

*Caracterització proteòmica de l'espermatozoide  
humà. Proteïnes diferencials trobades en pacients  
astenozoospèrmics.*

*Per Juan Martínez Heredia*



## 3.- Material i Mètodes



### 3.- Material i mètodes.

#### 3.1.- Procedència i selecció de mostres.

Aquest projecte va ser aprovat pel Comitè de Bioètica de l'Hospital Clínic de Barcelona i, prèviament al seu estudi, un consentiment informat va ser obtingut de cada pacient. Les mostres provenen del Laboratori d'Andrologia de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona.

Les mostres es van recollir en contenidors estèrils, després d'un mínim de tres dies d'abstinència sexual. Després de la liqüefacció, es van avaluar els paràmetres seminals dictats per la OMS (volum, concentració, percentatge de motilitat i característiques mòbils). Per fer-ho, es va usar un sistema informatitzat CASA (Computer Assisted Semen Analyser) (CASA, Photolux), i una cambra de contacte Makler (Sefi Medical Instruments, Hainfa, Israel). La morfologia espermàtica es va avaluar segons el criteri estricte de Kruger, i un mínim de 100 cèl·lules es van examinar en cada portaobjectes.

Es van analitzar un total de 47 pacients i 10 donants de semen (com a controls). D'aquets 47 pacients, 27 eren normozoospermics (tots el paràmetres seminals correctes) i 20 astenozoospermics (pacients amb la motilitat afectada). També es van utilitzar altres mostres per tal de posar a punt els protocols.

#### 3.2.- Preparació de les mostres.

##### 3.2.1.- Gradient de Percoll.

El primer pas és comú per als diferents protocols, i és el gradient de Percoll que es realitza per garantir que només s'analitzen espermatozoides, i no altres cèl·lules presents en el semen. El protocol es basa en el descrit en una de les tesis doctorals prèviament realitzades al nostre laboratori (Mengual, 2003; Mengual et al., 2003), amb les següents modificacions.

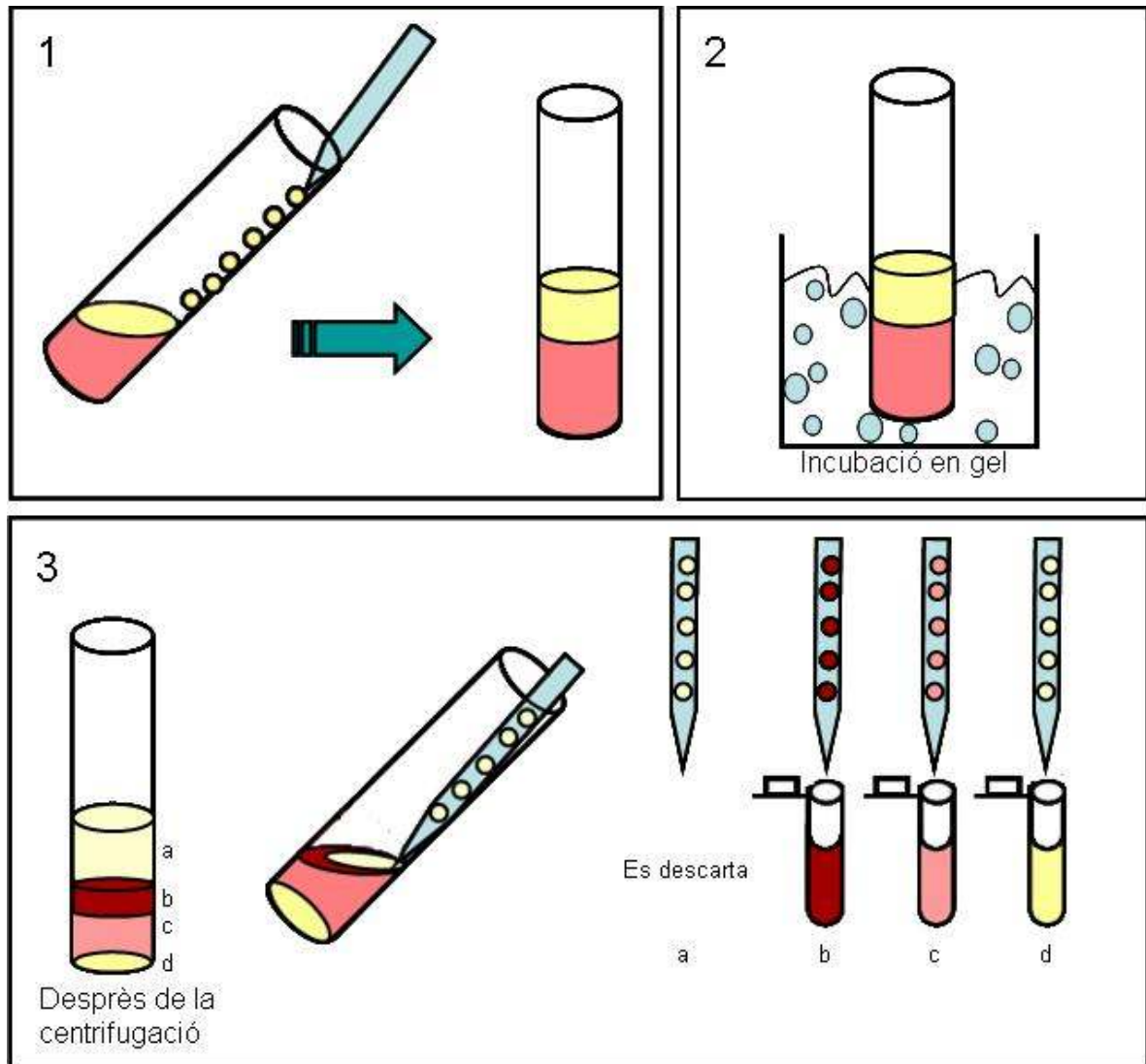
1. Es centrifuguen les mostres (3000g durant 5' a 4°C) per tal d'eliminar el plasma seminal.
2. S'elimina ràpidament el sobrenedant (per decantació o amb pipeta segons l'estat del sediment).
3. Es ressuspen el sediment amb 2 mL de HAM F-10 1x (Gibco BRL, Life

Technologies Ltd, Paisley, UK).

Per preparar el gradient, es parteix de Percoll 100% isotònic. Per preparar aquest Percoll, es barregen 8.7 parts de Percoll (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suècia), 1 part de Ham F10 10x (Biological Industries, Israel) i 0.3 parts de NaHCO<sub>3</sub> 7.5%. A partir del Percoll 100% es prepara el Percoll 50% per fer el coixí de densitat. Preparam el Percoll diluint el Percoll 100% en 47% Ham F10 1x i 3% de NaHCO<sub>3</sub> 7.5%.

4. Es prepara el gradient de Percoll, afegint 1 mL de Percoll 50% en un tub de 15 mL. A sobre s'afegeix la mostra (prèviament ressuspensa en 2 mL de Ham F10 1x). S'ha de fer amb molta cura (amb el falcon en diagonal) per tal de que no es barregin les dues fases.
5. Es deixar reposar el gradient, 10' en gel, per permetre una mínima barreja i evitar un canvi de fase brusca que podria conduir a la colmatació del gradient.
6. Es centrifugar a 800 g durant 20' (4° C). Un cop centrifugat s'ha d'observar una interfase i un sediment.
7. Es treu el sobrenedant i es guarda la interfase en un tub tipus eppendorf.
8. Es ressuspen el sediment amb 1mL de Ham F10 1x. Es guarda una alíquota (5 µl) per fer el contacte a la cambra de Makler (Sefi, Israel).
9. Es fa el contacte dels espermatozoides de l'interfase i del sediment.

Es centrifuga durant 5 minuts a 3000 g (4° C) la mostra. S'elimina el sobrenedant i el sediment es guarda al congelador (-20° C). Aquest espermatozoides, nets d'impureses i altres tipus cel·lulars, poden ser utilitzats en diversos tipus d'experiments.



**Fig 3.1.** Diagrames explicatius del gradient de Percoll. A 1), es veu la manera correcta d'afegir la mostra a sobre del gradient de Percoll; poc a poc i amb el tub inclinat 45°, per tal d'evitar la barreja de les dos fases. El resultat es veu a la següent imatge, on es veuen clarament les dues fases plenament diferenciades. A 2) s'observa el següent pas del protocol, una incubació de 10' en gel; aquesta incubació permetrà una mínima barreja de les dos fases, per tal d'evitar una colmatació excessiva de la interfase. A 3) es veu una imatge esquemàtica del tub falcon tal i com surt de la centrifugació. Marcades com a, b, c i d es troben les diferents fases que s'observen: a, restes de fluid seminal; b, interfase, amb cèl·lules rodones; c, restes de percoll; d, sediment amb tots els espermatozoides.

### 3.2.2.- Decapitació d'espermatozoides i separació dels caps.

Després del gradient, i amb la idea inicial d'estudiar només les proteïnes nuclears, es van posar a punt dos protocols alternatius.

*Mètode físic mitjançant sonicació.*

Es va utilitzar un mètode físic, amb la utilització sobre tot de la sonicació (aplicació d'ultrasons a la mostra), descrit prèviament (Van Blerkom et al., 1995) amb unes petites modificacions.

