

Tesi doctoral presentada per En/Na

**Albert SANTAMARIA MARTÍNEZ**

amb el títol

**"Identificació, aïllament i caracterització de  
cèl.lules mare en models de càncer de pròstata"**

per a l'obtenció del títol de  
Doctor per la Universitat de Barcelona

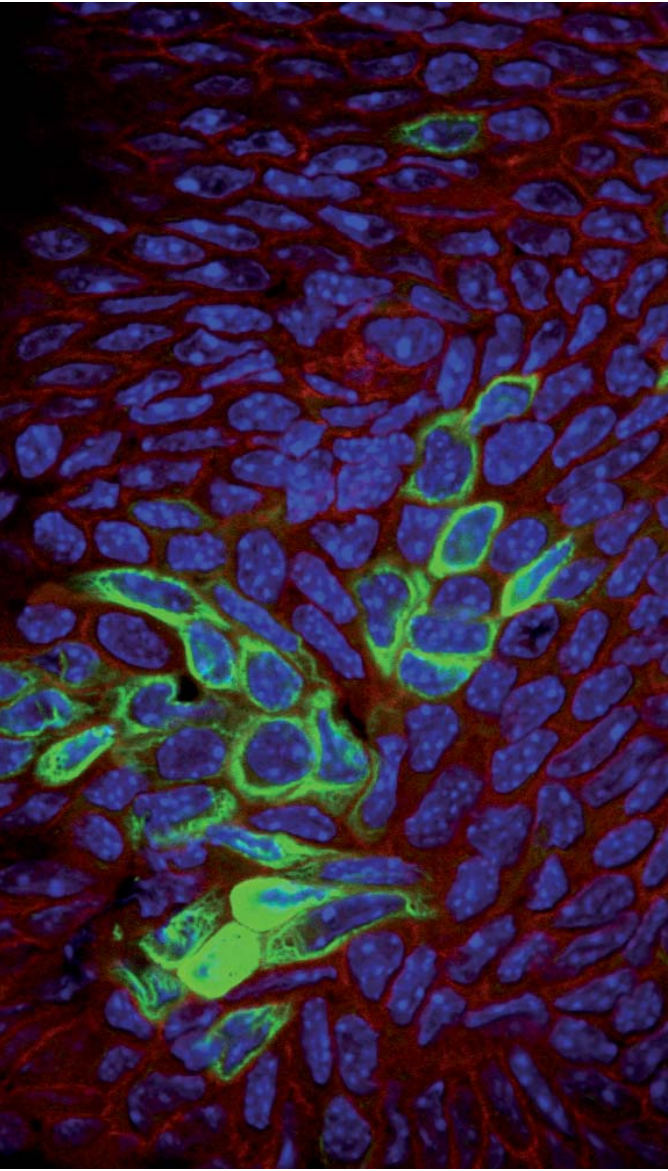
Barcelona, 11 de juny de 2009.

**Facultat de Medicina  
Departament de de Biologia Cel.lular,  
Immunologia i Neurociències**



UNIVERSITAT DE BARCELONA





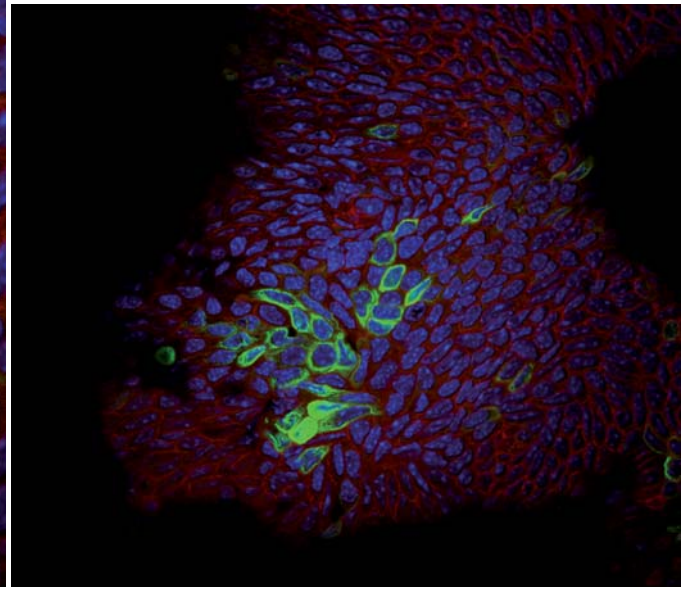
*The devil is in the details.*

**Dita anònima**

*All right sweethearts, what are you waiting for? Breakfast in bed? Another glorious day in the corps.*

*A day in the Marine Corps is like a day on the farm: every meal's a banquet! Every paycheck a fortune! Every formation a parade! I love the Corps!*

**Sgt Apone, Aliens**



# 3. MATERIALS I MÈTODES

***Ruscs de llum*** (Immunohistofluorescència sobre teixit d'ovari sencer feta per ASM i captada per MVS, 2007)

## **3. Materials i mètodes**

### **3.1 Animals**

Per al manteniment del model animal es van seguir les indicacions descrites a *de Pinieux et al.*, Am J Pathol, 2004. Es van utilitzar ratolins *swiss nude nu/nu* de 6 setmanes a la seva arribada (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA), que van ser estabulats a la zona lliure de patògens (SPF, de l'anglès 'single pathogen free') de l'estabulari de l'Institut de Recerca de l'Hospital de la Vall d'Hebron. Se'ls va proporcionar menjar i beguda *ad libitum*. Els procediments quirúrgics es van realitzar també als quiròfans de la zona SPF i sempre sota anestèsia inhalatòria d'isofluorà al 2% (Forane, Abbott, Illinois, EUA). Els ratolins es col·locaven sobre una talla estèril que al seu torn es col·locava sobre una manta tèrmica per mantenir termoregulat l'animal durant l'operació. Als ulls se'ls aplicava *Methocel* (Colorcon, Inc., West Point, PA), un gel fet a partir de polímers de cel·lulosa, per protegir-los-els de l'isofluorà. Sempre que fou necessari se'ls va administrar meloxicam o buprex (0,5 mg/ml) com a analgèsia després de la cirurgia.

Quant als animals injectats amb cèl·lules tumorals, es va procedir amb anestèsia inhalatòria i se'ls va punxar subcutàniament amb una agulla de 27G volums mai superiors a 200 µl.

A la taula M1 s'indica el nombre d'animals utilitzats, els tipus de trasplantaments realitzats, el temps de creixement dels tumors i la mitjana del seu volum a l'hora del sacrifici.

Tipus de trasplantament	<i>n</i>	Temps de creixement	$\bar{X}$ volum tumor (cm <sup>3</sup> )
PAC-120 subcutani dorsal	105	6-12 setmanes	3,06 ± 1,06
PAC-120 subcutani ventral	4	8-12 setmanes	0,25 ± 0,12
PAC-120 ortotòpic	8	10-16 setmanes	3,8 ± 0,75
LNCaP subcutani	5	10-16 setmanes	0,32 ± 0,13
PC-3 subcutani	4	9-14 setmanes	0,72 ± 0,26
DU145 subcutani	4	5-10 setmanes	0,78 ± 0,31
PAC-120 femelles SC	2	-	-
Injecció sc moll d'os	7	-	-

**Taula M1:** Tipus de trasplantaments realitzats, nombre d'animals, temps de creixement del tumor i mitjana del volum a l'hora del sacrifici de l'animal amb la seva desviació estàndard respectiva.

Es va dur a terme un seguiment continu dels animals. Es va practicar un reconeixement dels animals de dos a tres cops per setmana fent la valoració del pes, l'activitat i l'aspecte de l'animal, així com del volum del tumor, que va ser mesurat amb un peu de rei. Per obtenir la mesura cúbica del volum del tumor s'aplicà la fórmula  $V=a^2b/2$ , on (a) correspon al valor major de la mesura en creu del tumor i (b) n'és el valor menor.<sup>49</sup> Pel que fa als altres paràmetres es van seguir les normes estipulades segons les directrius de l'estabulari de l'Institut de Recerca, que es mostren a la taula M2. Les susdites valoracions es basen en l'aplicació d'una puntuació segons l'observació de l'estat de l'animal, essent aquesta puntuació major com pitjor és l'aspecte de l'animal.

