

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 MATERIAL CROMATOGRÀFIC I DE DERIVATITZACIÓ

3.1.1 Equipaments

Per a la separació a escala de grams es va treballar amb dos columnes: Una columna Flash Chromatography de vidre (Afora, l'Ametlla del Vallés, Barcelona) on s'empaquetaren les reïnes de bescanvi catiónic Macro Prep High S i bescanvi aniònic Macro Prep High Q (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA), amb 50 µm de diàmetre de partícula, 1000 Å de porus, 21×2,5 cm de diàmetre intern i 105 mL de volum de columna (VC). En una segona columna s'hi compactà una reïna hidrofòbica Amberlite® XAD-16, 560-710 µm de diàmetre de partícula, 800 m²/g d'àrea superficial, 45×4,5 cm de mida i 900 mL de VC (Rohm and Haas France SAS, Chauny, France).

Per a la purificació en aquesta escala s'emprà un equip cromatogràfic de fase reversa que constà d'un mòdul de bombeig Waters Prep LC 4000 (Millipore Corporation, Milford, MA, USA), un mòdul de pressió Waters Prepack 1000 i una columna Waters Prepack que contenia sílica derivatitzada Vydac C18 (The separations Group, Hesperia, CA, USA), 15-20 µm de diàmetre de partícula, 300 Å de porus i 30×4,7 cm de mida. A la sortida de la columna es va col·locar un distribuïdor de flux per a desviar un 2 % del mateix cap a un detector Merck-Hitachi L-4000 d'UV-Visible (E. Merck, Darmstadt, Alemanya). També s'emprà un altre equip de fase reversa amb una columna Perkin-Elmer C18, 25×2 cm de mida que utilitzà el mateix sistema de bombes anteriorment descrit.

Per a la separació a escala de mil·ligrams es treballà amb un sistema FPLC (Amersham-Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suècia). Les fases estacionaries emprades en bescanvi iònic, Macro Prep High S i High Q, van ser empaquetades en una columna Omnifit (Cambridge, Regne Unit), 70×10 mm de mida i 5,5 mL de VC. La reïna XAD-16 també s'empaquetà en una columna de vidre Omnifit, 42×1 cm de mida i 32 mL de VC.

A escala analítica es va fer servir un sistema cromatogràfic Smart System microPrep (Amersham-Pharmacia Biotech AB), equipat amb columnes de fase reversa µRPC C2/C18 SC 2,1/10, 3 µm de diàmetre de partícula, 120 Å de porus i 100×2,1 mm de mida, i de bescanvi catiónic Mono S PC 1,6/5, 10 µm de diàmetre de partícula i 50×1,6 mm de mida (Amersham-Pharmacia Biotech AB) amb detector d'UV-Visible que permet treballar en tres longituds d'ona alhora. També en fase reversa es va emprar un sistema Kontron Analytical LC 414

(Kontron Instruments, Basel, Suïssa) equipat amb un detector Uvikon LC 740 (Kontron Instruments), un integrador Merck-Hitachi D-2000 (E. Merck) i un injector Rheodyne (Cotati, CA, USA). La columna emprada va ser una Vydac C18 (The Separations Group), 5 µm de diàmetre de partícula, 300 Å de porus i 250×4,6 mm de mida.

Les mesures d'absorbància en UV-Visible es van realitzar en un espectrofotòmetre UV-265, UV-visible Recording (Shimadzu, Kyoto, Japó).

Les mesures de ressonància paramagnètica electrònica (electronic paramagnetic resonance, EPR) van ser realitzades en un espectròmetre Varian (Palo Alto, CA, USA) E-109 treballant en la banda X i variant les condicions segons l'experiment.

Per a l'obtenció dels espectres de RMN-¹H es van emprar els equips Varian model Unity 300 i 500 (Varian, Palo Alto) de 300 MHz i 500 MHz, respectivament.

Per a les proves d'espectrometria de masses es va emprar un espectròmetre quadrupolar Navigator (Finnigan, MassLab Group, Manchester, UK) en mode d'ionització electrosprai positiu a 3,5Kv i voltatge de conus 50v. El flux d'injecció fou de 50 µL/min en CH₃CN/H₂O (3:2), la temperatura de la font de 120°C i el flux de nitrogen de 120 L/h.

L'anàlisi elemental en la composició de C, H, N i S va ser realitzat en el Servei de Microanàlisi del Institut d'Investigacions Químiques i Ambientals de Barcelona (IIQAB-CSIC).

Les mesures de pH es van realitzar en un pH-metre Crison micro pH 2001 (Alella, Espanya).

3.1.2 Reactius i dissolvents

L'aigua emprada per a cromatografia analítica i a escala de mil·ligrams va ser de qualitat Milli-Q, mentre que per a cromatografia a escala de grams fou desionitzada i filtrada mitjançant un filtre de membrana amb 0,45 µm de diàmetre de porus. L'àcid trifluoroacètic (TFA) emprat fou de qualitat per a síntesi (Fluorochem, Derbyshire, UK) destil·lant-se al laboratori prèviament a la seva utilització. Per a la cromatografia analítica i a escala de mil·ligrams es va fer servir acetonitril (CH₃CN), metanol (MeOH) i tetrahidrofurà (THF, E. Merck), tots tres de qualitat HPLC, i etanol absolut (EtOH, E. Merck) filtrat mitjançant un filtre de membrana amb 0,45 µm de diàmetre de porus. En les purificacions per HPLC a escala de grams s'emprà CH₃CN de qualitat preparativa (Sharlau Chemie S.A., Barcelona, Espanya), i EtOH (Alcoholes Montplet S.A., Barcelona, Espanya).

Per a la despolimerització dels diferents extractes s'empraren els nucleòfils hidroclorur de cisteamina, hidroclorur de L-cisteïna, èster etílic d'hidroclorur de L-cisteïna i N-acetil-L-cisteïna (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemanya). A escala analítica i de mil·ligrams es va fer servir MeOH de qualitat HPLC (E.Merck). A major escala es va emprar MeOH per a anàlisi (Panreac Química S.A., Montcada i Reixac, Espanya). En tots els casos es va fer servir HCl fumant al 37 % (v/v) (E.Merck).

Per a la mesura de l'activitat antioxidant, es treballà amb els reactius Trolox 97 % (Aldrich, Milwaukee, USA) i els radicals lliures 1,1-difenil-2-picrilhidracil 95 % (DPPH) (Aldrich, Gillingham-Dorset, Regne Unit) i el tris(2,4,6-tricloro-3,5-dinitrofenil)metil (HNTTM) sintetitzat pel Laboratori de Materials Orgànics Halogenats (IIQAB-CSIC, Barcelona, Espanya). La (-)-epicatequina i l'epigallocatequin 3-O-galat foren de Sigma.

Les anàlisis de RMN-¹H es van fer en acetona completament deuterada i en presència d'aigua deuterada, ambdues de SDS (Peypin, França).

Pels assaigs enzimàtics s'emprà el reactiu 1,4-ditio-DL-treitol (DTT) de Fluka (Buchs, Suïssa) i l'enzim papaïna del cru de *Papaya latex* (EC 3.4.22.2, 1.8 U mg⁻¹) de Sigma Chemical CO (St. Louis, MO, USA).

3.1.3 Preparació de tampons i dissolucions

En la preparació de tampons, s'emprà àcid orto-fosfòric per a anàlisi al 85 % (E.Merck), trietilamina (TEA, Calbiochem-E.Merck, Darmstadt, Alemanya), clorur sòdic (NaCl) i hidròxid de sodi (NaOH) per a anàlisi (Carlo Erba reagenti, Milà, Itàlia), àcid acètic glacial 100 % (E. Merck), àcid trifluoroacètic (SDS, Peypin, França) destil·lat al laboratori, àcid cítric 1-hidrat i hidrogen fosfat de sodi (Panreac).

- Per a la preparació d'un litre de tampó d'acetat de sodi 200 mM a pH 4,75, es va afegir àcid acètic glacial 100% (11,4 mL) a l'aigua Milli-Q (990 mL). Seguidament, s'addicionaren gotes d'una solució de NaOH 20 M fins al pH desitjat (controlat amb pH-metre). El tampó es va filtrar al buit amb filtre de diàmetre de porus de 0.45 µm.
- Per a la preparació d'un litre de tampó fosfat sòdic 200 mM, es va dissoldre l'àcid orto-fosfòric (13,5 mL) en aigua Milli-Q. El pH s'ajustà addicionant una solució concentrada de NaOH fins a un valor de pH 2,26. El tampó es va filtrar com l'anterior.

