfauna, Barcelona) y ratones C57BL/6 (Criffa, Barcelona). Los animales se mantuvieron estabulados en condiciones ambientales estándar (22 \pm 2°C de temperatura, humedad relativa del 70-80%, ciclo de iluminación de 12 horas diarias de luz), con libre acceso al pienso y al agua. La dieta (B.K. Universal G.J./S.L., Sant Vicenç dels Horts) estaba constituida por un 45,5-48,5% de hidratos de carbono (3,5% glucosa absorbible, 43-45% almidón), 18,5% de proteína y 3,1% de grasa.

2.2. MODELOS EXPERIMENTALES DE TUMOR

Se utilizaron dos modelos tumorales altamente caquéticos: el hepatoma ascítico Yoshida AH-130 (en rata), y el carcinoma pulmonar de Lewis (en ratón). Ambos se mantuvieron mediante la inoculación del tumor de un individuo a otro en nuestra colonia del estabulario de forma permanente, obteniéndose para la realización de los experimentos muestras de tumor en fase de crecimiento exponencial.

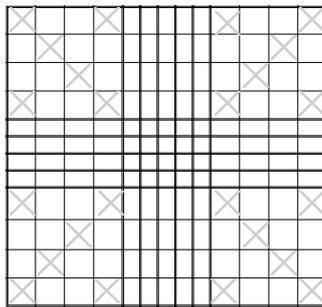
2.2.1. HEPATOMA ASCÍTICO YOSHIDA AH-130

El hepatoma ascítico Yoshida AH-130 es un tumor de rápido crecimiento (tiempo de duplicación de 24 horas) que contiene células poco diferenciadas y que causa, en las ratas portadoras, una rápida pérdida de peso corporal y del contenido proteico del músculo esquelético, así como otras importantes alteraciones metabólicas (Baccino *et al.*, 1984).

Las células tumorales fueron recogidas con una jeringa estéril directamente de la cavidad peritoneal de una rata con tumor en fase exponencial (7 días después de la inoculación), se diluyeron en PBS estéril a una concentración de 10^4 células/ml y se inocularon 2 ml (10^8 células) a cada una de las ratas del grupo de portadoras de tumor, inyectándose intraperitonealmente. Al final del periodo experimental se recogió el tumor de la cavidad peritoneal y se midió su volumen en una probeta graduada. En un *eppendorf* se mezcló, en el siguiente orden; 875 μ l de PBS, 100 μ l de azul Tripano y 25 μ l de suspensión de células tumorales; se agitó suavemente, y se pusieron 20 μ l en la gradilla del hematocitómetro. Se contaron las células en 6 cuadrillos de cada uno de los cuadrantes (X) y se calculó la media de los 16. El número de células se calculó de la siguiente forma;

$$X \times 16 \times 40 \text{ (factor de dilución)} \times 10^4 = \text{número de células / ml}$$

Teniendo en cuenta que la suma de los 16 cuadrillos representa un volumen de 0,1 mm^3 .



Para los experimentos de transferencia génica con adenovirus se usó una cantidad menor de células tumorales, debido a que los animales para este procedimiento eran más pequeños que los utilizados en los restantes tratamientos. La cantidad de células tumorales inoculadas fue en este caso de 40 millones, resuspendidas en 1 ml de PBS (4×10^7 células/ml). Los animales fueron sacrificados a los 4 días de crecimiento tumoral.

2.2.2. CARCINOMA PULMONAR DE LEWIS (LLC)

El LLC constituye un modelo experimental de tumor maligno caracterizado por el crecimiento de un tumor primario sólido (en una de las patas posteriores en nuestro caso) y la formación de ulteriores metástasis pulmonares. Es también de rápido crecimiento y produce una fuerte respuesta caquéctica.

De este modelo tumoral, mantenido en ratones de la cepa C57BL/6, se inyectaron intramuscularmente 200 μ l conteniendo $0,5 \times 10^6$ células a cada animal en una extremidad posterior. Las células fueron obtenidas de tumores en fase exponencial de ratones inoculados con idéntica cantidad de células 15 días antes. El contenido de células se determinó de idéntica manera al modelo tumoral anterior, si bien en este caso, al tratarse de un tumor sólido, debía procederse previamente a la dispersión de las células tumorales y a su suspensión en PBS estéril. Todos los experimentos con ratones se realizaron a día 14 de crecimiento tumoral, determinándose el número de metástasis y el tamaño del nódulo tumoral como indicadores del desarrollo del tumor, dada la imposibilidad de obtener números totales de células tumorales por la alta necrotización del tumor, que presenta además una alta variabilidad entre individuos.

2.2.3. HEPATOMA ASCÍTICO DE EHRLICH

Este modelo de tumor es un hepatoma de rápido crecimiento y que produce una marcada caquexia y múltiples alteraciones metabólicas (Korekane *et al.*, 2003). De este modelo tumoral se aisló la *ornithine decarboxylase-inducing factor* (ODC factor) (Noguchi *et al.*, 1976), una molécula que administrada a ratones sanos produce graves alteraciones metabólicas (Noguchi *et al.*, 1976; Sasaki *et al.*, 1983). Este modelo tumoral presenta altas concentraciones circulantes de TNF- α , IL-6 y IL-1 (da Silva *et al.*, 2002).

Este tumor fue implantado en la cavidad peritoneal de ratones de la cepa C57BL/6 y mantenido en crecimiento exponencial mediante pases sucesivos realizados cada 10 días. La cantidad de células inoculadas por animal fue de 100×10^6 células en un volumen de 1 ml de PBS estéril.

2.3. TRATAMIENTOS Y GRUPOS EXPERIMENTALES

2.3.1. TRATAMIENTO CON SP100030

Se utilizaron ratas Wistar macho que pesaban aproximadamente 110-135 g. Las ratas se dividieron en dos grupos: controles y portadoras de tumor (inoculadas con 10^8 células de AH-130). Ambos grupos fueron divididos a su vez en animales tratados y no tratados. El tratamiento consistió en la administración diaria subcutánea (s.c.) de 1 mg por Kg de peso corporal (p.c.) del compuesto disueltos en carboximetilcelulosa al 1%, a partir del día de la implantación del tumor. El grupo no tratado recibió una inyección similar del vehículo. Se sacrificaron los animales a día 7 tras la implantación del tumor. Diariamente se procedió a la medida de la ingesta y la bebida tomada por los animales.

2.3.2. TRATAMIENTO CON GW1929

Se utilizaron ratones macho C57BL6 que pesaban aproximadamente 25 g. Los animales fueron divididos en controles y portadores de tumor. Ambos grupos fueron subdivididos en animales tratados y no tratados. El tratamiento consistió en la administración diaria (durante 5 días consecutivos) por vía intraperitoneal de 10 mg/Kg. p.c. del compuesto disuelto en DMSO, y según las instrucciones del fabricante fue diluido con PEG 400 justo antes de la inoculación. El grupo no tratado recibió un volumen similar sólo con el vehículo. Se sacrificaron los animales a día 13 tras tras la implantación del tumor. Diariamente se procedió a la medida de la ingesta y la bebida tomada por los animales.

2.3.3. TRATAMIENTO CON RU38486

Para este tratamiento se utilizaron ratas Wistar macho de entre 100-120 g. Las ratas se dividieron en dos grupos: controles y portadoras de tumor (inoculadas con 10^8 células de AH-130). Ambos grupos fueron divididos a su vez en animales tratados y no tratados. El tratamiento consistió en la administración diaria subcutánea (s.c.) de 5 mg por Kg p.c. del compuesto disueltos en polietilenglicol 400 (PEG 400) en 20% etanol, a partir del día de la implantación del tumor. El grupo no tratado recibió una inyección similar del vehículo. Se sacrificaron los animales a día 7 tras la implantación del tumor. Diariamente se procedió a la medida de la ingesta y la bebida tomada por los animales.

2.3.4. INYECCIÓN INTRAMUSCULAR DE LOS ADENOVIRUS

En los experimentos de transferencia génica mediante adenovirus se utilizaron ratas Wistar macho de 3-4 días de vida, inoculándose 5×10^8 virus por animal (adenovirus recombinantes no replicativos) en el músculo gastrocnemius de la pata derecha (AdCMV-TAM67) e izquierda (AdCMV-GFP). Para la inyección de los virus se utilizó una jeringa Hamilton con una aguja diseñada especialmente para este objetivo y que tiene un calibre de 27 G. El volumen máximo que se administró fue de 10 μ l, siendo inyectados en la parte inferior de las extremidades posteriores, donde se encuentran los músculos gastrocnemius y soleus, estando los animales bajo anestesia y en una campana de bioseguridad. La inoculación del tumor se realizó en los animales una semana después de ser destetados, y se sacrificaron a día 4 de crecimiento tumoral. Los tejidos fueron diseccionados rápidamente, pesados y congelados en nitrógeno líquido, para su posterior análisis.

2.4. ANESTESIA Y SACRIFICIO

Al final de cada uno de los experimentos, los animales fueron pesados y anestesiados con una mezcla de ketamina (Imalgene 500 - Rhône Mérieux, Lyon, Francia) / Xilacina (Rompún - Bayer AG, Leverkusen, Alemania) (3:1). La muerte fue provocada por la extracción de la sangre tras la apertura de la cavidad peritoneal y asegurada mediante la ruptura del diafragma.

2.5. EXTRACCIÓN DE TEJIDOS Y SANGRE Y PROCESAMIENTO DE LA SANGRE

En primer lugar se abrió la cavidad abdominal, y una vez visualizada la aorta se procedió a la extracción de la muestra de sangre con una jeringa de 5 ml heparinizada; esta sangre se depositó en un tubo que se mantuvo frío en hielo. A continuación se extrajeron los tejidos. Los tejidos fueron congelados en nitrógeno líquido por *freeze-clamping* inmediatamente después de su extracción y posteriormente pesados. Las muestras de los tejidos congelados se guardaron a -80°C .

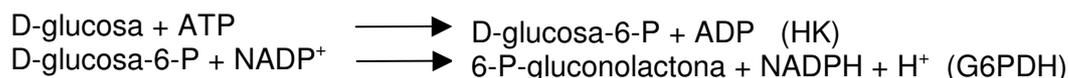
200 μ l de sangre fueron desproteinizados al mezclarlos en un tubo con 2 ml de ácido perclórico al 6%. Estos tubos fueron centrifugados durante 5 minutos y el sobrenadante se guardó en otros tubos cuyo peso ya había sido determinado. El resto de la sangre fue centrifugada y el plasma resultante se guardó en varios tubos *ependorf* que se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Todas estas muestras fueron mantenidas a -20°C .

La sangre desproteinizada fue posteriormente neutralizada mediante la adición de KOH al 30 %. El volumen final nos permitió calcular el factor de dilución debido a esta neutralización, que sería más tarde necesario para los cálculos de las diferentes valoraciones llevadas a cabo en esta muestra. Durante la neutralización se formó un precipitado de KClO_4 , por lo que fue necesario centrifugar la muestra y separar el sobrenadante.

2.6. DETERMINACIONES EN PLASMA, SANGRE Y TEJIDOS

2.6.1. GLUCOSA

Este método se basa en el publicado por Slein (1963). La concentración de glucosa se calculó a partir de la lectura a 340 nm de la cantidad de NADPH formado, que es proporcional a la glucosa presente en las muestras, según la siguiente reacción:

RReactivos

- Mezcla de reacción:

Tris- HCl 0,1 M pH8	10 ml
MgCl ₂ 0,1 M	1 ml
ATP 0,1 M	100 µl
NADP ⁺ 1 %	1 ml
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH)	100 µl

- G-6-PDH (Roche Cat# 0127183 dil. 1:5).

- Hexoquinasa (Roche Cat# 1426354 dil. 1:5).

Protocolo

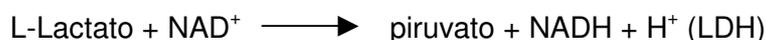
Esta valoración se realizó en muestras de sangre desproteinizada y neutralizada.

En las cubetas de espectrofotómetro se mezclaron: 1 ml de la mezcla de reacción con 0,2 ml de muestra y 0,8 ml de H₂O

Se realizó la prelectura a 340 nm en el espectrofotómetro (SHIMADZU UV 160-A). Se añadieron 10 µl de hexoquinasa (HK), se esperó 5 minutos y se hizo la lectura a la misma longitud de onda.