El manteniment rutinari dels animals estigué a càrrec del personal de l'estabulari de l'Institut de Recerca de l'Hospital Vall d'Hebron.

Es van seguir les directrius estipulades per la *Federació d'Associacions Europees de Ciència d'Animals de Laboratori (FELASA, [www.felasa.eu](http://www.felasa.eu))* quant al codi de bones pràctiques amb animals d'experimentació.

Paràmetre	Valoració	Puntuació	Freqüència	
Pes (de 0 a 3)	Normal (no hi ha pèrdua de pes o l'animal creix normalment)	0	3 cops setmana	
	Pèrdua de pes inferior al 10%	1		
	Pèrdua de pes entre 10 i 20%. Possible alteració en l'aspecte o quantitat de la femta.	2		
	Pèrdua de pes superior al 20%. L'animal no consumeix aigua ni aliment	3		
Observació de l'animal	Aspecte	Normal	0	Diària
		Pell en mal estat	1	
		Presència de secrecions oculars o nasals.	2	
		Postura anormal.	3	
	Automutilacions o vocalitzacions estranyes indicatives de dolor (0 o 3)	SÍ	3	
Conducta en resposta a estímuls	Molt agressiu o comatós (0 ó 3)	SÍ	3	Diària
		NO	0	
Tumor sc	Calibrador Vernier 0,5-1 cm3 (0 ó 3)	SÍ	3	2 cops setmana
		NO	0	

NOTA: quan un animal obté una puntuació de 3 en més de un paràmetre, tots els 3 passen a 4

#### Mesures correctores segons puntuació:

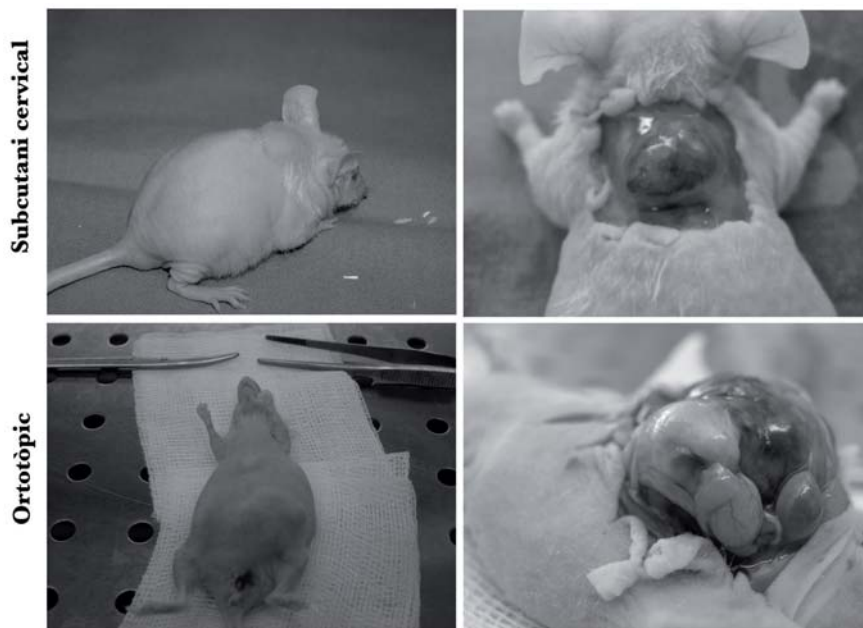
De 0-4	Normal
De 5-8	Cal supervisar acuradament
De 9-12	Sacrifici
De 13-16	Sacrifici

**Taula M2:** Protocol seguit Criteris utilitzats per a la valoració de l'estat dels animals establats. Aquest es basa en una valoració numèrica dels paràmetres exposats per controlar per controlar l'estat físic i conductual dels animals.

### 3.1.2 Tipus de trasplantaments

El tumor es va trossejar en fragments de  $5 \times 5$  mm i es va col·locar (en animals independents) a tres localitzacions diferents: subcutani a la regió dorsal cervical (SD), subcutani a la regió ventral pròxima a la zona prostàtica (SV) i ortotòpic (O).

SD: es practicà una petita incisió dèrmica ( $< 1$  cm) a la regió dorsal mitja. El fragment de tumor es va col·locar sota la regió de teixit adipós que hi ha a la zona cervical de l'animal. En detall, es va localitzar i estirar amb compte el teixit adipós, es va esquinçar amb unes pinces per poder col·locar el tumor sota d'aquesta capa de greix. Llavors se suturà la incisió amb fil de sutura *Prolene* de 6/0 (Johnson & Johnson, Berkshire, Regne Unit) i s'aplicà povidona iodada a la ferida i l'analgèsic corresponent.



**Figura M1:** Imatges que mostren dues de les localitzacions on es va col·locar el tumor. A dalt s'hi mostra el trasplantament més freqüentment utilitzat en aquest treball, el subcutani cervical. A sota la implantació periprostàtica del tumor.

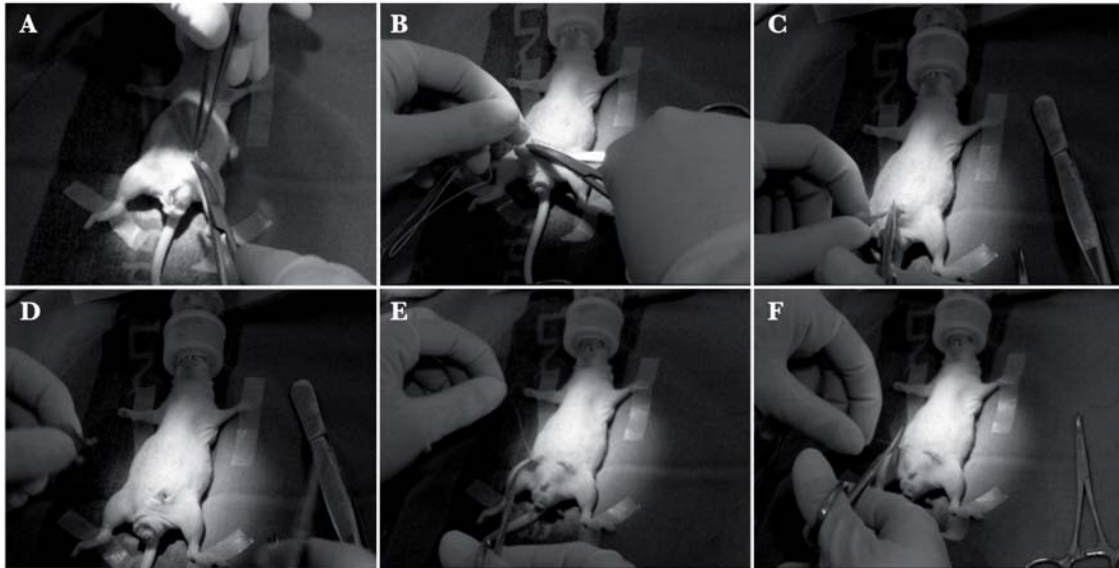
SV: Es va practicar una petita incisió dèrmica a la regió ventral pròxima a la pròstata i s'hi col·locà directament el tumor prèvia lleu separació de la pell del teixit conjuntiu per poder dur a terme l'operació. Un cop posat el tumor se suturà i netejà la ferida com en el cas anterior.

O: Es va practicar una incisió dèrmica a la regió ventral i després una altra per tallar el teixit conjuntiu i muscular tot vigilant de no malmetre cap òrgan. Llavors es van localitzar les vesícules seminals i a l'inici de les mateixes, que conflueix amb la zona ventral superior de la pròstata, s'hi cosí el tumor, enfilant-lo amb un fil de sutura de 6/0. Un cop col·locat el tumor es va suturar l'animal per capes, primer la muscular i després la pell i es va desinfectar la ferida i s'aplicà l'analgèsia.

