

2. OBJECTIUS

- Preparació de dos models experimentals per a la inducció de mort cel·lular programada en el testicle de la rata adulta.

Primer model: Model de toxicitat dels espermatòcits primaris en estadi de paquitè amb àcid metoxiacètic (Brinkworth, 1995).

Segon model: Model de toxicitat de les cèl·lules de Leydig amb EDS (età dimetà sulfonat) (Henriksen, 1995).

- Identificació morfològica i bioquímica de l'apoptosi en aquests models.

Mitjançant l'anàlisi del DNA genòmic total extret i tècniques de detecció de fragmentació del DNA in situ, es determinarà el tipus cel·lular que presenta una major activació d'apoptosis.

- Estudi de la implicació de gens coneguts relacionats amb apoptosi (gens de la família de Bcl-2, Caspasa-3,...) i no relacionats previament amb apoptosi (ER beta, AR i ABP) en la inducció de mort cel·lular programada en el testicle de la rata sotmesa als tractaments inductors d'apoptosi.

Utilitzant tècniques de Western blot i immunohistoquímiques, per demostrar la presència d'aquestes proteïnes a les cèl·lules germinals, i RT-PCR per demostrar l'expressió dels seus mRNAs a les cèl·lules germinals de rates tractades amb els tòxics inductors, comparant-los amb la seva expressió en rates normals.

- Estudi de l'expressió gènica diferencial entre el mRNA extret del testicle de la rata normal i de la rata sotmesa als tractaments inductors d'apoptosi

La comparació dels cDNAs obtinguts per transcripció reversa es realitzarà mitjançant la tècnica de *RNA-based arbitrarily primed PCR (RAP)* (Welsh i cols., 1992), ja que, és una tècnica molt més ràpida que la tècnica de substracció de llibreries i a més ofereix el ventatge respecte a la tècnica alternativa de *Representational differential analysis de cDNA (RDA)* (Hubank i cols., 1994) que permet comparar varis RNAs alhora.

- Identificació dels gens diferencialment expressats. Estudi de les noves seqüències trobades.

Les bandes comuns entre els mRNAs obtinguts dels testicles en els quals s'ha induït apoptosi i diferents dels mRNAs controls, ja sigui que apareguin en uns i no en uns altres o simplement s'apreciï una diferència d'intensitat, seran extretes, eluides, comprovada la seva diferencialitat per Northern blot, clonades i seqüenciades. Es comprovarà la seva existència als bancs de dades de seqüències gèniques i es poden donar 3 casos: 1) que sigui un gen conegut i coneguda la seva funció com a regulador d'apoptosi en el testicle, 2) que sigui un gen conegut però desconeguda la seva funció en apoptosi fins el moment i 3) que es tracti d'una nova seqüència. En el segon i tercer casos, es realitzaran estudis d'expressió *in situ* per localitzar i conèixer el paper del gen durant l'espermatogènesi.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1 Animals i tractament

Es van utilitzar rates adultes mascles Sprague-Dawley d'un pes aproximat de 400 g. Es varen mantenir sota condicions estàndar i distribuïdes en 4 grups de tractament:

- Grup 1: Tres rates control, a les quals se'ls va administrar una injecció i.p. de vehicle [DMSO: aigua (1:3)]; 18 rates restants, les quals van ser tractades amb una injecció i.p. d'EDS (75 mg/kg de pes corporal) dissolt en una barreja de DMSO : aigua (1:3, v/v).
- Grup 2: Cinc rates control, a les quals se'ls va administrar una injecció i.p. d'aigua salina 0.9%; 32 rates restants, les quals van ser tractades amb una injecció i.p. de MAA (650 mg/kg de pes corporal) en aigua salina 0.9% tamponada amb NaOH per un pH 7.4.
- Grup 3: Tres rates control, a les quals se'ls va administrar una injecció i.p. de vehicle [DMSO: aigua (1:3)]; 12 rates restants, les quals van ser tractades amb una injecció i.p. d'EDS (75 mg/kg de pes corporal) dissolt en una barreja de DMSO : aigua (1:3, v/v).
- Grup 4: Tres rates control, a les quals se'ls va administrar una injecció i.p. d'aigua salina 0.9%; 12 rates restants, les quals van ser tractades amb una injecció i.p. de MAA (650 mg/kg de pes corporal) en aigua salina 0.9% tamponada amb NaOH per un pH 7.4.

Els animals del grup 1 van ser sacrificats (3 animals per cada temps d'exposició al tòxic) 24, 36, 72 hores, 5 i 7 dies després del tractament.

Els animals del grup 2 van ser sacrificats (3 animals per cada temps d'exposició al tòxic) 3, 6, 9, 12, 24 hores, 3, 5 i 7 dies després del tractament.

Els animals del grup 3 van ser sacrificats (3 animals per cada temps d'exposició al tòxic) 24, 36, 48 i 72 hores després del tractament.

Per últim, els animals del grup 4 van ser sacrificats (3 animals per cada temps d'exposició al tòxic) 3, 6, 9 i 12 hores després del tractament.

En tots els grups el animals control van ser sacrificats a les 24 hores d'haver administrat el vehicle. Tots els animals van ser sacrificats per dislocació cervical.

Els grups 1 i 2 es van utilitzar per a realitzar tècniques *in situ* i aïllar DNA, RNA i proteïna, excepte dos controls i dos dels animals sacrificats a les 3, 6, 9 i 12 hores, els testicles dels quals van ser analitzats mitjançant la tècnica de microdissecció per laser (LCM). Un dels testicles va ser immediatament congelat amb N₂ per extreure l'àcid nucleic i l'altre fixat amb paraformaldehid durant 24 hores i seguidament submergit en parafina pels assatjos de tunel i immunohistoquímica.

Els grups 3 i 4 es van utilitzar per l'aïllament i separació de les cèl·lules germinals. Posteriorment també es va procedir a l'extracció de DNA i RNA de les cèl·lules aïllades.

El tòxic EDS va ser sintetitzat en el nostre laboratori, ja que no està disponible comercialment.

3.2 Síntesi d'EDS (Jackson i Jackson, 1994)

Reactius:

- . Etilenglicol
- . Piridina
- . Clorur de Metanosulfanil
- . Àcid Sulfúric
- . Alcohol Metílic
- . Cloroform

Mètode:

En primer lloc es barregen 8.5 ml d'etilenglicol amb 45 ml de piridina. Aquesta barreja es posa en agitació magnètica en un bany de gel i s'afegeix el clorur de metanosulfonil gota a gota (fins uns 23 ml). Prèviament s'ha preparat una barreja freda amb 1l de gel picat i 45 ml d'àcid sulfúric. Es deixa atemperar la barreja de reacció, que esta en el bany de gel, i llavors s'afegeix en agitació la barreja de gel-sulfúric. L'agitació es manté fins que es produeix la separació d'un compost sòlid, el qual es filtra per aspiració. Tot seguit, es

realitza una cristallització del producte filtrat amb 100 ml de metanol-cloroform (1:1), agitant suaument amb una mica de calor. Finalment es manté en el congelador a -20°C durant 2h i es deixa assecar sobre paper de filtre. El rendiment aproximat és d'uns 5 g d'EDS.

3.3 Aïllament de les cèl·lules germinals

Els testicles varen ser extrets i rentats amb PBS suplementat amb penicil·lina-streptomycina (5 mg/ml) i amfotericina (5 mg/ml), decapsulats, trossejats amb dos fulles de bisturí estèrils i incubats amb 100 ml del mateix medi amb que van ser rentats anteriorment.