- Per a preparar tampó fosfat de trietilamina (TEAP) a pH 2,25 ó 5,45 s'afegí àcid ortofosfòric (75 mL ó 30 mL, respectivament) i TEA (85 mL ó 65 mL, respectivament) a un volum d'aigua de 12 L. La mescla es va fer amb agitació i controlant el pH amb el pH-metre. En ambdós casos, es va emprar aigua desionitzada i filtrada en filtre de 0,45 µm.
- Per a la solució d'àcid trifluoroacètic (TFA) 0,10 %, s'emprà aigua desionitzada i filtrada amb filtre de 0,45 µm per al HPLC a escala de grams i aigua Milli-Q per al HPLC analític i a escala de mil·ligrams. S'afegí TFA (1 mL) per litre d'eluent.
- Per a la solució NaCl 5 M, es dissolgué NaCl (292,2 g) en aigua Milli-Q (fins a un volum de 1 L) i es filtrà al buit amb un filtre de 0,45 µm.
- Per a les reaccions enzimàtiques es preparà un tampó citrat 100 mM i els diferents pH de treball foren ajustats amb una solució concentrada de NaOH.
- Per preparar el tampó Mc Ilvaine 80 mM pH 6,6 1,5 mM EDTA, es barrejà àcid cítric 0,1 M (27,2 mL) amb hidrogen fosfat de sodi 0,2 M (72,8 mL). Es dissolgué l'EDTA fins a una concentració final de 1,5 mM i s'ajustà el pH a 6,6.

3.2 MATERIAL PER A BIOLOGIA CEL·LULAR

3.2.1 Equipaments

Tots els assaigs de cultius cel·lulars es van realitzar sota campana de flux laminar i condicions de màxima esterilitat, menys quan s'indiqui el cas contrari. Les incubacions dels cultius cel·lulars es van portar a terme en un incubador Forma Scientific a una temperatura de 37°C, amb una humitat relativa del 90 % i atmosfera del 5 % de CO₂. Les centrifugacions dels cultius cel·lulars es van realitzar en una Centrífuga Heraeus Megafuge 2.OR (Heraeus Instruments, Osterode, Alemanya).

El comptatge cel·lular es realitzà mitjançant una Càmera de Neubauer (Brand, Wertheim, Alemanya).

Les mesures d'absorbància de les plaques de 96 pous es van realitzar utilitzant un espectrofotòmetre amb lector de plaques de Merck ELISA System MIOS versió 3.2.

Les anàlisis del cicle cel·lular i d'apoptosi per *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) van ser realitzades emprant un citòmetre de flux Epics XL (Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA).

L'excitació de la mostra s'efectuà emprant un làser ió-argó sintonitzat a 488 nm, de 15 mW de potència. La fluorescència vermella (675 nm) del iodur de propidi (IP) es captà amb un filtre dicroic de 645 nm, permetent un pas de banda a 675 nm. La fluorescència verda (525 nm) del anticòs conjugat amb FITC es captà amb un filtre dicroic de 550 nm, permetent un pas de banda de 525 nm. Els paràmetres utilitzats per a seleccionar les poblacions cel·lulars van ser els de grandària (*Forward scatter*, FS) i complexitat cel·lular (*Side scatter*, SS). Així, els agregats van ser exclosos mitjançant els valors d'àrea *versus* la senyal de fluorescència. Els resultats es tractaren mitjançant el programa Epics ELITE, propi del citòmetre en ús. Finalment, l'anàlisi de l'ADN (anàlisi del cicle cel·lular) realitzat en un diagrama de fluorescència es portà a terme utilitzant el software Multicycle (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA).

L'anàlisi d'escaneig amb làser pel *laser scanning cytometry* (LSC) va ser utilitzada, principalment, per a visualitzar cèl·lules apoptòtiques i poder contrastar així els resultats obtinguts en el FACS. En aquest cas, l'excitació de la mostra es realitzà emprant un làser d'argó, de 20 mW de potència, a 488 nm. Les fluorescències vermella i verda foren adquirides de la mateixa manera que en el FACS. El LSC incorporà un microscopi Olympus BX50 (Olimpus, Japó) amb objectius de 10x, 20x, 40x i 40x amb platina automatitzada, 2 càmeres de vídeo Sony CCD amb monitor 20" i un software Wincyte de relocalització de cèl·lules.

Per a l'observació de la tinció amb Hoechst s'emprà un microscopi de fluorescència vertical Leica (Leica microsystems, Wetzlar, Alemanya) DMRB, amb objectius PL APO 63x/1.32 d'oli PH3 i amb filtre de UV. Les imatges foren captades a través d'una càmera digital Cooled CCD Micromax del format RTE 782-Y i analitzades amb el software Metamorph (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA, USA).

Per a l'extracció de l'ADN, les mostres s'escalfaren en un bloc sec (JP Selecta SA, Abrera, Espanya). La puresa de l'ADN es va mesurar mitjançant un espectrofotòmetre. El gel d'agarosa va ser muntat en un tanc d'electroforesi BioRad Sub-Cell GT Mini (BioRad Laboratories) i connectat a un generador BioRad PowerPac 300 (BioRad Laboratories). La fragmentació de l'ADN va ser visualitzada mitjançant un equip de transiluminació d'UV (Vilber Lourmat, Marine-la-Vallée, França) i la imatge va ser captada per un processador de vídeo Mitsubishi P91 (Mitsubishi, Kyoto, Japó) a través d'una càmera (JAI Corporation, Yokohama, Japó).

3.2.2 Reactius i dissolvents

El sèrum fetal boví (FBS) va ser subministrat per PAA Laboratories GmbH (Pasching, Àustria). Tripsina-EDTA solució C (es va emprar a concentracions 0,05% tripsina i EDTA 1:5.000 en PBS) van ser subministrats per Biological Industries (Beit Haemek, Israel). El tampó fosfat salí de Dulbecco (PBS), el bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazoli (MTT), el dimetil sulfòxid (DMSO), la L-glutamina i l'isopropanol 99 % foren de Sigma. La solució ja preparada de blau tripan (*Trypan blue solution* 0,4 %) i el detergent no iònic Igepal CA-630 van ser subministrats per Sigma Chemical CO. El Kit d'anexina V/FITC per a realitzar les proves apoptòtiques fou de Bender MedSystems (MedSystems Diagnostics GmbH, Viena, Àustria) el qual inclou el tampó *binding buffer* 4×. Pel tampó TBE s'emprà Tris (Trizma-base), àcid bòric i sal dihidratada d'EDTA subministrats per Sigma. La RNasa pancreàtica bovina i l'agarosa MP van ser subministrats per Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemanya). El kit d'extracció de l'ADN (Realpure) per a estudiar la fragmentació va ser subministrat per Durviz s.l. (Paterna, Espanya). El marcador de l'ADN de 1 kb i la solució Load Dye foren de Promega (Madison, WI, USA).

Per a la tinció amb Hoechst s'emprà el colorant nuclear Hoechst (bisBenzimide H33258, de Sigma), metanol i mowiol (Calbiochem) preparat amb glicerol i Tris als Serveis Científico-Tècnics (SCT, Parc Científic, Barcelona, Espanya).

Per a esterilitzar les solucions dels productes a estudiar es van emprar filtres de 0,2 µm de porus (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Alemanya). Tot el material de cultiu emprat va estar subministrat per Techno Plastic Products AG (TPP, Trasadingen, Suïssa). Les xeringues emprades per a l'aspiració de medi i la filtració van ser subministrades per Pentaferte (Campi, Itàlia).

3.2.3 Preparació de tampons i dissolucions

- Per a la inactivació del sèrum fetal boví (FBS), aquest es descongelà en un bany a 37°C. Un cop descongelat es va mantenir fora del bany, mentre s'incrementava la temperatura del bany fins a 55°C. Assolida la temperatura, s'introduí el FBS al bany durant 45 min per a la seva inactivació. Finalment, s'aliquotà en fraccions de 50 mL i es conservà a -20°C.
- La solució de bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazoli (MTT) de 1 mg/mL es preparà diluint-la en PBS. Les solucions resultants es protegiren de la llum. S'agità

enèrgicament amb un agitador magnètic per aconseguir una dissolució completa i es reservà a 5°C. Abans de la seva utilització, es filtrà amb porus de 0,2 µm. S'aconsella no utilitzar aquesta solució més enllà d'una setmana després de la seva preparació.