2.6.2. LACTATO

Se basa en la conversión de L-lactato a piruvato por la lactato deshidrogenasa (LDH) en presencia de NAD⁺ y con formación de NADH (Hohorst *et al.*, 1959). La adición de hidrato de hidracina permite el secuestro del piruvato formado, desplazando la reacción hacia la derecha.

Reactivos

- Mezcla de reacción inicial:

Tris 0,2 M	100 ml
Hidrato de hidracina	6 ml
H ₂ O	70 ml

Se ajustó el pH a 9,5 con HCl 2 N, llevando el volumen a 200 ml con AD y se añadió un poco de EDTA.

- Mezcla de reacción final:

19 ml de mezcla inicial por cada ml de solución de NAD⁺ al 2 %.

Procedimiento

La determinación se realizó en muestras de sangre ya desproteinizada y neutralizada. Se mezclaron en la cubeta de reacción 100 µl de muestra, 900 µl de H₂O y 1 ml de la mezcla de reacción final.

Se esperó 10 minutos y se hizo la prelectura a 340 nm en el espectrofotómetro (SHIMADZU UV 160-A).

A continuación se añadieron 20 µl de LDH (solución comercial Sigma L-2500 diluida 1:5), se esperó 15 minutos y se leyó a la misma longitud de onda.

2.6.3. ALANINA

El ensayo está basado en la siguiente reacción (Williamson, 1974) :



Reactivos

- Mezcla de reacción:

Tampón Tris-hidracina 0,1 M, pH 9.0	19 ml
NAD+ 1%	2 ml
ADP 0,1 M	200 µl

- Alanina deshidrogenasa (AlaDH) (solución comercial Sigma L-2500 diluida 1:5)

Procedimiento

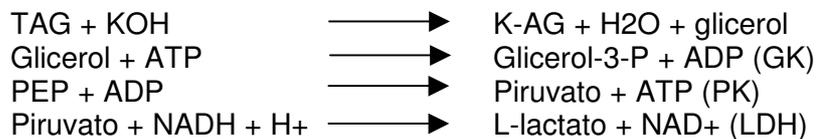
La determinación se realizó en muestras de sangre ya desproteinizada y neutralizada. Se mezclaron en la cubeta de reacción 500 µl de muestra, 500 µl de H₂O y 1 ml de la mezcla de reacción final. Como patrón de referencia se usó L-alanina 1 mM.

Se esperó 10 minutos y se hizo la prelectura a 340 nm en el espectrofotómetro (SHIMADZU UV 160-A).

A continuación se añadieron 20 µl de AlaDH, se esperó 30 minutos y se leyó a la misma longitud de onda.

2.6.4. TRIACILGLICEROLES

Los triacilglicerole (TAG) en plasma fueron determinados por el método de Eggstein y Kreutz (1966), basado en la saponificación del medio alcalino/alcohólico, y posterior determinación del glicerol formado (Garland y Randle, 1962)



Reactivos

- KOH 3% en etanol

- MgSO₄ 0,1 M

- Mezcla de reacción:

Tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4	30 ml
MgCl ₂	3 mg
Fosfoenolpiruvato	35 mg
ATP	50 mg
NADH	12,5 mg
Lactato deshidrogenasa (LDH) (Roche Cat# 107085 dil. 1/5)	200 µl
Piruvato quinasa (PK) (Roche Cat# 128155 dil. 1/5)	200 µl
Se ajustó el pH entre 7 y 8	

- Gliceroquinasa (GK) (Roche Cat# 127795 dil. 1/5)

Las diluciones de las enzimas se realizaron con (NH₄)₂SO₄ 3,2M

Protocolo

Se saponificaron 200 µl de plasma, incubándolos con 500 µl de solución de KOH alcohólica a 70°C durante 35 minutos.

Seguidamente se añadió a los tubos 1,5 ml de MgSO₄ 0,1 M y se centrifugaron durante 15 minutos a 2.000 g, guardando el sobrenadante.

En las cubetas se añadió 1ml de mezcla de reacción, 500 µl de muestra y 500 µl de H₂Od. Se agitó, se dejó estabilizar durante 5 minutos y se hizo una prelectura a 340 nm en el espectrofotómetro (SHIMADZU UV 160-A).

Se añadieron 10 µl de GK, se esperaron 10 minutos, y se leyó a la misma longitud de onda.

2.7. MEDIDA DE LA LIBERACIÓN DE TIROSINA EN INCUBACIONES DE MÚSCULOS AISLADOS

Para estudiar efectos directos sobre la degradación proteica en músculos, recurrimos a la incubación de músculos aislados (mantenidos en condiciones lo más parecidas posible a su estado natural en el animal) y a la cuantificación fluorimétrica de la tirosina liberada al medio (Waalkes y Udenfriend, 1957). Este aminoácido no es significativamente sintetizado ni metabolizado por el músculo, por lo que, en condiciones de síntesis proteica inhibida (presencia de cicloheximida), proporciona una buena medida de la tasa de degradación proteica muscular.

Reactivos

- Tampón Krebs-Hepes (TKH)

NaCl	7,47 mg/ml
KCl	0,35 mg/ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,29 mg/ml
KH ₂ PO ₄	0,16 mg/ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,27 mg/ml
Hepes	20 mM

Gasear durante 20 minutos. con carbógeno (O₂:CO₂, 95:5), ajustar pH a 7.4.

Preparar justo antes de su utilización y conservar a 4°C.

- Cicloheximida

- L-leucina (L-Leu), L-isoleucina (L-Ile) y L-valina (L-Val)

- Glucosa

- Tirosina

- TCA 30%

- Reactivo A: 1-nitroso-2-naftol 0,1% en alcohol 95%

- Reactivo B: (mezcla de ácido nítrico) 0,5 ml de sol. 1 + 24,5 ml de sol. 2

Sol. 1.- NaNO₂ al 2,5% (p/v) en H₂Od

Sol. 2.- Ácido nítrico diluido 1/5 en H₂Od

Material

- Viales de vidrio de 10 ml

- Soportes metálicos

- Hilo

- Baño con agitación

- Sistema de gaseado continuo

Procedimiento

Los músculos EDL de ambas patas fueron extraídos de los animales anestesiados antes de ser sacrificados. Los músculos fueron ligados a un soporte metálico antes de ser separados de los tendones, para mantenerlos en tensión, y transferidos a un vial que contenía 3 ml de TKH suplementados con L-Leu (170 µM), L-Ile (100 µM), L-Val (200 µM) y glucosa (0,5 M).

Se realizó una preincubación de 30 min. en un baño a 35°C con agitación suave.

Seguidamente los músculos fueron transferidos a nuevos viales que contenían 2 ml del mismo medio suplementados con cicloheximida (500 nM) y en presencia o ausencia de la sustancia a estudiar.

Se incubaron los viales durante 30 minutos en las mismas condiciones, se transfirieron a nuevos viales que contenían 2 ml del mismo medio fresco y se incubaron durante 2 horas más.

Al final de la incubación se recogió el medio de los viales y se mantuvo en hielo o se congeló a -20°C . Los músculos EDL fueron pesados, congelados y mantenidos a -80°C .

Para la determinación de la tirosina liberada al medio se tomaron 1,4 ml de muestra, de blanco (TKH) o de patrón (patrón de tirosina en TKH de 0,156 a 2,5 $\mu\text{g/ml}$) y se mezclaron con 250 μl de TCA30%.

La mezcla se centrifugó a 2.500 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se mezcló con 300 μl del reactivo A y 300 μl del reactivo B y se incubó durante 30 minutos a 55°C .

Una vez enfriada, se mezcló con 4 ml de dicloroetano, se agitó en el vórtex y se centrifugó durante 4 minutos a 1500 rpm.

El sobrenadante se utilizó para la determinación fluorimétrica, ajustando en el fluorímetro (SHIMADZU RF5001PC) la longitud de onda de excitación a 460 nm, y la de emisión a 570 nm.

3. ESTUDIOS *IN VITRO*

3.1. CULTIVOS CELULARES

3.1.1. NORMAS GENERALES DE MANIPULACIÓN

Cuando se trabaja con cultivos celulares es imprescindible mantener condiciones estrictas de esterilidad, y es extremadamente importante mantener un seguimiento de las características observables del cultivo al microscopio, para detectar tempranamente contaminaciones (bacterias, hongos, levaduras) o cambios espontáneos en el fenotipo de los cultivos.

3.1.1.1. NORMAS DE ESTERILIDAD

Se trabajó siempre intentando mantener la mayor limpieza posible; también lavándonos las manos con jabón y mojándonos con etanol antes de comenzar a trabajar. Se trabajó siempre bajo campana de flujo laminar vertical, cuya superficie se descontaminaba con etanol antes y después de cada sesión de trabajo. Todo el material fungible estéril se guardaba en bolsas bien cerradas para protegerlo de contaminaciones y suciedad, abriéndolas y cerrándolas preferentemente dentro de la campana y manteniéndolas dentro de la sala de cultivo. Las botellas de medios y reactivos, los succionadores y otro material que no estuviera convenientemente envuelto se fregaba con un poco de etanol antes de introducirlo dentro de la campana. Las botellas de medios estériles se abrían y cerraban dentro de la campana, cerca de la llama del mechero Bunsen, y se sellaban con cinta alrededor del tapón antes de sacarlas. Toda sustancia o material que tuviese que estar en contacto con las células se procuraba que fuera de calidad para cultivos (normalmente ya estériles) o se esterilizaban por filtración (filtro de 22 μm) o autoclavado.

Teniendo en cuenta que el flujo laminar de la campana es vertical de arriba a abajo, los tapones de las botellas y las tapas de las placas abiertas se colocaban boca abajo y se procuraba no pasar la mano o cualquier otro objeto por encima de los medios, placas al descubierto o cualquier material destinado a estar en contacto con las células.

Se realizaban limpiezas periódicas de la campana y del incubador, para evitar contaminaciones, y toda la sala era sometida a radiaciones ultravioleta durante la noche.

3.1.1.2. OTRAS CONSIDERACIONES GENERALES DE MANIPULACIÓN

Las condiciones dentro del incubador eran siempre de 37°C, 90% de humedad relativa y 5% de CO₂. Se procuró mantener las células el menor tiempo posible fuera del incubador.

Debido a que las células con las que trabajamos son inmortalizadas, es relativamente fácil la aparición de alteraciones fenotípicas debidas a la adquisición espontánea de características de transformación; por ello seguíamos atentamente el aspecto de los cultivos en la observación microscópica, y no utilizábamos células de más de 12 subcultivos a partir del pase cero del proveedor.

El mantenimiento del *stock* se hizo de forma que nunca llegara a confluencia para no deplecionar el componente mioblástico de la población de células: una vez que los mioblastos inician el programa miogénico, pierden irreversiblemente la capacidad proliferativa. Las células congeladas fueron siempre mantenidas en nitrógeno líquido.

Se comprobó la ausencia de contaminación por micoplasmas por medio del Kit de detección de micoplasmas (Biological Industries Co. Reactiva S.A. Cat# 6601-A), ya que este tipo de contaminación no es detectable a simple vista.

3.1.2. LINEA CELULAR C2C12

Esta línea celular es un subclón derivado por H. Blau (Blau *et al.*, 1985) de la línea celular miogénica murina C2, establecida a partir de células satélite de músculo esquelético de la extremidad posterior de ratón C3H adulto (Yaffe y Saxel, 1977).

Esta línea se diferencia rápidamente y produce anchos miotubos contráctiles que expresan características de músculo esquelético. Este clón proporciona un modelo excelente para el estudio de la miogénesis *in vitro* y la diferenciación celular (Blau *et al.*, 1985).

Las células con las que trabajamos fueron obtenidas directamente de la American Type Culture Collection (ATCC CRL-1772, Lot # F-15168)

3.1.3. MEDIOS DE CULTIVO, SUPLEMENTOS Y ANTIBIÓTICOS

3.1.3.1. DUBELCO'S MODIFIED EAGLE MEDIUM (DMEM)

(BioWhittaker. Cat# 12-604F). Este medio viene ya estéril y suplementado con 4,5 g glucosa/ml, 110 mg piruvato sódico/ml y 2 mM L-glutamina (Gln). Lo abríamos dentro de la campana y lo suplementábamos inmediatamente con 100 unidades de penicilina/ml, 100 mg de estreptomycin/ml, 25 ng de fungizona/ml y el suero correspondiente. Una vez abierto se conservaba a 4°C y no más de 15 días.

