

III. Materials i mètodes

1. ANIMALS

Per a realitzar aquest treball s'han emprat rates mascles de la soca *LEW/HanHsd* (*Harlan Interfauna Ibérica, Espanya*). Les rates pertanyents a aquesta soca són consanguínies i per tant presenten el mateix complex major d'histocompatibilitat (MHC), la qual cosa les fa molt apropiades per a estudis immunològics. S'han escollit rates mascles per tal d'evitar les fluctuacions de les poblacions limfocítiques i de la concentració sèrica d'immunoglobulines causades pel cicle estral.

Els animals (8 per ventrada) han arribat amb 15 dies d'edat junt amb la seva mare. Aquests animals, han estat una setmana en quarantena a l'Estabulari de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Durant aquest temps de quarantena, així com al llarg del període experimental, s'han mantingut sota condicions òptimes de temperatura (18–22°C) i humitat relativa (55%), així com amb cicles programats de llum–fosc de 12 hores.

En el moment del deslletament, que s'ha realitzat als 21 dies d'edat, els animals han estat separats en 4 grups homogenis en funció del pes. A partir d'aquest moment les rates han estat alimentades durant 14 dies amb el pinso experimental corresponent (vegeu apartat 3).

La manipulació dels animals al llarg de tot el procés experimental, així com el seu sacrifici, s'ha dut a terme segons els procediments autoritzats tant pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEAA) de la Universitat de Barcelona, com pel Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya (DARP n.651), seguint les recomanacions de la *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA, Guidelines for ethical care and use of animals, 1995). Els animals han estat sacrificats entre les 9:00 i les 11:30 del matí per dislocació cervical sota anestèsia.

2. POSTA A PUNT DEL MODEL D'INFLAMACIÓ

Per tal de poder estudiar els possibles efectes de la suplementació dietètica, ja sigui amb el concentrat de plasma animal (SDAP; *Spray-Dried Animal Plasma*) o amb el concentrat de la fracció immunoglobulina (IC; *Immunoglobulin Concentrate*), s'ha posat a punt un model d'inflamació intestinal aguda utilitzant com a agent inductor l'enterotoxina B d'*Staphylococcus aureus* (SEB; *Toxin Technologies, Florida, EUA*). Per realitzar aquesta posta a punt s'ha utilitzat l'activitat mieloperoxidasa com a marcador d'infiltració de neutròfils (Bradley *et al.* 1982). També s'ha fet un seguiment del contingut d'aigua en femtes a diferents temps després de l'administració del SEB.

Les diferents pautes d'administració de l'enterotoxina s'han ajustat per tal que el dia de sacrifici fos sempre el dia 35 d'edat. La inflamació s'ha induït mitjançant l'administració d'una o dues dosis de SEB que s'ha administrat via intraperitoneal i dissolt en PBS estèril. Als animals control se'ls hi ha administrat únicament el vehicle. En la taula III-1 es mostren les diferents pautes assajades així com els diferents temps de sacrifici. En la figura III-1 s'indiquen les mostres obtingudes en cada experiment.

Taula III-1. Pautes d'administració del SEB.

Exp.	SEB Dosi 1	Edat (dia)	SEB Dosi 2	Edat (dia)	Sacrifici després de:
1	50 µg	34			12 / 24 h
2	100 µg	34			12 / 24 h
3	50 µg	28	50 µg	33/34	12 / 24 h
4	50 µg	30	50 µg	33	24 / 48 h
5	50 µg	29	50 µg	33	24 / 48 h

En l'experiment 3 les dues dosis de SEB s'han separat 5-6 dies i el animals s'han sacrificat 12-24 h després de la segona administració de SEB. En l'experiment 4 les dues dosis de SEB s'han separat 3 dies i en l'experiment 5 les dues dosis s'han separat 4 dies.

2.1. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT MIELOPEROXIDASA EN MUCOSA DE JEJÚ

La mieloperoxidasa és un enzim present en leucòcits, especialment en els neutròfils. Concretament es localitza en els grànuls primaris d'aquestes cèl·lules. Aquest enzim en presència de peròxid d'hidrogen i d'un cofactor halogen forma el mecanisme antimicrobià i citotòxic més efectiu dels leucòcits. En aquest estudi, el procés utilitzat per determinar l'activitat d'aquest enzim és el descrit per Fedorak *et al.* (1995), amb algunes modificacions per tal d'adaptar-lo a les nostres condicions.

Aquest procediment es divideix en dues fases. La primera consisteix en extreure la mieloperoxidasa dels grànuls primaris dels neutròfils que s'han infiltrat a la mucosa intestinal. La segona fase és la quantificació d'aquest enzim, mitjançant tècniques espectrofotomètriques. Aquesta tècnica permet valorar la infiltració de neutròfils, ja que s'estableix una correlació lineal entre la quantitat d'activitat mieloperoxidasa detectada i la quantitat de neutròfils presents a la mostra (Bradley *et al.*, 1982).

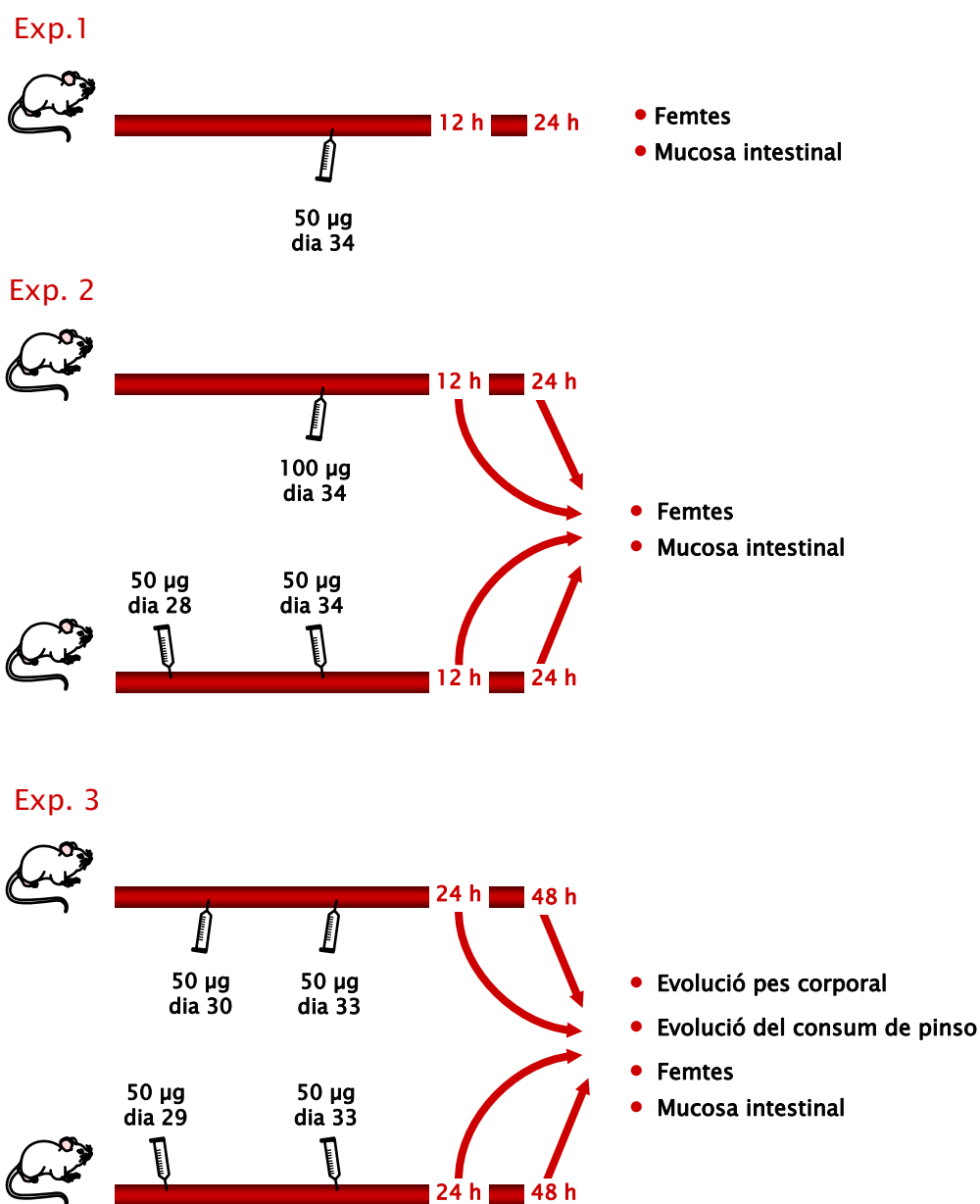


Figura III-1. Dissenys experimentals per a l'establiment de la pauta d'administració del SEB. En l'experiment 1 s'ha administrat un única dosi de 50 µg de SEB i s'han sacrificat rates a les 12 h i a les 24 h després. En l'experiment 2 s'ha duplicat la quantitat de SEB administrada; o bé en una única dosi de 100 µg de SEB, o bé amb dues dosis de 50 µg de l'enterotoxina separades 6 dies. Els animals s'han sacrificat a les 12 h o a les 24 h de l'administració de SEB. En l'experiment 3 s'han analitzat dos temps d'interval diferents entre les dues dosis. Els animals s'han sacrificat a les 24 h i a les 48 h després de la segona dosi de SEB.

OBTENCIÓ DE LA MOSTRA

- *Composició dels medis*

Solució d'anestèsics: 90% de quetamina (*Imalgene 1000*[®], Merial Laboratories, S.A., França) i 10% xilacina (*Rompún*[®], Bayer, Alemanya).

- *Procediment*

Una vegada l'animal ha estat anestesiats via intraperitoneal amb 1 mL de la solució d'anestèsics/kg de pes, s'ha realitzat una laparotomia que ha deixat la cavitat abdominal al descobert. S'ha extret el jejú, descartant el duodè (la porció anterior al lligament de Treitz) i l'ili. La mostra que s'ha utilitzat ha estat en tots els casos un fragment de mida similar de la zona del jejú medial. Seguidament, s'ha rentat amb PBS i s'ha obert longitudinalment seguint el mesenteri. Un cop el jejú obert, s'ha raspat la mucosa amb dos portaobjectes, s'ha pesat i s'ha congelat immediatament a -80°C. En aquest punt la mostra es guarda fins al moment de l'extracció de la mieloperoxidasa.

EXTRACCIÓ DE LA MIELOPEROXIDASA DE LA MUCOSA DE JEJÚ

L'extracció s'inicia amb un trencament del teixit mitjançant una homogenització. Seguidament es sonica l'homogenat per tal de trencar els grànuls primaris dels neutròfils i alliberar, així, l'enzim mieloperoxidasa al medi d'extracció. Per tal de solubilitzar les proteïnes s'afegeix detergent al medi (HTAB; *Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*) i per tal que d'inhibir l'acció de les proteases s'hi afegeix un quelant de calci (EDTA; EtilenDiaminoTetraAcetat).

- *Composició dels medis*

PBS: NaCl 154 mmol/L, NaH₂PO₄·H₂O 4 mmol/L, Na₂HPO₄·2H₂O 16 mmol/L (pH 7,4) en aigua desionitzada *MilliQ* (*Millipore, Massachussets, EUA*). El pH s'ha valorat amb un pH-metre *Micro-pH 2001* (*Crisson Instruments S.A., Espanya*).

Tampó fosfat 50 mmol/L (pH 6,0): KH₂PO₄ 50 mmol/L i s'hi afegeix Na₂HPO₄ fins a obtenir un pH 6,0.

Medi d'extracció: HTAB 13,72 mmol/L, EDTA 5 mmol/L en tampó fosfat 50 mmol/L (pH 6,0).

- *Procediment*

L'extracció de la mieloperoxidasa s'ha iniciat amb una homogeneïtzació de la mucosa intestinal en 2 mL de PBS a velocitat 8–9 i punta 7 durant 15 s en fred seguits de 15 s de repòs, tres vegades (*Polytron®*, *Kinematica AG, Suïssa*). D'aquest homogenat (H) s'ha separat una alíquota de 50 µL on posteriorment s'ha determinat la concentració de proteïnes (vegeu apartat 7.2). Seguidament s'ha centrifugat a 1300 g durant 20 min a 4°C. El sobrenedant (SN-1) s'ha emmagatzemat a -80°C per a determinar-ne la IgA (vegeu l'apartat 5.2.).

A continuació el sediment (S-1) anterior s'ha resuspès amb 4 mL de medi d'extracció i s'ha homogeneïtzat un altre cop. Després s'han afegit 2 mL més de tampó d'extracció i s'ha sonicat durant 15 s a una amplitud de 12 µm mitjançant un sonicador *Soniprep 150®* (*MSE Scientific Instruments, Regne Unit*). Aquesta sonicació s'ha repetit 2 vegades més, deixant reposar la mostra 15 s entre cada una. Acte seguit s'ha centrifugat a 1300 g durant 20 min a 4°C. Per tal de clarificar aquest sobrenedant (SN-2), s'ha tornat a centrifugar a 7000 g durant 5 min a 4°C i s'ha guardat immediatament a -80°C, fins al moment de determinar l'activitat mieloperoxidasa. Per tal d'acabar d'extreure la resta d'enzim que pogués quedar, s'ha resuspès el sediment (S-2) amb 2 mL de medi d'extracció, s'ha agitat vigorosament mitjançant un agitador *MS2 Minishaker®* (*IKA Works Incorporated, North carolina, EUA*) i s'ha tornat a centrifugar com en el cas anterior. Aquest sobrenedant (SN-3) es manté a -80°C, fins al moment de la determinació de l'activitat mieloperoxidasa.