- 1) Es ressuspen la mostra en un mil·lilitre de Ham F10 1x (Gibco BRL, Life Technologies Ltd, Paisley, UK). Es centrifuga durant 5', 1000g a 4°C. Es descarta el sobrenedant.
- 2) Es ressuspen en un mil·lilitre d'una solució de 60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Tritó X-100 i 0,2 mM PMSF, amb un pH final de 7,4 (solució 1).
- 3) S'apliquen 15 s de vòrtex a la solució. Es deixa reposar 15 s en gel.
- 4) Es repeteix el pas 3 tres cops més (un total de 4 vegades i un minut sencer de vòrtex).
- 5) Es centrifuga durant 5 minuts, 1000g a 4°C. Es descarta el sobrenedant amb pipeta.
- 6) Es ressuspen en 100 µL d'una solució de 60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub> i 0,2 mM PMSF, amb un pH final de 7,4 (solució 2).
- 7) Es sonica durant 90 s, dividit en dos parts de 45 s. Es mou el tub a dalt i a baix, per garantir una correcta sonicació (veure Fig 3.2). Es controla visualment gràcies al microscopi.
- 8) Es porta la mostra a un gradient de sucrosa (20, 40 i 60%). La mostra es ressuspen en el 20% de sucrosa (solució 2, 20% sucrosa). Es centrifuga a 3000 g durant 90 minuts, amb un rotor basculant i a 4° C.
- 9) S'elimina el sobrenedant, i es ressuspen en 1 mL de solució 2.
- 10) Es centrifuga durant 5 minuts, 3000g, 4°C.
- 11) Es repeteixen els passos 9 i 10 dos vegades més.
- 12) Es ressuspen en 100 µL de la solució 2.



**Fig 3.2** Sonicador i col·locació de la mostra. Com s'observa a C, la mostra ha de ser processada en gel, per les elevades temperatures que s'assoleixen amb el tractament i que podrien introduir canvis en la composició proteica de la mostra.

### *Mètode químic amb detergents.*

A més d'un mètode basat en mètodes físics, es va posar a punt un mètode de base química: la utilització de detergents per a afeblir les estructures de membrana de l'espermatozoide (Jassim et al., 1992).

- 1) Es ressuspen la mostra en un mil·lilitre de Ham F10 1x (Gibco BRL, Life Technologies Ltd, Paisley, UK). Es centrifuga durant 5 minuts, 1000g a 4°C. Es descarta el sobrenedant.
- 2) Es ressuspen la mostra en un mil·lilitre d'una solució de Tris HCl 8.8 (50 mM), complementada amb 20 mM DTT, 0.2 mM PMSF i 1% Triton X-100.
- 3) S'incuba durant 30 minuts a 4°C (en gel o cambra freda).



- 4) Es centrifuga durant 5 minuts, a 1000g i 4°C. Es descarta el sobrenedant.
- 5) Es repeteixen els passos 3 i 4.
- 6) Es centrifuga durant 5 minuts a 400 g i 4°C. S'incuba a 4°C en una solució que conté 4 M urea, 50 mM Tris HCl pH 8.8, 20 mM DTT i 0.2 mM PMSF.
- 7) Es comprova la morfologia cada 10 minuts al microscopi òptic (contrast de fase).
- 8) Els caps es sedimenten a través d'una centrifugació de 20 s, 3000 g.
- 9) Es ressuspen la mostra en un tampó que conté 50 mM Tris HCl pH 8.8, 20 mM DTT i 0.2 mM PMSF.
- 10) Es centrifuga durant 5 minuts, a 1000g i 4°C. Es descarta el sobrenedant. Es porta la mostra a un gradient de sucrosa (20, 40 i 60%). La mostra es ressuspen en el 20% de sucrosa (PBS-PMSF 20% sucrosa). Es centrifuga a 3000 g durant 90', amb un rotor basculant i a 4° C.
- 11) S'elimina el sobrenedant, i es ressuspen el sediment en 1 mL de solució 2 (Annex 1).
- 12) Es centrifuga durant 5 minuts, 3000g, 4°C.
- 13) Es repeteixen els passos 11 i 12 dos vegades més.
- 14) Es ressuspen en 100 µl de solució 2 (Annex 1).

### 3.2.3.- Extracció de proteïnes.

#### *Extracció àcida.*

Per tal de poder identificar les proteïnes minoritàries del nucli de l'espermatozoide humà, es van extreure utilitzant un protocol prèviament descrit per un antic membre del laboratori (de Yebra et al., 1993).

- 1) Per tal d'eliminar el fluid seminal, es centrifuga a 10.000g durant 5 minuts, a una temperatura de 4° C.
- 2) Es ressuspen en Ham F10 1x (Gibco BRL, Life Technologies Ltd, Paisley, UK). Es torna a centrifugar (10.000g, 5 minuts, 4° C) i es ressuspen de nou amb Ham F10 1x (300 µL), per tal de rentar bé la mostra de possibles impureses. El sobrenedant s'elimina amb pipeta.

- 3) Es repeteix el pas 2.
- 4) Es renta el sediment amb 200  $\mu\text{L}$  d'una solució de Tritó X-100, amb Tris 1M pH 8 i 1M  $\text{MgCl}_2$ . Centrifugar novament a 10.000g, durant 5 minuts i 4° C. S'elimina el sobrenedant amb pipeta. Amb el detergent aconseguim debilitar el sistema de membranes.
- 5) Es ressuspen el sediment amb 200  $\mu\text{L}$  PMSF 1mM. Es centrifuga (10.000g, 5 minuts, 4° C) dues vegades. Amb aquest xoc hiposmòtic aconseguim trencar les cèl·lules. El sobrenedant s'elimina amb pipeta.
- 6) Es ressuspen el sediment en 50  $\mu\text{L}$  d'una solució d'EDTA 20 mM, complementada amb PMSF 1 mM i Tris-HCl pH 8 100 mM.
- 7) S'afegeix 1 volum (50  $\mu\text{L}$ ) de hidrocloreur de guanidina (GuHCl) 6M, complementat amb DTT 575 mM. En aquest punt eliminem els ponts disulfur presents a les proteïnes (molt abundants a protamines). Homogeneïtzar bé la mostra. Sacsejar repetides vegades la mostra (manualment), utilitzant la pipeta (aspirant i barrejant) i un punt de vòrtex al final. S'ha d'observar un moc viscos a la mostra.
- 8) Afegir 1 volum (100  $\mu\text{L}$ ) d' $\text{H}_2\text{O}$  destil·lada estèril mQ. Barrejar i incubar durant 10-30 minuts a temperatura ambient.
- 9) S'atura la reacció afegint 5 volums d'etanol absolut fred (guardat al congelador) i s'incuba durant 10 minuts a  $-20^\circ\text{C}$ .
- 10) Posteriorment, es centrifuga durant 15 minuts a 12.000 rpm (4°C) per tal d'eliminar el sobrenedant. Per tal d'eliminar el màxim possible de sobrenedant, primer es decanta, i després s'aspiren les restes utilitzant la pipeta.
- 11) S'afegeixen 500  $\mu\text{L}$  de HCl 0.5 M i s'homogeneïtza la mostra amb el vòrtex. S'incuba durant 5 minuts a 37 ° C. Es fa un punt de vòrtex i es torna a incubar durant 2 minuts més.
- 12) Es centrifuga durant 10 minuts a 14.000g. El sobrenedant (on són les proteïnes) es guarda en un tub pre-refredat amb un 20% de TCA (125  $\mu\text{L}$  de TCA 100%). Es barreja la mostra amb el TCA per inversió. S'han d'observar unes aigües.
- 13) S'incuba durant 10 min a 4° C, per tal de que precipitin les proteïnes.

- 14) Es centrifuga durant 10 minuts a 14.000g (4° C). S'elimina el sobrenedant per decantació, i obtenim les proteïnes al sediment.
- 15) Es renta amb 500 µL d'1% β-mercaptoetanol en acetona (s'ha de preparar al moment). Es centrifuga durant 5 minuts a 14.000g (4° C).
- 16) Es realitza un segon rentat, idèntic a l'anterior.
- 17) S'assequen les proteïnes a l'*speed-vac* durant 10 minuts.

Aquestes proteïnes són estables i ens permeten tenir-les guardades al congelador durant mesos o anys.

### *Extracció total de proteïnes.*

Un mètode alternatiu desenvolupat consisteix en la lisi total de l'espermatozoide, sense cap tipus de pretractament o separació prèvia (Pixton et al., 2004).

- 1) El sediment obtingut en el gradient de Percoll es ressuspen en el volum necessari de medi de lisis per tal d'obtenir una concentració de  $230 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

Aquesta concentració ha estat determinat empíricament en el nostre laboratori com l'òptima per a fer estudis de proteòmica.

El medi de lisi es pot tenir preparat i es guarda al congelador. Però cal afegir el DTT i el PMSF just al moment d'utilitzar ja que es degraden en solució aquosa.

- 2) Un cop ressuspesa la mostra, es deixa incubar una hora en agitació a temperatura ambient.

En aquest punt, la mostra pot centrifugar-se o guardar-se al congelador, on serà estable durant mesos o anys.

- 3) Just abans de processar-la per a IEF, es centrifuga per tal d'eliminar les restes insolubles. Es centrifuga 5 minuts, a 3000 g i 4° C. El sobrenedant conté les proteïnes aïllades, que es carregaran en el sistema d'isoelectroenfoc.

### 3.3.- Gels mono i bidimensionals.

#### 3.3.1.- Gels monodimensionals àcids.

Els gels monodimensionals s'han fet servir al nostre laboratori per trobar diferències en les protamines, principalment. Per això són gels àcids, per tal de que les protamines penetrin al gel (les protamines estan molt carregades positivament) (Mengual et al., 2003).

El primer pas es netejar els vidres amb etanol. Un cop els vidres estiguin nets, es procedeix al seu muntatge (Fig 3.6). Després del muntatge, es comprova l'estanquitat del mateix omplint fins la meitat amb aigua. Es deixa reposar durant uns 10 minuts. Si no perd aigua, es buiden, sense desmuntar els vidres, i s'eixuguen amb paper absorbent, de manera que no quedi cap gota d'aigua que pugui alterar localment la concentració d'acrilamida.

