

“Metabolismo del colesterol y ciclo celular”.

Técnicas empleadas

Cultivos celulares; HL-60, MOLT-4, J774, leucocitos de sangre periférica de humanos (PBMC), etc.

Ensayos de proliferación: incorporación de 3H-timidina; contaje de células; ensayo de MTT

Ciclo celular: tinción con yoduro de propidio; incorporación de BrdU (citometría de flujo)

Apoptosis: escalera de DNA (electroforesis); tinción de núcleos con Hoechst 33258 (microscopía de fluorescencia); tinción con yoduro de propidio y/o anexina V, ensayo de TUNEL, incorporación de DiOC₆ (citometría de flujo)

Expresión de proteínas: Western blot en lisados celulares; expresión de antígenos intracelulares y de membrana mediante citometría de flujo; detección con anticuerpos marcados y microscopía de fluorescencia y confocal.

Expresión de genes a nivel de mRNA: northern blot; RT-PCR a tiempo real; cDNA microarray

Transfección de células: expresión de genes; actividad de promotores

Actividad de quinasas: inmunoprecipitación y ensayo de fosforilación

Biosíntesis de colesterol: incubación de células con acetato o mevalonato radiactivos y separación de los productos mediante HPLC: ácidos orgánicos (mevalónico, acetoacetato, HMG-CoA, etc.); farnesol y geranylgeraniol y otros alcoholes isoprenoides; y esteroides. Detección de la absorbancia UV (detector de diodos) y de la radiactividad.