3.1.3.2. SUERO FETAL BOVINO (FBS)

(BioWhittaker Cat#14-602B Lote: 65B0013). Es muy importante mantener un lote constante de suero, ya que un cambio de este puede introducir mucha variabilidad en los experimentos. Todos los experimentos se llevaron a cabo con FBS siempre de la misma casa comercial y el mismo lote. El suero se conservó en alícuotas de 50 ml a -20°C. Para inactivar el complemento, antes de alícuotar se mantenía el suero 1 hora a 55°C

3.1.3.3. PENICILINA-ESTREPTOMICINA-FUNGIZONA (PSF)

(BioWhittaker Cat# 17-745H), 10000 U/ml de penicilina, 10000 µg/ml de estreptomicina y 25 µg/ml de fungizona. Los dos primeros son antibióticos y el tercero es un antifúngico. Se añadía al DMEM justo al abrir la botella, diluyéndolo 1:100. Se conservaba en alícuotas de 10 ml a -20°C.

3.1.3.4. TRIPSINA (TRIPSINA-VERSENE)

(TRYPSIN-VERSENE 200 mg/L versene (EDTA) - 500 mg/L tripsina 1:250 BioWhittaker Cat# 17-161E). Es conveniente usar tripsina con EDTA porque este último quela los cationes divalentes, inhibiendo la adhesión intercelular y a la placa. Se alicuotaba en tubos estériles de 15 ml (ya que resiste varios ciclos de congelación y descongelación), y se conservaba a -20°C.

3.2. TÉCNICAS GENERALES EN CULTIVOS CELULARES

3.2.1. MANTENIMIENTO DEL STOCK

El stock se mantuvo siempre en DMEM 10% FBS en placas de 10 cm de diámetro o en frascos de rosca de 75 cm². El stock se mantuvo siempre por debajo del 80% de confluencia, haciendo subdivisiones cada dos o tres veces por semana en las que se diluían las células entre 5 y 15 veces. Se ponía especial cuidado en que las células estuvieran bien dispersas para que no se formaran clones, ya que en el centro de estos grupos los mioblastos pueden empezar el programa miogénico. Las alícuotas descongeladas procedían de un pase (o subdivisión) 2 ó 3 a partir del original de las cuales no se realizaron más de 8 ó 9 subdivisiones. El tiempo aproximado de duplicación de la población es de unas 24 horas (cuando las células no están demasiado diluidas). Una placa de 10 cm de diámetro contiene aproximadamente 4×10^6 células.

3.2.2. SUBDIVISIÓN (TRIPSINIZACIÓN)

Reactivos

- PBS
- Tripsina-VERSENE

Procedimiento

Se aspiraba el medio de las placas y se lavaban tres veces con PBS o con DMEM sin suero (procurando eliminar todo resto de suero porque inhibe la tripsina).

Se añadía 1 ml de tripsina sin diluir por placa de 10 cm de diámetro, se ponían exactamente 1 minutos en el incubador, y se sacaban para aspirar el mililitro de tripsina, dejando sólo una fina película de la misma sobre la monocapa.

Se volvían a introducir en el incubador durante 4 ó 5 minutos y luego se paraba la reacción añadiendo medio con suero.

3.2.3. CONTAJE

Material

- Hematocitómetro (cámara de Neubauer)

Procedimiento

Una vez tripsinizadas las células y hecha la primera dilución, se resuspendían muy bien con ayuda de una pipeta pasteur estéril, se agitaba bien el tubo, y se tomaba una

alícuota de 15 μ l para poner en el hematocitómetro. Observando al microscopio a 100 aumentos, se contaban 6 de los 16 cuadrillos de cada cuadrante. El número de células se calculaba de la siguiente manera:

$$\text{Células /ml} = \text{media de conteo de los 4 cuadrantes} \times 10^4$$

3.2.4. SIEMBRA

Una vez tripsinizado el stock, se hacía una primera dilución de aproximadamente $1,5-2 \times 10^6$ células/ml, y se realizaba el conteo. Después de hacer los cálculos se sembraba a $3,7 \times 10^4$ células/cm², de forma que pusiéramos:

- en cada placa de 10 cm de diámetro, 10 ml de medio con $2,5 \times 10^6$ células
- en cada pocillo de placa de 6 pocillos, 2 ml con $3,5 \times 10^5$ células
- en cada pocillo de placa de 24 pocillos, 1 ml con $0,7 \times 10^5$ células

Una vez realizada la dilución deseada de las células, se agitaba el tubo periódicamente para evitar que éstas se depositaran en el fondo. Una vez sembradas, se agitaban las placas suavemente de izquierda a derecha y de adelante a atrás, para repartirlas bien por toda su superficie.

3.2.5. CONGELACIÓN

Material y medios

- PBS
- Viales de congelación (NUNC Labclinics Cat# 366656 1ml)
- Medio de congelación: DMEM- 20%FBS, 10%DMSO

Procedimiento

Las células tripsinizadas y resuspendidas en DMEM-10%FBS se contaban, se centrifugaban durante 4 minutos a 220 g, y una vez eliminado el sobrenadante se resuspendían en medio de congelación a una concentración de 10^6 células/ml. Se repartían en alícuotas de 1 ml en los viales y se procedía a la siguiente secuencia de congelación:

- 1 hora a 4°C
- 2 horas a -20°C
- toda la noche a -80°C

Se conservaban congeladas en nitrógeno líquido.

3.2.6. DESCONGELACIÓN

La alícuota se descongelaba lo más rápidamente posible en un baño a 37°C y se resuspendía rápidamente en 10 ml de DMEM-10% FBS, para evitar la acción del DMSO. Se centrifugaban a 220 g durante 4 minutos y se descartaba el sobrenadante. Por último, se resuspendían en 10 ml de DMEM-10% FBS y se sembraban en una placa de 10 cm de diámetro.

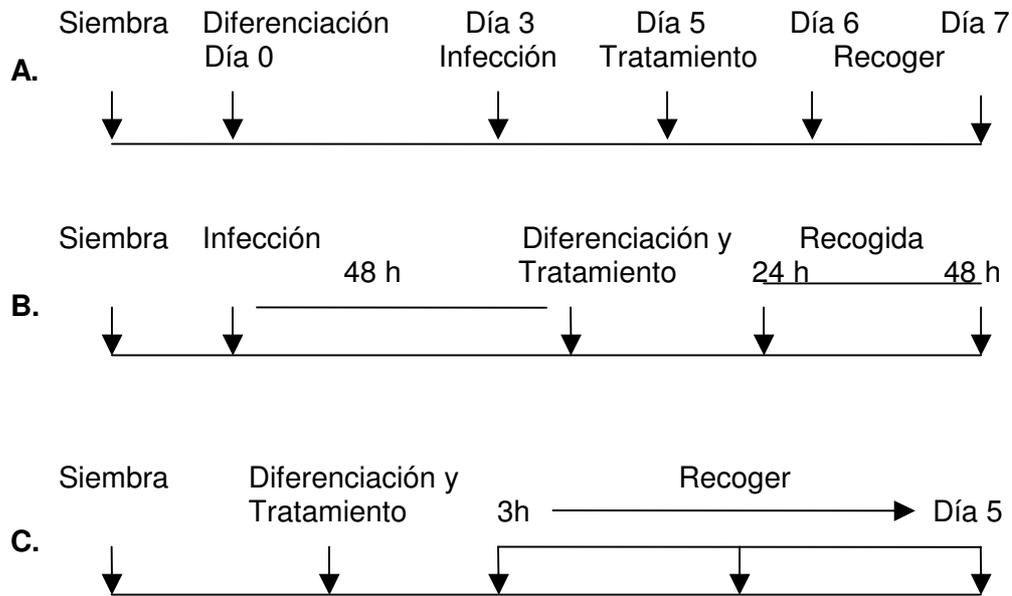
3.3. CONDICIONES DE CULTIVO Y DIFERENCIACIÓN

Para los experimentos con miotubos, las células C2C12 se sembraban a $3,7 \times 10^4$ células/cm² en DMEM-10% FBS. Al día siguiente, cuando las células estaban al 90-100% de confluencia, se transferían a medio de diferenciación: DMEM-2% FBS. El medio se renovaba cada 48 h y los tratamientos se realizaban de día 0 a 7 de diferenciación, según el tipo de ensayo (esquema A).

Para el modelo de células en diferenciación se sembraban $7,5 \times 10^4$ células por pocillo de las placas de 6 pocillos en DMEM-10% FBS. Para los ensayos con adenovirus, las células eran infectadas a las 10-12 horas posteriores a ser sembradas;

de esta manera, antes de cambiarles el medio al de diferenciación la proteína contenida en el genoma del virus disponía de 48 horas para alcanzar una expresión adecuada (esquema B). Al momento de ser diferenciadas eran tratadas con TNF- α y recogidas a las 3, 24, 48 horas y hasta los 5 días posteriores, dependiendo del ensayo que se quisiera realizar (esquema C).

Los esquemas seguidos para el desarrollo de los experimentos son los siguientes:



3.4. TRATAMIENTOS

Las citoquinas e inhibidores se conservaban a -20°C hasta justo antes de ser añadidas al medio. Entonces se mezclaban con éste en un tubo y luego se repartían entre los pocillos, para asegurarnos que todos recibían la misma dosis. Los tratamientos se renovaban todos los días.

4. MANIPULACIÓN Y DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.1. NORMAS GENERALES DE MANIPULACIÓN DE RNA

Las manipulaciones y las soluciones han de estar libres de la presencia de RNAsas. Para ello se utiliza el autoclave durante 20 minutos a 1 atm para esterilizar material y reactivos. Aún así, no es suficiente para inactivar totalmente las RNAsas, lo que requiere el tratamiento previo con agua DEPC u otro agente desnaturizante de las mismas. Los reactivos de biología molecular se preparan con agua ultrapura (MilliQ, Millipore). En general, las sales y reactivos que se deben mantener en solución se disuelven, se les ajusta el pH, y se esterilizan por medio de autoclavado o filtración (filtros estériles de $22\ \mu\text{m}$ de diámetro). El material de plástico utilizado era estéril de origen y el material de vidrio se autoclavaba.

Para la obtención y manipulación del RNA se tuvieron en cuenta las siguientes precauciones adicionales: 1) manipulación con guantes de cirugía, ya que las manos son una fuente muy importante de contaminación por RNAsas; 2) el material de vidrio se calentaba a 200°C al menos 4 horas; 3) el material de plástico se utilizaba de origen estéril, y además, se usaba un *stock* autoclavado reservado, que sólo se manipulaba con guantes; 4) los reactivos utilizados se tenían reservados para este propósito (libres de RNAsas), se manipulaban siempre con guantes y nunca se introducían espátulas

en ellos; 5) los reactivos se pesaban directamente sobre un recipiente libre de RNAsas o sobre papel de aluminio que no hubiera estado antes en contacto con ninguna posible fuente de contaminación; 6) para la electroforesis de RNA, se utiliza material reservado para esta finalidad, enjuagándolos con un poco de agua-DEPC antes de ser utilizados.

4.2. EXTRACCION DE RNA TOTAL

Para la extracción de RNA total tanto de tejidos como de células en cultivo usamos el *kit Tripure Isolation Reagent* (Roche). Este kit nos permite obtener aproximadamente entre 1-1,5 µg de RNA por mg de tejido muscular.

4.2.1. EXTRACCIÓN DE RNA A PARTIR DE MÚSCULO ESQUELÉTICO

Para la integridad del RNA es muy importante que el músculo haya sido congelado en nitrógeno líquido inmediatamente después de su extracción, que se conserve al menos a -80°C y que se haya evitado que sufra ciclos de congelación y descongelación.