### 3.1.3 Castracions quirúrgiques

Per tal de comprovar l'estat de dependència hormonal del tumor es van realitzar assajos de castració quirúrgica. Cinc animals es van sotmetre a castració en diferents estadis de creixement del tumor. La castració es va realitzar practicant una o dues incisions lleus a la paret abdominal dels animals, a la regió pròxima a la bufeta. Es van extreure amb compte els testicles de la cavitat escrotal tot estirant els conductes seminífers i es van mantenir humits amb sèrum durant el breu període que van romandre fora de l'animal. Després de practicar un lligament dels conductes amb sutura (6-0 Prolene) es van extreure els testicles, es van seccionar i es van reintroduir els teixits a

la cavitat abdominal i es va procedir a suturar la incisió en dos temps: primer la capa muscular i després l'epidermis.



**Figura M2:** Seqüència de fotogrames que mostra els diferents passos d'una operació de castració d'un ratolí. Breument, es practica una incisió a la cavitat abdominal (A), es treu i es lliga el testicle (B), es talla el testicle (C i D), i se sutura per capes la incisió (E i F).

### 3.1.4 Implantacions en femelles

Es van realitzar dues implantacions de fragments del tumor en femelles per comprovar l'hormonresistència. La cirurgia es va dur a terme com es descriu a l'apartat 1.1 d'aquest capítol i es va fer una implantació subcutània a la regió cervical.

### 3.1.5 Generació de tumors fluorescents per inoculació directa *in vivo* de concentrats de lentivirus GFP

Per tal de transduir cèl·lules del *PAC-120* per generar un model de tumor verd, es va procedir a la inoculació directa *in vivo* de lentivirus als tumors. Per això es va utilitzar entre 60 i 80  $\mu\text{l}$  d'un concentrat de lentivirus GFP (cedit amablement pel Dr. Jordi Barquinero) que es va inocular directament al tumor d'un animal (prèviament anestesiats) quan aquest mesurava 1,57  $\text{cm}^3$ . Es van practicar diverses punxades amb una xeringa de precisió *Hamilton microliter 700 series* de 100  $\mu\text{l}$ , per assegurar una infecció més o menys homogènia.



L'animal que portava aquest tumor va sacrificar-se quan el tumor tenia un volum de  $2,08 \text{ cm}^3$  i aquest tumor es va fixar en formol i es va incloure en parafina per fer tincions immunohistofluorescents amb GFP per comprovar la infecció. A l'hora de trasplantar el tumor es van identificar les regions més fluorescentes sota llum UV, les quals van ser trasplantades a 5 animals, segons el protocol descrit anteriorment. A les subsegüents generacions d'animals es va procedir de la mateixa manera.

### **3.1.6 Generació de tumors LNCaP, LNCaP-CMET, PC-3 i Du145**

Per a la generació de tumors *LNCaP*, *PC-3* i *Du-145* es van injectar  $3,5 \cdot 10^6$  cèl·lules subcutàniament a ratolins nusos. Les cèl·lules es van injectar al flanc lateral dret o a la zona ventral propera a la pròstata per controlar-ne bé el creixement.

Quant a la generació dels tumors *LNCaP-CMET*, es van injectar  $3,5 \cdot 10^6$  *LNCaP* barrejades amb  $10,5 \cdot 10^6$  cèl·lules multipotents estromals dels clons 1, 6 i 12 (proporció 1:3, *LNCaP:CMET*) també al flanc dret (la generació d'aquests clons es descriu més endavant). També es van punxar proporcions de 1:3 invertida i 1:1. El seguiment dels animals es va fer tal i com s'ha descrit anteriorment.

## **3.2 Citometria**

### **3.2.1 Assaigs de *side population***

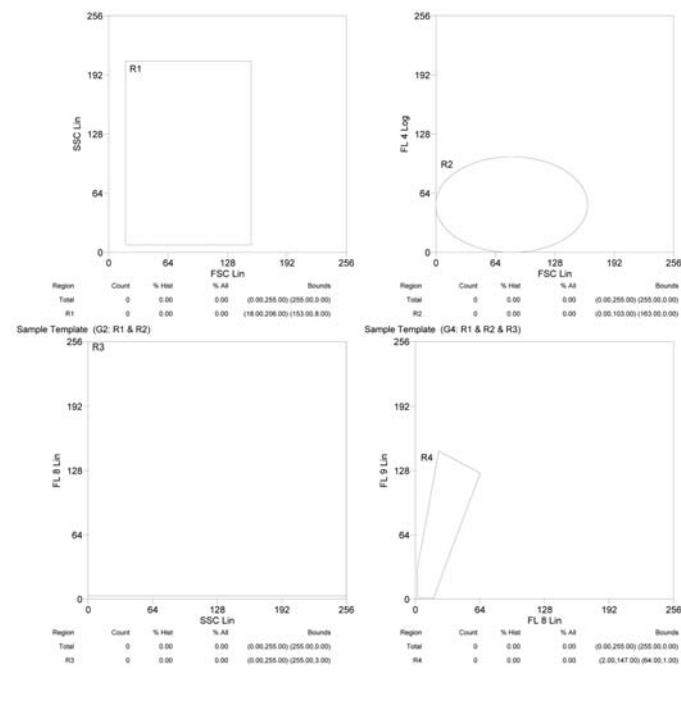
Per tal de realitzar els assaigs per a determinar la població SP dels molls d'ossos es van seguir les línies de protocol descrites a la secció 9.23.1 del *Current Protocols in Cytometry* titulada *Flow cytometry of the side population*.

Pels assaigs d'SP es va utilitzar un citòmetre *MoFlo* (DAKO, Glostrup, Dinamarca) equipat amb un làser de llum UV que opera a 350 nm i amb un altre làser de 488 nm. Es va utilitzar una combinació de filtres que consisteix en un pas de banda de 405/30 (blau), un pas de banda de 670/40 (vermell), i filtres de pas llarg dicròics de 440.

#### **3.2.1.1 Delimitació de la població i adquisició**

Per a l'estudi de la *side population* cal crear cinc histogrames: el primer enfronta el *forward scatter* (paràmetre de difracció de la llum que s'usa per valorar la mida de les

cèl·lules) en escala lineal i el iodur de propidi en escala logarítmica. En aquest histograma es descarten les cèl·lules positives pel iodur de propidi, atès que les que l'han incorporat són cèl·lules mortes. També cal generar un histograma que enfronti el *side scatter* (paràmetre de difracció de la llum proporcional a la complexitat cel·lular) amb les cèl·lules blaves per Ho342, ambdós paràmetres en escala lineal. Aquest histograma permet incloure totes les cèl·lules vives (quant a anàlisi del seu DNA) i excloure eritròcits i restes cel·lulars. Un



**Figura M3:** Histogrames per a la delimitació de les poblacions cel·lulars per a l'anàlisi de la *side population* amb el software Summit v4.3 (DAKO).

tercer histograma enfronta el *side scatter* amb les cèl·lules vermelles pel Ho342, cosa que permet determinar el marcatge vermell a les cèl·lules vives. Els dos histogrames restants enfronten el *side scatter* amb el *forward scatter* i el Ho342 vermell amb el Ho342 blau, respectivament

### 3.2.1.2 Obtenció del material a marcar

Els animals van sacrificar-se per dislocació cervical i es van tallar els fèmurs, els molls dels quals es van utilitzar pels experiments de citometria. Abans de tallar-los, els fèmurs es van netejar bé de restes de teixit. Després es van practicar talls a ambdós extrems de l'os i es va fer passar medi SP (DMEM+2% FBS Gold + 10 mM HEPES) per la cavitat medul·lar amb una xeringa d'insulina (27G) a una pressió suficient per obtenir el moll d'os sense malmetre el material. També es van practicar aspirats de la medul·la per acabar d'arrossegar tot el material. Per evitar un mal comptatge es va disgregar el teixit amb una pipeta.