QUANTIFICACIÓ DE L'ACTIVITAT MIELOPEROXIDASA

La quantificació de l'activitat mieloperoxidasa (MPO) es realitza en els SN-2 i SN-3 obtinguts en l'apartat anterior. La MPO reacciona amb un halogen (majoritàriament clor) en presència de peròxid d'hidrogen, generant un component altament corrosiu com és l'àcid hipoclorós:



La determinació de l'activitat enzimàtica s'efectua mesurant la velocitat de la reducció del peròxid d'hidrogen a través de l'oxidació d'orto-dianisidina. L'oxidació d'aquest cromogen comporta un canvi de color que es mesura mitjançant un espectrofotòmetre. A mesura que la reacció avança va apareixent color, i per tant, s'obtenen increments

d'absorbància (ΔA) a diferents temps. A partir de $\Delta A/\text{min}$ i segons la llei de Lambert-Beer es calcula la concentració de MPO en unitats d'enzim (UMPO).

- *Composició dels medis*

Tampó fosfat 50 mM (pH 6,0): KH_2PO_4 50 mmol/L i s'hi afegeix Na_2HPO_4 fins a obtenir un pH 6,0.

Solució de peròxid d'hidrogen: H_2O_2 1,5 mmol/L en aigua bidestil·lada estèril. Preparació extemporània.

Solució d'orto-dianisidina: orto-dianisidina 56,75 mmol/L en tampó fosfat 50 mM (pH 6,0) (s'han d'afegir 2-3 gotes de HCl per cada 25 mL de solució). Preparació extemporània.

- *Procediment*

Per determinar l'activitat enzimàtica s'han afegit les diferents solucions a la cubeta, sempre en el mateix ordre i agitant amb la pipeta cada vegada. Primerament s'han col·locat 1,3 mL de tampó fosfat, a continuació s'han afegit 100 μL del sobrenedant corresponent (SN-2 o SN-3), seguidament s'ha agregat 50 μL de la solució d'orto-dianisidina i finalment 50 μL de la solució de peròxid d'hidrogen. L'absorbància s'ha mesurat cada 15 s durant 75 s a 460 nm en un espectrofotòmetre *UV-160 A (Shimadzu Corporation, Japó)*.

Per calcular la quantitat d'enzim present a la mostra s'ha aplicat la llei de Lambert-Beer, que estableix que l'absorbància d'una mostra és directament proporcional a la concentració de l'espècie absorbent. En el nostre cas s'ha substituït l'absorbància per l'increment d'absorbància.

$$\Delta A/\text{min} = \epsilon b C$$

$$C = (\Delta A/\text{min}) / \epsilon b$$

a on : ΔA és l'increment d'absorbància
 ϵ és el coeficient d'absorció molar
 b és la longitud del trajecte òptic
 C és la concentració de la mostra

$\Delta A/\text{min}$ s'ha determinat experimentalment (3 replicues per animal), $\epsilon = 11.3 \text{ mL/cm} \cdot \mu\text{mol}$ i $b = 1 \text{ cm}$. Un cop s'ha obtingut l'activitat mieloperoxidasa, s'ha corregit per les dilucions i els volums de les extraccions realitzades. Finalment s'ha normalitzat pel pes humit de la mucosa.

El resultat s'expressa en unitats de MPO per g de mucosa (UMPO/g mucosa), sent una unitat d'activitat mieloperoxidasa la quantitat que degrada 1 μmol de peròxid d'hidrogen per minut a 25°C.

2.2. DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT D'AIGUA EN FEMTES

Per determinar el contingut d'aigua en femtes, s'han recollit femtes a diferents temps després de la dosi de SEB corresponent. Aquestes han estat defecades espontàniament i han estat immediatament recollides (en eppendorfs prèviament tarats) i pesades. Tot seguit s'han assecat en una estufa a 60°C durant 3 dies, s'han tornat a pesar i s'ha calculat el percentatge d'aigua (Kasper *et al.*, 2000).

3. DIETES

En aquest treball s'han estudiat els efectes de dues dietes sobre un model d'inflamació intestinal: SDAP (*Spray-Dried Animal Plasma*), suplementada amb plasma animal i IC (*Immunoglobulin Concentrate*) amb concentrat d'immunoglobulines. Com a referència s'ha utilitzat una dieta Control on aquests dos suplementes han estat substituïts per proteïnes làctiques (Taula III-2). Les dietes han estat preparades en forma de *pellet* per APC Europe, S.A. (Espanya) i formulades per contenir un 18% de proteïna, per tal de satisfer els requeriments nutricionals d'animals de laboratori d'acord amb el *National Research Council* (NRC, 1995).

La dieta SDAP conté 80 g SDAP/kg de pinso. La sang d'on s'obté l'SDAP es recull en escorxadors i prové d'animals sans destinats a consum humà. Seguidament, se li afegeix anticoagulant, normalment citrat sòdic, i s'eliminen els eritròcits per centrifugació (Russell i Weaver, 1996; Coffey i Cromwell, 2001). La dieta IC conté 22,7 g IC/kg de pinso. Aquest concentrat ha estat obtingut per purificació de la fracció d'immunoglobulines del plasma boví mitjançant el mètode descrit per Lee *et al.* (1988).

Ambdós ingredients han estat assecats per polvorització per obtenir un producte en pols estable que contingui immunoglobulines actives (17,5% d'IgG en l'SDAP i 61,7% d'IgG en l'IC). La bioactivitat d'aquestes immunoglobulines presents en els pinsos està descrita a Borg *et al.* (2002). Les dietes suplementades amb SDAP o IC han estat formulades per tal que el seu contingut en immunoglobulines fos similar (1,4%).

Taula III-2. Composició de les dietes experimentals.

	CONTROL	SDAP ¹	IC ²
Ingredients			
		g/kg	
Plasma animal assecat (SDAP)	--	80	--
Concentrat d'immunoglobulines (IC)	--	--	22,7
Blat de moro	149	262	187
Llet descremada en pols	531	337	470
Sucre	150	150	150
Oli de soja	70	70	70
Cel·lulosa	50	50	50
AIN-93 VX ³	10	10	10
AIN-93 GM ⁴	35	35	35
DL-metionina	2,5	3,2	2,7
Bitartrat de colina	2,5	2,5	2,5

¹AP-920. APC Inc., Iowa, EUA. ²Immunoglobulin concentrate. APC Inc., Iowa, EUA.^{3, 4} Dyets, Inc., Pennsylvania, EUA.

4. DISSENY EXPERIMENTAL

Una vegada s'ha establert la pauta d'administració adequada per induir la inflamació intestinal, s'ha realitzat la seva caracterització i l'estudi de l'efecte de la suplementació dietètica sobre la inflamació intestinal.

El dia de desalletament (dia 21) les rates han estat distribuïdes en quatre grups de forma homogènia respecte el pes. Els grups han estat: a) animals sans, alimentats amb el pinso control i que han estat administrats amb PBS (grup Control); b) rates alimentades amb el pinso control i que han estat administrades amb la doble dosi de SEB (grup SEB); c) rates tractades amb doble administració de SEB i alimentades amb el pinso suplementat amb plasma animal (grup SEB-SDAP) i d) rates tractades amb SEB i alimentades amb el pinso suplementat amb concentrat d'immunoglobulines (grup SEB-IC).

Aquests animals han estat alimentats durant 14 dies (fins al dia 35 d'edat) amb els pinsos experimentals. Durant aquest període, s'ha realitzat un seguiment del pes i del consum de pinso. Totes les mesures s'han realitzat dins del recinte de l'estabulari, d'acord amb la normativa vigent.

Els dies 30 i 33 d'edat (dies 9 i 12 de consum de pinso), les rates han rebut via intraperitoneal 50 µg de SEB (Figura III-2). Els animals control únicament han rebut el vehicle, és a dir PBS. El dia 35, els animals han estat sacrificats entre les 9:00 i les 11:30 del matí per dislocació cervical sota anestèsia. El fet de sacrificar tots els animals en un mateix període diari, ha permès evitar les variacions degudes al ritme circadiari.

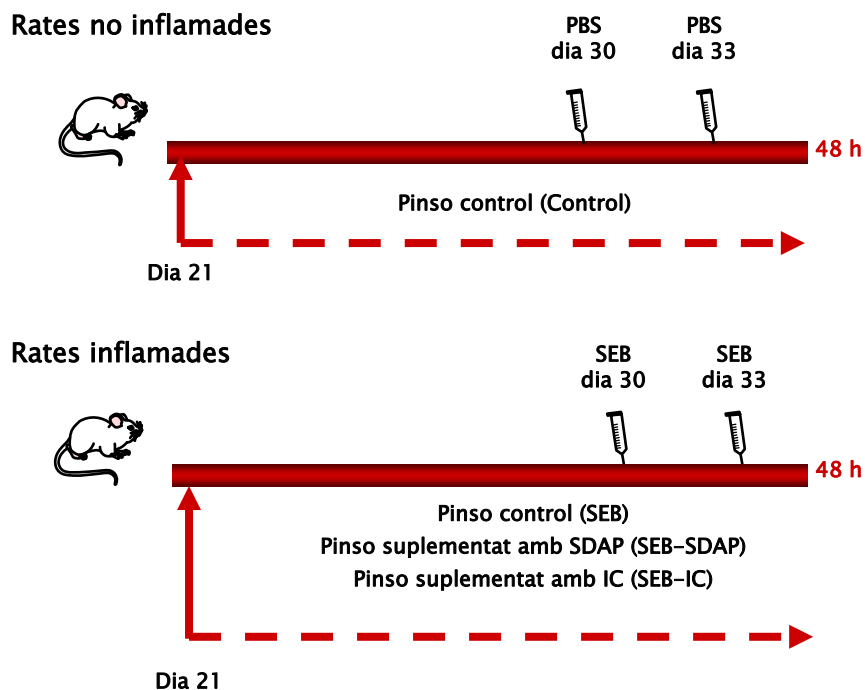


Figura III-2. Disseny experimental. El dia 21 les rates han estat deslletades i distribuïdes en quatre grups. Els animals han consumit els pinsos corresponents durant 14 dies. Els dies 30 i 33 han rebut 50 µg de SEB o el seu vehicle (PBS). A les 48 h de la segona administració (dia 35) s'han obtingut les mostres.

5. MESURA DE VARIABLES FISIOLÒGIQUES EN SANG I SÈRUM

5.1. HEMOGRAMA

Les variables hematològiques han estat determinades en base al mètode Coulter (1956), mitjançant un comptador automatitzat amb el mateix nom. Aquest aparell detecta i mesura els canvis de la resistència elèctrica d'una solució produïts pels elements cel·lulars sanguinis. L'aparell consta de dues cambres: en una d'elles, s'hi realitza el recompte

d'eritròcits i plaquetes. En l'altre, s'hi realitza el recompte de leucòcits i la mesura de la concentració d'hemoglobina de la mostra.

Per realitzar el recompte, ja sigui d'eritròcits, plaquetes o leucòcits el procediment és similar. Es força el pas de 100 µL de sang diluïda per un orifici de 100 µm de diàmetre, que comunica dos compartiments d'una cambra. Els elèctrodes situats a ambdós costats de l'orifici estan sotmesos a una diferència de potencial. En passar un element cel·lular per l'orifici es produeix una pertorbació en aquest camp elèctric, amb una intensitat que, segons el principi de Coulter (Shapiro, 1995), és proporcional al seu volum. El sistema distribueix les partícules comptades en funció del seu diàmetre i del volum que ocupen, permetent-ne calcular el nombre i el volum promig.

- *Procediment*

La sang destinada a la mesura de variables hematològiques s'ha extret amb xeringues tractades amb etilendiaminotetraacetat de potassi (EDTA-K), essent la concentració final 1,5–2 mg EDTA-K/mL de sang. Les mostres s'han agitat suaument per inversió repetida, per tal d'afavorir la barreja de l'anticoagulant amb la sang.

Les variables hematològiques analitzades han estat: recompte d'eritròcits i de leucòcits, hematòcrit, concentració d'hemoglobina i fórmula leucocítica. La determinació d'aquestes variables s'ha realitzat mitjançant un hemocitòmetre *Coulter Counter JT hemocytometer* (Coulter Corporation, Florida, EUA).

5.2. DETERMINACIÓ D'IMMUNOGLOBULINES A I G EN MUCOSA INTESTINAL I EN SÈRUM

La tècnica d'ELISA va ser descrita per primera vegada i de forma simultània pels investigadors Engvall i Perlman i van Weemen i Schuurs, l'any 1971. Aquesta tècnica es basa en l'especificitat de la unió antígen-anticòs. L'anticòs, està adsorbit sobre un suport sòlid. La detecció es realitza mitjançant un anticòs conjugat a un enzim i l'addició posterior del substrat específic per aquest enzim, el qual desenvoluparà color de forma proporcional a la quantitat d'antigen present a la mostra.

