



# Anàlisi “ex vivo” de mecanismes d’inducció d’apoptosi i resistència al tractament en gliomes malignes

Ruth Villalonga Planells

**ADVERTIMENT.** La consulta d’aquesta tesi queda condicionada a l’acceptació de les següents condicions d’ús: La difusió d’aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d’investigació i docència. No s’autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d’un lloc aliè al servei TDX. No s’autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you’re accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it’s obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE MEDICINA  
Programa de Doctorat "Biomedicina"

Ruth Villalonga Planells

**Anàlisi "ex vivo" de mecanismes d'inducció d'apoptosi i  
resistència al tractament en gliomes malignes**

DIRECTORS DE LA TESI

Dra. Avelina TORTOSA I MORENO  
Dra. Josefa GIMÉNEZ BONAFÉ

Data de lectura: 14 de setembre de 2011

# Materials i Mètodes

## 1. Cultius cel·lulars.

### 1.1 Recollida de mostres

Les mostres tumorals de pacients amb glioma es van recollir en el quiròfan de Neurocirurgia del Hospital Universitari de Bellvitge (HUB), amb una ampolla esterilitzada que contenia medi DMEM amb el 20% de iFBS o medi DMEM/F12. Tota l'informació de la mostra es va recopilar a una base de dades interna, a on es van anar anotant la data de recollida, el pes del tumor i els vials de la mostra tumoral que es van poder congelar. A més, totes les mostres realitzades es codificaven per poder treballar més còmodament. La codificació consistia en 3 números, el primer era el número de mostra de totes els que portaven fetes fins el moment, separat amb una barra invertida, el següent era el número de mostra realitzada en aquell any fins el moment i finalment, les dos últimes xifres eren l'any en el moment d'establir el tumor.

Ex: 33/1306. El 33 era el nombre de mostres cultivades fins el moment. El 13, eren mostres que havíem cultivat fins el moment en el 2006. I el 06 corresponia a l'any 2006.

El diagnòstic de cada mostra va ser realitzat per la Neuropatòloga clínica del HUB, seguint els criteris clínics, morfològics i moleculars de la classificació de la OMS. Els pacients van ser informats i van donar el seu consentiment firmat per l'ús de les mostres en estudis d'investigació, a més els projectes desenvolupats es troben avalats pel Comitè Ètic del Hospital Universitari de Bellvitge, número de protocol 06/03.

### 1.2 Establiment de cultius primaris de glioma a partir d'una mostra tumoral

Portàrem a terme dos protocols diferents, un d'ells ens va servir per establir cultius primaris de cèl·lules adherents que van créixer amb un medi complementat amb sèrum. L'altre protocol ens va permetre establir un cultiu primari de cèl·lules mare que es varen desenvolupar

en suspensió , amb un medi sense sèrum però amb múltiples factors que afavorien el creixement d'aquest cultiu.

En els cultius primaris que porten sèrum, es van obtenir de dos formes diferents, a partir d'una disgregació mecànica per donar lloc a explants i a partir d'una disgregació mecànica i enzimàtica per aconseguir cèl·lules independents.

### **1.2.1 Establiment de cultius primaris amb sèrum**

#### **1.2.1.1 Establiment de cultius primaris a partir d'explants tissulars**

Els explants, són petits fragments de teixit, a partir del qual es pot desenvolupar un cultiu primari. El protocol per establir cultius primaris a partir d'explants cel·lulars va ser el següent:

1. Afegir 30-40ml de DMEM amb el 20% de iFBS en una ampolla estèril. A la vegada, posar a escalfar els medis que es faran servir: HBSS; DMEM amb iFBS, penicil·lina/estreptomicina i L-glutamina (medi complet) i posar en marxa l'estufa a 37°C.
2. Pesar la mostra; si la mostra es suficientment gran congelar una part a -80°C.
3. Rentar la mostra amb PBS 1x per eliminar l'excés de eritròcits que conté; es pot repetir 2-3 vegades en funció de la quantitat de sang que hi trobem.
4. Afegir 10ml de HBSS per a facilitar la disgregació mecànica.
5. Disgregar mecànicament amb una fulla de bisturí, amb cura d'obtenir petits fragments.
6. Afegir 5ml de medi complet amb un flascó de 25cm<sup>2</sup>. Posar el flascó en posició vertical.
7. Una vegada obtinguts els fragments, amb unes pinces recollir un fragment. Col·locar-ho en la paret d'un flascó de 25cm<sup>2</sup>, on prèviament s'havia afegit medi. Evitar que el medi entri en contacte amb l'explant.
8. Incubar el flascó en posició vertical que conté l'explant durant 2-3 hores a 37°C, fins que l'explant s'adhereixi al plàstic.

9. Col·locar el flascó en posició horitzontal i permetre que el medi entri en contacte amb l'explant.

#### **1.2.1.2 Establiment de cultius primaris amb una disgregació amb l'enzim col·lagenasa I**

1. Afegir 30-40ml de DMEM amb el 20% de iFBS en una ampolla estèril. A la vegada, posar a escalfar els medis que es faran servir: HBSS; DMEM amb iFBS, penicil·lina/estreptomicina i L-glutamina (medi complet) i posar en marxa l'estufa a 37°C.
2. Pesat la mostra; si la mostra es suficientment gran congelar una part a -80°C.
3. Rentar la mostra amb PBS 1x per eliminar l'excés de eritròcits que conté; es pot repetir 2-3 vegades en funció de la quantitat de sang que hi trobem.
4. Afegir 9ml de HBSS en una placa de cultiu de 100mm i dipositar la mostra tumoral (Nota: amb una mostra tumoral de un pes fins a 500mg, utilitzar un volum final de digestió amb col·lagenasa I de 10ml)
5. Disgregar mecànicament amb una fulla de bisturí, amb cura d'obtenir petits fragments.
6. Aspirar el medi i dipositar els fragments en un tub falcon de 50ml. Aspirar amb suavitat un parell de cops per facilitar una major disgregació; també es pot provar a passar per una pipeta de 5ml per augmentar la disgregació mecànica.
7. Afegir 1ml d'una solució stock de col·lagenasa I (2000U/ml) per assolir una solució final de 200U/ml.
8. Dipositar el tub amb la mostra en un aparell agitador que es troba a l'estufa prèviament escalfada a 37°C. Incubar durant 1 hora aproximadament, però es recomanable durant la primera mitja hora observar l'evolució del procés, i en cas necessari pipetejar sota campana.
9. Finalitzat el temps, comprovar que el teixit pot passar amb facilitat a través d'una pipeta de 1ml.

10. Centrifugar a 1200rpm durant 5 minuts. Descartar el sobrenedant.
11. Aspirar el sobrenedant i addicionar 1ml de tampó de lisi d'eritròcits ACK (Lonza).
12. Dissociar el pelet amb una pipeta d'un ml i afegir 2-3ml més de tampó de lisi, i deixar incubar la mostra durant 4 minuts a 4°C.
13. Per bloquejar l'acció de tampó de lisi, afegir DMEM.
14. Centrifugar a 1200rpm durant 5 minuts i descartar el sobrenedant.
15. plaquejar la mostra en un o varis pous d'una placa de 6 pous en funció del la quantitat de pelet obtingut.

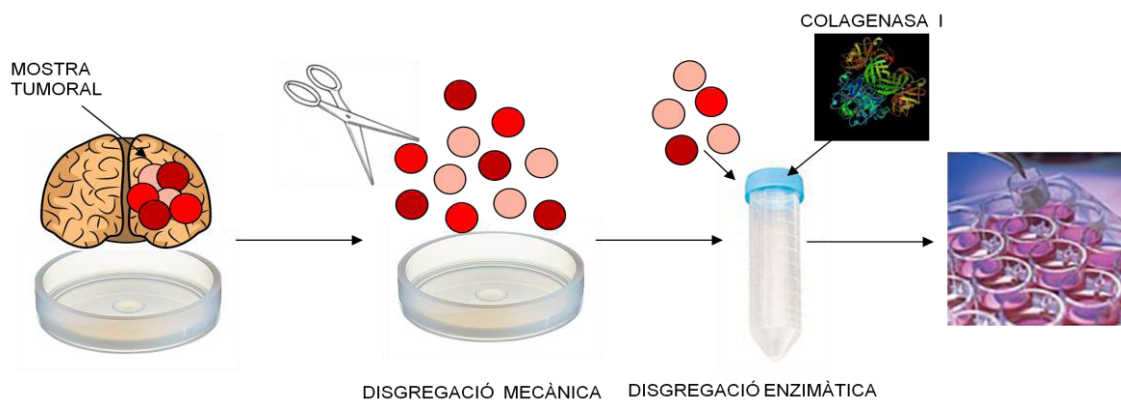


Figura 1. Esquema simplificat de l'establiment de cultius primaris amb medi amb sèrum.

