

ESTUDI DE L'EFFECTE ANTIINFLAMMATORI DEL CACAU

Maria Font Alberich

2n batxillerat

Curs: 2018-2019

Departament: Física i Química

Tutora: Josepa de Maria Sierra

Institut Baix Camp



Agraïments

Abans de començar, vull donar les gràcies a totes aquelles persones que m'han ajudat a tirar aquest treball endavant. Primerament vull agrair a la doctora Rosa Maria Solà Alberich, de la unitat de recerca en Lípids i Arteriosclerosi de l'Hospital universitari Sant Joan de Reus i de la Facultat de Medicina i Ciències de la salut de la universitat Rovira i Virgili, que em va donar les eines necessàries per iniciar la investigació i em va obrir les portes d'un laboratori professional. També em va posar en contacte amb dos membres del seu equip, les doctores Sara Fernández-Castillejo i l'Úrsula Catalán Santos, del grup d'investigació en nutrició funcional, oxidació i malalties cardiovasculars, de les que estic enormement agraïda per la seva disposició i ajuda prestada. Vull destacar la implicació i paciència que han tingut amb mi i amb el meu treball, atès que els meus coneixements inicials en investigació eren força limitats. També vull donar les gràcies al doctor Jordi Salas del departament de nutrició de la universitat Rovira i Virgili per facilitar-me informació sobre el cacau i els seus beneficis. I finalment vull agrair a la tutora del meu treball de recerca Josepa de Maria Sierra, per fer el seguiment del treball, empènyer-me i motivar-me a realitzar-lo i animar-me a seguir investigant.

Resum

Els últims estudis que s'han fet sobre el cacau han demostrat que aquest presenta nombrosos beneficis sobre la salut gràcies a la seva composició en compostos fenòlics, especialment els flavanols, als quals se'ls atribueixen diferents efectes entre els que en destaquen l'antioxidant, el cardioprotector i l'antiinflamatori.

Aquest estudi se centrarà en aquest darrer efecte. En l'estudi s'avaluarà l'efecte antiinflamatori de la crema de cacau i la crema de cacau suplementada amb avellanes, fitosterols i fibra soluble a través d'un model *in vitro* en el que s'estimularan les cèl·lules amb lipopolisacàrid i s'analitzarà la capacitat antiinflamatòria de sèrums de voluntaris abans i després de la ingesta de les cremes per mitjà de la quantificació del biomarcador d'inflamació *tumor necrosis factor α* (TNF- α) secretat per les cèl·lules.

Els resultats obtinguts demostren que el cacau no té efecte antiinflamatori ni proinflamatori sobre el TNF- α , malgrat que s'hagi demostrat anteriorment que sí que presenta aquest efecte sobre altres biomarcadors d'inflamació com la proteïna C-reactiva (CRP).

Résumé

Les dernières études que se sont faites sur le cacao ont démontré que celui-ci présente nombreuses bénéfices sur la santé grâce à sa composition dans des composés phénoliques, spécialement les flavanols, auxquels se les attribuent différents effets comme l'antioxydant, le cardioprotectrice et l'anti-inflammatoire.

Cette étude se centrera dans ce dernier effet. Dans l'étude s'évaluera l'effet anti-inflammatoire de la crème de cacao et la crème de cacao complétée avec des noisettes, phytostérols et fibre soluble à travers un modèle in vitro dans ce que se stimuleront les cellules avec lipopolysaccharide et on analysera la capacité anti-inflammatoire de sérums de volontaires avant et après l'ingestion des cremes au moyen de la quantification du biomarqueurs d'inflammation tumeur nécroses facteur α (TNF- α) sécrété par les cellules.

Les résultats obtenus démontrent que le cacao n'a pas effet anti-inflammatoire ni pro-inflammatoire sur le TNF- α , malgré qu'il se soit démontré avant qu'il présente cet effet sur d'autres biomarqueurs d'inflammation comme la protéine C-réactive (CRP)

Índex

1. Motivació	1
2. Introducció	2
3. Hipòtesi i objectius	4
3.1. Objectiu primari.....	4
3.2. Objectius secundaris.....	4
4. Metodologia.....	5
4.1. Materials.....	5
4.1.1. Cèl·lules THP-1	5
4.1.2. Medi de cultiu	6
4.1.3. Estudi d'intervenció nutricional i obtenció dels sèrums	7
4.1.4. LPS (lipopolisacàrids).....	10
4.1.5. BAY.....	12
4.1.6. Trypan Blue	12
4.1.7. Utensilis i aparells.....	13
4.2. Mètodes.....	25
4.2.1. Esterilitat i asèpsia.....	25
4.2.2. Descongelació de cèl·lules	28
4.2.3. Comptatge i viabilitat cel·lular	30
4.2.4. Cultiu cel·lular	32
4.2.5. Kit <i>Enzyme-LinkedImmunoSorbentAssay</i> (ELISA). Immunoassaig de TNF- α humà.....	33
4.2.6. Kit de detecció de la citotoxicitat (LDH).....	36
4.3. Procediment	38
4.3.1. Descongelació i creixement cel·lular previ al procés experimental:.....	39
4.3.2. Procés experimental	42

5. Resultats	46
5.1. Citotoxicitat de les mostres	46
5.1.1 Sobrenedant de cultiu cel·lular	46
5.1.2 Sèrums	47
5.2. Proteïna del TNF- α de les mostres	48
6. Discussió	49
7. Conclusions.....	51
7.1. Conclusió de la part experimental.....	51
7.2. Reflexió personal.....	52
8. Bibliografia	53
8.1. Bibliografia web.....	54
9. Annex	56

1. Motivació

El factor principal que ha motivat la realització d'aquest treball ha sigut el meu interès per la investigació. Volia endinsar-me en aquest món, entrar en un laboratori professional, veure com funciona, conèixer el que es necessita per realitzar una investigació i participar-hi activament.

El que va determinar la meua investigació va ser el fet que fa uns anys la meua àvia participés com a voluntària en un estudi clínic on s'estudiaven els possibles beneficis del cacau en la prevenció de malalties cardiovasculars. Ella sempre m'ha explicat aquesta experiència i vaig pensar que seria molt interessant prendre-ho com a punt de partida. Per aquest motiu em vaig posar en contacte amb la meua familiar, la doctora Rosa Maria Solà i Alberich, que va ser la investigadora principal de l'estudi clínic en el que va participar la meua àvia. La doctora Solà em va posar al corrent del seu estudi i del que en podíem derivar, i em va posar en contacte amb dos membres el seu equip que em permetrien participar en un laboratori professional i dur a terme la investigació, les doctores Sara Fernández-Castillejo i Úrsula Catalán Santos. Amb elles vam decidir que centràrem la investigació en l'efecte antiinflamatori del cacau, tot utilitzant mostres biològiques provinents de l'estudi clínic.

Motivation

Le facteur principal qui a motivé la réalisation de ce travail a été mon intérêt par l'investigation. Je voulais m'enfoncer dans ce monde, entrer dans un laboratoire professionnel, voir comme il fonctionne, connaître ce que se précise pour réaliser une investigation et y participer activement.

Ce qu'a déterminé mon investigation a été le fait qu'il y a quelques années ma grand-mère a participé comme volontaire dans une étude clinique où s'étudiaient les possibles bénéfices du cacao dans la prévention de maladies cardiovasculaires. Elle toujours m'a expliqué cette expérience et j'ai pensé que ce serait très intéressant le prendre comme point de départ. Par ce motif je m'ai mis en contact avec ma famille, le docteur Rosa Maria Solà et Alberich, qui a été l'enquêtrice principale de l'étude clinique dans ce qu'a participé ma grand-mère. La docteur Solà m'a mis au courant de son étude et du ce que nous en pouvions dériver, et il m'a mis en contact avec deux membres de son équipe qui me permettraient participer à un laboratoire professionnel et faire l'investigation, les docteurs Sara Fernández-Castillejo et Úrsula Catalán

Santos. Avec elles, nous avons décidé que nous centrerions l'investigation dans l'effet anti-inflammatoire du cacao, en utilisant des échantillons biologiques provenant de l'étude clinique.

2. Introducció

El cacau és el fruit del cacauer (*Theobromacacao*) que permet l'elaboració de la xocolata, que és la forma més comuna de consumir cacau. Tradicionalment primer es recol·lecta el cacau i es fermenta durant uns dies, es posa a assecar i es neteja, i finalment es torra per moldre. En aquest últim procés és en el que se separa la mantega de cacau i s'obté una pasta de cacau solidificada de la que se'n farà la xocolata. (Solà R, *Cocoa, Hazelnuts, Sterols and Soluble Fiber Cream Reduces Lipids and Inflammation Biomarkers in Hypertensive Patients: A Randomized Controlled Trial*, 2012)

La composició del cacau en macronutrients i micronutrients li atribueix efectes beneficiosos per la salut. Entre aquests components en destaquen l'arginina, la teobromina, el triptòfan, minerals com el potassi i el magnesi, i els polifenols o compostos fenòlics. Molts d'aquests beneficis s'atribueixen als compostos fenòlics, que són metabòlits secundaris de moltes plantes i als que se'ls han atribuït propietats saludables i de prevenció de malalties. En destaquen les propietats antioxidant, cardioprotectora i antiinflamatòria. Una classe de compostos fenòlics són els flavonoides que es troben en una concentració elevada en el cacau. I un tipus d'aquesta classe són els flavanols, que són ràpidament absorbits per l'intestí i metabolitzats al fetge, i presenten efectes favorables en la salut cardiovascular. (Reis Q, *Cacao amb Human Health: from Head to Foot - A Review*, 2013)

Els principals efectes del cacau sobre la salut atribuïts a la seva presència de flavanols són: l'antioxidant, el vasorregulador, la millora de la funció endotelial, l'antiagregant, l'antihipertensiu, el modulador de la resposta immunitària i l'antiinflamatori. (Solà R, *Cocoa, Hazelnuts, Sterols and Soluble Fiber Cream Reduces Lipids and Inflammation Biomarkers in Hypertensive Patients: A Randomized Controlled Trial*, 2012)

Precisament l'efecte antiinflamatori és en el que s'ha centrat la recerca d'aquest treball, atès que hi ha estudis que demostren que els flavanols del cacau tenen efectes antiinflamatoris ja que disminueixen diversos biomarcadors¹ d'inflamació. Concretament, on es va veure que el cacau disminuïa el marcador d'inflamació CRP (*C-reactive protein*) és en l'estudi "*Cocoa, Hazelnuts, Sterols and Soluble Fiber Cream Reduces Lipids and Inflammation Biomarkers in Hypertensive Patients: A Randomized Controlled Trial*". A més a més, aquest resultat és el que ens va fer decidir per testar l'efecte antiinflamatori en el laboratori, aprofitant els sèrums obtinguts dels voluntaris abans i després de la ingesta de crema de cacau o crema de cacau suplementada. El cacau es pot suplementar amb diversos productes, com avellanes, fitosterols i fibra soluble, que podrien ser els responsables de l'efecte antiinflamatori demostrat en l'estudi anterior.

Per tal de fer un estudi sobre l'efecte antiinflamatori del cacau sobre el marcador d'inflamació *tumor necrosis factor α* (TNF- α), hem decidit realitzar experiments *in vitro* amb cultius cel·lulars de cèl·lules THP-1, amb els mètodes i materials que aquest requereix. Un cop obtinguda la quantitat de cèl·lules necessàries per l'experiment, es procedeix a separar-ne unes pel grup control o blanc i les altres s'estimulen amb lipopolisacàrid (LPS). Un cop estimulades, se'n torna a separar una part que es deixarà estimulada, una altra que es posarà en contacte amb el BAY, molècula d'efecte antiinflamatori conegut, i una altra amb els sèrums corresponents. Després es quantifica la presència de TNF- α secretat per les cèl·lules al medi, cosa que ens permetrà deduir-ne la inflamació. I finalment es comprova la citotoxicitat de les condicions de cultiu de les mostres per comprovar que la mort cel·lular no ha alterat els resultats de l'experiment.

D'aquesta manera podrem conèixer si el cacau i/o el cacau suplementat tenen efecte antiinflamatori per la via del TNF- α o no.

¹ Els biomarcadors són majoritàriament substàncies químiques en funció de marcadors biològics que proporcionen informació com la detecció d'una malaltia, un canvi fisiològic, una resposta a un tractament o un trastorn psíquic. Es caracteritzen per ser objectivament mesurats.

3. Hipòtesi i objectius

Hipòtesi

La ingesta de cremes de cacau i cremes de cacau enriquides amb avellanes, fitosterols i fibra soluble tenen efecte antiinflamatori a través de la reducció del marcador de inflamació *tumor necrosis factor α* (TNF- α), valorat en un model *in vitro* de monòcits estimulats amb lipopolisacàrid (LPS).

3.1. Objectiu primari

- Estudiar l'efecte antiinflamatori del cacau i altres compostos bioactius a través del marcador TNF- α en cèl·lules on s'ha induït la inflamació amb LPS, i incubades amb sèrums de voluntaris que havien ingerit crema de cacau o crema de cacau enriquida amb altres compostos bioactius.

3.2. Objectius secundaris

- Aprendre el mètode científic quant a l'elaboració d'un experiment des del disseny del mateix, passant per la seva realització i acabant amb l'avaluació dels resultats que es duria a terme en la rutina d'un laboratori d'investigació.
- Conèixer, experimentar i manipular les tècniques adients per dur a terme l'experiment com el pipeteig, treball en condicions asèptiques, descongelació de cèl·lules, comptatge i viabilitat cel·lular, tècnica com l'*Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) i eines bàsiques d'estadística.
- Determinar la citotoxicitat mitjançant la mesura de la secreció de la *lactatedehydrogenase* (LDH).

4. Metodologia

4.1. Materials

4.1.1. Cèl·lules THP-1

Les cèl·lules THP-1 són les utilitzades en l'experiment. És una línia cel·lular d'origen humà que ens permet fer experiments *in vitro* amb característiques pro-inflamatòries. Degut a que és una línia cel·lular, els experiments seran reproduïbles perquè les característiques cel·lulars es mantindran durant la seva divisió. Cal destacar, que un cultiu primari està format per cèl·lules que s'obtenen directament d'un animal o un humà i proliferen de forma limitada. En canvi, en una línia cel·lular provenen d'un cultiu primari que ha estat sotmès a diverses divisions les quals li han conferit la capacitat de dividir-se "eternament". També poden provenir d'un teixit tumoral i per aquesta raó proliferen de forma infinita.

Aquestes cèl·lules són monòcits² procedents d'una leucèmia monocítica aguda³. Concretament, les cèl·lules THP-1 es deriven de la sang perifèrica⁴ d'un nen d'un any d'edat amb leucèmia monocítica aguda. Es caracteritzen per la seva morfologia esfèrica.

No s'han trobat virus infecciosos ni productes tòxics en les cèl·lules THP-1, de manera que tot i ser cèl·lules d'origen cancerós, no són cancerígenes. Tot i això, es recomana que els cultius es manegin amb el nivell adequat de bioseguretat (*veure apartat 4.2.1*).

Pel que fa al seu creixement, es cultiven i divideixen, cada 35-50 hores, en suspensió, inicialment soltes i posteriorment en clústers en forma de raïm⁵ a una densitat de creixement d'entre 100.000 i 1.000.000 cèl·lules/mL (cel/mL) (*veure Figura 1*). Es poden diferenciar a macròfags⁶, afegint al medi èsters de forbol⁷, en aquest estadi s'adhereixen a la superfície del cultiu i perden la seva morfologia esfèrica.

² Els monòcits són una varietat de leucòcit agranular que es genera en la medul·la òssia, i es troben a la sang i en diferents teixits.

³ La leucèmia monocítica aguda és un tipus de leucèmia mieloide aguda caracteritzada pel domini de monòcits a la medul·la.

⁴ La sang perifèrica és la sang que circula per tot el cos.

⁵ Els clústers són agrupaments d'unitats funcionals interconnectades per mitjà d'una xarxa que actuen com una sola unitat.

⁶ Els macròfags són cèl·lules del sistema immunitari que es troben en els teixits.

⁷ El èsters de forbol tenen la capacitat d'actuar com a promotors tumorals.

Per tal d'emmagatzemar aquestes cèl·lules, es congelen en DMSO, que és un crioprotector, i s'utilitzen *dewars* en condicions de vapor de nitrogen líquid (-196°C) on es col·loquen els criotubs amb les cèl·lules.

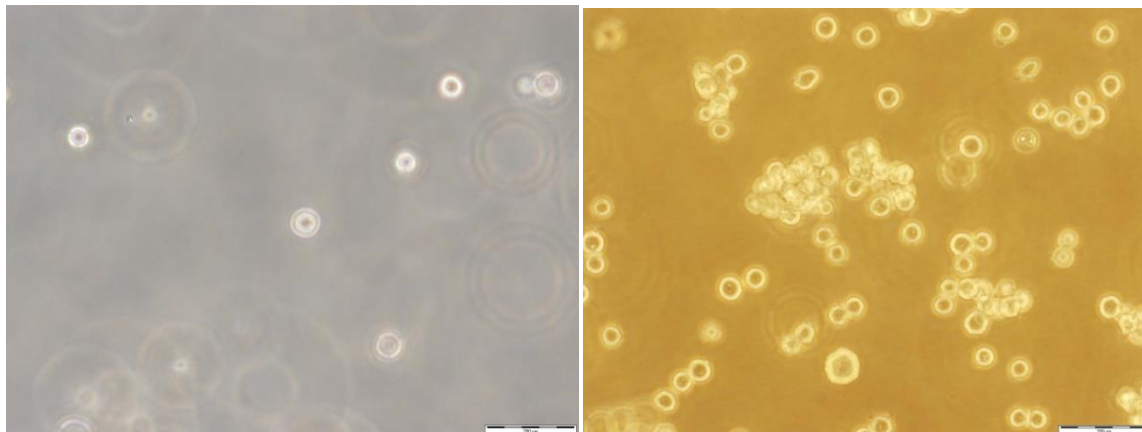


Figura 1: Imatges microscòpiques de les cèl·lules en suspensió soltes i formant clústers amb augment X20 del dia 0 i 6 del cultiu cel·lular.

4.1.2. Medi de cultiu

Un medi de cultiu és una mescla de compostos i nutrients indispensables que afavoreixen la multiplicació en gran nombre de les cèl·lules o dels microorganismes que s'hi troben dins. Els compostos que es troben en el medi incentiven la proliferació cel·lular, de manera que ens permet obtenir la quantitat de cèl·lules THP-1 necessàries per realitzar el nostre experiment.

Per tal de dur a terme el cultiu cel·lular de la manera adient per a la proliferació de les cèl·lules THP-1, hem elaborat dos medis de cultiu diferents. El primer medi consta d'un 79% de RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute 1640*), un 20% de FBS (*fetal bovine serum*), i un 1% de Penicil·lina i Estreptomicina (P/S). El segon medi consta d'un 89% de RPMI-1640, un 10% de FBS i un 1% de P/S. El primer medi amb un 20% de FBS és el que utilitzarem durant els primers dos dies per tal d'estimular la divisió i el creixement de les cèl·lules. Després d'aquests dos dies canviarem el medi del cultiu i afegirem el segon medi amb un 10% de FBS que s'adequa més a les condicions normals de proliferació del cultiu, ja que aquest ja ha estat estimulat amb el primer medi i ja no és necessària tanta quantitat de FBS.

L'RPMI-1640 és un medi cel·lular que conté aminoàcids essencials (L-glutamina), sucres, fosfats i altres factors necessaris pel creixement cel·lular. La idea del seu

desenvolupament era mantenir fibroblasts⁸ en suspensió, tot i això es va acabar desenvolupant per a cultius de cèl·lules leucèmiques humanes en suspensió i ha estat considerat adequat per a una gran varietat de cèl·lules de mamífers.

L'FBS és sèrum fetal de boví que prové de la sang extreta d'un fetus de boví. Té un nivell molt baix d'anticossos i una gran quantitat de factors de creixement que estimula la proliferació dels cultius cel·lulars, és especialment utilitzat per a cultius cel·lulars *in vitro* de cèl·lules eucariotes. A més a més, l'FBS conté una gran varietat de proteïnes que permet el manteniment de cèl·lules de cultiu en un medi en què poden créixer i dividir-se.

La P/S és Penicil·lina i Estreptomicina, dos antibiòtics que s'utilitzen per impedir la contaminació bacteriana del cultiu cel·lular. D'una banda, la penicil·lina interfereix directament en el volum de la paret cel·lular bacteriana, i indirectament mitjançant l'alliberament d'enzims que alteren encara més la paret cel·lular. D'altra banda, l'estreptomicina s'uneix a la subunitat 30S del ribosoma bacterià que produeix la inhibició de la síntesi de proteïnes i, en conseqüència, la mort dels bacteris.

4.1.3. Estudi d'intervenció nutricional i obtenció dels sèrums

Els sèrums utilitzats en l'experiment són sèrums extrets d'un estudi d'intervenció en humans realitzat anteriorment (Solà R, *Cocoa, Hazelnuts, Sterols and Soluble Fiber Cream Reduces Lipids and Inflammation Biomarkers in Hypertensive Patients: A Randomized Controlled Trial*, 2012), la hipòtesi del qual era que el consum de noves fórmules de productes de cremes de cacau amb baix contingut d'àcids grassos saturats, un contingut moderat de sucre, i enriquits amb avellanes, fitosterols o fibra soluble, redueixen els biomarcadors de malalties cardiovasculars. L'objectiu d'aquest estudi era comprovar els efectes del producte A: cacau; del producte B: cacau+avellanes; del producte C: cacau+avellanes+fitosterols; i del producte D que se'l va anomenar LMN (Patent WO2007063158A2): cacau+avellanes+fitosterols+fibra soluble; en marcadors metabòlics del risc de malalties cardiovascular.

⁸Els fibroblasts són un tipus de cèl·lules que es troben en el teixit connectiu.

Aquests 4 productes de crema de cacau es van introduir en una dieta calòricament equilibrada durant 4 setmanes. Hi va haver un període d'estabilització previ de dues setmanes en el que tots el voluntaris van rebre el producte de crema de cacau (producte control) per avaluar la seva tolerància al producte. En aquest període d'estabilització la ingesta va ser isocalòrica⁹ era la composició de la dieta mediterrània el 39% de l'energia total era greix, dels quals el 13% era SFA(*saturated fatty acids*; greixos saturats). En el període d'intervenció de 4 setmanes de durada, la dieta isocalòrica prescrita era de: el 35% de l'energia total era greix, dels quals el 7% era SFA, el 50% de l'energia total eren carbohidrats i el 15% de l'energia total era proteïna. Aquesta dieta comportava 200mg/dia de colesterol.