A continuació, el medi va ser extret i els túbuls seminífers varen ser digerits amb tripsina diluïda al 2.5 % en PBS a 33°C durant 10 min. La reacció va ser aturada afegint 25 mg/ml d'inhibidor de tripsina. La solució resultant va ser tractada amb DNAsa (0.4 mg/ml) a temperatura ambient durant 5 min. D'aquesta manera es van alliberar les cèl·lules germinals de les seves unions amb les cèl·lules de Sertoli i entre elles mateixes, així com de les cèl·lules de Leydig i les cèl·lules intersticials que hi ha entre els túbuls.

Tot seguit, els túbuls aïllats varen ser tallats en una placa de petri durant 30 min amb dues fulles de bisturí estèrils i seqüencialment filtrats amb filtre de nylon de 100 µm de porus, filtre de fibra de vidre de cotó i filtre de nylon de 20 µm de porus. D'aquesta manera es van separar les cèl·lules intersticials i de Leydig de la resta de cèl·lules del testicle.

La solució recuperada va ser centrifugada a 800 rpm durant 10 min, i el pellet va ser resuspès amb 15 ml de medi de cultiu DMEM/NUT mix F12 (Life technologies Inc., Gaithersburg, MD) suplementat amb 10% de sèrum fetal boví. Les cèl·lules resultants foren incubades en una estufa a 33°C i 4 % de CO₂ durant 4 hores. Transcorregut aquest temps, el sobrenadant de cèl·lules germinals lliures de cèl·lules de Sertoli va ser centrifugat a 800 rpm durant 10 min. El pellet va ser guardat a -80°C fins que va ser utilitzat per extreure RNA.

3.4 Assaig de Tunel

Les seccions van ser desparafinades amb xilè 10 min, 3 vegades i hidratades amb concentracions decreixents d'alcohol etílic (100%, 96%, 90% i 70%, 2 vegades cadascun) i aigua destil·lada.

Seguidament van ser incubades amb proteinasa K (20 µg/ml) durant 15 min a temperatura ambient, rentades amb aigua destil·lada i tractades amb peròxid d'hidrogen al 3 % durant 5 min.

Després de ser rentades amb aigua, les seccions van ser immediatament incubades en la solució tampó de la TdT (200 mM àcid cacodílic, 200 mM KCl, i 25 mM Tris, pH 6.6), la qual se li va afegir 1.25 mg/ml d'albumina bovina i clorur de cobalt per a una concentració final de 1 mM, a temperatura ambient, durant 15 min.

Llavors, les seccions foren incubades amb 12 µl de TdT i 36 µl de biotin-16-dUTP en 1 ml de la solució tampó de la TdT, a 37°C durant 1 hora.

Per aturar la reacció, les seccions foren incubades en solució tampó de TB (300 mM NaCl, 30 mM Citrat sòdic) durant 15 min.

Després de rentar-les amb aigua destil·lada i PBS, les seccions foren incubades en un complex avidina-biotina-peroxidasa (ABC kit de Vector Laboratories, Burlingame, CA,USA) (1:25) a 37°C durant 30 min i la reacció de peroxidasa va ser visualitzada amb diaminobencidina 0.05% en PBS i peròxid d'hidrogen 0,05% en PBS. Després de contratenyir, es va analitzar el marcatge mitjançant un microscopi òptic Olympus BX40.

3.5 Anàlisi de la Fragmentació del DNA/Southern blot Analysis

El DNA total dels testicles congelats va ésser aïllat per digestió en tampó de lisi (Tris-HCl 1M, pH 7.4, EDTA 0.5M, 20% SDS) i proteinasa K (20 mg/ml) tota la nit a 56°C. Les mostres foren extretes amb Fenol/Cloroform i precipitades per addició de 0.75 volums de acetat sòdic 3M i 2.5 volums d'alcohol etílic. El DNA resultant va ser resupés en solució tampó *Low TE* (Tris-HCl 1M, pH 7.4, EDTA 0.5 M, pH 8) i la seva concentració va ser mesurada per espectrofotometria UV/Vis (A_{260}/A_{280}).

La mateixa quantitat de mostra va ser carregada en un gel d'agarosa al 2% (w/v) amb bromur d'etidi. Un cop corregudes les mostres, el gel va ser rentat en agitació amb solució desnaturalitzant (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) durant 15 min, rentat breument en aigua destil·lada i rentat en solució neutralitzant (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.2, 0.001M EDTA) durant 15 min més. Seguidament va ser transferit a una membrana de nylon (Hybond-N, Amersham) tota la nit utilitzant SSC concentrat 10 vegades.

Southern blot hibridation

Es va utilitzar una sonda de rata marcada radioactivament per *random priming* utilitzant l'activitat 5'-3' polimerasa del fragment Klenow de la DNA polimerasa I de E. Coli, amb el Kit Prime-a-Gene Labeling System (Promega Corporation, Madison, Wi). 25 ng de DNA genòmic de rata foren incubats amb hexanucleòtids a l'atzar, ^{-32}P dCTP (5 μl), en presència del fragment Klenow de la DNA polimerasa I. La reacció es va dur a terme a 37°C durant 1h. Un cop finalitzada la reacció la sonda marcada va ser precipitada, purificada.

La membrana va ser prehibridada amb una solució que contenia 5x SSPE (3.6 M NaCl, 0.2 M fosfat sòdic, 0.02 M EDTA pH 7.7), 5x solució Denhardt a 42°C, durant 16h. Seguidament les membranes van ser rentades a 20°C, durant 10 min amb SSPE 2x/0.1% SDS, 10 min més amb SSPE 1x/0.1% SDS i finalment un rentat a 65°C amb SSPE 0.1x /0.1% SDS. Després dels rentats, les membranes foren assecades i exposades a un film a -80°C, durant 3 dies, per obtenir l'autoradiografia corresponent.

3.6 Extracció de RNA total

Es va utilitzar el mètode descrit per Chomczynski i Sacchi (Chomczynski, 1987). Aquest es basa en una extracció per tiocianat de guanidina i fenols-cloroforms. Els agents desnaturalitzants com el guanidi-HCl i el tiocianat de guanidina, dissolen be les proteïnes i disgreguen els complexos àcids nucleics-proteïnes, per pèrdua de l'estructura secundària d'aquestes últimes. Malgrat tot, les RNAses podrien recuperar la seva activitat si no fossin inactivades pel tiocianat de guanidina i els agents reductors com el $^{-\text{mercaptoetanol}}$. La combinació d'aquests reactius és útil, doncs, per l'aïllament de RNA.

El teixit va ser homogeneïtzat amb solució D (tiocianat de guanidina 4M, citrat sòdic pH 7, 25 mM, Sarcosyl 10 % i H₂O DEPC) amb politró, en fred. Un cop homogeneïtzat el teixit, es va traspasar l'homogeneïtzat a tubs *corex* de 30 ml. Per cada 8 ml de solució D es van afegir 0,8 ml d'acetat sòdic 2M, 8 ml de fenol tamponat amb H₂O DEPC i 1,6 ml de cloroform. Els tubs van ser tapats amb *parafilm* i es va agitar vigorosament, es van deixar 15 minuts en gel i transcorregut aquest temps es van centrifugar a 8000 rpm i 4°C, durant 30 min. A continuació, el sobrenadant va ser traspasat a un tub nou, se li va afegir un volum de isopropanol i va ser guardat a -20°C tota la nit.