### 1.2.2 Establiment de cultius primaris amb medi stem

1. Afegir uns 30-40ml de medi DMEM/F12 en un recipient estèril per al transport de la mostra tumoral fins al laboratori
2. En el moment d'espera de la mostra pesar en un tub falcon de 50ml fora campana de cultius els diferents compostos que formaran el tampó de digestió

	<b>50ml</b>
<b>Papaïna</b>	<b>47,2mg</b>
<b>Cisteïna</b>	<b>9mg</b>
<b>EDTA</b>	<b>9ml</b>
<b>EBSS (Earle's balanced salts)</b>	

3. En els moments previs a la recollida de la mostra, encendre l'estufa a 37°C i temperar els medis: EBSS, DMEM/F12 i el medi complet per a el cultiu de cèl·lules mare.
4. Dipositar els fragments tumorals en un o varis pous d'una placa de 6 pouets (en funció de la quantitat de teixit).
5. Rentar el teixit amb PBS 1x estèril per eliminar els eritròcits. Aquest pas es pot repetir un parell de vegades si es considera adient.
6. Al mateix temps, afegir 50ml de EBSS en el tub falcon on es troben els compostos necessaris per al tampó de digestió.
7. Mesclar be tots els components amb l'ajuda d'un vòrtex, filtrar (filtre de 20 µM) i afegir la DNasa I a una concentració 1:100.
8. Afegir 3ml de tampó de digestió dissolt en el pou on es troba la mostra.
9. Disgregar el teixit amb l'ajuda d'un bisturí o d'unes Micro tisores, procurant obtenir fragments petits. (Nota: si ha suficient mostra guardar fragments tissulars a -80°C amb 90% sèrum i 10% DMSO).
10. Pipetejar amunt i avall primer amb una pipeta de 5ml, després de 2ml i finalment amb una pasteur de vidre.
11. Transferir el teixit a un tub falcon 50ml i afegir 7 ml més de tampó de digestió.
12. Incubar el teixit en una estufa a 37°C amb un moviment oscil·lant durant 20 minuts.
13. Centrifugar la mostra a 1000rpm durant 10 minuts.
14. Aspirar el sobrenedant i addicionar 1ml del tampó de lisi d'eritròcits ACK (Lonza).
15. Dissociar el pelet amb una pipeta d'un ml i afegir 2-3ml més de tampó de lisi, i deixar incubar la mostra durant 4 minuts a 4°C.
16. Per bloquejar l'acció de tampó de lisi, afegir 4ml de DMEM sol.
17. Recuperar tot el volum i fer-ho passar a través d'un filtre de cèl·lules de 40µM (cell strainer) (Nota: es recomana realitzar aquest pas quan els fragments de teixit encara són visibles).
18. Afegir 4 ml més de DMEM per acabar de rentar el tub.

19. Centrifugar 10 minuts a 1000rpm i descartar el sobrenedant deixant una petita quantitat de líquid que facilitarà la dissociació amb una pipeta de 200 $\mu$ l.
20. Si fos necessari, realitzar una centrifugació diferencial per rentar i eliminar aquells teixits amb restes de fibres no digerides. Les condicions són 20 minuts a 400rpm enrasant amb medi fins completar el volum total del tub.
21. Plaquejar el pelet en 1-2 pous d'una placa de 6 pous (en funció de la quantitat de pelet obtinguda).

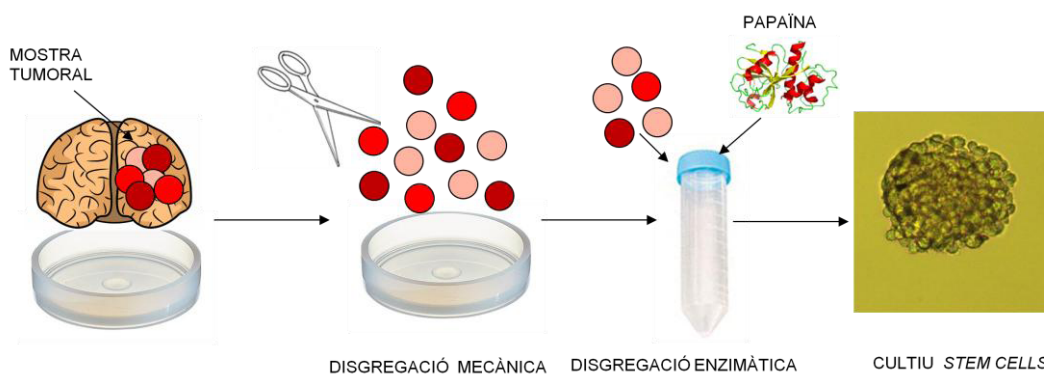


Figura 2. Esquema simplificat de l'establiment de cultius primaris amb medi stem.

### 1.3 Líneas cel·lulars de glioma

En aquest treball es varen fer servir 4 línies cel·lulars de glioblastoma humans: T98G i U87-MG, les dues de l'ATCC (American Type Culture Collection, EUA), les U87-EGFRVIII que deriven de les U87 i que han sigut transfectades amb un vector que expressa una variant constitutivament activa del receptor del EGF (Epidermal Growth Factor), aquesta línia va ser cedida per el Dr. W. Cavenee (Ludwing Institute for Cancer Research, La Jolla, CA) i finalment, la línia ANGM-CSS obtinguda de l'ECACC (European Collection of Cell Cultures).

La línia cel·lular T98G es una línia adherent, que deriva d'un pacient caucàsic de 61 anys amb GBM (Stein GH, 1979). Aquesta línia cel·lular presenta una morfologia fibroblàstica, les cèl·lules es van dividint fins a la formació d'una monocapa. Molecularment, posseeixen la proteïna p53 mutada i promotor MGMT hipermetilat.



Les U87-MG és una línia cel·lular adherent d'una pacient caucàsica de 44 anys amb GBM (Beckman G, 1971). Aquesta línia es caracteritza per una morfologia epitelial, creixent formant clústers que s'uneixen entre ells formant una xarxa cel·lular. Té una proteïna p53 no mutada i el promotor MGMT hipermetilat.

Les U87- EGFRvIII, prové de la línia cel·lular U87-MG a la qual se li ha introduït una transfecció estable que expressa constitutivament la forma mutada variant III del receptor EGF, molt freqüentment mutat en els gliomes.

La línia cel·lular ANGM- CSS deriva d'un pacient de 65 any d'edat diagnosticat amb glioblastoma multiforme, és adherent i amb morfologia fusiforme, encara que poden arribar en confluència a formar clústers cel·lulars. Aquesta línia es caracteritza per estar propera a la tetraploïdia. Cal afegir, que no presenta el promotor del MGMT metilat.

En aquest treball també es va fer servir una línia derivada d'astròcits normals humans: Clonetics® Normal Human Astrocytes (NHA) procedent de Lonza Walkersvill, Inc. Els NHA són cèl·lules adherents que provenen de cèl·lules astrocítiques normals. La seva morfologia és típicament astrocitària.

Les condicions de cultiu de cadascuna de les línies cel·lulars es troba resumida a la següent taula:

Línia cel·lular	T98G	U87-MG I U87EGFRvIII	ANGM-CSS	NHA
Condicions de cultiu	37° C 5% CO <sub>2</sub>	37° C 5% CO <sub>2</sub>	37° C 5% CO <sub>2</sub>	37° C 5% CO <sub>2</sub>
Medi de cultiu	Medi DMEM (440 ml) 10% FBS (50 ml) Penicil·lina/Estreptomicina (5 ml) L-Glutamina (5 ml)	Medi MEM (430 ml) 10% FBS (50ml) Penicil·lina/Estreptomicina (5 ml) L-Glutamina (5 ml) Piruvat (5 ml) Aminoàcids no essencials (5ml)	Medi DMEM (440 ml) 10% FBS (50 ml) Penicil·lina/Estreptomicina (5 ml) L-Glutamina (5 ml)	Astrocyte Basal Médiu 10% FBS (15 ml) rhEGF (0.5 ml) Insulina (1.25 ml) Ácido ascòrbico (0.5ml) Gentamicina/Amfotericina B (0.5 ml) L-Glutamina (5ml )

## 1.4. Criopreservació

### 1.4.1 Cultius primaris en medi amb sèrum i línies cel·lulars

Es congelen les cèl·lules quan les plaques de 100 i/o les ampolles de 75 cm<sup>2</sup> es troben confluents i en fase exponencial.

1. Aspirar el medi de cultiu i realitzar un rentat amb PBS 1x estèril (en el cas de les línies cel·lulars U87-MG i U87EGFRvIII, descartarem el rentat perquè són cèl·lules que fàcilment es desenganxen de la placa).
2. Retirarr el PBS 1x mitjançant aspiració i afegir 4ml de Tripsina-EDTA temperada.
3. Incubar a 37°C durant un parell de minuts; passat el temps donar un petits tocs a la placa i comprovar al microscopi que les cèl·lules es trobin desenganxades i en suspensió.
4. Afegir 6ml de medi complet i pipetejar suaument per trencar els possibles agregats cel·lulars que s'hagin pogut formar.
5. Recollir tot el volum i posar-ho en un tub falcon de 50ml. Amb l'ajuda d'una cambra de Neubauer realitzar un recompte cel·lular (congelar entre 400.000-1.000.000 cèl·lules/vial).
6. Centrifugar a 1200rpm durant 5 minuts.
7. Aspirar el medi i es resuspen en 900µL de FBS i 100µl de DMSO per cada vial a congelar. (Nota: es important , primer resuspendre les cèl·lules en FBS i posteriorment afegir el DMSO, ja que és tòxic). Aliquotar 1ml per cada vial.
8. Disposar les alíquotes en un nalgene que conté isopropanol i dipositar-les al congelador de -80°C.
9. En un parell de dies passar les alíquotes al tanc de Nitrogen líquid.