Tenint la composició nutricional de la crema de cacau com un component bàsic de la dieta, es va reduir la ingesta d'oli d'oliva com a greix predominant. Es van evitar aliments com les salsitxes, la llet sencera, els formatges curats i els iogurts sencers. No obstant, per compensar l'energia dietètica d'aquests aliments es va augmentar la ingesta de carbohidrats proporcionats per aliments com el pa, la pasta i les patates. A més a més, es va recomanar evitar la ingesta de xocolata, productes que contenen èsters d'estanol o esterols, productes rics en fibra o omega-3, nous i soja i els seus derivats. I el consum de llegums es va limitar a un màxim de 3 cops per setmana.

Les dosis de crema de cacau que ingerien els voluntaris depenia del producte. Els voluntaris del producte A ingerien 6 unitats de 13g cadascuna, és a dir, 78g al dia. Els voluntaris del producte B n'ingerien 78g al dia dels quals 30g eren d'avellanes. Els voluntaris del producte C n'ingerien 78g al dia dels quals 30g eren d'avellanes i 2g de fitosterols. I els del producte D ingerien 78g al dia dels quals 30g eren d'avellanes, 2g de fitosterols i 20g de fibra soluble. Per tant, tots consumien 78g totals al dia, en unitats de 13g totals. La ingesta de 30g al dia d'avellanes i 20g de fibra soluble, es van escollir aquestes quantitats perquè són les que han demostrat tenir efectes protectors front a les malalties cardiovasculars. A més a més, tots els productes contenien 1g aproximadament de sòlids de cacau per unitat i les dosis es consumien sense llet ni altres productes lactis.

⁹Dieta isocalòrica és aquella que inclou aliments dels quals el nombre de calories que produeixen són iguals al seu pes, és a dir, les calories són directament proporcionals al seu pes.

Els voluntaris que hi van participar eren homes i dones majors de 20 anys amb hipertensió, amb colesterol *low-densitylipoprotein* (LDL) entre 130 mg/dL i 189mg/dL, amb colesterol *high-densitylipoprotein* (HDL) inferior a 40mg/dL en homes i inferior a 46mg/dL en dones, amb algun factor de risc per desenvolupar alguna malaltia cardiovascular com l'edat (major de 45 anys en homes i major de 55 anys en dones), fumadors habituals, o amb historial familiar de malalties cardiovasculars prematures (abans dels 55 anys en homes i abans dels 65 anys en dones). Els criteris d'exclusió incloïen: diabetis *mellitus*, malalties cròniques, tractament actual d'arteriosclerosi, triglicèrids en una concentració major a 350mg/dL en dejú, i un índex de massa corporal major de 35 kg/m².

Al llarg de l'experiment es van anar extraient sèrums dels voluntaris i es van anar classificant per producte i dia d'extracció per tal de poder fer-ne l'estudi posterior.

Aquest estudi exploratori va demostrar que els extractes de cacau barrejats amb altres ingredients alimentaris com les avellanes, els fitosterols o la fibra soluble en un producte de crema baixa en greixos saturats és una nova alternativa per millorar biomarcadors de les malalties cardiovasculars com: colesterol LDL, CRP (marcador d'inflamació), etc.

La resta dels sèrums que no es va utilitzar per aquest estudi es va emmagatzemar al banc de mostres. Gràcies a això, hem pogut recuperar aquests sèrums i utilitzar-ne els que ens eren necessaris pel nostre experiment. Concretament, hem utilitzat els següents sèrums:

- a) Del producte A (cacau) de tres voluntaris (9, 10 i 15) abans de la intervenció amb cacau (dia 0): mostres Vol9_D0, Vol10_D0 i Vol15_D0.
- b) Del producte A dels mateixos voluntaris al final de la intervenció (dia 28): mostres Vol9_D28, Vol10_D28 i Vol15_D28.
- c) Del producte D (cacau+avellanes+fitosterols+fibra soluble) de tres voluntaris (7, 16 i 23) al final de la intervenció (dia 28): mostres Vol7_D28, Vol16_D28 i Vol23_D28.

Els sèrums del producte A del dia 0 els hem utilitzat de grup control ja que els voluntaris només havien ingerit el producte de cacau control del període d'estabilització, de manera que encara no s'havien vist afectats per cap producte de

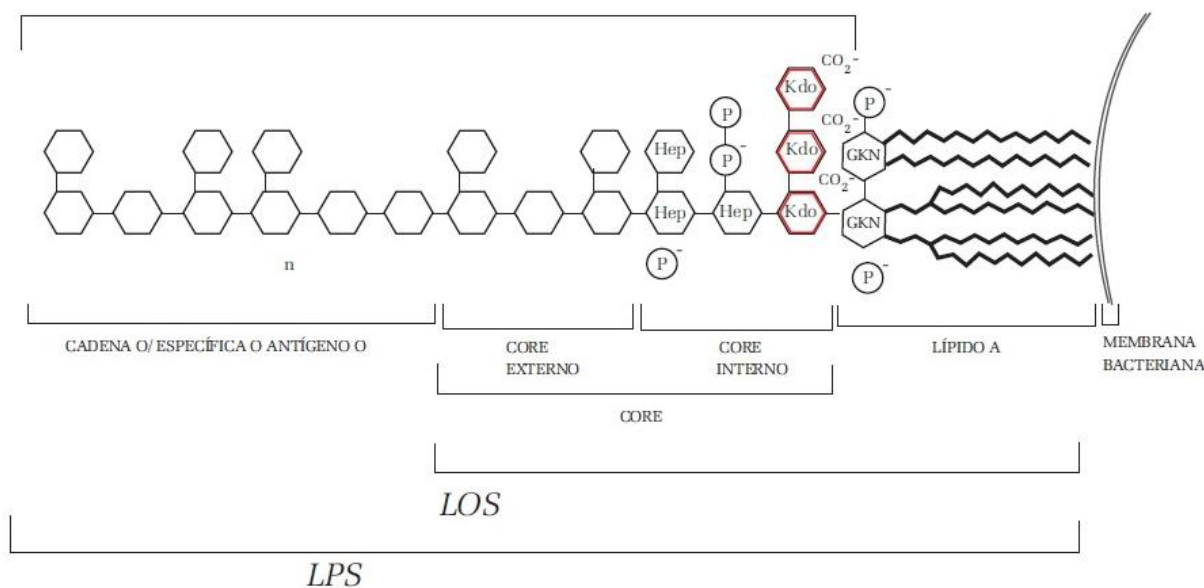
l'estudi. Per tant, no influiria que haguéssim agafat els sèrums dels voluntaris del producte A o del producte D del dia 0 ja que aquests encara no havien estat ingerits de manera que els sèrums dels dos grups haurien de presentar les mateixes característiques. Els sèrums del producte A del dia 28 els hem escollit per comprovar l'efecte de l'extracte de cacau sense altres ingredients suplementaris, per comprovar si l'efecte antiinflamatori en marcadors TNF α és degut a la composició del propi cacau. Finalment, els sèrums del producte D del dia 28 els hem triat per comprovar si els efectes antiinflamatoris poden ser deguts majoritàriament al cacau, als ingredients suplementaris (avellanes, fitosterols i fibra soluble) o a la combinació dels dos.

4.1.4. LPS (lipopolisacàrids)

Els lipopolisacàrids són les endotoxines inflammatòries més potents procedents de la paret cel·lular de bacteris Gram-negatius. En la superfície externa d'aquesta cèl·lula bacteriana, alguns bacteris hi tenen lipopolisacàrids tòxics per les cèl·lules humanes. Tenen una funció important en l'activació del sistema immune humà ja que constitueix l'antigen superficial més important d'aquest tipus de bacteris.

Un lipopolisacàrid és una molècula amfipàtica formada per una cadena polar glicosídica i un grup lipídic. La seva estructura es caracteritza per una part interna formada per la part lipídica i una part externa formada per l'antigen O. La part interna està constituïda per una part lipídica, concretament, per un glicolípid, anomenat lípid A, que constitueix la part hidrofòbica de la molècula. I la part externa està formada per la cadena polar, anomenada nucli o *core*, formada per un seguit de monosacàrids de sis carbonis, i d'altres de menys usuals, i una sèrie anomenada antigen O de quatre sucres específics del bacteri que es repeteixen. Aquesta part externa és la part hidròfila i actua com a receptor de bacteriòfags¹⁰ i desencadena juntament amb el lípid A la resposta immunològica per part de l'individu infectat.(veure Figura 2)

¹⁰ Un bacteriòfag és un virus que infecta únicament a bacteris.



Fuente: Modificado de Rietschel *et ál.*,1996.

Figura 2: Estructura química d'una molècula de LPS

Font: www.scielo.org.co

En el nostre experiment l'hem utilitzat per tal d'induir la inflamació de les cèl·lules THP-1 i poder comprovar posteriorment quin és l'efecte dels sèrums de cacau i cacau amb suplementes sobre aquesta inflamació.

Els mecanismes bàsics de la inflamació induïda per LPS s'executen mitjançant l'estimulació dels receptors de superfície cel·lular en les cèl·lules immunes. Concretament, es tracta del receptor *toll-like receptor 4* (TLR4), que en ser estimulat concentra factors de transcripció al nucli i secreta quimiocines i citocines proinflamatòries¹¹ de tal manera que condueix a una reacció intracel·lular. El sensor intracel·lular de LPS anomenat caspasa-11¹² i els seus derivats, activats pel lípid A, causen l'activació d'inflamasomes¹³ que secreten IL-1 β ¹⁴ produint febre, factor de necrosis tumoral (TNF) que pot causar hemorràgies i la mort cel·lular (piroptosi), i òxid nítric que produeix hipotensió arterial.

¹¹ Les quimiocines i les citocines són proteïnes capaces d'induir la quimiotaxi, és a dir, el desplaçament de cèl·lules a favor o en contra del gradient químic, que s'utilitzen en la comunicació intercel·lular, en l'activació de receptors de membrana específics, en la secreció d'immunoglobulines i en la diferenciació i proliferació cel·lular. Tot i això la seva funció principal és la regulació del mecanisme d'inflamació.

¹² La caspasa-11 és un tipus de macròfag, és a dir, un tipus de cèl·lula del sistema immunitari que es troba en els teixits.

¹³ Un inflamasoma és un complex multiproteic capaç d'activar els processos inflamatoris i fins hi tot la piroptosi cel·lular.

¹⁴ La IL-1 β o interleucina-1 β és una citocina proinflamatòria.

4.1.5. BAY

El BAY és un inhibidor de complexos enzimàtics causants de la propagació de la resposta cel·lular a la inflamació. El BAY té respostes farmacològiques que inclouen efectes anticancerosos, neuroprotectors i antiinflamatoris. Tal com s'ha demostrat en alguns estudis, el BAY anul·la fortament diferents mecanismes d'inflamació incloent el TNF- α .

Aquesta capacitat ens interessa a l'hora de realitzar el nostre experiment, ja que utilitzem el BAY com a inhibidor químic que disminueix la inflamació induïda amb LPS a les cèl·lules THP-1. Entès que inhibeix la resposta inflamatòria de les cèl·lules i redueix la producció de TNF- α , podem comprovar per mitjà del kit ELISA de TNF- α humà la falta o disminució de presència de TNF- α en els medis de les cèl·lules en els que s'hi ha introduït BAY. D'aquesta manera podem observar els resultats i comparar l'efecte que té un antiinflamatori químic, del qual l'eficàcia ja està demostrada, amb l'efecte d'un possible antiinflamatori natural com és el cacau i el cacau amb suplementes.

D'una banda comprovaríem si l'efecte antiinflamatori del cacau i del cacau suplementat és similar o no al del BAY. I d'altra banda és un mètode d'assegurar que l'experiment ha estat realitzat correctament, que les cèl·lules i el medi no han estat contaminats per altres factors i la inflamació ha estat induïda adequadament com requeria l'experiment. És a dir, que s'utilitza com a control positiu d'experiment ja que permet avaluar-ne la validesa comparant amb el BAY del qual la resposta ja és coneguda. Per tant, si observem que el BAY no fa disminuir de manera contundent la presència de TNF- α en el medi podrem concloure que l'experiment ha estat fallit, ja que segurament haurem comès algun error pel que fa a la contaminació de les cèl·lules o a la inducció de la inflamació amb LPS.

4.1.6. Trypan Blue

El *Trypan Blue* és una solució aquosa de color blau amb tint violeta. Es tracta d'un colorant azo (que tenen el grup funcional R-N=N-R') que s'utilitza com a tint. El *Trypan Blue* també es coneix amb el nom de Blau de tripà, blau de diamina o blau de Niàgara.(veure Figura 3)

En el laboratori s'utilitza per tenyir de forma selectiva els teixits o les cèl·lules mortes, a través d'una taca vital. Una taca vital significa una taca que s'aplica a cèl·lules vives sense matar-les. De manera que, les cèl·lules vives i els teixits amb membrana cel·lular queden intactes sense tenyir.

La capacitat selectiva de les cèl·lules pel que fa als compostos que travessen la membrana cel·lular permet que la cèl·lula viva amb la membrana cel·lular intacta no absorbeixi el *Trypan Blue*. En canvi, en una cèl·lula morta que té la membrana cel·lular compromesa, aquest travessa la membrana cel·lular fàcilment i tenyeix la cèl·lula.

Per tant, amb l'ajut d'un microscopi podrem observar, comptar i calcular la viabilitat d'un cultiu cel·lular gràcies a que veurem les cèl·lules mortes de color blau i les vives intactes ja que s'exclouen de la tinció. (veure Figura 4)



Figura 3: Solució de Trypan Blue.

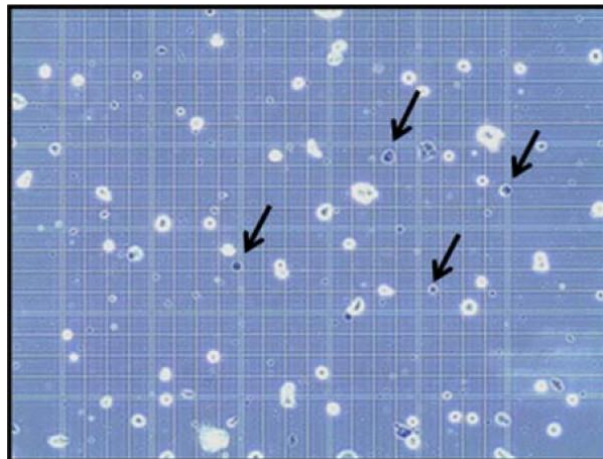


Figura 4: Imatge microscòpica de la càmera de Neubauer amb les cèl·lules vives de color blanc i les mortes tenyides de blau.

Font: www.bioind.com i www.researchgate.net

4.1.7. Utensilis i aparells

Cabina de flux laminar

La cabina de flux laminar també és coneguda amb el nom de campana de flux laminar o càmera de flux laminar. Es tracta d'un recinte que posseeix un flux laminar d'aire recte i paral·lel a les seves 5 cares. Majoritàriament, l'espai de treball que proporciona la cabina està delimitat per làmines d'acer inoxidable excepte en la part frontal que

disposa d'una porta de vidre trempat. En una de les cares hi ha un filtre HEPA o ULPA a través del qual s'injecta aire esterilitzat dins la pròpia cabina.

L'objectiu de la cabina de flux laminar és únicament protegir el producte en el qual es vol treballar, no a l'usuari que hi treballa. La seva funció bàsica és mantenir l'espai de treball estèril i evitar la contaminació per tal de dur a terme la tècnica d'asèpsia i esterilitat correctament. Permet mantenir l'àrea de treball lliure de pols, bacteris i altres factors contaminants.

El seu funcionament es basa en un flux d'aire, procedent d'un ventilador, que passa a través d'un filtre d'alta eficiència (HEPA o ULPA). Aquest filtre no deix passar a l'interior de la cabina partícules majors de $0,3\mu\text{m}$ (per tant, no permet el pas de bacteris) i té un percentatge d'eficàcia mínima del 99,97%. Per tal que l'atmosfera de treball sigui encara més estèril, la cabina incorpora al seu interior una làmpada de raigs ultraviolats. A més a més, també porta instal·lat un segon filtre a la sortida de l'aire per evitar l'emissió de productes contaminants en el cas que es treballi amb productes tòxics.(veure Figura 5)

Pel que fa a la seva utilització, s'engega el ventilador uns 15 minuts abans de començar a treballar per tal d'eliminar possibles partícules adherides a les parets de la cabina i de purgar els filtres. També s'ha de desinfectar l'àrea de treball amb etanol al 70%, o si és necessari amb lleixiu, abans de començar a treballar. Quan la pressió de la cabina s'ha estabilitzat el flux d'aire ja és laminar i es pot procedir a treballar-hi. Es recomana que es deixi la zona propera a les reixetes de ventilació lliures i s'eviti acostar-hi els productes amb els que es treballa per evitar una possible contaminació. Quan s'acaba de treballar-hi, s'ha de mantenir el funcionament del ventilador i engegar la làmpada de raigs ultraviolats per garantir l'esterilitat de la cabina durant uns 10 minuts.

La manera de treballar de l'usuari també és important per mantenir l'esterilitat de la cabina i dels producte introduïts a l'interior. Per això, aquest ha de treballar amb bata, peücs, reixeta pel cabell, mascareta i guants. A l'hora de treballar dins la cabina ha d'introduir únicament les mans després d'haver-se-les rentat amb etanol just en el moment previ a l'entrada de les mans a la cabina. Aquest procés de rentat s'ha de repetir cada vegada que l'usuari treu i posa les mans dins la cabina. A més a més, cada

utensili o producte que es vulgui introduir dins la cabina també ha de ser netejat prèviament amb etanol. També es recomana procedir amb moviments suaus i evitar els bruscos i ràpids ja que es generaria corrents d'aire que podrien interferir en el flux laminar.

Es poden trobar dos tipus de cabina de flux laminar: de flux laminar vertical i de flux laminar horitzontal. La cabina de flux laminar vertical permet introduir objectes de tot tipus de mida sense bloquejar el flux d'aire estèril i l'aire no toca directament a la cara de l'usuari. No obstant, en la cabina de flux laminar horitzontal és més fàcil introduir objectes petits o sensibles a prop del filtre i les possibles partícules existents dins la cabina no cauen sobre el producte ni sobre la resta d'objectes amb els que es treballa. (veure Figura 6)

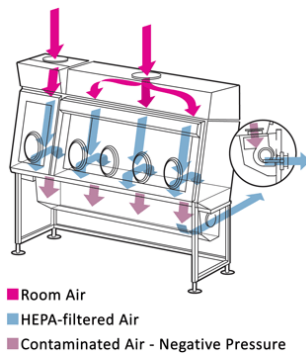


Figura 5: Funcionament d'una cabina de flux laminar

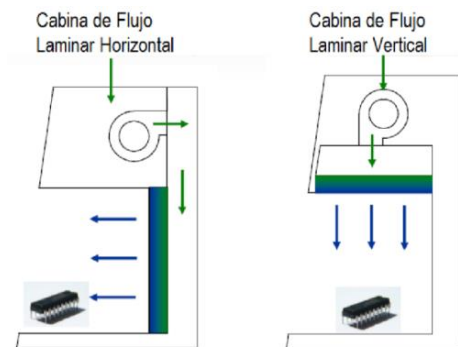


Figura 6: Comparació entre flux vertical i horitzontal

Font: cybertesis.uni.edu.pe

Bany tèrmic

El bany tèrmic és utilitzat habitualment per temperar medis de cultiu entre d'altres solucions a una temperatura constant de 37°C per ser utilitzats en cultius cel·lulars. També se solen utilitzar en la descongelació de cèl·lules i sèrums.

Pel seu funcionament s'ha d'accionar l'interruptor d'encès, comprovar que marqui la temperatura desitjada (37°C) i col·locar els reactius i les solucions en recipients ben tancats dins del bany perquè es temperin.

Dewar de congelació

Un *dewar* de congelació és un dipòsit criogènic format per: un recipient d'aïllament, un tap de bloqueig, un mànec per obrir i tancar, una junta de segellat al buit per garantir l'aïllament, un tub de coll, un aïllament de múltiples capes i un recipient interior amb revestiment que conté els cilindres on es troba el material criogènic, en el nostre cas, cèl·lules congelades en criotubs. (veure Figura 7)

El seu objectiu és emmagatzemar líquids criogènics, proporcionar aïllament tèrmic i mantenir la congelació. En aquest recipient s'hi troben gasos criogènics com el nitrogen líquid que produeixen i mantenen la congelació del material criogènic que es vol congelar i emmagatzemar. El nitrogen líquid és un gas liquat a temperatura criogènica, és a dir, a -196°C , que pot causar cremades per fred o congelació i fins i tot asfíxia en altes concentracions per desplaçament d'oxigen. (veure Figura 8)

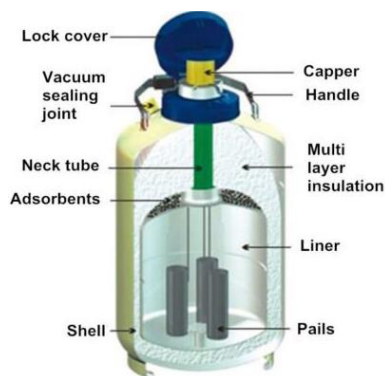


Figura 7: Dibuix de les parts d'un dewar de congelació



Figura 8: Dewar de congelació

Font: spanish.alibaba.com

Criotub

Un criotub és un tub que té una capacitat de volum entre 1 i 5 mL utilitzat per emmagatzemar mostres biològiques a temperatures de fins a -196°C . Proporciona la màxima seguretat i resistència a fugues inclús submergit en nitrogen líquid gràcies al tap de rosca.

Tub d'assaig

El tub d'assaig és un tub cilíndric amb un dels dos extrems obert que s'utilitza per contenir-hi substàncies i per fer determinades reaccions químiques.

Gradeta

La gradeta és un suport per a tubs d'assaig i tubs de característiques similars que evita el possible abocament d'aquests.

Vas de precipitats

El vas de precipitats és un recipient cilíndric amb un dels extrems obert que s'utilitza per contenir-hi substàncies, mesurar volums aproximats i per fer-hi reaccions químiques.

Proveta

La proveta acostuma a estar graduada i és un tub del qual un extrem està obert i l'altre té un peu. S'utilitza principalment per mesurar líquids, tot i que amb menys precisió que una pipeta.

Pipeta Pasteur

La pipeta Pasteur és una pipeta graduada senzilla de plàstic tou amb un "globus" que en ser premut expulsa aire i en conseqüència el líquid que conte la pipeta, i en deixar de prémer la pipeta aspira el líquid en el que està submergit l'extrem inferior. Permet mesurar volums petits de líquid a poca precisió i transferir-los d'un envàs a un altre. La més utilitzada pot pipetejar un volum de 0.5-3.5 mL.