Procedimiento

1. Añadir 1 ml de la solución Tripure en tubos falcon.
2. Poner rápidamente el tejido dentro del tubo, aproximadamente 100 mg sin tocarlas con las manos (las muestras hasta este momento se mantenían en nitrógeno líquido).
3. Homogenizar las muestras con el politrón Ultra turrax T-25 a velocidad media durante unos 30-45 segundos, en tandas de 10-12 segundos, evitando que la muestra se caliente.
4. Pasar el homogenado a tubos eppendorf y centrifugar a 12.000 g durante 1 minuto.
5. Pasar el sobrenadante a un eppendorf nuevo e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Añadir 200 µl de cloroformo y mezclar usando el vortex durante 15 segundos.
7. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 12.000 g 15 minutos y a 4 °C .Con esta centrifugación se separan las dos fases: la fase acuosa con el RNA (arriba) y la fase de fenol-cloroformo (abajo).
9. Coger la fase acuosa y transferirla a un nuevo eppendorf, con cuidado de no coger la fase de abajo.
10. Añadir 500 µl de isopropanol y mezclar por inversión para que precipite el RNA.
11. Incubar 5-10 minutos a temperatura ambiente.
12. Centrifugar a 12.000 g 10 minutos a 4 °C.
13. Eliminar el sobrenadante y lavar el *pellet* con 1 ml de etanol al 75 % libre de RNAsas.
14. Centrifugar a 12.000 g por 5 minutos a 4 °C.
15. Descartar el sobrenadante y secar el *pellet* (se puede poner en un bloque a 37°C unos minutos). Una vez las muestras están secas, ponerlas rápidamente en hielo.
16. Resuspender el *pellet* en 40 µl de H₂O_{bd}, tampón TE o H₂O DEPC, dependiendo cual será su uso. Siempre el disolvente que se utilice debe estar libre de RNAsas. Para que el RNA se disuelva totalmente, las muestras se pueden incubar 10-15 minutos a 65 °C.

4.2.2. EXTRACCIÓN DE RNA A PARTIR DE CULTIVOS CELULARES

Para la extracción de RNA a partir de células en cultivo se utiliza el mismo procedimiento, pero con algunas modificaciones. Las células normalmente habían crecido sobre placas multiwell de 6 pocillos.

Procedimiento

1. Una vez terminado el tratamiento, lavar las células se 3 veces con PBS frío y ponerlas sobre hielo.
2. Añadir 500 µl de Tripure y rascar las placas. Con la finalidad de ayudar a la lisis celular, aspirar y tirar el homogenado con la pipeta un par de veces antes de ponerlo en el eppendorf.
3. Continuar con el procedimiento para tejidos desde el paso 4.

4.3. CUANTIFICACIÓN DEL RNA

Para resuspender bien el RNA, se calentó durante 10 minutos a 65°C y se diluyó 1 µl del mismo en 1 ml de agua (por duplicado). La cuantificación se hizo utilizando el espectrofotómetro (Shimadzu UV 160-A). Se midió la absorción a 260 nm, que nos dió la cantidad de RNA (1 unidad de D.O. corresponde 40 µl de RNA/ml) y a 280 nm, que nos proporcionó la cantidad de proteína. La relación entre D.O.260/D.O.280 debía estar comprendida entre 1,7 y 2. La integridad del RNA se comprobó corriendo 1 µg del mismo en un gel desnaturizante de agarosa al 1,2% y visualizando el RNA ribosómico en un transiluminador de luz ultravioleta.

4.4. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA/FORMALDEHÍDO

El gel de agarosa/formaldehído es un sistema simple de electroforesis desnaturizante que nos permite obtener una buena resolución del RNA de cadena sencilla (Lehrach *et al.*, 1977). La desnaturización del RNA garantiza que la movilidad electroforética sea función del peso molecular, así como una eficiente transferencia del RNA hacia la membrana de Nylon.

Soluciones

- Tampón de electroforesis (MOPS x 10):

MOPS	0,2 M
Acetato sódico	0,05 M
EDTA (pH 7.0)	0,01 M

- Tampón de muestra desnaturizante:

Formamida	62,5 %
Formaldehído	25 %
MOPS x 10	12,5 %

- Tampón de carga:

Sacarosa	40 %
Cianol xileno	0,25 %
Azul de bromofenol	0,25 %

La relación entre tampón de muestra y el de carga es de 4:1.

Procedimiento

De cada muestra se cargó 10 µg de RNA desnaturizado en un gel de agarosa del 1,2% y formaldehído al 6,3% (en MOPS 1x). Para visualizar el RNA se incorporó

bromuro de etidio directamente a la muestra (1 μ l de *stock* 10 mg/ml por 40 μ l de tampón de carga).

Se mezcló el RNA en tampón de muestra con el volumen correspondiente de tampón de carga, se calentó 10 minutos. a 65°C y se cargó en el gel.

La electroforesis se realizó a 120 V en tampón MOPS 1x.

Por último, se comprobó el estado del RNA y la carga visualizando las bandas correspondientes a RNA ribosómico en un transiluminador de luz ultravioleta.

4.5. NORTHERN BLOT

El análisis de Northern blot se utiliza para determinar la medida y la cantidad de cualquier RNA específico a partir de una mezcla de RNAs. Una vez se han separado los RNAs según su medida en el gel de agarosa, se transfieren a una membrana de Nylon, donde se fijan covalentemente. La detección de una especie concreta de RNA se realiza incubando con una sonda marcada radioactivamente. Esta técnica ha tenido pocas modificaciones desde su publicación (Alwine *et al.*, 1977).

Material y soluciones

- Membrana de Nylon (Hybond N, Amersham)
- Papel Whatman 3MM Chr.
- Papel de filtro.
- Tampón de transferencia: SSC 20X (1 l)

NaCl	3M	175,3 g
Citrato sódico·2H ₂ O	0,3M	88,3 g

 Ajustar el pH a 7 con HCl 1M y autoclavar

Procedimiento

Una vez realizada la electroforesis, se hizo la transferencia del RNA del gel de agarosa/formaldehído a una membrana por capilaridad. Para ello se llenaba una bandeja con el tampón SSC 20X y encima se colocaba un trozo de vidrio. Sobre el trozo de vidrio, se montaba un circuito en el que el gel y la membrana estaban en contacto directo entre sí y entre sendas capas de papel Whatman que los conectaban constantemente con el tampón SSC 20X. El circuito se cerraba poniendo tiras de plástico en los bordes del gel y de la membrana, y se aseguraba el buen contacto de ambos poniendo encima abundante papel absorbente y algún objeto pesado. La transferencia tenía lugar durante toda la noche.

El RNA se fijó a la membrana mediante la técnica *gene-linker* (mediante radiación U.V., 150 mJoule) (*BioRad G.S. Gene Linker UV Chamber*).

Se fotografió la membrana y el gel; de esta manera se pudo comprobar la integridad del RNA, si se había cargado la misma cantidad de RNA en cada pocillo y la eficiencia de la transferencia.

Después se guardó la membrana sellada dentro de una bolsa de plástico a 4°C hasta el momento de la hibridación.

4.6. MARCAJE DE LA SONDA E HIBRIDACIÓN

4.6.1. MARCAJE

Para el marcaje radioactivo de las sondas de cDNA utilizó el kit *Redi Prime™ II random Prime labelling System* de la empresa Amersham, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Procedimiento

1. Coger 40ng de cDNA para cada una de las sondas a marcar, ponerlas dentro de tubos eppendorf y hacer un *Speed vac*; con esto secamos la muestra, para posteriormente resuspenderla en 45 μ l de 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.
2. Hervir las muestras 5 minutos a 100 $^{\circ}$ C.
3. Mantener las muestras en hielo durante 5 minutos; transcurrido este tiempo centrifugar las muestras unos segundos con el fin de bajar toda la muestra al fondo del tubo.
4. Añadir el cDNA (sonda) al tubo comercial, incluido en el kit, sin mezclar.
5. Una vez en las instalaciones radioactivas, se añaden 5 ml de 32 P-CTP.
6. Según las instrucciones del kit, en tan sólo 10 minutos la sonda ya está lista para usar, aunque se puede incubar hasta 1 hora.
7. Parar la reacción mediante la adición de 5 μ l de EDTA 10 mM y 50 μ l de H₂O_{bd}.
8. Con el fin de eliminar los nucleótidos no libres, se procede a someter la sonda por una columna MicroSpinTM S-200HR (Amersham), recoger la sonda ya marcada y purificada, y cuantificar las cpm en el equipo de la instalación radioactiva.

4.6.2. HIBRIDACIÓNMaterial y Soluciones

- Horno de hibridación
- Tubos de hibridación
- Película fotográfica (*Hyperfilm MP, Amersham*)
- Na₂HPO₄ 25 mM
- Tampón de prehibridación (10 ml)

EDTA 0,5 M	20 μ l
BSA	0,1 g
Fosfato sódico 0,5 M	5 ml
SDS 20 %	3,5 ml
- Tampón de hibridación (10 ml)

EDTA 0,5 M	20 μ l
BSA	0,1 g
Fosfato sódico 0,5 M	5 ml
SDS 20 %	3,5 ml
- Solución de deshibridación 1.
SSC 1X - SDS 0,1%
- Solución de deshibridación 2
SSC 0,1X - SDS 0,1%

Procedimiento

Las membranas se introdujeron en los tubos de hibridación y se les añadieron 200 ml de Na₂HPO₄ 25 mM. Se incubaron durante 5 min. a 65 $^{\circ}$ C.

Después se incubaron a la misma temperatura con el tampón de prehibridación otros 5 minutos, y lo mismo se hizo con el tampón de hibridación.

Se añadió la sonda justo después de hervirla durante 5 minutos (1-3 x 10⁶ dpm/ml) y se incubó toda la noche a 65 $^{\circ}$ C.

Se realizaron sendos lavados de 20 minutos en el horno a la misma temperatura con la solución de deshibridación 1 y con la 2 secuencialmente. De esta manera, al disminuir la concentración de sales se aumentaba la astringencia, ya que las interacciones entre la sonda y el RNA son hidrofóbicas. Una de las ventajas de trabajar con membranas de Nylon es que pueden ser deshibridadas y posteriormente

rehibridadas con otras sondas, si bien al repetirse el proceso se va perdiendo parte del RNA adherido a la membrana y el marcaje inespecífico se incrementa.

Las membranas se guardaron selladas en bolsas de plástico y se expusieron a película fotográfica.

Posteriormente las bandas fueron cuantificadas con el programa de análisis de imagen Phoretix (versión 2.51, Phoretix International Ltd) y los resultados obtenidos se corrigieron por la cantidad de RNA de la banda de los RNA ribosómicos 18 S.

4.7. SONDAS DE cDNA

Los plásmidos recombinantes que se utilizaron son los siguientes:

4.7.1. UBIQUITINA

Se utilizó el vector SP64, que contenía 12 pares de bases de la segunda secuencia codificadora de la ubiquitina más la tercera y cuarta secuencia codificadora de la ubiquitina y 120 pares de bases de la región 3' no traducida del gen de la poliubiquitina UBI de pollo (Bond y Schlesinger, 1986). Como sonda se utilizó un fragmento de 534 pb de longitud, resultante de la digestión con el enzima de restricción Pst 1.

4.7.2. 18S

Se utilizó una sonda de 175 pb de la subunidad ribosomal de rata que corresponde a los nucleótidos 500 al 672 (Torczynski *et al*, 1983). Se encontraba insertada en el vector Bluescript-KS+, y se obtuvo por digestión con EcoRI y PstI.

4.7.3. MyoD

Este plasmido fue donado por el Dr. C. Vesco (Institute of Cell Biology (CNR) Roma, Italia). El plasmido pCMVMyoD contiene el cDNA codificante para este factor miogénico de rata. Para los Northern blot se utilizó todo el cDNA 1.199 pb.

4.7.4. E2

Esta sonda fue donada por el Dr. S.S. Wing (Protein and Polypeptide Hormone Laboratory, Québec, Canada).

4.7.5. UCP3

Esta sonda contiene todo el cDNA codificante para la UCP3 de ratón (Fleury y Bouillard, número de acceso al *GenBank* AF032902).

Para poder disponer de la cantidad suficiente del plásmido recombinante necesario para los diferentes marcajes radioactivos del cDNA, se transformaron bacterias competentes con el plásmido recombinante y posteriormente se aisló el DNA plasmídico. Por digestión con enzimas de restricción adecuadas, se extrajo el inserto de cDNA de los plásmidos recombinantes, se purificaron y se guardaron a 4°C hasta el momento del marcaje por el método de *random priming*.

4.8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-PCR.