### 1.4.2 Cultius primaris en medi stem

Les cèl·lules es congelen quan s'observa una gran densitat de neuroesferes en una placa de 100 mm o bé en un flascó de 75 cm<sup>2</sup>.

1. Recollir tot el medi en el que es troben les cèl·lules en suspensió i centrifugar a 1200rpm durant 5 minuts.
2. Aspirar el medi deixant una petita quantitat en el fons del tub que servirà per disgregar les cèl·lules amb una pipeta de 200µl.
3. A continuació afegir medi i fer un recompte cel·lular (congelar entre 300.000-1.000.000 cèl·lules/vial).
4. Centrifugar 5 minuts a 1200rpm, i resuspendre en 900µl de medi sense sèrum i 100µl DMSO per cada vial que anem a congelar.
5. Dipositar les alíquotes en primer lloc al congelador de -80°C i després traslladar-les al tanc de Nitrogen líquid.

### 1.4.3 Descongelació

1. Temperar el medi cel·lular en el bany i es busca l'alíquota desitjada per descongelar.
2. Agafar 4ml de medi en un tub falcon de 15ml i s'afegeix el mil·lilitre de vial cel·lular descongelat.
3. Centrifugar durant 5 minuts a 1200rpm i es descarta el sobrenedant.
4. Resuspendre el pelet en 5ml de medi i es sembra en una placa de 60mm.

## 1.5 Tripsinització i manteniment dels cultius primaris i línies cel·lulars

1. Aspirar el medi de cultiu i rentar amb PBS1x (evitarem aquest pas en les U87-MG i U87EGFRvIII, ja que tenen una gran facilitat per desenganxar-se de la placa de cultiu)
2. Descartar el PBS 1x i afegir tripsina (volum necessari per cada placa) i deixar incubar durant un parell de minuts a 37°C.

3. Colpejar suaument la placa per desenganxar les cèl·lules adherides i bloquejar l'acció de la tripsina a través de l'addició de medi de cultiu.
4. Recollir tot el volum de líquid i centrifugar a 1200rpm durant 5 minuts. Descartar el sobrenedant i resuspendre el pelet amb medi de cultiu.
5. Plaquejar les cèl·lules a una placa de volum superior o si volem expandir més el cultiu a varies plaques.

### 1.6 Descongelació de astròcits normals humans

1. Plaquejar les cèl·lules en una densitat recomanada de 5.000 cèl·lules/cm<sup>2</sup>.
2. Afegir a una placa la quantitat necessària de medi de cultiu i temperar-la a 37°C durant 30 minuts.
3. Descongelar el criovial que conté els astròcits en un bany amb aigua a 37°C fins que el gel desaparegui.
4. Resuspendre les cèl·lules del criovial i dipositar-les a la concentració correcta en la placa/plaques temperades prèviament, moure la placa per distribuir les cèl·lules homogèniament.

Nota: En aquest protocol, no es centrifuga per eliminar les restes del medi de congelació, aquesta acció per aquest tipus cel·lular és més nociu que les restes de DMSO en el medi.

### 1.7 Tripsinització i manteniment dels astròcits normals humans

1. Aspirar el medi de la placa.
2. Rentar les cèl·lules amb 3ml de HEPES-BSS a temperatura ambient. Aspirar el HEPES-BSS de la placa.
3. Afegir 2ml de solució tripsina-EDTA.
4. Incubar durant 3-4 minuts a 37°C.
5. Comprovar al microscopi que al menys el 90% de les cèl·lules es trobin flotant.

6. Neutralitzar l'efecte de la tripsina amb 3ml de solució neutralitzadora a temperatura ambient.
7. Transferir les cèl·lules desenganxades a un tub falcon de 15ml.
8. Rentar la placa amb 2ml de HEPES-BSS per recollir les cèl·lules residuals.
9. Centrifugar la suspensió cel·lular entre 160 i 200g durant 5 minuts a 4°C.
10. Aspirar el sobrenedant i resuspendre amb la quantitat necessària per plaquejar-les.

## **1.8 Seguretat**

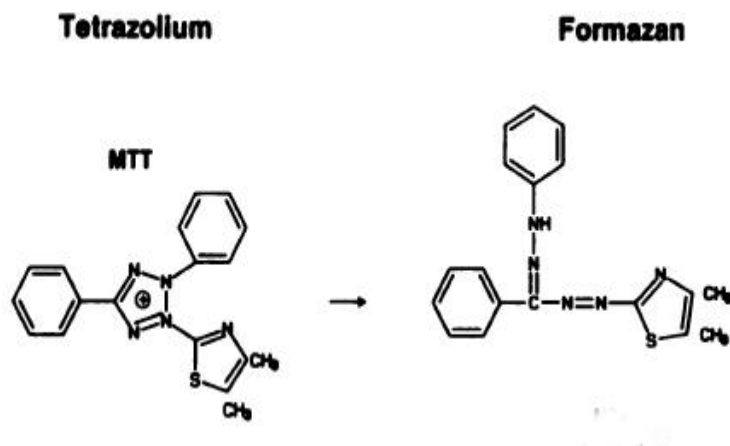
Les manipulacions tan dels cultius primaris humans com de les línies cel·lular es van desenvolupar sota una campana de flux laminar de bioseguritat IIA (<http://www.ub.edu/ossma/higiene/cabines.htm>).

## **2. Biologia cel·lular**

### **2.1 Anàlisi de la viabilitat cel·lular i apoptosi**

#### **2.1.1 Assaig MTT**

Aquest assaig es basa en la reducció metabòlica del Bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltretrazol portada a terme per l'enzim mitocondrial succinat-deshidrogenasa en un compost amb coloració blavosa anomenat sal de formazan, permeten d'aquesta forma determinar la funcionalitat mitocondrial de les cèl·lules tractades. Aquest mètode es molt utilitzat per assajos de supervivència i proliferació cel·lular. La quantitat de cèl·lules vives es proporcional a la quantitat de sals de formazan produïdes.



**Figura 3. Formació de les sals de formazan. Modificat de Scudiero DA, 1988.**

#### Protocol de l'assaig MTT

1. Una vegada complert el temps d'incubació a les plaques amb tractament, afegir 20 $\mu$ l de tampó MTT a dins de cada pou de la placa de 96 pous que s'està fent servir.
2. Incubar durant 2 hores a 37 $^{\circ}$ C.
3. Comprovar amb el microscopi òptic, si les cèl·lules han adquirit una coloració blava.
4. En cas afirmatiu, aspirar el medi de cultiu i resuspendre les cèl·lules amb 100 $\mu$ l de DMSO que les trencarà permeten que les sals de formazan formades donin color al DMSO.
5. Afegir DMSO en 3 pous buits que seran el blanc de l'experiment.
6. Quantificar l'absorbància a 540nm amb un lector de plaques.
7. Exportar els resultats a un plantilla Excel on obtindrem la mesura de la viabilitat cel·lular.

#### **2.1.2 Anàlisi de l'apoptosi mitjançant la determinació de l'Anexina-V per citometria de flux.**

L'apoptosi està caracteritzada per una sèrie de canvis morfològics com la pèrdua d'asimetria en la membrana, la condensació del citoplasma i del nucli i el trencament

internucleosomal del DNA. Un dels primers indicis de l'activació de l'apoptosi es la translocació del fosfolípid fosfatidilserina situat a la cara interna de la membrana cel·lular a la seva cara externa. Una vegada exposada en el ambient extracel·lular, els llocs d'unió per l'Anexina-V es troben disponibles. L'Anexina-V és una proteïna de 35kDa. Es pot trobar conjugada amb biotina o amb diversos fluorocroms com FITC, PE, APC etc. Com la translocació de la fosfatidilserina també té lloc durant la necrosi, per aquest motiu s'utilitza conjuntament el Yodur de propidi, que s'uneix als àcids nucleics, però únicament pot penetrar a la membrana cel·lular quan aquesta es troba danyada. Això té lloc a estadis tardans de l'apoptosi i la necrosi.

Quan les cèl·lules són negatives per tots dos marcadors, ve a indicar que la cèl·lula es viable, ja que la translocació de la fosfatidilserina no ha tingut lloc, el que es indicatiu que la membrana es troba intacta.

Les cèl·lules que són positives només per Anexina -V es troben en un estadi d'apoptosi primerenca, ja que únicament s'ha produït la translocació del fosfolípid a la cara externa de la membrana i que per tant, aquesta membrana es troba intacta.

Finalment, les cèl·lules positives per els dos marcadors, es troben en un estadi d'apoptosi tardana o ja estan mortes. S'observa translocació del fosfolípid i pèrdua de l'integritat de la membrana plasmàtica.