Micropipeta

Una micropipeta és una pipeta que permet mesurar volums de líquids d'entre 0,1 i 1000 μ L. Concretament, es troben micropipetes que mesuren de 0,1-10 μ L, de 2-100 μ L i de 2-200 μ L i de 100-1000 μ L. Una micropipeta està formada per una columna d'aire i els pistons que en varien la seva longitud en funció de la quantitat de volum que es vol mesurar, una punta de polipropilè d'usar i tirar per on s'aspira el volum de líquid desitjat, i un botó situat a la part superior que permet pressionar l'èmbol.

Per tal d'utilitzar-la, s'ha de posar la punta adequada a la micropipeta i establir el volum exacte que es vol mesurar. A continuació, s'ha de pressionar el botó superior, és a dir, l'èmbol, fins al primer topall mecànic. Després s'ha d'introduir la punta dins del líquid que es vol aspirar i deixar anar suaument l'èmbol. Un cop succionat el volum desitjat s'ha de tornar a prémer l'èmbol delicadament per abocar el líquid, si es pitja fins el primer topall mecànic quedarà un part molt petita del volum desitjat a la punta, en canvi si es pitja fins el segon topall aquesta part restant també serà abocada. Tot i això hi ha vegades que no interessa pitjar fins el segon topall mecànic ja que és molt possible que generi bombolles d'aire, per tant, s'ha de valorar si interessa més tenir el volum desitjat exacte o evitar l'aparició de bombolles. També es recomana utilitzar-la sempre de manera vertical i evitar tombar-la ja que és molt sensible i si el líquid que s'ha aspirat entra dins del mecanisme la pipeta queda inutilitzable.

Pipeta serològica graduada

Tub de vidre per mesurar i transvasar líquids de volums més grans dels que mesuraríem amb una micropipeta. Amb l'ajut d'un pipetejador automàtic o manual, s'omple del volum de líquid desitjat i l'aboca en un altre envàs. És un utensili de mesura amb bastanta precisió.

Pipetejador automàtic

El pipetejador automàtic és un instrument auxiliar elèctric que s'utilitza per aspirar volums de líquid amb les pipetes serològiques. Està format per: un adaptador de

pipeta cònic, un connector de carregador, una pantalla on se selecciona el volum que es vol absorbir, un botó per omplir que varia la velocitat d'ompliment segons la pressió que s'hi fa, i un botó de descàrrega que també varia la velocitat de descàrrega segons la pressió exercida.

Flascó T-75

El flascó T-75 és el flascó utilitzat en cultius cel·lulars. Es caracteritza per ser de poliestirè i estar format per una superfície de creixement estàndard per a cèl·lules adherents o en suspensió, un coll inclinat i un tap de rosca lliure d'endotoxines i no citotòxic. A més el tap amb ventilació té una membrana hidrofòbica de $0,2\mu\text{m}$ que no permet el pas de bacteris cap a l'interior del flascó. El flascó també compta amb graduacions volumètriques impreses i una zona per a l'escriptura *(veure Figura 18)*.

Centrifugadora

La centrifugadora és un aparell que genera moviments de rotació amb l'objectiu de separar els components que constitueixen una substància. Hi ha diferents tipus de centrifugadores segons la seva utilitat i la seva velocitat. Està format per: una tapa que impedeix l'accés a les mostres mentre es centrifuguen, la càmera (que és l'espai on es realitza la centrifugació i dins de la qual hi gira el rotor), el rotor on es col·loquen els tubs amb les mostres que es volen centrifugar, l'interruptor, el marcador de temps, el control de velocitat, el tacòmetre (que mostra de velocitat de a centrifugació) i el fre.

Per tal que la centrifugació es produeixi correctament cal col·locar les carregues, és a dir, els tubs amb les mostres que es volen centrifugar, amb el mateix pes de forma oposada en el rotor. Han de tenir la mateixa massa i el mateix centre de gravetat. Si les mostres són imparelles, s'ha d'afegir al rotor un tub amb aigua amb el mateix pes que la mostra al costat oposat. D'aquesta manera la centrifugadora estarà equilibrada i la centrifugació es realitzarà adequadament *(veure Figura 9)*.



Figura 9: Centrifugadora utilitzada en l'experiment

Tub eppendorf

El tub eppendorf és el nom més comú per anomenar al tub de microcentrífuga, ja que fa referència a l'empresa distribuïdora més popular. Es tracta d'un tub petit de plàstic que té un extrem cònic i un altre obert amb una tapa unida al tub que permet evitar que s'aboqui la substància que conté. S'utilitza com a vial contenidor i per a la centrifugació.

Incubador

Un incubador és un aparell que s'utilitza per mantenir la temperatura, la humitat, el contingut de CO_2 i d'oxigen en l'atmosfera interior i altres condicions que permeten garantir el creixement de cultius cel·lular. El control de l'atmosfera interior de l'incubador s'aconsegueix mitjançant un dispositiu de monitorització de CO_2 que controla la pressió d'aquest gas i l'ús d'una safata d'humidificació. Aquest dispositiu de monitorització extreu l'aire de l'incubador en una càmera de mostra i en determina la concentració de CO_2 , a continuació injecta CO_2 pur a l'interior de l'incubador per compensar-ne la falta. L'aire circula per l'incubador amb l'ajut d'un ventilador que manté constants la temperatura i el nivell de CO_2 (veure Figura 10).



Figura 10: Incubador tancat i obert utilitzat en l'experiment

Microscopi òptic invertit

El microscopi òptic invertit és el tipus de microscopi que s'utilitza per observar l'estat i el creixement dels cultius cel·lulars. Mentre que el microscopi convencional no és adequat, per la petita distància frontal de la que disposa, ja que les mostres de cultiu cel·lular que es volen observar es troben en recipients de gruix considerable, el microscopi òptic invertit disposa d'objectius i font d'il·luminació invertits respecte la platina del microscopi òptic convencional. El microscopi òptic invertit també es caracteritza pel dispositiu de contrast de fases que permet observar les mostres vives amb poc contrast. D'aquesta manera millora el contrast i la qualitat de la imatge.

Aquest microscopi està format per un sistema de suport constituït pel suport, que manté l'estabilitat del microscopi sostenint el condensador i la làmpada, i la platina mecànica, on es col·loquen les mostres que es volen observar i disposa d'un orifici central per on passa el raig de llum procedent del condensador fins als objectius.

També consta d'un sistema d'ajust mitjançant el carro mecànic, que és un suport foradat on s'acobla el recipient del cultiu cel·lular i hi ha una regleta per moure, de dreta a esquerra i de dalt a baix, el carro sobre la platina mecànica.

A més a més consta d'un sistema d'il·luminació format per: un portalàmpades, un suport de filtres, un condensador, una obertura de diafragma i un portaanells de llum. El portalàmpades és el suport on hi ha la làmpada de llum halògena. El suport de filtres és un contenidor on hi ha els filtres específics per a cada tipus d'il·luminació que requereix l'observació de les mostres: el filtre blau (de cobalt), que passa la llum de groc a blanc permetent observar mostres fosques en un fons clar, i el filtre verd,

que permet el contrast de fases, en relleu o d'interferència. El condensador és el sistema de lents que recull els raigs de llum i els convergeix en un focus, es troba acoblat amb l'obertura de diafragma per tal de controlar la resolució, el contrast i la resplendor. L'obertura del diafragma és un dispositiu que permet graduar la llum emesa per la làmpada i es pot utilitzar sota per enfocar sobre les mostres incolores o obert pel contrast de fases. I el portaanells de llum és un corredís d'anells que s'utilitza segons el tipus d'il·luminació que es necessita, si és de contrast de fases o de relleu, excepte en camp clar que no s'utilitza.

Per acabar cal anomenar el sistema de les lents, que està format pels objectius, els oculars i per altres peces. Els objectius es caracteritzen per un sistema de lents complexes situat sota la platina mecànica, estan adaptats per enfocar mostres sobre diferents bases i per treballar a llargues distàncies a causa del gruix dels recipients que impedeixen un contacte estret entre la mostra i l'objectiu. Concretament, hi ha 4 objectius segons l'augment de les seves lents: 4X, 10X, 20X i 40X. Els oculars permeten captar la imatge generada per l'objectiu i ampliar-la. I les altres peces del sistema de lents són els botons micromètrics i macromètrics, el tub binocular, l'anell d'ajust de diòptries, etc (*veure Figura 11*).

En l'experiment hem utilitzat el Microscopi invertit IMT2 (Olympus).

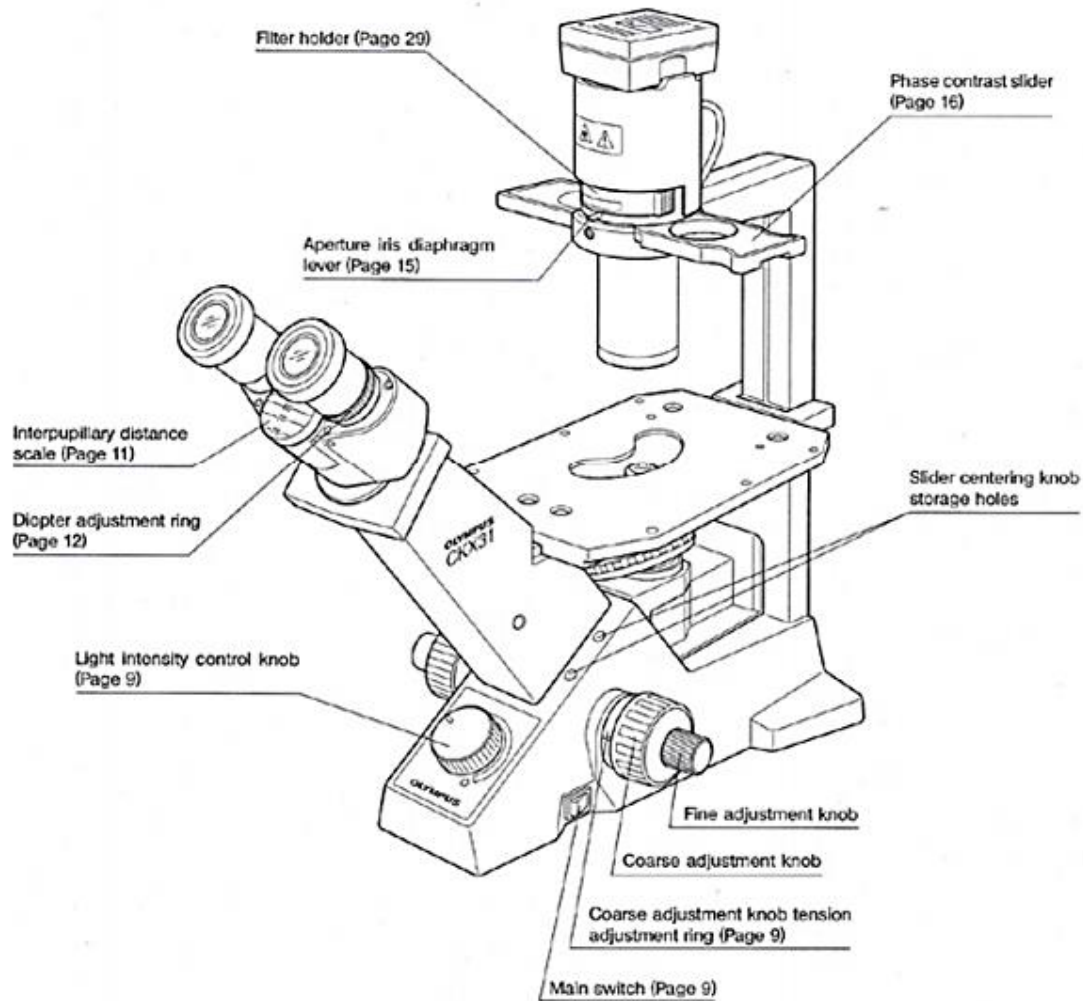


Figura 11: Microscopi òptic invertit

Font: biblioteca.institutbonanova.cat

Càmera de Neubauer

La càmera de *Neubauer* és instrument que s'utilitza pel comptatge cel·lular en un medi líquid. Està formada per un portaobjectes que té dues zones amb una lleugera depressió en el fons de la qual hi ha gravada una quadrícula, aquestes dues zones ens permeten fer dos recontes simultàniament. Per la seva utilització, la càmera (portaobjectes) es cobreix amb un cobreobjectes, que s'adhereix per tensió superficial. Posteriorment s'introdueix el líquid amb les cèl·lules per capil·laritat entre la càmera i el cobreobjectes, i es col·loca correctament al microscopi amb l'augment adequat i es realitza el comptatge cel·lular (veure Figures 12 i 13).

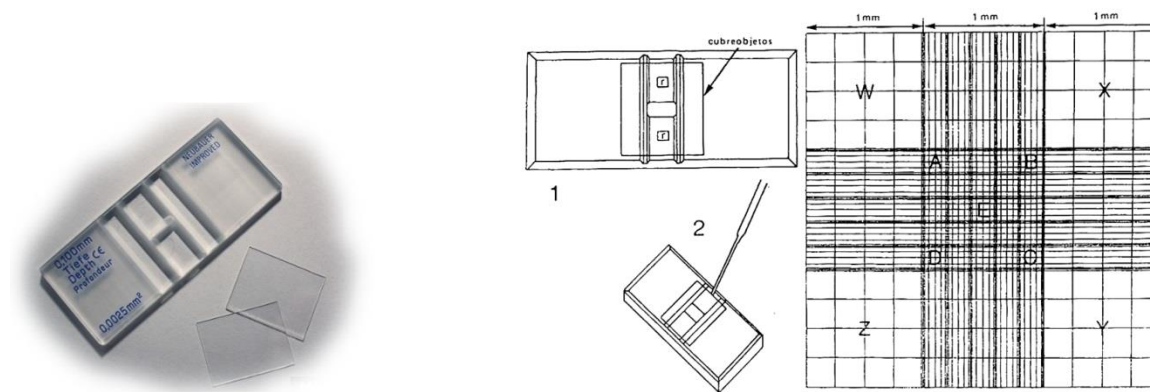


Figura 12: Càmera de Neubauer i cobreobjectes **Figura 13:** Dibuix de càmera de Neubauer i la seva quadrícula

Font: biomodel.uah.es

Font: www.ub.edu

Vòrtex

El vòrtex és un agitador que permet barrejar i homogeneïtzar les substàncies en líquids continguts en vials, petits tubs o flascons. Està format per un motor elèctric amb un eix vertical unit a una peça de goma foradada lleugerament pel centre. Pel que fa al seu funcionament, quan el motor està encès la peça de goma oscil·la en un moviment circular ràpid i en pressionar el tub amb el líquid contra la goma aquest moviment es transmet a l'interior del tub barrejant el líquid i homogeneïtzant-ne les substàncies dissoltes al líquid (veure Figura 14).



Figura 14: Vòrtex

Font: es.aliexpress.com

Plaques de cultiu cel·lular

Les plaques de cultiu cel·lular són les utilitzades en procediments de cultiu cel·lular degut a la seva esterilitat i la no citotoxicitat. Estan formades per poliestirè òpticament transparent per garantir-ne una observació microscòpica sense

distorsions. Entre els diferents models de plaques de cultiu cel·lular es poden trobar les d'una única superfície plana o amb diferent nombre de pous.

4.2. Mètodes

4.2.1. Esterilitat i asèpsia

En un laboratori de cultius cel·lulars és bàsic mantenir l'asèpsia i l'esterilitat. Cal disposar de les instal·lacions necessàries i minimitzar tant com sigui possible qualsevol agent contaminant. Els més habituals són: bacteris, llevats, fongs i micoplasmes.

La contaminació pot ser localitzada i afectar únicament un cultiu i no altres experiments, o pot escampar-se en diferents cultius i comprometre la totalitat dels experiments dels usuaris que treballin al laboratori en aquell moment.

Per evitar o minimitzar la presència de contaminants és fonamental establir un codi estricte de bones pràctiques de laboratori que abasti des del material extern al que introduïm al laboratori de cultius, el vestuari, l'interior de les cabines de flux laminar, els incubadors, la centrífuga, el bany tèrmic, etc. I cal assegurar-se que tots els usuaris del laboratori compleixen aquest codi.

Per mantenir les condicions d'asèpsia al laboratori cal seguir el procediment següent:

Respecte l'usuari:

1. Abans d'entrar a la sala de cultius cal assegurar-se que es té tot el material necessari, deixar la bata de laboratori fora de la sala de cultius i posar-se la bata exclusiva de cultius, les polaines, la reixa pel cap i la mascareta. Un cop vestit no es pot sortir de la sala i si es fa s'haurà de repetir tot el procediment.
2. Posar-se guants sense talc i rentar-se les mans amb una solució d'alcohol del 70% i esperar que s'evapori per posar les mans dins la cabina de flux laminar. No es podran treure de la cabina un cop introduïdes, si es fa s'han de tornar a rentar amb alcohol.
3. Cal evitar contaminar els guants que portem, evitant tocar-nos la cara i el cabell.

4. Evitar parlar directament sobre la cabina de flux laminar o amb la porta oberta de l'incubador.
5. S'han d'evitar els corrents d'aire: apagar l'aire condicionat, evitar entrar i sortir moltes vegades, acompanyar les portes amb cura, treballar amb moviments lents dins la cabina.

Respecte el material:

1. Tot el material utilitzat ha de ser estèril. No es poden entrar a la sala de cultius material contaminat ni brut o objectes amb pols.
2. El material que entri a la cabina s'ha de rentar abans amb un paper impregnat d'alcohol del 70%.
3. El material estèril que no s'ha utilitzat no es pot tornar al seu lloc, s'ha de deixar dins de la cabina.
4. El pipeteig de substàncies ha de ser acurat i ràpid.
5. Llençar els materials netejats prèviament amb lleixiu que hagin estat en contacte amb els cultius cel·lulars, i el material punxant s'ha de llençar al contenidor de residus clínics.

Respecte l'equipament:

1. Mantenir la temperatura del bany a 37°C.
2. Tenir l'incubador obert el mínim temps possible.
3. Manipular els cultius dins la cabina de flux laminar.
 - a. Encendre la cabina uns 10 minuts abans de començar a treballar-hi.
 - b. Netejar la superfície de la cabina amb alcohol del 70%.
 - c. Netejar cada utensili i material amb alcohol del 70% abans d'introduir-lo dins la cabina.
 - d. Ficar en un vas lleixiu diluït en aigua i anar ficant dins tots els estris que anem utilitzant per tal de netejar-los i d'esterilitzar-los de nou.
 - e. Mantenir el cos allunyat uns 20 cm de la cabina i les mans netejades prèviament amb etanol del 70% dins.
 - f. No obstruir les reixetes amb el material.
 - g. Intentar tenir el mínim material necessari dins la cabina i mantenir el material als lateral.

- h. En acabar de treballar-hi, s'ha de netejar la superfície de la cabina amb alcohol del 70% i apagar el llum i el flux.
 - i. Encendre la llum ultraviolada durant uns 15 minuts. A continuació, apagar-lo i esperar 15 minuts més abans de tornar-hi a treballar.
4. Manipular la cistella per centrifugar tubs dins la cabina i tancar la cistella amb la tapa amb rosca.

Respecte la manipulació de la mostra:

1. Mantenir les mans el més allunyades possibles dels materials que han d'entrar en contacte amb els cultius, ja que encara que ens les netegem amb alcohol els guants no són estèrils i poden ser una font de contaminació.
2. S'han de subjectar els taps amb la mà boca avall o deixar-los de cap per amunt sobre la superfície de la cabina de flux laminar i evitar passar la mà o el braç per sobre.
3. Si accidentalment es toca la part de fora de la rosca de taps, tubs, flascons o ampolles amb la pasteur, pipeta serològica,... descartar-la ràpidament i si queda medi o solució a la part externa de la rosca eixugar-lo amb cura amb un paper impregnat d'alcohol.
4. En cas que produïm un esquitx a alguna de les parets de la cabina cal eixugar-ho immediatament amb un paper impregnat d'alcohol si la superfície és d'acer inoxidable. Si és una part de metacrilat (com els frontals de les cabines) mai s'utilitza alcohol ja que danyaria el material. També és important no deixar residus de paper.
5. En cas de vessament accidental, ja sigui a la cabina o a l'incubador, cal retirar-lo amb paper absorbent net, netejar la superfície primer amb un paper impregnat amb aigua estèril i després amb un paper impregnat amb alcohol. Mai s'ha de començar a netejar el vessament amb alcohol ja que estaríem fixant el producte que ens ha caigut enlloc de retirar-lo.
6. En cas que ens caigui alguna cosa sòlida per les reixetes de la superfície de la cabina, a l'acabar de treballar, apagar el flux, retirar les reixetes i recuperar allò que ens hagi caigut, sinó es quedarà interferint el flux de la cabina.

7. Cal fer un control diari del cultiu cel·lular. Visualment: canvi de color del medi, terbolesa. Amb microscopi: canvis de morfologia, creixement, observació de microorganismes.
8. És necessari fer un control de l'*stock*: quan arriben les cèl·lules d'un laboratori extern comprades s'ha de mantenir una part amb medi sense antibiòtics durant 1 setmana per assegurar-nos que no estan contaminades.
9. S'ha de fer un control del medi: posar medi de cultiu suplementat i sense antibiòtics a l'incubador en una placa de petri o un flascó durant 2-3 dies.

4.2.2. Descongelació de cèl·lules

Per tal de poder realitzar l'experiment cal descongelar les cèl·lules per poder cultivar-les i disposar de les que es requereixen. Es basa en una descongelació ràpida de les cèl·lules que estan conservades en nitrogen líquid a -196°C per poder establir un cultiu cel·lular.

Cal tenir presents les precaucions que s'han de prendre a l'hora de procedir a descongelar cèl·lules:

- El procés de descongelació ha de ser ràpid, ja que el dimetilsulfòxid (DMSO), que és un crioprotector quan les cèl·lules estan congelades, és tòxic per a aquestes un cop descongelat a partir de 37°C , i s'ha d'evitar al màxim possible fer-les malbé.
- Treballar amb les condicions d'asèpsia i esterilitat descrites en l'apartat 3.2.1.
- Al treure els criotubs del nitrogen líquid, utilitzar guants i paper absorbent.

El procediment que s'ha de seguir per dur a terme la descongelació de cèl·lules és el següent:

1. Encendre el bany tèrmic a 37°C .
2. Encendre la cabina de flux laminar a màxima potència per a que recirculi l'aire i creï esterilitat.
3. Preparar tot el material, netejar-lo amb alcohol del 70% per esterilitzar-lo i desmar-ho dins la cabina.