L'endemà, els tubs van ser centrifugats durant 30 minuts a 8000 rpm i 4°C, durant 30 min, es va descartar el sobrenadant i el *pellet* va ser rentat amb alcohol etílic al 70 %. Finalment es va centrifugar a 8000 rpm i 4°C, durant 30 min. Després de descartar el sobrenadant, el *pellet* es va assecar 2 ó 3 minuts a temperatura ambient, i es va resuspendre en H₂O DEPC.

3.7 Extracció del mRNA

L'extracció del mRNA procedent de les cèl·lules germinals aïllades dels testicles de rata, es va efectuar d'acord amb les intruccions proporcionades pel "Quickprep mRNA purification Kit" (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

Una vegada aïllades les cèl·lules, van ser tractades amb 400 µl de solució tampó d'extracció (solució aquosa que conté tiocianat de guanidina i N-lauroyl sarcosina) i es van homogeneïtzar amb una xeringa. Després de ser homogeneïtzades, es van afegir 800 µl d'una solució tampó d'elució (10 mM Tris-HCl pH=7,5; 1 mM EDTA) i es van barrejar be.

El següent pas va ser centrifugar, per una banda, les mostres extretes, i per l'altre 1 ml d'Oligo(dT)-cel·lulosa, a una velocitat de 16000x g durant 1 min. La solució tampó de l'Oligo(dT)-cel·lulosa va ser separada i, sobre el pellet, es va afegir 1 ml de l'homogeneïtzat de cèl·lules. Seguidament, es van barrejar per inversió durant 3 min.

Després es van fer tota una sèrie de rentats amb solucions salines d'alta i baixa concentració. La solució resultant de l'últim rentat va ser traspasada a una columna (*Microspin Column*) i per últim es va extreure el mRNA amb la solució tampó d'elució.

Els sobrenedants van ser precipitats per addició de 0.75 volums d'acetat sòdic 3 M i 2.5 volums d'alcohol etílic, a -80°C , durant tota la nit. El RNA va ser resupés en aigua DEPC al 0.1% per inhibir les RNAses, i la seva concentració va ser mesurada per espectrofotometria UV/Vis (A_{260}/A_{280}).

3.8 RT-PCR de Bax, Bcl-2, Bcl-x, Caspasa 3, ER beta i Rat HRP-1

El mRNA de les cèl·lules germinals aïllades va ser sotmès a retrotranscripció utilitzant 200 unitats de la Transcritasa inversa Superscript II (Gibco BRL). Cada reacció va tenir lloc en un volum final de 20 μl , 9 μl d'aigua estèril i 2 μl de mostra (125 ng/ μl) es van barrejar amb oligo dT 1mM, a 70°C , durant 10 min. Després es va afegir una barreja formada per 4 μl de tampó 5xRT (125 mM Tris-HCl pH 8.3, 188 mM KCl, 7.5 mM MgCl_2), 1 μl de dNTPs (10 mM) i 2 μl DDT 0.1 M i es va mantenir a 42°C durant 2 min. Finalment es va afegir 1 μl de l'enzim i es va mantenir a 42°C durant 50 min. 2 μl del cDNA resultant varen ser amplificats utilitzant encebadors específics (Taula 1).

Encebador	Seqüència	T° d'hibridació
Bax sentit	TACAGGGTTTCATCCAGGATCG	58°C
Bax antisentit	GATGGTCACTGTCTGCCATGTGG	
Bcl-2 sentit	GGGGGAAACACCAGAATCAAG	58°C
Bcl-2 antisentit	GACGGTAGCGACGAGAGAAG	
Bcl-x gen sentit	TGGACAATGGACTGGTTGAG	57,5°C
Bcl-x gen antisentit	TGTCTGGTCACTTCCGACTG	
Caspasa-3 sentit	CCCACTCCCAGTCATTCC	55°C
Caspasa-3 antisentit	GCCTGCCGAGGTACAGAG	
ER beta sentit	TGCTGGATGGAGGTGCTAATG	59°C
ER beta anti sentit	ACACAACCACCCTGACTCCT	
Rata HRP sentit	AGAGCACACGCTATGTCTTGC	59°C
Rata HRP antisentit	ACACTGCTGTCTCACTTTCCC	
L19 sentit	CAATGCCAACTCTCGTCAAC	56°C
L19 antisentit	CTTGGTCTCTTCTCCTTGG	

Taula 1

3.9 Immunohistoquímica per a Bax, Bcl-2, Receptor d'Andrògens (AR) i Mouse HRP-1.

Les seccions van ser desparafinades amb xilè 3 vegades durant 10 min i hidratades amb concentracions decreixents d'alcohol etílic (100%, 96%, 90% i 70%, 2 vegades cadascun) i aigua destil·lada.

Després es va realitzar l'exposició d'epitops mitjançant l'ebullició de les secrecions en una olla a pressió, en tampó citrat al 10% [Dako Retrieval Agent (Dako Corporation, Carpinteria, CA)] durant 2 min 3 seg. Posteriorment, es deixa atemperar durant 10 min. Tot seguit, es va realitzar el bloqueig de la peroxidasa endògena amb peròxid d'hidrògen al 3% durant 7 min es van rentar amb H₂O destil·lada i van ser bloquejades les unions inespecífiques amb sèrum normal de cabra diluït en PBS a temperatura ambient durant 2h en una cambra humida i protegida de la llum.

Transcorregut aquest temps, les mostres van ser incubades amb l'anticòs primari (Rabbit anti-Bcl-2 sc-492 i Bax sc-493, tots dos de Santa Cruz Biotechnology, Inc; Rabbit anti-mouse AR (PG-21), regal del Dr. Carlos Suarez-Quian, Georgetown University i Rabbit anti-mouse HRP-1, regal del Dr. Nagata, Osaka University) a una concentració de 1mg/ml, en una cambra humida, a 4°C, durant tota la nit.

Després de rentar breument amb H₂O destil·lada i PBS 3 vegades, es van incubar amb l'anticòs secundari biotinilat (Goat anti-rabbit Ig G biotinilat, ICN # 67-339), a 37°C, durant 45 min.

Per últim les seccions van ser incubades amb el complex avidina-biotina-peroxidasa (ABC) a 37°C, durant 30 min, rentades amb PBS 3 vegades i revelades amb Diaminobencidina i peroxid d'hidrògen. Totes les seccions foren contratenyides amb hematoxilina diluïda i analitzades en un microscopi òptic Olympus BX40.

3.10 Immunohistoquímica per a ER β

Les seccions van ser desparafinades amb xilè durant 10 min, 3 vegades i hidratades amb concentracions decreixents d'alcohol etílic (100%, 96%, 90% i 70%, 2 vegades cadascun) i aigua destil·lada.

Després es va realitzar una exposició d'epitops incubant les seccions en tampó citrat al 10% (Dako Retrieval Agent), en una olla a pressió durant 2 min 3 seg. A continuació es deixa atemperar durant 10 min. Tot seguit, es va realitzar el bloqueig de peroxidasa endògena amb peroxid d'hidrogen al 3% i metanol al 10 % en PBS durant 5 min i es van rentar amb H₂O destil·lada. Per bloquejar les unions inespecífiques, les seccions van ser incubades amb 3 % de sèrum normal de conill.