En el cas del tumor del *PAC-120*, després d'extreure'l de l'animal es va trossejar mecànicament en petits fragments amb un bisturí. Tot seguit es van incubar aquests fragments en 1 ml de medi de cultiu amb 2,5% de col·lagenasa (Sigma-Aldrich, St

Louis, MO) durant 30 minuts a 37°C i en agitació. Després es va centrifugar 5 minuts a 1500 rpms a 4°C. Es va aspirar el sobrenedant i el pellet es va filtrar amb una malla de niló de 50 µm.

En el cas de les cèl·lules en cultiu, es va procedir a fer una tripsinització normal de les cèl·lules en cultiu tal i com es descriu a l'apartat de cultius (3.3).

En el cas de les pròstates humanes (cedides pel departament d'Anatomia Patològica de l'Hospital de la Vall d'Hebron), aquestes es van recollir en medi DMEM just després de la seva extracció dels fetus i es van transportar sobre gel fins el laboratori, on es va procedir a la seva manipulació en condicions estèrils sota campana. Primer es va fer una disgregació mecànica amb un bisturí per tal de fer porcions del teixit prou petites perquè el conjunt fos més fàcilment atacat per la posterior acció de la col·lagenasa. Després es van fer incubacions d'entre mitja hora i una hora a 37°C i en agitació periòdica amb col·lagenasa al 2,5% en medi de cultiu DMEM. Un cop fetes les incubacions, es va procedir a inactivar la col·lagenasa mitjançant la seva dilució en medi DMEM fred i la centrifugació a 1300 rpms durant 5 minuts a 4°C. El pellet es va resuspendre en 1 ml de medi *SP*, es va filtrar amb una malla de niló de 50 µm per descartar els agregats cel·lulars i les restes de teixit no disgregades i es van fer els comptatges pertinents. En tots els casos hi havia consentiment informat per autoritzar l'ús de les mostres en projectes de recerca.

Tots els comptatges es van realitzar amb una cambra de Neubauer seguint els protocols estàndards. En el cas dels molls d'ossos el comptatge es va fer amb solució Türk (per eliminar els eritròcits), mentre que en la resta es va utilitzar el blau tripà.

### **3.2.1.3 Marcatge amb Hoechst 33342**

El protocol de marcatge va adaptar-se al tipus de mostres, per la qual cosa el temps d'incubació de les mostres mixtes (les que contenien cèl·lules humanes i murines) va ser d'una hora i 45 minuts. En el cas de les mostres totalment humanes es van fer incubacions de dues hores. En tots els casos les incubacions es van dur a terme en un bany fosc, a 37°C, en agitació periòdica. Les mostres es resuspengueren en medi DMEM amb 2% FBS (PAA Labs, PAsching, Àustria) i 10 mM d'HEPES (Sigma-Aldrich) prèviament escalfat a 37°C, a raó d'un milió de cèl·lules per ml de medi. S'afegí 5 µg/ml de Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) d'un estoc a 1 mg/ml. Per realitzar els controls s'inhibí parcialment l'activitat del transportador amb verapamil (Sigma-Aldrich) tot fent una alíquota i afegint 50 µM de verapamil (estoc a 5 mM). Un cop acabada la incubació es féu una centrifugació de 6 minuts a 1500 rpms a 4°C, per aturar l'activitat

del transportador i el pellet es resuspengué en tampó HBSS (PAA Labs) amb 2% de FBS i 10 mM d'HEPES a raó de 20 milions de cèl·lules/ml i s'hi afegiren 5 µg/ml de iodur de propidi.

### **3.2.2 Assaigs d'immunotinció**

Es van realitzar immunotincions directes i indirectes per caracteritzar fenotípicament la població *SP*. En el cas que els anticossos portessin conjugada una molècula fluorescent no es va fer ús d'anticossos secundaris. En alguns casos, però, l'ús d'anticossos secundaris marcats fou necessari per poder combinar tots els colors adequadament. També es van utilitzar els anticossos isotípics corresponents per assegurar l'especificitat de l'anticòs i la veracitat de la lectura. En tots els casos les incubacions es van fer amb un mínim d'un milió de cèl·lules per mostra i aquestes es van incubar amb l'anticòs també un mínim de 30 minuts a 4°C a una concentració adequada a cada cas (entre 5 i 10 µl d'anticòs no diluït per  $10^6$  cèl·lules en un volum de 50 µl). En els casos en què va caldre utilitzar secundaris es van practicar rentats de 5 minuts a 1200 rpms amb HBSS+2% FBS Gold+10 mM HEPES i es van incubar amb l'anticòs secundari corresponent 30 minuts a 4°C. Abans de fer la lectura de la mostra s'afegia HBSS per arribar a un volum mínim de 400 µl.

### **3.2.3 Anàlisi del contingut de DNA**

Es van rentar les cèl·lules amb PBS i es van fixar amb etanol fred al 70% i es guardaren a -20°C fins que van ser utilitzades. Per fer el marcatge es van utilitzar entre  $1 \cdot 10^6$  i  $1,5 \cdot 10^6$  cèl·lules, es van rentar dues vegades amb PBS, es van resuspendre en 500 µl d'una solució que portava 10 µl/ml de iodur de propidi a 1 mg/ml i 100 mg/ml de RNAsa i es van deixar incubant tota la nit a 4°C i el dia següent es va fer la lectura del contingut del DNA amb un citòmetre *FACSCalibur* (BD, Franklin Lakes, NJ). L'anàlisi *off-line* es va fer amb el programa *FCS express* (De Novo Software, Los Angeles, CA).

## 3.3 Cultius cel·lulars

### 3.3.1 Línies cel·lulars

Es va treballar amb tres línies derivades de metàstasis de càncer de pròstata humana: *LNCaP*, *PC-3* i *DUI145* (American Type Culture Collection, Manassas, VA).

Aquestes línies es van mantenir en cultiu en incubadors amb 95% d'humitat i 5% de CO<sub>2</sub> i amb medi RPMI 1640, preescalfat. Un cop havia assolit el pH adequat es va afegir un suplement de sèrum fetal del 10%, piruvat, penicil·lina i estreptomicina, aminoàcids no essencials i L-glutamina quan el medi no en duia. En alguns casos, les línies *LNCaP* i *PC-3* es van cultivar amb DMEM enriquit amb un 20% de FBS. Pels assajos de castració *in vitro* es féu servir medi RPMI 1640 (PAA Labs) enriquit amb un 5% de FBS i amb un tractament amb carbó activat. Les cèl·lules s'expandiren a partir de flascons T25 i es cultivaren en diferents passatges en flascons T75 (Nalgene Nunc Intl., Rochester, NY).

Per a passar les cèl·lules, s'aspirava el medi amb pipetes Pasteur de vidre estèrils i es feien dos rentats amb PBS estèril fred i llavors s'afegia de 2 a 4 ml de tripsina a 37°C i es deixava que actués durant aproximadament un minut.

Quant a la congelació, les cèl·lules es van congelar amb un 10% de dimetilsulfòxid (DMSO) en el seu medi habitual i en un gradient decreixent de temperatura de -1°C/minut fins a -80°C en uns contenidors de policarbonat que s'omplen d'isopropanol (Mr Frosty, Nalgene Labware, Rochester, NY) i llavors es van guardar en tancs de nitrogen líquid.

### 3.3.2 Cultius primaris

#### 3.3.2.1 Tumor *PAC-120*

Per tal de cultivar les cèl·lules dels tumors primaris del *PAC-120*, un cop extrets, els tumors es van trossejar i es van incubar en una solució composta de medi Quantum 286 amb un 2,5% de col·lagenasa (Sigma-Aldrich) durant 1 hora a 37°C i en agitació. Després es va fer un rentat amb medi i es van plantar en flascons T75 amb 15 ml de medi Quantum 286 o DMEM + 20% FBS. Aquests cultius es mantenien als incubadors durant dues o tres setmanes sense canviar-los el medi, només afegint-n'hi uns mil·lilitres després d'una setmana. Els cultius primaris es manipulaven només quan era estrictament necessari.