OBTENCIÓ DE LES MOSTRES

Les mostres de sang s'han obtingut per punció cardíaca. S'han mantingut a 20°C durant 2 h, per tal que es formés el coàgul. Seguidament, s'ha separat el sèrum centrifugant les

mostres de sang a 2600 g durant 20 min a 4°C. Les mostres de mucosa intestinal s'han obtingut tal com es descriu en l'apartat 2.1.1.

DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ D'IMMUNOGLOBULINES A I G

La modalitat d'ELISA que s'ha utilitzat és la de sandvitx. En aquesta, la mostra queda entre els dos anticossos, el de captura i el de detecció. L'anticòs de captura està adherit a una placa de poliestirè i a ell s'uneix la proteïna de la mostra. El de detecció va conjugat a un sistema de revelat i s'adhereix a l'antigen. Finalment, amb l'addició del substrat adequat per al sistema enzimàtic, es desenvolupa color en funció de la quantitat d'antigen a la mostra. Aquesta intensitat de color es quantifica amb un espectrofotòmetre.

- *Composició dels medis*

PBS–BSA: PBS suplementat amb 0,15 mmol/L d'albumina sèrica bovina (*BSA; Sigma, Missouri, EUA*). Preparació extemporània.

PBS–Tw: PBS suplementat amb 0,41 mmol/L de Tween® 20 (*Sigma, Missouri, EUA*).

PBS–Tw–BSA: PBS suplementat amb 0,41 mmol/L de Tween® 20 i 0,15 mmol/L BSA (*Sigma, Missouri, EUA*). Preparació extemporània.

Tampó fosfat citrat: Na₂HPO₄ 200 mmol/L, àcid cítric 100 mmol/L (pH 5,0).

Solució de revelat: orto–fenil–dianisidina 2,21 mmol/L (*Sigma, Missouri, EUA*), H₂O₂ 11,8 mmol/L (*Sigma, Missouri, EUA*), en tampó citrat. Preparació extemporània.

Solució d'aturada: H₂SO₄ 1,5 mol/L.

- *Procediment*

El primer pas consisteix en adherir 100 µL/pou de l'anticòs de captura al fons d'una placa de poliestirè de 96 pous. Els anticossos utilitzats són contra IgA i IgG de rata i les seves dilucions es mostren a la taula III–3. L'adsorció d'aquest anticòs a la placa s'ha realitzat a 20°C durant tota la nit, en cambra humida. Un cop ha finalitzat aquesta incubació, s'ha rentat la placa 3 vegades amb 250 µL/pou de PBS durant 3 min i s'ha procedit al bloqueig amb 200 µL/pou de PBS–BSA (albumina sèrica bovina) durant 1 h a temperatura ambient. L'albumina és una proteïna de baix pes molecular que bloqueja els llocs d'unió inespecífics de la fase sòlida. Aquesta proteïna competeix amb les molècules d'antigen presents en la mostra i així es minimitza la unió inespecífica dels antígens a la placa.

Finalitzat aquest bloqueig, la placa s'ha rentat i s'hi han afegit 100 µL/pou de les mostres i dels estàndards a la dilució adequada en PBS-Tw-BSA (Taula III-3). La incubació s'ha efectuat a temperatura ambient durant 3 h. Per detectar la quantitat d'IgA o d'IgG a la mostra i a l'estàndard s'ha emprat un anticòs de ratolí contra immunoglobulines de rata conjugat amb peroxidasa de rave (RT-39/RL-6, dilució 1:2000; *Sigma, Missouri, EUA*) sembrat a 100 µL/pou.

Taula III-3. Anticossos i mostres emprades en la determinació de les immunoglobulines A i G.

	IgA	IgG
Anticòs de captura (en PBS)	MARA-1, Labgen; 1,25 mg/L	STAR-71, Serotec; 0,25 mg/L
Mostra origen/dilució (en PBS-Tw-BSA)	Mucosa intestinal (SN-1); 1/50 Sèrum; 1/200	Sèrum; 1/10.000
Estàndard (en PBS-Tw-BSA)	IR22 Labgen; 0-800 µg/L	IgG rata Labgen; 0-800µg/L
Anticòs de detecció (en PBS-Tw-BSA)	RT-39/RL-6; 1/2000	

Labgen (Alemanya); Serotec (Regne Unit).

Seguidament, i després de realitzar un altre rentat, s'han afegit 200 µL/pou de la solució de revelat, que desenvolupa color de forma proporcional a la quantitat d'immunoglobulines presents a la mostra. El color s'ha deixat progressar durant 20 min i passat aquest temps s'ha aturat la reacció mitjançant l'addició de 50 µL/pou de la solució d'aturada. Finalment s'ha llegit la intensitat de color a 450 nm mitjançant un lector de plaques ELISA Microplate Reader (*Multiscan, Labsystems, Finlàndia*).

Una vegada s'han obtingut els valors de densitat òptica, tant dels estàndards com de les mostres, s'ha calculat la funció associada a l'estàndard i s'han interpolat els valors de les mostres. Els valors d'IgA a mucosa intestinal s'han normalitzat pel pes humit de la mucosa raspada.

6. AÏLLAMENT I MARCATGE DE POBLACIONS LIMFOCÍTIQUES

L'obtenció de cèl·lules limfocítiques i el seu posterior marcatge amb anticossos específics permet determinar el percentatge de les diferents subpoblacions en un òrgan determinat i per tant el seu perfil limfocític. En el procés d'aïllament hi intervenen processos de pressió mecànica i de digestió de teixit.

El percentatge de les diferents subpoblacions s'estableix en funció de l'expressió de diferents marcadors en la seva superfície, que s'anomenen clústers de diferenciació. Aquests marcadors són reconeguts per anticossos específics que estan conjugats a fluorocroms. Finalment, aquestes cèl·lules són comptabilitzades mitjançant un citòmetre de flux, que les diferencia en funció de la seva mida, rugositat i intensitat de fluorescència emesa.

6.1. AÏLLAMENT DE LIMFÒCITS DE GANGLIS LIMFÀTICS DEL MESENTERI

En el cas d'aïllament de limfòcits de ganglis no es necessari cap procés de purificació ni de separació cel·lular. En aquest teixit, la suspensió limfocítica s'obté per pressió mecànica. Aquesta suspensió s'ha de deixar reposar per tal que sedimentin les restes de teixit.

- *Composició dels medis*

RPMI-FCS: RPMI 1640 (*Innogenetics, Bèlgica*) suplementat amb 10% (v/v) de sèrum fetal boví (*FCS; Innogenetics, Bèlgica*). Preparació extemporàniament i en condicions d'esterilitat.

PBS-FCS-Az: PBS suplementat amb 2% (v/v) de sèrum fetal boví (*FCS; Innogenetics, Bèlgica*) i 7,7 mmol/L NaN_3 (*Az; Sigma, Missouri, EUA*).

- *Procediment*

S'ha sacrificat l'animal sota anestèsia i s'ha realitzat una laparotomia, per tal que quedés al descobert la zona abdominal. Amb molta cura s'han localitzat els ganglis limfàtics del mesenter, s'han extret i s'han dipositat en 1,5 mL de RPMI-FCS fred. Els ganglis han estat triturats mecànicament mitjançant un èmbol de xeringa sobre un colador d'acer col·locat sobre una placa de Petri de plàstic, en gel. En aquest punt ja s'eliminen els macròfags, ja que s'adhereixen al plàstic. Seguidament s'ha recollit la suspensió de limfòcits de la placa de Petri mitjançant una pipeta Pasteur de vidre i s'ha dipositat en un tub. La suspensió obtinguda s'ha deixat reposar durant 10 min en gel, per tal que les restes de teixit sedimentessin i s'ha traspasat el sobrenedant a un altre tub. La suspensió cel·lular s'ha

centrifugat a 600 g durant 10 min a 4°C i seguidament s'ha descartat el sobrenedant. Finalment, les cèl·lules s'han resuspès en 2 mL de medi PBS-FCS-Az i s'han mantingut a 4°C fins a realitzar el recompte cel·lular i posteriorment el marcatge fenotípic (vegeu apartats 6.4 i 6.5, respectivament).

6.2. AÏLLAMENT DE LIMFÒCITS DE PLAQUES DE PEYER

Per aïllar limfòcits de les plaques de Peyer, primer s'han de digerir una mica, per tal que aquest teixit altament organitzat esdevingui una estructura més laxa. Això s'aconsegueix incubant les plaques amb un medi amb ditiotreitòl (DTT). Aquest pas permet que els limfòcits puguin sortir amb més facilitat, amb la qual cosa s'en millora tant el rendiment com la viabilitat.

De les plaques de Peyer, a part de limfòcits també s'obtenen altres tipus cel·lulars, com ara cèl·lules epitelials. Per tal d'enriquir la suspensió de limfòcits es realitza una purificació mitjançant un gradient de Percoll™.

- *Composició dels medis*

RPMI-FCS: RPMI 1640 (*Innogenetics, Bèlgica*) suplementat amb 10% (v/v) de sèrum fetal boví (*FCS, Innogenetics, Bèlgica*). Preparació extemporània i en condicions d'esterilitat.

RPMI-FCS-DTT: RPMI 1640 (*Innogenetics, Bèlgica*) suplementat amb 10% (v/v) de sèrum fetal boví (*FCS; Innogenetics, Bèlgica*) i 1 mmol/L de ditiotreitòl (*DTT; Sigma, Missouri, EUA*)

PBS-FCS-Az: PBS suplementat amb 2% (v/v) de sèrum fetal boví (*FCS; Innogenetics, Bèlgica*) i 7,7 mmol/L NaN₃ (*Az; Sigma, Missouri, EUA*).

Percoll 90%: 9 mL Percoll™ (*Amersham Biosciences, Regne Unit*) amb 1 mL PBS (10x)

Percoll 44%: 3,9 mL Percoll 90% amb 4,1 mL medi RPMI

Percoll 67,5%: 3,75 mL Percoll 90% amb 1,25 mL medi RPMI

- *Procediment*

Després d'haver sacrificat l'animal i haver separat els ganglis mesentèrics, s'ha extret tot l'intestí prim, descartant el duodè, i s'ha rentat amb PBS fred. S'ha dipositat l'intestí sobre una placa de Petri amb RPMI-FCS fred, s'ha eliminat el teixit greixós i s'ha obert

longitudinalment seguint el mesenteri. Després de l'eliminació del mucus mitjançant una gasa amarada amb medi RPMI-FCS, s'han localitzat i retallat totes les plaques de Peyer.

A continuació s'han incubat en 5 mL de medi RPMI-FCS-DTT durant 5 min a 37°C. El DTT digereix suaument el teixit, permetent llavors que els limfòcits puguin sortir amb més facilitat. Seguidament, s'ha procedit a una disgregació mecànica del teixit igual que en l'apartat anterior i s'ha recollit la suspensió cel·lular. Aquesta suspensió s'ha centrifugat a 600 g durant 10 min a 4°C, s'ha descartat el sobrenedant i les cèl·lules s'han resuspès amb 8 mL de Percoll 44%, que s'ha dipositat amb molta cura en un tub de vidre que contenia 5 mL de Percoll 67,5%. S'ha centrifugat a 600 g durant 30 min a temperatura ambient, s'ha recollit l'anell de limfòcits de la interfase i s'han portat a 11 mL amb PBS-FCS-Az. S'ha tornat a centrifugar a 600 g durant 10 min a 4°C i s'ha descartat el sobrenedant. Finalment, les cèl·lules s'han resuspès en 500 µL de medi PBS-FCS-Az i s'han mantingut a 4°C fins a realitzar el recompte cel·lular i posteriorment el marcatge fenotípic (vegeu apartats 6.4 i 6.5, respectivament).

6.3. AÏLLAMENT DE LIMFÒCITS DE MELSA

En l'aïllament de limfòcits de melsa, el procés de l'extracció de limfòcits és similar al dels ganglis. En aquest teixit, però, s'ha de realitzar un gradient amb Ficoll® per tal de separar el gran nombre d'eritròcits presents en aquest òrgan.

- *Composició dels medis*

RPMI-FCS: RPMI 1640 (*Innogenetics, Bèlgica*) suplementat amb 10% (v/v) de sèrum fetal boví (*FCS, Innogenetics, Bèlgica*). Preparació extemporània i en condicions d'esterilitat.

PBS-FCS-Az: PBS suplementat amb 2% (v/v) de sèrum fetal boví (*FCS; Innogenetics, Bèlgica*) i 7,7 mmol/L NaN₃ (*Az; Sigma, Missouri, EUA*).