- El tampó TBS 1× consisteix en una solució 10 mM de Tris i 150 mM de NaCl a pH 7,4. Per a portar-la a terme es barrejà Tris (1,21 g) amb NaCl (8,775 g), addicionant aigua Milli-Q fins un volum de 1 L.
- El tampó TBS per a Vindelov 10× constà de 100 mM de Tris i 100 mM de NaCl. Es barrejà Tris (1,21 g) amb NaCl (0,584 g), addicionant aigua Milli-Q fins un volum de 100 mL.
- Per a preparar tampó Vindelov (10mL) s'addicionà tampó TBS per a Vindelov (1 mL), iodur de propidi (0,5 mL, d'una solució 1 mg/mL), estoc RNasa (10 µL, d'una solució 10 mg/mL) i el detergent no iònic Igepal CA-630 (10 µL). S'enrassa amb aigua Milli-Q tot afegint unes gotes de HCl 37 % (v/v) fins assolir el pH de 8 mesurat per tires indicadores (Riedel-de Haën AG, Seelze) (Comin-Anduix *et al.*, 2001).
- Per a l'estoc RNasa lliure de DNasa, es diluí la RNasa pancreàtica a una concentració final de 10 mg/mL en una solució de 10 mM de Tris-HCl pH 7,5 i 15 mM de NaCl. S'escalfà a 100°C, 15 min, i es va deixar refredar lentament a temperatura ambient. Finalment, s'aliquotà en fraccions de 50 µL, conservant-la a -20°C. Adaptat del manual Maniatis *et al.* (Maniatis *et al.*, 1989)
- El tampó *binding buffer* 1×: La casa comercial Bender MedSystems el proporciona 4×, pel que cal diluir-lo amb tres volums d'aigua Milli-Q.
- El tampó TBE (Tris 0,45 M- borate 0,45 M) 5× (1 L) es preparà diluint 54 g de Tris i 27,5 g d'àcid bòric en una solució d'aigua Milli-Q (980 mL) i 20 mL EDTA 0,5 M. El pH que assoleix el tampó és de 8,5. Es treballarà amb el tampó TBE 0.5× diluït amb aigua Milli-Q i ajustat a pH 8 amb HCl al 37 %.
- La solució Hoechst de 500 ng/mL en PBS es preparà a partir d'un estoc de 10 µg/mL, el qual es va obtenir en fer una dilució 1/100 a partir de la solució inicial (1 mg/mL de Hoechst en PBS). Les solucions es guardaren a -20°C i protegides de la llum.

3.3 PREPARACIÓ DE DERIVATS DE FLAVANOLS I CARACTERITZACIÓ QUÍMICA

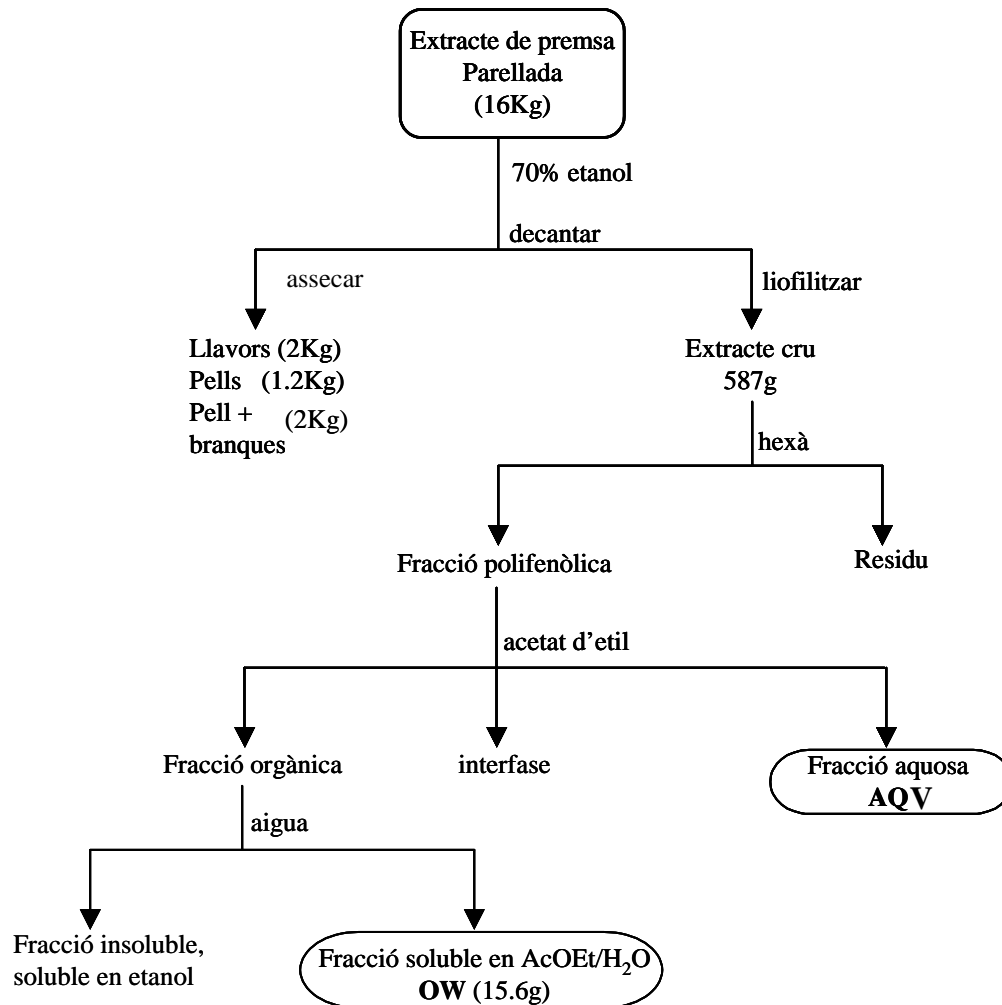
3.3.1 Obtenció de les fraccions que contenen procianidines

Diverses fonts naturals són les que s'han emprat per a obtenir compostos bioactius, depenent de les característiques del subproducte. Així, es començà amb un subproducte de premsat de raïm (*Vitis vinifera*), el qual contenia unitats flavanòliques amb i sense grups galats. Després ens interessà una font natural que no presentés èsters de galats (*Pinus pinaster*) i finalment una altre que estigués extensament esterificada amb galats (*Hamamelis virginiana*). La importància dels productes majoritaris de cadascuna de les fraccions està descrit i discutit al llarg del treball.

3.3.1.1 Fraccions de *Vitis vinifera*

La font d'obtenció d'aquestes procianidines fou la part residual d'un primer premsat del raïm de varietat Parellada (*Vitis vinifera*), cedit per les Bodegas Miguel Torres, S.A. (Vilafranca del Penedès, Espanya) el qual fou extret i posteriorment fraccionat (Esquema 1) tal com es descriu a Torres *et al.* (Torres *et al.*, 2001a)

La fracció OW conté majoritàriament flavanols monomèrics i oligomèrics, compostos relativament petits i amb caràcter dual hidrofílic i hidrofòbic, pel que són solvatats eficientment pel dissolvent orgànic i també per l'aigua. És una fracció rica en els monòmers de (-)-epicatequina (**1**), (+)-catequina (**2**) i flavonols glicosilats. La fracció AQV, en canvi, conté gran quantitat de material polimèric, principalment procianidines solubles només en aigua.



Esquema 1. Esquema de l'obtenció de les fraccions de partida OW i AQV mitjançant diverses extraccions amb solvents orgànics a partir d'un primer extracte de premsa de *Vitis vinifera*.

3.3.1.2 Fraccions de *Pinus pinaster*

La font d'obtenció va ser el subproducte de aserradores del pi (*Pinus pinaster*) cedit per Manuel Bouzas S.A. (Vedra, A Coruña, Espanya). Els petits trossos de troncs van ser molturats per a la posterior extracció.

3.3.1.3 Fraccions d'*Hamamelis virginiana*

La font d'obtenció foren troncs de l'arbust de varietat *Hamamelis virginiana* proveïda per Martin Bauer GMBH (Alveslohe, Alemanya). Els troncs, de mida petita, foren emprats directament per l'extracció del material d'interès.

3.3.2 Despolimerització àcida de proantocianidines en presència de tiols

En medi àcid, les proantocianidines es despolimeritzen generant intermedis monomèrics catiónics, els quals evolucionen fins formar les antocianidines (Matthews *et al.*, 1997). Si en el medi de despolimerització es troba un nucleòfil, aquest pot reaccionar amb el primer intermedi catiónic que es forma i donar un monòmer derivat en la posició C-4 (veure Figura 5) (Dangles *et al.*, 2000; Ferreira, 1999).