Els gels estan formats per una barreja de 0.9M d'àcid acètic, 2.5M d'urea, un 15% d'acrilamida (al 33.3%) i un 0.09% de bisacrilamida (al 0.2%) i, per últim, un 0.53% d'APS (al 10%) i un 0.53% de TEMED. Finalment, s'afegeix aigua fins al volum final necessari.

Després d'això, cal degasificar els gels durant 20 minuts mínim, ja que eliminant l'oxigen la reacció serà més ràpida

Es prepara la barreja que formarà el gel, tenint en compte que l'APS i el TEMED fan polimeritzar l'acrilamida, i per tant s'afegiran a l'últim pas. Aquesta barreja es posa entre els vidres, intentant evitar que es formen bombolles que puguin afectar a la posterior electroforesis. Si es formen bombolles, s'han de treure, utilitzant l'eina adient (un filferro amb ganxo, fet especialment per això). S'omplen els vidres fins a dalt de tot, i després es fica tota la pinta, deixant que l'excés caigui. Així ens assegurem que tots els gels tenen la mateixa alçada.

Es deixa gelificar a temperatura ambient, durant un mínim de 30 minuts. Amb aquest mínim, es assegurem que la malla està ben feta. Amb 15 minuts els gels ja són sòlids, però la malla no està acabada i podem tenir problemes de mala resolució a la part superior del gel. Passat aquest temps, es comprova que estigui gelificat. Una primera indicació és la formació d'un canvi de fase en la zona superior del gel (entre les pintes, si s'han ficat). Aquest canvi de fase es veu com una segona línia de front (Fig 3.7). Si

s'observa aquest fenomen, es pot moure lleugerament el muntatge, per comprovar que estigui gelificat. Un cop estigui gelificat, s'extreu la pinta amb cura, estirant primer des de una banda, i permetent que entri l'aire. Després, es col·loca el gel sota l'aixeta d'aigua desionitzada, per eliminar les possibles restes d'acrilamida sense polimeritzar que puguin quedar. Després de sacsejar-lo bé, l'excés d'aigua s'eixuga amb paper de filtre.

Un cop es té el gel preparat, es prepara el tampó d'electroforesis. Per a aquest tipus de gel, el tampó conté àcid acètic 0.9N (equivalent a 0.9M en aquest cas).

Amb el tampó ja preparat, es procedeix a realitzar una pre-electroforesis, per tal d'eliminar tots els possibles ions que podrien quedar al gel. Això es fa perquè en aquest tipus de gel la separació es fa per càrrega, no per pes molecular. La duració de la pre-electroforesis depèn del tamany del gel, i s'ha de realitzar fins que l'amperatge sigui estable (una hora per a gels petits, i o/n per a gels grans).

Un cop fet la pre-electroforesis, es carreguen les mostres en els pous i comença l'electroforesi. Es deixa córrer fins que la primera banda del verd de metil (un colorant) ha començat a sortir; a gels grans i amb 300V, unes 3 hores.

Després de l'electroforesi, els gels es tenyeixen amb el sistema més indicat.

### 3.3.2.- Gels bidimensionals. Preparació de la primera dimensió.

El protocol realitzat es basa en el descrit prèviament per Pixton (Pixton et al., 2004), amb modificacions. Tres-cents microlitres, corresponents a 230 milions d'espermatozoides, provinents del sobrenedant obtingut en la extracció total de proteïnes s'utilitzen per a córrer una tira. Aquests 300 µl es disposen sobre la safata de rehidratació del PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad), intentant que cobreixi tota la superfície i que no quedin bombolles. A sobre es col·loca una tira d'isoelectroenfoc, vigilant que l'acrilamida quedi cap baix. Es va utilitzar una rehidratació passiva de 12 hores. Un cop finalitzada, es programa l'aparell. Si es té un problema de sals, es pot col·locar un paper Whatman mullat en H<sub>2</sub>O destil·lada a sobre de cada elèctrode, i la tira a sobre d'aquest paper. Així, les sals es queden retingudes al paper i no la tira.

També es pot programa l'aparell amb un pas addicional per tal d'incorporar la rehidratació passiva al programa. En aquest cas, es substitueix la safata de rehidratació per la safata on es correran les mostres.

### *Condicions d'isoelectroenfoc.*

En el nostre cas, les condicions d'electroforesis van ser les dictaminades per la casa comercial per a aquella llargada de tira. Per a tires de 17 cm (les emprades), les condicions són les següents:

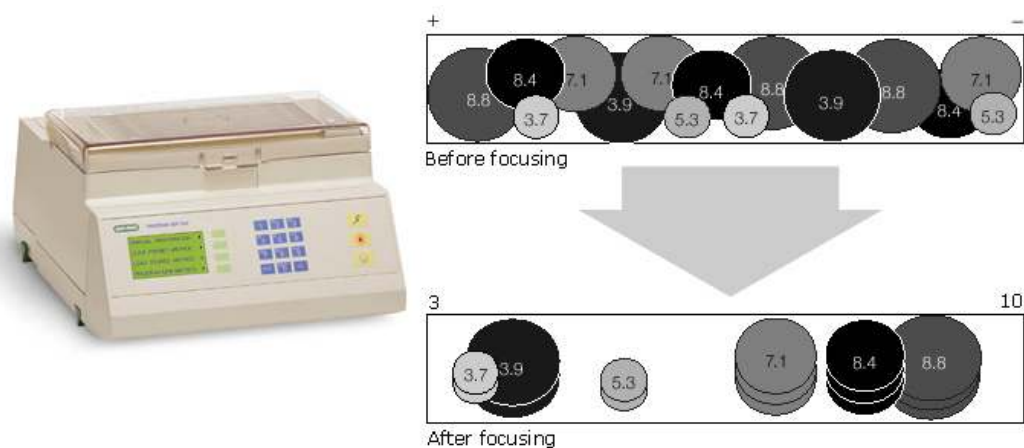
- Pas 1: quinze minuts de pujada ràpida (0-250 V)
- Pas 2: 2 hores de pujada lenta (250-10000 V)
- Pas 3: 45-60000 V-hours, rapid ramp, 10000 V
- Pas 4: durant 10 hores, a 50 V, pujada lenta. Aquest pas s'ha afegit per tal de no haver de dependre dels temps anteriors, i poder parar l'isoelectroenfoc en el moment més convenient.

A la Fig 3.4 s'observa de manera esquemàtica el procés que es duu a terme durant l'electroforesis.

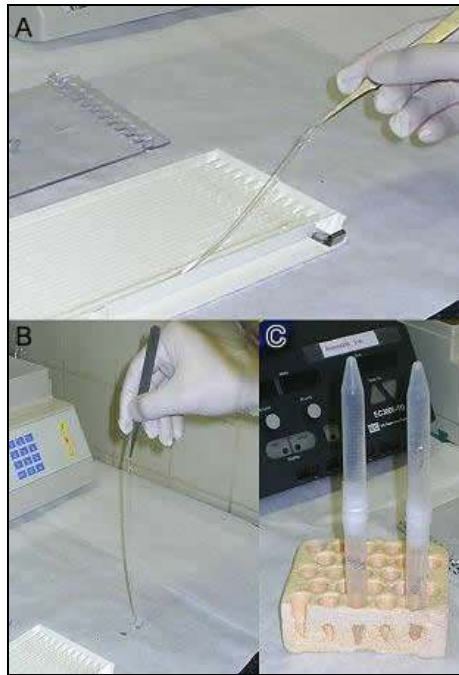
Després d'uns 10 minuts de haver començat la rehidratació, s'ha d'afegir oli a sobre les tires, per evitar l'evaporació de la mostra, degut als elevats voltatges assolits.

Un cop acabat l'isoelectroenfoc, l'excés d'oli s'ha d'eliminar, ajudats d'alguna mena de paper absorbent (veure Fig 3.5).

Després d'aquest pas, les tires es poden utilitzar al moment, o ser guardades a  $-80^{\circ}\text{C}$  durant mesos o anys (Fig 3.5, fotografia inferior dreta).



**Fig 3.4** Esquema del procés d'isoelectroenfoc. A la primera imatge, l'isoelectroenfoc no ha començat encara. A la segona imatge, l'isoelectroenfoc ha finalitzat, i cada proteïna ha quedat enfocada en el punt dictaminat pel seu pI (indicat amb un número dintre del cercle que representa la proteïna). *Extret de www.bio-rad.com.*



**Fig 3.5** Neteja i conservació de les tires. En A es pot veure com es treuen les tires de la safata d'isoelectroenfoc. A B es mostra el procediment per a eliminar l'excés d'oli de les tires. Finalment, a C es mostra el mètode de conservació ideal al laboratori, consistent en dos falcons units per parafilm. Aquests tubs es poden guardar al congelador sense problemes, protegint la tira i conservant-la fins que sigui necessari.

### 3.3.3.- Gels bidimensionals. Preparació de la segona dimensió.

El mètode emprat es basa essencialment en el descrit per Pixton (Pixton et al., 2004), amb modificacions.

#### *Equilibrat de tires.*

Abans de passar al gel de SDS, les tires s'han d'equilibrar. Temps superiors a 20 minuts poden conduir a la pèrdua per difusió de les proteïnes. Deu minuts es el temps usual, però si es té problemes d'*streaking* és millor augmentar aquest temps fins a 15 o 20 minuts.