Les seccions van ser incubades amb un anticòs policlonal de cabra anti-receptor de estrògens de rata dirigit contra l'extrem amino-terminal (3g/μl) (Santa Cruz Biotechnology Inc.) durant 16 h a 4°C. Després de rentar amb PBS, les seccions van ser exposades a l'anticòs secundari de conill biotinilat anti-cabra (Vector Laboratories, Inc.) a temperatura ambient, durant 30 min.

Per últim, les seccions van ser incubades amb el complex avidina-biotina-peroxidasa (ABC) a 37°C, durant 30 min i rentades amb PBS 3 vegades i revelades amb Diaminobencidina i peroxid d'hidrogen. Totes les seccions foren contratenyides amb hematoxilina diluïda i visualitzades amb un microscopi òptic Olympus BX40.

3.11 Extracció proteica i Western blot per a Bax, Bcl-2, Bcl_{L/S}, ER β, Caspasa 3, AR i Proteïna Transportadora d'Andrògens (ABP).

Les fraccions de testicle total procedent de rates control i tractades amb els dos tòxics inductors d'apoptosi, van ser llissats amb 1 ml de tampó RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1% NP-40; 0,25% deoxicolat sòdic; 150 mM NaCl) que contenia diferents inhibidors de proteases (PMSF 1 mM, aprotinina 10 mg/ml i leupeptina 10mg/ml) utilitzant homogeneïtzadors de vidre (Afora). Els productes de la lisi van ser centrifugats a 13,000x g, a 4°C, durant 30 min. El contingut proteic dels sobrenadants va ser determinat mitjançant el mètode Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA).

La mateixa quantitat de proteïna (30 µg) va ser sotmesa a electroforesis en un gel SDS-PAGE al 10%, a 80 V, durant 3 h. A continuació, les proteïnes van ser transferides a una membrana de nitrocel·lulosa (Bio-Rad Laboratories, Inc.) a 400 mA, durant 1 h.

El següent pas va ser bloquejar les membranes amb llet en pols al 5% en PBS a temperatura ambient i en agitació constant, durant 1 h.

Després del bloqueig, les membranes van ser incubades amb els respectius anticossos primaris: Bcl-2, Bax, Bcl-x, ER beta, Caspasa-3 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a una concentració de 3 µg/ml, amb ER beta dirigit també contra l'extrem amino-terminal (Affinity Bioreagents Inc., Golden, CO) a una concentració de 2 µg/ml, amb AR (PG-21) i amb ABP a una concentració de 1 µg/ml, durant tota la nit a 4°C en agitació constant.

Tot seguit, les membranes van ser rentades amb 0,01% Tween-20 en PBS, 3 vegades, en agitació, durant 15 min. Les membranes van ser incubades llavors amb l'anticòs secundari de cabra anti-conill quan es tractava de detectar Bax, Bcl-2, Bcl-x, Caspasa-3, AR i ABP, i conill anti-cabra en el cas d'ER beta, conjugats amb HRP a una concentració 1/2000 (Vector Laboratories, Inc.) a temperatura ambient i en agitació, durant 1 h.

Després de tres rentats més amb 0,01% Tween-20 en PBS, l'activitat peroxidasa va ser analitzada amb el sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL) seguint les instruccions de la casa comercial. A continuació, les membranes van ser exposades a un film per obtenir l'autoradiografia corresponent.

3.12 Separació de nuclis i citosols

Els testicles van ser extrets de les rates, decapsulats i trocejats breument, seguidament va ser afegit 1 ml de solució tampó A (Tris-HCl 10 mM, EDTA 2 mM, Sacarosa 0,25 M, pH 7,4). Després van ser homogenitzats amb un homogenitzador mecànic i centrifugats a 2000 rpm durant 10 min. El pellet conté els nuclis i el sobrenadant els citosols.

3.13 Laser Capture Microdissection (LCM)

En un criostat estandar, amb una fulla neta, es van tallar seccions congelades de 5 µm. Dues seccions corresponents a cada temps del tractament amb MAA, així com dels respectius controls van ser muntades en portaobjectes de vidre Colorfrost Plus (Fisher Scientific, Pittsburg, PA).

Les seccions que no van ser fixades es van guardar a -80°C. Les seccions congelades i muntades van ser descongelades a temperatura ambient durant uns 30 seg sense permetre que s'assequessin i van ser sotmeses a l'agent fixador (alcohol etílic al 70% en H₂O DEPC) durant 30 seg.

Després de la fixació, les seccions van ser tenyides amb hematoxilina durant 1 min i eosina durant 15 seg, seguidament deshidratades en concentracions ascendents d'alcohol etílic (70%, 90% i 100%, 2 vegades cadascun) i inmerses en xilè durant 5 min, 2 vegades.

Les seccions així tenyides i fixades van ser utilitzades per la microdissecció utilitzant un aparell Pixell II (Arcturus, Mountain View, CA) amb un diàmetre de diana de 30 µm.

3.14 Línies cel·lulars

Es van fer servir dues línies cel·lulars de Sertoli de ratolí diferents, MSC-1 (cedides pel Dr Carlos Suarez-Quian) i TM4 (ATCC No:CRL-1715).

Tots dos tipus de cèl·lules es van fer créixer en flascons de cultiu de poliestirè de 25 cm² (T30) i van ser cultivades a 37°C en una atmosfera humida al 5% de CO₂.

Medi complet de creixement de les cèl·lules MSC-1:

- DMEM
- Sèrum boví fetal al 5%
- Antibiòtic antimicòtic al 1%

Medi complet de creixement de les cèl·lules TM4:

- Ham's F12 medi
- DMEM (amb 1,2 g/L bicarbonat sòdic)
- Sèrum de cavall al 5%

- Sèrum boví fetal al 2,5%
- HEPES 15 mM pH 7,4
- Antibiòtic antimicòtic al 1%

3.15 Tripsinització

Les cèl·lules van ser rentades amb PBS (neutralitza el sèrum que inhibeix la tripsina). Es va afegir 3 ml de solució de tripsina al 2,5% (Boheringer Mannheim) i es va deixar a 37°C, durant 2 min. Les cèl·lules van ser recollides i passades a un tub de 15 ml on prèviament s'havien afegit 7 ml de medi (en fred) i van ser centrifugades a 1000 rpm, a 4°C durant 5 min.

Un cop centrifugades es va treure el sobrenedant, es van resuspendre amb 2 ml de medi complert i van ser sembrades en un altre flascó.

3.16 Congelació i descongelació de cèl·lules

Les dues línies cel·lulars es van mantenir en *stocks* congelats a -130°C.

Congelació :

Les cèl·lules van ser tripsinitzades (veure punt 3.15), es van afegir 900 µl de suspensió de cèl·lules en criotubs on prèviament hi havia 100 µl de DMSO fred i es va barrejar per inversió. La congelació va ser realitzada gradualment (4°C, -20°C 2 hores, -80°C breument i -130°C).

Descongelació :

Les cèl·lules van ser descongelades a 37°C fins un 80-90%. Es va afegir 1 ml de medi fred al criotub gota a gota. Els 2 ml es van posar en un tub de 15 ml que contenia 8ml de medi fred. Es van centrifugar a 1000 rpm, a 4°C, durant 5 min. Finalment el *pellet* va ser resuspès amb 1 ml de medi i sembrat en un flascó.