3.3.2.1 *Vitis vinifera*

3.3.2.1.1 *Tractament de la mostra de Vitis vinifera a escala analítica*

A partir de la fracció OW (apartat 3.3.1.1), es portà a terme la despolimerització segons el mètode descrit a Souquet *et al.* (Souquet *et al.*, 1996): una porció de la fracció OW liofilitzada (200 µg) es va dissoldre en MeOH (200 µL) i es barrejà amb un volum equivalent del reactiu despolimeritzador, en aquest cas s'empraren cisteïna i derivats de cisteïna (50 mg) dissolts en MeOH (930 µL) i HCl 37 % (v/v) (20 µL). Per a afavorir la reacció, la barreja es va escalfar en un bany a 60°C durant 20 min. La solució resultant es diluí 1/4 en aigua Milli-Q.

En els diferents escalats que es descriuen a continuació, es treballà amb el mateix protocol tot escalant les quantitats emprades excepte la del tiol, que va ser 10 vegades menor que l'utilitzat a escala analítica.

3.3.2.1.2 *Tractament de la mostra de Vitis vinifera a escala de mil·ligrams*

Es barrejà la fracció OW liofilitzada (770 mg) amb MeOH (50 mL) i s'afegí a una solució del aminoàcid (2,6 g) i HCl 37% (1,5 mL) en MeOH (50 mL). Un cop acabada la reacció, la mostra despolimeritzada es diluí 1/5 amb aigua, obtenint-se una concentració aproximada de 1,5 mg/mL de tiol derivats.

3.3.2.1.3 *Tractament de la mostra de Vitis vinifera a escala de grams*

A escala de grams es treballà amb la fracció AQV (veure apartat 3.3.1.1). El solvent present en la fracció aquosa AQV (que conté aigua i acetat d'etil) va ser eliminat d'una alíquota de 400 mL (4 g d'equivalents d'àcid gàl·lic, ~ 6 g de polifenols en pes). El residu resultant es va redissoldre en MeOH (400 mL) i es tornà a evaporar. Aquesta operació es repetí tres cops per tal d'enriquir-lo en el dissolvent de reacció. Finalment, el residu es diluí en MeOH (400 mL) i se li addicionà una solució del reactiu cisteïníc (20 g) i 37% HCl (10 mL) en MeOH (400

mL). La barreja es va mantenir a 65°C durant 20 min sota agitació. La reacció va ser aturada amb aigua destil·lada i filtrada (3,2 L), obtenint-se una solució amb ~1,5-2 g/L de polifenols derivats. El cru de reacció conté altres tipus de materials, principalment sucres en una quantitat estimada de ~60 g i ~15 g de tiol no reaccionat.

3.3.2.2 *Pinus pinaster*

3.3.2.2.1 *Tractament de l'escorça de Pinus pinaster a escala de grams*

A partir de l'escorça de pi, aquesta es molturà fins obtenir uns 200 g. S'addicionà aigua destil·lada i filtrada (1,2 L) acidificada amb HCl 37 % (10 mL) i s'escalfà fins a 90°C de temperatura sota atmosfera de N₂ per a minimitzar l'ambient oxidant. Un cop assolida la temperatura d'extracció, s'addicionà la L-cisteïna (33,1 g, dissolts en aigua) i es mantingué en reflux durant 2 h. Seguidament es refredà i la solució resultant es filtrà al buit.

3.3.2.3 *Hamamelis virginiana*

3.3.2.3.1 *Tractament de l'escorça d'Hamamelis a escala de mil·ligrams*

S'optimitzaren les condicions d'extracció intentant minimitzar el volum d'aigua i la quantitat de tiol. Així, a partir de tronquets d'*Hamamelis* (3,15 g) es realitzà l'extracció amb aigua destil·lada i filtrada (diversos volums) acidificada amb HCl 37 % (v/v) a 90°C sota N₂. Un cop assolida la temperatura d'extracció, s'addicionà la L-cisteïna i es mantení en reflux durant 2 h. Seguidament es refredà i la solució resultant es filtrà.

3.3.2.3.2 *Tractament de la mostra d'Hamamelis a escala de grams*

Per raons de seguretat a la hora de manipular grans quantitats de volums, l'extracció i tiòlisi es dividí en vuit etapes idèntiques. Cadascuna d'elles contenia troncs fins d'*hamamelis* (400 g), aigua destil·lada i filtrada (2 L) i HCl 37 % (15 mL). La barreja s'escalfà en un baló de 5 L amb tres boques fins a 90°C amb reflux i atmosfera de N₂. Un cop assolida la temperatura, s'addicionà la L-cisteïna (50 g, ja dissolta en 200 mL d'aigua) i es deixà a 90°C durant 2 h, amb agitacions periòdiques. Es refredà i filtrà al buit. La solució resultant es reservà a 4°C i protegida de la llum.

3.3.3 Estudi de les condicions de separació per bescanvi iònic

Inicialment es portà a terme un estudi previ a escala analítica per a triar el tipus d'eluent i la seva proporció per a la realització del bescanvi. Les millors condicions s'optimitzaren per a les diferents reïnes emprades en els escalats.

3.3.3.1 Separació a escala analítica

S'estudiaren els perfils cromatogràfics en diverses condicions d'elució, sent aquestes:

Columna: Mono S Pc 1,6/5; 0,1 mL VC
Eluents [A]: 20 mM de tampó, co-sovent/aigua Milli-Q^(*)
[B]: 20 mM de tampó, co-sovent/aigua Milli-Q^(*); 1 M NaCl
Gradient: 0 → 100 % [B], 20 VC (2 mL)
Flux: 100 µL/min. Detecció a 214, 280 i 320 nm; aufs variable

A partir dels tampons preparats segons s'indica a l'apartat 3.1.3, es feren els eluents [A] i [B], on ^(*) significa que el tipus de co-solvent i la seva proporció va anar variant (veure apartat 4.1.2 de Resultats). S'injectà 20 µL de barreja despolimeritzada diluïda 1/4 amb aigua Milli-Q i 0,1 %TFA.

3.3.3.2 Separació a escala de mil·ligrams

El fraccionament cromatogràfic per bescanvi iònic es portà a terme mitjançant el sistema cromatogràfic de FPLC per a optimitzar les condicions d'elució a escala de mil·ligrams. La reïna que s'emprà (Macro Prep High S i High Q, pel bescanvi catiònic i aniònic respectivament) fou la mateixa que s'utilitzà, més endavant, en l'escala de grams.

L'estudi es va portar a terme en les següents condicions d'elució:

Columna: Macro Prep High S o High Q 50 µm; 5,5 mL de VC
Eluents: 20 mM tampó, etanol/aigua Milli-Q^(*) a diferent concentració de NaCl
^(*)el tampó i les quantitats d'etanol són indicades a l'apartat 4.2
Gradient: 0 → 100% [B], 20 VC (120 mL)
Flux: 2 mL/min. Detecció a 254 nm; aufs variable

La càrrega òptima per a aquesta columna fou de 25 mL de cru de despolimerització (50 mg de flavanols derivats).

3.3.3.3 Separació a escala de grams

La separació es va realitzar en una columna de vidre tipus flash de 21×2,5 cm i una altre de 45×4,5 cm de mida, empaquetades amb reïna Macro Prep High S fins un volum de columna de 105 mL i 900 mL respectivament. Es feu un rentat previ a la columna amb una solució 0,5 M de NaOH en H₂O/EtOH (1:1) i, seguidament, s'equilibrà amb una solució H₂O/EtOH (4:1). Un cop la reïna va ser equilibrada amb un tampó de rentat inicial que diferí segons les condicions pròpies per a cada elució, es carregà la fracció aquosa despolimeritzada i s'aplicà els diferents criteris d'elució. Es recolliren dues fraccions d'interès, on els derivats tiolitzats es trobaren en la segona fracció.

3.3.4 Separació per hidrofobicitat mitjançant una reïna Amberlite XAD16

3.3.4.1 Separació a escala de mil·ligrams

S'emprà una reïna d'adsorció hidrofòbica porosa (Amberlite XAD-16). Es buscaren les condicions d'elució òptimes per a la retenció dels productes d'interès.

Columna: Flash (42×0,5 cm) contenint XAD-16 (32 mL de VC)

Eluents : 0,2 % àcid acètic en H₂O Milli-Q

0,2 % àcid acètic en H₂O Milli-Q /EtOH (1:4)

Gradient: diversos isocràtics (0; 12,5; 25; 37,5 i 50 %) d'àcid acètic/EtOH (1:4)

Flux: 2 mL/min. Detecció a 254 nm; 0,1 aufs

El rentat final de la reïna es realitzà amb 100% d'àcid acètic/EtOH (1:4) i H₂O Milli-Q/acetona (2:3).