### **3.3.2.2 Cultius de cèl·lula única**

Per d'establir clons de la *side population* es van separar cèl·lules úniques de la SP en una placa de 96 pouets (Nalge Nunc Intl, Rochester, NY) que contenia medi DMEM amb 20% de FBS. Els clons que van créixer es van anar expandint a plaques i flascons de superfícies cada cop majors

### **3.3.2.3 Moll d'os**

Un cop extrets, els molls d'os es disgregaven amb una pipeta i se sembraven en flascons T25 amb 5-8 ml de medi DMEM amb 20% de FBS o bé amb Mesencult amb suplementes (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC). També es van fer cultius amb el medi Quantum 286.

### **3.3.3 Tractament amb 5-aza-2'-deoxicitidina**

Per tal d'estudiar l'efecte de l'impediment de la metilació *de novo* sobre la població SP es van tractar les línies *LNCaP*, *PC-3* i *DU145* amb l'agent 5-aza-2'-deoxicitidina (Sigma-Aldrich). Aquest tractament va consistir en l'addició de 1  $\mu\text{M}$  del fàrmac dissolt en PBS als cultius, quan estaven a una confluència del 50%. Es tractament va tenir una durada d'entre 48 i 72 hores, passades les quals es procedia a tripsinitzar-les per fer els assajos corresponents.

### **3.3.4 Experiments de diferenciació cel·lular**

#### **3.3.4.1 Diferenciació osteogènica**

Les cèl·lules es cultivaren durant 4 setmanes amb medi Mesencult, en DMEM-10% o 20% de FBS i 10 nM de dexametasona, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'àcid ascòrbic i 10 nM  $\beta$ -glicerolfosfat (Sigma-Aldrich). El medi es canviava de dos a tres cops per setmana. La visualització es va fer afegint fosfatasa alcalina (Abcam, Regne Unit) durant 20 minuts, prèviament portada a temperatura ambient durant uns altres 20 minuts.

#### **3.3.4.2 Diferenciació adipogènica**

Les cèl·lules es cultivaren durant 4 setmanes amb medi Mesencult, en DMEM-10% o 20% de FBS i 10 nM de dexametasona i 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'insulina (Sigma-

Aldrich). El medi es canviava de dos a tres cops per setmana. La visualització es va fer afegint oli vermell O (Sigma-Aldrich) al 0,5% durant 20 minuts.

### **3.3.5 Activació del *Transforming Growth Factor beta 1* (TGF $\beta$ )**

Per tal de valorar l'activitat del TGF $\beta$  en els clons de cèl·lules SP es van incubar les cèl·lules amb i sense TGF $\beta$  (R&D Systems, Minneapolis, MN) dissolt en DMSO, a una concentració final de 10 pM durant 3 hores. També es van incubar amb i sense inhibidor SB 431542 (Sigma-Aldrich) del TGF $\beta$ , a una concentració final de 2  $\mu$ M, en combinació amb el TGF $\beta$ . En els controls es va afegir la quantitat de DMSO afegida als altres flascons per eliminar el possible efecte del mateix sobre les cèl·lules.

Com a cèl·lules control per a l'experiment es van fer servir les DU145, que se sap que responen a TGF $\beta$ . Totes van ser cultivades en DMEM amb 10% FBS. Passades les 3 hores del tractament les cèl·lules es van recollir amb tampó RIPA i es van extreure les proteïnes.

### **3.3.6 Inhibició del TGF $\beta$ amb un anticòs de bloqueig**

Per valorar si el bloqueig de TGF $\beta$  n'inhibia la via es va utilitzar un anticòs contra TGF $\beta$  (R&D Systems, Minneapolis, MN) a les cèl·lules en cultiu. Es va afegir una concentració d'anticòs de bloqueig òptima per a les cèl·lules de 15  $\mu$ g/ml determinada empíricament i es van incubar tres hores als incubadors amb el medi corresponent en presència i absència de l'anticòs. Un cop passades les tres hores es van recollir les cèl·lules mitjançant un raspap del flascó, i es va procedir a extreure'n la proteïna i fer una transferència *western* per p-Smad 2 tal i com es descriu a l'apartat 3.11.

## **3.4 Immunotincions per microscòpia**

### **3.4.1 Immunocitofluorescència**

#### **3.4.1.1 Immunocitofluorescència sobre cèl·lules en cultiu**

Per fer immunotincions sobre cèl·lules en cultiu es va preparar una placa P30 (Nalge Nunc Intl.) i s'hi dipositaren cobreobjectes circulars. Se sembraren les cèl·lules i

es van deixar créixer el temps necessari. Les cèl·lules es van fixar amb paraformaldehid 4% en PBS durant 15 minuts a 4°C. Després es van fer rentats amb PBS fred. La permeabilització es va fer amb PBS+ 0,1% Tritó X100, 10 minuts a 4°C. A continuació es van fer rentats amb PBS i PBS+ 3% BSA i es va procedir a fer la incubació amb l'anticòs primari dissolt en una solució de PBS+3% BSA durant 1 hora a temperatura ambient. Després es van fer rentats de 5 minuts a 30 minuts amb PBS-BSA i es procedí a la incubació amb l'anticòs secundari, també dissolt en PBS-BSA a temperatura ambient durant una hora. Els darrers rentats es van fer amb PBS i els cobreobjectes es van muntar sobre portaobjectes amb PBS-glicerol 50%.

#### **3.4.1.2 Immunocitofluorescència sobre citospins i cèl·lules separades per citometria**

En el cas dels citospins, es van fer a partir de molls d'os d'animals sobre portes amb una coberta de polilisina (DAKO). Les mostres es van centrifugar en una centrifuga de citospins durant 5 minuts a 1500 rpms.

En el cas de la separació cel·lular per citometria es van deixar caure les cèl·lules també sobre portaobjectes recoberts de polilisina.

Es va fer una primera fixació i permeabilització alhora de les mostres amb metanol o etanol. En el cas del metanol es van mantenir 10 minuts a -20°C i en el cas de l'etanol es van mantenir a temperatura ambient submergides fins l'hora de fer la tinció. La resta del protocol fou similar a l'anterior, però escurçant els passos dels rentats per tal de no perdre el material.

#### **3.4.2 Immunohistofluorescència**

Per dur a terme les tincions immunohistofluorescents es van utilitzar seccions de blocs de parafina en què s'havia inclòs els teixits a estudiar, prèvia fixació amb formol durant un mínim de 12 hores. Per tal d'estovar la parafina aquests talls es van mantenir tota la nit a 37°C o bé una o dues hores a 50°C. Després es va procedir a la desparafinació, en què es van fer passar les mostres successivament per tres cubetes amb xilè durant 15 minuts cada una. Després es van passar per etanol 100% durant 10 minuts i es canviaren a una altra cubeta amb etanol 100% durant 5 minuts més. Tot seguit es va fer la hidratació de la mostra, en què es passaren els portaobjectes per una gradació decreixent d'alcohols que en aquest cas fou: 100%, 95%, 85%, 70%, 50% i 30%, fins arribar a aigua destil·lada. Després de la deshidratació es procedí a fer un rentat amb PBS i un rentat amb PBT (PBS+ 0,5% Tritó X100) seguit de dos rentats



més amb PBS, tots quatre de 5 minuts cada un. Llavors es va fer el desemascament de l'epítip. Aquest procés és clau a l'hora que la tinció sigui reeixida. Hi ha diverses maneres d'enfocar el desemascament de l'epítip, però totes tenen la mateixa finalitat: deixar la proteïna que es vol estudiar en un estat d'exposició tal que l'anticòs pugui unir-s'hi. En aquest estudi el desemascament dels epítips a estudiar es va fer sempre de la mateixa manera: amb un tampó citrat (*Antigen retrieval solution*, DAKO) i amb un forn microones. Els passos a seguir van ser els següents: es col·locaren les mostres dins una cubeta amb tampó citrat i es va tapar. Es posà al microones durant 5 minuts a màxima potència (fins que bullís). Llavors es retirà del microones i es va deixar que la temperatura del tampó baixés fins a 70°C, cosa que va permetre un desplegament de les proteïnes. Després es va tornar a col·locar al microones durant 15 minuts a mínima potència. S'afegí més tampó si aquest s'evaporava o perdia per tal que les mostres mai no quedessin seques. Un cop passats els 15 minuts es va deixar que la temperatura del tampó assolís la temperatura ambient i llavors es féu un rentat amb aigua MilliQ