3.17 RNA Differential Display

La tècnica d'anàlisi d'expressió diferencial o *differential display* va ser desenvolupada inicialment per Liang i Pardee (Liang, 1992). Aquesta tècnica pretén analitzar els diferents RNA missatgers que expressa un tipus cel·lular en circumstancies distintes.

El mètode consisteix en seleccionar una subpoblació de RNA's missatgers realitzant la transcripció inversa amb encebadors oligo-dT anclats en una base diferent (A, C o G) a l'inici de la cua poliadenilada i, a continuació, amplificar els cDNAs resultants mitjançant PCR en presència d'un segon encebador curt, de seqüència aleatòria, en condicions de baixa astringència.

Les subpoblacions de RNA retrotranscrites en els seus respectius cDNAs són separades en un gel de poliacril·lamida. Les mostres de cDNA analitzades en carrils contigus el que permet distingir bandes expressades diferencialment. Aquestes són retallades, reamplificades, subclonades i seqüenciades.

En el nostre cas, es va tractar de trobar gens expressats diferencialment en les cèl·lules germinals del testicle de rates tractades amb MAA i EDS. Utilitzant el Kit RNAimage (GeneHunter Corporation, Nashville, TN) es va procedir de la següent manera:

3.17.1 Síntesi de la primera cadena de DNA mitjançant transcripció reversa

A partir de 250 ng de mRNA extret de les cèl·lules germinals aïllades de rates tractades amb els 2 tòxics es van dur a terme 3 transcripcions inverses per cada mostra, una amb cadascun dels 3 oligo-dT diferents proporcionats pel Kit (anclats en una A, C o G respectivament).

Cada reacció va tenir lloc en un volum final de 20 µl, que contienien 9 µl d'aigua estèril, 2 µl de mostra (125ng/µl), 4 µl de tampó 5xRT (125 mM Tris-HCl pH=8.3, 188 mM KCl, 7.5 mM MgCl₂, 25 mM DTT), 1.6 µl de dNTPs (250 µM) i 2 µl d'un dels 3 oligo-dT, H-T11G, C o A (2 µM).

Les condicions a les quals es va fer la retrotranscripció foren: 65°C durant 5 min. i 37°C durant 60 min. Quan portaven 10 min a 37°C, es va afegir 1 µl de retrotranscritasa MMLV

(100 unitats) i 75°C durant 5 min. Finalment es va deixar a 4°C. El cDNA resultant va ser congelat a -20°C fins a la seva utilització.

3.17.2 Amplificació del cDNA mitjançant PCR

Cadascun dels 3 cDNAs obtinguts de cada mostra va ser amplificat amb 5 encebadors diferents escollits a l'atzar, fins trobar bandes potencialment diferenciades sobre el gel de poliacril.lamida (clarament induïdes o disminuïdes en els animals tractats respecte als controls).

Cada reacció contenia, en un volum final de 20 µl, el següent; 10 µl d'aigua estèril, 1,6 µl de tampó 10xPCR (100mM Tris-HCl pH=8.4, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,01% gelatina), 1,6 µl de dNTPs (25 µM), 2 µl d'encebador o *H_n-AP primer*, 2 µl de H-T11G, C o A (2 µM) (el mateix que s'havia utilitzat per a la transcripció reversa), 2 µl de producte de la RT, 0,2 µl de ³³P-dATP i 0,2 µl (1U) de Taq polimerasa.

Les condicions programades al termociclador varen ser: desnaturalització inicial a 94°C durant 3 min.; 40 cicles que constaven de desnaturalització a 94°C durant 30 seg; hibridació a 40°C durant 2 min i extensió a 72°C durant 30 seg, seguida d'una extensió final a 72°C durant 5 min.

3.17.3 Electroforesi en gel desnaturalitzant de poliacril.lamida.

La poliacril.lamida és un polímer que, en presència de radicals lliures provinents del persulfat d'amoni, i estabilitzat per la tetrametilèdiamina (TEMED), polimeritza formant cadenes llargues. Si s'afegeix bisacril.lamida, les cadenes s'entrecreuen, formant un gel. Per a separar fragments de DNA de doble cadena s'utilitzen gels de poliacril.lamida no desnaturalitzants i, per a separar fragments de DNA de cadena única, es fan servir gels de poliacril.lamida desnaturalitzants. Habitualment l'agent desnaturalitzant utilitzat és la urea o la formamida.

En aquest cas, les electroforesis es varen fer en gels 6% acril.lamida i urea 7M, en presència de tampó 0,1 M TBE (0,9 M Tris-HCl, 0,9 M àcid bòric, 0,02 M EDTA pH 8).

Més concretament, es va preparar inicialment una solució d'acril·lamida al 38% i bisacril·lamida al 2%. A continuació, es varen barrejar 150 ml d'aquesta solució amb 100 ml de tampó TBE 1 M i 460 g d'urea, en un volum total d'un litre. Després de filtrar la solució, es va guardar a 4°C protegida de la llum.

El gel es va preparar amb 100 ml d'aquesta solució, 300 µl de persulfat d'amoni 10% i 100 µl de TEMED. A l'afegir aquest últim component, es va agitar la barreja durant 20 segons i, a continuació, es va procedir a carregar la solució entre dos vidres dissenyats per aquest ús i prèviament netejats amb isopropanol. La polimerització va tenir lloc a partir de les 2 hores.

Un cop polimeritzat el gel, es va procedir a la càrrega de les mostres en el gel i a l'electroforesi. Inicialment, es va realitzar un *pre-run* de 30 min amb el tampó de càrrega (95% formamida, 10 mM EDTA pH 8, xil·lè cianol FF al 0,09%, blau de bromofenol al 0,09%) per comprovar l'estat del gel.

A continuació, 3,5 µl de cada producte de PCR, juntament amb 2 µl de tampó de càrrega, foren desnaturalitzats a 80°C durant 2 min, immediatament abans de ser carregats al gel. L'electroforesi va tenir lloc a 60 W, sense que el voltatge superés els 1700 voltis, durant 2 hores i 30 min.

Al finalitzar, es varen separar els vidres que contenien el gel, i aquest es va col·locar sobre un paper Whatman 3M, es va embolicar en Saran Wrap i es va assecat a 80°C en condicions de buit durant 1 hora. El gel ja sec va ser exposat a una pel·lícula d'autoradiografia durant 16-18 hores a -80°C.

3.17.4 Retall, el·lució i reamplificació de les bandes diferencials.

Després de revelar la pel·lícula i identificar les bandes potencialment diferencials, es va procedir a retallar-les del gel amb una fulla de bisturí estèril. Cada una d'elles va ser submergida en un tub autoclavat que contenia 100 µl d'aigua destil·lada durant 10 min.

Seguidament, es va bullir durant 15 min, es va centrifugar a màxima potencia durant 30 min i el sobrenadant va ser traspasat a un altre tub, per a realitzar en ell la precipitació del cDNA amb acetat sòdic 0,3 M, glicogen i alcohol etílic 100% a -80°C durant una hora.

Després de centrifugar i rentar amb alcohol etílic 70% fred, el cDNA precipitat va ser dissolt amb 20 µl d'aigua destil·lada.

Un volum de 4 µl d'aquest cDNA va ser utilitzat per una posterior reamplificació amb els mateixos components i les mateixes condicions esmentades en l'apartat anterior, amb el fi de verificar l'aïllament d'una única banda i de la grandària corresponent. Per això el producte de PCR reamplificat va ser visualitzat en un gel d'agarosa al 1'5%.