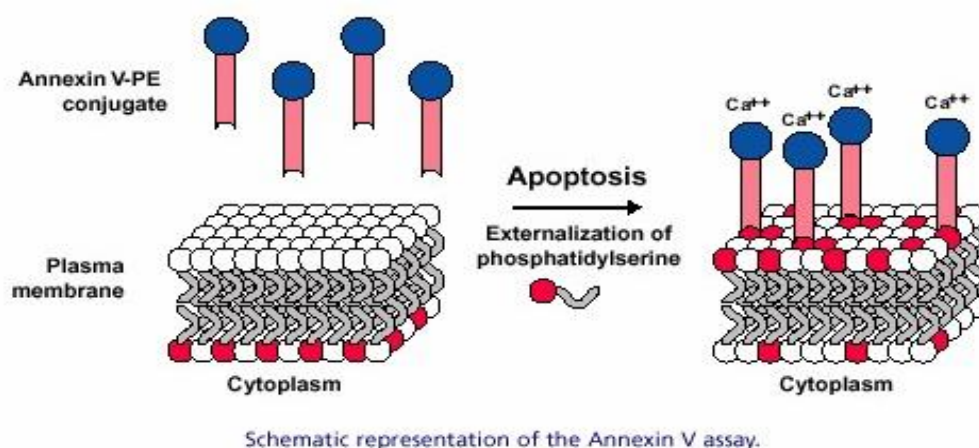


Figura 4. Esquema representatiu del anàlisi de inducció d'apoptosi per marcatge cel·lular amb Annexina V. Modificat del web [bdbioscience.ca](http://bdbioscience.ca).

En un primer moment la citometria de flux es va desenvolupar per l'anàlisi de mostres sanguínies. Gràcies a l'aparell es podia porta a terme un recompte linfocitari d'una forma ràpida i automatitzada.

El funcionament del citòmetre requereix d'una suspensió que bé pot ser cel·lular, de microorganismes o nuclis. La mostra que conte les cèl·lules s'injecta a través d'una petita agulla en un fluid que ho envoltarà i anirà ascendent d'una en una fins la càmera de flux. Es en aquest lloc a on el làser incideix en les cèl·lules, produint-se una dispersió de la llum que serà captada per uns sensor que processaran les mides obtingudes. Quan el feix de llum del làser incideix sobre una cèl·lula la llum es dispersa de forma:

- Frontal (Foward Scatter). És el detector que correlaciona amb la mida de la cèl·lula.
- Lateral (Side Scatter). Correlaciona amb la rugositat i complexitat interna de la partícula.

Però això no es suficient per discernir si una cèl·lula es troba en apoptosi i per això es fan servir marcadors de membrana que es poden marcar amb fluorescència.

### Protocol de citometria de flux

1. Recollir el medi d'incubació (medi on es troben les cèl·lules i a on també s'hi poden trobar les cèl·lules mortes o fragments cel·lulars).
2. Rentar 2 vegades amb PBS 1x i recollir el rentat.
3. Tripsinitzar les cèl·lules amb 1ml durant un parell de minuts a 37°C.
4. Inactivar la tripsina amb medi complet i recollir tot el volum de líquid.
5. Centrifugar el tub falcon a 1200rpm durant 5 minuts.
6. Aspirar el sobrenedant i resuspendre en 1ml de tampó d'unió 1x (BB) i contar el nombre de cèl·lules per separar 200.000 per el seu ús en citometria. Les cèl·lules sobrants poden servir per extraccions de RNA i/o proteïna.
7. Passar les cèl·lules separades als corresponents tubs de citometria i centrifugar-les a 1200rpm durant 10 minuts.



8. Realitzar 2 rentats amb 500µl de tampó d'unió. Centrifugar 10 minuts a 1200rpm després de cada rentat.
9. Resuspendre la mostra amb 200µl de tampó d'unió i 5µl d'Anexina V per tub.
10. Incubar durant 10 minuts a temperatura ambient protegint de la llum amb paper d'alumini.
11. Centrifugar 10 minuts a 1200rpm.
12. Aspirar el sobrenedant i resuspendre en 400µl de tampó d'unió i 4µl de iodur de propidi per tub.
13. Anàlisi de les mostres amb el FACScalibur, Becton Dickinson, Mountauin View, CA..

### 2.1.3 Assaig de formació de colònies

L'assaig de formació de clons o també anomenat assaig de formació de colònies, és un mètode *in vitro* per analitzar l'habilitat de que una única cèl·lula pugui créixer i formar una colònia. Es defineix una colònia per tenir al menys 50 cèl·lules .

Aquest assaig estudia l'habilitat de cada cèl·lula de la població per dividir-se d'una forma il·limitada. El assaig de formació de colònies es fa servir per determinar la capacitat de recuperació cel·lular després d'un tractament amb radiació ionitzant, però també pot ser utilitzat per determinar l'efectivitat d'agents citotòxics. Només una petita fracció de les cèl·lules que es sembren té la capacitat de formar colònies.

Protocol de l'assaig de formació de colònies:

1. Abans o després del tractament, plaquejar les cèl·lules en la dilució apropiada per formar colònies en un període de 1-3 setmanes .
2. Una vegada passat el temps i hi ha colònies, rentar una vegada amb PBS 1x. Decantar el PBS 1x.
3. Fixar amb etanol absolut (2%) i marcades amb cristall violeta (0,5%).
4. Reciclar el fixador i rentar amb PBS 1x. Decantar el PBS 1x.
5. Assecar les plaques amb la tapa oberta.

6. Contar les colònies formades.
7. Càlcul de l'eficiència de plaqueig i la fracció de supervivència ens permetrà fer les corbes de dosi-fracció de supervivència.

Per a calcular la fracció de supervivència:

Cada línia cel·lular té una eficiència de plaqueig (PE) pròpia. Quan les cèl·lules no tractades són plaquejades com una suspensió cel·lular a baixa densitat, creixent formant colònies. El PE és el ràtio entre el nombre de colònies formades partit per el nombre de cèl·lules sembrades.

$$PE = \frac{\text{no. de colònies formades}}{\text{no. de cèl.lules sembrades}}$$

El nombre de colònies que es formen després del tractament, expressat en termes de PE, s'anomena fracció de supervivència.

$$SF = \frac{\text{no.de colònies formades després del tractament}}{\text{no.cèl.lules sembrades} \times PE}$$

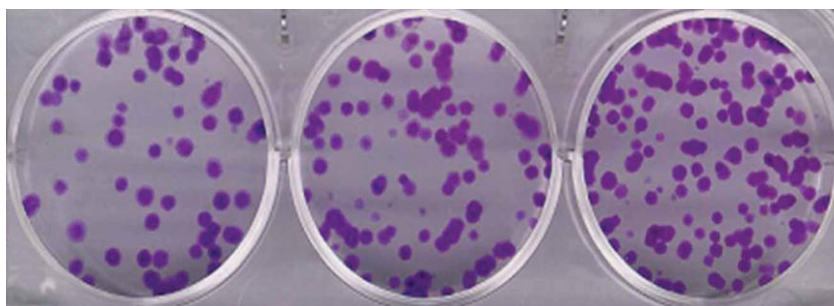
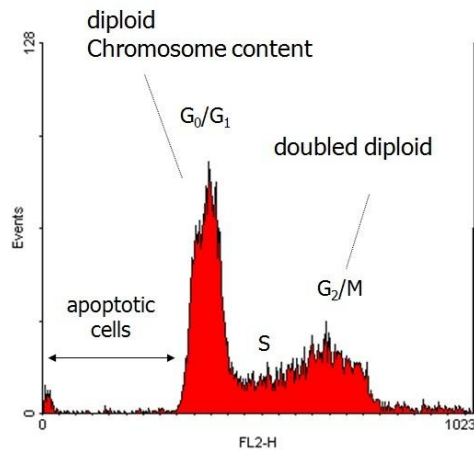


Figura 6. Assaig de formació de colònies en una placa de 6 pous . Modificat de Franken NAP,2006.

## 2.2 Anàlisi del cicle cel·lular

L'anàlisi d'una població cel·lular en estat replicatiu pot ser seguit a través d'un marcatge nuclear de cèl·lules en suspensió i posteriorment analitzant les propietats fluorescents de cada cèl·lula en la població. Les cèl·lules quiescents i les cèl·lules en fase G1 posseeixen únicament una copia de DNA, per tant, tindran una fluorescència equivalent a 1X. Pel contrari, les cèl·lules que es troben en la fase G2/M tenen 2 còpies de DNA i el marcatge amb fluorescència equivaldrà a 2X. Finalment cèl·lules en fase S que es troben sintetitzant DNA, tindran valors compresos entre les poblacions 1X i 2X.

El gràfic es divideix en 3 subpoblacions: 2 corbes corresponen als pics de 1X i 2X i la fase S que es troba al mig dels 2 pics. Les subpoblacions adjacents es solapen unes amb les altres.



**Figura 5. Representació de les fases del cicle cel·lular. Modificat del web meduniwien.ac.at.**

El protocol de cicle cel·lular es detalla a continuació:

Primera part

1. Recollir el medi d'incubació i rentar les cèl·lules 2 vegades amb PBS 1x.
2. Tripsinitzar les cèl·lules amb 1ml durant un parell de minuts a 37°C.
3. Inactivar la tripsina amb medi complet i recollir tot el volum de líquid
4. Centrifugar el tub falcon a 1200rpm durant 5 minuts.
5. Aspirar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en PBS 1x amb 1% sèrum .
6. Contar les cèl·lules per separar al voltant d'un milió.
7. Centrifugar la suspensió cel·lular 5 minuts a 1200rpm, descartar el sobrenedant.
8. Rentar 2 vegades amb PBS 1x amb 1% de sèrum, centrifugar entre mig amb les mateixes condicions detallades en el punt 7.
9. Resuspendre molt bé les cèl·lules amb 0.5ml de ml PBS 1x amb 1% de sèrum.

10. Agitar la mostra suaument amb un vòrtex i amb una pipeta Pasteur afegir gota a gota 2ml d'etanol al 70% (prèviament refrigerat a -20°C). Nota: es important, resuspendre amb molta cura per evitar la formació d'agregats cel·lulars.
11. Fixar les cèl·lules resuspeses amb etanol al 70% a -20°C un temps mínim de dues hores i fins un màxim de 3 setmanes.