Anticòs	Espècie	Dilució	Casa comercial
Citoqueratina 8	Pollastre	1/150	Abcam
Citoqueratina 8	Ratolí	1/50	Abcam
Citoqueratina 18	Ratolí	1/50	Abcam
Citoqueratina 5	Ratolí	1/50	Abcam
Citoqueratina 14	Ratolí	1/50	Abcam
5-metilcicidina	Ratolí	1/50	Abcam
p63	Conill	1/50	Santa Cruz
Receptor d'andrògens	Conill	1/50	Santa Cruz
$\beta$ 2-mgلوبulina	Ratolí	1/50	Biolegend
NK1.1	Ratolí	1/50	BD
Sca-1	Rata	1/50	ATCC
$\alpha$ SMA	Ratolí	1/50	Sigma
p-Smad2	Conill	1/50	Cell signaling
$\beta$ -catenina	Ratolí	1/200	BD
Cromogranina A	Ratolí	1/50	-
E-cadherina	Conill	1/50	BD
PSA	Ratolí	1/50	Neomarkers
Fibronectina	Ratolí	1/300	Sigma

**Taula M3:** Relació d'anticossos primaris utilitzats per immunotincions per microscòpia.

(Millipore Corp., Bedford, MA). Després es féu un rentat amb PBT durant 5 minuts i s'incubaren les mostres durant una hora amb un tampó de bloqueig que portava 3% BSA, 5% FBS, 20mM MgCl<sub>2</sub> i 0,3% de Tween 20 en PBS. Un cop fet el bloqueig es va posar l'anticòs primari diluït adequadament en la solució de bloqueig i s'incubava tota la nit a 4°C. Els anticossos utilitzats així com les dilucions i les cases comercials s'especificquen a la taula M3.

L'endemà es feia un rentat amb PBT seguit de dos amb PBS de 5 minuts cada un, i després s'incubà amb l'anticòs secundari una hora a temperatura ambient (en el cas que calgués) diluït també en la solució de bloqueig. La relació d'anticossos secundaris utilitzats i les cases comercials s'especificquen a la taula M4. A la mitja hora o deu minuts finals d'incubació s'afegí el TOPRO-3 (dilució 1:500) o el Hoechst 33342 (dilució 1:300) per marcar els nuclis.

Finalment es tornà a fer un rentat amb PBT i tres amb PBS i es va muntar amb PBS+glicerol 50%.

<b>Fluorocrom</b>	<b>Espècies</b>	<b>Dilució</b>	<b>Casa comercial</b>
AlexaFluor 488	Pollastre anticonill	1/200	Molecular Probes
AlexaFluor 488	Ase anticonill	1/200	Molecular Probes
AlexaFluor 647	Cabra antipollastre	1/200	Molecular Probes
AlexaFluor 647	Ase antiratolí	1/200	Molecular Probes
AlexaFluor 568	Cabra antiratolí	1/200	Molecular Probes
Cy3	Ase antirata	1/100	Molecular Probes
FITC	Ase antirata	1/100	Molecular Probes

**Taula M4:** Relació d'anticossos secundaris utilitzats per immunofluorescència.

### 3.4.3 Immunohistoquímica

La immunohistoquímica és una tècnica que no permet l'ús de diversos anticossos per fer una tinció múltiple però sí que permet tenir una visió més global de la histologia del teixit i per tant del context del marcatge de la tinció. Per dur-la a terme es va seguir un protocol semblant al de la immunohistofluorescència, però amb algunes modificacions. Després de fer el desemascament i els rentats posteriors, es va fer una

incubació amb una solució de bloqueig de la peroxidasa endògena, atès que la reacció és amb la peroxidasa que porta conjugada l'anticòs secundari. Aquesta incubació es féu 10 minuts a les fosques. La solució en què es van diluir els anticossos, tant primaris com secundaris, és comercial (DAKO). Els anticossos secundaris ja estaven prediluïts en el sistema utilitzat (*DAKO EnVision+ System*) i les incubacions van ser de 30 minuts. Un dels passos més rellevants en aquesta tècnica rau en el revelat. En aquest pas s'utilitza la diaminobenzidina per tal de produir una reacció colorimètrica amb la peroxidasa, que marca els llocs d'unió de l'anticòs secundari. Aquest pas té un lleuger caràcter subjectiu, atès que s'atura quan hom considera que el marcatge és prou clar. Tanmateix, el que cal és sempre mantenir els temps de revelat iguals per totes les mostres a comparar. Per aturar la reacció de revelat es van posar els talls en aigua. Un cop fet el revelat es van rentar amb aigua abundant i es va fer la contratinció amb hematoxilina durant un temps variable depenent de l'hematoxilina utilitzada, que en aquest cas fou de 30 segons (Hematoxylin Harris, Surgipath, Richmond, IL). Tot seguit es va tornar a rentar amb aigua abundant per netejar les restes d'hematoxilina i es va procedir a fer una deshidratació de la mostra amb un gradient creixent d'alcohols (30%, 50%, 70%, 90%, 100%). Després es posaren les mostres en xilè i es muntà amb medi de muntatge *DPX mountant* (BDH).

### **3.5 Hibridació in situ fluorescent (FISH)**

La hibridació in situ fluorescent (*FISH*) és una tècnica de tinció fluorescent que permet marcar regions cromosòmiques concretes per visualitzar-les per microscòpia de fluorescència. Aquesta tècnica es va utilitzar en aquest treball per discriminar cèl·lules humanes i murines mitjançant l'ús de dues sondes fluorescentes (FITC i Cy3) pancentromèriques específiques d'humà i de ratolí respectivament (Cambio, Cambridge, Regne Unit). Les hibridacions es van realitzar tant sobre talls tissulars parafinats com sobre cèl·lules separades per citometria sobre portes.

Per tal de realitzar la tècnica es va seguir el protocol de la casa comercial aplicant-hi unes lleus modificacions: en primer lloc les mostres es van preescalfar a 37°C tota la nit o a 50°C una hora per estovar la parafina. Després es va procedir a fer la desparafinació amb un seguit de tres passos per xilè de 15 minuts cada un. Tot seguit es deshidratava la mostra en una gradació decreixent d'alcohols (com el descrit a l'apartat d'immunohistoquímica). Després es va fer una incubació amb solució de tiocianat de sodi (Sigma-Aldrich) 10 minuts a una temperatura que oscil·lava de 80°C a 95°C en