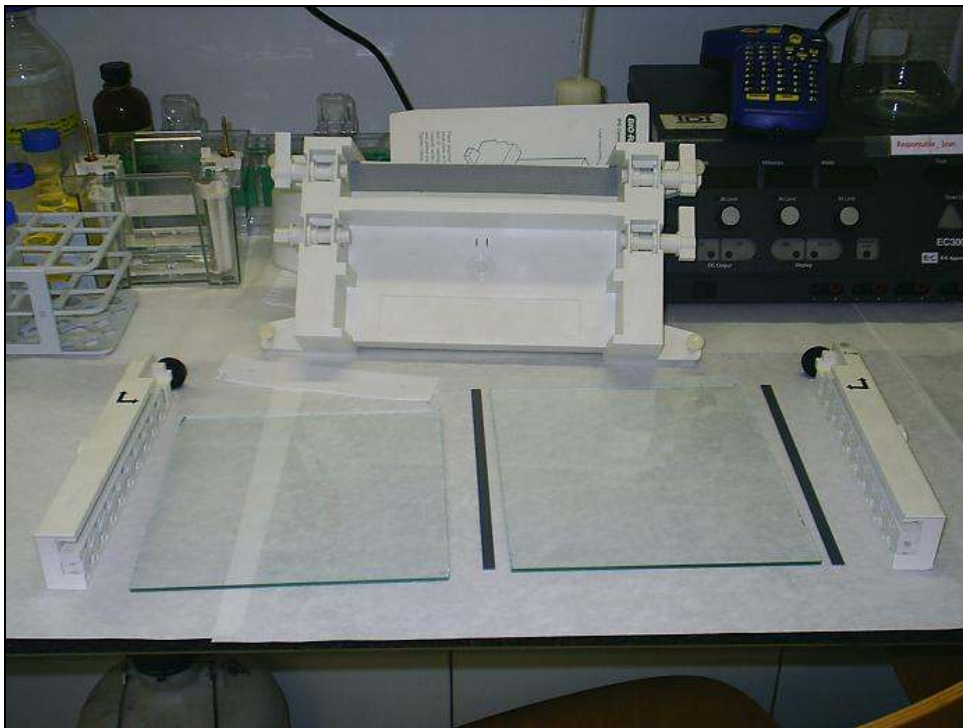
Els dos medis tenen la majoria de reactius en comú: Urea 6M, Tris HCl 0,375 M pH 8,8, 20% glicerol i 2% SDS. El medi I es troba complementat amb un 2% de DTT, i el medi II amb un 2,5% de iodoacetamida.

### *Preparació del gel.*

El primer pas es netejar els vidres amb etanol (si es tenyiran amb plata) o només amb aigua (si es tenyiran amb el sistema DIGE). Un cop els vidres estiguin nets, es procedeix al seu muntatge (Fig 3.6). Després del muntatge, es comprova l'estanquitat del mateix omplint fins la meitat amb aigua. Es deixa reposar durant uns 10 minuts. Si no perd aigua, es buiden, sense desmuntar els vidres, i s'eixuguen amb paper absorbent, de manera que no quedi cap gota d'aigua que pugui alterar localment la concentració d'acrilamida.

Es prepara la barreja que formarà el gel, tenint en compte que l'APS i el TEMED fan polimeritzar l'acrilamida, i per tant s'afegiran a l'últim pas. S'utilitza el Duracryl (Proteomic Solutions, France) per donar rigidesa als gels. El duracryl es un tipus d'acrilamida que dona rigidesa i resistència a l'entramat d'acrilamida (Patton et al., 1992).

Aquesta barreja es posa entre els vidres, intentant evitar que es formin bombolles que puguin afectar a la posterior electroforesis. Si es formen bombolles, s'han de treure, utilitzant l'eina adient (un filferro amb ganxo, fet especialment per això). S'omplen els vidres fins a dalt de tot, i després es fica tota la pinta, deixant que l'excés caigui. Així ens assegurem que tots els gels tenen la mateixa alçada.



**Fig 3.6** Elements necessaris per a l'elaboració del gel per a la segona dimensió.



Es deixa gelificar a temperatura ambient, durant un mínim de 90 minuts. Una polimerització o/n es recomanable en algunes situacions. Amb aquest mínim, es assegurem que la malla està ben feta. Amb 15 minuts els gels ja són sòlids, però la malla no està acabada i podem tenir problemes de mala resolució a la part superior del gel (la part d'elevat pes molecular). Passat aquest temps, es comprova que estigui gelificat. Una primera indicació és la formació d'un canvi de fase en la zona superior del gel (entre les pintes, si s'han ficat, o a la part superior del gel). Aquest canvi de fase es veu com una segona línia de front (Fig 3.7). Si s'observa aquest fenomen, es pot moure lleugerament el muntatge, per comprovar que estigui gelificat. Un cop estigui gelificat, s'extreu la pinta amb cura, estirant primer des de una banda, i permetent que entri l'aire. Després, es col·loca el gel sota l'aixeta d'aigua desionitzada, per eliminar les possibles restes d'acrilamida sense polimeritzar que puguin quedar. Després de sacsejar-lo bé, l'excés d'aigua s'eixuga amb paper de filtre.

Aquests gels són estables i es poden guardar a la nevera uns pocs dies, fins la seva utilització.



**Fig 3.7** Gel d'acrilamida polimeritzat, i ampliació. A l'ampliació es pot veure la línia (indicada per una fletxa) que ens indica que hi ha un canvi de fase entre la fase aquosa i l'acrilamida; aquesta línia es indicadora de la polimerització del gel.

### *Preparació del tampó.*

El tampó d'electroforesis es prepara concentrat 10x, per tal de tenir una solució estoc. Per preparar aquesta solució, es barreja Tris 25mM, Glicina 192 mM i 1% SDS. La solució de treball es una dilució 1x. Per a un gel corresponent a una tira de 17 cm, es necessiten 4 L de tampó, per tal que cobreixi tota la superfície del gel. Això es fa així per a evitar l'escalfament excessiu del gel. El tampó ajuda a distribuir uniformement la temperatura, evitant així escalfaments locals que podrien alterar les condicions d'electroforesis.

### *Condicions d'electroforesis.*

Un cop els gels estan preparats, les tires equilibrades i el tampó fet, es pot realitzar la segona dimensió. Les tires equilibrades es submergeixen en tampó d'electroforesis, i després es poden col·locar a la part superior del gel. Per conveni, es col·loca el pol positiu (el de pH més baix) al costat esquerra del gel.

Per protegir la mostra i fer de gel “stacking” es col·loca a sobre la tira agarosa a l'1%. S'utilitza agarosa de baix punt de gelificació, i es barreja amb tampó d'electroforesis. S'afegeix una traça de blau de bromofenol (0.005%) per controlar el temps d'electroforesis. Aquesta agarosa es guarda a la nevera, i s'ha de liquar abans d'utilitzar-la. Per fer-ho, s'escalfa al microones (uns 30 segons, fins que bull) i es deixa refredar a temperatura ambient, per no fer malbé la tira. El punt en que es pot utilitzar aquesta agarosa és quan ja no crema a la mà (aproximadament, uns 10 minuts després). En aquest punt, es deixa gelificar 5 minuts, i es pot començar l'electroforesi. Els gels es corren a 300 V durant 3 hores aproximadament, fins que el front comença a sortir.

Si s'utilitza una DodecaCell (Bio-Rad), el temps serà superior, però mantenim les mateixes condicions i ho parem en el mateix moment: quan el front comenci a sortir.

Passat aquest punt, s'atura l'electroforesi i es buida la cubeta. Els vidres es desmunten, i els gels es col·loquen dins la safata de tinció.

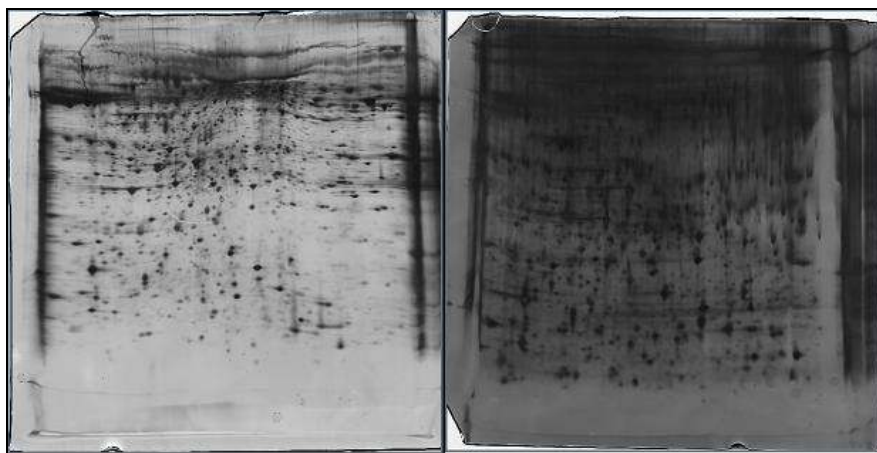
### *Tinció argèntica.*

Donada la sensibilitat de la tinció argèntica, es va decidir utilitzar-la en front d'altres tipus de tinció (com la tinció de comassie) tot i tenir en compte les seves limitacions. El mètode utilitzat es basa en el desenvolupat per Blum (Blum et al., 1987) amb modificacions.

Durant tot el procés s'ha d'anar amb molt de compte per no trencar els gels; s'han d'evitar les revolucions excessives de l'aparell, i rentar-se els guants amb etanol per tal d'evitar la contaminació amb queratines. També es recomana utilitzar guants sense pols, que poden donar falsos positius a l'hora de fer la tinció.

- 1) S'incuben els gels 1h mínim en tampó 10% acètic – 30% etanol (fixació).
- 2) Es fan tres rentats de 20 minuts amb etanol 30%.
- 3) Es fa un pretractament durant 1 minut amb 0,02%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .
- 4) Es fan tres rentats de 20 s amb  $\text{H}_2\text{O}$  mQ.
- 5) Es tenyeix durant 20 minuts en 0,2%  $\text{AgNO}_3$ .
- 6) Es fan 3 rentats de 20 s amb  $\text{H}_2\text{O}$  mQ.
- 7) Es velen els gels durant 90 s amb 6%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,0004%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 0.05% de Formaldehid al 37%.
- 8) Es fan dos rentats de 2 minuts amb  $\text{H}_2\text{O}$  mQ.
- 9) S'atura la reacció amb etanol 30% amb àcid acètic 10% durant 10 minuts.