### Segona part

12. Centrifugar 5 minuts a 1600rpm i rentar amb PBS 1x amb 1% de sèrum. Descartar la fase aquosa.
13. Resuspendre el precipitat format amb 100µl de tampó citrat-fosfat pH 7.8 (Na<sub>2</sub>HPO 0.2M: àcid cítric 0.1M (192:8)). Deixar incubar 45 minuts a temperatura ambient. Aquest pas és opcional, la seva finalitat és la detecció del pic subdiploid.
14. Centrifugar durant 5 minuts a 1600rpm.
15. Descartar el sobrenedant i resuspendre en 400µl de PBS 1x amb 1% de sèrum.
16. Afegir 50µl d' IP (stock 0.5mg/ml) per tub, després afegir a cada tub 5µl de RNAsa A lliure de DNAsa (stock 10mg/ml).
17. Incubar uns 40 minuts a 37°C protegit de la llum.
18. Anàlisi de les mostres al citometre de flux.

### 2.3 Anàlisi de senescència cel·lular

La senescència es un fenomen que s'observa quan les cèl·lules han arribat al límit de Hayflick (nombre finit de duplicacions) i deixen de dividir-se. Les cèl·lules senescentes es caracteritzen per: a) ser incapaces de proliferar en resposta a estímuls mitogènics, ja que es troben en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> i a diferència de la quiescència és irreversible. b) presenten canvis fenotípics, morfològicament són grans i aplanades, amb una gran quantitat de vacuoles. C) Són resistents a estímuls que indueixen el mecanisme de mort cel·lular per apoptosi. (López-Diazguerrero, NE,2005).

Abans de començar:

1. Preparar PBS 1X estèril.
2. Diluir el tampó de tinció i el tampó de fixació, els dos 10x amb aigua destil·lada per fer una solució 1x. Per un pou de 35mm (placa de 6 pous), s'utilitza 930µl de tampó de tinció 1x i 1ml de tampó de fixació 1x.
3. Dissoldre 20mg de X-gal en 1ml de dimetilformamida per preparar un stock 20x. L'excés de X-gal es pot guardar a -20°C tapat de llum durant 1 mes.

Protocol:

1. Aspirar el medi i rentar la placa amb PBS 1x.
2. Fixar les cèl·lules amb 1ml de tampó de fixació 1x durant 10-15 minuts a temperatura ambient.
3. Mentrestant, preparar la solució de tinció amb un tub de plàstic de polipropilè.
  - a. 930µl de tampó de tinció 1x.
  - b. 10µl de suplement de tinció A.
  - c. 10µl de suplement de tinció B.
  - d. 50µl de X-gal diluït en dimetilformamida.
4. Rentar la placa 2 cops amb PBS 1x.
5. Afegir 1ml de solució de tinció (tota la mescla) a la placa.
6. Incubar tota la nit a 37°C.
7. Al dia següent observar al microscopi les cèl·lules que han adquirit la coloració blava perquè són senescentes.
8. Per guardar les mostres durant un període prolongat, treure la solució de tinció i afegir glicerol al 70%. Guardar al 4°C.

## 2.4 Separació de cultius primaris per al marcador CD133.

Aquesta metodologia permet aïllar cèl·lules per a un determinat marcador a través d'un aparell que pot discernir quines cèl·lules tenen la molècula, a partir d'un marcatge cel·lular previ. Les cèl·lules amb la molècula d'interès són separades de la resta de la població que no expressa la molècula.

Abans de començar preparar 10 mli de solució PBS/2nM EDTA/0.5BSA i filtrar-la.

Protocol:

1. Recollir el medi amb les cèl·lules en suspensió i traspasar-ho a un tub de 50 ml.
2. Centrifugar a 1500rpm durant 5 minuts.
3. Aspirar i resuspendre en 2 ml de medi de cultiu (el primer ml ens ajudarà a disgregar el pellet).
4. Contar les cèl·lules (el nombre mínim són 1 milió).
5. Centrifugar a 1500rpm durant 5 minuts.
6. Aspirar i afegir 300µl de tampó PBS/EDTA/BSA.
7. Resuspendre i transferir-ho a un tub de 15ml.
8. Recollir l'anticòs de CD133 de la nevera.
9. Afegir 100µl de Blocking reagent i mesclar bé.
10. Afegir 100µl de l'anticòs CD133i mesclar amb la pipeta.
11. Incubar la mostra a 4°C durant 30 minuts.
12. Afegir 2ml de solució PBS/EDTA/BSA.
13. Centrifugar 10 minuts a 1500 rpm.
14. Aspirar i afegir 500µl de solució PBS/EDTA/BSA.
15. Separar les poblacions amb el cell sorter.

## 2.5 Radioteràpia de línies cel·lulars

La radiació de les cèl·lules tumorals va tenir lloc en el Servei de Radioteràpia de l'Hospital Durant i Reynals. El aparell empleat va ser el Clinac 600 CD (MS Variant AG, USA).

## 3.Citologia

### 3.1 Inmuncitofluorescència

#### Preparació de plaques i sembra de cèl·lules

1. Posar a cada pou d'una placa de 24 pous, un cobreobjectes rodó de vidre.
2. Esterilitzar amb la llum UV de la cabina de cultius durant 15-20 minuts amb les plaques obertes.
3. Plaquejar 40.000 cèl·lules per pou.
4. Abans de tractar les cèl·lules comprovar que estan adherides al cobreobjectes de vidre.

#### Fixació

5. Després del tractament, rentar 3 cops amb PBS 1x. Eliminar el PBS 1x.
6. Fixar amb paraformaldehid 4% durant 20 minuts a temperatura ambient i sota la campana extractora de gasos.
7. Descartar el fixador i rentar 3 cops amb PBS 1x.
8. Guardar les mostres a 4°C amb PBS 1x.

#### Primer dia de la inmuncitofluorescència

9. Rentar 2 cops amb PBS-Tritó 0.2% durant 5 minuts cada rentat.
10. Bloquejar amb *Normal Horse Serum* 1:10 i PBS- Tritó 0.2% durant 2 hores a temperatura ambient i sense agitació.

11. Incubar amb l'anticòs primari a la concentració necessària per a cada anticòs, preparat amb *Normal Horse Serum* 1:100 i PBS- Tritó 0.2%.
12. Incubar tota la nit a 4°C.

### **Segon dia de la immunocitofluorescència**

13. Rentar 3 cops amb PBS 1x 5 minuts cada rentat.
14. Incubar amb anticòs secundari fluorescent preparat amb PBS 1x durant 1 hora a temperatura ambient.
15. Rentar 3 cops amb PBS 1x 5 minuts cada rentat.
16. Tenyir els nuclis cel·lulars amb Topro III 1:3000 preparat amb PBS 1x durant 30 minuts.
17. Rentar 3 cops amb PBS 1x 5 minuts cada rentat.
18. Muntar els cobreobjectes amb Mowiol (medi de muntatge).
19. Anàlisi de les mostres al microscopi confocal.

## **4. Biologia molecular**

### **4.1 Anàlisi de DNA**

#### **4.1.1 Extracció de DNA**

Per a la seqüenciació de pacients diagnosticats de GBM, es va extreure DNA a partir de mostres tumorals congelades a -80°C.

1. Pesar el tumor i tallar amb un bisturí per obtenir una mostra d'un pes comprés entre 20-25µg.
2. Afegir el tampó de lisis (Quiagen) amb l'ajuda del politró, donar 3 passades de 2-3 segons cadascuna.
3. Seguir el protocol recomanat per a l'extracció de DNA de Quiagen.



#### 4.1.2 Quantificació del DNA

Les mostres es van quantificar amb el aparell NanoDrop model ND-1000, un espectrofotòmetre usat per a la quantificació d'àcids nucleics sense la necessitat de realitzar una dilució prèvia, amb 1µl de mostra de DNA.

#### 4.1.3 Seqüenciació de TP53

El terme seqüenciació del DNA es basa en la determinació de l'ordre de bases nucleotídiques en una molècula de DNA.

El protocol que es detalla a continuació es va fer servir per a la seqüenciació del gen *TP53* de l'exó 2 al 11.

1. Preparar les diferents reaccions de PCR, amb cada primer específic per cada exó, posant especial atenció, ja que cada primer té les seves condicions de PCR específiques.
  2. Calcular en fulls excels previament preparats la mix per cada exó.
  3. Preparar els DNA's perquè estiguin a una concentració de 20ng/µl.
  4. Fer la PCR (5µl) i comprovar que s'ha amplificat correctament amb un gel d'acrilamida al 8%. Veure Annexa I per les condicions de cada exó.
  6. Preparar les mostres pel gel : 10µl de PCR + 10µl de tampó STOP (carregar 20µl). Posar 2.5µl de marcador de DNA 100kb.
  7. Córrer el gel amb TBE 1x a 70V fins que la mostra entri i després augmentar el voltatge fins a 85V. Deixar corre 1h i 15 minuts mes o menys.
  8. Tenyir el gel amb bromur d'etidi durant 10 min i després posar amb aigua.
  9. Revelar el gel amb el transiluminador.
- Una vegada tenim banda i per tant que s'ha amplificat correctament es passa a purificar aquest DNA de la PCR.
10. Amb els 4µl restants de la PCR fer la purificació amb el EZNA Cycle-Pure kit .
  11. Agafar els 40µl de la reacció de PCR i posar-ho a un eppendor de 1.5ml, afegir 160µl de tampóCP.
  12. Posar la columna en un tub de recol·lecció.