funció de l'experiment. Llavors es va fer un rentat amb PBS i s'incubà amb solució de pepsina (Sigma-Aldrich) 10 minuts a 37°C. Aquest és un pas crucial de la FISH i tant la concentració com el temps d'incubació de la pepsina s'han de determinar per cada teixit, atès que depèn del tipus i llargada de la fixació del teixit així com també del tipus de teixit. En aquest cas es van practicar incubacions de 5 a 15 minuts amb la pepsina diluïda en HCl 1M. Un cop feta la incubació s'aturava l'acció de la pepsina amb una solució de glicina que contenia 0,4 g de glicina (Sigma-Aldrich) en 200 ml de PBS 2X. Llavors es va fer una postfixació de dos minuts amb solució de paraformaldehid preparada el mateix dia (cal escalfar 8 g de paraformaldehid en 200 ml de PBS a 80°C i deixar-ho refredar a temperatura ambient abans d'usar). Un cop postfixat es feren tres rentats en PBS durant 15 minuts en total i llavors es féu una deshidratació a través d'un gradient creixent d'alcohols per acabar deixant assecar la mostra a temperatura ambient. Mentrestant es descongelaren les sondes i s'escalfaven a 37°C i un cop seques les mostres se li aplicaren de 10 a 15 µl de sonda. Es cobrien els talls amb un cobreobjectes i se segellava amb esmalt transparent. Un cop segellat cal dur a terme el procés de desnaturalització a la temperatura adient durant 10 minuts. Aquesta temperatura va de 60°C per tincions murines i a 80°C per tincions humanes. En aquest cas les temperatures es van fer oscil·lar entre 80°C i 90°C, atès que les mostres tenien tant cèl·lules humanes com murines. Després d'aquest pas les mostres es deixaren en hibridació amb les sondes tota la nit a 37°C. L'endemà es van retirar l'esmalt i el cobreobjectes amb compte i es feren 3 rentats de 5 minuts cada un a 37°C amb solució rentadora de formamida, 3 rentats de 5 minuts cada un a 37°C amb solució de rentat d'astringència, un rentat de 10 minuts a 37°C amb solució de rentat amb detergent i 3 rentats de 5 minuts cada un amb PBS. Llavors s'afegí un marcador nuclear (en aquest cas el Hoechst 33342 a una dilució 1:300 durant 10 minuts) i es féu el muntatge amb PBS-glicerol 50%.

Les FISH es van captar amb un microscopi confocal Olympus FluoView1000 i amb un microscopi de fluorescència Olympus BX61.

### 3.6 *Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)* per *TGFβ*

Es van realitzar ELISA per TGFβ1 amb el *Quantikine ELISA kit* (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN), seguint les instruccions del proveïdor. Es van cultivar tres clons (1, 6 i 14) en medi DMEM + 10 % FBS durant 48 hores i després es va recollir el medi. També es va recollir el mateix medi no condicionat (sense haver estat en contacte amb les cèl·lules). Les mostres es van processar per duplicat. El TGFβ1 latent a les mostres es va activar per convertir-lo en immunoreactiu i, doncs, detectable per l'immunoassaig mitjançant l'addició de 20 µl de 1M HCl a cada 100 µl de mostra i incubant-ho durant 10 minuts. Les mostres acidificades es van neutralitzar amb 20 µl de 1,2 M NaOH/0,5 M HEPES. Es va fer un estàndard de TGFβ1 i fou processat simultàniament. A continuació, es van afegir 50 µl d'*Assay Diluent RDI-21* i 50 µl de mostra o estàndard a cada pouet i es va incubar durant 2 hores. Es van fer tres rentats dels pouets amb i es van afegir 100 µl de conjugat de TGFβ1 a cada pou i es va incubar durant 2 hores més. Després de rentar tres cops més, es van afegir 100 µl de *Substrate Solution* a cada pou i es va incubar durant 30 minuts, protegit de la llum. Finalment es va afegir un volum de 100 µl de *Stop Solution* a cada pouet i es va llegir la densitat òptica a 450 nm en un lector de plaques.

### 3.7 Reacció en cadena de la polimerasa (*PCR*)

#### 3.7.1 Extracció d'àcids nucleics

Per tal d'obtenir els àcids nucleics dels teixits a estudiar en primer lloc es pulveritzava el teixit en un morter amb nitrogen líquid. Per extreure el RNA es va utilitzar el paquet comercial *RNA extraction minikit* (GE Healthcare, Chalfont St Giles, Regne Unit). Un cop triturat se n'agafava el necessari i se li afegia 350 µl de tampó RA1 i 3,5 µl de β-mercaptoetanol per tal d'acabar de trencar bé les cèl·lules. Per extreure els àcids nucleics de teixits com el moll d'os o de les cèl·lules en cultiu (cultius primaris o línies) es passava directament a afegir-los el tampó amb el β-mercaptoetanol. En ambdós casos després del tampó es feia passar la mostra per una xeringa d'insulina (27G) de 5 a 10 vegades per tal d'acabar d'homogeneïtzar el teixit. Tot seguit es procedia a seguir el

protocol d'extracció de RNA descrit pel fabricant. Les mostres que no haguessin de ser utilitzades al moment es van congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$  per preservar-les.

Pel que fa a l'extracció de DNA es va utilitzar el *QIAMP DNA microkit* (QIAGEN, Hilden, Alemanya) i es va seguir el protocol descrit pel proveïdor.

### **3.7.2 Quantificació d'àcids nucleics i valoració de la integritat del RNA**

La quantificació dels àcids nucleics es dugué a terme utilitzant l'espectròmetre *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific, Wilmington, DE) seguint les instruccions del fabricant.

Atès que la qualitat del RNA és un factor crític a l'hora de poder realitzar estudis per PCR, siguin o no comparatius, es va procedir a fer una valoració de la integritat dels RNAs mitjançant el *2100 Bioanalyzer* d'Agilent (Agilent, Palo Alto, CA), que permet obtenir un valor d'integritat relatiu basat en l'electroferograma de cada RNA analitzat.

### **3.7.3 Transcripció reversa**

Per obtenir cDNA a partir del RNA extret de les mostres es va utilitzar la transcriptasa reversa *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Carlsbad, CA). Per a la reacció es van utilitzar encebadors a l'atzar a una concentració de 100 mM, 1 mM de ditiotretitol, tampó 5X, i 10 mM d'una barreja de dNTPs. La reacció es va portar a un volum final de 20  $\mu\text{l}$  i se seguí el protocol següent en un controlador tèrmic *PTC-100 Programmable Thermal Controller* (MJ Research, Inc., Waltham, MA): 5 minuts a  $65^{\circ}\text{C}$ , clavar en gel i afegir els dNTPs (10 mM), el tampó 5X i el DTT (0,1 M), posar 10 minuts a  $25^{\circ}\text{C}$  i 1 minut a  $42^{\circ}\text{C}$ , afegir la transcriptasa i deixar 50 minuts a  $42^{\circ}\text{C}$ , 15 minuts a  $72^{\circ}\text{C}$  i 4 $^{\circ}\text{C}$  a temps indefinit.

### **3.7.4 Disseny dels encebadors**

Les seqüències diana a amplificar es van buscar a la base de dades del National Center for Biotechnology Information (NCBI) i es van guardar en format FASTA i en extensió .txt. Per tal de dissenyar els encebadors es va utilitzar el programa *Primer Express Software v2.0* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Es van triar els encebadors amb penalitzacions menors i que formessin menys estructures secundàries.

La síntesi dels encebadors es va encarregar a la casa Thermo Fisher Scientific, Inc. Es van resuspendre amb aigua a una concentració de 120  $\mu\text{M}$  o 100  $\mu\text{M}$  cada un en funció de si després es feia una barreja dels dos encebadors a 30  $\mu\text{M}$  o es diluïen a 10  $\mu\text{M}$  cada un per separat, respectivament. Els encebadors i les seves respectives temperatures d'anellament s'especifiquen a la taula M5.