Els temps s'ha de procurar que siguin el més exactes possibles, ja que si no el resultat es veu compromès. Rentats excessius en aigua, temps de pretractament menors, etc, poden donar com a resultat un gel tenyit menys de l'esperat i que, per tant, no servirà per comparar amb la resta. També, a l'inversa, temps de revelat superiors condueixen a gels tenyits més del compte, perquè la tinció argèntica és dependent del tems. Aquest gels tampoc no seran comparables (Fig 3.9).



**Fig 3.9** Exemples de gels tenyits sense mantenir les mateixes condicions. El gel de la esquerra s'ha revelat durant 90 segons. El revelat del gel de la dreta ha estat superior.

Amb les cubetes en què s'ha treballat (amb un volum de 1732.5 cm<sup>3</sup>), el volum per gel s'ha de procurar que sigui de 500 mL, ja que si no podem tenir problemes d'accessibilitat de la tinció a la mostra.

### *Tincions fluorescentes*

#### a) Tinció DIGE

A part de la tinció argèntica, es va posar a punt la tinció fluorescent tipus 2D-DIGE (two dimensional difference gel electrophoresis) (Gorg, 2004). Aquest tipus de tinció ens permet visualitzar fins a 3 mostres diferents en el mateix gel de 2D. A més, ens permet marcar un estàndard intern, i eliminar així la variació gel a gel.

Resumint, la tinció DIGE ens permet comparar dos mostres diferents en el mateix gel, i comparar-les també amb d'altres gels gràcies a l'ús d'un marcatge intern comú a tots els gels de l'experiment.

Tot el protocol es fa bàsicament com he descrit prèviament, amb les següents modificacions:

- Els tiols (com el DTT) interfereixen amb el marcatge. Per tant després del lissat s'ha de precipitar la mostra amb acetona (acetona al 80%) i ressuspendre en un medi lliure de DTT. L'acetona ha d'estar prerafredada prèviament a -20°C. S'afegeix a la mostra fins a una concentració final del 80% i s'incuba durant 10 minuts a -20°C. Després d'aquesta incubació, es centrifuga durant 5 minuts, a 3000 g i 4°C. Es descarta el sobrenedant i es ressuspèn en medi de lisis lliure de DTT.
- Un cop tenim la proteïna lissada, s'ha d'ajustar el pH entre 8 i 9. Si no es troba dins d'aquest rang, el marcatge no s'efectuarà correctament, arribant a l'extrem de no tenir marcatge fins i tot. S'agafa una petita alíquota de mostra (entre 2 i 5 µL) i es porta fins a 50 µL. Aquest volum s'afegeix sobre una tira reactiva, que ens donarà el pH aproximat. Si cal ajustar el pH, s'afegirà a la mostra petits volums de HCl o NaOH, depenent de la direcció en que vulguem ajustar el pH.
- Després d'ajustar el pH, s'ha de quantificar la proteïna. Per a això existeixen diversos mètodes, des del mètode Bradford (el més senzill) fins al Quant-kit de Amersham, passant pel RC DC de Bio-Rad. A tots els mètodes es necessita fer, primer, una corba patró, amb quantitats conegudes de proteïna. S'utilitzen

concentracions conegudes de BSA (*Bovine Serum Albumine*, albúmina de sèrum boví) com a recta patró. S'ha de recordar que les dilucions s'han de fer en el mateix medi en que es trobin les mostres.

- Un cop tenim quantificada la proteïna, es procedeix al marcatge.

### **Mètode Bradford de quantificació**

El mètode Bradford es basa en la unió del marcador blau brillant de Coomassie G-250 a les proteïnes (Bradford, 1976). El marcador existeix en tres formes: catiónica (vermella), neutral (verda) i aniònica (blava) (Compton and Jones, 1985). Sota condicions àcides, el marcador es troba predominantment en la forma doblement protonada catiónica (vermella) ( $A_{\max} = 470$  nm). No obstant, en unir-se a una proteïna es converteix a la forma estable sense protonar blava ( $A_{\max} = 595$  nm) (Reisner et al. 1975, Fazekes de St. Groth et al. 1963, Sedmack and Grossberg 1977). És aquesta forma blava la que és detectada a 595 nm a l'assaig.

El protocol a seguir és el següent:

- 1.- S'afegeix a una alíquota (20  $\mu$ L) de la mostra a quantificar 1 mL de la solució de Bradford.
- 2.- Es barreja bé (amb un vòrtex o per inversió) i es deixa incubar la mostra durant 5 minuts (no més d'una hora).
- 3.- Passat aquest temps, es mesura l'absorbància a 595 nm.

### **Mètode RC DC de Bio-Rad**

El kit RC DC es basa en el mètode desenvolupat per Lowry (Lowry et al., 1951), amb modificacions.

El mètode es basa en la reacció de la proteïna amb una solució alcalina de tartrat de coure i els reactius de Folin. Com en l'assaig de Lowry en que es basa, hi ha dos passos que condueixen al canvi de color: la reacció entre la proteïna i el coure a pH alcalí, i la subseqüent reducció del reactiu de Folin pel complex proteïna-coure. El desenvolupament del color es deu principalment als aminoàcids tirosina i triptòfan, i en menor grau a cistina, cisteïna i histidina. Aquests aminoàcids redueixen el reactiu de Folin, donant lloc a un característic color blau (amb un màxim d'absorbància a 750 nm i un mínim a 405 nm) (Peterson 1979). L'absorbància pot ser llegida llavors entre 650 i

750 nm.

El protocol per a tubs eppendorf és el següent:

- 1.- S'afegeixen 5  $\mu\text{L}$  del reactiu S de DC a cada 250  $\mu\text{L}$  del reactiu A de DC. Aquesta solució s'anomena reactiu A'. Cada estàndard o mostra necessita 127  $\mu\text{L}$  de reactiu A'.
- 2.- Es pipetegen 25  $\mu\text{L}$  dels estàndards i les mostres dintre de tubs eppendorfs buits.
- 3.- S'afegeixen 125  $\mu\text{L}$  del reactiu I de RC dintre de cada tub. Es barregen per inversió o amb vòrtex. Incubar els tubs 1 minut a temperatura ambient.
- 4.- S'afegeixen 125  $\mu\text{L}$  del reactiu II de RC dintre de cada tub. Es barregen per inversió o amb vòrtex. Es centrifuguen a 15000xg durant 3-5 minuts.
- 5.- Es descarta el sobrenedant per decantació. Es deixa assecar el sediment a l'aire.
- 6.- S'afegeixen 127  $\mu\text{L}$  del reactiu A' a cada tub. Es barregen per inversió o amb vòrtex. S'incuben a temperatura ambient durant 5 minuts, o fins que el precipitat està plenament dissolt. Es realitza un punt de vòrtex abans de passar al següent pas.
- 7.- S'afegeix 1mL del reactiu B de DC a cada tub i es fa un vòrtex immediatament. S'incuba a temperatura ambient durant 15 minuts.
- 8.- Després dels 15 minuts d'incubació, es pot llegir l'absorbància a 750 nm. L'absorbància serà estable durant una hora.

### **Mètode 2D Quant-Kit de Amersham**

El kit de quantificació d'Amersham utilitza una combinació única de precipitant i co-precipitant per quantificar la proteïna present en una mostra, mentre deixa en solució tots els contaminants que poden interferir (tiols i detergents, sobre tot). La proteïna es precipita mitjançant una centrifugació i es ressuspen en una solució alcalina d'ions de coure. Els ions de coure s'uneixen als enllaços polipeptídics de qualsevol proteïna present. Un agent colorimètric reacciona amb els ions de coure que no estan units a res. La densitat del color és inversament proporcional a la quantitat de proteïna present a la mostra.

El kit permet mesurar volums des de 1 a 50  $\mu\text{L}$ , amb un rang lineal per a la quantificació de 0-50  $\mu\text{g}$ .

Abans de començar el protocol, s'ha de preparar el reactiu colorant de treball. Per fer-

lo, es barregen 100 parts de reactiu A amb 1 part de reactiu B. Cada tub individual requerirà de 1 mL de reactiu.

El protocol per a realitzar 2D DIGE és el següent:

- 1.- S'afegeixen 50  $\mu\text{L}$  de la mostra/estàndard a tubs eppendorf buits.
- 2.- S'afegeixen 500  $\mu\text{L}$  del precipitant a cada tub. Es barregen per inversió o vòrtex. Es deixa incubar durant 2-3 minuts a temperatura ambient.
- 3.- S'afegeixen 500  $\mu\text{L}$  del co-precipitant a cada tub. Es barregen per inversió o vòrtex. Es centrifuga a un mínim de 10000 g durant 5 minuts. Així es sedimenta la proteïna.
- 4.- Treure els tubs de la centrífuga tan aviat com sigui possible, per evitar que es ressuspendi la proteïna. S'ha d'observar un petit sediment blanc. Es decanta el sobrenedant.
- 5.- Repetir els passos 2 a 4.
- 6.- Centrifugar breument els tubs, per tal de fer baixar qualsevol resta de líquid. Eliminar el sobrenedant amb pipeta. No ha de quedar cap mena de líquid al tub.
- 7.- S'afegeixen 100  $\mu\text{L}$  de la solució de coure i 400  $\mu\text{L}$  d'aigua destil·lada o desionitzada. Es fa vòrtex fins que es dissolgui la proteïna.
- 8.- S'afegeix 1 mL del reactiu colorant de treball. Barrejar per inversió.
- 9.- Es deixa incubar durant 15-20 minuts.
- 10.- Es llegeix l'absorbància a 480 nm, usant aigua com a referència. L'absorbància serà estable durant 40 minuts.