4. Preparar un tub cònic de 30mL amb 5mL de medi de cultiu específic de la línia cel·lular a descongelar.
5. Treure els criotubs del *dewar* on estaven preservats en nitrogen líquid i embolicar-los immediatament amb paper absorbent, ja que amb el xoc tèrmic podrien esclatar i obrir-se.
6. Posar el criotub en un bany d'aigua a 37°C sense submergir el tap, ja que podria entrar aigua i contaminar les cèl·lules, i remoure contínuament
7. En 3 minuts el contingut del criotub s'haurà descongelat, es treu del bany, es neteja amb alcohol del 70% abans d'introduir-lo a la cabina.
8. Pipetejar el contingut del criotub (cèl·lules + medi de congelació), 1 mLaproximadament, amb la pipetapasteur estèril i posar-ho al tub de 30 mL preparat prèviament amb 5 mL de medi de cultiu. S'ha d'agitar el tub amb cura mentre es van afegint les cèl·lules per ajudar a disgregar-les.
9. Centrifugar 200xg durant 5 minuts. Per tal d'equilibrar la centrífuga s'ha d'afegir un tub amb el mateix volum amb aigua al costat oposat del tub que conté les cèl·lules amb el medi.
10. Descartar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* de cèl·lules en el seu medi de cultiu específic.(veure Figura 15)
11. Col·locar la suspensió de cèl·lules en un flascó T-75 i posar-lo a l'incubador a 37°C i al 5% de CO₂.

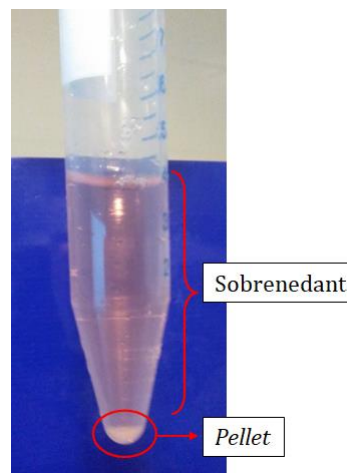


Figura 15: Tub amb cèl·lules després de centrifugar.

4.2.3. Comptatge i viabilitat cel·lular

Una suspensió cel·lular presenta un número de partícules microscòpiques, que són les cèl·lules, disperses en el fluid. Abans de procedir amb l'experiment és necessari determinar tant la densitat de les cèl·lules en suspensió com el seu percentatge de viabilitat. Per tant, l'objectiu del comptatge i la viabilitat cel·lular és determinar el número de cèl·lules totals que tenim a la suspensió cel·lular i quantes d'aquestes cèl·lules són viables en un determinat volum. D'aquesta manera en podem conèixer el creixement per cultivar les cèl·lules sempre en les mateixes condicions de densitat. I saber el nombre de cèl·lules que s'utilitzen en els experiments així com el que posem en cada vial.

Per dur a terme el comptatge cel·lular s'utilitza la càmera de *Neubauer*, que és una càmera de comptatge adaptada al microscopi de camp clar o al de contrast de fases, (veure Figura 16). Es tracta d'un portaobjectes amb una depressió al centre en el fons de la qual hi ha marcat amb diamant una quadrícula. Concretament, és un quadre de 3x3 mm amb una separació entre dues línies consecutives de 0,25 mm (veure Figura 17). Les zones blaves marcades amb L corresponen a 1mm². La depressió central del portaobjectes està enfonsada 0,1mm respecte la superfície, de manera que quan es cobreix amb un cobreobjectes, aquest dista de la superfície marcada 0,1mm, i el volum comprès entre la superfície L i el cobreobjectes és de 0,1mm³.



Figura 16: Càmera de Neubauer

Font: articulo.mercadolibre.com.ar

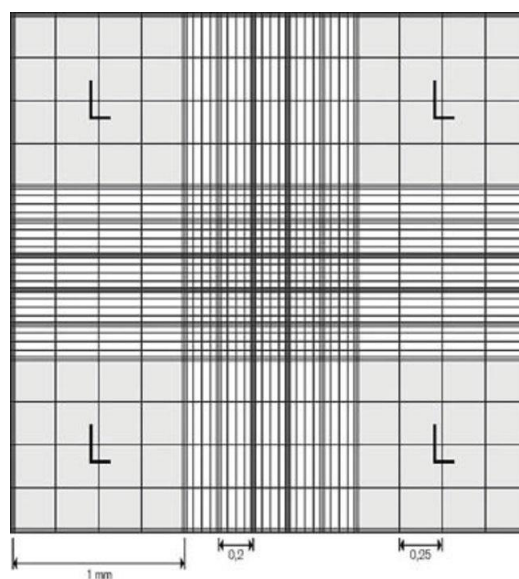


Figura 17: Quadrícula marcada a la depressió central

Font: www.fishersci.es

Cal tenir presents les precaucions que cal prendre per procedir a fer el comptatge cel·lular: treballar en condicions d'esterilitat, protegir-se amb màscara, guants i bata i no respirar el vapor, ja que el *Trypan Blue* és tòxic i potencialment carcinogen.

El procediment que s'ha de seguir per fer el comptatge de cèl·lules és el següent:

1. Afegir 50µL de la solució 0,4% *Trypan Blue* i 50µL de la suspensió cel·lular en un eppendorf de 0,5 mL de capacitat. Pipetejar per tal d'aconseguir una mescla homogènia.
2. Introduir amb la micropipeta una gota de la suspensió a la càmera de *Neubauer* per la vora del cobreobjectes perquè pugui penetrar cap dins fins cobrir tota la superfície.
3. Observar al microscopi . Localitzar el quadre de la càmera i les cèl·lules. Les cèl·lules tenyides de blau són les mortes i les altres les vives, ja que el *Trypan Blue* penetra pels porus de la membrana de les cèl·lules mortes i les tenyeix, en canvi, no pot penetrar la membrana de les cèl·lules vives, ja que aquesta es troba intacta, de manera que queden de color blanquinós(veure Figura 18).
4. Comptar les cèl·lules vives i les mortes dels 4 quadres en diagonal de cadascun dels 4 quadrats que formen els vèrtexs de la quadrícula. De les cèl·lules que queden a les línies del quadre només contem les de la línia de dalt i la de l'esquerra (veure Figura 19).
5. Fer la mitjana de cada quadrat i la total
6. Multiplicar: la mitjana total $\times 2 \times 16 \times 10000 = X$ cèl·lules/mL. S'obté la concentració de cèl·lules en 1mL.
(2 per la dilució de *Trypan Blue*,16 perquè és la superfície que correspon a 0,1µL i per 10000 per convertir 0,1mm³ a 1 mL)
7. Per saber la quantitat total de cèl·lules es multiplica pel volum on teníem les cèl·lules resuspeses.

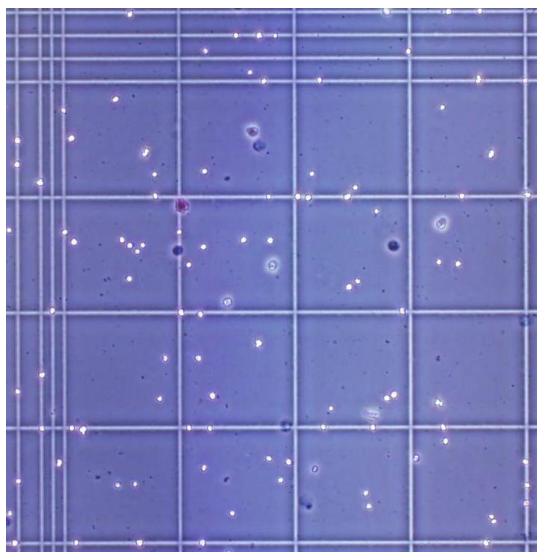


Figura 18: Imatge microscòpica de la càmera de Neubauer

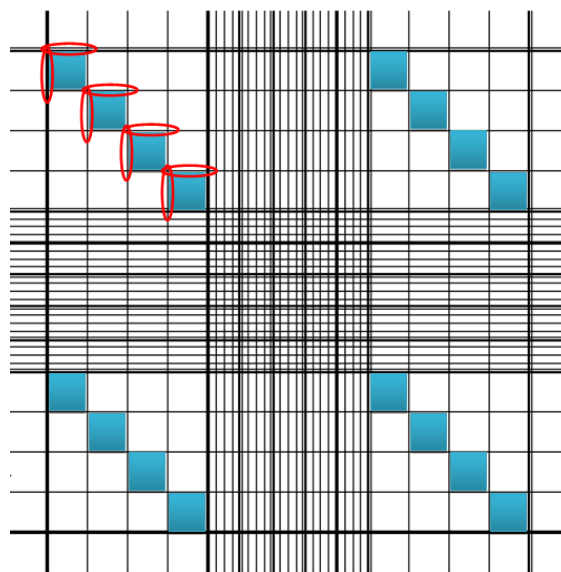


Figura 19: Comptatge cel·lular

Per conèixer la viabilitat de la suspensió cel·lular s'ha de calcular el percentatge de cèl·lules viables: $\text{cèl·lules no tenyides} / \text{cèl·lules totals} \times 100$.

Una vegada coneguda la viabilitat cel·lular i la quantitat de cèl·lules de les que es disposa, se les pot sembrar en un flascó T-75 amb medi de cultiu per procedir amb el cultiu cel·lular.

4.2.4. Cultiu cel·lular

L'objectiu principal d'un cultiu cel·lular és bàsicament mantenir vives les cèl·lules extretes artificialment i que puguin cultivar-se en condicions controlades. En els sistemes de cultiu cel·lular es pretén que les cèl·lules, que es troben en un entorn tridimensional en el teixits, es cultivin i examinin en les circumstàncies adequades i en condicions *in vitro*. Les tècniques de cultiu cel·lular s'utilitzen amb cultius cel·lulars primaris, cultius secundaris i línies cel·lulars.

En el nostre experiment hem utilitzat la línia cel·lular de les cèl·lules THP-1(DSMZ, Germany) que són cèl·lules que creixen en en suspensió. Les línies cel·lulars estan formades per cèl·lules que es diferencien genèticament i morfològicament de les cèl·lules de les quals s'han originat. Aquest tipus de cultiu es caracteritza per no tenir inhibició per contacte i per créixer de manera indefinida.

Les cèl·lules estan en continua divisió durant el cultiu, per tant, creixen fins ocupar tot el volum disponible. Això pot provocar: esgotament dels nutrients del medi, acumulació de cèl·lules mortes, inhibició de la divisió cel·lular i, fins i tot diferenciació cel·lular promiscua causada pels contactes intercel·lulars. Aquests problemes es poden resoldre amb mètodes d'esterilitat, amb l'afegiment d'antibiòtics al medi i amb els canvis de medi per mantenir les condicions de densitat apropiades. El canvi de medi té per objectiu renovar els nutrients i evitar l'acumulació de cèl·lules mortes i productes metabòlics potencialment tòxics per les cèl·lules.

Per tal de mantenir el cultiu cel·lular, les cèl·lules s'han de mantenir en un incubador a una temperatura i mescla de gasos apropiats, és a dir, 37°C, 5% CO₂ i 95% O₂. També s'ha de tenir en compte el medi de cultiu, les composicions dels quals poden variar en pH, concentració de glucosa, factors de creixement i la presència d'altres components nutritius.

4.2.5. Kit *Enzyme-LinkedImmunoSorbentAssay*(ELISA). Immunoassaig de TNF- α humà.

El kit ELISA per immunoassaig de factor de necrosis tumoral-alpha(TNF- α) s'utilitza per determinar quantitativament la concentració de TNF- α en cultius cel·lulars en suspensió, sèrums i plasma.

El TNF- α és una citocina, és a dir, una glicoproteïna de baix pes molecular que es produeix en els primers segons de l'activació cel·lular i estimulen a cèl·lules amb receptors específics. Per aquest motiu, té un paper central en la inflamació, el desenvolupament del sistema immunològic, l'apoptosi (mort cel·lular), i el metabolisme dels lípids. El TNF- α també està involucrat en nombroses condicions patològiques.

L'immunoassaig TNF- α és un ELISA de fase sòlida que té una durada de 3,5-4,5 hores i està dissenyat per a mesurar i quantificar el TNF- α humà. Conté TNF- α humà recombinant derivat d'*Escherichiacolii* anticossos contra aquesta proteïna. Aquest kit es pot utilitzar per determinar els valors de massa relatius del TNF- α humà secretat per les cèl·lules. Atès que la mesura del TNF- α és insensible a l'addició de formes recombinants d'algun dels dos tipus de receptors solubles, és probable que aquesta

mesura detecti la quantitat total de TNF- α lliure més la quantitat de TNF- α unida a receptors solubles.

Aquest assaig utilitza la tècnica de l'immunoassaig enzimàtic *sandwich* quantitatiu. Un anticòs monoclonal específic per a TNF- α s'ha pre-encapsulat sobre una microplaca de 96 pous. Els *standards* i les mostres es pipetegen als pous i el TNF- α present queda unit per l'anticòs immobilitzat. Després de rentar les substàncies que no han quedat unides, s'afegeix als pous un anticòs policlonal unit a l'enzim específic pel TNF- α humà. Seguidament d'un rentat per eliminar els reactiu d'enzim d'anticòssos que no s'han unit, s'afegeix una solució de substrat als pous i el color es desenvolupa en proporció a la quantitat de TNF- α unit en el pas inicial. Quan el desenvolupament del color s'atura es mesura la intensitat del color de cada pou (veure Figura 20).

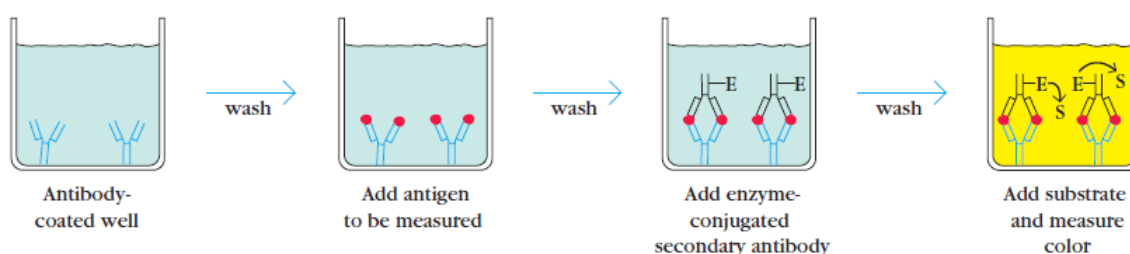


Figura 20: ELISA tipus Sandwich

Font: laboratoryinfo.com

Abans de procedir amb el kit cal posar els reactius a temperatura ambient i preparar-los:

- **Wash Buffer:** si s'han format cristalls en el concentrat, s'ha d'escalfar a temperatura ambient i barrejar suaument fins que els cristalls estiguin completament dissolts.
- **Calibrator Diluent RD6-35(diluit 1:5):** s'ha d'afegir 10mL d'aquesta solució en 40mL d'aigua destil·lada o desionitzada. S'obté una dilució 1:5 de *Calibrator Diluent RD6-35* de 50mL.
- **SubstrateSolution:** Els reactiu de color A i B s'han de mesclar junts en volums iguals en 15 minuts per ser utilitzats. S'ha de protegir de la llum. De la mescla resultant es dipositen 200 μ L en cada pou.
- **TNF- α Standard:** S'ha de reconstruir amb aigua desionitzada o destil·lada. Aquesta reconstrucció produeix una solució *stock* de 10.000pg/mL. S'ha de

deixar reposar un mínim de 15 minuts amb una lleugera agitació abans de fer dilucions.

Quan s'han preparat els reactius, es pipetegen 900µL de dilució 1:5 de *Calibrator Diluent RD6-35* en un tub obtenint una concentració de 1000pg/mL. Després es pipetegen 500µL de la dilució de *Calibrator Diluent* en els tubs restants. I s'utilitza la solució *stock* per fer dilucions en sèrie. Cal barrejar bé cada tub abans de la següent transferència. Els 1000pg/mL serveixen com d'*standard* alt i la dilució de *Calibrator Diluent* com a *standard zero* (veure Figura 21).

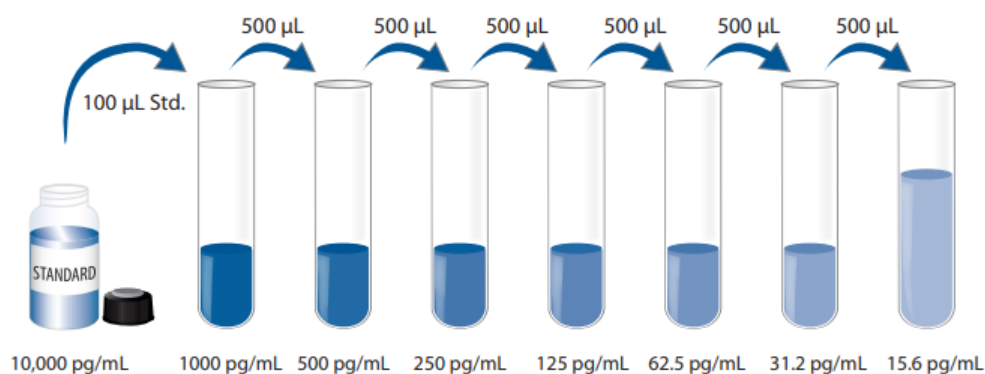


Figura 21: Dilucions en sèrie dels reactius del kit ELISA

Font: www.sigmadrich.com

El procediment que s'ha de seguir per dur a terme aquest kit ELISA per TNF- α (R&D Systems, United Kingdom) és el següent:

1. Introduir 50µL d'*Assay Diluent RD1F* a cada pou. Si l'*Assay Diluent RD1F* ha precipitat cal barrejar-lo bé abans d'utilitzar-lo.
2. Afegir 200µL d'*Standard* per pou, cobrir-ho amb un plàstic adhesiu i deixar-ho durant 2 hores a temperatura ambient.
3. Aspirar i rentar cada pou 4 vegades. Es neteja amb un rentador de plaques que omple cada pou amb 400µL de *Wash Buffer*. L'eliminació completa del líquid és imprescindible pel bon funcionament del kit. Després de l'últim rentat cal eliminar les restes de *Wash Buffer* per aspiració o decantació. S'ha d'invertir la placa i buidar-la contra tovallons nets de paper absorbent.
4. Posar 200µL de *Human TNF- α Cojugate* a cada pou i cobrir-ho amb un plàstic adhesiu. En el cas que les mostres sigui de cultiu cel·lular en suspensió, s'ha d'incubar 1 hora a temperatura ambient.
5. Repetir el rentat com en el punt 3.

6. Afegir 200µL de *Substrate Solution* a cada pou i incubar-ho 20 minuts a temperatura ambient. Cal protegir de la llum.
7. Afegir 50µL de *Stop Solution* a cada pou. El color dels pous canviarà de blau a groc. Si el color dels pous és verd o no és uniforme s'ha de moure suaument la placa perquè la barreja sigui completa.
8. Determinar la densitat òptica de cada pou abans de 30 minuts a través un lector de microplaques (Synergy HT de Biotek) ajustat a 450nm.

4.2.6. Kit de detecció de la citotoxicitat (LDH)

El kit de detecció de la citotoxicitat està dissenyat com una alternativa colorimètrica precisa, ràpida i senzilla per quantificar la citotoxicitat basada en la mesura de l'enzim lactat-deshidrogenasa (LDH) alliberat per les cèl·lules danyades. Per això, aquest kit s'utilitza en sistemes cel·lulars *in vitro* quan hi ha possibilitats que es produeixin danys a la membrana plasmàtica i les cèl·lules estiguin malmeses, de manera que els resultats dels experiments en els que s'utilitzin puguin sortir alterats. S'ha demostrat que una avaluació precisa de la mort cel·lular durant la fermentació en els bioreactors es pot realitzar mitjançant la mesura de l'alliberament citoplasmàtic de l'activitat enzimàtica de LDH al medi de cultiu.

La mort cel·lular és avaluada normalment amb la quantificació dels danys de la membrana plasmàtica. La necessitat de mètodes automàtics fiables de quantificació per determinar amb precisió la mort cel·lular va portar al desenvolupament de diferents assaigs per a quantificar la viabilitat cel·lular. La quantitat d'activitat enzimàtica detectada en el sobrenedant del cultiu té una correlació amb la proporció de cèl·lules mortes.

L'enzim lactat-deshidrogenasa (LDH) és un enzim citoplasmàtic estable present en totes les cèl·lules. I es localitza ràpidament en el sobrenedant del cultiu cel·lular sobre els danys de la membrana plasmàtica. Utilitzant el kit de detecció de citotoxicitat l'activitat del LDH pot ser mesurada fàcilment en un cultiu en suspensió i l'ús del lector espectrofotomètric de microplaques permet la mesura simultània d'un gran nombre de mostres.

Aquest kit es du a terme recollint el sobrenedant lliure de cèl·lules del cultiu i incubant-lo amb la mescla de reactius del kit. L'activitat de la LDH es determina amb un test enzimàtic. Primer la LDH redueix l'ió positiu de nicotinamida adenina dinucleòtid (NAD^+)¹⁵ (agent oxidant, accepta electrons) a NADH/H^+ (agent reductor, cedeix electrons) mitjançant l'oxidació del lactat¹⁶ a piruvat¹⁷. En el segon pas un catalitzador (diaforasa) transfereix 2 hidrògens del NADH/H^+ a la sal de tetrazoli INT¹⁸ que és reduïda a un producte de formazan¹⁹ vermell. (veure Figura 22)

L'augment de l'activitat enzimàtica del LDH en el sobrenedant del cultiu cel·lular està directament relacionat amb la quantitat de formazan format durant un període de temps limitat. En conseqüència, la quantitat de color format en l'assaig és proporcional al nombre de cèl·lules mortes. El colorant de formazan format és soluble en aigua i pot mostrar una absorció màxima de 500nm, mentre que la sal de tetrazoli INT mostra una absorció insignificant.

El procediment que s'ha de seguir per du a terme el kit és el següent (veure Figura 23):

1. S'ha de deixar els reactius a temperatura ambient abans de començar.
2. Posar 50µL de sobrenedant del cultiu en una placa de 96 pous amb els duplicats corresponents.
3. Segons la quantitat de mostres que tinguem, es farà el càlcul de la quantitat de cada reactiu que necessitem pel nostre assaig. En el nostre cas, en un tub d'assaig protegit de la llum es posa 4,05mL del reactiu *Dyesolution* i 90µL del reactiu catalitzador (*Catalyst*) i es remou suaument.
4. Es posen 50µL de la mescla dels dos reactius preparats anteriorment en cada pou obtenint dissolucions 1:2 en cadascun. Cobrir la placa i mantenir-la en un lloc protegida de la llum durant 30 minuts.

¹⁵ La nicotinamidaadenina dinucleòtid (NAD) és un coenzim compost per dos nucleòtids enllaçats per grups fosfats, un amb adenina i l'altre amb nicotinamida, present en totes les cèl·lules vives.

¹⁶ El lactat és l'anió de l'àcid làctic ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$), i té un paper important en diferents processos bioquímics.