- *Procediment*

S'ha extret la melsa i s'ha col·locat en un tub amb 25 mL de medi RPMI-FCS fred. A continuació s'ha procedit a tallar-la a trossos petits sobre un colador d'acer i s'ha triturat mecànicament igual que en els apartats anteriors. El teixit triturat s'ha anat rentant amb el medi RPMI-FCS. Un cop s'ha recollit tota la suspensió cel·lular, s'ha deixat reposar durant 10 min en gel, per tal que les restes de teixit sedimentin i el sobrenedant s'ha traspasat a un altre tub. Aquesta suspensió cel·lular s'ha centrifugat a 600 g durant 10 min a 4°C i seguidament s'ha descartat el sobrenedant. Les cèl·lules s'han resuspès amb 6 mL de

RPMI-FCS i s'han afegit damunt de 3 mL de *Nycoprep™* (Axis-Shield PoC AS, Noruega); aquest pas s'ha de realitzar amb molta cura per tal de no desfer la interfase. S'ha centrifugat a 600 g durant 30 min a temperatura ambient, s'han recollit els limfòcits que hi ha a l'interfase i s'han portat fins a 11 mL amb medi RPMI-FCS. S'han tornat a centrifugar a 600 g durant 10 min a 4°C i s'ha descartat el sobrenedant. Finalment, les cèl·lules s'han resuspès en 4 mL de medi PBS-FCS-Az i s'han mantingut a 4°C fins a realitzar el recompte cel·lular i posteriorment el marcatge fenotípic (vegeu apartats 6.4 i 6.5, respectivament).

6.4. RECOMPTE I VIABILITAT DE LA SUSPENSÍO CEL·LULAR

La viabilitat ens aporta informació sobre la idoneïtat del procés seguit per a l'aïllament dels limfòcits. Per discriminar les cèl·lules vives de les mortes s'utilitzen dues substàncies fluorescentes, taronja d'acridina (AO) i bromur d'etidi (EBr).

Las cèl·lules vives són capaces d'incorporar el colorant AO a través d'un mecanisme de transport actiu, en canvi, les cèl·lules mortes capten EBr per difusió passiva.

- *Composició dels medis*

Colorant vital: Taronja d'acridina 3,31 $\mu\text{mol/L}$ (AO; Merck, Alemanya) i bromur d'etidi 50,72 $\mu\text{mol/L}$ (EBr; Sigma, Missouri, EUA) en PBS.

- *Procediment*

El procediment consisteix en combinar la suspensió cel·lular a la dilució adequada (1:2 pels limfòcits de plaques de Peyer i 1:4 pels limfòcits de ganglis mesentèrics i de melsa), amb el colorant vital, en una relació 1:1. El recompte s'ha realitzat mitjançant una cambra de recompte estandarditzada (Fast Read® 10; Sarstedt, Alemanya). Aquesta cambra es comercialitza amb el cubreobjectes fix i així s'evita l'efecte de variació de volum a causa de diferències en l'alçada entre el cubreobjectes i el portaobjectes. Les cèl·lules s'han observat al microscopi de fluorescència sota llum ultraviolada, i es veuen les cèl·lules vives tenyides de color verd i les cèl·lules no viables de color taronja.

La **viabilitat** cel·lular s'expressa com el nombre de cèl·lules vives respecte al total de cèl·lules comptades. En tots els casos s'han obtingut valors de viabilitat entre 80 i 95%. A més, s'ha realitzat el **recompte cel·lular**, que s'expressa com a nombre de cèl·lules limfocítiques vives per μL . La fórmula utilitzada és la següent:

$$\text{n}^\circ \text{ cèl} \cdot \text{lules} / \mu\text{L} \text{ suspensió} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de cèl} \cdot \text{lules} \text{ vives} \times \text{dilució}}{\text{n}^\circ \text{ de quadres comptats}} \times 160$$

a on : 160 és el nombre de quadres que ocupa 1 μL de suspensió

6.5. MARCATGE FENOTÍPIC DE LIMFÒCITS PER IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Una vegada s'han obtingut les suspensions cel·lulars es procedeix a realitzar el marcatge. El marcatge de limfòcits per immunofluorescència es basa en la capacitat que tenen els anticossos monoclonals per unir-se específicament a un determinat antigen, en aquest cas, de membrana. Gràcies als diferents marcadors de superfície cel·lular, és a dir als clústers de diferenciació (CD), és possible discriminar les diferents subpoblacions limfocítiques d'una suspensió cel·lular.

En aquest estudi s'han aplicat dobles marcatges per poder identificar 2 antígens de membrana (marcadors de superfície) en la mateixa cèl·lula. El doble marcatge comprèn un marcatge directe en que l'anticòs contra l'antigen està conjugat a un fluorocrom i un marcatge simple indirecte, en que s'utilitzen dos anticossos; l'anticòs primari, contra l'antigen a detectar i l'anticòs secundari conjugat a un altre fluorocrom. En la figura III-3 es mostra un esquema d'aquest tipus de marcatge.

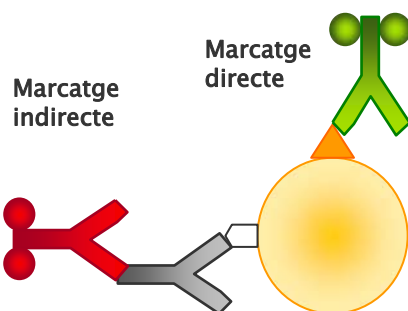


Figura III-3. Esquema d'un doble marcatge. En el nostre cas l'anticòs secundari del marcatge indirecte està conjugat al fluorocrom ficoeritrina (PE) i l'anticòs primari, corresponent al marcatge directe, està conjugat a l'isotiacionat de fluoresceïna (FITC).

A causa de la presència del marcatge simple indirecte, resulta indispensable realitzar un control negatiu per a cada suspensió cel·lular. En aquest control, les cèl·lules s'han incubat amb un anticòs primari control d'isotip (no reconeix antigen de rata) i com a

secundari el mateix que en la resta de marcatges. Abans de dur a terme els marcatges, s'ha realitzat una titulació de tots els anticossos, per tal d'establir la dilució adequada per a obtenir un marcatge òptim. Si no hi ha prou anticòs el marcatge seria insuficient, és a dir no es marcarien totes les molècules que hi ha a la mostra. Si hi ha massa anticòs el marcatge pot resultar inespecífic.

- *Composició dels medis*

PBS-FCS-Az: PBS suplementat amb 2% (v/v) de sèrum fetal boví (FCS; *Innogenetics, Bèlgica*) i 7,7 mmol/L NaN₃ (Az; *Sigma, Missouri, EUA*).

Paraformaldehid: NaCl 154 mmol/L, paraformaldehid 160 mmol/L.

- *Procediment*

S'han posat 3x10⁵ cèl·lules de les suspensions obtingudes en els apartats anteriors, en tubs de polipropilè de 5 mL. A continuació, s'ha afegit la quantitat necessària de PBS-FCS-Az per a un volum final de 100 µL. Seguidament, s'han incubat amb els anticossos primaris corresponents al marcatge indirecte durant 20 min a 4°C. Els anticossos primaris utilitzats, així com les respectives dilucions es mostren a la taula III-4. Un cop finalitzat el temps d'incubació, les cèl·lules s'han rentat amb PBS-FCS-Az, és a dir s'ha afegit 1 mL de PBS-FCS-Az i s'ha centrifugat a 600 g durant 5 min a 4°C, descartant posteriorment el sobrenedant.

Taula III-4. Anticossos emprats en el marcatge indirecte de les poblacions limfocitàries.

Clon	Font	Especificitat	Dilució	Població
OX-33	<i>Pharmlingen</i>	CD45RA	1 / 1000	Limfòcits B
R73	<i>Pharmlingen</i>	αβ-TCR	1 / 500	Limfòcits T αβ
NDS61	<i>Labgen</i>	IL-2 R	1 / 1000	Limfòcits T activats
V65	<i>Pharmlingen</i>	γδ-TCR	1 / 1000	Limfòcits T γδ
10/78	<i>Pharmlingen</i>	NKR-P1A	1 / 500	Cèl·lules Natural Killers

Anticossos primaris sense conjuguar. *Pharmlingen* (*Beckton Dickinson, New Jersey, EUA*); *Labgen* (*Alemanya*).

A continuació, les cèl·lules s'han incubat amb l'anticòs secundari, específic contra immunoglobulines de ratolí i conjugat amb ficoeritrina (PE) (*Sigma, Missouri, EUA*), durant

20 min a 4°C en foscor. Aquest anticòs s'ha utilitzat a una dilució 1/250 en PBS-FCS-Az i s'ha bloquejat amb un 5% (v/v) de sèrum de rata, per tal d'evitar una possible reacció creuada amb immunoglobulines de rata.

Després de realitzar un altre rentat, s'ha realitzat un bloqueig d'aquest anticòs secundari amb 25 µL d'immunoglobulines de ratolí a 10 mg/L (*Sigma, Missouri, EUA*), durant 15 min a 4°C en foscor. La funció d'aquestes immunoglobulines de ratolí és bloquejar les regions lliures de l'anticòs secundari del marcatge indirecte, a les que es podria unir l'anticòs del marcatge simple directe.

Un cop finalitzat el temps d'incubació, els limfòcits han estat rentats i incubats amb el corresponent anticòs primari conjugat amb isotiocianat de fluoresceïna (FITC) durant 20 min a 4°C en foscor. Les dilucions emprades es mostren a la taula III-5. Finalment, les mostres s'han rentat i s'han fixat amb 500 µL de la solució de paraformaldehid. Les cèl·lules un cop marcades i fixades es guarden a 4°C fins al moment de ser comptabilitzades.

Taula III-5. Anticossos emprats en el marcatge directe de les poblacions limfocitàries.

Clon	Font	Especificitat	Dilució	Població
G4.18	<i>Pharmingen</i>	CD3	1/1000	Limfòcits T
W3/25	<i>Labgen</i>	CD4	1/500	Limfòcits T col·laboradors
OX8	<i>Labgen</i>	CD8α	1/500	Limfòcits T supressors/citotòxics

Anticossos primaris conjugats a isotiocianat de fluoresceïna (FITC). *Pharmingen (Beckton Dickinson, New Jersey, EUA)*; *Labgen (Alemanya)*.

6.6. ANÀLISI DE LES POBLACIONS LIMFOCÍTIQUES

Les suspensions de limfòcits marcats amb anticossos monoclonals s'han processat en un citòmetre de flux (*Epics Elite, Coulter Corporation, Florida, EUA*) de la Unitat de Citometria de Flux i Microscòpia Confocal dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

Aquest aparell permet diferenciar les cèl·lules en funció de la seva mida i de la seva rugositat, així com en funció de la fluorescència emesa, en el cas de que es tractin de partícules marcades amb fluorocroms.

En referència al funcionament, la suspensió cel·lular marcada s'introdueix en una cambra de flux amb un volum molt més gran de solució salina, amb la finalitat de crear un corrent capil·lar de líquid que disposi a les cèl·lules separades entre sí. Quan una cèl·lula passa a través d'un feix de làser, fa que es dispersi la llum; si hi ha molècules de fluorocrom unides a la cèl·lula, aquestes seran excitades i emetran fluorescència.

A continuació, els tubs fotomultiplicadors detecten les propietats òptiques, tant de la llum dispersada (que proporciona informació sobre la mida i la rugositat de cada cèl·lula) com de l'emissió de fluorescència (que aporta informació de la unió dels anticossos marcats i, per tant, de l'expressió de proteïnes en la superfície de cada cèl·lula).

CONFIGURACIÓ DEL CITÒMETRE DE FLUX

Per poder realitzar una anàlisi reproducible i fiable, és necessari posar a punt la configuració de l'equip per tal d'adaptar-lo a la nostra mostra.

L'excitació s'ha realitzat amb un làser d'ió argó, d'una longitud d'ona de 488 nm, a 15 mW de potencia.

Els paràmetres adquirits han estat els següents:

FSC (forward scatter): representa la dispersió frontal, la quantitat de llum desviada en la mateixa direcció que el feix de llum incident. Aquest paràmetre aporta informació sobre la mida de la cèl·lula.

SSC (side scatter): representa la dispersió lateral, la quantitat de llum desviada 90° respecte la direcció del feix de llum incident. Aquest paràmetre discrimina en funció de les característiques morfològiques de la cèl·lula, com la rugositat o el nombre d'òrgànuls.

Fluorescència: la fluorescència verda (FITC) es mesura amb un filtre dicròic de 550 nm i un filtre de pas de banda de 525 nm. En canvi, la fluorescència taronja (PE) es mesura amb un filtre dicròic de 625 nm i un filtre de pas de banda de 575 nm. Aquest paràmetre aporta informació sobre la quantitat d'anticòs que està unit a la membrana de cada cèl·lula, per tant, el percentatge de cèl·lules que expressen cada marcador.

El citograma FSC/SSC, és a dir, la dispersió frontal respecte la dispersió en angle recte, proporciona una gràfica que conté tots els elements presents en la mostra (Figura III-4 A). La finestra d'adquisició s'estableix en funció de la mida i la rugositat de les cèl·lules i delimita la població a estudiar, en aquest cas la població limfocitària. A part, també

apareixen partícules que no són del nostre interès (eritròcits, monòcits, cèl·lules mortes...).

Les cèl·lules ubicades dins de la finestra d'adquisició són representades mitjançant un citograma biparamètric de dispersió, en el qual la fluorescència de cada cèl·lula per l'anticòs marcat amb el primer fluorocrom es confronta amb el marcatge del segon (Figura III-4 B).

Així, en aquest cas, en el primer quadrant (1) s'hi troben les cèl·lules positives per al fluorocrom PE, en el segon (2) les cèl·lules doblement positives, és a dir positives per als dos fluorocroms, en el tercer (3) les cèl·lules doblement negatives i en el quart (4) les cèl·lules positives per al fluorocrom FITC. Els resultats obtinguts s'han tractat amb el programa *Coulter System II™* (*Epics Elite, Coulter Corporation, Florida, EUA*).