En tots tres casos, l'aparell emprat ha estat un espectrofotòmetre marca Ultrospec III (Pharmacia Biotech), amb cubetes de plàstic prèviament netejades amb aigua sabonosa, ben esbandides i amb les parets netejades amb paper de filtre per no tenir interferències en la lectura (Fig 3.10)



**Fig 3.10** Espectrofotòmetre i cubetes emprades en les quantificacions.

### **Marcatge de la proteïna**

**Consideracions prèvies:** la mostra ha d'estar a un pH entre 8 i 9 (l'òptim es 8.5) i la solució de lisis no pot contenir DTT, ja que el DTT (i altres tiols) pot competir amb les proteïnes pel marcador.

Abans de fer el marcatge, el marcador s'ha de reconstituir. Per tal de fer-lo, s'afegeix dimetilformamida (DMF) fins a una concentració de 1 nmol/ $\mu$ L. Després de reconstituir-lo, el marcador tindrà un color intens: groc el Cy2, vermell el Cy3 i blau el Cy5.

- 1) Es treu el eppendorf amb el marcador reconstituït cinc minuts abans de fer-los servir. Es deixa escalfar a temperatura ambient abans d'obrir-lo, per tal d'evitar que el marcador entri amb contacte amb la condensació, que li pot causar hidròlisis.
- 2) S'agafa una alíquota de DMF, amb xeringa, evitant el contacte directa amb l'aire de l'estoc.
- 3) Es barregen 25  $\mu$ L de DMF amb 25 nmol del marcador (1mM)
- 4) Es fa un vòrtex durant 30 segons, seguit d'una petita centrifugació de 30 segons més a 12000 g, per tal de assegurar que tot el marcador es troba al fons del tub.

Això es la solució estoc del marcador. Es estable durant 3 mesos.



Per fer la dilució de treball, els passos són els següents:

- 1) Fer una centrifugació de 10 segons per tal de tenir tot el marcador al fons del tub.
- 2) S'afegeixen 2  $\mu\text{L}$  de la solució estoc a 3  $\mu\text{L}$  de DMF (també es poden agafar volums inferiors, però mantenint la proporció).

Amb aquesta dilució, ens assegurem de que 400 pmol del marcador són utilitzats per a marcar 50  $\mu\text{g}$  de proteïna. Es poden marcar més o menys  $\mu\text{g}$  de proteïna, però s'ha de mantenir la proporció. S'han fet proves en d'altres laboratoris on marquen amb èxit 20  $\mu\text{g}$  de proteïna.

El protocol consta dels següents passos:

- 1.- S'afegeix a un tub eppendorf un volum de mostra equivalent a 50  $\mu\text{g}$  de proteïna.
- 2.- A la mostra s'afegeix 1  $\mu\text{L}$  de la dilució de treball (400 pmol). Es barregen bé, per inversió i/o pipetejant diverses vegades.
- 3.- Es fa una breu centrifugació, per tal de que tota la mostra es quedi a la part baixa del tub. S'incuba durant 30 minuts en gel, a la foscor.
- 4.- Per finalitzar la reacció, s'afegeix 1  $\mu\text{L}$  de lisina 10 mM. Es barreja bé, i s'incuba en gel durant 10 minuts (també a la foscor).

El marcatge ja està fet. Ara es pot processar la mostra immediatament o guardar-la al congelador ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) fins a 3 mesos.

Es recomanable que tant l'isoelectroenfoc com la segona dimensió es corrin a la foscor, o protegits d'alguna manera de la llum (la llum artificial no afecta en principi a la reacció, però es millor no arriscar-se).

Un cop acabada la 2D, s'ha d'escanejar la mostra, amb un escàner de fluorescència. S'ha utilitzat el Typhoon, d'Amersham (Fig 3.11). Els filtres aplicats han sigut els següents:

- 580BP 30 Cy3, TAMRA, AlexaFluor 546.
- 670BP 30 Cy5
- 520BP 40 Cy2, ECL, Blue FAM



**Fig 3.11** Escàner i dyes emprats en la tinció DIGE.

### b) Tinció "Flamingo"

Com alternativa a la tinció argèntica (a part de la tinció DIGE, que té altres objectius) també s'ha posat a punt la tinció amb el marcador fluorescent Pink Flamingo, de Bio-Rad (Flamingo Instruction Kit). Aquest marcador s'uneix a proteïnes desnaturalitzades, i té un màxim d'excitació fluorescent a 512 nm, i un màxim d'emissió fluorescent a 535 nm. La tinció del gel es realitza en dos passos:

- 1.- *Fixació*. Es deixa la mostra incubant amb 40% etanol, 10% àcid acètic, un mínim de dos hores en agitació. No es pot deixar més de 24 hores en aquest pas.
- 2.- *Tinció*. Es tenyeix la mostra amb 200 mL (gel de 17 cm) de Flamingo 1x, durant un mínim de 3 hores. Si es vol deixar més de 8 hores, s'ha de protegir de la llum. No hi ha més senyal per deixar-lo més temps.
- 3.- *Eliminació de soroll de fons*. Aquest pas és opcional. Es neteja la mostra durant 10 minuts en una solució d'1% de Tween.

Un cop fets aquests passos, s'escaneja la mostra. S'ha de fer un rentat, però, amb aigua just abans d'escanejar-lo.

Un cop acabada la 2D, s'ha d'escanejar la mostra, amb un escàner de fluorescència. S'ha utilitzat el Typhoon Trio (GE Healthcare Biosciences, Orsay, France). El filtre aplicat ha sigut el 535BP 40 Flamingo.

### 3.4.- Identificació de proteïnes.

#### 3.4.1.- Selecció de les proteïnes a identificar.

Després de la tinció, i per tal de poder identificar les proteïnes, es procedeix a retallar els punts dels gels. S'agafa una eina de punta rodona, preferiblement de diàmetre ajustable, i es retalla del gel el punt seleccionat. En el nostre cas, es va utilitzar una punta groga estèril retallada al diàmetre necessari amb un bisturí estèril. És important que tant les puntes com el bisturí siguin estèrils, per tal de no contaminar la mostra amb proteïnes exògenes que puguin afectar a l'anàlisi. També s'ha de procurar utilitzar guants sense pols, ja que el pols dels guants és una font important de proteïna exògena. Si no és possible utilitzar guants sense pols, s'han de rentar acuradament abans de tocar cap altra eina.

Per facilitar la feina, és important haver seleccionat prèviament els punts a retallar. Aquesta selecció es pot fer en base a diferents criteris: la seva abundància relativa, la seva identificació inequívoca en diferents experiments o una expressió diferencial en diversos tipus de pacients. Un cop tenim els punts seleccionats, es marquen en una còpia en paper del gel i es numeren. Aquesta numeració ens ajudarà després a poder relacionar els resultats de MALDI-TOF amb el gel.

Amb una còpia al davant, es col·loca el gel a sobre d'un vidre (prèviament netejat amb etanol) inclinat uns 30°, per facilitar el procés. És convenient també tenir una font d'il·luminació alternativa (un flexo, per exemple) i una font d'hidratació per prevenir que el gel s'assequi. La font d'hidratació òptima es el tampó final de la tinció argèntica (10% àcid acètic, 30% etanol), que és el medi on està guardat el gel.

Un cop retallat els punts, es guarden en tubs tipus eppendorf (de 0.5 mL) i es congelen a -20° C fins al següent pas.

També existeixen alternatives totalment mecanitzades per a aquest pas, però no ens va ser possible accedir-hi durant el període en que es va executar el treball experimental corresponent a aquesta tesis.

#### 3.4.2.- Tripsinització i anàlisi per MALDI-TOF.

*En aquest apartat i el següent es descriu la metodologia bàsica emprada. Cal, però, esmentar que tota la part de l'anàlisi per MALDI-TOF ha estat realitzada per la Unitat de Proteòmica de la Universitat de Barcelona, a càrrec del Dr. Josep Maria Estanyol.*

Els punts són digerits amb 100-150 ng de tripsina (Trypsin (Promega)) durant tota la nit, a 37° C. S'utilitza un sistema Montage In-Gel DigestZP (Millipore) amb el protocol del fabricant. Els pèptids són assecats i ressuspesos en aigua tractada amb 0.1% TFA. S'agafen 0.5 µl de la mostra i es barreja amb la mateixa quantitat d'àcid α-Cyano-4-hydroxycinnamic (3 mg/mL). Aquesta preparació és analitzada amb un espectròmetre de masses MALDI-TOF Voyager DE Pro (Applied Biosystems), operat en el mode "delayed extraction reflector mode", a 20kV com voltatge acceleratriu, 90 ns de "pulse delay time", 75% de "grid voltage", i una "guide wire voltage" de 0.005% (Kinter and Sherman, 2000).

Els espectres s'acumulen durant 100 trets laser, obtenint una massa de 750 – 3500 Da. Aquests espectres són analitzats utilitzant el software Protein Prospector MSFit (versió 3.2.1; University of California San Francisco). Tots els espectres són calibrats externament utilitzant una barreja peptídica com a estàndard (Angiotensin II [1046.5], angiotensin I [1296.7], Substance P-amide [1347.7], Bombesin [1619.8], ACTH fragment 1–17 [2093.1], ACTH fragment 18–39 [2465.2], Somatostatin 28 [3147.5]; Bruker) (Kinter and Sherman, 2000).