¹⁷ El piruvat és l'anió (COO^-) de l'àcid pirúvic ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$), i té un paper important en diferents vies metabòliques.

¹⁸ La sal de tetrazoli o clorur de tetrazoli ($\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{ClN}_4$) és un indicador redox utilitzat en experiments bioquímics, soluble en aigua.

¹⁹ El formazan és un compost químic ($\text{C}_{40}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_{10}\text{O}_6$) utilitzat freqüentment en immunologia experimental i en immunoassaigs.

5. Cada pou adquireix un to de vermell del qual se'n determina la densitat òptica amb un lector de plaques i es calcula la quantitat de LDH del cultiu.

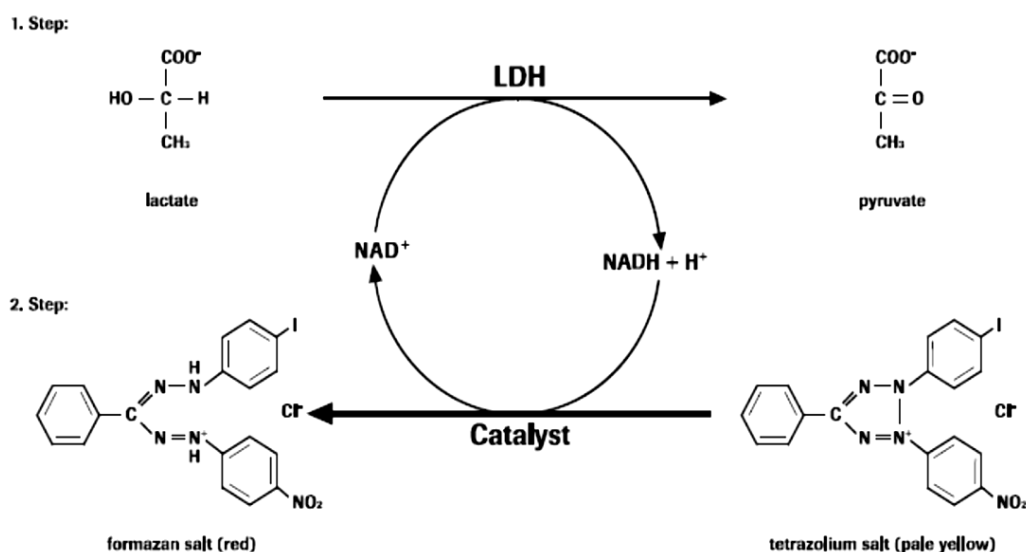


Figura 22: Test enzimàtic que determina l'activitat de LDH

Font: dspace.umh.es

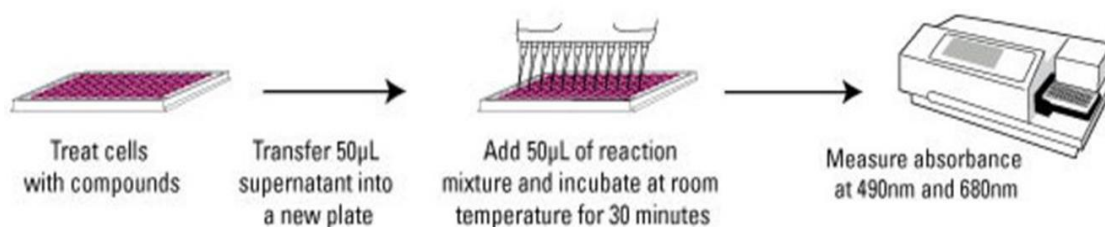


Figura 23: Procediment d'aplicació del kit

Font: www.fishersci.es

4.3. Procediment

L'experiment es basa en induir a través de LPS la inflamació a monòcits THP-1. Determinarem si els sèrums presenten propietats antiinflamatòries a partir de la quantificació de les concentracions de TNF- α (marcador d'inflamació per excel·lència) secretat al medi del cultiu. L'efecte antiinflamatori dels sèrums es calcularà mitjançant la diferència entre el TNF- α secretat per les cèl·lules que han estat pre-incubades amb els sèrums corresponents i les que només hagin estat incubades amb LPS solament.. D'aquesta manera podrem calcular el percentatge d'inhibició del

TNF- α produït pels sèrums i el que obtenim amb la màxima estimulació causada a les cèl·lules amb LPS.

4.3.1. Descongelació i creixement cel·lular previ al procés experimental:

(veure annex 1)

Dia 0 (dimecres):

1. Seguint el mètode d'asèpsia i esterilitat (*mirar subapartat 4.2.1*) s'elaboren els medis de cultiu al 10 i al 20% de FBS dins la cabina de flux laminar. (*veure figura 24*)



Figura 24: Components del medi de cultiu: RPMI-1640, FBS, i P/S.

2. Es descongelen les cèl·lules THP-1 seguint el protocol (*mirar subapartat 4.2.2*).
3. Es fa el comptatge cel·lular (*mirar subapartat 4.2.3*)(*veure annex 3*) i es fan fotos del cultiu a diferents augments. (*veure annex 4, dia 0*)
4. Es sembren en un flascó T-75 i es deixen incubar en suspensió, a 37°C i al 5% de CO₂, a una densitat aproximada de 211.000 cels/mL i s'obté un volum de 22mL de cultiu cel·lular al 20% de FBS. Sembrem les cèl·lules al 20% de FBS per tal d'estimular el seu creixement ja que les acabem de descongelar. Al cap de 2 dies s'afegeix medi de cultiu al 10% de FBS ja que llavors ja haurem estimulat el seu creixement i només el mantindrem en les condicions normals.

Dia 1 (dijous):

1. S'observa el creixement del cultiu cel·lular amb el microscopi i es fan fotos a diferents augments per fer-ne el seguiment. *(veure annex 4, dia 1)*

Dia 2 (divendres):

1. Seguint els mètodes d'asèpsia i esterilitat es fa un canvi de medi. Atès que les cèl·lules es dupliquen cada 48h, a dia 2 es calcula tenir aproximadament $9,28 \times 10^6$ cèl·lules en total a una densitat de 422.000 cels/mL en un volum de 22mL de medi de cultiu al 20% de FBS.
2. Per aconseguir una dilució 1:2 s'afegeix al cultiu 22mL de medi de cultiu al 10% de FBS amb l'ajut d'una pipeta i un pipetus ambdós estèrils. D'aquesta manera s'aconsegueix reduir a densitat del cultiu cel·lular a 211.000 cels/mL augmentant el volum total a 44mL de medi de cultiu al 10% de FBS.
3. S'observa el creixement del cultiu amb el microscopi i es fan fotos a diferents augments. *(veure annex 4, dia 2)*

Dia 3 (dissabte) i Dia 4 (diumenge):

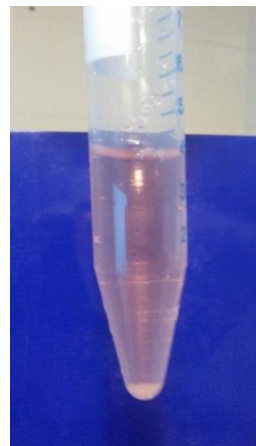
1. Les cèl·lules poden nodrir-se en el mateix medi de cultiu durant 2-3 dies sense la necessitat de canviar de medi durant aquest temps. Per aquest motiu, no cal fer manteniment dels cultius cel·lulars durant aquests dos dies.

Dia 5 (dilluns):

1. Seguint la tècnica d'asèpsia i esterilitat es fa el canvi de medi. A dia 5 es calcula tenir aproximadament $27,84 \times 10^6$ cèl·lules en total a una densitat de 633.000 cels/mL i en un volum de 44mL de medi de cultiu al 10% de FBS.
2. Per obtenir una dilució 1:2 s'afegeix al cultiu cel·lular 44mL de medi de cultiu al 10% de FBS. Aconseguint un volum total de 88mL de medi de cultiu al 10% de FBS es redueix la densitat del cultiu a aproximadament 300.000 cels/mL.
3. Com que al flascó T-75 no hi caben els 88mL de medi de cultiu s'ha de dividir en dos flascons amb 44mL de medi cadascun.
4. S'observa el creixement del cultiu al microscopi i es fan fotos a diferents augments. *(veure annex 4, dia 5)*

Dia 6 (dimarts):

1. Seguint el mètode d'asèpsia i esterilitat es transfereix el cultiu cel·lular (medi de cultiu + cèl·lules) dels flascons T-75 a dos tubs d'assaig. A dia 6 es calcula tenir aproximadament $41,76 \times 10^6$ cèl·lules totals a una densitat de 450.000cels/mL i en un volum de 88mL de medi de cultiu al 10% de FBS.
2. Es centrifuguen els tubs d'assaig (200g, 5min, T^aambient) i s'extreu el sobrenedant (cultiu cel·lular) per descartar-lo. (veure Figura 25 i 26)

**Figura 25:** centrifugadora utilitzada**Figura 26:** cultiu cel·lular centrifugat

3. Per fer el comptatge cel·lular es posen 40µL de *Trypan Blue* i 40µl de cultiu cel·lular en un tub eppendorf amb l'ajut d'una micropipeta. Aquesta mescla s'introdueix en una càmera de Neubauer i es fa el comptatge. (veure imatge 27)

**Figura 27:** Introducció de la solució de cultiu cel·lular + *Trypan Blue* a la càmera de Neubauer

4. Es necessiten 20×10^6 cèl·lules totals en 40 mL finals de medi de cultiu per fer el nostre experiment, segons els càlculs del comptatge cel·lular, s'han d'agafar 6,5 mL de cultiu cel·lular i afegir medi de cultiu al 10% de FBS fins arribar a 40mL totals en un tub d'assaig. Es calcula tenir en el nostre experiment una densitat de 500.000cels/mL/well (veure annex 4, dia 6)

4.3.2. Procés experimental

Dia 6 (dimarts):

1. Preparació del material

- 1.1. Seguint la tècnica d'asèpsia i esterilitat es prepara el material necessari per l'experiment i es retola degudament cada placa o tub on s'ha de dipositar en algun moment medi de cultiu, sèrum, dissolucions o reactius necessaris per l'experiment.
- 1.2. Es treuen els sèrums del congelador a -80°C i es deixen descongelar a temperatura ambient.
- 1.3. S'han de filtrar els sèrums abans d'utilitzar-los per tal de mantenir l'esterilitat de l'experiment. Primer es xucla amb una xeringa i una agulla els sèrums. Després s'insereix el contingut de la xeringa en un tub eppendorf a través d'un filtre que té uns porus de $0,22\mu\text{m}$ de mida. La mida d'aquests porus és més petita que la mida dels bacteris i, per tant, evita que els bacteris passin. D'aquesta manera s'evita contaminar les cèl·lules quan entren en contacte amb els sèrums. (veure Figura 28)



Figura 28: Filtració dels sèrums

2. Preparació de la dilució de BAY

- 2.1. Es prepara una dilució 1:10 del BAY, pipetejant en un tub $5\mu\text{L}$ de BAY stock (100mM) i $45\mu\text{L}$ de DMSO (actua com a vehicle del BAY). Per tant, la concentració que s'obté és de 10mM .
 - 2.2. Es posen 7mL de cultiu cel·lular i $3,5\mu\text{L}$ de la dilució (10mM) que s'ha preparat en el punt anterior (BAY diluït) per tenir una concentració final de BAY al medi de cultiu de $5\mu\text{M}$.
3. Preparació de plaques i de les condicions de l'experiment:(veure annex 2)

- 3.1. En cadascuna de les 3 plaques de 12 pous cadascuna, es posa 1mL de cultiu cel·lular del 1r al 4t pou. El sembrat ha de seguir un patró circular, realitzant cercles de l'exterior a l'interior del pou per tal de garantir la bona dispersió de les cèl·lules. 
- 3.2. Al 5è i al 6è pou se sembra 1mL de la dilució de BAY diluït + cultiu cel·lular.
- 3.3. Als sis pous restants se sembren 900µL de cultiu cel·lular i 100µL de sèrum corresponent (dilucions de concentració 1:10), de tal manera que el contingut de sèrum és del 10%. En el 7è i el 8è hi ha el sèrum del mateix voluntari. En el 9è i el 10è el sèrum d'un altre voluntari i a l'11è i al 12è hi ha el d'un altre voluntari. (veure Figura 29)

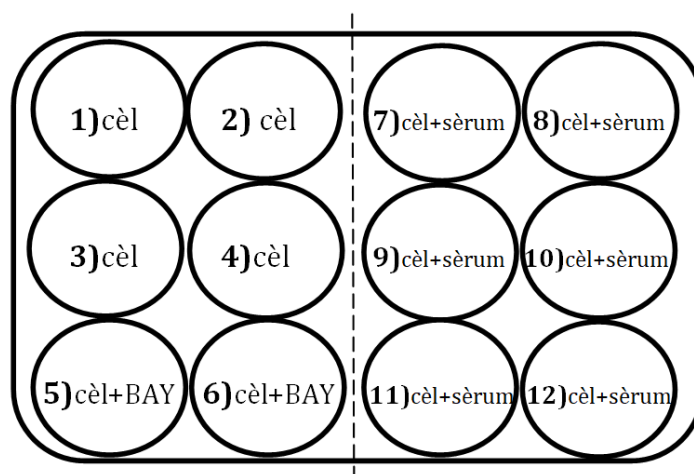


Figura 29: Esquema de la placa i el seu contingut

- 3.4. Les plaques s'han d'incubar a 37°C i al 50% de CO₂ durant 1 hora.
4. Preparació de la dilució de LPS
- 4.1. Durant l'hora d'incubació de les plaques, es prepara una dilució de LPS diluït de concentració 1:10 amb aigua destil·lada estèril (actua com a vehicle del LPS). Per fer-ho es posa 360µL d'aigua destil·lada estèril i 40µL de LPS stock (500µg/mL) en un tub eppendorf per tenir una concentració de LPS de 50µg/mL.
5. Activació dels monòcits amb LPS
- 5.1. Després d'una hora es treuen les plaques de l'incubador.
- 5.2. S'afegeix amb una micropipeta 10µL de LPS diluït (50µg/mL; preparat en el punt 4) en cada pou excepte als dos primers que són els blancs. D'aquesta manera obtindrem la concentració final de LPS de 500ng/mL.

- 5.3. Es posen les plaques a incubar a 37°C i al 5% de CO₂ durant 4 hores.
6. Fi de l'experiment: extracció del sobrenedant
- 6.1. Un cop finalitzat l'experiment, es passa el contingut de cada pou de les plaques a tubs eppendorf d'1,5mL amb l'ajut d'una micropipeta.
- 6.2. Es centrifuguen els tubs eppendorf durant 10 minuts a 200g i a 4°C. Amb aquest procediment el que es fa és separar les cèl·lules del medi de cultiu.
- 6.3. S'extreu el sobrenedant i es posa en uns altres tubs eppendorf nous, i es descarta el *pellet*.
- 6.4. Es posen els tubs eppendorf a congelar a -20°C fins l'anàlisi del TNF- α i de la LDH.

Dia 7 (dimecres)

1. Kit ELISA (mirar subapartat 4.2.5)

Es realitza el kit seguint el protocol que proporciona la casa comercial del kit *Quantikine Human TNF α de R&D Systems* amb referència DTA00C. I obtenim una placa amb els continguts distribuïts tal com es representa en la Figura 30. (veure Figura 31, 32, 33 i 34)

Blank	Blank	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33
Std 1 (15.6 pg/mL)	Std 1 (15.6 pg/mL)	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34
Std 2 (31.2 pg/mL)	Std 2 (31.2 pg/mL)	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35
Std 3 (62.5 pg/mL)	Std 3 (62.5 pg/mL)	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36
Std 4 (125 pg/mL)	Std 4 (125 pg/mL)	5	5	13	13	21	21	29	29		
Std 5 (250 pg/mL)	Std 5 (250 pg/mL)	6	6	14	14	22	22	30	30		
Std 6 (500 pg/mL)	Std 6 (500 pg/mL)	7	7	15	15	23	23	31	31		
Std 7 (1000 pg/mL)	Std 7 (1000 pg/mL)	8	8	16	16	24	24	32	32		

Product A (Control) D0

Product A (Control) D28

Product D (LMN) D28

Figura 30 :Representació del contingut que es posa en cada pou de la placa ELISA.

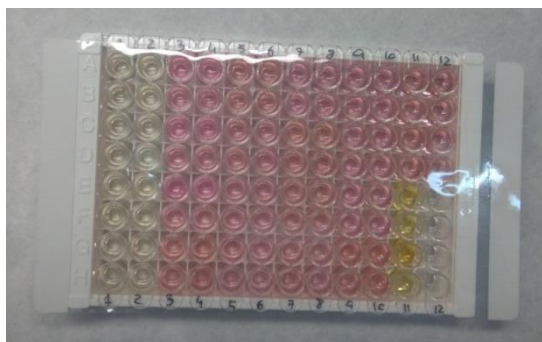


Figura 31: Placa abans de l'adició dels reactius del kit.

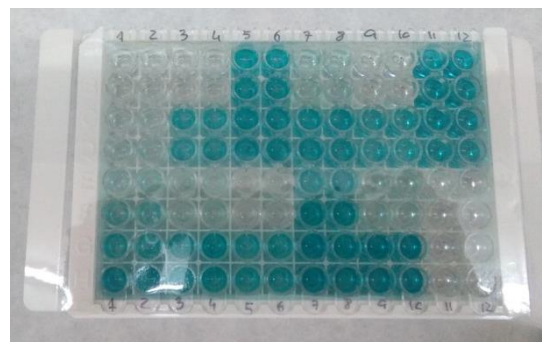


Figura 32: Placa després de l'adició dels reactius del kit

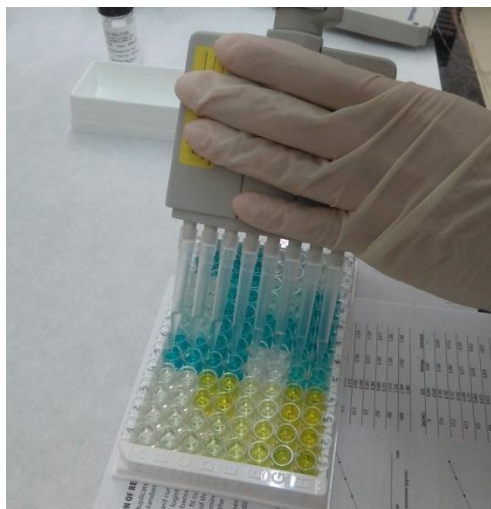


Figura 33: Placa quan s'afegeix l'Stop Solution i els pous passen de blau a groc.

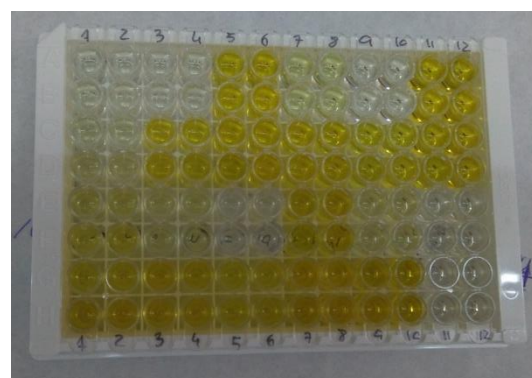


Figura 34: Placa llesta per determinar-ne la densitat òptica

2. Kit citotoxicitat del cultiu cel·lular (mirar subapartat 4.2.6)

S'ha de seguir el protocol indicat per la casa comercial *Cytotoxicity Detection kit (LDH)* de *Roche Applied Science* amb referència 11 644 793 001. S'obté que les solucions dels pous tenen colors de diferents tons de vermell. Es posa la placa al lector de densitat òptica i se'n determina l'activitat del LDH dels sèrums. (veure *Figura 35 i 36*)



Figura 35: Placa abans de l'adició dels reactius del kit.

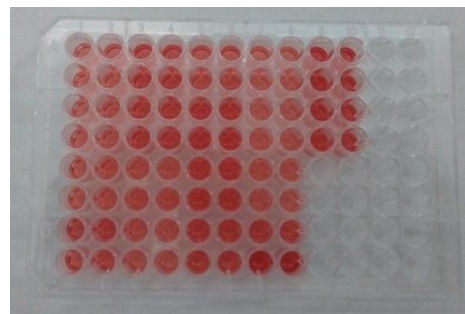


Figura 36: Placa després de l'adició del reactius del kit llesta per determinar-ne la densitat òptica.

5. Resultats

5.1. Citotoxicitat de les mostres

5.1.1 Sobrenedant de cultiu cel·lular

(veure annex 5)

S'observa que els valors de presència de LDH de cada mostra es manté força regular en les tres plaques.

En la condició del blanc observem que hi ha uns nivells basals de LDH.

En la condició del LPS (500 ng/mL) en la que estimulem les nostres cèl·lules (per tal que secretin TNF- α) és la condició de màxima estimulació cel·lular. No obstant, veiem que no provoca una mort cel·lular més gran que el blanc, per tant, la inflamació que s'ha induït ha inflammat les cèl·lules per tal de secretar el TNF- α però no n'ha provocat la seva mort. De manera que les cèl·lules són funcionals a la concentració de LPS testada (500 ng/mL).

En la condició de BAY a la concentració testada (5 μ M) i amb LPS, veiem que tampoc és tòxica per les cèl·lules. També s'ha de tenir en compte la presència de DMSO que és el vehicle del BAY i podria tenir certa citotoxicitat. Això no passa ja que estem utilitzant una concentració que s'ha testat prèviament i sabem que no provoca citotoxicitat. Així doncs,, la secreció de LDH que desprenen les cèl·lules en aquesta condició és equiparable a la que s'observa a la condició del LPS (de màxima estimulació).

La secreció de LDH de les cèl·lules en els sobrenedants del medi de cultiu en les condicions del blanc, del LPS i del LPS + BAY, és força similar entre els tres pel que podem dir que el nostre model cel·lular funciona. És a dir, podem estimular les nostres cèl·lules però aquesta inflamació no provoca mort cel·lular. De totes formes es pot veure un augment del 52,52 % de mitjana respecte la condició del LPS en les mostres dels tres tipus d'estudis (sense cacau del dia 0, amb cacau del dia 28 i amb cacau suplementat del dia 28).

Els nivells de citotoxicitat detectats entre els tres tipus de tractament són similars, pel que el fet d'haver consumit o no crema de cacau o crema de cacau suplementat no afectaria als nivells de citotoxicitat de les mostres.

5.1.2 Sèrums

(veure annex 6)

La composició dels sèrums dels voluntaris d'aquest estudi, poden contenir altres factors no testats que facin augmentar la presència de LDH en les mostres d'aquest experiment o pot ser que el sèrum en sí ja contingui LDH degut a la seva procedència humana, tot i això no hi ha diferències significatives respecte al LPS.