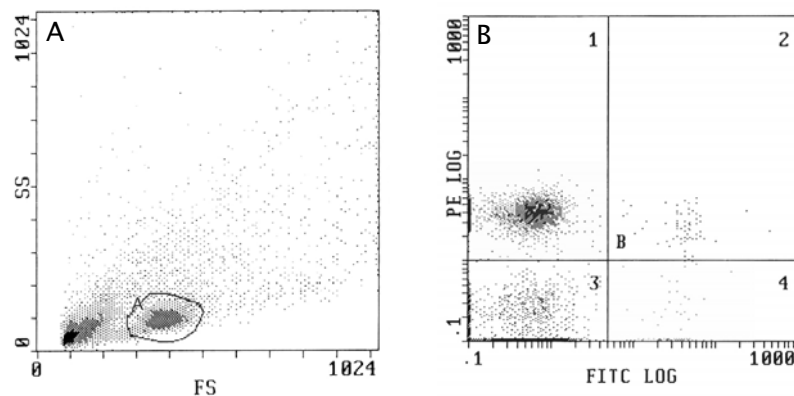


Figura III-4. Citograma d'una suspensió cel·lular. A) Finestra d'adquisició. Aquesta finestra es defineix en funció de la mida de les cèl·lules i de la seva rugositat. B) Citograma biparamètric. En aquest diagrama es representa cada cèl·lula en funció de la intensitat de fluorescència per a cada fluorocrom.

7. OBTENCIÓ DE VESÍCULES DE LA MEMBRANA APICAL DELS ENTERÒCITS

El protocol d'aïllament de vesícules de la membrana apical dels enteròcits s'ha basat en els procediments descrits per Vázquez *et al.* (1997). El fonament d'aquesta tècnica es basa en la disgregació mecànica i química del teixit, la precipitació d'agregats cel·lulars amb $MgCl_2$ i diverses centrifugacions de forma que finalment s'obté una suspensió de

membranes apicals d'enteròcits. Aquesta suspensió es fa passar per una agulla de calibre petit, ja que això afavoreix la formació de les vesícules.

Un cop s'han obtingut les vesícules, s'ha realitzat una prova per quantificar la seva concentració de proteïnes, que s'utilitza com a factor de normalització, així com també la valoració de la seva puresa mitjançant la determinació de l'activitat sacarasa.

7.1. AÏLLAMENT DE VESÍCULES DE MEMBRANA APICAL

Aquestes vesícules presenten els transportadors i proteïnes de membrana que presentaven els enteròcits en el moment d'obtenir la mostra.

- *Composició dels medis*

Sèrum amb inhibidors: NaCl 154 mmol/L, NaN₃ 3 mmol/L, PMSF 0,2 mmol/L, Benzamidina 0,2 mmol/L.

Tampó 1: Mannitol 100 mmol/L, Hepes 2 mmol/L. Ajustar a pH 7,1 amb Tris 2 mol/L.

Tampó 2: Mannitol 10 mmol/L, Hepes 2 mmol/L, MgSO₄ 0,1 mmol/L. Ajustar a pH 7,4 amb Tris 2 mol/L.

Tampó 3: Mannitol 300 mmol/L, Hepes 20 mmol/L, MgSO₄ 0,1 mmol/L, LiN₃ 0,41 µmol/L. Ajustar a pH 7,5 amb Tris 2 mol/L.

- *Procediment*

Un cop s'ha extret l'intestí, s'ha netejat fent passar sèrum amb inhibidors mitjançant una xeringa sense agulla. Una vegada net, s'ha obert longitudinalment i s'ha obtingut la mucosa per raspat. A continuació, s'ha pesat i s'ha començat immediatament el procés d'aïllament de membrana apical.

La mucosa raspada s'ha abocat dins d'un homogeneïtzador *Waring Blendor® (Waring Instruments®, Connecticut, EUA)*, juntament amb 40 mL de Tampó 1 i s'ha sotmès a una trituració a alta velocitat durant 3 min. Així s'ha esmicolat la mucosa i s'ha obtingut una suspensió homogènia de fragments cel·lulars, la qual s'ha filtrat a través d'una malla de niló de 40 deniers per eliminar-ne els fragments més grossos. La suspensió s'ha enrasat amb Tampó 1 fins a 150 mL. La suspensió així obtinguda és el que s'anomena homogenat (H).

El següent pas ha estat afegir $MgCl_2$ a l'homogenat en una quantitat adequada per obtenir una concentració final de 10 mmol/L i s'ha mantingut en agitació suau durant 20 min. Aquesta sal magnèsica provoca la precipitació d'agregats cel·lulars. A continuació, s'ha portat a terme diverses centrifugacions, sempre a 4°C (*Centrikon H-401®*, *Kontron Instruments, Itàlia*), per tal d'aconseguir la purificació de les membranes apicals i l'eliminació d'altres orgànuls i membranes que podrien interferir en els posteriors estudis de transport.

La primera centrifugació s'ha realitzat a 4300 g durant 20 min, s'ha descartat el sediment (S-1), s'ha recollit el sobrenedant (SN-1) i aquest s'ha tornat a centrifugar durant 35 min a 43600 g. Després d'aquesta segona centrifugació s'ha descartat el sobrenedant (SN-2) i s'ha resuspès el sediment (S-2) amb 40 mL de Tampó 2. Aquesta suspensió s'ha homogeneïtzat manualment 40 vegades mitjançant un homogeneïtzador de vidre i tefló i seguidament s'ha realitzat una centrifugació a 43600 g durant 25 min. El sobrenedant (SN-3) obtingut s'ha descartat i el sediment (S-3), que correspon a les membranes apicals, s'ha resuspès acuradament amb 200–300 µL de Tampó 3 mitjançant una xeringa amb una agulla de calibre 25 G (0,5 x 16 mm). Finalment, la suspensió s'ha fet passar 5 vegades per una xeringa amb una agulla de calibre 26 G (0,33 x 13 mm). És en aquestes últimes passes quan, en fer passar les membranes apicals purificades per un agulla de diàmetre molt petit s'afavoreix la seva completa vesiculació. La suspensió de vesícules (V) ha estat emmagatzemada dins de *pallettes* de 200 µL de capacitat i immediatament dipositada dins d'un tanc de nitrogen líquid fins al moment de la seva utilització.

7.2. DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES

La determinació de la concentració de proteïnes de l'homogenat (H) i de les vesícules (V) dels aïllaments permet referir els resultats obtinguts en els experiments de transport a una variable comuna a tots els experiments.

S'ha emprat la tècnica colorimètrica descrita per Bradford (1976) i el colorant Bio-Rad® (*Bio-Rad Laboratories, Alemanya*). Aquest reactiu conté el colorant *Coomassie Brilliant Blue G-250*, el qual es combina ràpidament amb les proteïnes quan es troben en medi àcid i forma un complex de color blau molt estable i d'elevat coeficient d'extinció que confereix una alta sensibilitat al mètode.

- *Procediment*

En primer lloc s'ha preparat el colorant. El Bio-Rad® pur s'ha diluït en aigua destil·lada en una proporció 1:5 i a continuació, s'ha filtrat a través d'un filtre *Whatman®* del número 1 (*Whatman International, Regne Unit*).

seguidament, 50 µL de les mostres diluïdes (H, 1/50 i V, 1/100) s'han incubat durant 15 min juntament amb 50 µL d'àcid fòrmic i 1,5 mL del colorant Bio-Rad® diluït. Al mateix temps, s'han preparat 4 patrons de concentració 75, 150, 300 i 500 µg/mL d'albumina sèrica bovina, als quals se'ls ha aplicat un tractament idèntic al de les mostres. Aquestes solucions han servit per elaborar una recta patró. L'absorbància dels patrons i de les mostres s'ha llegit a una longitud d'ona de 495 nm en un espectrofotòmetre de doble feix *UV-160 A®* (*Shimadzu Corporation, Japó*).

7.3. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT SACARASA

L'activitat específica de la sacarasa intestinal s'ha analitzat segons la tècnica descrita per Messer i Dahlqvist (1966).

Aquest mètode es basa en incubar la mostra problema amb el substrat sacarosa, de forma que l'enzim present en la mostra hidrolitza el substrat i s'obté D-glucosa. Aquesta és aleshores oxidada per la glucosa oxidasa, formant-se àcid glucònic i peròxid d'hidrogen. Aquest últim reacciona amb la 4-aminoantipirina i s'obté un complex colorejat, l'absorbància del qual és directament proporcional a la concentració de D-glucosa obtinguda al principi i per tant, a l'activitat sacarasa.

- *Composició dels medis*

Tampó fosfat: KH_2PO_4 50 mmol/L, K_2HPO_4 50 mmol/L.

Glucostat: Tris/HCl (pH 7,3) 500 mmol/L, Àcid para-hidroxibenzoic 10 mmol/L, 4-aminoantipirina 0,4 mmol/L, Glucosa oxidasa 1480 UI/L, Peroxidasa 252 UI/L. La 4-aminoantipirina, la glucosa oxidasa i la peroxidasa s'han d'afegir extemporàniament a la solució.

- *Procediment*

En primer lloc s'han preparat les solucions estàndard de D-glucosa a les concentracions de 0,1, 0,2, 0,4 i 0,8 mmol/L a partir d'una solució mare a 2 mmol/L de glucosa. Les mostres

problema s'han diluït a 1/5 en el cas de l'homogenat (H) i a 1/100 en el cas de la suspensió de vesícules (V).

A continuació, 50 µL de la solució estàndard o de la mostra (prèviament diluïda) s'han incubat amb 150 µL de tampó fosfat i 50 µL de sacarosa 0,1 mol/L, durant exactament 30 min a 37°C. Passat aquest temps, s'ha afegit 1 mL de Glucostat i s'ha incubat durant 2 h a la mateixa temperatura. Finalment, s'ha llegit l'absorbància a 505 nm en un espectrofotòmetre de doble feix *UV-160 A® (Shimadzu Corporation, Japó)*.

7.4. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT ATPasa

L'activitat Na⁺/K⁺ ATPasa present a la membrana basolateral dels enteròcits s'ha determinat segons la tècnica descrita per Colas i Maroux (1980).

Aquesta tècnica es basa en l'activitat fosfatasa que presenta la Na⁺/K⁺ ATPasa en presència de K⁺ i en què és inhibible amb ouabaïna. La inhibició amb ouabaïna és una característica que la diferencia de les altres fosfatases presents a la membrana basolateral. Així doncs, la tècnica consisteix en fer reaccionar les fosfatases presents a la mostra amb para-nitrofenilfosfat (p-NFF) que es converteix en para-nitrofenol (p-NF) i s'obté un compost amb color. Aquesta reacció es realitza en paral·lel en absència i en presència d'ouabaïna, de forma que en el primer cas s'obté l'activitat total de totes les fosfatases, mentre que en el segon cas s'obté l'activitat de totes les fosfatases menys de la Na⁺/K⁺ l'ATPasa. Per tant, la diferència de p-NF produït (diferència d'absorbàncies) entre les mostres incubades amb i sense ouabaïna, indica l'activitat de la Na⁺/K⁺ ATPasa de les mostres.

- *Composició dels medis*

Tampó sense ouabaïna: Tris/HCl (pH 7,6) 50 mmol/L, MgSO₄ 10 mmol/L, EDTA 5 mmol/L, KCl 90 mmol/L.

Tampó amb ouabaïna: ouabaïna 0,7 mmol/L en tampó sense ouabaïna.

Solució de substrat sense ouabaïna: p-NFF 12 mmol/L en tampó sense ouabaïna.

Solució de substrat amb ouabaïna: p-NFF 12 mmol/L en tampó amb ouabaïna.

Les solucions que contenen ouabaïna i les que contenen p-NFF s'han d'elaborar de forma extemporània; les solucions que contenen p-NFF s'han de protegir de la llum.

- *Procediment*

En primer lloc s'han preparat les solucions estàndard de p-NF a les concentracions de 0,1, 0,25, 0,5, 0,8 i 1 mmol/L a partir d'una solució mare 10 mmol/L de p-NF. Cada mostra problema s'ha diluït en aigua destil·lada en la proporció adequada per obtenir una concentració final d'1 mg de proteïna/mL. A continuació s'han preincubat 500 µl de solució estàndard o de mostra en 500 µL de tampó sense ouabaïna o de tampó amb ouabaïna durant 30 min a 37°C. Una vegada transcorregut aquest temps s'ha iniciat la reacció afegint-hi 500 µL de solució de substrat sense ouabaïna o amb ouabaïna, segons correspongués. Exactament 30 min després, s'ha aturat la reacció afegint-hi 300 µL d'àcid tricloroacètic al 20% i totes les mostres s'han centrifugat a 13000 g durant 5 min. Finalment, s'han afegit 1,25 mL del sobrenedant a una macrocubeta que contenia 2 mL de Tris 1 mol/L. El color resultant s'ha llegit a 420 nm en un espectrofotòmetre de doble feix UV-160 A® (Shimadzu Corporation, Japó).