13. Afegir a la columna la barreja de la mostra i el tampóCP (200µl totals) i centrifugar a 10.000g durant 1 minut a temperatura ambient.
14. Decantar el líquid i afegir a la columna en el mateix tub de recol·lecció.
15. Rentar la columna i afegir 700µl de DNA tampó de rentat (abans s'ha de mirar si a l'ampolla se li ha afegit l'etanol) i centrifugar 10.000g 1 minut.
16. Decantar el líquid i repetir el pas del rentat amb 500µl de DNA tampó de rentat i tornar a centrifugar 1 minut a 10.000 g.
17. Decantar el líquid i centrifugar la columna 2 min a màxima velocitat per assecar-la. És un pas crític per obtenir uns bons resultats.
18. Posar la columna en un eppendorf de 1.5 ml i afegir 20µl de H<sub>2</sub>Odd o tampó d'elució i centrifugar 2 minuts a 13.000g o màxima velocitat.
19. Una vegada hem centrifugat ja tenim el DNA purificat, guardar o mirar si hem si hem purificat correctament i no hem perdut DNA, comprovació amb un gel de acrilamida al 8%.
20. Gel de acrilamida: carregar 1.5µl de mostres + 1.5µl de tampó STOP i de ladder 2.5µl. Córrer a 70V al principi fins que la mostra entri i després pujar fins a 85V durant 1hora i 15 minuts més o menys.
21. Finalitzada l'electroforesi tenyir el gel 10 min en bromur d'etidi i després posar amb aigua i observar les bandes amb el transiluminador.

Si s'observen bandes podem continuar amb el protocol. El següent pas es la reacció de PCR amb el Big Dye.

22. Per a la PCR:
- DNA: 2µl
  - Primer : 0.25µl
  - Mix terminator (big dye): 0.5µl
  - Aigua destil·lada fins a 10µl: 7.25µl

-----

10µl

Preparar la mix pel nombre de mostres que tinguem mes un 10%. S'ha de fer una reacció per el sense i una altre per l'antisense.

Ex:

Exó 7 → 7 mostres : - mix sense x 7.1

- mix antisense x 7.1

Nota important: Rotular els eppendorf de PCR amb un numero i apuntar a la llibreta que és, ja que el volum de tubs acostuma a ser considerable.

23. Programa de PCR:

- 96° 3'

- 96° 10'' I

- 50° 5'' I → X 25 cicles

- 60° 4' I

- 72° 2'

- 4° ∞

24. Després de la PCR afegir 10µl de aigua destil·lada i posar-ho en un eppendorf.

25. Afegir 63µl de alcohol 95% a temperatura ambient.

26. Vòrtex.

27. Incubar a RT un màxim de 15 minuts.

28. Centrifugar 20 minuts a 14.000 rpm a temperatura ambient.

29. Eliminar amb compte el ETOH i afegir 200µl de ETOH al 70%.

30. Centrifugar 2 minuts a 14.000 rpm. Repetir el pas de 70% 2-3 vegades.

31. Eliminar el ETOH al màxim.

32. Assecar el pelet amb el speed-vac durant 15 minuts.

33. Les mostres ja es poden guardar a -20° fins el moment de portar-les al servei de seqüenciació del Parc Científic. Guardar fins un màxim d'un any.

Una vegada es van obtenir els resultats del Servei de seqüenciació es van analitzar amb el Multialin ( <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) i amb el Gene tool 1.0.0.1.

## 4.2 Anàlisi de RNA

### 4.2.1 Extracció de RNA

La extracció de RNA es va realitzar a partir de pelets de línees cel·lulars i de cultius primaris. El kit utilitzat va ser el RNeasy Micro kit de Quiagen, seguint les instruccions del fabricant.

### 4.2.2 Mètode de RT-MLPA (Multiplex ligase-dependent probe analysis)

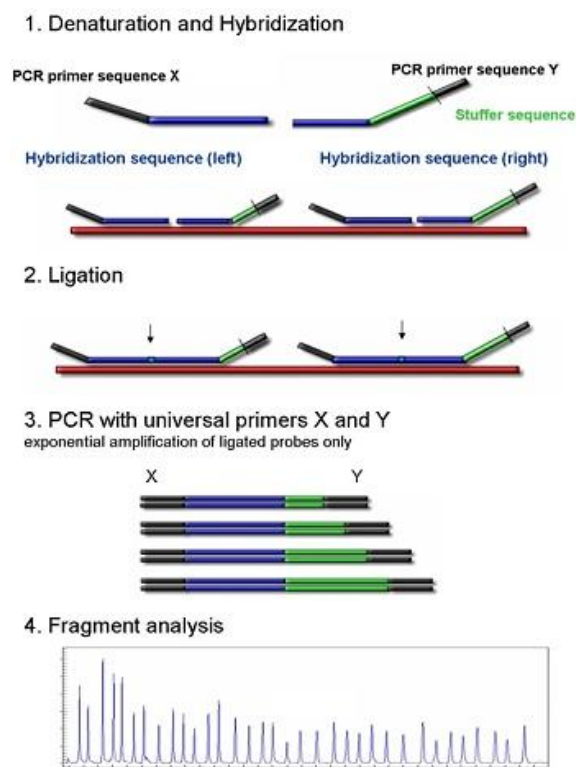
La tècnica del MLPA consisteix en una PCR múltiple, en la que es pot detectar un nombre anormal de còpies en més de 50 seqüències de DNA genòmic o de RNA, té la capacitat de distingir seqüències que difereixen en tan sols un nucleòtid. És una tècnica fàcil de fer servir i que únicament requereix d'un termociclador i d'un equip d'electroforesi capil·lar. Aquesta tècnica permet l'anàlisi de fins a 96 mostres simultàniament.

En el nostre cas, s'utilitzà la variant del RT-MLPA en la qual la tècnica comença amb una reacció de transcripció inversa de la qual s'obté el cDNA, en els següents passos es continua amb la reacció de normal de MLPA.

El kit utilitzat va ser el SALA MLPA KIT R011 Apoptosi mRNA de MRC-Holland (Amsterdam, The Neatherlands). En aquest protocol de RT- MLPA s'obté un patró de transcripció simultània de 38 molècules diferents de mRNA implicats en el procés d'apoptosi (gens pro i antiapoptòtics).

La reacció de RT-MLPA es pot dividir en 6 passos principals:

1. Reacció de transcripció inversa.
2. La desnaturalització del DNA i l'hibridació de les sondes de MLPA.
3. La reacció de lligació.
4. La reacció de PCR.
5. La separació d'amplificació dels productes resultants per electroforesi capil·lar.
6. L'anàlisi dels resultats.



**Figura 7. Esquema dels passos que es realitzen en la tècnica del RT-MLPA. Extret de la pàgina web del fabricant.**

El protocol detallat és el següent:

Reacció de la transcriptasa inversa:

1. Mesclar en fred (0-4°C): 2.5µl de la mostra de RNA (concentració 10-500ng totals)+ 1µl de tampó SALSA RT (tapa rosa) + 1µL de RT primer mix (tap lila).
2. Escalfar 1 minut a 80°C.
3. Incubar 5 minuts a 45°C.
4. Afegir 1.5µl de transcriptasa inversa (20u/µl). Mesclar i incubar 15 minuts a 37°C.
5. Inactivar la transcriptasa inversa per calor a 98°C durant 2 minuts, i seguidament refrigerar a 25°C.

Solució de la transcriptasa inversa:

- Diluir l'enzim MMLV Transcriptasa inversa a 20U en 7 $\mu$ L usant una mescla 1:1 daigua i tampó SALSA Enzyme Dilution (tapa blava). Guardar en gel i utilitzar-ho dins de la mateixa hora de preparació.

Hibridació de les sondes de MLPA:

6. Afegir a la reacció de RT : 1.5 $\mu$ L de SALSA Probe-mix (tap negre) + 1.5 $\mu$ L de tampó MLPA (tapa groga). Mesclar amb compte.
7. Incubar 1 minut a 95 $^{\circ}$ C, seguits de 16 hores a 60 $^{\circ}$ C.

Reacció de lligació:

8. Reduir la temperatura del termociclador a 54 $^{\circ}$ C. Mentre estiga a 54 $^{\circ}$ C, afegir 32 $\mu$ L de el mix de Ligase-65 a cada mostra i mesclar bé.
9. Incubar 10-15 minuts a 54 $^{\circ}$ C, i escalfar durant 5 minuts a 98 $^{\circ}$ C.

Mix Ligase 65 (preparar-ho dins la mateixa hora i guardar-ho en gel):

- Mix: 3 $\mu$ L de tampó Ligase-65 A (tapa transparent) + 3 $\mu$ L de tampó Ligase-65 B (tap blanc)+ 25 $\mu$ L d'aigua destil·lada autoclavada. Afegir 1 $\mu$ L de Ligase-65 (tapa verda) i mesclar de nou.