Per aquest motiu es va voler testar el nivells de LDH dels sèrums sense haver estat incubats amb les cèl·lules.

S'observa que els sèrums presenten entre un augment del LDH d'entre el 48,77% i el 80,88% en comparació amb la mostra de medi de cultiu amb un contingut del 10% de FBS. Per tant, els nivells de citotoxicitat dels sèrums és superior a la de medi de cultiu, que en té una quantitat basal.

No obstant, podem comparar les absorbàncies obtingudes dels sèrums de les mostres dels voluntaris del D28 amb el tractament de ambdues cremes de cacau i dels sobrenedants del cultiu cel·lular de l'experiment i veiem que són similars. Això vol dir que els nivells de citotoxicitat del medi i dels sèrums no són diferents i, per tant, no alteren els resultats de l'experiment.

Cal destacar que el medi de cultiu cel·lular conté vermell de fenol (indicador de pH), que ja dona un color rosat a la mostra de manera que en comprovar la densitat òptica de la mostra part d'aquesta densitat pot ser donada pel vermell de fenol, no únicament per la presència de LDH. De la mateixa manera, els sèrums també tenen un color més grogós de per sí que podria afectar a la determinació de l'absorbància. És a dir, a part del heterogeni contingut dels sèrums i/o el color de la mostra de l'experiment podrien ser factors que podrien explicar el lleuger augment dels nivells de LDH de les mostres comparats amb la condició de LPS.

5.2. Proteïna del TNF- α de les mostres

(veure annex 7)

S'observa que la quantitat de TNF- α secretat per les cèl·lules en la condició del blanc és molt baixa, així que, els nivells basals d'aquesta citocina són molt baixos.

En la condició de LPS (500ng/mL) la quantitat de TNF- α secretada per les cèl·lules és de 497,44 pg/mL a causa de la inflamació induïda.

En la condició del BAY (5 μ M) es veu un descens important de TNF- α secretat per les cèl·lules després d'haver estat estimulades amb LPS que suposa la inhibició de la inflamació en un 87,44% de mitjana. Pel que podem demostrar que el BAY és un bon inhibidor de l'activació del TNF- α després d'haver estimulat amb del LPS.

En el sobrenedant de les condicions dels sèrums s'observa un augment de la secreció de TNF- α de les cèl·lules respecte la condició de LPS.

En el sobrenedant de les condicions dels sèrums sense cacau (dia 0) es pot veure un augment de secreció de TNF- α del 62,06% respecte la condició del LPS. I els valors de TNF- α oscil·len entre 737,14 i 899,69pg/mL i les desviacions són d'entre 27,45 i 56,57 pg/mL. En el sobrenedant de les condicions dels sèrums amb cacau (dia 28) s'observa un augment de secreció de TNF- α del 68,04% respecte la condició del LPS. I els valors de TNF- α es troben entre 720,08 i 1010,24 pg/mL i les desviacions són d'entre 18,64 i 71,31pg/mL.

En el sobrenedant de les condicions dels sèrums amb cacau suplementat (dia 28) es veu un augment de secreció de TNF- α del 78,38% respecte la condició del LPS. I els valors de TNF- α oscil·len entre 898,28 i 876,36 pg/mL i les desviacions són d'entre 20,59 i 41,91 pg/mL.

Si es comparen a nivell individual les mostres de la condició del sèrum dels tres voluntaris, es troba que el voluntari 9 no ha experimentat cap variació significativa comparant el dia 0 (sense cacau) amb el dia 28 (amb cacau), el voluntari 10 tampoc ha experimentat cap variació significativa, i el voluntari 15 ha experimentat una lleugera variació que no es considera significativa. Per tant, la presència de cacau en el sèrum no ha provocat ni un augment ni una disminució de la presència de TNF- α en el sobrenedant. Com que no hi ha diferències entre els tractaments ni abans ni

després d'aquests, el tractament amb cadascun dels tractaments amb cacau no disminuiria TNF- α .

6. Discussió

En aquest estudi, s'ha avaluat l'efecte de diferents sèrums de voluntaris en els que no hi havia hagut ingesta de crema de cacau, havien ingerit crema de cacau o havien ingerit crema de cacau suplementada, sobre la disminució del TNF- α , un biomarcador d'inflamació secretat per les cèl·lules quan hi ha una inflamació. L'avaluació s'ha fet en el disseny d'un experiment d'inflamació *in vitro* estimulat amb LPS en el que s'apliquen BAY i els sèrums corresponents amb els controls necessaris (condició del blanc, condició del LPS). Després de realitzar aquest experiment, vam observar que tant el tractament amb crema de cacau com el tractament amb la crema de cacau suplementada són incapaços de disminuir la secreció de TNF- α de les cèl·lules estimulades amb LPS. A més a més, vam veure que tampoc estimulaven o augmentaven la secreció de TNF- α d'aquestes cèl·lules pel que podem afirmar que el cacau no té cap efecte sobre el TNF- α .

Comparant els tractaments després del consum de les dues cremes de cacau (dia 28) entre sí s'observa que no hi ha diferències entre el consum de les dues cremes. És a dir, el TNF- α secretat és gairebé el mateix en les condicions dels sèrums amb cacau que amb cacau suplementat. Això ens permet constatar que els suplementes de la crema de cacau no tenen un efecte diferent sobre el TNF- α diferent al consum d'una crema de cacau no enriquida.

Si es comparen les condicions dels sèrums amb cacau (dia 28) respecte els de sense cacau (dia 0), s'observa que tampoc hi ha diferències significatives. Per tant, el tractament amb cacau no afecta a la secreció de TNF- α de les cèl·lules. Això ens permet afirmar que el cacau no té cap efecte sobre el TNF- α , així doncs el cacau no té efecte antiinflamatori ni pro-inflamatori per la via del TNF- α .

Si es comparen les condicions dels sèrums (D0 i D28) respecte la condició del LPS, es va observar un augment de la secreció de TNF- α en les condicions del sèrums comparat amb el LPS. Aquest augment no està causat pel cacau ni pels suplementes, com hem justificat anteriorment. Per tant, podem pensar que el que causa aquest increment podria ser la composició del propi sèrum, ja que s'ha de tenir en compte que prové de persones i que conté altres factors no testats que no s'han tingut en compte en l'experiment. Cal destacar que els voluntaris d'aquest estudi presentaven hipertensió i algun factor de risc cardiovascular, entre d'altres requisits, de manera que és molt probable que els sèrums presentin TNF- α o algun factor que en provoqui la seva secreció. Una possibilitat també pot ser que un d'aquests factors de risc cardiovascular sigui la obesitat, que produeix inflamació, de manera que el sèrum ja podria contenir marcadors d'inflamació, com el TNF- α , des d'un principi.

En aquest estudi, hem demostrat que els sèrums de pacients que han consumit crema de cacau o crema de cacau enriquida, no tenen efecte antiinflamatori sobre el TNF- α . No obstant, la ingesta d'aquestes cremes de cacau poden tenir efecte sobre altres paràmetres. En concret, s'ha demostrat que la ingesta de la crema de cacau enriquida, té efecte antiinflamatori sobre altres biomarcadors d'inflamació, com és el cas de la proteïna C-reactiva d'alta sensibilitat (hsCRP) (Solà R, *Cocoa, Hazelnuts, Sterols and Soluble Fiber Cream Reduces Lipids and Inflammation Biomarkers in Hypertensive Patients: A Randomized Controlled Trial*, 2012). La proteïna C-reactiva és una proteïna que circula per la sang i és produïda al fetge, els seus nivells en sang augmenten quan el cos s'enfronta a una infecció o hi ha una inflamació. Segons l'estudi "*Cocoa, Hazelnuts, Sterols and Soluble Fiber Cream Reduces Lipids and Inflammation Biomarkers in Hypertensive Patients: A Randomized Controlled Trial*", el producte D (cacau+avellanes+fitosterols+fibra soluble) redueix la hsCRP. Concretament, comparat amb el control del producte de mantega de cacau, aquest producte redueix la hsCRP un 33,4%, cosa que indica un efecte antiinflamatori del producte. La fibra soluble és l'ingredient addicional en el producte que pot ser responsable de la disminució de la hsCRP. Segons l'estudi, aquest efecte ha estat descrit també recentment en l'efecte antiinflamatori dels polifenols del cacau. (Solà R, *Cocoa, Hazelnuts, Sterols and Soluble Fiber Cream Reduces Lipids and Inflammation Biomarkers in Hypertensive Patients: A Randomized Controlled Trial*, 2012)

Com que es va veure que la crema de cacau enriquida provoca una reducció de la hsCRP, vam decidir comprovar si amb el TNF- α passa el mateix, ja que els dos són biomarcadors d'inflamació. Però després del nostre experiment podem afirmar que malgrat que el cacau sigui antiinflamatori per algunes vies d'inflamació, com és el cas de la hsCRP, no ho és per la via del TNF- α .

7. Conclusions

7.1. Conclusió de la part experimental

Aquest estudi mostra que els sèrums de persones que han ingerit cremes de cacau o cremes de cacau enriquides amb avellanes, fitosterols i fibra soluble no tenen efecte antiinflamatori a través de la reducció del marcador de inflamació TNF- α en un model *in vitro* de monòcits estimulats amb LPS. Tot i que estudis previs mostren que la ingesta de la crema de cacau enriquida amb avellana, fitoesterols i fibra soluble van disminuir la concentració de hsCRP, però no a través de la disminució del TNF- α com s'ha demostrat en aquest estudi. Podem concloure que aquesta crema de cacau enriquida tindria un efecte antiinflamatori per la via de la hsCRP però no per la via del TNF- α .

Conclusion de la partie expérimentale

Cette étude montre que les sérums de personnes qui ont ingéré des crèmes de cacao ou crèmes de cacao enrichies avec des noisettes, fitosterols et fibre soluble n'ont pas effet anti-inflammatoire à travers la réduction du marqueur d'inflammation TNF- α dans un modèle in vitro de monocytes stimulés avec LPS. Même si études antérieures montrent que l'ingestion de la crème de cacao enrichie avec noisette, fitoesterols et fibre soluble a diminué la concentration de hsCRP, mais pas à travers la diminution du TNF- α comme est-il démontré dans cette étude. Nous pouvons conclure que cette crème de cacao enrichie aurait un effet anti-inflammatoire par la voie de la hsCRP mais ne par la voie du TNF- α .

7.2. Reflexió personal

Aquest treball m'ha permès endinsar-me profundament en l'àmbit de la investigació, que és el que em va motivar a realitzar aquest treball. Vaig començar amb uns conceptes molt bàsics respecte a la investigació i tot el que es feia en un laboratori, i aquesta experiència m'ha obert a aquest món i me l'ha permès conèixer i familiaritzar-m'hi. He après com funciona i com es treballa en un laboratori professional començant pel mètode científic amb el disseny, la realització i l'avaluació d'un experiment. A més a més he tingut l'oportunitat de treballar amb cultius cel·lulars i portar a la pràctica les tècniques necessàries per l'experiment, la majoria de les quals desconeixia. També he après algunes eines bàsiques d'estadística que m'han ajudat a expressar els resultats obtinguts de manera quantitativa.

Tot això acompanyat de la recerca que he fet per tal de comprendre i expressar tots aquests nous conceptes que estava aprenent i aplicant directament m'han permès tirar endavant aquest treball i arribar a les conclusions a les que he arribat.

Réflexion personnelle

Ce travail m'a permis m'enfoncer profondément dans le domaine de l'investigation, qui est ce que m'a motivé à réaliser ce travail. J'ai commencé avec des concepts très basiques par rapport à l'investigation et tout ce que se faisait dans un laboratoire, et cette expérience m'a ouvert à ce monde et me l'a permis connaître et m'y familiariser. J'ai appris comment il fonctionne et comment on y travaille dans un laboratoire professionnel en commençant par la méthode scientifique avec le design, la réalisation et l'évaluation d'un expériment. En plus, j'ai eu l'opportunité de travailler avec des cultures cellulaires et porter à la pratique les techniques nécessaires par l'expériment, la plupart desquelles je ne connaissais pas. J'ai appris aussi quelques outils basiques de statistique que m'ont aidé à exprimer les résultats obtenus de façon quantitative.

Tout cela accompagné de l'investigation que j'ai fait afin de comprendre et exprimer tous ces nouveaux concepts que j'étais en apprenant et en appliquant directement m'ont permis faire avancer ce travail et obtenir les conclusions à celles que je suis arrivée.

8. Bibliografia

- Solà R, Valls RM, Godàs G, Perez-Busquets G, Ribalta J, Girona J, Heras M, Cabré A, Castro A, Domenech G, Torres F, Masana L, Anglés N, Reguant J, Ramírez B, Barriach JM. ***Cocoa, hazelnuts, sterols and soluble fiber cream reduces lipids and inflammation biomarkers in hypertensive patients: a randomized controlled trial.*** PLoS One. 2012;7(2):e31103. doi: 10.1371/journal.pone.0031103.
- De Araujo QR, Gattward JN, Almoosawi S, Silva Md, Dantas PA, De Araujo Júnior QR. ***Cocoa and Human Health: From Head to Foot--A Review.*** Crit Rev Food Sci Nutr. 2016;56(1):1-12. doi: 10.1080/10408398.2012.657921. Review.
- Latif R. ***Health benefits of cocoa.*** Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2013 Nov; 16(6):669-74. doi: 10.1097/MCO.0b013e328365a235. Review.
- Li F, Vijayasankaran N, Shen AY, Kiss R, Amanullah A. ***Cell culture processes for monoclonal antibody production.*** MAbs. 2010 Sep-Oct;2(5):466-79.
- Kwok CS, Boekholdt SM, Lentjes MA, Loke YK, Luben RN, Yeong JK, Wareham NJ, Myint PK, Khaw KT. ***Habitual chocolate consumption and risk of cardiovascular disease among healthy men and women.*** Heart. 2015 Aug;101(16):1279-87. doi:10.1136/heartjnl-2014-307050.
- Kerimi A, Williamson G. ***The cardiovascular benefits of dark chocolate.*** Vascul Pharmacol. 2015 Aug;71:11-5. doi: 10.1016/j.vph.2015.05.011.
- Vicente Pascual, Rosa M. Valls, Rosa Solà. ***Cacao y chocolate: ¿un placer cardiosaludable?***
- Crescenti A, Solà R, Valls RM, Caimari A, Del Bas JM, Anguera A, Anglés N, Arola L. ***Cocoa Consumption Alters the Global DNA Methylation of Peripheral Leukocytes in Humans with Cardiovascular Disease Risk Factors: A Randomized Controlled Trial.*** PLoS One. 2013 Jun 26;8(6):e65744. doi:10.1371/journal.pone.0065744. Print 2013.
- Khan N, Khymenets O, Urpí-Sardà M, Tulipani S, Garcia-Aloy M, Monagas M, Mora-Cubillos X, Llorach R, Andres-Lacueva C. ***Cocoa polyphenols and inflammatory markers of cardiovascular disease.*** Nutrients. 2014 Feb 21;6(2):844-80. doi: 10.3390/nu6020844. Review.

- Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. **THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach**. Int Immunopharmacol. 2014 Nov;23(1):37-45. doi:10.1016/j.intimp.2014.08.002.
- Auwerx J (January 1991). **"The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation"**. Experientia. 47 (1): 22–31. doi:10.1007/BF02041244.
- Mario M. Müller, Roland Lehmann, Tilman E. Klassert, Stella Reifenstein, Theresia Conrad, Christoph Moore, Anna Kuhn, Andrea Behnert, Reinhard Guthke, Dominik Driesch, Hortense Slevogt. **Global analysis of glycoproteins identifies markers of endotoxin tolerant monocytes and GPR84 as a modulator of TNF α expression**. Sci Rep. 2017; 7: 838. Published online 2017 Apr 12. doi: 10.1038/s41598-017-00828-y
- Heinbockel L, Weindl G, Martinez-de-Tejada G, Correa W, Sanchez-Gomez S, Bárcena-Varela S, Goldmann T, Garidel P, Gutschmann T, Brandenburg K. **Inhibition of Lipopolysaccharide- and Lipoprotein-Induced Inflammation by Antitoxin Peptide Pep19-2.5**. Front Immunol. 2018 Jul 26;9:1704. doi: 10.3389/fimmu.2018.01704.eCollection 2018. Review.
- Hurtado, Stefany Romero; Iregui, Carlos Arturo (enero-junio de 2010). **«El Lipopolisacárido»**. Rev. Med. Vet. (Bogotá, Colombia: Scielo) (19): 37-45. ISSN 0122-9354. doi:10.19052/mv.783.
- Lee J, Rhee MH, Kim E, Cho JY. **BAY 11-7082 is a broad-spectrum inhibitor with anti-inflammatory activity against multiple targets**. Mediators Inflamm. 2012;2012:416036. doi: 10.1155/2012/416036.

8.1. Bibliografia web

- <http://servicios.unileon.es/formacion-pas/files/2014/02/Introducci%C3%B3n.pdf>
- <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2010/un102j.pdf>
- <https://www.sonoraquest.com/patient/patient-resources/crp-de-alta-sensibilidad-hs-crp/>
- <https://www.eupati.eu/es/medicina-genomica-personalizada/biomarcadores/>
- <https://iquimicas.com/bacterias-definicion-y-estructura/>
- https://cordis.europa.eu/result/rcn/92178_es.html

- http://www.termcat.cat/en/Diccionaris_En_Linia/183/Fitxes/catal%C3%A0/H/2000/
- <http://www.quimica.es/enciclopedia/Lipopolisac%C3%A1rido.html>
- https://www.ecured.cu/Cultivo_Celular
- <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~ONXRe2:2>
- http://cybertesis.uni.edu.pe/bitstream/uni/3196/1/reyes_yw.pdf
- <http://intrepido1.over-blog.es/article-como-funciona-campana-flujo-laminar-85924110.html>
- [http://www.idipaz.es/ficheros/files/Que%20es/2015/BA%C3%91O%20TERMOST%C3%81TICO\(1\).pdf](http://www.idipaz.es/ficheros/files/Que%20es/2015/BA%C3%91O%20TERMOST%C3%81TICO(1).pdf)
- http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/TIB-202.aspx?geo_country=es#generalinformation
- <http://www.icms.us-csic.es/sites/icms.us-csic.es/files/Procedimiento%20para%20la%20manipulaci%C3%B3n%20de%20nitr%C3%B3geno%20l%C3%ADquido.pdf>
- <https://glosarios.servidor-alicante.com/quimica>
- <https://es.vwr.com/store/product/556273/frascos-para-cultivo-celular-falcon>
- http://biblioteca.institutbonanova.cat:8080/intranet-tmpl/prog/local_repository/documents/3964.pdf
- <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/agitador-vortex-agitador-tubos-vortex.html>
- <https://www.softcatala.org/>
- <http://www.diccionari.cat/>
- <https://sinonims.iec.cat>

9. Annex

Annex 1: Planificació del creixement cel·lular

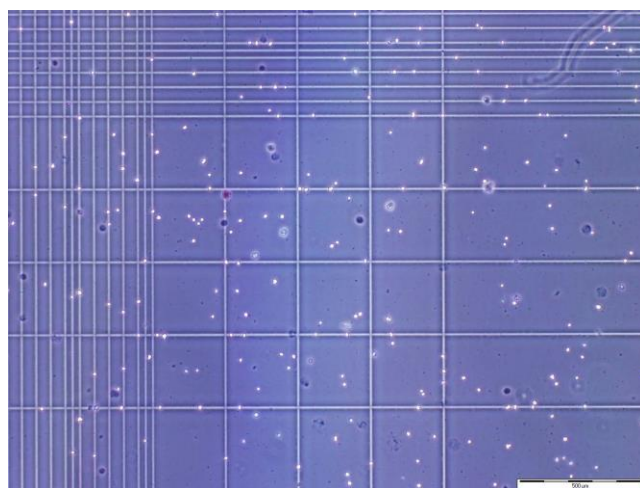
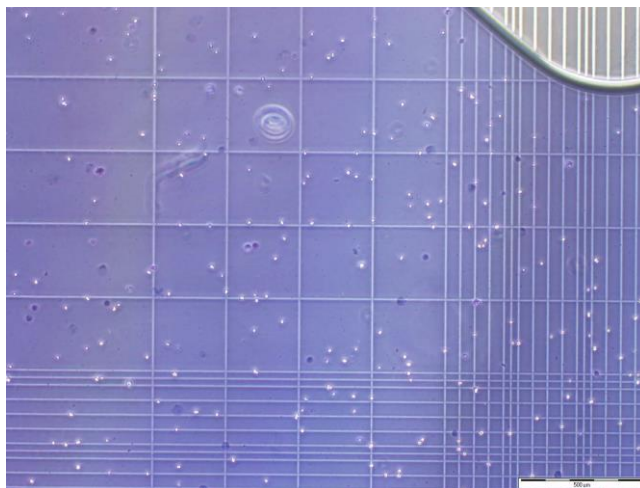
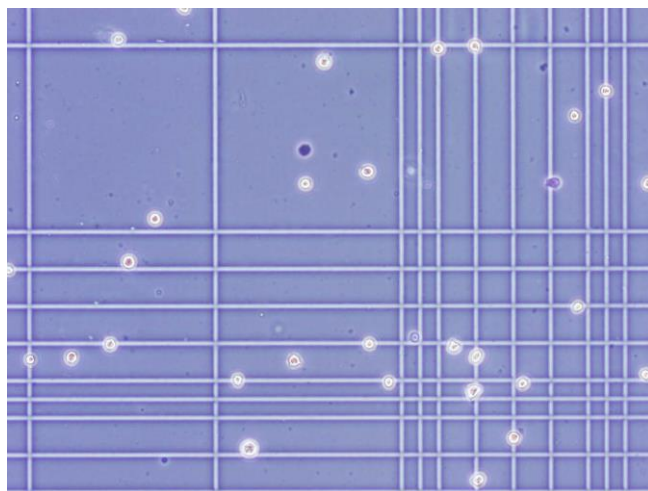
Dimecres 29/08/2018 D+0	Dijous 30/08/2018 D+1	Divendres 31/08/2018 D+2	Dissabte 01/09/2018 D+3	Diumenge 02/09/2018 D+4	Dilluns 03/09/2018 D+5	Dimarts 04/09/2018 D+6
Preparació medi de cultiu	Fotos	9.3 x 10 ⁶ cels totals			28 x 10 ⁶ cels totals	42 x 10 ⁶ cels totals
Descongelació		422 000 cels /mL			633 000 cels /mL	450 000 cels /mL
Centrifugació (200g, 5min, Tª amb)		22 mL MC al 20%			44 mL MC al 10%	88 mL MC al 10%
Comptatge:		 1:2			 1:2	
4.64 x 10 ⁶ cels totals		9.3 x 10 ⁶ cels totals			28 x 10 ⁶ cels totals	Centrifugació (200g, 5min, Tª amb)
211 000 cels /mL		211 000 cels /mL			300 000 cels /mL	Comptatge
22 mL MC al 20%		44 mL MC al 10%			88 mL MC al 10%	
						Experiment (500.000 cels /mL/well)