3.3.4.2 Separació a escala de grams

S'escalà unes 25 vegades les condicions trobades a escala de mil·ligrams. La separació es va realitzar en una columna de vidre tipus flash de 45×4,5 cm de mida, empaquetada amb reïna XAD-16 fins un volum de columna de 900 mL. Es feu un rentat previ a la columna amb una solució desgasificada de H₂O/EtOH (1:4) i, seguidament, s'equilibrà amb una solució de H₂O destil·lada i filtrada en 0,5 % d'àcid acètic. Es carregà tota la fracció despolimeritzada (2,4 L) i es recolliren dos fraccions emprant diferents isocràtics, tal com es mostra a l'apartat 4.3.3.1. Tots els eluents foren desgasats, i el flux va ser de 50 mL/min sense l'ús de pressió externa.

3.3.5 Anàlisi cromatogràfica i separació per fase reversa

3.3.5.1 Anàlisi a escala analítica

Es va estudiar el perfil cromatogràfic dels crús i fraccions mitjançant dos sistemes analítics de fase reversa amb columnes Vydac C18 i μ RPC.

Columna: Vydac C18

Eluents [C]: 0,10 %(v/v) TFA en H₂O Milli-Q

[D]: 0,09 %(v/v) TFA en H₂O Milli-Q /CH₃CN (1:4)

[D']: 0,09 %(v/v) TFA en H₂O Milli-Q /CH₃CN (2:3)

Gradient: variable

Flux: 1,5 mL/min. Detecció a 214 nm; 0,002; 0,016 ó 0,064 aufs

Columna: μ RPC C2-C18 SC 2,1/10

Eluents [C] i [D] con l'anterior

Gradient: variable

Flux: 200 μ L/min. Detecció a 214, 280 i 320 nm; 0,086 ó 0,30 aufs

3.3.5.2 Separació per fase reversa a escala de grams

S'utilitzà una columna de sílica derivatitzada Vydac C18 de 30×4.7 cm de mida amb flux de 100 mL/min, i una columna Perkin-Elmer C18 de 25×2 cm de mida amb flux de 10 mL/min. Els eluents emprats en aquesta columna (anomenats [E] i [F] en la secció de Resultats) i el gradient foren variables. La detecció es realitzà a 230 nm; 2,5 aufs. Les fraccions a carregar foren evaporades o diluïdes.

3.3.6 Purificació i caracterització dels productes

La purificació de cada producte es va realitzar mitjançant els HPLC destinats a l'escalat de mil·ligrams i de grams, ambdós de fase reversa, i emprant condicions d'elució amb gradient o isocràtiques amb CH₃CN en el medi aquós adequat (0.1%TFA o TEAP de pH 2,25 i 5,46). Les fraccions recollides i que s'havien de tornar a carregar, es diluïren al doble de volum amb H₂O destil·lada i filtrada.

El seguiment analític de les fraccions es va fer amb una columna Vydac C18 (veure apartat 3.3.5.1) tot emprant condicions isocràtiques a 11% [D] per a l'anàlisi del conjugat **7**, 8% [D] pel **8**, 17% [D] pel **9**, 19% [D] pel **10** i **11**, 21% [D] pel **12**, 17% [D] pel **13** i **14** i 22% [D] pel **15**.

Per a enregistrar els espectres de RMN-¹H dels productes purificats, es van fer dissolucions de concentració 10 mg/mL fent servir acetona deuterada com a dissolvent amb 3-4 gotes de D₂O i el TMS com a patró intern en el Varian de 300 MHz menys quan s'indiqui el contrari. Altres productes van ser analitzats amb menys quantitat de mostra emprant el Varian de 500 MHz.

Els ions moleculars dels productes purificats es van obtenir per espectroscòpia de masses en mode electrosprai (del tipus positiu pels compostos amb càrrega neta positiva i del tipus negatiu pels neutres).

3.3.7 Hidròlisi enzimàtica de l'èster carboxílic dels derivats amb NAMC

L'enzim papaïna (1,22 mg, 58 µM) i el DTT (60 µg, 58 µM) es van dissoldre en el tampó Mc Ilvaine (940 µL). En aquest medi de reacció se li afegí el producte **13** (5,6 mg, 12 mM) i es feu reaccionar a 25°C sota atmosfera d'argó i agitació durant 24 h.

3.3.8 Deuteració en hidrògens làbils

Els experiments d'intercanvi de deuteris van ser realitzats en un espectròmetre Unity-300 emprant una solució de D₂O/acetona-*d*₆ (amb 100% de grau de deuteració, 3:1 v/v) tamponat a pD = 6 (mesurat amb un elèctrode estàndard de pH) amb clorur d'amoni deuterat (150 mM de concentració final en la barreja). Tot el material emprat va ser cuidadosament netejat amb solvent deuterat per a eliminar qualsevol traça d'hidrogen. Els compostos (aproximadament 5 mg) van ser dissolts en 0,75 mL de la mescla tampó deuterada (concentració dels compostos entre 15 i 20 mM) just abans de començar l'adquisició de RMN. Els espectres van ser adquirits a 30°C mitjançant polsos d'amplada curta (15°) i 32 escans (per a cada valor de la cinètica) amb un temps entre polsos consecutius de 4 s per tal d'assegurar-nos que recupera les condicions inicials i tenir integrals similars per a tots els espectres.

3.3.9 Avaluació de l'activitat antioxidant/antiradicalària

L'activitat dels compostos derivats com agents antiradicalaris va ser avaluada mitjançant els mètodes dels radicals lliures 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH) (Blois, 1958; Brandwilliams *et al.*, 1995) i tris(2,4,6-tricloro-3,5-dinitrofenil)metil (HNTTM) (Torres *et al.*, 2003).

En l'assaig del DPPH es mesurà la capacitat de donar àtoms d'hidrogen i s'emprà un anàleg hidrofílic de la Vitamina E (Trolox) com a control positiu. Primerament es preparà la solució de DPPH (4,8 mg) en MeOH (200 mL). Per una altra banda, es preparà una solució mare de 1 mg/mL de cadascun dels derivats, de la qual es feren diverses alíquotes de concentració final diferent. D'aquestes alíquotes, un volum de 0,1 mL va ser addicionat a la solució de DPPH (3,9 mL), obtenint barreges de concentració diferent. Les barreges s'incubaren a les fosques durant una hora a temperatura ambient. La concentració inicial del DPPH, aproximadament de 60 μ M, va ser calculada en cada experiment a partir d'una corba de calibració, feta prèviament amb diverses concentracions estàndards de DPPH i mesurant la seva absorbància a 517 nm. L'equació de la corba de calibració va ser $Ab_{517nm} = 11345 \times C_{DPPH}$, determinada per regressió linear.

En l'assaig realitzat amb el radical lliure HNTTM es mesurà exclusivament la capacitat de transferència electrònica. S'emprà un espectròmetre d'EPR que treballà a la banda X, una potencia de microona de 20 mW i l'amplitud de modulació de 3,2 G. Els compostos a ser avaluats van ser dissolts en CH₃Cl/MeOH (2:1) a concentracions similars al estudi anterior. Una alíquota (1 mL) de cada condició s'addicionà a una solució del radical estable HNTTM (1 mL, 120 μ M in CH₃Cl/MeOH (2:1)) i la barreja fou incubada durant 30 min. La concentració inicial del radical, aproximadament 60 μ M, fou calculada per a cadascun dels experiments a partir de corbes de calibració. Aquestes corbes es realitzaren mesurant la intensitat (I_0) de la senyal d'EPR (distància linear entre pics) amb patrons de HNTTM a diferents concentracions. Les equacions de les corbes foren $I = 1,980 \times C_{\text{radical}}$ ó $I = 2,262 \times C_{\text{radical}}$ depenent del experiment.

Per a ambdós assaigs la concentració inicial dels antioxidants va estar compresa entre 1 i 40 μ M. Els resultats es representaren com el grau de desaparició de l'absorbància a 517 nm ($[1 - (A/A_0) \times 100]$, en l'assaig del DPPH) o de la senyal d'intensitat ($[(1-I/I_0) \times 100]$, en l'assaig de HNTTM) *versus* els μ mol de mostra dividit pels μ mol del radical inicial (DPPH o HNTTM respectivament). Cada punt va ser obtingut per triplicat. Es va obtenir una corba dosis-resposta per a cada producte. El resultat va ser expressat com la dosi eficient ED₅₀, donada

com els μmols de producte capaç de reduir la meitat de la quantitat del radical lliure dividit pels μmols del radical inicial.