Para la determinación de las cantidades relativas de algunos mRNA de interés se utilizó la técnica de RT-PCR semicuantitativa. Esta técnica se basa en la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) acoplada a una reacción de retro-transcripción, ambas realizadas por polimerasas con unas características muy particulares. Para la realización de esta técnica se utilizaron los tubos de RT-PCR de la empresa Amersham *Ready-to-go RT-PCR Veads*, que permiten en un solo paso tener ambas reacciones acopladas; las reacciones fueron realizadas en las condiciones que recomienda el fabricante. El RNA usado fue obtenido como se indica en el apartado 4.2. Los oligonucleótidos utilizados para las reacciones fueron diseñados con el programa y contrastados con los cDNAs disponibles en el *Gene Bank* (Id3, Gene Bank Acceso N° NM_013058). Los productos de las RT-PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1,5% en TBE 1X y cuantificados por densitometría. Los valores de los mRNA fueron corregidos por el mRNA de la subunidad ribosómica 18S. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la siguiente tabla:

Gen		óligo 5'-3'	Producto
Id3	sentido	GGCTGCTACGAGGCGGTGTGC	500 pb
	antisentido	TCGAGGCGTTGAGTTCAGGGTAAG	
18S	sentido	CGCAGAATTCCCACTCCCGACCC	212 pb
	antisentido	CCCAAGCTCCAACACTACGAGC	

Las condiciones de experimentales para cada reacción fueron: **Id3**, 1x (42°C, 30 min); 1x (92°C, 1 min); 1x (94°C, 2min); 34x (94°C, 1 min; 62°C, 45 seg; 72°C, 1 min); 1x (72°C, 7 min). **18S**, 1x (42°C, 30 min); 1x (92°C, 2 min); 10x (92°C, 30 seg; 55°C, 1min; 72°C, 2 min); 1x (72°C, 7 min).

5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE LA TÉCNICA DE WESTERN BLOT

5.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL DESDE MÚSCULO ESQUELÉTICO Y CÉLULAS EN CULTIVO

Reactivos:

- Tampón de extracción para proteínas totales:

		50ml de tampón
Trizma base	50mM	0,302g
Sacarosa	0,25mM	4,275g
EDTA	5mM	0,5ml (Stock 500mM)
	Ajustar a pH 7,4, con HCl.	
Tritón	0,5%	250µl

Cocktail de inhibidores de proteasas (SIGMA) 5µl por ml de tampón

- Politrón Ultra Turrax T25 Polytron

- Tubos Falcon (ref 2059)

Procedimiento

Para tejidos congelados:

Las muestras que se utilizaron para las determinaciones de proteínas específicas mediante Western blot, se obtuvieron por homogenización de una fracción de músculo congelado. El trozo de músculo (aprox. 100 mg) a homogenar se puso en 1 ml del tampón cuando aún estaba congelado para evitar la acción de proteasas. El músculo fue homogenizado en el politrón Ultra turrax a velocidad media y durante tres intervalos de 20 segundos. Una vez la muestra estuvo bien homogenada, se mantuvo

en hielo. Las muestras fueron centrifugadas a 7.000 rpm durante 10 minutos y a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, para luego cuantificar la proteína total mediante la técnica de BCA .

Para células en cultivo:

Para la obtención de extractos de proteínas totales desde las líneas celulares estudiadas, se utilizó el mismo tampón de homogenización, pero variando las condiciones de extracción. La monocapa fue lavada con PBS (frío) tres veces, y después del último lavado se añadió el tampón frío y se rascaron las placas. Las células se transfirieron a tubos *ependorff* de 1,5ml para ser sonicadas durante 30 segundos, en 3 tandas de 10 segundos, manteniendo los tubos siempre en hielo. Los extractos se guardaron a -20°C hasta ser cuantificados por la técnica de BCA.

5.2. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA POR BCA

Preparación de la recta patrón:

Patrón	Agua (μl)	Vol. BSA 2 μg/μl (μl)	Conc. BSA final (μg/μl)
A	0	300 ul stock	2
B	125	375 ul stock	1,5
C	325	325 ul stock	1
D	175	175 ul de B	0,75
E	325	325 ul de C	0,5
F	325	325 ul de E	0,250
G	325	325 ul de F	0,125
H	400	100 ul de G	0,025
I	400	0	0

Procedimiento

1. Colocar 10 ó 25 μl de muestra o patrón, previamente diluido con tampón de extracción si es necesario, en los pocillos de una placa de elisa (96 pocillos).
2. Añadir 200 μl del reactivo de BCA (50 partes de A más 1 parte de B).
3. Incubar 2 horas a 37 °C.
4. Leer a 590 nm, en un lector de placas de elisa.

5.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA

La electroforesis en gel de acrilamida con SDS (PAGE/SDS) es el sistema más clásico para separar las proteínas en función de su peso molecular. Los extractos de proteína se someten a una electroforesis con un tampón de carga a través de un gel de acrilamida-bisacrilamida.

5.3.1. PREPARACIÓN DEL GEL

En este tipo de electroforesis se emplean dos geles, cada uno de ellos con diferente concentración de acrilamida: un gel concentrador (*stacking*) y un gel separador (*running*). El gel concentrador tiene una concentración final de acrilamida del 5%, y su función es la de apilar todas las proteínas en un mismo punto justo en el inicio del gel separador, que puede tener concentraciones de acrilamida variables y que tiene la función de separar las proteínas de la muestra en función de su tamaño.

El gel separador esta formado por un tampón Tris-HCl 0,39 M pH 8,8, SDS al 0,1% y una concentración de acrilamida-bisacrilamida que puede ser 8 o 10%, dependiendo de la proteína que queramos analizar. La solución de acrilamida-bisacrilamida que utilizamos es comercial (Protogel). A esta mezcla se añadieron dos

catalizadores de la polimerización, TEMED al 0,06% y persulfato de amonio (PSA) al 0,1%. El gel concentrador contiene un tampón Tris-HCl 0,126 M pH 6,8, SDS al 0,1%, acrilamida al 5%, TEMED al 0,1% y PSA al 0,1%.

Para la preparación del gel definitivo, primero se deposita el gel separador en el *casting*, y se deja polimerizar. Una vez formado, se deposita el segundo encima, junto con una pieza de teflón (peine) que sirve para formar los pocillos donde se depositará la muestra.

5.3.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Después de cuantificar la concentración de proteína de los extractos, el volumen final de las muestras se igualó con tampón de electroforesis. A cada muestra se añadió la correspondiente cantidad de tampón de carga 3X; (Tris-HCl 250 mM pH 6,8, DTT 50 mM, SDS 10 %, azul de bromofenol al 0,5 % y glicerol al 50 %). Una vez se obtuvo una mezcla homogénea tampón-extracto, se hirvieron las muestras durante 5 minutos a 100 °C. Acabado este proceso las muestras estuvieron listas para ser cargadas en el gel.

5.3.3. CONDICIONES DE LA ELECTROFORESIS

La electroforesis se realizó en una cubeta Mini Protean II® (Bio-Rad). El tampón de electroforesis preparado a partir de una solución concentrada 10X, contenía glicina 192 mM, Tris-HCl 25 mM y SDS 0,2 %.

Procedimiento

1. Cargar las muestras con una pipeta automática.
2. Una vez cargadas se conecta el sistema y se pone en marcha la fuente de electroforesis a 120 V durante aproximadamente 90 minutos. Este es el tiempo que tarda en salir del gel el azul de bromofenol.
3. Finalizada la electroforesis, sacar el gel y cortar el gel concentrador del separador.
4. Depositar el gel separador en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 81 mM, SDS 0.02% y metanol al 20 %, pH 7.2) hasta que se ponga en marcha la transferencia.

5.3.4. TRANSFERENCIA

La transferencia es una técnica por la cual las proteínas de la electroforesis se electrotransfieren a soportes membranosos, inmovilizándolas. La resolución proteica que se ha conseguido durante la electroforesis se mantiene inalterada.

Procedimiento

1. Preparar en una bandeja con tampón de transferencia, la membrana, el gel y el resto de los elementos de la transferencia.
2. Conectar la transferencia a 400 mA durante 1 hora.
3. Acabada la transferencia se puede teñir el gel con rojo Ponceau durante unos 10 segundos. Es un colorante general de proteínas y permite saber si la transferencia ha sido correcta.
4. Lavar la membrana con agua destilada para eliminar el exceso de tinción del rojo Ponceau. Acabar de desteñirla con PBS.

5.3.5. INCUBACIÓN CON LOS ANTICUERPOS ESPECÍFICOS

Este proceso consta básicamente de tres etapas:

1. Bloqueo de la membrana. Esta fase consiste en incubar la membrana en una solución que contiene una proteína “inespecífica” (albúmina sérica bovina (BSA) o leche desnatada en polvo). Con esto evitamos que los anticuerpos se unan inespecíficamente a la membrana.
2. Incubación con el anticuerpo primario. Esta etapa permite que el anticuerpo primario se una de forma específica a la proteína objeto del estudio y que ha sido transferidas a la membrana.
3. Incubación con el anticuerpo secundario. Este último proceso consiste en la formación del complejo entre el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario, el cual tiene conjugada la peroxidasa de rabano. Esta enzima, cuando reacciona con su sustrato adecuado, da lugar a un producto fluorescente que es el que permite detectar las bandas correspondientes a la proteína de interés (en la tabla siguiente se muestran los anticuerpos y condiciones utilizadas).

Anticuerpo	Referencia	Procedencia	Dilución
MyoD	Sc-760	Santa Cruz Biotechnology	1:200
c-Jun	PC06	Oncogene	1:5000
MHC	MF20	Hybridoma Bank	1:20
Glut 4	IgG conejo	Donación del Dr. A. Zorzano	1:400
GFP	CT6833	Clontech	1
Tubulina	T5168	Sigma	1:8000
Ciclina D1	Sc-8396	Santa Cruz biotechnology	1:500
I κ B α	Hibridoma	Donación del Dr. R. Hay	1:50

Procedimiento

1. Bloquear la membrana con una solución de leche al 5 % disuelta en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente o por un tiempo indefinido a 4°C; en este caso es necesario añadir azida sódica al 0,05% para evitar la contaminación por hongos.
2. Realizar 1 lavado de 5 minutos con TBS II en agitación.
3. Incubar la membrana con el anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación continua. Alternativamente se puede incubar la membrana toda la noche a 4 °C. El anticuerpo se diluye en TBS I, 2% leche en polvo. Este anticuerpo puede ser utilizado en posteriores incubaciones, pero se debe guardar a 4 °C con azida sódica al 0,05%.
4. Realizar 3 ó 4 lavados, de 10 minutos cada uno, con TBS II y en agitación vigorosa.
5. Incubar con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación continua. El anticuerpo secundario (BioRad) también se diluye en TBS I, al 5% leche en polvo. A diferencia del anticuerpo primario, a éste no se le puede añadir azida porque inhibe la actividad de la peroxidasa.
6. Lavar de la misma manera que en el paso 3.

5.3.6. REVELADO DE LA MEMBRANA

Una vez acabadas las incubaciones con los anticuerpos, la membrana se incuba en la solución reactiva que contiene los sustratos de la peroxidasa de rabano. Para ello se utiliza un kit comercial (ECL™, Amersham) y se emplea siguiendo las indicaciones del fabricante. Acabada la incubación con el sustrato (1 minuto), se retira

el exceso de sustrato y se expone la membrana en contacto con un film (Hyperfilm, Amersham) para autoradiografía, que se revela por el procedimiento normal.

6. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

6.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES

Para realizar los ensayos de retardamiento en gel (EMSA) requerimos la obtención de extractos nucleares purificados en las mejores condiciones posibles, mediante protocolos adecuados. Los protocolos de extracción y purificación de proteínas nucleares a partir de tejidos y células son una adaptación de los establecidos por Blough *et al.* (1998) y Hayashi y Faustman (2000). Estos métodos se basan en la extracción de las proteínas contenidas en los núcleos, entre las que se encuentran los factores de transcripción que están unidos al DNA, mediante el aumento de la osmolaridad y de la fuerza iónica. Mediante este proceso, los núcleos se contraen y liberan de forma soluble las proteínas.