3.18 Subclonatge de les bandes diferencials obtingudes.

3.18.1 Lligació del cDNA

Cada cDNA ja amplificat va ser lligat a un vector plasmídic. Es va utilitzar el kit *Original TA Cloning* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Aquest aprofita la capacitat de la Taq polimerasa no termoestable d'afegir una deoxiadenosina (A) als extrems 3' dels productes de PCR (Clark 1988). Així poden lligar-se aquests productes al vector facilitat per aquest kit (pCR2.1), que posseeix un residu deoxitimidina (T) als seus extrems 3'. A més, quan el producte de PCR és insertat en el vector, queda flanquejat en els seus 2 extrems per llocs específics de restricció per a l'enzim EcoRI, la qual cosa permet recuperar l'insert fàcilment.

Altres característiques d'aquest vector inclouen un gen de resistència a ampicil·lina, que permet la selecció i manteniment d'*E. Coli* i el fragment lacZ , que codifica pels primers 146 aminoàcids de la β -galactosidasa, junt amb el seu promotor, la qual cosa permet el *screening* de les bactèries que han estat transformades (Fig.14).

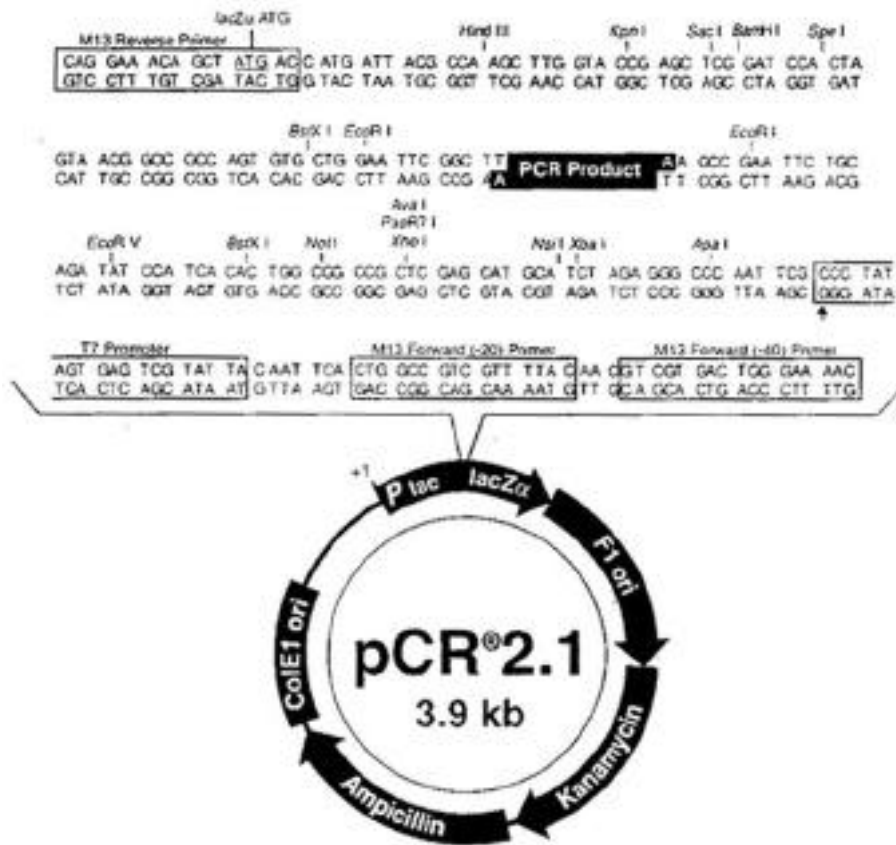


Fig. 14. Descripció del vector pCR2.1

Per a calcular la quantitat de producte de PCR necessari per realitzar una lligació òptima, es va fer servir la següent fórmula:

$$X \text{ ng de producte PCR} = \frac{(Y \text{ bp prod PCR}) \times (50 \text{ ng pCR2.1 vector})}{(\text{grandària en bp del vector} = 3900)}$$

De tota manera, en general, per a grandàries entre 400 i 700 pb, es considera que 1 µl de producte de PCR proporciona una ratio molar apropiada amb el vector (1:1).

A continuació, es va preparar una reacció de lligació en un volum total de 10 µl contenint: 1 µl de producte de PCR, 1 µl de tampó de lligació 10x (60 mM Tris-HCl pH 7,5, 60 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1mg/ml albúmina bovina, 70 mM β-mercaptoetanol, 1 mM dATP, 20 mM ditiotreitòl (DTT) i 10 mM espermidina), 2 µl del vector pCR2.1 (25 ng/ml), aigua estèril fins 9 µl i 1 µl de T4 DNA Ligasa (4 U). Aquesta barreja es va incubar a 14°C durant tota la nit.

3.18.2 Transformació de bacteris i subclonatge.

Es van transformar bacteris de la soca E. Coli INV F' proporcionades pel mateix kit, mitjançant shock tèrmic (a 42°C, durant 30 seg) en presència del plàsmid lligat a l'insert, -mercaptoetanol (concentració final 0,02 M) i medi SOC (2% triptona, 0,5% extracte de llevat, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10mM MgCl₂.6H₂O i 20 mM glucosa).

Després de l'agitació del vial que contenia les cèl·lules ja transformades a 225 rpm i 37°C durant una hora, es va procedir a sembrar-les en plaques de LB-agar amb 50 µg/ml d'ampicilina i 40 µg/ml de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- -D-galactosidasa, diluït en dimetilformamida) i es van incubar a 37°C durant 16-18 hores.

A continuació, les plaques varen ser col·locades a 4°C durant 2-3 hores per tal que virés completament el color de les colònies blaves (que no han estat transformades i que, per tant, no han metabolitzat la galactosa).

Finalitzat aquest període, 11 colònies blanques (potencialment amb insert) i una blava (sense insert) aïllades de cada placa sembrada varen ser crescudes separatament, en 10 ml de medi líquid LB cadascuna, en agitació a 225 rpm i 37°C, durant tota la nit.

3.18.3 Purificació, reamplificació i identificació de les bandes subclonades.

A continuació es va extreure el DNA plasmídic de cada cultiu líquid i es va procedir a la seva amplificació amb els encebadors universals M13 (sentit 5' CAGGAAACAGCTATGACC 3' i antisentit 5' GTTTCCCAGTCACGAC 3'), que amplifiquen des d'els extrems del vector, incloent la zona de l'insert. Les condicions de PCR van ser: desnaturalització inicial a 94°C durant 3 min, 40 cicles consistents en desnaturalització a 94°C durant 20 seg, hibridació a 50°C durant 30 seg i extensió a 72°C durant 20 seg, amb un període d'extensió final de 72°C durant 5 min. El producte de PCR va ser sotmès a electroforesi en un gel d'agarosa al 2% per comprovar quines de les colònies transformades (blanques) posseïen insert i, en les positives quina era la grandària.

L'obtenció del DNA purificat procedent dels plasmids que contenien l'insert d'interès va ser realitzat amb el Kit de purificació de DNA *Wizard Miniprep* (Stratagene) seguint les instruccions del fabricant. El procediment era el següent:

Es van introduir 5 ml del cultiu en tubs i es van centrifugar a velocitat màxima a temperatura ambient, durant 5 min. El sobrenadant es va descartar, es van afegir sobre el pellet 250 µl de *Wizard Plus SV Minipreps Cell Resuspension Solution* i van ser resuspessos completament amb el vortex.