Reacció de PCR

10. Mesclar en tubs nous: 4 $\mu$ L de tampó SALSA PCR (tap vermell) + 26 $\mu$ L d'aigua destil·lada autoclavada + 10 $\mu$ L de tampó MLPA ligation reaction.
11. Mentre els tubs es troben al termociclador a 60 $^{\circ}$ C, afegir 10 $\mu$ L de mix de Polimerasa a cada tub i iniciar la reacció de PCR.

Mix de Polimerasa (preparar-ho dins la mateixa hora i guardar-ho en gel):

- Mix: 2 $\mu$ L de primers SALSA-PCR (tapa marró) + 2 $\mu$ L de tampó SALSA Enzyme Dilution (tapa blava) + 5.5 $\mu$ L de d'aigua destil·lada autoclavada. Afegir 0.5 $\mu$ L de Polimerasa SALSA (tap taronja). Mesclar bé.

Separació dels productes amplificats per electroforesis capil·lar:

12. Portar les mostres al Parc Científic per la electroforesis capil·lar.

Anàlisi del RT-MLPA amb les dades obtingudes:

13. Analitzar els resultats amb el Gene Mapper i l'Excel.

## 4.3 Anàlisi de proteïnes

### 4.3.1 Extracció de proteïna

1. Recollir el medi d'incubació de les plaques. Rentar un parell de cops amb PBS 1x.
2. Tripsinitzar les cèl·lules amb 1ml de tripsina durant un parell de minuts a 37°C.
3. Inactivar la tripsina amb medi complet i recollir tot el volum de líquid.
4. Centrifugar el tub falcon a 1200rpm durant 5 minuts.
5. Resuspendre el pelet amb 1ml de PBS 1x, passar la mostra a un eppendorf 1.5ml.
6. Centrifugar 5 minuts a 13.000rpm i aspirar el sobrenedant.
7. Una vegada obtingut el pelet, afegir 40-90µl de tampó de lisi de proteïnes, pipetejar fins a disgregar el pelet.
8. Escalfar la mostra a 100°C durant 10 minuts per eliminar el restes de DNA de la mostra. (Nota: el DNA es veu com líquid amb textura viscosa transparent).
9. Mostra llesta per ser quantificada i utilitzada.

### 4.3.2 Quantificació proteica

Abans de començar el protocol és convenient disposar d'un stock proteic amb diferents concentracions de proteïna que permetran obtenir una recta patró amb la qual es calcularà la concentració de la mostra a analitzar. En el laboratori, s'utilitza un stock proteic de albúmina.

Protocol de per a la quantificació és:

1. Posar 25µl en un pou d'una placa de 96 pous de cada eppendorf del patró d'albúmina sèrica bovina (BSA). Fer duplicats.

2. Per altra banda agafar 6 $\mu$ l de la mostra proteica per analitzar i afegir 54 $\mu$ l d'aigua destil·lada.
3. Una vegada diluïda la mostra posar 25 $\mu$ l en un poc d'una placa de 96 pous. Fer duplicats.
4. Preparar 200 $\mu$ l de tampó A i B (50:1) per a cada pou.
5. Vòrtex suau.
6. Posar un film transparent per cobrir la placa i incubar a 37°C durant 30 minuts.
7. Analitzar l'absorbància de la mostra amb un lector de plaques a 540nm.
8. Exportar les dades a un full Excel, on s'obté la recta patró de l'albumina i la concentració de la mostra d'interès.

### 4.3.3 Western Blot

La tècnica del Western blot és un mètode utilitzat en biologia molecular, per la detecció de proteïnes de una mostra cel·lular o d'un teixit homogeneïtzat. La tècnica s'inicia amb una electroforesi desnaturalitzant on les mostres són separades en funció de la seva massa. A continuació, les proteïnes són transferides del gel a una membrana de PDVF o de nitrocel·lulosa on a posteriori seran incubades amb les proteïnes d'interès.

Protocol de western blot:

1. Preparar les mostres amb tampó de càrrega (tampó de lisi 1x). Carregar entre 30-50 $\mu$ g de proteïna en un volum final de 20 $\mu$ l.
2. Bullir les mostres a 100°C per desnaturalitzar les proteïnes.
3. Durant aquest temps, preparar els vidres de 1.5 cm. Rentar els vidres amb etanol al 70% i assecar.
4. Montar els suports corresponents i comprovar amb aigua destil·lada que no perd.
5. Preparar un gel d'acrilamida al 12%, ja que és l'òptim per un rang de proteïnes entre 14-60kDa.

Para el gel separador (20ml):



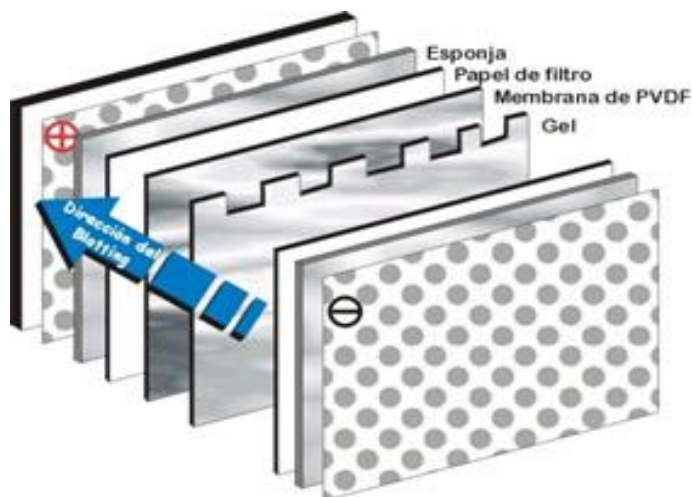
	<b>Gel separador (lower)</b>
<b>Tampó 1.5M tris pH 8.8</b>	5 ml
<b>Acrilamida/bisacrilamida 30%</b>	8 ml
<b>Agua destil·lada</b>	7ml
<b>APS</b>	75µl
<b>TEMED</b>	25µl
<b>Volum final</b>	20ml

6. Posar 6.7 ml de separador entre els dos vidres, afegir una mica de isopropanol amb una pipeta Pasteur i esperar fins que polimeritzi.
7. Eliminar els restes de isopropanol amb un paper de filtre i preparar el gen concentrador.

	<b>Gel concentrador (upper)</b>
<b>Tampó 1M tris pH 6.8</b>	2.5 ml
<b>Acrilamida/bisacrilamida 30%</b>	1 ml
<b>Agua destil·lada</b>	6.5ml
<b>APS</b>	40µl
<b>TEMED</b>	10µl
<b>Volum final</b>	10ml

8. Preparar el tampó d'electroforesi 1x (100ml de tampó d'electroforesi 10x i 900ml d'aigua destil·lada).
9. Carregar els 50µg de proteïna a cada pou , i 7µl de marcador de pesos moleculars de proteïna. Córrer les mostres durant 1 hora i 30 minuts aproximadament, a voltatge constant de 125mV. Durant aquest temps observar que l'amperatge no disminueixi massa.
10. Parar l'electroforesi quan el marcador de pes molecular ha corregut fins el lloc on ens interessa.
11. Preparar el tampó de transferència 1x (100ml de tampó de transferència, 800ml d'aigua destil·lada i 100ml de metanol).

12. Activar les membranes (5,8cm x 8,5 cm) amb metanol 1 minut i aigua destil·lada 5 minuts. Equilibrar la membrana amb el tampó de transferència, també posar el gel d'acrilamida sense la porció de gel concentrador.
13. Posar els papers whatman juntament amb les membranes i gels, així com també les esponges.



**Figura 8. Esquema de preparació del cassette per a la transferència de proteïnes del gel d'acrilamida fins a la membrana.**

14. Realitzar la transferència a una membrana de PDVF durant 1 hora a temperatura ambient i 400mA.
15. Una vegada finalitzada la transferència rentar la membrana amb TBS-T 0.2% durant 5 minuts en agitació.
16. Bloquejar amb llet al 5% preparada amb TBS-T 0,2% durant 1 hora en agitació.
17. Rentar 3 vegades amb TBS-T 0.2% durant 5 minuts en agitació.
18. Incubar l'anticòs primari a 4°C amb agitació tota la nit.

Els anticossos primaris emprats van ser:

- Anti-p53 anticòs monoclonal clon 186 (Neomarkers, Fremont, CA) utilitzat a dilució 1:250.
- Anti-MDM2 anticòs monoclonal clon 2A10 (Abcam, Cambridge, UK) utilitzat a dilució 1:500.

- Anti-p21 anticòs policlonal C19(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) utilitzat a dilució 1:100.
- Anti-Survivina anticòs policlonal clon NB 500-201 (Novus Biological, Littleton, CO) utilitzat a dilució 1:500.
- Anti-PUMA anticòs policlonal clon ab9645 (Abcam, Cambridge, UK ) utilitzat a dilució 1:500.
- Anti-Noxa anticòs monoclonal clon 114C307 (Abcam, Cambridge, UK) utilitzat a dilució 1:200.
- Anti-Caspasa 3 anticòs monoclonal clon 9668 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) utilitzat a dilució 1:500.
- Anti-P-S6 anticòs (fosforilació a Ser235/236 policlonal clon 2211 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) utilitzat a dilució 1:500.
- Anti-S6 anticòs monoclonal clon 2317 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) utilitzat a dilució 1:500.
- Anti- $\beta$ actina anticòs monoclonal clon AC-15 (Sigma) utilitzat a dilució 1:5000.