### 3.4.3.- Comparació amb bases de dades.

Les bases de dades (no redundants) *Swiss-Prot* i *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI, NIH, Bethesda, MD, USA) s'utilitzen com a font de seqüències de proteïnes, i per obtenir informació sobre l'expressió i la funció d'aquestes. Una tolerància de masses de 50-75 ppm i un tall incomplet són permesos. Acetilació de l'extrem N-terminal, alquilació de les cisteïnes per carbamidometilació, i oxidació de les metionines són considerades com a possibles modificacions. El criteri utilitzat per a acceptar identificacions inclou el tros de seqüència que coincideix amb les seqüències teòriques amb una precisió de 50-75 ppm (amb calibració interna), el nombre de pèptids que coincideixen i la probabilitat teòrica (MOWSE score) (Kinter and Sherman, 2000).

S'accepten espectres amb un MOWSE score inferior a 1000 si els pics són nets i millors que els corresponents a la tripsina. Els pèptids corresponents a tripsina, queratines humanes o altres proteïnes irrelevantes (determinat per la font d'estudi) són descartats.

Després d'aquest procediment, s'assoleix la identificació positiva i inequívoca dels punts retallats.

### 3.5.- Comparació de gels.

#### 3.5.1.- Matchset.

Una part important de tot el procés és la comparació de gels. Aquesta comparació ens permet trobar les diferències d'expressió proteica presents entre diferents grups de pacients, entre cèl·lules tractades amb diferents fàrmacs o entre diferents estats de la cèl·lula.

En el nostre cas, es van estudiar dos grups de pacients infèrtils (normozoospermics i astenozoospermics) i un grup control.

Per tal de poder analitzar el gels, aquest es digitalitzen amb un escàner calibrat d'alta resolució GS-800 (Bio-Rad) (Figura 3.12). Aquest aparell és un densitòmetre que compara la intensitat de la llum abans i després de ser atenuat per una mostra. La calibració ens garanteix la reproductibilitat dels escanejats i l'elevada resolució que punts propers es resolran com a punts independents. Aquest escàner ens genera una imatge digitalitzada del gel, amb un format d'elevada resolució que mantindrà les diferències del gel a l'ordinador. Aquesta imatge es guarda a l'ordinador en un format únicament reconeixible pel software PD-Quest, de Bio-Rad.



**Fig 3.12** Escàner GS-800 de Bio-Rad. Permet escanejar tot tipus de tincions visibles (comassie, plata, etc) i fer-ne una quantificació acurada, gràcies a la seva calibració.

A més, pels estudis tipus DIGE, o pels gels tenyits amb Flamingo Stain, s'utilitza un escàner Typhoon Trio (GE Healthcare Biosciences, Orsay, France) (Fig 3.11).

### *Introducció al software PDQuest.*

Els software d'anàlisi d'imatge són una eina indispensable per a la avaluació dels gels bidimensionals. Aquest tipus de software ens permet:

- Guardar i estructurar les dades quantitatives corresponents a grans quantitats de treball experimental.
- Anàlisis ràpid i sofisticat de la informació.
- Distribució entre diferents laboratoris, aportant un fitxer únic.
- Establir un banc de dades de proteïnes en gels 2D.

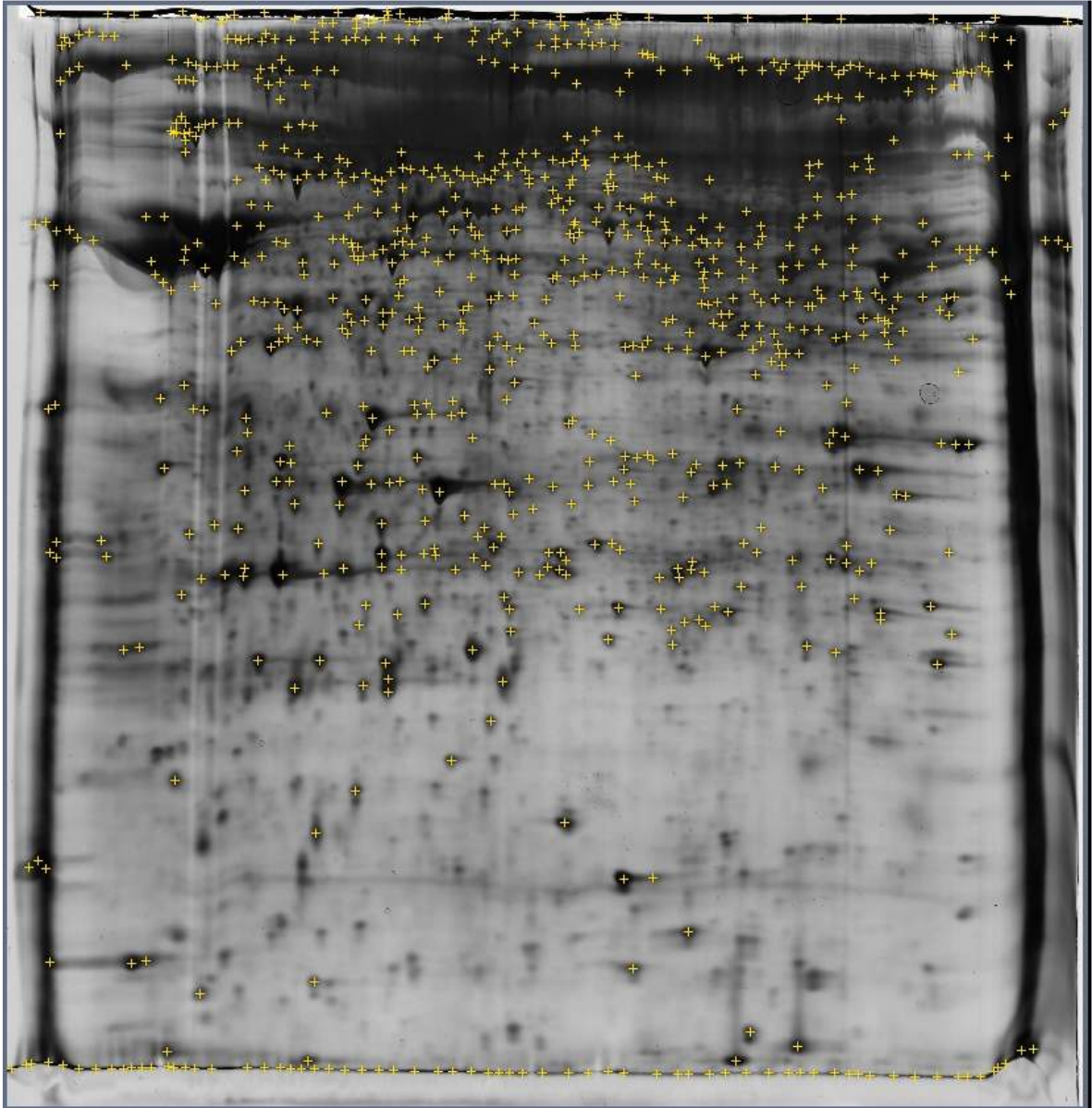
A més, els sistemes d'anàlisi d'imatge ens donen dades lliures d'error sobre valors qualitius i quantitius d'un gran nombre de gels bidimensionals (Miller and Merrill, 1989).

El software PDQuest ens permet detectar punts, quantificar-los, comparar gels entre sí i fer simples anàlisis estadístiques. La detecció dels punts pot fer-se de manera automàtica o manual. Sigui com sigui, un cop detectat un punt el software modela una distribució gaussiana en tres dimensions, que utilitza per calcular l'absorció màxima. Seguint aquest mètode, les intensitats dels punts són obtingudes per la integració de la funció gaussiana. A més, la descripció matemàtica dels punts serveix per a reduir el volum de dades i per a incrementar la velocitat de processament.

En definitiva, aquest software és una eina precisa que facilita molt la tasca de comparació entre els diferents gels.

### *Comparació assistida.*

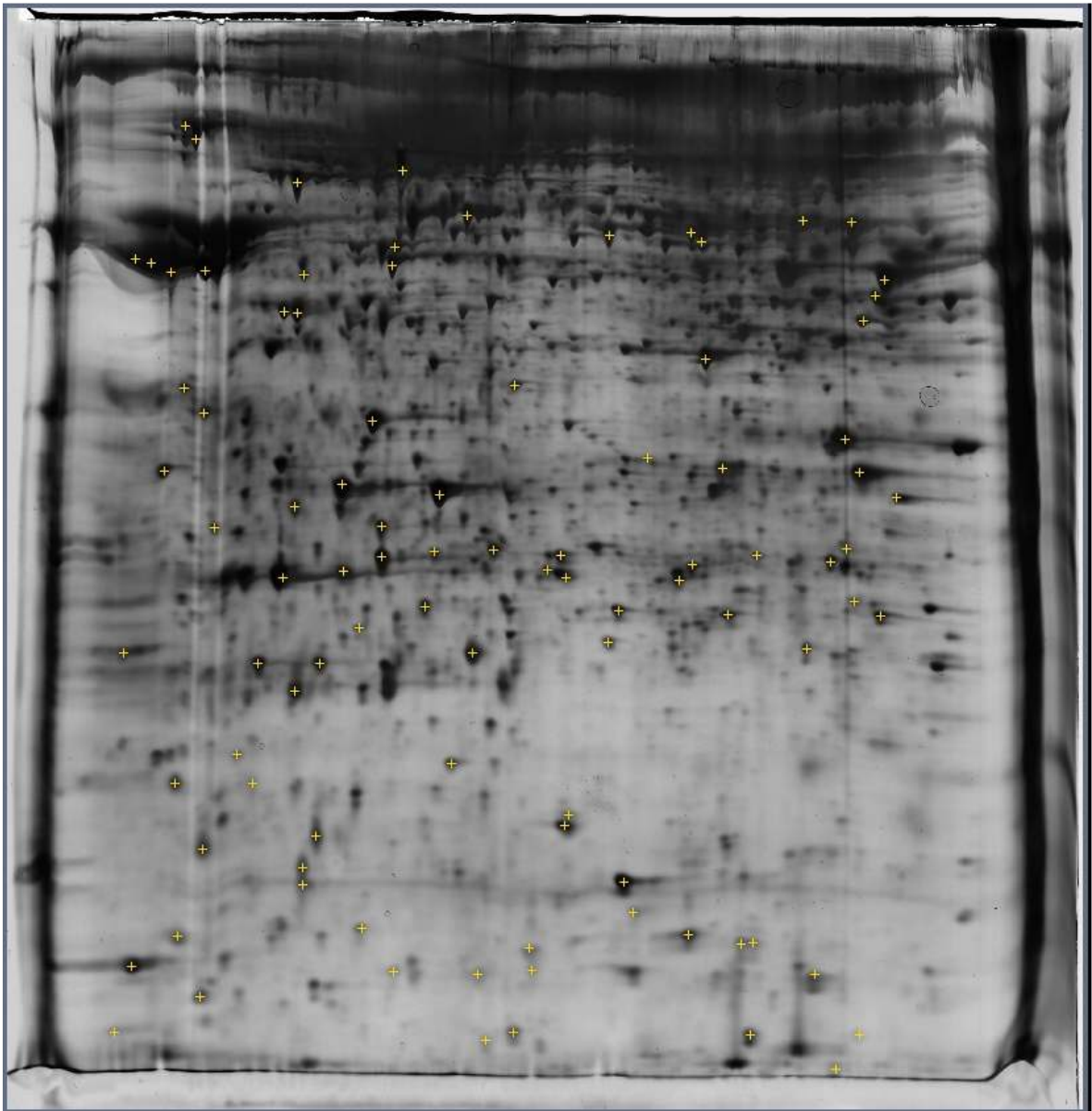
Amb el software PDQuest, la manera de treballar que es va seguir va ser la següent:



**Fig 3.13** Exemple de gel amb els punts detectats, abans i després de fer la comparació assistida.

Després d'escanejar (i, per tant, digitalitzar) tots els gels, es crea un nou “matchset”. Aquest matchset constarà de tots els gels que es volen comparar. Amb el sistema “wizard” es detecten els punts; es millor detectar més punts dels que es volen comparar automàticament, ja que la localització serà més acurada que si s'introdueixen manualment. Un cop es tenen tots els punts detectats, s'anul·len tots els punts. Això es fa perquè, prèviament ja s'han decidit quins punts es volen analitzar; si es volgués fer un anàlisi total, els punts es deixarien.





**Fig 3.13 (continuació)** Exemple de gel amb els punts detectats, abans i després de fer la comparació assistida.

Un cop es tenen tots els punts anul·lats, amb l'eina “restaurar punt” s’aniran marcant tots els punts dels quals volem fer l’anàlisi. En el nostre cas en concret, aquests punts van ser els prèviament identificats gràcies al sistema MALDI-TOF.

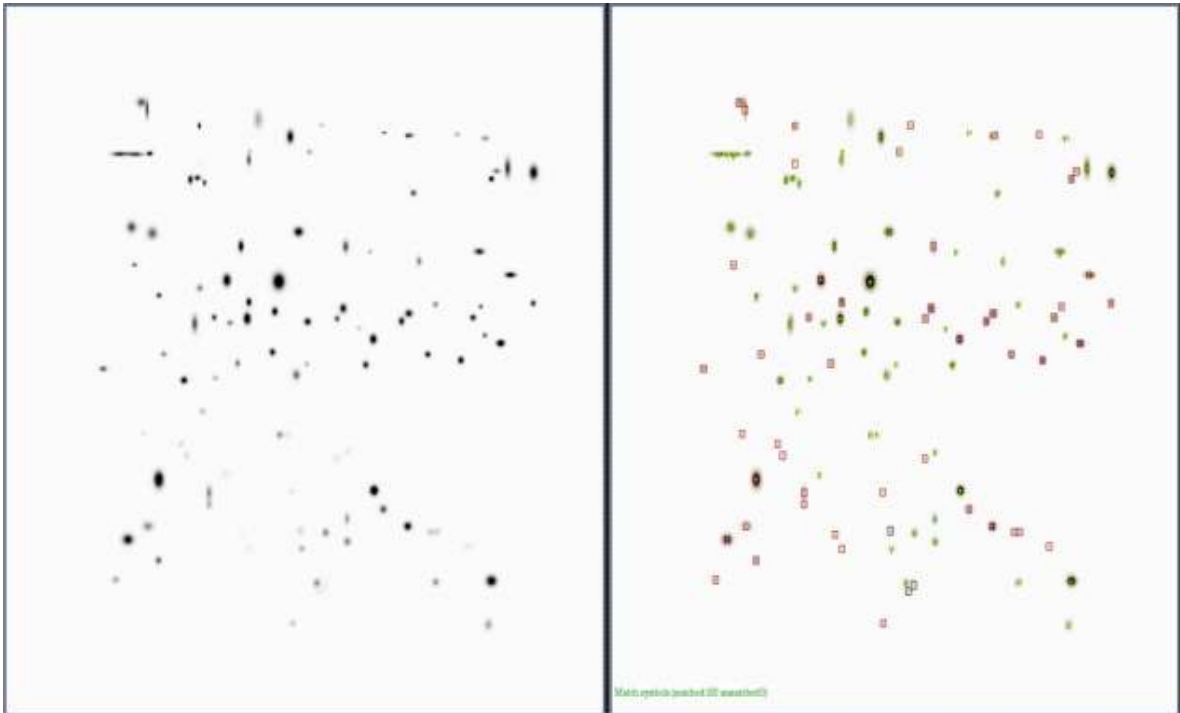
El software autodetecta un “master”, un gel mestre que agafa com a base per a fer la comparació. Sobre aquest gel mestre, s’han d’afegir els punts d’interès que no es trobin presents; per fer-ho, s’utilitza l’eina “afegir punt”. Amb aquesta eina, el software afegeix un punt al lloc on tenim el cursor, encara que sigui un espai en blanc.

Un cop tenim tots els punts afegits a tots els gels, de manera inequívoca, es procedeix a fer la comparació. Amb el botó “match” es compararen tots els gels entre sí i amb el “master”. És important repassar els gels, ja que poden haver punts associats a un “punt



mestre” que no els hi correspongui. Al “master”, els punts en vermell són punts no associats. Aquests punts s’han d’associar manualment, amb el botó “manual match”.

Després d’aquest procés, el “master” ha de tenir una imatge semblant a aquesta (Figura 3.14). Idealment, tots els punts haurien de ser verds o blaus, ja que són punts associats automàticament pel software. Els punts liles són punts associats manualment. En principi, no haurien d’haver punts vermells, ja que al fer l’associació s’han marcat els punts no presents amb un punt virtual a un espai en blanc, a la seva localització exacta. D’aquesta manera, al fer la quantificació, aquests punts absents tindran un valor de zero o proper. Si encara queden punts vermells, en principi es correspondran a punts que no s’han pogut associar a cap punt d’aquell gel en concret, ja sigui per una dolenta resolució del gel, per incapacitat de trobar el punt en la localització espacial o per altres motius.



**Fig 3.14** “Master” emprat a l’experiment. A l’esquerra, la imatge sense marcar. A la dreta, els punts marcats segons si ha sigut un match automàtic (verd) o un match manual (lila).

*Normalització de les dades.*

Un cop tenim tots els gels analitzats, amb tots els punts localitzats i associats al “master”, es procedeix a normalitzar els valors per poder fer els estudis estadístics pertinents. La normalització es pot fer de diverses maneres, però la fórmula general que se segueix és sempre la mateixa:

$$\text{Quantitat normalitzada} = \text{quantitat original} * \text{factor d'escala} * \text{compensació de l'error de pipeteig} / \text{factor de normalització}$$

On la quantitat original és la quantitat (intensitat) no normalitzada de cada punt, el factor d'escala és un factor seleccionat per donar sentit al valor (PPM, percentatge o especificat per l'usuari), la compensació per error de pipeteig és un factor definit per l'usuari i depenent de les seves pipetes i el factor de normalització es calcula per a cada gel basat en el mètode de normalització triat. En el nostre cas, es va triar el mètode “quantitat total en els punts vàlids”.

Aquest valors normalitzats s'exporten a un software d'anàlisi de dades (Excel, per exemple), des d'on podran ser tractats de diverses maneres.

**3.5.2.- Comparació estadística.**

Les dades normalitzades s'exporten a format .xls, on els hi donarem format i farem unes transformacions mínimes. Un cop aquestes dades estiguin depurades, s'exporten al software SPSS, on es farà l'anàlisi estadístic de les dades.

*Test de Mann-Whitney.*

En estadística, el test U de Mann-Whitney es un test no paramètric usat per comprovar que dos grups d'observacions provenen de la mateixa distribució. La hipòtesi nul·la es que els dos grups provenen de la mateixa població, i per tant les seves distribucions de probabilitat són iguals. Necessita que les dos mostres siguin independents, i que les observacions siguin mesures ordinals o contínues.

En el nostre cas, es va utilitzar per a comparar els dos grups, un amb espermatozoides lents (astenozoospermics), i un altra amb espermatozoides ràpids (normozoospermics i controls). Tots els càlculs estadístics els va fer el software SPSS v12.

### 3.5.3.- "Clustering".

Un cop el tractament estadístic ha finalitzat, s'intenta agrupar les proteïnes segons els seus valors d'expressió, intentant veure patrons d'expressió entre els pacients. Per fer-ho, s'utilitza el software Cluster & TreeView, desenvolupat per Eisen (Eisen et al., 1998). El software Cluster ens genera agrupacions segons el patró d'expressió, que es visualitzen amb el programa Tree View.