3.4 EXPERIMENTS *IN VITRO*

3.4.1 Cultius cel·lulars

3.4.1.1 Línies cel·lulars

Es va treballar amb quatre línies cel·lulars: La línia cel·lular A375 prové d'un melanoma humà. El medi de cultiu emprat fou Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), que conté 4,5 mg/mL glucosa i L-glutamina, subministrat per Sigma, el qual es va suplementar amb 10 % (v/v) de FBS inactivat i 0,1 % dels antibiòtics penicil·lina (100 U/mL) i estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$) (Biological Industries). La segona línia de melanoma humà, M21, es cultivà amb medi RPMI 1640, subministrat per Sigma i suplementat de la mateixa manera que l'anterior. Com a tercera línia es van emprar queratinòcits humans transformats, HaCaT. Es cultivaren amb DMEM subministrat per Biowhittaker/Cambrex (Milà, Itàlia) contenint 4,5 mg/mL de glucosa i suplementat amb 10 % de FBS inactivat, 2 % de L-glutamina (2 mM), 2 % de tampó HEPES (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) i els antibiòtics penicil·lina i estreptomicina com els anteriors. Finalment, es treballà amb la línia HT29 que prové d'un adenocarcinoma de colon humà. Es cultivà amb el mateix medi de la línia A375. Totes les línies emprades creixen en adherència i amb morfologia epitelial en unes condicions estèrils d'incubació de 37°C, amb una humitat relativa del 90 % i atmosfera del 5 % de CO₂. El medi fou renovat cada tres-quatre dies. Les línies cel·lulars emprades en aquest treball foren lliures d'infecció per micoplasma, tal com ens mostrà el sistema de detecció ràpida de micoplasma en cultius de Gen-probe (Fisher Scientific, Pittsburg, PA).

3.4.1.2 Tripsinització cèl·lular

La tripsinització és un procés per a separar les cèl·lules adherents de la placa i s'ha de realitzar un cop el cultiu cel·lular es troba en un 80 % - 90 % de confluència (Doyle *et al.*, 1995). S'eliminà el medi de cultiu mitjançant una pipeta Pasteur i aspirant amb bomba de buit. Seguidament es rentaren les cèl·lules amb PBS (1mL, tres cops) i es féu un tractament amb tripsina, amb un volum suficient per a cobrir tot just les cèl·lules i incubant-les entre 3-5 min a 37°C. Al començar a desprendre's les cèl·lules de la superfície, s'inactivà la tripsina

amb un volum de medi de cultiu tres vegades superior. Finalment, es transvasà a un tub de centrífuga i es centrifugà a 1.500 rpm durant 5 min. El sobrenadant es descartà, i el precipitat de cèl·lules (anomenat *pellet*) resultant es va resuspendre amb 1 mL del medi de cultiu corresponent al tipus de cèl·lules. La solució cel·lular resultant es va emprar per al manteniment de la línia cel·lular en noves plaques o pel comptatge cel·lular per tal de, posteriorment, portar a terme els diversos assaigs.

3.4.1.3 Congelació i descongelació de línies cel·lulars

Per a congelar estocs de cèl·lules, aquestes havien d'arribar a un 90 % de confluència. Es tripsinitzaren tal com es descriu a l'apartat 3.4.1.2 i el *pellet* de les línies A375 i HT29 es resuspengué amb el medi corresponent suplementat (1 mL) i un 10 % de DMSO. El *pellet* de la línia cel·lular M21 es resuspengué en medi RPMI fresc (1 mL) suplementat amb 20 % de FBS i 20 % de DMSO. En el cas de la línia cel·lular HaCaT, el *pellet* es resuspengué en FBS amb un 10 % de DMSO. Les suspensions cel·lulars es col·locaren ràpidament en un criotub i es congelaren a -85°C durant un mínim de 24 h, per a finalment mantenir-les sota nitrogen líquid.

Els criotubs es descongelaren en un bany estèril a 37°C. Tan bon punt estaven descongelats, en les línies A375, HT29 i HaCaT, la suspensió cel·lular es diluí amb medi suplementat (1/20 ó 1/40) i es sembrà en plaques pel seu creixement, incubant-les a 37°C, 5 % CO₂ i 90% d'humitat. En la línia M21, 10 mL de medi suplementat s'addicionaren gota a gota a la suspensió cel·lular per tal de fer sortir el DMSO de dintre les cèl·lules lentament. Es centrifugà a 1.500 rpm, 5 min i el *pellet* es resuspengué en medi suplementat per a ser sembrat i incubat.

3.4.1.4 Tècnica de comptatge cel·lular

Un cop assolida la confluència cel·lular, les cèl·lules adherents es tripsinitzaren tal com es descriu a l'apartat 3.4.1.2. Un cop totes les cèl·lules es trobaren resuspenses en 1 mL de medi, s'agafà una alíquota de 10 µL i es diluí en PBS en una proporció entre 1/2 i 1/8, depenent de la concentració cel·lular de partida. D'aquesta dilució, es tornà a agafar una alíquota de 10 µL, diluint-la 1/2 amb la solució blau de tripan (*Tripan Blue*). Finalment, 10 µL d'aquesta última es van col·locar a la càmera Neubauer per a realitzar el comptatge.

Es comptaren les cèl·lules contingudes dins les 4 càmeres amb un volum final de 0,1 µL (1 mm × 1 mm × 0,1 mm) (Doyle *et al.*, 1995). Un cop portat a terme el comptatge, s'aplicà la següent fórmula per a obtenir el número de cèl·lules per mL:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ cèl·lules}}{4 \text{ (càmeres)}} \times \frac{\text{Factor de dilució}}{\text{(en PBS)}} \times 2 \times 10^4 = \text{N}^\circ \text{ cèl·lules/mL}$$

On 2 és el factor de dilució amb Tripan Blue.

10^4 és el factor de conversió de volums.

3.4.2 Anàlisi de la viabilitat cel·lular

3.4.2.1 Optimització del número de cèl·lules

L'assaig de viabilitat cel·lular es va determinar seguint una variació del mètode descrit per Mosmann (Mosmann, 1983), emprant plaques TPP de 96 pous amb fons pla. Inicialment, es determinà el número de cèl·lules necessàries en cada pou per a obtenir una resposta d'absorbància òptima a partir de la qual realitzar l'estudi. La resposta òptima és aquella en que es compleix la Llei de Lambert-Beer, on l'absorbància mesurada és directament proporcional a la concentració.

Per a trobar el número de cèl·lules òptim, les cèl·lules es tractaren tal com s'indica a l'apartat 3.4.1.4. Un cop fet el comptatge per Neubauer, les cèl·lules es diluïren en tants mil·lilitres de medi de cultiu com milions de cèl·lules hi hagués, per tal que en resultés una solució de concentració final 1 milió/mL. Per últim, es feu una dilució 1/10, sent aquesta la solució mare que s'aliquotà en la placa per tal de sembrar un rang de cèl·lules entre 500 i 20.000 per pou. El volum final de cada pou fou de 200 µL, i cada mesura es realitzà per triplicat.

Un cop sembrada la placa, aquesta s'incubà durant 24 h. Posteriorment, es féu una renovació del medi aspirant-lo i addicionant 200 µL de medi fresc, deixant-ho incubar 72 h més. Finalment, s'aspirà novament el medi i s'addicionà el reactiu MTT a una concentració final variable (entre 0,2 i 1 mg/mL) i incubant-lo a 37°C a diversos temps (1 i 4 h). Passat aquest temps, s'eliminà la solució de MTT i s'afegí DMSO (100 µL) per a lisar les cèl·lules i realitzar la lectura espectrofotomètrica a 550 nm en el ELISA.

3.4.2.2 Determinació de la viabilitat cel·lular en presència dels productes derivats

S'estudià l'efecte dels flavanols derivats 4 β -(S-cisteinil)epicatequina **7**, 4 β -(S-cisteinil)catequina **8**, 4 β -(S-cisteinil)epicatequin 3-O-galat **9**, 4 β -(S-O-etilcisteinil)epicatequina **10**, 4 β -(S-O-etilcisteinil)catequina **11**, 4 β -(S-O-etilcisteinil)epicatequin 3-O-galat **12**, 4 β -[S-(N-acetil-O-metilcisteinil)]epicatequina **13**, 4 β -[S-(N-acetil-O-metilcisteinil)]catequina **14**, 4 β -[S-(N-acetil-O-metilcisteinil)]epicatequin 3-O-galat **15** i amb (-)-epicatequina **1** no derivada. Es va partir de dissolucions mare de 5 mg/mL en PBS, menys amb el compost **1** que fou de 1.4 mg/mL, degut a presentar una menor solubilitat en aquest tampó. Les solucions s'esterilitzaren amb un filtre de 0,2 μ m de diàmetre de porus. Les dissolucions estoc s'aliquotaren i es conservaren a -20°C fins al moment de la seva utilització.