8. EXPERIMENTS DE TRANSPORT *in vitro*

Els experiments de transport amb vesícules de membrana apical s'han realitzat mitjançant el mètode de filtració ràpida descrit per Hopfer *et al.* (1973) i modificat posteriorment al nostre laboratori tal com es descriu a Garriga *et al.* (1999). Aquesta tècnica ens permet determinar les constants cinètiques d'un determinat transportador.

8.1. CINÈTICA DEL TRANSPORT DE LA D-GLUCOSA

Aquesta tècnica consisteix en incubar les vesícules en un medi que conté concentracions creixents del substrat del qual volem estudiar-ne el transport. Aquesta incubació es realitza durant un període de temps molt curt en el qual sabem que la seva entrada a l'interior de les vesícules es produeix de forma lineal.

Una alíquota d'aquest substrat es troba marcada radioactivament i durant la incubació és transportat a l'interior vesicular. Una vegada les vesícules són filtrades i s'elimina el substrat restant en el medi d'incubació, es pot quantificar la radioactivitat acumulada en el seu interior. Això permet calcular el flux d'entrada del substrat a la vesícula.

- *Composició dels medis*

Medi d'incubació: NaCl 100 mmol/L, mannitol 100 mmol/L, Hepes/Tris (pH 7,4) 20 mmol/L, MgSO₄ 0,1 mmol/L, LiN₃ 0,41 µmol/L, D-[¹⁴C]glucosa 0,01 mmol/L, D-glucosa q.s.p. 0,010/ 0,050/ 0,075/ 1/ 10/ 50/ 75 mmol/L.

L'osmolaritat final de tots els medis era de 320 mOsm/kg i ha estat mesurada per descens del punt crioscòpic, amb un osmòmetre crioscòpic *OSMOMAT 030* (*Gonotec, Alemanya*). En el cas de contenir concentracions de substrat superiors a 50 mmol/L, la concentració de manitol s'ha ajustat per tal de mantenir aquesta osmolaritat.

Solució d'aturada: Mannitol 300 mmol/L, Hepes/Tris (pH 7,4) 20 mmol/L, MgSO₄ 0,1 mmol/L, LiN₃ 0,41 μmol/L.

- *Procediment*

Tots els experiments s'han realitzat a una temperatura de 20–22°C immediatament després de descongelar les vesícules obtingudes en l'apartat 7.1..

La captació de substrat s'ha iniciat en barrejar 10 μL de la suspensió vesicular amb 40 μL del medi d'incubació adequat a cada experiment. Els fluxos inicials d'entrada s'han determinat als 5 s, dins del marge de linealitat de la captació de substrat (experiments preliminars). Transcorregut aquest temps, la captació de substrat s'ha aturat afegint 1 mL de solució d'aturada. Acte seguit s'han pres 900 μL de la solució resultant i s'han filtrat a través d'un filtre *White GSWP®* (*Millipore, Massachusetts, EUA*) de 25 mm de diàmetre i 0,22 μm de diàmetre de porus, sota condicions de pressió negativa, que ha estat generada per una bomba de buit *S4/30®* (*Telstar, Espanya*). A continuació, el filtre s'ha rentat dues vegades amb 10 mL de solució d'aturada, s'ha dissolt en 4 mL de líquid de centelleig *Filtron X®* (*National Diagnostics, Georgia, EUA*) i se n'ha quantificat la radioactivitat mitjançant un comptador *Tri-Carb 2100 TR®* (*Packard®, Australia*).

Per quantificar la radioactivitat que ha pogut quedar retinguda de forma inespecífica als filtres s'han realitzat els blancs. En aquests, s'ha afegit 1 mL de solució d'aturada directament sobre 40 μL de medi d'incubació, en absència de vesícules, i s'ha prosseguit de manera idèntica a les altres mostres.

Finalment, i per tal de quantificar la radioactivitat total que contenen els medis d'incubació, s'ha realitzat un estàndard de cadascuna de les solucions preparades i s'han dipositat 10 μL de medi directament en els 4 mL de líquid de centelleig.

Els resultats obtinguts es processen amb el programa d'ajust matemàtic *Biosoft Enzfitter®* (*Leatherbarrow, 1987*) el qual ens permet calcular les constants cinètiques V_{max} (velocitat màxima de transport), K_m (constant de Michaelis–Menten del transportador), K_d (constant de difusió del substrat). Aquestes constants s'ajusten a l'equació matemàtica representativa del transport actiu (Michaelis–Menten) i de la difusió simple d'un substrat:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} + K_d \cdot [S]$$

a on: [S] representa la concentració de substrat.

8.2. ESTUDIS D'INHIBICIÓ DEL TRANSPORT DE D-GLUCOSA AMB GLUCOSAMINA I CITOCALASINA B

Per tal de veure si el transport de D-glucosa a través de la membrana apical estava influït per transportadors del tipus GLUT, s'ha realitzat una prova amb inhibidors específics d'aquests transportadors.

La glucosamina és un inhibidor del pas de D-glucosa a través del transportador GLUT2, degut a que la seva constant d'afinitat és molt més elevada que la de la D-glucosa. Aquest fet juntament amb que la incubació es realitza amb concentracions saturants d'aquest inhibidor, ens permet utilitzar-lo com a inhibidor competitiu del transport de D-glucosa a través del GLUT2.

La citocalasina B també és un inhibidor del pas de D-glucosa a través dels transportadors del tipus GLUT, ja que s'hi uneix específicament en presència d'aquest monosacàrid.

- *Composició dels medis*

Medi d'incubació: NaCl 100 mmol/L, Hepes/Tris (pH 7,4) 20 mmol/L, MgSO₄ 0,1 mmol/L, LiN₃ 0,41 μmol/L, D-[¹⁴C]glucosa 0,01 mmol/L, D-glucosa q.s.p. 0,1 ó 25 mmol/L, Citocalasina B 0,1 mM o bé Glucosamina 10 mM, mannitol q.s.p. 320 mOsmol/kg.

Solució d'aturada: Mannitol 300 mmol/L, Hepes/Tris (pH 7,4) 20 mmol/L, MgSO₄ 0,1 mmol/L, LiN₃ 0,41 μmol/L.

- *Procediment*

El procediment seguit és anàleg al descrit en l'apartat anterior. En aquest cas les concentracions de D-glucosa emprades han estat solament dues: una de baixa (0,1 mmol/L) i una d'alta (254 mmol/L). Les vesícules han estat incubades en absència dels inhibidors per tal d'obtenir els fluxos basals de transport de D-glucosa. Seguidament s'han realitzat les incubacions en presència dels inhibidors, per tal d'observar si s'han reduït els fluxos de transport.

8.3. UNIÓ DE FLORRIZINA

La florrizina és un glucòsid que inhibeix competitivament els transportadors del tipus SGLT, ja que s'hi uneix de manera específica en presència de Na⁺ (Alvarado i Crane, 1962). Aquests experiments, realitzats segons la tècnica de Peerce i Clarke (1990), consisteixen en incubar les vesícules amb florrizina marcada radioactivament per tal d'estudiar-ne la unió específica als transportadors SGLT. La informació obtinguda ens permet estudiar l'abundància d'aquests transportadors a la membrana dels enteròcits.

- *Composició dels medis*

Medi d'incubació: NaCl o KCl 100 mmol/L, mannitol 100 mmol/L, Hepes/Tris (pH 7,4) 20 mmol/L, MgSO₄ 0,1 mmol/L, LiN₃ 0,41 μmol/L, [³H]florrizina 0,1 μmol/L, florrizina q.s.p. 50 μmol/L.

- *Procediment*

El procediment que s'ha seguit és el mateix que el descrit en l'apartat 8.1., però canviant el medi d'incubació. Les vesícules s'han incubat durant 5 s en presència de Na⁺ per tal de determinar la unió total de la florrizina a les vesícules, és a dir la unió específica als transportadors SGLT-1 i la unió inespecífica a la resta de la membrana apical. A continuació s'ha repetit l'experiment en absència de Na⁺, de forma que s'ha obtingut únicament la unió inespecífica a la membrana. La diferència entre aquests dos valors representa la unió específica de la florrizina al transportador SGLT-1.

8.4. TRANSPORT D'AMINOÀCIDS AMB VESÍCULES

L'estudi del pas d'aminoàcids a través de la membrana apical de l'enteròcit s'ha realitzat incubant vesícules aïllades amb medis que contenen els aminoàcids L-leucina, L-metionina o L-lisina com a substrat. Per a cada aminoàcid s'han mesurat els fluxos inicials d'entrada incubant les vesícules durant un període molt curt de temps, en el qual sabem que la seva entrada a l'interior de les vesícules es produeix de forma lineal.

El medi d'incubació, a més de l'aminoàcid assajat a la concentració requerida també conté Na⁺, per tal de garantir el funcionament de tots els possibles mecanismes de transport. En tots els casos s'ha afegit al medi d'incubació una alíquota del substrat radioactiu i el mateix aminoàcid, no marcat, fins a assolir 2 concentracions diferents: 1 μmol/L i 10 mmol/L per a la L-leucina i la L-lisina; i 10 μmol/L i 1 mmol/L per a la L-metionina.

- *Composició dels medis*

Medi d'incubació: NaCl 100 mmol/L, mannitol 100 mmol/L, Hepes/Tris (pH 7,4) 20 mmol/L, MgSO₄ 0,1 mmol/L, LiN₃ 0,41 μmol/L, L-[³H]leucina o L-[¹⁴C]lisina o L-[¹⁴C]metionina (*New England Research Products, Alemanya*) 0,01 μmol/L, L-leucina o L-lisina q.s.p., 1 μmol/L i 10 mmol/L; o L-metionina q.s.p. 10 μmol/L i 1 mmol/L.

Solució d'aturada: Mannitol 300 mmol/L, Hepes/Tris (pH 7,4) 20 mmol/L, MgSO₄ 0,1 mmol/L, LiN₃ 0,41 μmol/L.

- *Procediment*

El procediment per determinar la captació d'aquests aminoàcids per les vesícules de membrana apical de l'enteròcit és el mateix que l'exposat anteriorment (vegeu l'apartat 8.1.). En aquest cas en el medi d'incubació s'hi han afegit, en les concentracions adequades, els aminoàcids a estudiar. També s'ha canviat el temps d'incubació, en aquest cas de 3 s, ja que en el cas dels aminoàcids la linealitat es manté durant únicament 5 s.

9. WESTERN BLOT DE L'SGLT-1

La tècnica del Western Blot (Towbin *et al.* 1979) s'utilitza per identificar antigens específicament reconeguts per anticossos policlonals o monoclonals. Aquesta tècnica consta de diferents fases, la primera de les quals és la preparació i solubilització de les proteïnes. Seguidament, aquestes proteïnes es sotmeten a un camp elèctric, que les separa en funció de la seva càrrega i del seu pes molecular.

Una vegada les proteïnes estan separades, es transfereixen a una membrana de nitrocel·lulosa, que n'evita la seva difusió i és un suport més manejable. Per últim es procedeix al blocatge i a la immunodetecció, que es realitza mitjançant anticossos específics per a la proteïna d'interès.

9.1. PREPARACIÓ DE LA MOSTRA

Per tal de facilitar la migració de les proteïnes dins del gel on es duu a terme l'electroforesi, cal un procés previ de tractament de les mostres, anomenat desnaturalització, durant el qual es desfà l'estructura tridimensional de les proteïnes i només en resta la cadena polipeptídica lineal, que és més soluble en el tampó de mostra. Les proteïnes són solubilitzades amb SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) i agents reductors com

el 2-mercaptoetanol. Les mostres utilitzades són les suspensions de vesícules obtingudes en l'apartat 7.1.

- *Composició dels medis*

Tampó de mostra 2X: Glicerol 10%, Tris/HCl (pH 6,8) 23 mmol/L, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 5%, blau de bromofenol 0,001%.

- *Procediment*

En primer lloc s'ha determinat la concentració de proteïna de les mostres segons el procediment explicat en l'apartat 7.2 i acte seguit s'ha calculat el volum necessari de cada suspensió vesicular per tal que continguis 50 µg de proteïna.

La mostra s'ha barrejat amb el tampó de mostra 2X en proporció 1:1 i s'ha fet bullir al bany maria durant exactament 3 min, moment en el qual les proteïnes s'han desnaturalitzat gràcies a l'acció del 2-mercaptoetanol i del detergent SDS. A continuació s'ha dipositat ràpidament en gel per evitar el replegament de nou de les proteïnes.

El blau de bromofenol i el glicerol que conté el tampó de mostra serveixen, respectivament, per visualitzar la mostra i per aportar-li la viscositat necessària per facilitar la seva sembra dins dels pous del gel de l'electroforesi.

9.2. PREPARACIÓ DEL GEL I ELECTROFORESI

L'electroforesi constitueix la base del Western Blot. Consisteix en sotmetre les proteïnes desnaturalitzades a un camp elèctric, de manera que es separen en funció de la seva càrrega i del seu pes molecular. Les proteïnes de menor pes molecular avancen més ràpid mentre que les de major pes queden retingudes més a prop del pou on s'ha sembrat la mostra.

- *Composició dels medis*

Gel separador: Acrilamida/bisacrilamida (30%) 27%, Tris 1,5 mol/L 25%, SDS (10%) 1%, persulfat amònic (APS, 10%) 1%, N,N,N,N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED) 0,06%.