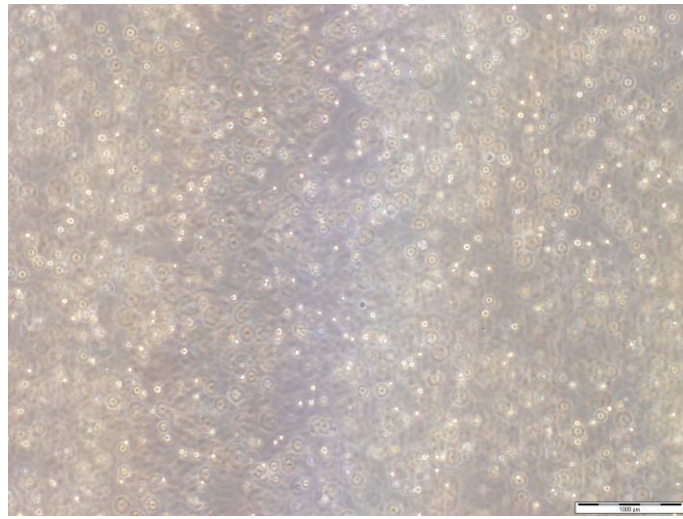
Annex 2: Plaques

Product A (Control) Baseline (D0)			
1	2	7	8
Blanc	Blanc	Sèrum Vol9_D0 (10%) + LPS (500ng/mL)	Sèrum Vol9_D0 (10%) + LPS (500ng/mL)
3	4	9	10
LPS (500 ng/mL)	LPS (500 ng/mL)	Sèrum Vol10_D0 (10%) + LPS (500ng/mL)	Sèrum Vol10_D0 (10%) + LPS (500ng/mL)
5	6	11	12
BAY (5 uM) + LPS (500 ng/mL)	BAY (5 uM) + LPS (500 ng/mL)	Sèrum Vol15_D0 (10%) + LPS (500ng/mL)	Sèrum Vol15_D0 (10%) + LPS (500ng/mL)

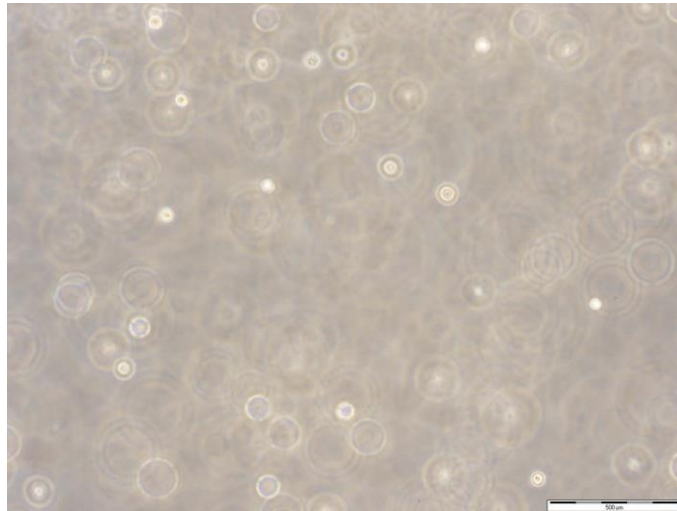
Product A (Control) Final (D28)			
13	14	19	20
Blanc	Blanc	Sèrum Vol9_D28 (10%) + LPS (500ng/mL)	Sèrum Vol9_D28 (10%) + LPS (500ng/mL)
15	16	21	22
LPS (500 ng/mL)	LPS (500 ng/mL)	Sèrum Vol10_D28 (10%) + LPS (500ng/mL)	Sèrum Vol10_D28 (10%) + LPS (500ng/mL)
17	18	23	24
BAY (5 uM) + LPS (500 ng/mL)	BAY (5 uM) + LPS (500 ng/mL)	Sèrum Vol15_D28 (10%) + LPS (500ng/mL)	Sèrum Vol15_D28 (10%) + LPS (500ng/mL)

Product D (LMN) Final (D28)			
25	26	31	32
Blanc	Blanc	Sèrum Vol7_D28 (10%) + LPS (500ng/mL)	Sèrum Vol7_D28 (10%) + LPS (500ng/mL)
27	28	33	34
LPS (500 ng/mL)	LPS (500 ng/mL)	Sèrum Vol16_D28 (10%) + LPS (500ng/mL)	Sèrum Vol16_D28 (10%) + LPS (500ng/mL)
29	30	35	36
BAY (5 uM) + LPS (500 ng/mL)	BAY (5 uM) + LPS (500 ng/mL)	Sèrum Vol23_D28 (10%) + LPS (500ng/mL)	Sèrum Vol23_D28 (10%) + LPS (500ng/mL)

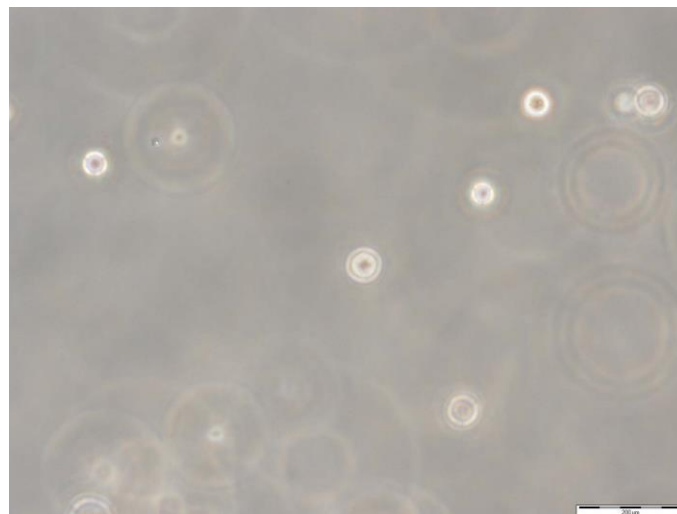
Annex 3: Imatges microscòpiques de la càmera de Neubauer llesta pel comptatge.

Annex 4: Observació del creixement del cultiu cel·lular amb microscopiDia 0

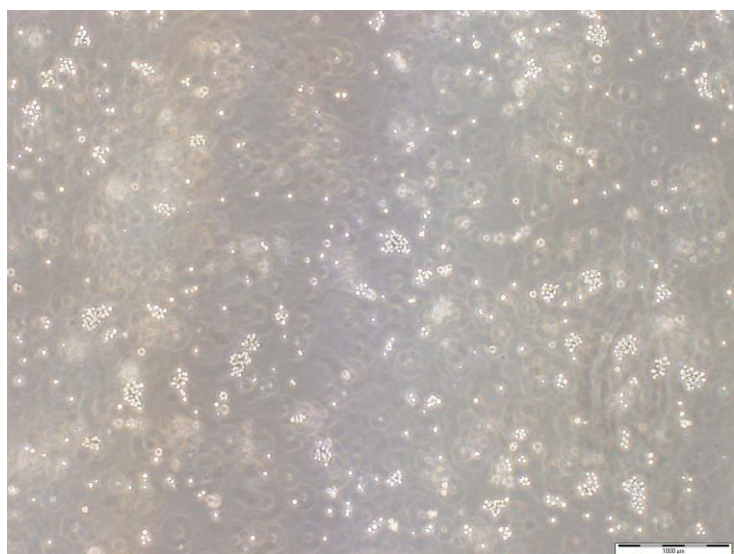
X4



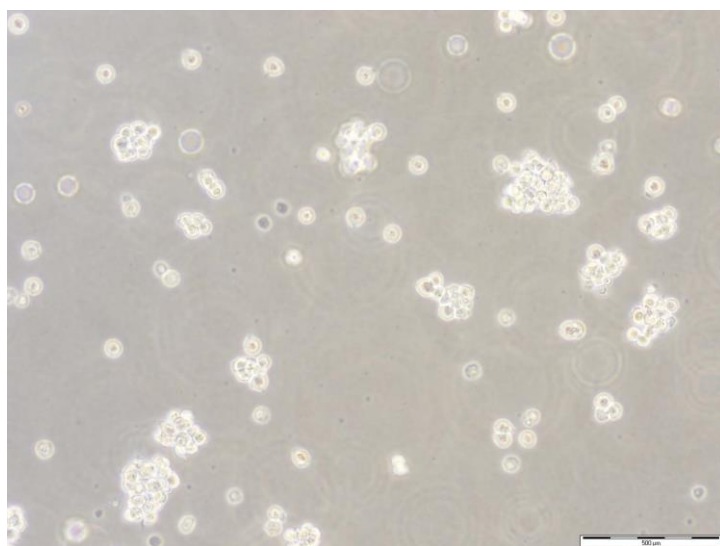
X10



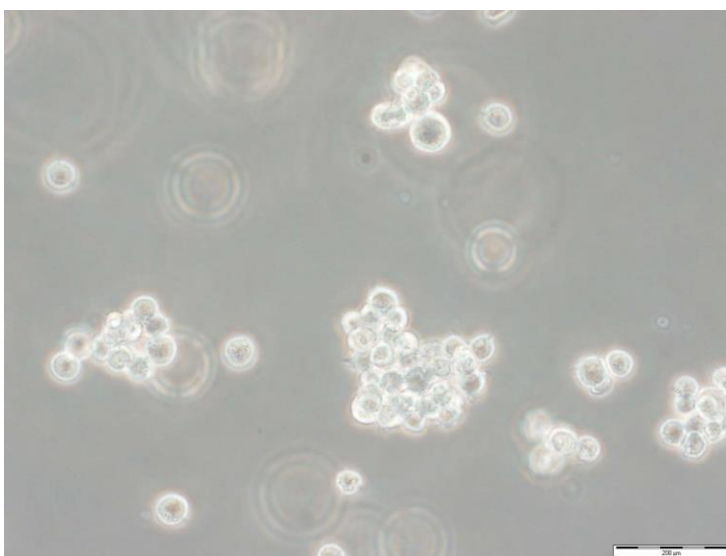
X20

Dia 1

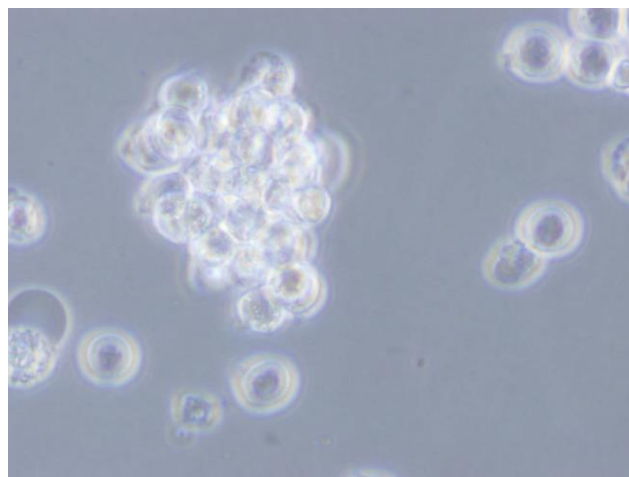
X4



X10

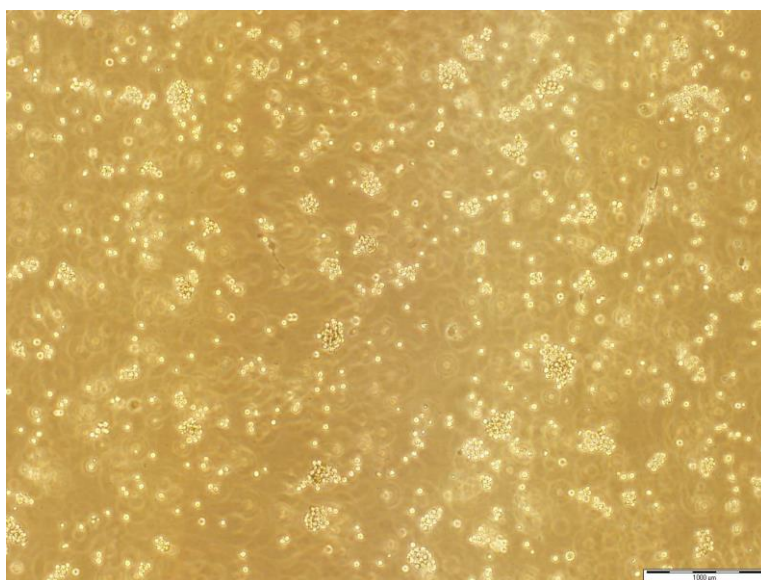


X 20

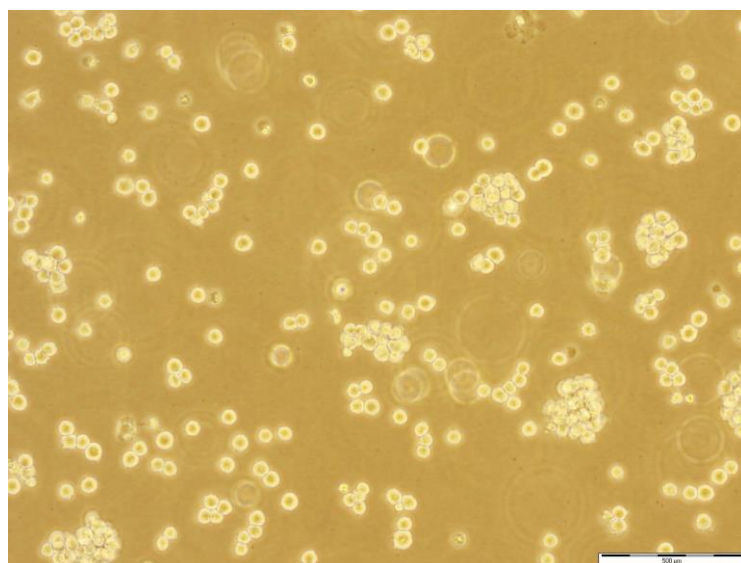


X40

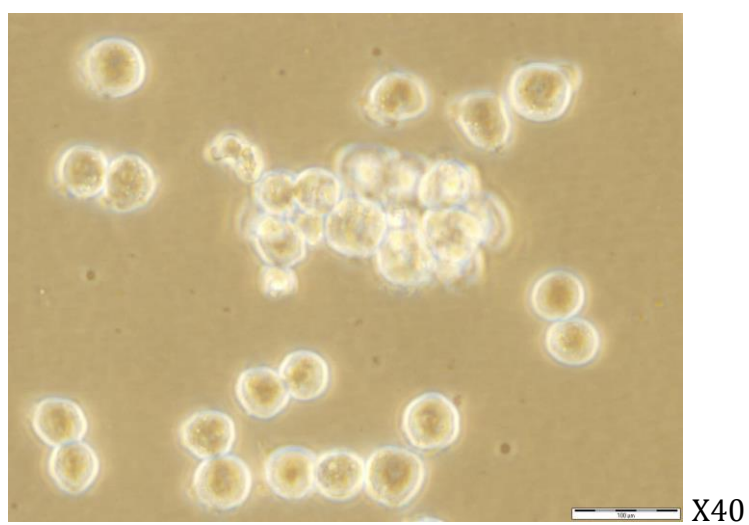
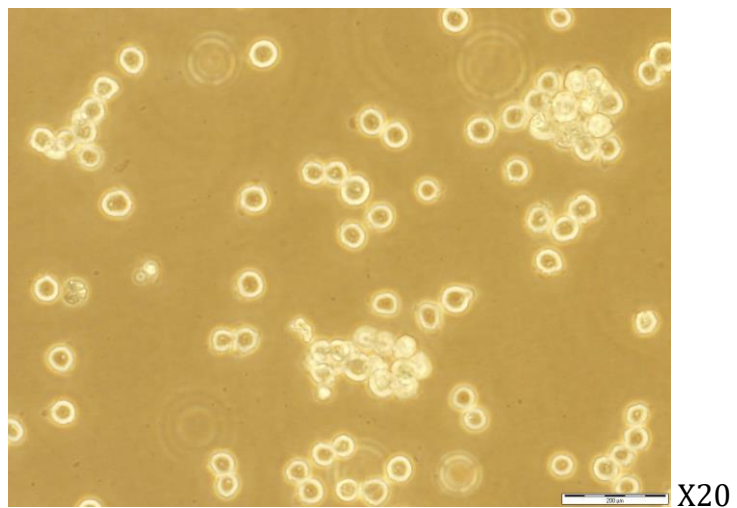
Dia 2