6.1.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES A PARTIR DE CÉLULAS EN CULTIVO

Reactivos y soluciones

PBS-EDTA 0.01%

Tampón 1:

- 10 mM Hepes, pH 7,5
- 10 mM MgCl₂
- 5 mM KCl
- 0,1 mM EDTA, pH 8
- 1% Nonidet P-40

Al momento de usar añadir:

- 1 mM ditioneitol (DTT)
- 0,1 mM fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF)
- 2 µg/ml Aprotinina
- 2 µg/ml Leupeptina

Tampón 2:

- 20 mM Hepes, pH 7.9
- 1,5 mM MgCl₂
- 10% Glicerol
- 350 mM NaCl
- 0,2 mM EDTA, pH 8

Al momento de usar añadir:

- 0,5 mM DTT
- 0,2 mM PMSF
- 2 µg/ml Aprotinina
- 2 µg/ml Leupeptina

Procedimiento

Este método está adaptado para la línea celular C2C12 crecidas en condiciones generales en multi-well de 6 pocillos (3,5 cm de diámetro).

1. Se extrae el medio y se lavan dos veces con PBS-EDTA 0,01% frío.
2. Para obtener las células se procede a tripsinizar las multi-well con 0.3 ml de tripsina por pocillo e incubando 5 minutos a 37°C y 5% CO₂.
3. Se recuperan las células en un *ependorf* de 1,5 ml, centrifugar 15 minutos a 3.000 rpm (minifuga, *Eppendorf*).

4. Lavar el *pellet* con PBS, y descartar el sobrenadante.
5. Resuspender el *pellet* en 100 µl de tampón 1.
6. Mezclar por inversión (vigorosamente) e incubar 15 minutos a 4°C.
7. Centrifugar 15 minutos a 6.000 rpm a 4°C.
8. Recuperar el sobrenadante (fracción citoplasmática), cuantificar la concentración de proteína y mantener a -80°C.
9. Resuspender el *pellet* en 100 µl de tampón 2.
10. Incubar 30 minutos en hielo, agitando cada 5 minutos la suspensión.
11. Centrifugar 10 minutos a 3.000 rpm.
12. Recuperar el sobrenadante (fracción nuclear), cuantificar la concentración de proteína, alicuotar y mantener a -80°C.

Para comprobar la pureza de los extractos se realizó un Western blot de la tubulina, una proteína del citoesqueleto que no está presente en los núcleos. Un resultado positivo de este análisis implica la repetición de la extracción.

6.1.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES DESDE MÚSCULO ESQUELÉTICO

La obtención de extractos nucleares a partir de músculo esquelético de animales adultos es muy complicada, pero con este sencillo procedimiento logramos obtener una considerable cantidad de proteína nuclear pura, en corto tiempo y utilizando muy poco tejido inicial. Este procedimiento es una adaptación del protocolo de Blough *et al.* (1999).

Reactivos y soluciones

Tampón 1:

- 10 mM Hepes pH 7,5
- 10 mM MgCl₂
- 5 mM KCl
- 0,1 mM EDTA pH 8
- 0,1% Triton X-100
- Al momento de usar añadir:
- ditioneitol (DTT) 1 M
- 0,1mM (PMSF)
- Aprotinina (2 µg/ml)
- Leupeptina (2 µg/ml)

Tampón 2:

- 20 mM HEPES pH 7.9
- 25 % Glicerol
- 500 mM NaCl
- 1,5 mM MgCl₂
- 0,1mM EDTA pH 8
- Al momento de usar añadir:
- DTT 1 M
- 0,1mM PMSF
- Aprotinina (2 µg/ml)
- Leupeptina (2 µg/ml)

Procedimiento

- 1.- Poner como mínimo 50 mg de tejido (músculo esquelético, fresco o congelado a -80 °C) dentro de un tubo de 15 ml (Falcon) y mantener en hielo.
- 2.- Añadir 3 ml de tampón 1 frío.

- 3.- Homogenizar usando un Polytron Ultra Turrax T25 a velocidad media durante 45 segundos.
- 4.- Centrifugar 5 min a 5.000 rpm a 4 °C.
- 5.- Recuperar el sobrenadante (fracción citoplasmática) en otro tubo y guardar a – 80°C.
- 6.- Resuspender el *pellet* en 500-1000 µl de tampón 2 frío.
- 7.- Incubar en hielo por 30 min, mezclando intermitentemente la suspensión.
- 8.- Repetir el paso 4.
- 9.- Recuperar el sobrenadante como fracción nuclear, cuantificar la concentración de proteína, alicuotar y mantener a -80°C.

Para comprobar la pureza de los extractos, se realizó un Western blot de la tubulina una proteína del citoesqueleto que no está presente en los núcleos. Un resultado positivo de este análisis implica la repetición de la extracción.

6.2. ENSAYO DE RETARDAMIENTO EN GEL

Los ensayos de retardamiento en gel (EMSA o *gel-shift*) permiten detectar y caracterizar *in vitro* la interacción DNA-proteína; esta característica la hace ser una herramienta muy importante en el estudio de los factores de transcripción. Consiste en la incubación de los extractos nucleares con una sonda marcada radioactivamente; esta sonda contiene la secuencia consenso para cada uno de los factores estudiados. La reacción se realiza bajo unas condiciones adecuadas para favorecer la interacción DNA-proteína. El producto de esta reacción se carga en un gel de poliácridamida no desnaturante: la movilidad de la sonda en el gel estará determinada por la unión de éstas a las proteínas contenidas en los extractos nucleares. Para disminuir las interacciones inespecíficas, se añade un oligonucleótido sin marcar y que sea irrelevante (poli dl-dC). La especificidad de la unión se verifica mediante la adición de una sonda mutada en la secuencia consenso; esta mutación impide la unión específica del factor de transcripción.

6.2.1. OBTENCIÓN Y MARCAJE DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos que contienen la secuencia consenso para cada uno de los factores estudiados, fueron encargados a Invitrogen (*Life Technologies*) a una concentración de 50 nM y con una pureza estandar. Los oligonucleótidos liofilizados fueron reconstituidos a una concentración de 100 µg/ul mantenido como un *stock* y una dilución de trabajo a 1 µg/ul; como disolvente se utilizó agua bidestilada estéril. En la siguiente tabla se muestran las secuencias de los oligonucleotidos utilizados para esta técnica.

		Óligo sentido	Óligo antisentido
NFκB	Normal	5'-AGTTGAGGGGACTTTCC	5'-GCCTGGGAAAACCTCCCCT
	Mutado	5'-AGTTGAGGCGACTTTCC	5'-GCCTGGGAAAACCTCGCCT
AP-1	Normal	5'-CGCTTGATGACTCAG	5'-TTCCGGCTGAGTCAT
	Mutado	5'-CGCTTGATGACTTGG	5'-TTCCGGCCAAGTCAT
Sp-1	Normal	5'-ATTCGATCGGGGCGGGG	5'-GCTCGCCCCGCCCGAT
C/EBP	Normal	5'-TGCAGATTGCGCAAT	5'-TGCAGATTGCGCAAT
	Mutado	5'-TGCAGAGACTAGTCT	5'-TGCAGAGACTAGTCT

6.2.2. ANILLAMIENTO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS

Reactivos y soluciones

- Stock de oligonucleótidos
- NaCl 1M
- agua bidestilada

Procedimiento

- 1- Poner 5µg de cada uno de los oligonucleótidos (5µl del stock) y añadir NaCl a una concentración final de 50 mM en el tubo de reacción, con un volumen final de reacción de 50µl.
- 2- Hervir 10 minutos, para separar las posibles uniones inespecíficas entre los oligonucleotidos.
- 3- Dejar 30 minutos a temperatura ambiente (20 - 25 °C); pasado este tiempo, los oligonucleotidos están listos para ser marcados.
- 4- Los oligonucleótidos anillados se conservan a -20°C y se puede confirmar el anillamiento mediante un gel de agarosa al 3%: los oligonucleotidos anillados serán más brillantes que los que estén sin anillar, debido a la mayor afinidad del bromuro de etidio por cadenas dobles que por cadenas sencillas.

6.2.3. MARCAJE RADIOACTIVO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS USANDO LA KLENOW Y (P³²) CTP

Reactivos y soluciones

- Klenow DNA polimerasa (Amersham)
- Tampón de la Klenow 10X
- Soluciones concentradas de dATP, dTTP, dGTP (Promega)
- dCTP ³²P (Amersham)

Procedimiento

- 1- Reacción de polimerización con la Klenow:
 - 1 µl Óligos anillados (100ng/ul)
 - 2 µl Tampón 10X para la Klenow
 - 2 µl dNTP's sin CTP
 - 2 µl dCTP-(P³²)
 - 1 µl Klenow
 - H₂O bidestilada estéril hasta un volumen de 20 µl
- 2- Incubar 1 hora a 37°C.
- 3- Purificar en columnas *Micro Spin G-25* (Amersham), siguiendo las indicaciones del fabricante.
- 4- Cuantificar las cpm. Se ponen 30.000 cpm por pocillo del gel.

6.2.4. PREPARACIÓN DEL SISTEMA DE ELECTROFORESIS

En primer lugar se preparan los geles en condiciones no desnaturizantes, ya que nos permitirán separar los oligonucleótidos libres de los complejos DNA-proteína. La concentración de la mezcla y la relación de poliacrilamida:bis-acrilamida a utilizar depende del tamaño de la sonda y la migración de los complejos que deseamos detectar. Para ensayos con sondas pequeñas, de entre 15 y 30 pares de bases (pb), el porcentaje idóneo es de un 7%; para sondas más grandes y para los ensayos de *super-shift* el porcentaje a utilizar es de un 4%.

Reactivos y soluciones

- Solución de poliacrilamida:bisacrilamida
- TEMED (BioRad)
- Persulfato de amonio al 13% (APS)
- Tampón TBE
 - 0,45 mM Tris-HCl
 - 0,45 mM de Ácido bórico
 - 10 mM de EDTA, pH 8

Procedimiento

- 1- Para estos ensayos utilizamos en sistema de electroforesis *Protean II Xi Cell* de BioRad. Los cristales se limpian con etanol antes de montar el sistema. Se monta el sistema siguiendo las instrucciones del fabricante y comprobando que no hayan filtraciones de la solución de poliacrilamida.
- 2- Preparar tampón TBE 0.5x y 40 ml de gel en un vaso de precipitados de acuerdo con la fórmula siguiente:

	Gel al 7%
Solución Acri/Bisacrilamida	9,3 ml
TBE (10X)	2 ml
PSA (13%)	769 µl
TEMED	40 µl
H ₂ O biestilada	27,9 ml

- 3- Una vez completada la solución, poner la rápidamente en espacio que hay entre los dos cristales, y cuando la solución llegue a la parte superior poner el peine que tiene 10 ó 15 pocillos. Dejar polimerizar durante al menos 30 minutos. El gel esta listo para ser utilizado, o bien puede ser guardado a 4°C cubierto con film transparente para evitar que se seque.

6.2.5. REACCIÓN DE UNIÓN AL DNA

La reacción de unión de las proteínas nucleares al DNA se realiza en el tampón de reacción, que presenta las unas condiciones favorables para la interacción DNA-proteína. Junto con las muestras se incluye un pocillo donde se pone la sonda marcada sin incubar con el extracto de proteínas nucleares, con el fin de tener una referencia de la migración electroforética de la sonda libre. En este mismo pocillo se puede incluir tampón de corrida que contiene azul de bromofenol, que nos servirá para monitorizar la electroforesis.