19. Rentar 3 vegades amb TBS-T 0.2% durant 5 minuts en agitació.

20. Incubar l'anticòs secundari (3 $\mu$ l d'anticòs secundari en 15ml de llet al 5% preparada amb TBS-T 0,2% durant 1hora en agitació.

21. Rentar 3 cops amb TBS-T 0.2% durant 5 minuts en agitació i 2 rentats amb TBS 1x 5 minuts.

22. Afegir a la membrana l'ECL plus per revelar.

23. Revelar amb la màquina automàtica.

## 5. Vectors d'expressió gènica

### 5.1 Transfecció cel·lular per electroporació mitjançant l'ús del Nucleofector

L'electroporació és una tècnica que permet introduir DNA exogen dins la cel·lular mitjançant un xoc elèctric que fluidifica la membrana i permet la incorporació del DNA. El DNA plasmídic que s'introdueix acostuma a afegir-se a una concentració suficient com per assegurar que una gran proporció de les cèl·lules rebrà almenys una còpia. Aquesta tècnica es va utilitzar per a la transfecció de la línia cel·lular U87-MG. Una mostra per transfectar amb la màquina d'electroporar Nucleofector conté:

- 500.000 cèl·lules trispsinitzades (en suspensió), per cada mostra a transfectar.
- 2µg de plàsmid de DNA (dissolt en aigua o TE), o 2µg de vector pmax GFP o 30-300nm siRNA.
- 100µl Cell line Nucleofector Solution T : 82µl de Nucleofector Solution + 18µl Supplement solution.

Protocol de transfecció amb Nucleofector:

1. Tripsinitzar les cèl·lules i centrifugar a 90g durant 10 minuts.
2. Remoure el sobrenedant completament.
3. Resuspendre amb molta cura el pelet cel·lular en 100µl de solució de Nucleofector per mostra a temperatura ambient.

Nota: Evitar deixar les cèl·lules més de 15 minuts en la solució del Nucleofector, degut a que es redueix la viabilitat cel·lular i la eficiència en la transfecció.

4. Combinar els 100µl de la suspensió cel·lular amb 2µg de plàsmid de DNA (dissolt en aigua o TE), o 2µg de vector pmax GFP o 30-300nm siRNA.
5. Transferir les cèl·lules/DNA a una cubeta especial per la transfecció, evitant introduir bombolles. Tancar la tapa.
6. Escollir el programa U029.

7. Inserir la cubeta al Nucleofector i aplicar el programa correcte.
8. Retirar la cubeta una vegada el programa ha finalitzat.
9. Afegir 500µl de medi de cultiu a la cubeta i amb l'ajuda d'una pipeta pasteur transferir la solució cel·lular a una placa de cultiu de 6 pous i afegir medi.
10. Traslladar les plaques a l'incubador.

### 5.1.1 Seqüència del siRNA de p53

Es va utilitzar un mix de 2 siRNA validats de la casa Invitrogen per transfectar les cèl·lules amb el Nucleofector, el TP53VHS40367.

Seqüències del siRNA: CCAGUGGUAUAUCUACUGGGACGGAA  
UUCCGUCCCAGUAGAUUACCACUGG

### 5.2 Transformació bacteriana

1. Aliquotar 100µl de E.Coli DH5-α competents congelades. Acabar de descongelar amb els dits.
2. Mantenir en gel 10 minuts, agitar suaument cada 2 minuts.
3. Afegir la quantitat de DNA (1-10ng) i mesclar suaument amb les bactèries competents.
4. Mantenir 30 minuts en gel.
5. Xoc tèrmic de 90 segons a 42-45°C (per a les competents congelades).
6. Deixar 2 minuts en gel.
7. Afegir 900µl de medi LB i incubar 1 hora a 31°C en agitació (225rpm).
8. Centrifugar de 30 segons a 1 minut a 13.000rpm i ressuspèndre en 150-200µl de LB.

9. Plaquejar: agafar el volum de bactèries i plaquejar-lo en una placa d'agar amb ampicil·lina. Afegir boletes de vidre (3 o 4) i agitar la placa amb la ma perquè es sembli homogèniament.
10. Treure les boletes i incubar la placa a 37°C.

### **5.3 Inoculació de colònies bacterianes recombinats a un medi de cultiu líquid**

Es procedirà a la inoculació d'una colònia resistent agafada de la placa de cultiu en un tub estèril pel creixement i multiplicació del nombre de bacteris que contenen el plasmidi d'interès. Amb aquestes farem una Maxi-prep per obtenir el plasmidi.

1. En un erlenmeyer posar 250ml de medi LB i ampicil·lina (250µl d'un stock de 50mg/ml), i amb una punta estèril picar una de les colònies aïllades. Posar la punta dins el medi LB\*. Tot en condicions estèrils.
2. Tapar la boca de l'erlenmeyer amb un paper d'alumini i deixar a l'incubador amb agitació a 37°C tota la nit per permetre la proliferació de la colònia bacteriana.

\*Per a tenir proliferant més bacteris de la mateixa colònia, abans de tirar la punta a l'erlenmeyer, quan es pica la colònia es sembren 3 línies amb una placa d'agar amb ampicil·lina, així tindrem proliferació del mateix clon (ho podem guardar a 4°C).

### **5.4 Extracció i purificació del plasmidi amb el insert d'interès. Maxi-prep.**

1. Posar tot el contingut bacterià de la colònia picada el dia anterior en una ampolla de centrifugació. Centrifugar 15 minuts a 5000 rpm.
2. Descartar el sobrenedant, resuspendre el pelet bacterià en 10ml de tampó P1 (té que està fred, i guardat amb la RNasa). Transferir el pelet resuspes a un tub de centrifuga (50ml).
3. Afegir 10ml de tampó p2, mesclar suaument, i incubar a temperatura ambient durant 5 minuts.

4. Afegir 10ml de tampó P3 fred, mesclar immediatament, però suaument i per inversió, i incubar en gel durant 20 minuts.
5. Centrifugar durant 30 minuts a 12.000rpm a 4°C. Durant els últims 10 minuts de centrifuga, equilibrar les columnes Quiagen-tip 500 afegint 10 ml de tampó QBT. Permetre el drenatge de la columna.
6. Decantar el sobrenedant en un falcon de 50 ml (repetir dos cops) . Retirar el fragments romanents amb la pipeta.
7. Afegir el sobrenedant decantat a la columna.
8. Rentar la columna amb 2 vegades amb 30 ml de tampó QC.
9. Eluir el DNA afegint 2 x 5ml de tampó QF. Recollir el eluït en un tub de centrifuga net.
10. Precipitar el DNA amb 7ml de isopropanol a temperatura ambient. Centrifugar durant 30 minuts a 12.000rpm.
11. Descartar el sobrenedant, afegir 5 ml de etanol al 70%, centrifugar 5 minuts a 12.000rpm a 4°C.
12. Decantar el sobrenedant, tornar a centrifugar 5 minuts a 12.000rpm a 4°C i eliminar les gotes romanents amb aspiració.
13. Assecar durant 5 minuts i resuspendre en 500µl de aigua destil·lada o tampó TE, transferir-ho a un ependorf.

## **5.5 Vectors d'expressió**

### **5.5.1 Plasmidis**

Per induir l'expressió gènica del gen de la Survivina, es va utilitzar el plasmidi pcDNA3. Aquest plasmidi que contenia el cDNA del gen de la Survivina va ser amablement cedit per el Dr. Altieri de la University of Massachusetts Medical School.

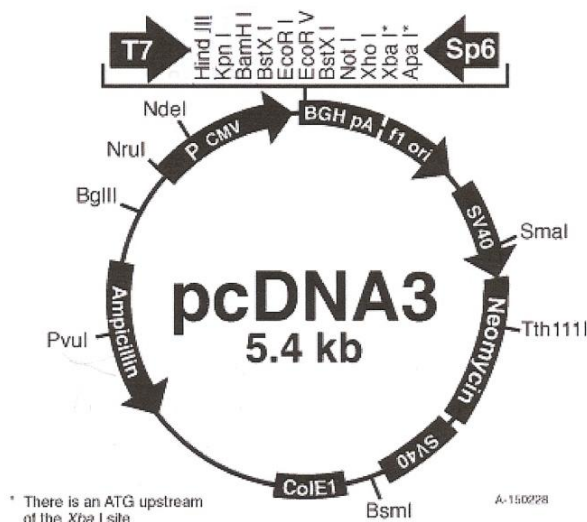


Figura 9. Esquema del plasmidi pcDNA3.

## 6. Anàlisi de dades i estadística

Els resultats en la realització de la tesi doctoral, van ser expressat com a mitjana  $\pm$  desviació estàndard, dels valor obtinguts, de com a mínim 3 experiments. L'anàlisi estadística per comparar el grup control amb el grup tractat, i per tant analitzar les possibles diferències entre grups, es va portar a terme amb un test t de Student. Les diferències que assolien un p-valor menor de 0,05 eren considerades significatives.

Els càlculs van ser realitzats amb els programes informàtics SPSS 14.1 (SPSS Inc., Chigago, IL) i Statgraphics 5.1 (Manugistic Inc., Rockville MD). L'índex de combinació per a la realització de dos tractaments conjunts es va calcular amb el programa Biosoft CalcuSyn (Ferguson, MO). Un índex de 1 indicava un efecte additiu, inferior a 1 un efecte antagonista i un índex superior a 1 indicava un efecte sinèrgic.