Gel concentrador: Acrilamida/bisacrilamida (30%) 16,25%, Tris 1 mol/L 12,5%, SDS (10%) 1%, APS (10%) 1%, TEMED 0,1%.

Tampó d'electroforesi: Tris 25 mmol/L, glicina 200 mmol/L, SDS 1%.

- *Procediment*

Primer s'ha preparat el gel separador a través del qual corren i es separen les proteïnes. L'acrilamida i la bisacrilamida confereixen l'estructura al gel, el qual comença a polimeritzar just després d'afegir els catalitzadors APS i TEMED. Per tant, s'ha abocat el preparat ràpidament dins l'espai tancat que formen dos vidres i que serveixen de suport al gel, amb compte de que no quedin bombolles. A sobre del gel separador s'ha afegit una mica d'aigua destil·lada ja que la polimerització s'accelera en absència d'oxigen.

Quan el gel ha polimeritzat, s'ha tret l'aigua, s'ha afegit el gel concentrador i s'ha col·locat una pinta de plàstic al damunt com a motlle per formar els pous. Aquest segon gel serveix per igualar tots els fronts de la mostra i així començar la separació de proteïnes a la vegada. Passats 15 min i havent-nos assegurat de la completa polimerització del gel concentrador s'ha procedit a treure la pinta amb molt de compte.

Un cop s'han preparat els gels, s'han muntat dins d'una cubeta d'electroforesi *Mini-Protean II Cell*[®] (*Bio-Rad, Alemanya*) que s'ha omplert amb tampó d'electroforesi. Seguidament, s'han sembrat les mostres desnaturalitzades i barrejades amb el tampó de mostra 2X, cadascuna en un pou. Als pous dels extrems s'ha sembrat el marcador de pesos moleculars *Full Range Rainbow*[®] (*Amersham Biosciences, Regne Unit*), el qual serveix per relacionar cada banda amb el seu pes molecular i així identificar la proteïna. A continuació s'han connectat els dos elèctrodes a la cubeta i s'ha posat en marxa l'electroforesi sota un voltatge de 150 V durant 1 h a temperatura ambient.

9.3. TRANSFERÈNCIA

Després de separar les proteïnes per electroforesi, cal transferir-les a una membrana de nitrocel·lulosa, amb la qual cosa s'aconsegueix evitar la difusió d'aquestes i tenir un suport més manejable per treballar. Aquest pas és monitoritzat mitjançant una tinció reversible amb vermell de Ponceau.

- *Composició dels medis*

Tampó de transferència: Tris 25 mmol/L, glicina 200 mmol/L, SDS 1%.

Colorant Vermell de Ponceau: Ponceau S 0,5%, àcid acètic glacial 1%.

Tampó de rentat: KCl 3 mmol/L, NaCl 137 mmol/L, KH₂PO₄ 1,5 mmol/L, NaH₂PO₄ 17 mmol/L, Tween 20 0,05%.

- *Procediment*

Primer s'ha submergit el gel d'electroforesi i tot el material a utilitzar en una safata plena de tampó de transferència per tal que quedi tot ben amarat. Aleshores s'ha desmuntat el suport de vidre on es troba el gel i aquest s'ha col·locat damunt d'un paper de filtre. Al damunt del gel s'hi ha dipositat en primer lloc la membrana de nitrocel·lulosa *Trans-Blot® Transfer Medium* (Bio-Rad, Alemanya) i després un segon paper de filtre. A continuació, aquest conjunt s'ha envoltat amb dues esponges i s'ha muntat dins d'un suport de plàstic, el qual s'ha submergit dins d'una cubeta de transferència *Mini Trans-Blot Cell®* (Bio-Rad, Alemanya). La transferència s'ha efectuat a 100 V durant 1 h a 4°C.

Una vegada passat aquest temps s'ha desmuntat el suport, s'ha extret la membrana de nitrocel·lulosa i s'ha tenyit amb vermell de Ponceau, el qual ha permès visualitzar les bandes proteiques. Així s'ha pogut comprovar si l'electroforesi i la transferència s'havien desenvolupat correctament. En cas afirmatiu, s'ha rentat la membrana amb tampó de rentat, de forma que les bandes s'han destenyit i la membrana ha quedat a punt pel següent pas.

9.4. BLOCATGE I IMMUNODETECCIÓ

Una vegada les proteïnes són transferides a la membrana, es bloqueja la resta de llocs lliures de la membrana per què no interfereixin en els resultats. Seguidament, la membrana s'incuba amb un anticòs específic per a la proteïna que es vol determinar (anticòs primari), el qual serà posteriorment reconegut per un segon anticòs conjugat a un enzim.

Per últim procedim al revelat, on l'enzim conjugat a l'anticòs secundari reacciona amb el sistema *ECL® Western Blotting* (Amersham Biosciences, Regne Unit). Aquesta reacció química produeix un senyal luminescent proporcional a la quantitat d'anticòs secundari i per tant, a la quantitat de proteïna. El senyal impacta en una pel·lícula fotogràfica sensible i així s'obté la imatge de la banda on es troba la proteïna que es volia detectar.

- *Composició dels medis*

Tampó de blocatge: KCl 3 mmol/L, NaCl 137 mmol/L, KH₂PO₄ 1,5 mmol/L, NaH₂PO₄ 17 mmol/L, Tween 20 0,05%, llet descremada en pols 3%.

Solució d'anticòs primari: *SGLT-1*; anticòs policlonal de conill sintetitzat contra la seqüència d'aminoàcids 564–575 de l'*SGLT-1* de conill. Dilució 1/5000 en tampó de blocatge. Cedit pel Dr. M Kasahara (Universitat de Tokio, Japó).

Solució d'anticòs secundari: *Anti-IgG de conill (Sigma, Missouri, EUA)*; es troba unit a peroxidasa de rave i s'utilitza per detectar anticossos primaris obtinguts en conill. Dilució 1/3000 en solució de blocatge.

- *Procediment*

La membrana s'ha submergit en el tampó de blocatge de forma que restés completament coberta i s'ha agitat sobre un agitador orbital durant 2 h a temperatura ambient.

Una vegada finalitzat el temps d'incubació, s'ha abocat el tampó de blocatge i s'ha afegit la solució d'anticòs primari damunt de la membrana. La incubació s'ha realitzat durant 12–18 h a 4°C en un agitador orbital. Tot seguit s'ha rentat la membrana amb tampó de rentat 8 vegades durant 3 min i s'ha afegit la solució d'anticòs secundari. La membrana s'ha incubat amb la solució d'anticòs secundari durant 1 h a temperatura ambient i en agitació. Passat aquest temps, s'ha tornat a rentar de la mateixa forma que amb l'anticòs primari.

Just acabat l'últim rentat, s'ha assecat la membrana amb paper de filtre i s'ha cobert amb les solucions de detecció comercials ECL durant exactament 1 min. A continuació s'ha tornat a assecar la membrana, s'ha muntat damunt d'una cartolina i s'ha embolicat tot amb un plàstic transparent. A partir d'aquest moment s'ha treballat sota llum vermella per tal de no danyar la pel·lícula fotogràfica *X-OMAT LS® (Kodak, EUA)*. Aquesta pel·lícula s'ha posat damunt la membrana, dins d'un dispositiu de tancament hermètic *Hypercassette® (Amersham Biosciences, Regne Unit)* i s'ha deixat en exposició el temps necessari per obtenir una imatge amb la intensitat desitjada.

Passat aquest temps, s'ha tret la pel·lícula de dins del dispositiu i s'ha cobert amb solució reveladora de raigs X *LX24® (Kodak, França)* durant 2 min aproximadament. A continuació s'ha submergit en solució d'aturada *Max-Stop® (Kodak, França)* durant 30 s, després en solució fixadora *A4® (Kodak, França)* fins que la pel·lícula ha esdevingut transparent. Finalment, s'ha esbandit amb aigua corrent i s'ha deixat assecar.

9.5. DENSITOMETRIA

La quantificació de les bandes obtingudes s'ha realitzat a partir de les imatges digitalitzades de la pel·lícula al Laboratori d'Anàlisi i Tractament d'Imatges dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona mitjançant un programa informàtic d'anàlisi d'imatges. Aquest programa permet determinar la densitat de les bandes i dona els resultats en unitats arbitràries.

10. IMMUNOLOCALITZACIÓ

La immunolocalització és una tècnica que ens permet localitzar una determinada proteïna en una mostra de teixit, gràcies a l'especificitat de la unió antigen-anticòs. El mètode depèn d'una apropiada fixació que retengui la distribució cel·lular de l'antigen i que preservi la morfologia cel·lular i tissular. Un cop fixat, el teixit es crioprotegeix i es congela, de forma que genera un bloc. A continuació, aquest bloc es talla mitjançant un criostat i sobre els talls obtinguts es realitza el marcatge.

En el nostre cas el marcatge s'ha efectuat mitjançant la incubació de la mostra amb un anticòs específic per a la proteïna que es vol determinar (anticòs primari), el qual després serà reconegut per un segon anticòs conjugat a un fluorocrom. Aquestes molècules presenten la propietat que poden ser excitades a una determinada longitud d'ona i emeten fluorescència a una longitud d'ona més llarga, que pot ser detectada mitjançant un microscopi de fluorescència.

10.1. FIXACIÓ I CRIOPROTECCIÓ DE LES MOSTRES

Un cop obtingudes les mostres es fixen amb un fixador a base de zinc. Aquest tipus de fixador no emmascara la mostra i per tant millora el marcatge posterior. Seguidament, els fragments de teixit es crioprotegeixen amb una solució saturant de sacarosa. Aquesta solució presenta una osmolaritat molt elevada, amb la qual cosa segresta l'aigua present a la mostra, per tant l'aigua no formarà cristalls i la mostra no es trencarà quan es congeli.

- *Composició dels medis*

Solució saturant de sacarosa: Sacarosa al 40% en PBS.

- *Procediment*

Després d'extreure i de netejar l'intestí de les rates pertanyents als 4 grups experimentals (vegeu apartat 4), s'han tallat 4 fragments de jejú d'uns 0,5 cm de llargada, sempre de la mateixa zona. Aquests fragments s'han dipositat en un tub amb 4 mL de solució fixadora de zinc *IHC Zinc fixative®* (Becton Dickinson, New Jersey, EUA), i s'han deixat a 20°C durant 16 h. Passat aquest temps s'ha descartat la solució fixadora i els fragments s'han rentat amb PBS. Seguidament, s'han incubat amb la solució saturant de sacarosa durant 24 h a 4°C. A continuació, s'ha descartat aquesta solució i se n'ha afegit de nova, que s'ha deixat fins que les mostres han estat completament incloses en sacarosa (quan les mostres baixen fins al fons del tub).

En aquest punt, les mostres s'han dipositat en una gota de *Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Miles Incorporated, Indiana, EUA)* sobre un suport de cartolina i immediatament s'han submergit en nitrogen líquid, generant així els blocs de teixit. Finalment, els blocs han estat conservats a -80°C fins al moment de realitzar els talls amb el criòstat.

10.2. OBTENCIÓ DE LES SECCIONS HISTOLÒGIQUES

Els teixits englobats i congelats s'han tallat a -25°C mitjançant el criòstat *CM3050S® (Leica Microsystems, Alemanya)* de la Unitat de Citometria de Flux i Microscòpia de Confocal dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona. Els talls s'han dipositat damunt d'un portaobjectes silanitzat (*Sigma, Missouri, EUA*), per tal de millorar-ne l'adherència.

10.3. MARCATGE DE PROTEÏNES DE LA UNIÓ ESTRETA I DE LA UNIÓ ADEHERENT

Les unions estretes i les unions adherents s'han localitzat mitjançant anticossos contra ZO-1 i contra β -catenina, respectivament. Aquestes dos anticossos provenen d'hostes diferents; en el cas de l'anticòs contra la ZO-1 l'hoste és el conill i l'hoste on s'ha generat l'anticòs contra la β -catenina és el ratolí. El fet que els hostes siguin diferents permet que es pugui realitzar una localització d'aquestes dues proteïnes damunt d'un mateix tall histològic.

A més, s'ha realitzat un marcatge amb faloïdina per detectar els filaments d'actina. Tant la ZO-1 com la β -catenina s'uneixen a filaments d'actina. Això permet localitzar la zona del marcatge i quantificar la fluorescència associada a cadascuna d'aquesta proteïnes mitjançant la colocalització amb els filaments d'actina.

- *Composició dels medis*

Solució de blocatge: PBS suplementat amb 1% d'albumina sèrica bovina (*BSA; Sigma, Missouri, EUA*).

Solució de permeabilització: Tritó 0,2% (*Sigma, Missouri, EUA*) en solució de blocatge.

Solució d'anticossos primaris: Dilució 1/125 de l'anticòs contra ZO-1 (policlonal sintetitzat en conill; *Zymed Laboratories Incorporated, California, EUA*) i dilució 1/250 de l'anticòs contra β -catenina (clon 14, sintetitzat en ratolí; *Biosciences; Becton Dickinson, New Jersey, EUA*), en solució de blocatge.