A continuació es van afegir 200 µl de *Cell Lysis Solution*, es van ser barrejar per inversió 4 vegades i es van deixar reposar durant 5 min a temperatura ambient. Transcorregut aquest temps, es van ser afegir 10 µl de la solució Proteasa Alcalina, es va barrejar per inversió 4 vegades, i es va deixar reposar durant 5 min, a temperatura ambient. El següent pas va consistir en afegir 350 µl de *Neutralization Solution* i es va barrejar per inversió 4 vegades. Després d'això es va centrifugar a 14000 rpm a temperatura ambient, durant 10 min, el sobrenadant (uns 850 µl aproximadament) es va ser dipositar en unes columnes proveïdes pel fabricant i les mostres es van centrifugar a 14000 rpm a temperatura ambient, durant 1 min.

La columna es va rentar amb 750 µl de la sol.lució de rentat dues vegades i per últim el DNA es va recollir amb 50 µl de low TE i quantificat en un espectrofotòmetre.

3.19 Seqüenciació de Plasmids i productes de PCR

La reacció de seqüència es va dur a terme amb *Big Dye terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). En un tub de PCR (PE Applied Biosystems) es van afegir 200 ng de producte de PCR purificat o 900 ng de plàsmid, 1 µl de encebador amb el qual es va obtenir el producte de PCR o de la zona flanquejant del plàsmid on era l'insert que es volia seqüenciar, 4 µl del *Big Dye terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (PE Applied Biosystems) i H₂O estèril en una quantitat suficient fins un volum total de 20 µl.

Aquesta barreja va ser introduïda en el termociclador 2400 PE (PE Applied Biosystems) i va ser sotmesa a la següent reacció de seqüència: desnaturalització a 94°C durant 3 min; 25 cicles que constaven de desnaturalització a 96°C durant 10 seg, hibridació a 50°C durant 5 seg, i extensió a 60°C durant 4 min.

La temperatura d'hibridació va variar en funció de l'encebador utilitzat en cada cas. Normalment es considera òptima una temperatura d'hibridació 5°C per sota de la temperatura de *melting* del propi encebador.

Un cop la reacció de seqüència va ser complerta, el producte obtingut va ser precipitat per l'addició de 64 µl d' alcohol etílic 95% i 16 µl d' H₂O estèril. Es va barrejar be i es va deixar precipitar durant 15 min a temperatura ambient. A continuació es va centrifugar a màxima velocitat durant 20 min i el sobrenadant va ser descartat immediatament.

Tot seguit, es van afegir 250 ml d' alcohol etílic al 70%, es va barrejar i es va centrifugar a màxima velocitat durant 10 min. Un cop centrifugat, es va treure el sobrenadant i es va deixar assecar a 37°C. Les mostres van ser llavors seqüenciades amb l'analitzador genètic Abi Prism 310 (Perkin-Elmer Corporation).

3.20 Northern Blot

La hibridació de sondes d'àcids nucleics complementàries a seqüències diana de RNA o DNA fixats a membranes, ha estat utilitzada comunment en l'anàlisi d'estructura i expressió gènica.

En el nostre cas, es va utilitzar per comprovar la diferencialitat de les bandes aïllades mitjançant la tècnica de *mRNA Differential Display*.

Les mostres es van separar electroforèticament en un gel d'agarosa al 1% (en H₂O DEPC + MOPS 20X (0,8 M MOPS, 200 mM acetat sòdic, 20 mM EDTA pH 7) + Formaldehid 35 %) a 100V durant 5 hores, amb MOPS 1X com a tampó d'electroforesi. Finalitzada l'electroforesi, el gel es va rentar en agitació succesivament amb solució desnaturalitzant (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) durant 15 min, amb aigua destil·lada, i amb solució

neutralitzant (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.2, 0.001M EDTA) durant 15 min més. Seguidament, es va ser transferir a una membrana de nitrocel.lulosa (Bio-rad Laboratories) tota la nit utilitzant SSC concentrat 20 vegades.

Northern blot hibridation

Les sondes utilitzades es van marcar radioactivament per *random priming* utilitzant l'activitat 5'-3' polimerasa del fragment Klenow de la DNA polimerasa I de E. Coli, amb el Kit Prime-a-Gene Labeling System (Promega Corporation, Madison, Wi). 25 ng de sonda foren incubats amb cebadors a l'atzar, ^{-32}P dCTP (5 μl), en presència del fragment Klenow de la DNA polimerasa I. La reacció es va dur a terme a 37-40°C durant 15 min.

Un cop finalitzada la reacció, la sonda marcada va ser purificada. La membrana es va prehibridar amb la solució d'hibridació *ExpressHybTM Hybridization Solution* (Clontech Laboratories, Inc.) i després es va rentar a temperatura ambient, amb SSC 2X/0,05% SDS 3 vegades durant 20 min, i a 50°C amb SSC 0,1X/0,1% SDS 2 vegades durant 20 min. Després dels rentats les membranes foren assecades i exposades a un film a -80°C durant tota la nit, per obtenir l'autoradiografia corresponent.

3.21 Screening d'una llibreria de cDNA de testicle de rata.

Es va utilitzar una llibreria de cDNA de testicle de rata construïda en vectors *gt11* (Clontech Laboratories, Inc.).

3.21.1 Sembrat i titulació de la llibreria

Es va procedir al *streaking* de 5 μl de la soca Y1090r⁻ del cultiu mare en 25% de glicerol proveït per la casa comercial, en una placa de LB agar lliure de MgSO₄ i contenint 50 mg/ml d'ampicil.lina. Aquesta placa va ser anomenada "placa mare". Després de ser incubades a 37°C durant tota la nit, es va seleccionar una colònia i es va sotmetre al mateix procediment, donant lloc a la "placa de treball" que va ser guardada a 4°C.

Una colònia aïllada de les crescudes en la placa de treball va ser inoculada en 10 ml de medi LB (Gibco BRL) suplementat amb MgSO₄ 10 mM i 0,2% de maltosa (sense

antibiòtics). Aquest inòcul va ser incubat en agitació, a 225 rpm i 37°C fins arribar a una O.D₆₀₀ de 2.0. Per un altre cantó, es van preparar una sèrie de dilucions del llisat del fag en tampó de dilució lambda 1x (5.83 g de NaCl 1M, 2,46 g de MgSO₄·7H₂O 0,1 M i Tris-HCl 0,35 M a pH 7,5) amb gelatina al 0,01%.

Aquestes dilucions es van barrejar amb 200 µl del cultiu que contenia la soca receptora i 100 µl del tampó lambda. Es van incubar a 37°C durant 15 min, se'ls va afegir 3 ml de *LB soft top agar* (Medi LB-agar amb MgSO₄ 10 mM) escalfat i es va barrejar be. Tot seguit, el contingut de la barreja va ser abocat en plaques de LB-agar amb MgSO₄ 10 mM. Les plaques van ser incubades a 37°C durant 10 hores aproximadament. El nombre de clapes trobades es va utilitzar per realitzar el títol de la llibreria fent servir la fórmula següent:

$$\text{Pfu/ml} = (\text{n}^\circ \text{ de clapes}/\mu\text{l utilitzats}) \times \text{el factor de dilució} \times 10^3 \mu\text{l/ml}$$

3.21.2 Screening

El procés d'hibridació pel *screening* de la llibreria de cDNA de testicle va ser realitzat en tots els casos amb sondes de DNA marcades amb ⁻³²P dCTP (5 µl) mitjançant el kit de random priming (Stratagene).