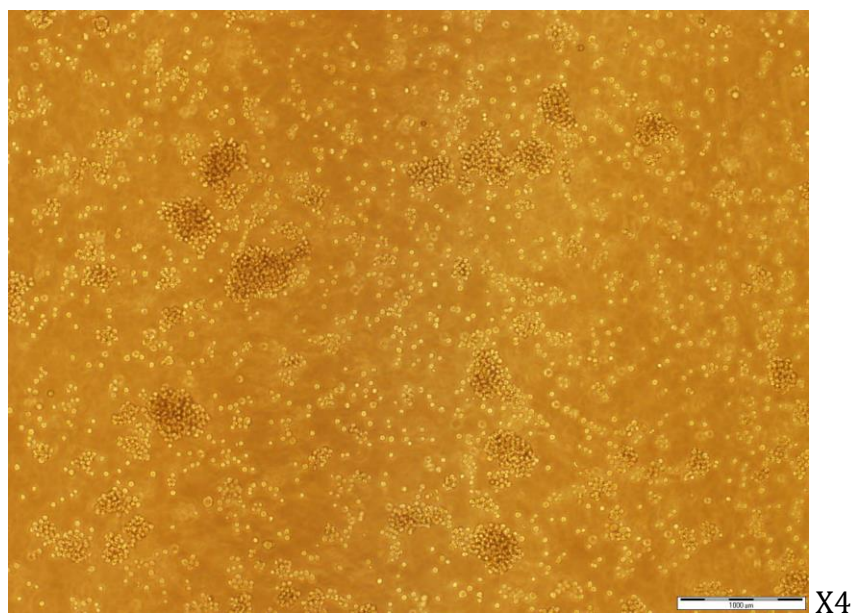
X4

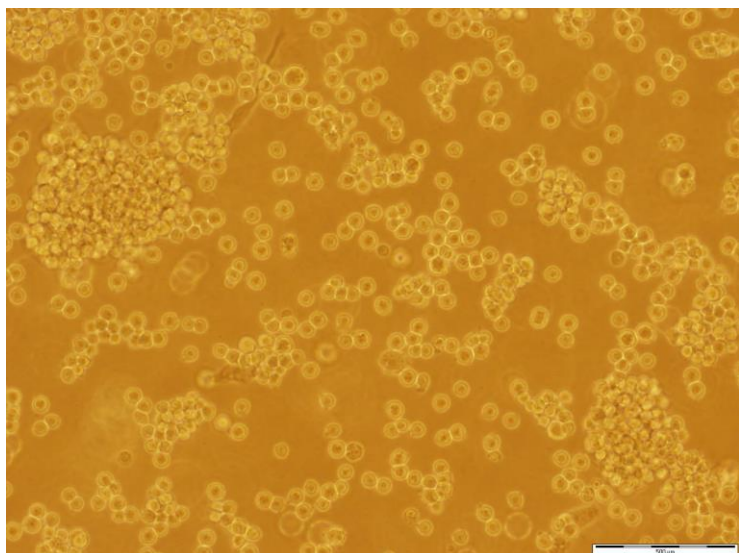


X10

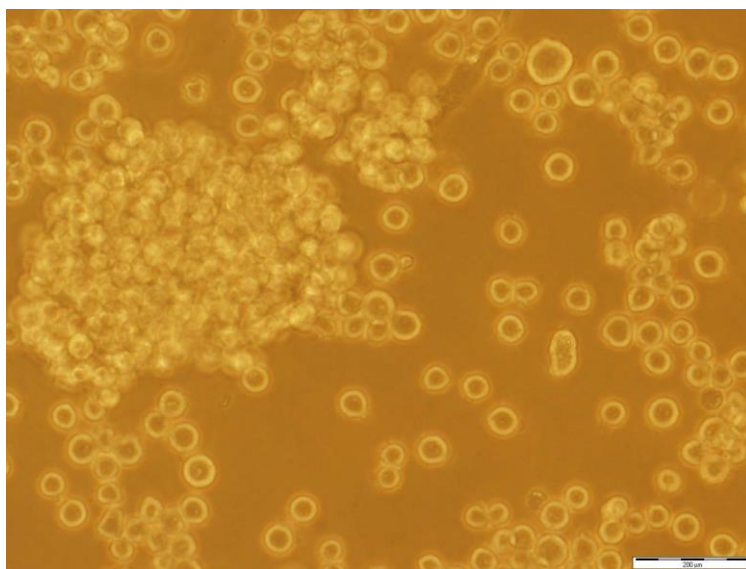


Dia 5

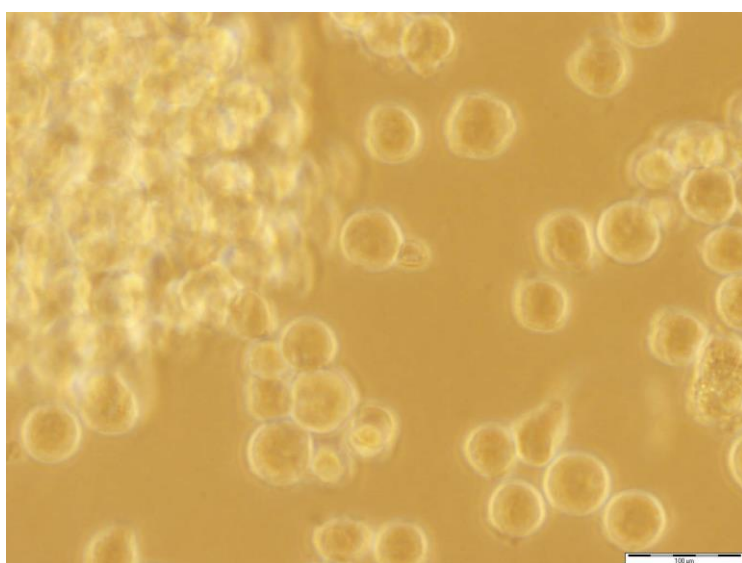




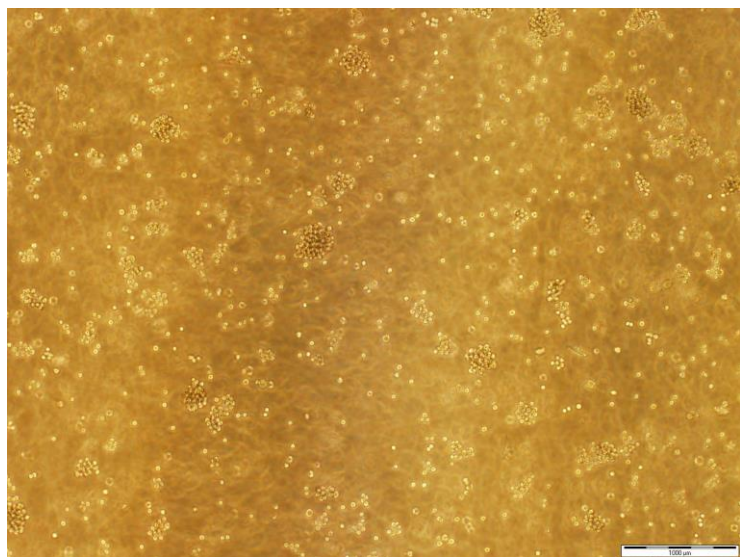
X10



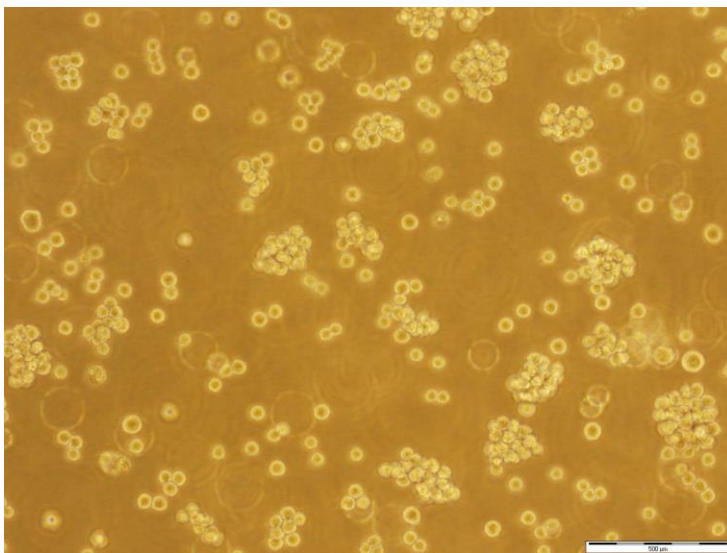
X20



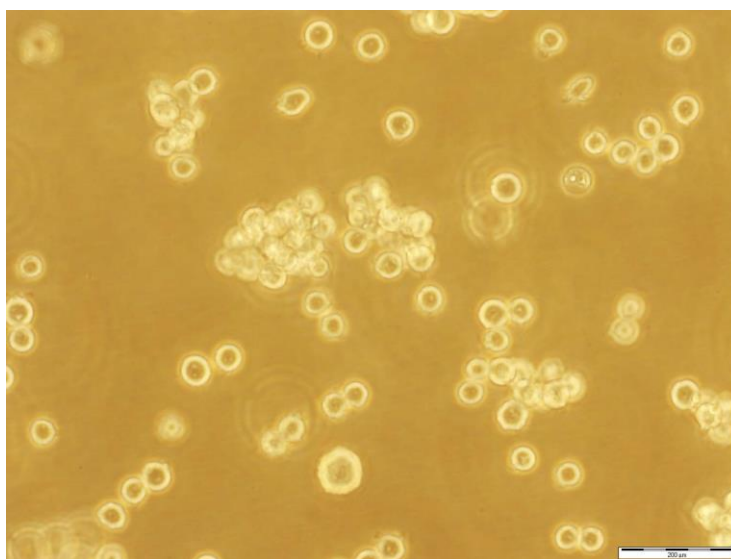
X40

Dia 6

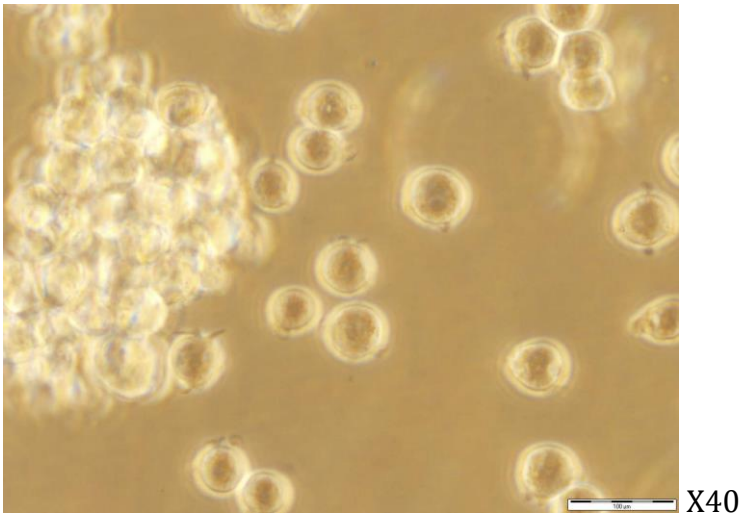
X4



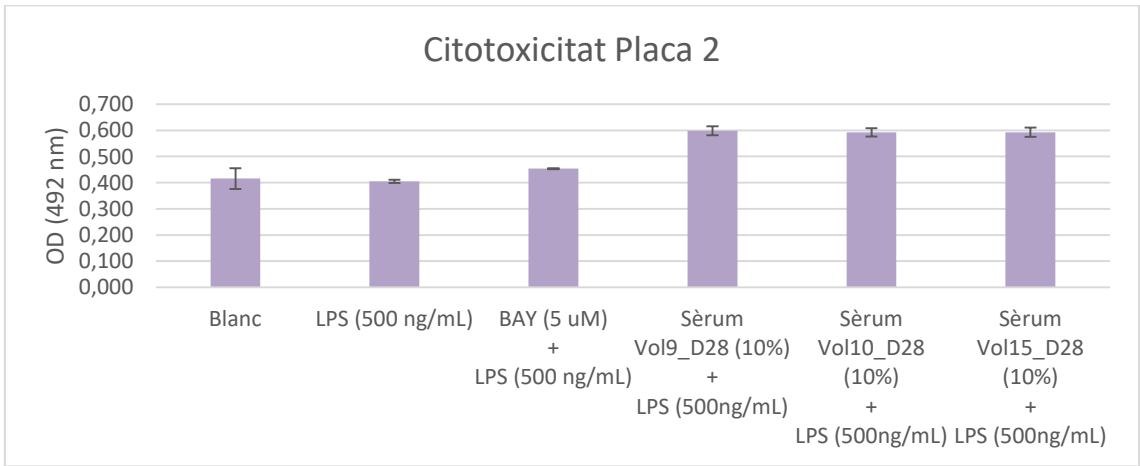
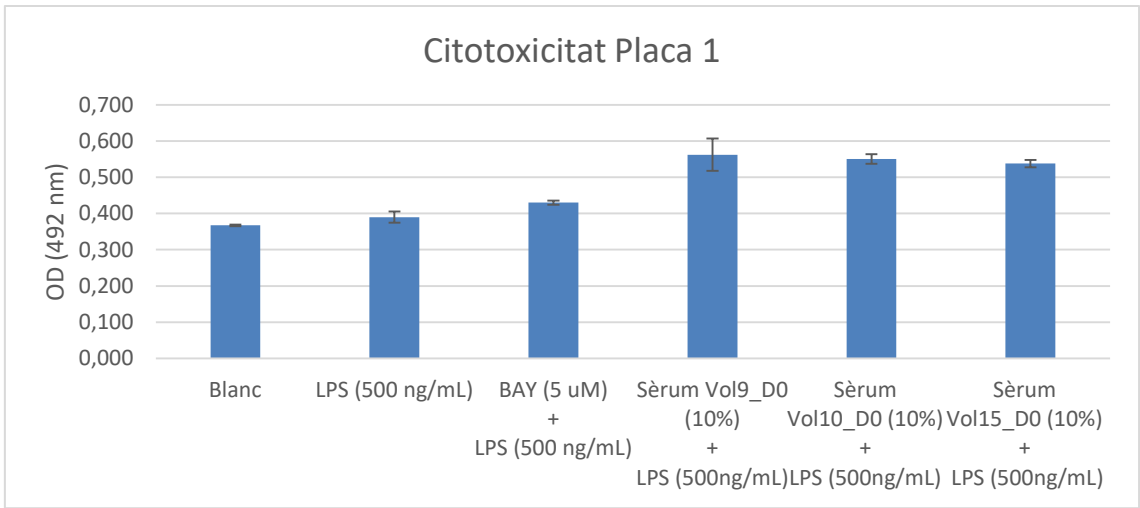
X10

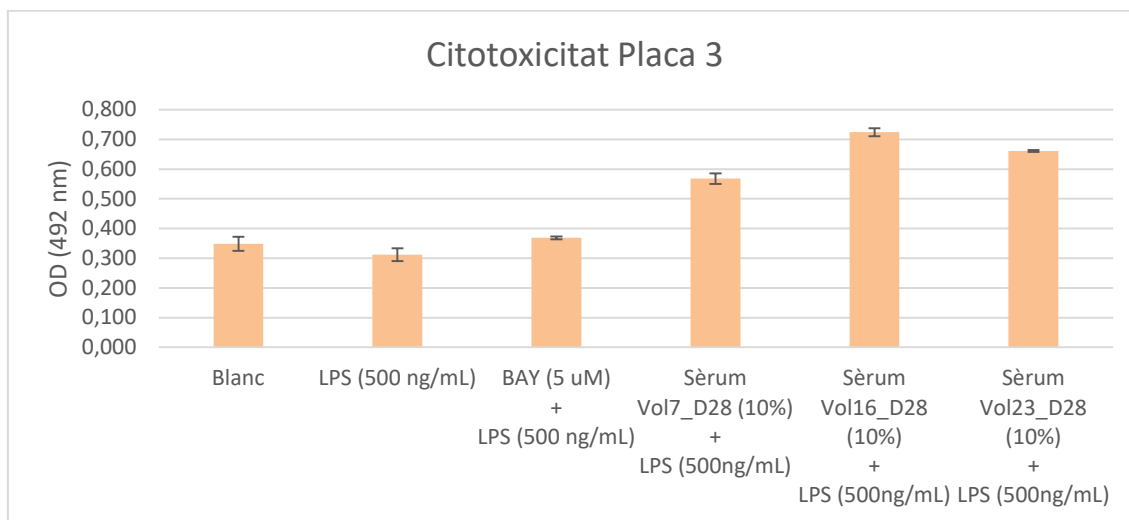


X20

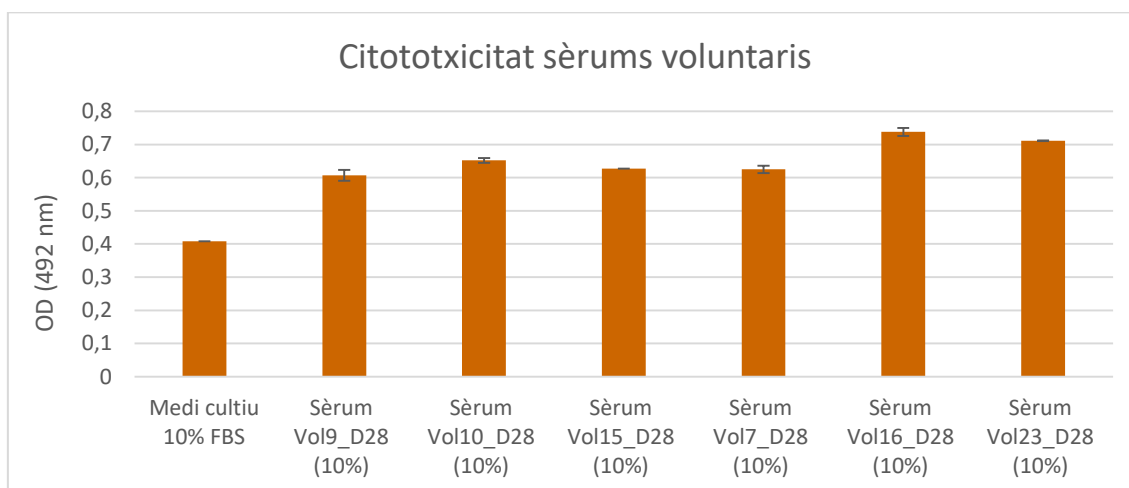


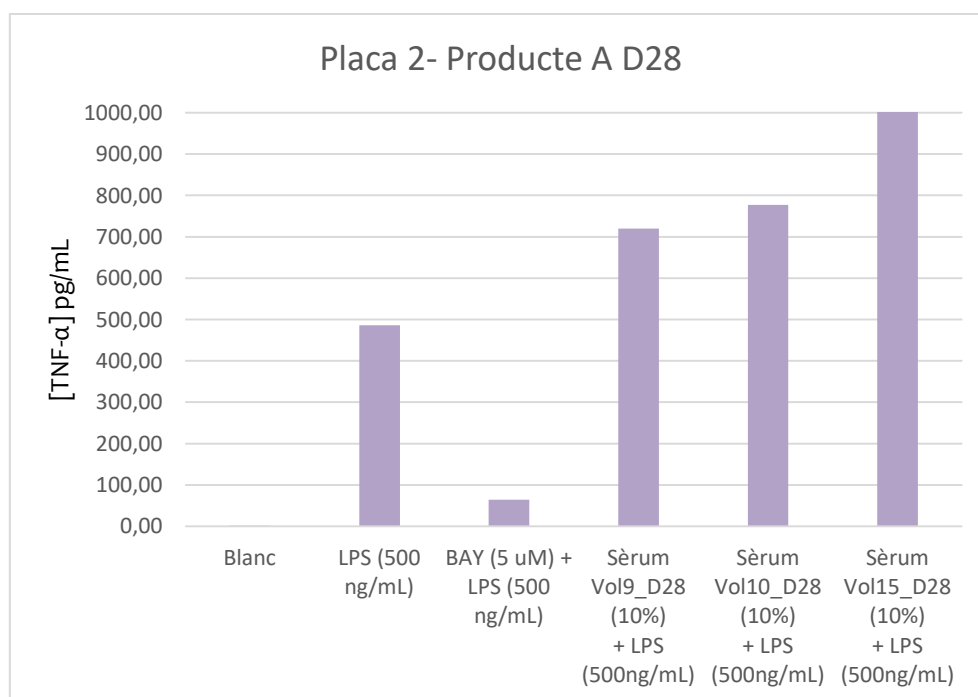
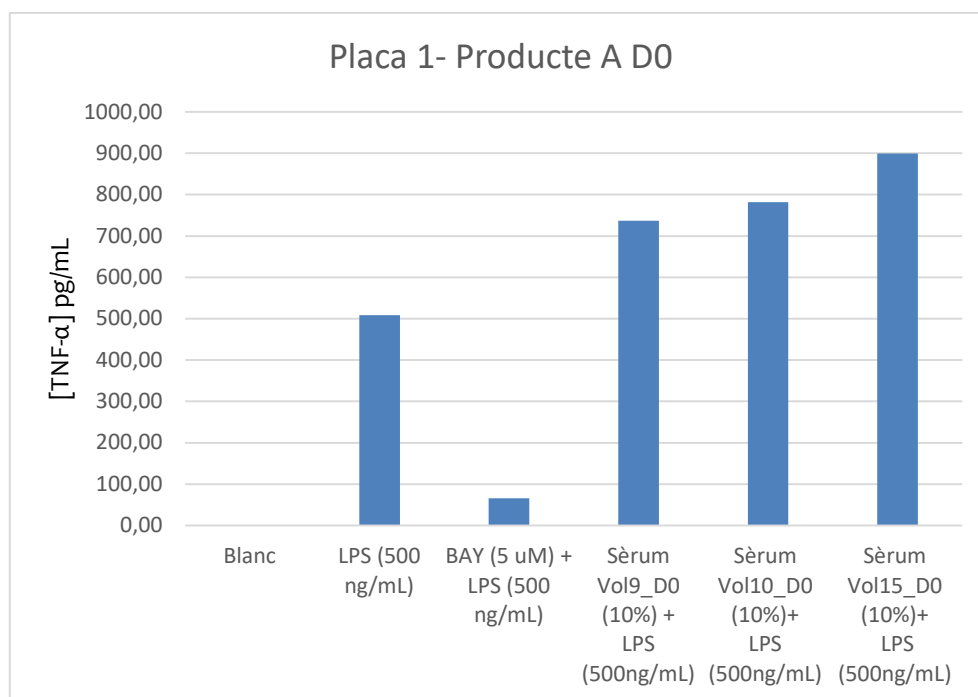
Annex 5: Gràfics de la citotoxicitat del sobrenedant de cultiu cel·lular

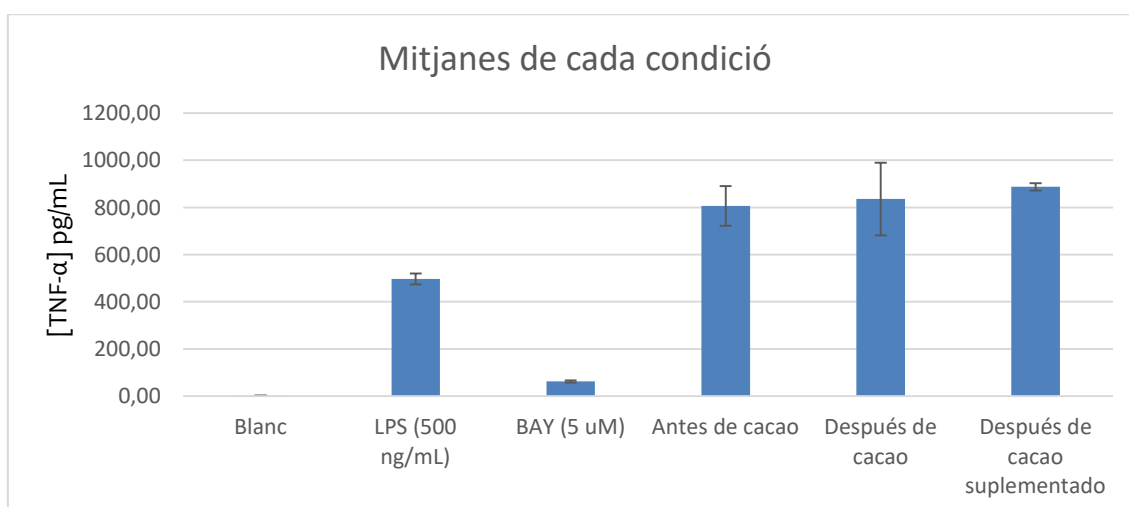
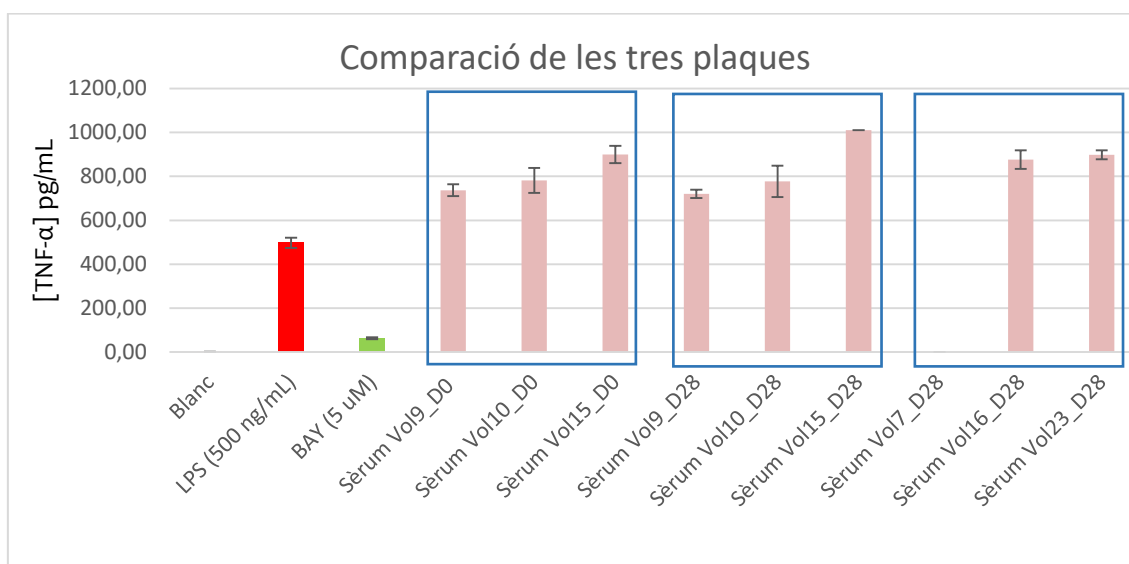
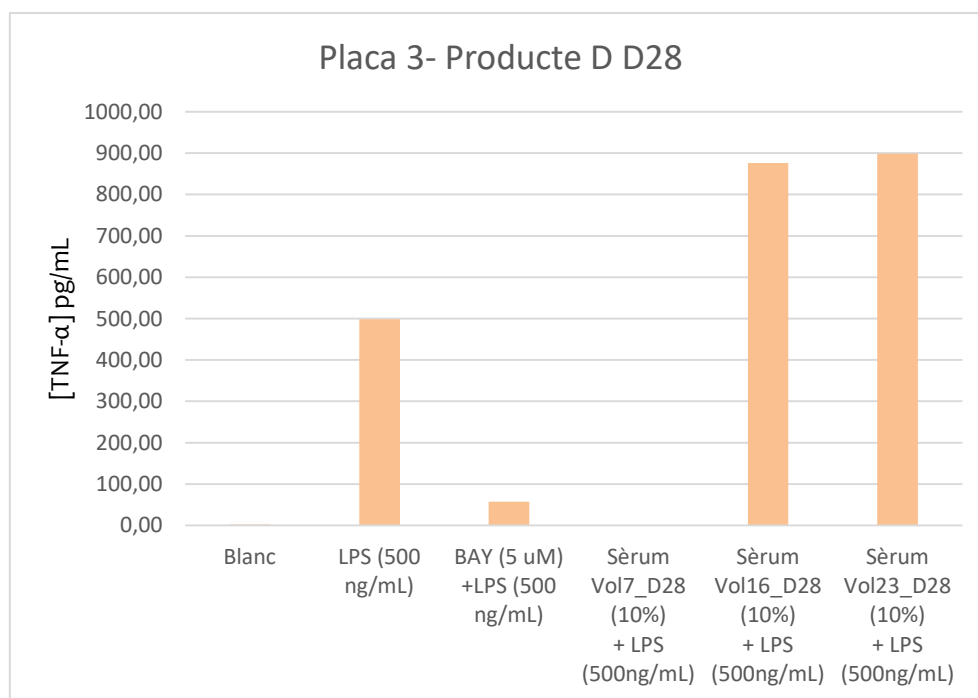




Annex 6: Gràfic de la citotoxicitat dels sèrums



Annex 7: Gràfics de la quantificació de la Proteïna del TNF-alfa de les mostres



Annex 8: Fotos diverses del laboratori