Després de tripsinitzar (apartat 3.4.1.2) i el posterior comptatge (apartat 3.4.1.4), es sembrà el número òptim de cèl·lules en cada pou d'una placa de 96, trobat en l'optimització realitzada en l'apartat 3.4.2.1 (3.000 cèl·lules/pou en HaCaT, 2.500 cèl·lules/pou en HT29, 1.500 cèl·lules/pou en M21 i 1.200 cèl·lules/pou en A375). El volum final en cada pou fou de 180 μ L del medi corresponent, posant-se a incubar a 37°C per a aconseguir l'adherència de les cèl·lules. Passades 24 h es va renovar el medi, tot addicionant concentracions creixents de cada producte. El volum final de cada pou fou ara de 200 μ L. Els productes es deixaren actuar durant 72 h a l'incubador i, finalment, s'eliminà el medi per tal d'addicionar el MTT en una concentració final de 0,5 mg/mL (afegint 50 μ L de solució MTT 1 mg/mL i 50 μ L de medi per pou), tal com es detalla en l'apartat 3.4.2.1.

Per a cada producte es va realitzar un mínim de 4 experiments. En ells es mesurà la disminució de la viabilitat cel·lular com a mitjana \pm DE dels valors de densitat òptica (DO) obtinguts en l'espectrofotòmetre. L'efecte dels productes a cada concentració va ser expressat com un percentatge [(mitjana DO en cèl·lules tractades després de l'incubació amb producte/mitjana DO dels controls després de l'incubació amb PBS en comptes del producte) \times 100]. La IC₅₀, la qual indica la concentració en que un producte és capaç de reduir en un 50% el valor de DO relatiu al control, va ser estimada utilitzant el model logístic Grafit 3.00 (Data Analysis and Graphics Program, Erithacus Software Ltd. Microsoft Corp., Surrey, UK) opció de corba: *IC50 curve-start at 0*.

3.4.3 Estudi del cicle cel·lular

3.4.3.1 Preparació de les mostres per "*Fluorescence-activated cell sorting*" (FACS)

Aquesta tècnica de citometria de flux permet mesurar característiques físiques i químiques de cèl·lules o partícules en suspensió com la mida, el volum i la fluorescència que presentin, agrupant-les en distribucions. El FACS presenta un senzill procediment experimental i un ràpid tractament de les mostres (Krishan, 1975; Darzynkiewicz *et al.*, 1997).

Per a portar-ho a terme, les cèl·lules es van sembrar en plaques de 6 pous, amb un volum total de 2 mL de medi. La quantitat de cèl·lules a afegir dependrà del tipus de línia. Per determinar el nombre de cèl·lules òptim a sembrar en les plaques de 6 pous, s'aprofità la característica de les cèl·lules adherents en que només difonen sobre la superfície. Així, un cop s'ha optimitzat el nombre de cèl·lules en les plaques de 96 pous (veure apartat 4.10.1.1 de Resultats) aquest s'utilitzà per a calcular el de les plaques de 6 pous mitjançant el quocient entre les superfícies dels pous de les plaques de 6 i 96, sent $S_6/S_{96}=9,03 \text{ cm}^2/0,31 \text{ cm}^2=29,1$. Com a resultat, els estudis de citometria es van portar a terme sembrant 85.000 cèl·lules en la línia HaCaT, 73.000 en HT29 i 35.000 en A375 i M21. El protocol a seguir en la tripsinització, el sembrat de cèl·lules i la incubació és idèntic al utilitzat en l'apartat 3.4.2.2.

Passades 24 h d'incubació, s'eliminà el medi i es tractaren amb una quantitat de producte, corresponent a la seva IC_{50} o al doble del seu valor, juntament amb medi fresc fins un volum total de 2 mL.

Un cop incubades a 72 h i 37°C, s'eliminà el medi i es rentaren amb PBS (2 cops). Es va tripsinitzar amb 0,3 mL, 3 min a l'incubador, i finalment es neutralitzà amb 0,9 mL de medi. Tot seguit, es prepararen les mostres per a l'anàlisi.

3.4.3.2 Anàlisi de les mostres pels estudis de cicle cel·lular

El següent tractament de les cèl·lules es va portar a terme sense condicions d'esterilitat (fora de la campana de flux laminar).

Després de tractar les cèl·lules tal com s'indica a l'apartat 3.4.3.1, es transvasà el contingut de cada pou a un eppendorf de 2 mL i es centrifugà a 1.500 rpm, 5 min i temperatura ambient. Seguidament, es decantà el sobrenedant i el *pellet* es va resuspendre en tampó TBS 1× fred (1 mL), afegint-se iodur de propidi (50 µL, 50 µg) i tampó Vindelov (1 mL). Per últim es va agitar suaument amb la pipeta i s'incubà a 4°C a les fosques (el temps òptim és una hora tot i que es pot mantenir fins a 24 h, però les cèl·lules tenen tendència a agregar-se) (Comin-

Anduix *et al.*, 2001). La distribució del cicle cel·lular va ser analitzada per fluorescència a 488 nm emprant el sistema FACS, i els histogrames de l'ADN foren analitzats tal com s'indicà a l'apartat 3.2.1.

3.4.4 Estudi de la inducció d'apoptosi

3.4.4.1 Anàlisi de les mostres per citometria de flux (FACS)

El mecanisme d'apoptosi mostra, entre d'altres processos, una pèrdua de la simetria fosfolipídica en la superfície cel·lular. En aquest estadi, la translocació de la fosfatidilserina és un indicatiu apoptòtic que pot ser detectat mitjançant la seva interacció amb l'anexina V, la qual està unida amb un fluoresceïn isotiocianat (FITC). Aquesta metodologia, juntament amb la citometria, permet detectar l'apoptosi en els primers estadis d'una manera ràpida i senzilla (Koopman *et al.*, 1994; Vermes *et al.*, 1995). El tractament de les cèl·lules es va portar a terme sense condicions d'esterilitat (fora de la campana de flux laminar).

La preparació de les mostres per a analitzar l'apoptosi per FACS fou idèntica a l'emprada pel cicle cel·lular (apartat 3.4.3.1), amb la peculiaritat d'utilitzar el reactiu d'anexina per a detectar els estadis inicials del mecanisme d'apoptosi (Aubry *et al.*, 1999; Van Engeland *et al.*, 1998). Així doncs, la preparació de les mostres començà transvasant el contingut de cada pou a un eppendorf de 2 mL per tal de centrifugar-ho a 1.500 rpm, 5 min i a temperatura ambient. Seguidament, es decantà el sobrenedant i el *pellet* es va resuspendre en tampó *binding buffer* 1× fred (0,5 mL). Es va fer el comptatge de cada mostra (veure l'apartat 3.4.1.4) i s'aliquotà el volum corresponent a 0,8 milions de cèl·lules per a cada un d'ells. Els 0,8 milions de cèl·lules es centrifugaren i el *pellet* es resuspenguè amb tampó *binding buffer* 1× (95 µL) i anexina V/FITC (3 µL). S'incubà 30 min a les fosques i a temperatura ambient abans de l'anàlisi (Comin-Anduix *et al.*, 2002). En el citòmetre, s'addicionà a cada mostra tampó *binding buffer* 1× (0,8 mL) i, un minut abans de la lectura amb el FACS, s'afegí el iodur de propidi (20 µL). Les mostres foren analitzades com en l'apartat anterior.

3.4.4.2 Anàlisi de les mostres per "laser scanning cytometry" (LSC)

El principal avantatge del LSC enfront l'anterior tècnica de FACS és que treballa amb cèl·lules fixades, ampliant així el rang de mostres a estudi i combinant les característiques de citometria de flux i d'anàlisi d'imatges permetent la visualització i relocalització de les

cèl·lules analitzades, adquirint les dades automàticament (Bedner *et al.*, 1999). Aquestes es tracten posteriorment pel software WinCyte, que calcula els paràmetres cel·lulars. Un altre avantatge d'aquest sistema és la senzilla metodologia de fixació i tinció de la mostra, que també ens permet seleccionar cèl·lules des de la pantalla del vídeo i confirmar, visualment, les cèl·lules en els estadis inicials d'apoptosi per la tinció amb anexina V/FITC i diferenciar-les de les cèl·lules que presenten una apoptosi avançada per tinció amb anexina V/FITC i IP juntament amb una morfologia determinada que presenten les cèl·lules apoptòtiques (comentat en l'apartat 1.3.3 de la Introducció).