Paral·lelament es van seguir els següents procediments:

- per una banda es va picar una colònia aïllada de la placa de treball, es va inocular en 15 ml de medi LB (Gibco BRL) suplementat amb MgSO₄ 10 mM i 0,2% de maltosa (sense antibiòtics) i es va incubar a 37°C en agitació, a 225 rpm. Per una altra banda, basant-nos en el títol realitzat anteriorment, es van preparar dilucions de fag que continguessin de l'ordre de 10,000 unitat formadores de colònies per cada placa de petri de 90 mm de diàmetre.

A continuació es van barrejar 200 µl del cultiu bacterià amb les dilucions de fag i es van incubar a 37°C durant 15 min. Es van afegir 3 ml de LB soft top agarosa escalfat, es va barrejar be i es va abocar a una placa de LB-agar amb MgSO₄ 10 mM, que va ser incubada

a 37°C fins arribar al límit de confluència. Aquestes plaques van ser guardades a 4°C durant tota la nit.

Diferents membranes de nylon (Stratagene) van ser numerades i col·locades per sobre de les plaques que contenien les clapes de fag que havien infectat el cultiu bacterià durant 2 min. Seguidament van ser col·locades sobre un paper Whatman 3M prèviament mullat amb solució desnaturalitzant durant 30 seg. Llavors van ser col·locades sobre un altre paper Whatman 3M mullat amb solució neutralitzant durant 5 min, i finalment, van ser col·locades sobre un paper Whatman 3M mullat amb SSC 2x durant 20 seg.

A continuació es van deixar assecar a temperatura ambient i el DNA va ser fixat a la membrana mitjançant l'UV crosslinker (Stratalinker, Stratagene). De cada una de les membranes es va realitzar una rèplica. El procés d'hibridació es va fer utilitzant l'*ExpressHybTM Hybridization Solution* (Clontech Laboratories, Inc.), i es van seguir les instruccions d'ús descrites en l'apartat de Northern blot.

Es va realitzar un *re-screening* de les plaques fins aïllar clapes que només continguessin el cDNA d'interès. El DNA dels fags que contenien el fragment de cDNA d'interès va ser purificat seguint les instruccions del fabricant del kit Maxiprep MaxiKit (Quiagen, Hilden, Germany).

3.22 Hibridació “In situ” de mRNAs en seccions parafinades utilitzant sondes marcades amb digoxigenina.

Aquesta tècnica és útil per localitzar mRNAs en diferents teixits de manera més específica que quan s'utilitza marcatge radiactiu. Per cada mRNA van ser utilitzades dues sondes, una anti-sentit, que hibridarà complementàriament amb el RNA del teixit i, per tant, donaria marcatge positiu, i una sentit, que seria la que no donaria marcatge positiu.

Rdes antisentit 5' CAGCCCTCGAAATCAGTAGGGATATCCACATCGATGCCGTCCGCCCCG 3'

Rdes sentit 5' GTCGGGAGCTTTAGTCATCCCTATAGGTGTAGCTACGGCAGGCGGGGC 3'

HARP anti-sentit

5'CGGCTCTGGCTCCTCTCCTGGCCCTGGCTCCTCGGCAGAAAGCTGCTCCTCATCTGGGCACAGGCAAG 3'

Rat HRP sentit

5' GCCGAGACCGAGGAGAGAGACCAGGGACCGAGGAGCCGTATTTTCGAGGAGGAGTAGACCCGTGTCCGTTTC 3'

Els oligonucleòtids van ser marcats amb digoxigenina de la següent manera:

- en un microtubs es van afegir 4 µl de 5X tampó TdT (Boehringer-Mannheim), 4 µl de solució de CoCl₂ 25 mM, 1 µl de digoxigenina dUTP 1 mM, 1 µl de dATP 10 mM, 2 µl d'enzim terminal transferasa (50 U) i aigua destil·lada fins 20 µl.

A continuació van ser incubats a 37°C durant 15 min. i van ser transferides a 4°C. Les sondes marcades van ser precipitades per l'addició de 2,5 ml de LiCl 4M i 75 ml d'alcohol etílic fred al 100% a -80°C durant 5 hores.

Tot seguit es van centrifugar a 12000 rpm, a 4°C, durant 30 min, es va descartar el sobrenadant i els *pellets* es van rentar amb 250 µl d'alcohol etílic al 70%. Després es van centrifugar a 12000 rpm, a 4°C, durant 5 min, el sobrenadant es va ser descartar, es van ser assecar a temperatura ambient fins l'evaporació de l'alcohol etílic i es van resuspendre amb 20 µl d'aigua destil·lada,.

Les seccions es van desparafinar amb xilè 10 vegades durant 10 min i es van hidratar concentracions decreixents d'alcohol etílic (100%, 96%, 90%, 70% i 50% 2 vegades cadascun durant 5 min) i PBS 1X durant 5 min. A continuació les seccions es van pre-hibridar amb 150 µl de la barreja 1/1 (v/v) de tampó d'hibridació (SSC 10 M, Solució Denhardt 2 M, 10 mg/ml de DNA d'esperma de salmó desnaturalitzat, 10 mg/ml de tRNA de llevat i Sulfat Dextrà al 20%) i formamida deionitzada (Sigma), a 42°C durant 2 hores.

Es van afegir les sondes respectives (2 ng/µl) a la solució anterior i es va dur a terme la hibridació incubant a 42°C durant tota la nit.

Després de la hibridació, les seccions es van rentar en agitació amb SSC 2X a temperatura ambient durant 1 hora, SSC 1X a temperatura ambient durant 1 hora, SSC 0,5X a 37°C, dues vegades, durant 30 min..

Després de rentar les seccions, es van incubar amb el tampó 1 (Tri-HCl 100mM, NaCl 150 mM a pH 7,4) a temperatura ambient, durant 1 min i a continuació es van incubar amb aquest mateix tampó però afegint sèrum normal d'ovella al 2%, durant 30 min. Transcorregut aquest, temps les seccions es van incubar amb un anticòs anti-digoxigenina (Boehringer Mannheim) a 4°C, durant tota la nit.

L'endemà, les seccions es van ser rentar amb el tampó 1 a temperatura ambient, durant 30 min. Tot seguit, les seccions es van ser rentar amb el tampó 2 (Tris-HCl 0,2 M, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 0,05 M a pH 9,4) a temperatura ambient, durant 5 min.

El desenvolupament de color es va realitzar afegint 700 ml d'una solució de fosfatasa alcalina [4,5 µl de solució de NBT (75 mg de Clorur de NB (Boehringer Mannheim) en 1 ml de formamida deionitzada al 70 %); 3,5 µl de BCIP (50 mg de sal de toluidina BCIP (Boehringer Mannheim) en 1 ml de formamida deionitzada al 100%] per cada ml de tampó 2) deixant a temperatura ambient fins observar el viratge de color.

Un cop el color va virar suficientment, les seccions es van rentar amb tampó *stop* (Tris-HCl 100 mM, EDTA(Na)₂ 20 mM, i NaCl 150 mM, a pH 7-7,4) a temperatura ambient, durant 5 min. Seguidament, es van rentar amb PBS dues vegades, durant 5 min i es van muntar amb 40% de glicerol en PBS per a la seva visualització al microscopi.