Reactivos y soluciones

Tampón de Reacción

12 % Glicerol
 12 mM Hepes pH 7,9
 4 mM Tris-HCl pH 7,9
 1 mM EDTA
 1 mM DTT
 25 mM KCl
 5 mM MgCl₂

Tampón de corrida

Formamida al 95%
 EDTA 20mM
 0,05% Azul de Bromofenol

Procedimiento

- 1- Precorrer el gel a 100 V a 4°C durante al menos 2 horas antes de cargar las muestras. Como tampón de corrida se usa TBE 0.5X. Limpiar los pocillos con la pipeta antes de cargar las muestras.
- 2- Preparar una tabla con las muestras que se cargarán y las condiciones de cada una antes de empezar. El volumen final de las muestras debe ser el menor posible, tratando de no superar los 20-25 µl (idealmente 10-15 µl). Como las muestras no se corren en presencia de un tampón de carga, el glicerol presente en el tampón de extracción y en el tampón de reacción hacen que la muestra baje al fondo del pocillo. La concentración de glicerol no debe superar el 12%, ya que concentraciones superiores a ésta pueden inhibir la unión proteína-DNA.
- 3- Descongelar las alícuotas necesarias de Poly dl-dC y las muestras conservarlas en hielo.
- 4- Preparar la secuencia de tubos requeridos y añadir las soluciones en el siguiente orden: H₂O, tampón de reacción, competidor específico o anticuerpo en un rango de 10 a 1000 veces la cantidad de sonda marcada, muestra 5 a 20 µg de proteínas nucleares y 1 µl de Poly dl-dC.
- 5- Centrifugar unos segundos.
- 6- Preincubar 15 minutos a temperatura ambiente mientras se descongela la sonda.
- 7- Añadir 30.000 cpm de sonda a cada tubo e incubar en hielo durante 10 min. Cargar las muestras utilizando una pipeta automática: cargar en primer lugar la sonda libre sin proteína y después todas las muestras y competiciones. Lavar la punta con TBE entre cada muestra. Poner en el último carril o en el de la sonda libre 3-4 µl de tampón de corrida.
- 8- Correr el gel a 325 V y a 4°C hasta que el azul de bromofenol haya corrido $\frac{3}{4}$ partes del gel.
- 9- Desmontar el sistema rápidamente para evitar la difusión de las muestras, separar los vidrios y recuperar el gel con un trozo de papel Watman, y luego cubrir con papel de plástico.
- 10- Secar el gel en el secador BioRad Gel Drier: precalentarlo a 80°C, y secar el gel se seca en 60-120 minutos (no dejar menos de 60 minutos).
- 11- Exponer el gel con un film, 16-24 horas a -80°C.

7. MÉTODOS Y ESTRATEGIAS PARA LA OBTENCIÓN DE ADENOVIRUS RECOMBINANTES

7.1. CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR 293

Las células de la línea 293 (ATCC CRL 1573) proceden de riñón de embrión humano (Graham, 1977), y se immortalizaron de manera estable por medio de la incorporación del gen AdE1A del adenovirus 5. Son las células que se utilizan para la propagación de los adenovirus. El medio de mantenimiento del cultivo contenía DMEM al que se añadió glucosa (4.5 g/l), suero bovino fetal (FBS) al 10% y antibióticos (estreptomomicina y penicilina).

Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C, con 5% CO₂ y 95% de humedad, en placas de 100 mm de diámetro. Para subcultivar las células, las placas se lavaron con PBS y se trataron con 2 ml de tripsina al 0,25% y EDTA 1 mM (Tripsina-EDTA 1X, Gibco). Se resuspendieron en 6 ml de medio y se volvieron a inocular en placas nuevas con una densidad aproximada de 60.000 células/cm². El recuento de las células se realizó en la cámara de Neubauer.

7.2. PREPARACIÓN DE ADENOVIRUS RECOMBINANTES

7.2.1. ESTRATEGIA DE CLONACIÓN

Se dispone de dos plásmidos para la clonación de un nuevo virus: pACCMVpLpa (Gluzman, 1982) y pJM17 (McGrory, 1988). El plásmido pACCMVpLpa se construyó mediante la inserción de una serie de elementos en un vector pAC. Concretamente, el promotor constitutivo de citomegalovirus (CMV), una secuencia de poliadenilación del plásmido pUC19 y un fragmento del genoma de SV40 que contiene el intrón del antígeno T y una señal de poliadenilación. Flanqueando este cassette de expresión se encuentran dos fragmentos del genoma del adenovirus 5. En la región 5' del *cassette*, un fragmento que contiene desde 0 a 1,3 unidades de mapa (μ) del adenovirus, y en la zona 3' la región adenovírica que abarca desde 9,1 a 17 μ . La secuencia comprendida entre 1,3 y 17 μ contiene precisamente al gen AdE1A que se encuentra insertado en las células de la línea celular 293. El plasmido pJM17, de 40 Kb, está formado por el genoma completo del adenovirus 5 interrumpido en la posición 1,3 μ por la inserción del plasmido bacteriano pBRX. pJM17 excede el límite de empaquetamiento del adenovirus, que es de 38 Kb, de manera que, a pesar de poder expresar todas las proteínas incluyendo las de la cápside, no es capaz de generar partículas víricas infectivas.

7.2.2. PROCESO DE TRANSFECCIÓN

Los plásmidos pJM17 y pACCMVpLpA se transfectaron en células 293 mediante el método de la coprecipitación con fosfato cálcico (Graham, 1973). Las células 293 ceden en "trans", el gen AdE1A necesario para que el adenovirus defectivo, producido *de novo*, pueda replicarse y generar a su vez nuevas partículas víricas infectivas. Los dos plásmidos se internalizan en la célula y, por recombinación homóloga intramolecular, dan lugar a un genoma vírico recombinante de tamaño empaquetable. En este virus la región AdE1A se sustituye por el gen quimérico clonado. Así pues, los virus generados son infectivos pero deficientes para su replicación en células que, como las células de la línea 293, no sean capaces de complementar esta deficiencia.

La transfección con fosfato cálcico se realizó sobre placas de 60 mm de diámetro con un 80% de confluencia (Hitt, 1994; Becker, 1994).

1. Preparar la mezcla de transfección en un tubo de plástico estéril de la siguiente manera:
 - 5-10 μ g del plásmido pACCMV correspondiente.
 - 10 μ g del plásmido pJM17.
 - 500 μ l de la solución HBS 2X (KCl 0,5 M, D-glucosa 0,55 M, Na_2HPO_4 30 mM, Hepes 40 mM, NaCl 0,17 M, pH 7,1).
 - H_2O hasta 1 ml final.
2. Añadir 50 μ l de CaCl_2 sobre la mezcla de transfección, muy suavemente, para conseguir una concentración final de 125 mM.
3. Agitar inmediatamente después de añadir el CaCl_2 , con mucho cuidado y tratando de no hacer burbujas, para facilitar y aumentar la cantidad de agregados DNA-fosfato cálcico.
4. Incubar el tubo con la solución de DNA-fosfato cálcico a temperatura ambiente durante 15-20 minutos.
5. Añadir sobre la monocapa de células 0.5 ml de la mezcla de DNA-fosfato cálcico junto con 0.5 ml de solución HBS 1X. Dejar incubar las placas durante 15 minutos a temperatura ambiente.

6. Añadir sobre las placas 4 ml de medio de cultivo. Incubarlas a 37°C, y 5% de CO₂ durante unas 16 horas.
7. Pasado este tiempo, aspirar el medio para remover los restos de precipitados de DNA-fosfato cálcico y de células muertas. Lavar dos o tres veces con PBS estéril.
8. Añadir medio de cultivo DMEM con FBS al 4%, para no estimular la proliferación celular de forma desmesurada.
9. Aproximadamente una semana después de la transfección, se pueden ver las primeras calvas de lisis sobre la monocapa celular. Éstas se producen como resultado el desprendimiento de las células que los nuevos adenovirus generados, como consecuencia de la recombinación de los plásmidos transfectados, han lisado.
10. Recuperar el medio de cultivo de la infección donde se encuentran los adenovirus.

7.2.3. ANÁLISIS DEL DNA DE LOS ADENOVIRUS RECOMBINANTES.

Mediante este método se procede a determinar si realmente los clones víricos obtenidos a partir de las transfecciones contienen el cDNA insertado. Para ello, primero es necesario aislar el DNA vírico del DNA celular y su posterior análisis por técnicas de PCR o restricción con endonucleasas, para confirmar la presencia del gen.

7.2.4. AISLAMIENTO DEL DNA VÍRICO.

El protocolo de aislamiento de DNA vírico es una adaptación del por Hirt *et al.* (1967).

- 1- El día 1, infectar placas de células 293 subconfluentes con una alícuota del adenovirus procedente de las placas de lisis que se obtuvieron durante el proceso de clonación.
- 2- Entre 36-48 horas después de la infección, las células, que todavía se encuentran adheridas a la placa, tienen un aspecto esférico y refringente. En este punto las células están completamente infectadas pero aún no han comenzado a lisarse por efecto de virus. Lavar el medio, suavemente, con PBS.
- 3- Añadir 800 µl de tampón de lisis preparado justo en el momento de ser utilizado (0,6% SDS, 10 mM EDTA, 100 µg/ml de proteinasa K). Incubar a 37°C durante una hora.
- 4- Añadir 200 µl de NaCl 5M, gota a gota, mientras se hace rotar la placa con el objetivo de que se mezcle uniformemente con el lisado celular. Incubar en hielo durante 1 hora.
- 5- Transferir el lisado (que tiene ahora un aspecto viscoso) a un tubo eppendorf de 1,5 ml y centrifugar durante 30-45 minutos a 12.000 g a 4°C para precipitar el DNA cromosómico.
- 6- Recuperar el sobrenadante y añadir 0,5 volúmenes de fenol. Agitar suavemente por inversión, añadir un volumen igual de cloroformo y volver a agitar por inversión.
- 7- Centrifugar durante 5 minutos a 12.000 xg a temperatura ambiente. Recuperar la fase acuosa superior y realizar nuevas extracciones con fenol:cloroformo. Después de la segunda extracción se precipita el DNA añadiendo 2,5 volúmenes de etanol al 70%.
- 8- Dejar secar el precipitado de DNA y resuspenderlo en 25-50 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) pH 7,4, que contiene RNAsa a una concentración final de 20 µg/ml.

7.2.5. ANÁLISIS DEL ADN VÍRICO POR DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS

Una primera manera de determinar la calidad del DNA vírico purificado consiste en digerir una alícuota de éste con Hind III. Si el DNA es suficientemente puro, la imagen típica que aparece cuando se analiza la digestión en un gel de agarosa al 0,8% es la de entre 7-8 bandas con un tamaño que oscila entre las 2 y las 8 Kb. Si hay DNA que no está totalmente digerido, entonces aparecen un conjunto de bandas de alto peso molecular que corresponden a diferentes formas de enrollamiento del DNA.

7.2.6. CLONACIÓN Y TITULACIÓN DEL ADENOVIRUS

El lisado inicial que se obtiene después de la contransfección en realidad es una población de virus heterogénea, formada por adenovirus procedentes de diferentes recombinaciones. Es necesario aislar al menos uno de estos nuevos virus para después amplificarlo y llegar a tener un *stock* vírico con un título suficientemente elevado ($> 10^{10}$ pfu/ml, donde pfu (*plaque forming unit*) indica el número de partículas víricas). Este mismo protocolo es igualmente útil para poder titular el *stock* vírico.

- 1- Preparar diluciones seriadas del *stock* vírico en 3 ml. Del medio de cultivo completo (DMEM, glucosa 4,5 g/l, FBS 10% y antibióticos). Las diluciones se preparan entre 10^{-1} y 10^{-10} .
- 2- Infectar por duplicado con 0,4 ml una placa confluyente de células 293 de 60 mm de diámetro durante 1 hora a 37°C.
- 3- Aspirar el medio de infección y lavar dos veces con PBS.
- 4- Preparar en un tubo estéril de forma anticipada una solución de agar noble al 2%, que se mantiene en un baño termostático a 60°C para evitar que solidifique, y DMEM 2x que se mantiene a temperatura ambiente a 37°C. Mezclar el agar y el medio de cultivo, en una relación 1:1, justo antes de añadirla sobre las placas de cultivo.
- 5- Añadir 10 ml de agar/DMEM 2x, muy suavemente, a cada placa y dejar solidificar a temperatura ambiente antes de depositarlas en el incubador a 37°C.
- 6- Entre 7-10 días después de la infección comienzan a verse las primeras placas víricas. Teniendo en cuenta la dilución realizada, se puede calcular el título del *stock*, es decir, el número de unidades formadoras de placa por ml de suspensión (pfu/ml).

7.2.7. AMPLIFICACIÓN DE UN CLON VÍRICO

Una vez que ya se dispone de un clon vírico aislado, se puede proceder a su amplificación y purificación.

- 1- Extraer el virus del agar mediante ciclos de congelación-descongelación usando alternativamente un baño de agua a 37°C y un baño de hielo seco y etanol. Centrifugar a 1.500 rpm durante 5 minutos para descartar los restos de agar del virus.
- 2- Infectar una placa de células 293 subconfluyente con parte de este virus así obtenido, durante 1 hora a 37°C. Lavar inmediatamente después con PBS y añadir medio fresco.
- 3- La lisis celular se produce aproximadamente una semana después de la infección. Pasado este tiempo, recoger el lisado celular, realizar tres nuevos ciclos de congelación-descongelación y centrifugar de la misma manera que en el punto 1 para eliminar los restos celulares. Recoger el

sobrenadante, que constituye en *stock* primario, o "P1". Este *stock* suele tener un título de orden de 10^7 pfu/ml.