Aquesta tècnica utilitza un procediment experimental idèntic a l'anterior. Així, les mostres van ser tractades tal com s'indica a l'apartat 3.4.4.1 amb una modificació en el mètode just abans de la lectura, ja que com s'analitza per seccions es va necessitar que la mostra presentés una major concentració de cèl·lules, pel que després de l'incubació amb anexina no es va diluir la mostra amb més tampó *binding buffer*, sinó que es va afegir directament el iodur de propidi i s'agafà una alíquota de la mostra per a fixar-la sobre un portaobjectes i s'escanejaren seccions d'aquesta superfície.

3.4.4.3 Anàlisi de la morfologia cel·lular per tinció nuclear de Hoechst

El reactiu Hoechst és un colorant nuclear que s'ha emprat per a visualitzar els cossos apoptòtics, els quals s'observen com a conseqüència irreversible del mecanisme d'apoptosi ja en estadis avançats del procés (Latt *et al.*, 1976; Shapiro, 1981).

Per tal de obtenir un número de cèl·lules elevat, es sembraren 0,3 milions en plaques TPP de 60 cm² de diàmetre. Es procedí com en l'anàlisi d'apoptosi, pre-incubant 24 h abans del tractament. Un cop tractades amb els diferents productes i incubades 72 h, les cèl·lules adherents es tripsinitzaren i juntament amb el sobrenedant es centrifugà (5 min a 1.300 rpm i temperatura ambient). El *pellet* obtingut es rentà amb PBS (atemperat a 37°C), es tornà a centrifugar i les cèl·lules foren fixades amb metanol pur (500 µL a -20°C, 5 min). Les cèl·lules fixades es centrifugaren novament per tal d'eliminar el metanol i es rentaren amb PBS. El *pellet* resultant es ressuspengué amb el reactiu de Hoechst (500 µL) i s'incubà a 37°C durant 1 h a les fosques. A partir d'aquest moment, les mostres es van mantenir protegides al màxim de la llum degut a que el reactiu va perdent fluorescència. S'eliminà el reactiu de tinció i es rentaren amb PBS. Una última centrifugació ens permeté concentrar les cèl·lules en 20 µL de PBS, dels quals 10 µL es mesclaren amb mowiol (10 µL) i la barreja es deixà en un

portaobjectes sobre el qual es muntà un cubre. Els portaobjectes muntats amb mowiol es deixaren polimeritzar a 4°C i a les fosques un mínim de 8 h. Finalment, la preparació s'observà al microscopi de fluorescència amb un filtre d'UV.

3.4.4.4 Anàlisi de la fragmentació de l'ADN per electroforesi

Aquesta tècnica ens permeté veure les fragmentacions específiques de la cadena d'ADN que ocorren en els estadis avançats del procés d'apoptosi. Es treballà amb un número de cèl·lules d'entre 1 i 5 milions degut a que es manipularen mostres d'ADN purificat i es necessità carregar en el gel un mínim de 5 µg.

3.4.4.4.1 Extracció de l'ADN

Per tal d'obtenir un bon número de cèl·lules al final del tractament, es sembraren 1 milió en plaques de 100 cm² de diàmetre, pre-incubant 24 h. Les cèl·lules foren tractades i es post-incubaren 72 h i 120 h, degut a que es tracta de mesurar un estadi terminal del procés d'apoptosi. 5 h abans de finalitzar la incubació, s'afegí l'estaurosporina (35 µL, 3,5 µM) en les plaques destinades al control positiu. Després de les incubacions, el sobrenedant es recollí i les cèl·lules van ser rascades en presència de PBS (2 mL, 37°C) i juntament amb el sobrenedant van ser centrifugades a 1.500 rpm durant 5 min. El sobrenedant va ser descartat i les cèl·lules foren lisades repipetejant amb el tampó de lisis (1 mL pels controls i 0,6 mL pels tractats, degut al diferent número de cèl·lules, proveït en el kit de Realpure) i s'incubà amb la proteinasa K (6 µL, 120 µg) a 55°C durant 1 h. Posteriorment, l'ARN de les mostres fou digerit per incubació amb RNasa (7 µL, 70 µg) a 37°C durant 1 h, agitant el tub per inversió. Després del tractament, les proteïnes dels lisats foren precipitades addicionant un tampó de precipitació (800 µL en controls i 360 µL en tractats, proveït pel kit Realpure) i agitant les mostres vigorosament 20-30 s. Es centrifugà a 16.000 rpm durant 10 min perquè el precipitat proteic quedés en forma de *pellet*.

L'ADN es trobà en el sobrenedant aquós, el qual es traspasà a un eppendorf contenint isopropanol (600 µL) per tal d'extreure'l per inversió. Es centrifugà a 14.000 rpm durant 3 min per tal de precipitar l'ADN. El sobrenedant s'eliminà i el pellet es netejà amb etanol fred al 70% (600 µL). Amb una última centrifugació a 14.000 rpm, 2 min, s'eliminà l'etanol i es deixà assecar al aire durant 10 min. Finalment, l'ADN es va ressuspendre en una solució d'hidratació (100 µL, proveïda pel kit Realpure) i es deixà hidratant a temperatura ambient i

a les fosques fins l'endemà. L'ADN hidratat es conservà a 4°C per a períodes curts i a -20°C pel seu emmagatzematge.

3.4.4.4.2 Anàlisi de puresa de l'ADN obtingut

Els àcids nucleics absorbeixen eficientment llum ultraviolada degut a la presència de bases aromàtiques nitrogenades al llarg de les cadenes de l'ADN. L'absorció UV de l'ADN és una característica de la molècula, que és emprada eficientment per a determinar la seva concentració. Una solució d'ADN té una absorció màxima a 260 nm. Les proteïnes, per altra banda, tenen un màxim d'absorció a 280 nm (principalment per residus de triptòfan). El càlcul de la relació A_{260}/A_{280} és un valor ja establert per a expressar la puresa de l'ADN (Glasel, 1995). Dependent de la composició nuclèica, un valor en la relació A_{260}/A_{280} d'entre 1,8 i 2,0 indicaria que es tracta d'una mostra pura. Per mesurar la quantitat d'ADN, aquest es diluí 1/50 en aigua Milli-Q de tal manera que els valors de DO es trobessin entre 0,1 i 1. Es realitzà un escanejat espectrofotomètric entre 290 i 250 nm i la línia de base es realitzà amb aigua Milli-Q.

3.4.4.4.3 Quantificació de l'ADN

Es determinà mitjançant els valors de densitat òptica a 260 nm obtinguts amb l'anàlisi de puresa. 1 unitat de $DO_{260\text{ nm}}$ equival a 50 µg/mL d'ADN. Per tant, la dosis d'ADN vindrà per la transformació de les unitats de DO en valors de concentració i multiplicat per la dilució de la mostra (1/50). Un cop coneguda la quantitat d'ADN per mostra, es podrà calcular el volum necessari per tal de carregar en totes les mostres els mateixos µg en el gel d'agarosa.

3.4.4.4.4 Electroforesi en gel d'agarosa

Es preparà un gel d'agarosa al 1 % (p/v) dissolent l'agarosa (0,5 g) en tampó TBE 0,5× (50 mL) i escalfant amb agitacions suaus temporals fins la total dilució de l'agarosa. Es deixà reposar 15 min i se li addicionà bromur d'etidi (2 µL), agitant amb cura, i col·locant la solució en un suport perquè gelidifiqués. Es col·locà el gel i el suport en el tanc d'electroforesi i es cobriren amb tampó TBE 0,5×. Es carregaren els pous del gel amb equivalent contingut d'ADN (en µg) i de *Load Dye* (3 µL), variant el volum d'aigua Milli-Q fins a un volum final de 30 µL. Com a marcador de parell de bases s'emprà una escala d'ADN de 1Kb (4 µL) el qual es carregà diluït amb *Load Dye* (2 µL) i aigua Milli-Q (6 µL). L'electroforesi es portà a

terme a 80 V durant 75 min. Un cop acabada, el gel es va treure del seu suport i les bandes d'ADN foren visualitzades a través d'un transiluminador d'UV (Vilber Lourmat) acoblat a un processador de vídeo (Mitsubishi) on es captà l'imatge.