Solució d'anticossos secundaris: Alexa Fluor® 488 F(ab')₂ fragment d'IgG de cabra contra Ig de ratolí i Alexa Fluor® 546 F(ab')₂ fragment d'IgG de cabra contra Ig de conill (*Molecular probes Incorporated, Oregon, EUA*). Ambdós anticossos s'han utilitzat a una dilució 1/300 en solució de blocatge. En aquesta solució també s'ha afegit faloïdina conjugada a Alexa Fluor® 633 (*Molecular probes Incorporated, Oregon, EUA*) a una dilució 1/75 per tal de marcar els filaments d'actina i un 5% de sèrum de rata per tal d'evitar unions inespecífiques dels anticossos secundaris a altres proteïnes presents en la mostra.

- *Procediment*

Abans de realitzar aquest marcatge s'ha efectuat una prova de reacció creuada. Aquesta consisteix en realitzar una incubació amb un o l'altre anticòs primari i una segona incubació amb la solució dels anticossos secundaris. Tot i incubar amb els dos anticossos secundaris només hi ha d'haver el marcatge amb el fluorocrom corresponent a l'anticòs primari utilitzat.

Els talls histològics s'han incubat durant 30 min a temperatura ambient amb la solució de permeabilització. Aquesta solució bloqueja els possibles llocs d'unió inespecífica a l'anticòs primari i alhora permeabilitza la mostra. Després de realitzar dos rentats de 5 min cadascun amb PBS, les mostres s'han incubat amb la solució d'anticossos primaris durant tota la nit a 4°C. El control negatiu s'ha fet incubant dos talls amb solució de blocatge sense anticòs.

Passat aquest temps i després d'efectuar dos rentats més, s'ha afegit la solució d'anticossos secundaris, que s'ha incubat durant 2 h a temperatura ambient. Durant aquesta incubació, les mostres han estat protegides de la llum. A continuació s'han rentat novament els talls, i seguidament s'han muntat en un medi que els protegeix de la decaiguda de la fluorescència (*Mowiol 488®*, *Calbiochem, Alemanya*). Les mostres s'han deixat 1 h a temperatura ambient per tal que el Mowiol polimeritzi i s'han guardat a 4°C fins al moment d'observar-los.

10.4. MARCATGE DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA DEPENENT DE SODI DE TIPUS I (SGLT-1)

L'anticòs per detectar el transportador de glucosa depenent de sodi present a la membrana dels enteròcits ha estat cedit pel Dr. Kasahara (Universitat de Tokio, Japó) i s'ha produït en conill. Aquest anticòs reconeix la cadena peptídica corresponent als aminoàcids 564 a 575 de la seqüència deduïda per a l'SGLT-1 (*Sodium-dependent Glucose Transporter 1*) de l'intestí de conill (Takata *et al.*, 1991).

- *Composició dels medis*

Solució de blocatge: PBS suplementat amb 1% de BSA (*Sigma, Missouri, EUA*).

Solució de permeabilització: Tritó 0,2% (*Sigma, Missouri, EUA*) en solució de blocatge.

Solució d'anticòs primari: Dilució 1/750 de l'anticòs contra SGLT-1 (policlonal; cedit pel Dr. M. Kasahara, Universitat de Tokio, Japó), en solució de blocatge.

Solució d'anticòs secundari: Alexa Fluor® 546 F(ab')₂ fragment d'IgG de cabra contra Ig de conill (*Molecular Probes Incorporated, Oregon, EUA*). L'anticòs s'ha utilitzat a una dilució 1/300 en solució de blocatge.

- *Procediment*

El procediment al igual que en l'apartat anterior, s'ha iniciat permeabilitzant i bloquejant els talls durant 30 min a temperatura ambient. Després dels rentats amb PBS, les mostres s'han incubat amb la solució d'anticòs primari durant tota la nit a 4°C. A continuació, i després de realitzar els rentats corresponents, s'ha procedit a incubar els talls amb la solució d'anticòs secundari durant 2 h a temperatura ambient. Finalment, i després de 2 rentats amb PBS, s'ha realitzat el muntatge amb Mowiol. Les mostres s'han deixat a temperatura ambient durant 1 h, per tal que el Mowiol polimeritzi i s'han guardat a 4°C i protegides de la llum fins al moment de ser analitzades.

10.5. VISUALITZACIÓ DE LES MOSTRES I TRACTAMENT DE LES IMATGES

La fluorescència emesa per les mostres s'ha visualitzat mitjançant el microscopi confocal d'escaneig espectral per làser TCS SP2® (*Leica Microsystems, Alemanya*) de la Unitat de Microscòpia Confocal dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona. Aquest microscopi presenta la característica de captar la fluorescència emesa per un sol pla focal. Això permet fer diversos escaneigs a diferents profunditats i obtenir finalment una imatge més acurada.

Una altra característica d'aquest microscopi és que la fluorescència emesa per la mostra no és captada a través de filtres sinó a través de sensors, amb la qual cosa permet emprar un ampli ventall de fluorocroms.

Les imatges s'han captat a 400 Hz de velocitat (a més velocitat menys soroll de fons), a una resolució de 1024 per 1024 bytes i són imatges de 8-bits (és a dir, tenen 256 nivells de grisos).

La intensitat de fluorescència de les imatges s'ha quantificat mitjançant el programa Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Per tal de poder quantificar la fluorescència associada a les proteïnes ZO-1 i β -catenina s'ha seleccionat la zona de la unió estreta i del cinturó d'adhesió mitjançant el marcatge dels filaments d'actina, és a dir s'ha quantificat tota aquella fluorescència que ha colocalitzat amb el marcatge d'actina (Figura III-5) i s'ha expressat en unitats arbitràries.

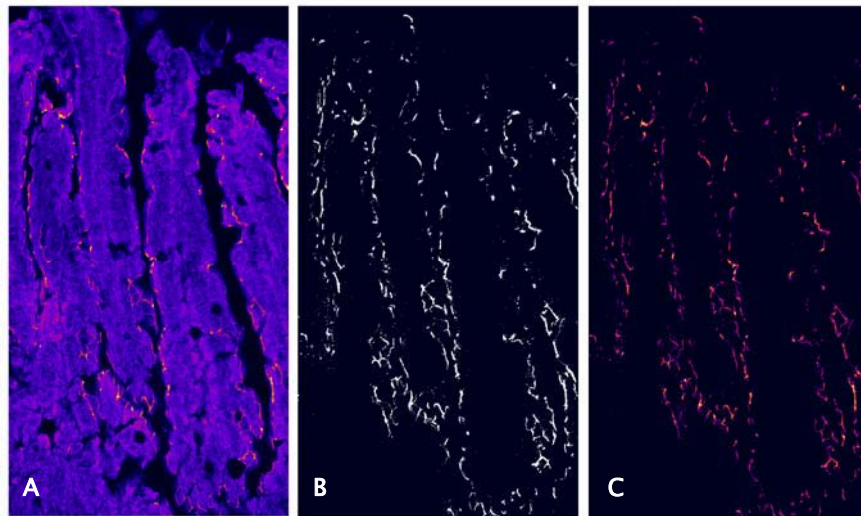


Figura III-5. Imatge representativa de la immunolocalització de la ZO-1. A) Imatge original en pseudocolor, d'un animal Control. B) Imatge resultant de la colocalització amb l'actina. C) Imatge que s'ha quantificat.

En el cas de la fluorescència emesa en el marcatge del transportador de glucosa, s'ha realitzat la mitjana de la intensitat de fluorescència de l'àrea segmentada. Aquesta és l'àrea que inclou intensitats de fluorescència superiors a un determinat llindar. En aquest cas, tenint en compte els controls negatius, s'ha considerat un llindar d'intensitat de 45 bins/píxel, de forma que per damunt d'aquest valor s'ha considerat marcatge i per sota, soroll de fons (Figura III-6). Per tant, només es té en compte aquella zona del camp que presenta valors d'intensitat per damunt de 45. A més, s'ha realitzat una quantificació de la fluorescència associada a l'expressió del transportador a l'apex, al mig i a la base de la vellositat per separat. Cadascuna d'aquestes zones representa un terç de la vellositat.

S'han captat 4 camps per animal i s'ha realitzat la mitjana de la intensitat de fluorescència d'aquestes 4 imatges i així s'ha obtingut un valor per animal. Seguidament, s'ha calculat la mitjana per grup amb aquests valors.

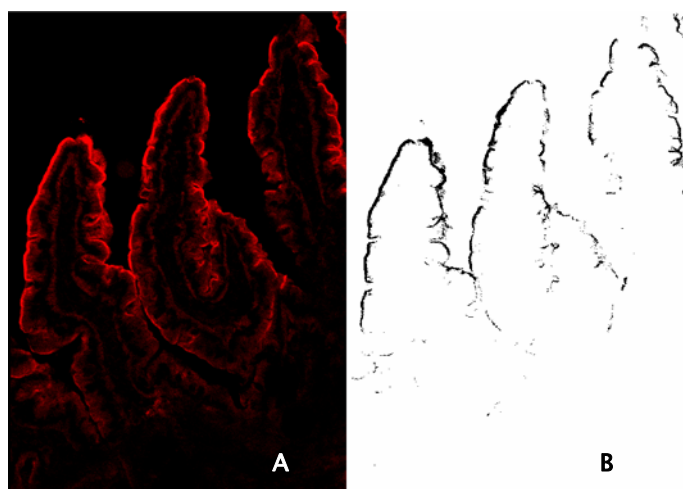


Figura III-6. Imatge representativa de la immunolocalització del transportador SGLT-1. A) Imatge original d'un animal Control. B) Imatge resultant de l'aplicació del llindar de 45 bins.

11. ESTUDI DE LA PERMEABILITAT CAPIL·LAR

El colorant *Evans Blue (EB)* ha estat àmpliament utilitzat per valorar l'increment de la permeabilitat vascular. Quan el colorant és injectat en el torrent sanguini s'uneix molt ràpidament a proteïnes sèriques (majoritàriament albúmina), formant complexos dissociables (Lange *et al.*, 1994). L'increment local de la permeabilitat a macromolècules dóna lloc a l'extravasació i deposició a l'espai intersticial de complexos proteïna-EB. La quantitat de EB extravasat pot ser estimada espectrofotomètricament (Lange *et al.*, 1995).

- *Composició dels medis*

Solució d'anestèsics: 90% de quetamina (*Imalgene 1000®*, Merial Laboratories, S.A., França) i 10% xilacina (*Rompún®*, Bayer, Alemanya).

Sèrum fisiològic: NaCl 154 mmol/L.

Solució d'Evans Blue: 1% en sèrum fisiològic.

- *Procediment*

Per a aquest estudi els animals han estat anestesiats via intraperitoneal amb 1 mL/kg de pes de la solució d'anestèsics. Seguidament, s'ha administrat via intramuscular 100 µL d'*Heparina LEO 1%* (*Altana Pharma, S.A., Espanya*). A continuació, s'ha administrat la

solució d'Evans Blue (2 mL/kg) directament a la vena jugular i s'ha mantingut la rata sobre una manta elèctrica (per tal que no baixés en excés la temperatura corporal) durant 15 min, temps de distribució de l'Evans blue. Passat aquest temps s'ha procedit al sacrifici de l'animal per decapitació i seguidament a la seva exsanguinació.

A continuació, s'ha realitzat una laparotomia i s'ha extret l'intestí prim i el còlon. Aquests han estat rentats amb sèrum fisiològic i acte seguit s'han assecat acuradament amb paper de filtre humit. S'han agafat els 3 cm més proximals com a duodè, el jejú i ili s'han dividit en fragment d'uns 5 cm i el còlon s'ha agafat sencer i s'ha tallat per la meitat. Tots aquests fragments han estat pesats, dipositats en tubs amb 3 mL de formamida (*Merck, Alemanya*) i deixat en agitació durant 24 h a temperatura ambient. Passat aquest temps s'han centrifugat els tubs a 3300 g durant 15 min i s'ha recollit el sobrenedant.

La determinació espectrofotomètrica del colorant s'ha realitzat amb un espectrofotòmetre *Helios δ® ThermoSpectronic (Thermo Electron Corporation, Alemanya)* a una longitud d'ona de 612 nm. El blanc s'ha realitzat amb el dissolvent utilitzat, en aquest cas amb formamida. Els estàndards s'han efectuat amb solucions d'Evans Blue en formamida de concentracions conegudes: 0,1, 0,4, 1 i 1,8 µg/ml. Com que la formamida crema el plàstic, les mesures s'han dut a terme amb microcubetes de quars.

12. ANÀLISI ESTADÍSTICA

L'anàlisi estadística de les dades presentades en aquesta memòria s'ha dut a terme amb el programa estadístic *SPSS® 11.5 (SPSS Incorporated, Illinois, EUA)*. L'anàlisi estadística s'ha realitzat en un primer lloc valorant l'efecte de la doble administració de l'enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB), comparant els grups Control i SEB mitjançant un estudi de la variància d'un factor (ANOVA).

Posteriorment s'ha determinat l'efecte de la suplementació dietètica en el model d'inflamació intestinal, ja sigui amb plasma animal assecat per evaporació (grup SEB-SDAP) com amb concentrat d'immunoglobulines (SEB-IC), comparant-los amb el grup control inflammat (SEB). Aquesta comparació també s'ha avaluat mitjançant un ANOVA seguit del test de Scheffé en el cas de variances homogènies o el test de Tamhane en el cas de variances no homogènies. Les diferències estadísticament significatives corresponen a valors de *P* inferiors a 0,05.