- 4- Infectar 10 placas de 100 mm de diámetro con células 293 subconfluentes con 5-25 μ l de *stock* P1 en un volumen final de 3 ml durante 1 hora a 37°C. Lavar con PBS y adicionar medio fresco.
- 5- Después de la lisis de la monocapa, recoger el medio en un tubo estéril de 50 ml, realizar 3 ciclos de congelación-descongelación. Centrifugar en las mismas condiciones que en los puntos 1 y 3, y recuperar el sobrenadante que contiene el virus amplificado. De esta manera se pueden llegar a obtener títulos del orden de 10^{10} pfu/ml.

El sobrenadante, *stock* P2, se guarda en alícuotas de menor volumen a -20°C y se puede utilizar para realizar experimentos *in vitro* en células de cultivo. Para realizar experimentos *in vivo* es necesario amplificar aún más los adenovirus, concentrarlos y purificarlos.

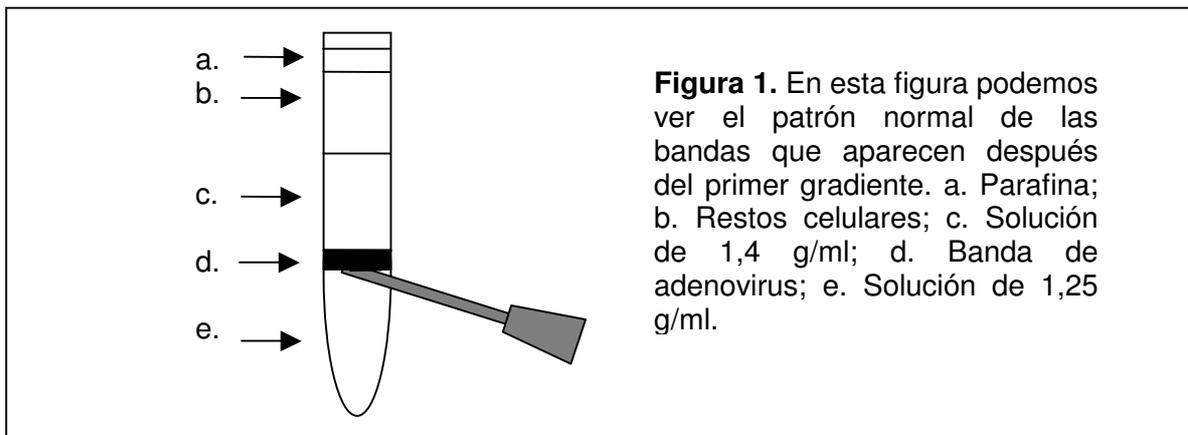
- 6- Inocular 60 placas de 150 mm de diámetro, al 80-90% de confluencia, con una cantidad de virus suficiente para conseguir una multiplicidad de infección de 10 pfu/célula, en un volumen final de 5 ml. Dejar la infección durante 2 horas a 37°C. Durante este tiempo, agitar la placa por rotación cada 15 minutos para distribuir el volumen de infección por toda la placa. Pasado este tiempo, añadir 15 ml más de medio fresco.
- 7- Dejar la infección durante 36-48 horas.
- 8- Recuperar las células cuando se haga evidente un efecto citopático completo. Esto es, el total de células adheridas a la placa tienen una morfología esférica y muy refringente, junto con un 10-20% de células flotando. En este momento, todas las células están infectadas, pero aún no han sufrido el proceso de lisis, con la consiguiente liberación del virus al medio del cultivo.
- 9- Despegar las células de la placa pipeteando el medio de cultivo sobre éstas de forma suave. Depositar el conjunto de células y medio en un tubo estéril de 50 ml y centrifugar a 1500 rpm durante 3-4 minutos. El sobrenadante se puede guardar a -80°C para futuras reinfecciones, P3, y el *pellet*, que contiene las células cargadas de virus, se guarda a -80°C hasta que se procede a su purificación.

7.2.8. PURIFICACIÓN DE UN CLON VÍRICO

1. Añadir un volumen mínimo de PBS (1 ml) al *pellet* de células para resuspenderlas. Debido a las limitaciones de la ultracentrífuga, el volumen final de la suspensión células no debe exceder los 36 ml. Distribuir la suspensión en varios tubos de 50 ml y realizar 5 ciclos de congelación-descongelación.
2. Eliminar los restos celulares centrifugando la suspensión a 4.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Depositar el sobrenadante en los tubos de ultracentrífuga que previamente contienen un gradiente de CsCl.
4. Preparar el gradiente de CsCl de la siguiente manera:
 - 4.1- Preparar tres disoluciones de CsCl con las siguientes densidades: 1,4 g/ml, 1,34 g/ml y 1,25 g/ml en PBS estéril.
 - 4.2- Filtrar cada una de las disoluciones y comprobar la densidad real pesando 100 μ l de la solución en una balanza reprecisión.
 - 4.3- Para formar el gradiente discontinuo, depositar en los 6 tubos (Beckman, N°344060, 14 x 95 mm), de forma ordenada, las siguientes cantidades: 2,5 ml de la solución de 1,25 g/ml en el fondo del tubo y luego colocar en el fondo del tubo con una pipeta 2,5 ml de la solución 1,4 g/ml

muy lentamente; al poner éste, debe formarse un anillo entre las dos soluciones. De esta forma, el gradiente se forma correctamente.

5. Después de montar el gradiente, añadir 6 ml (máximo 6,5 ml) del lisado procedente de la centrifugación del punto 3.
6. Centrifugar en un rotor basculante (Beckman, SW 40 Ti) durante 90 minutos a 20°C, a 150.000 g. Los adenovirus aparecen como una banda blanquecina de aspecto turbio en la interfase entre los gradientes de 1,4 y 1,25 g/ml.
7. Para obtener la banda de adenovirus, pinchar con una jeringa de 2 ml la pared del tubo de plástico como se indica en la figura 1, justo por debajo de donde se encuentra la dicha banda. El bisel de la aguja debe quedar plano y tangencial a la banda. Una vez colocada la aguja en este punto, y de la manera que se indica, aspirar suavemente hasta retirarla por completo, tratando de no arrastrar demasiada cantidad de CsCl durante este proceso.



8. Realizar una segunda centrifugación utilizando un gradiente continuo de CsCl de 1.34 g/ml para conseguir una *stock* de virus aún más puro.
9. Preparar un tubo con 7 ml de CsCl, y añadir 3 ml de *stock* purificado procedente de la centrifugación anterior. Equilibrar la centrifuga utilizando CsCl, y centrifugar de la misma manera que en el paso 6 durante 18 horas.
10. Después de esta segunda centrifugación, el virus vuelve a presentar el mismo aspecto y color. Recuperar la banda por el mismo método descrito previamente y guardarla en un tubo estéril en hielo hasta que se elimine el resto de CsCl.
11. Realizar 4 ciclos de diálisis de 30-60 minutos cada uno, con el fin de reemplazar los restos de CsCl por la solución de diálisis. La diálisis se realizó con el tampón TS (NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 0,7 mM, Tris 25 mM, MgCl 0,5 mM, CaCl₂ 0,5 mM), y
12. se obtuvieron entre 3-4 ml de *stock* vírico concentrado y purificado.
13. Guardar el *stock* purificado en alícuotas de 20 y 50 µl a -80°C hasta el momento en que se utiliza para las infecciones. Por norma general, cada alícuota que se descongela no se vuelve a congelar para utilizarla en futuras infecciones debido a la progresiva pérdida de capacidad infectiva que sufre el virus durante este proceso.

7.3. INFECCIÓN CON ADENOVIRUS DE CÉLULAS MUSCULARES EN CULTIVO

Una vez establecidos los cultivos de fibras musculares, las células se lavaron con PBS y posteriormente se incubaron con DMEM sin suero (factores de crecimiento), en el mismo medio utilizado en la diferenciación de los mioblastos a miotubos (DMEM suplementado con un 2% de FBS), que contenía los adenovirus durante 2 horas a 37°C en el incubador de CO₂. El número de m.o.i. (multiplicidad de

infección) indica el número de partículas víricas por el número de células a infectar. Las m.o.i. utilizadas en las infecciones de fibras musculares de ratón (C2C12), son generalmente de 100. El volumen utilizado en las infecciones fue el mínimo posible para facilitar la entrada de los virus en las células (400 μ l para placas de 35 mm de diámetro). Durante el período de infección se agitaron las placas cada 15 minutos, para asegurar que la solución vírica cubriese toda la monocapa celular. Pasadas las 2 horas, se retiró el medio que contenía el virus (el cual se debe dejar 12-24 horas en lejía para su destrucción) y se lavó la monocapa celular con PBS. Para finalizar, se añadieron 2 ml de medio de diferenciación y se devolvieron las placas al incubador de CO₂. Para infectar células musculares indiferenciadas, se utiliza una m.o.i. mayor, que normalmente es de 200.

8. ESTADÍSTICA

Los resultados expresados en esta memoria están expresados como media \pm error estándar (s.e.m.). Las comparaciones estadísticas entre grupos se han realizado mediante el test de la t de Student. El valor de t nos permite hallar la probabilidad (p) de que las diferencias halladas entre las medias se deban al azar. Se consideran que existen diferencias significativas a partir de $p \leq 0,05$. Los símbolos utilizados han sido los siguientes:

- * /†/\$ (p \leq 0,05)
- ** /††/\$\$ (p \leq 0,01)
- ***/†††/\$\$\$ (p \leq 0,001)

APÉNDICE 1: SOLUCIONES GENERALES

AGUA TRATADA CON DEPC (Dietilpirocarbonato) (AGUA-DEPC)

Agua Milli Q, Millipore

DEPC 0,01%

Añadir el DEPC bajo campana extractora, dejar durante 16 horas a 37°C con agitación, y autoclavar para inactivar el DEPC, que puede alterar los residuos de purinas del RNA por carboximetilación

SSC X20

NaCl 3 M

Citrato sódico tribásico 0,3 M

dihidratado

Ajustar el pH a 7,0 con HCl 1M y autoclavar.

TAMPÓN FOSFATO SALINO (PBS) para 1 l:

NaCl 8 g

KCl 0,2 g

KH₂PO₄ 0,2 g

Na₂PO₄(2H₂O) 1,43 g

pH 7,4 \pm 0,05

Preparar en botellas de vidrio de 500 ml, ajustar el pH con HCl 1M y autoclavar.

TBS I para 1 l:

Tris 3,5 g

NaCl 8,7 g

Tween 20 0,5 ml

Ajustar a pH 7,4 y enrasar a un litro con H₂O.

TBS II para 1 l:

Tris 1,21 g

NaCl 29 g

Twen 20 5 ml

Ajustar el pH a 7.4 y enrasar a un litro con H₂O.

Solución de *Stripping*

Preparar una solución con 3,78 g de Tris y 300 ml de H₂O. Ajustar el pH a 6,7 con HCl.

Para 500 ml:

300 ml tampón Tris-HCl

100 ml SDS al 10%

4,472 ml β-mercaptoetanol

Enrasar hasta 500 ml con H₂O

TBE:

90mM Tris-HCl

90mM Ácido Bórico

2mM EDTA ph 8

APÉNDICE 2 : MATERIAL FUNGIBLE UTILIZADO EN CULTIVOS CELULARES

- Placas de 6 pocillos (multi-well) de 3,5 cm de diámetro: Corning, Cat# 430343
- Placas de 10 cm de diámetro: Corning, Cat# 25020-100
- Frascos de 75 cm²: Corning, Cat# 25110-75
- Pipetas (Sterilin) de 25 ml, 10 ml, 5 ml y 2 ml.
- Criotubos de 1 ml: NUNC Labclinics, Cat# 366656
- Tubos de 50 ml de polipropileno claro: Corning, Cat# 25331-50
- Tubos de 15 ml de polipropileno: Corning, Cat# 430290
- Desenganchadores de células estériles: TPP[®] Cell scrape, Cat# 9902
- Filtros 0,2 µm pequeños: Schleicher&Schuell FP030/3 Cat# 462200