Gen	Encebador sentit (5'-3')	Encebador antisentit (5'-3')	Ta
CD44	GATGGAGAAAGCTCTGAGCATC	GTCATCATCAGTAGGGTTGCT	59°C
K8	CTGCAGAGCCTGGCTGGGAAGCA	ATCTGCAATGGCGGCCTCCAGG	59°C
Abcg2	CTCGCAGAAGGAGATGTGTTGA	GCAGGTTGAGGTGCTCCATT	59°C
ABCG2	ATTCAGGAGACCACATTTTCATCTAGC	CAGGGCACCCACTGACAAAC	58°C
L19	CACATGGATGAGGAGAATGAGGATTT	GCTGATCTATGTAATCACAGAGGCCAG	60°C
Rps18	TTCGCCATCACTGCCATTAA	AGGTCCCTCACGCAGCTTGTT	59°C
Alu-sx	GGCGCGGTGGCTCACG	TTTTTTTGAGACGGAGTCTCGCTC	58°C
c-mos	GAATTCAGATTTGTGCATACACAGTGACT	AACATTTTTTCGGAATAAAAAGTTGAGT	58°C
$\beta$ 2M	TATGCCTGCCGTGTGAACC	TGCCAGCCCTCCTAGAGCTAC	59°C
Cd34	AGAATGCAGGTCCACAGGGA	TCTGAGATGGCTGGTGTGGTC	59°C

**Taula M5:** Relació d'encebadors utilitzats i les seves respectives temperatures d'anellament (Ta).

### 3.7.5 Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

Les PCRs es van fer amb la polimerasa Ecotaq i els seus reactius (Ecogen, Barcelona, Catalunya). Les reaccions van dur-se a terme en un volum final de 20  $\mu\text{l}$  i, generalment, portaven les concentracions finals següents: 0,2 mM dNTPs, 3 mM  $\text{Mg}_2\text{Cl}$  i 0,75  $\mu\text{M}$  de la barreja dels encebadors o 0,25  $\mu\text{M}$  de cada un.

Les PCRs es van realitzar en un termociclador *Minicycler* (MJ Research, Inc.) i les condicions, tot i que variables segons l'amplificació, segueixen el següent patró: 94°C durant 5 minuts, i llavors de 28 a 43 cicles de 5-30 segons a 94°C, 15-30 segons a 55°C-61°C i 15-40 segons 72°C, seguit d'un darrer pas de poliadenilació de 7-10 minuts a 72°C.

Els productes de PCR es van córrer en gels d'agarosa (Ecogen) a l'1%-1,5% amb un 0,005 % de bromur d'etidi.

## 3.8 Microxips de cDNA

### 3.8.1 Disseny experimental, tipus d'arrays i mostres

El disseny experimental es basa en la utilització de clons de cèl·lula única seleccionats a través del seu fenotip *SP* a partir de cultius primaris del tumor *PAC-120*. Prèviament es va comprovar la procedència murina d'aquestes cèl·lules i es va plantejar un experiment d'anàlisi dels perfils gènics comparant les poblacions *SP* i no *SP* de tres clons que no diferissin massa quant al seu percentatge d'*SP*. La idea es basa en l'obtenció de perfils que donin una idea de les diferències entre *SP* i no *SP* en una població cel·lular estromal de l'entorn del tumor. Aquesta població, purificada en 3 ocasions pel que fa al seu fenotip *SP* i finalment separada en cèl·lules úniques suposa un model d'estudi únic de la població *SP* quant a les diferències intrapoblacionals.

Es van separar per citometria 300.000 cèl·lules *SP* i 300.000 cèl·lules no *SP* de tres clons de cèl·lules murines dels tumors i es va extreure el seu RNA tal i com es descriu a l'apartat corresponent. Es van mesurar la concentració i la qualitat dels RNAs amb el *2100 Bioanalyzer* (Agilent). Es van fer servir els xips *GeneChip Mouse Gene 1.0 ST Array* i els *GeneChip Human Gene 1.0 ST Array* d'Affymetrix. Tal i com diu la companyia, aquests nous xips ofereixen una cobertura total del genoma amb una representació de 28.853 gens, cada un dels quals té al voltant de 27 sondes que s'uneixen al llarg de la forma llarga del gen (el *full-length*), cosa que dona una informació més acurada sobre l'expressió gènica que els xips basats en la hibridació 3'. Els xips poden hibridar-se amb una quantitat mínima de 100 ng d'RNA total.

### 3.8.2 Anàlisi de les dades

Les imatges es van processar amb el software *Microarray Analysis Suite 5.0* (Affymetrix). Totes les mostres presentaven característiques de cRNA d'alta qualitat (quocient 3'/5' dels grups de sondes pels gens del *Gapdh* i la  $\beta$ -actina <1.5) i van sotmetre's a les anàlisis subsegüents.

Els valors d'expressió crus es van obtenir directament dels arxius *.CEL* i es van preprocessar utilitzant el mètode RMA, un procés de tres passos que integra la correcció del soroll de fons, la normalització i la sumarització dels valors de les sondes. Aquests valors normalitzats van ser les bases de totes les anàlisis.

Prèviament a qualssevol anàlisi, les dades es van sotmetre a un filtrat no específic per eliminar gens amb senyals baixos (aquells gens el senyal mitjà dels quals a cada grup



no superava un llindar mínim) i gens d'alta variabilitat (aquells gens la desviació estàndard dels quals entre totes les mostres no superava un llindar mínim). La selecció de gens expressats de manera diferencial entre condicions es va basar en un model d'anàlisi lineal amb una moderació empírica de Bayes de les estimacions de la variància seguint la metodologia desenvolupada per Smyth. El mètode estén l'anàlisi del model lineal tradicional utilitzant mètodes de Bayes empírics per combinar la informació del total de l'*array* i cada gen individual per tal d'obtenir estimacions de l'error millorades que són molt útils en les anàlisis de dades de *microarrays* en què la mida mostral sovint és petita, cosa que pot dur a estimacions de l'error erràtiques i, en conseqüència, a p-valors no creïbles. L'anàlisi comprèn tests estadístics estàndard com *fold changes*, moderat-t o p-valors que poden utilitzar-se per fer *ranks* dels gens des dels que estan expressats més diferencialment fins als que ho estan menys. Per tal de manejar amb els múltiples paràmetres de test derivats del fet que es fan molts tests simultàniament (un per gen), els p-valors es van ajustar per obtenir un fort control sobre la taxa de fals descobriment utilitzant el mètode de Benjamini i Hochberg. Si resultava que el mètode era massa restrictiu llavors la llista de gens per rank si els p-valors no ajustats s'usaven com a bases per a la selecció de candidats.

Gens significatius poden destacar-se gràficament amb vulcanogrames, que disposen els gens en dimensions de significació estadística biològica. La primera dimensió (horitzontal) és el *fold change* entre dos grups (en una escala logarítmica, de tal manera que que la regulació a l'alça i a la baixa hi apareixen simètriques), i el segon eix (vertical) representa el p-valor del test moderat en una escala logarítmica negativa, de tal manera que els p-valors més baixos apareixen a la zona alta. El primer eix indica l'impacte biològic del canvi; el segon indica la prova estadística, o la fiabilitat del canvi.

Els gens que es van seleccionar com a expressats de manera diferencial es van agrupar per trobar patrons d'expressió comuns. L'agrupament jeràrquic amb distància euclidiana es va utilitzar per formar grups i es van usar "mapes d'escalfor" (gràfics codificats amb colors amb les mostres en columnes i els gens en files) per tal de visualitzar-los. L'escalatge multidimensional es va aplicar a les matrius de distàncies utilitzades per agrupar les mostres per tal de produir representacions gràfiques que ajudessin a descobrir grups en les mostres.

Totes les anàlisis estadístiques es van fer amb el software *Affymetrix Expression Console*, el llenguatge estadístic lliure *R* i les llibreries desenvolupades per a les anàlisis de dades de *microarrays* del *Bioconductor Project* ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)). Els principals mètodes i eines utilitzats estan descrits a la monografia de Gentleman i col·laboradors titulada *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor* (Springer, NY, 2005).

## 3.9 Clonatge i seqüenciació

### 3.9.1 Clonatge

Els clonatges es dugueren a terme amb el sistema comercial *TOPO TA Cloning* (Invitrogen). La transformació de les cèl·lules competents es va fer per xoc tèrmic a 42°C durant 30 segons, després d'haver estat un mínim de 20 minuts en gel. Tot seguit el tub amb la barreja es va clavar en gel durant dos minuts i llavors se li afegiren 250 µl de medi comercial o 500 µl de medi LB i s'incubaren les cèl·lules a 37°C durant una hora a l'agitador bacterià a 225 rpms. La barreja del clonatge es va sembrar en plaques d'agar amb ampicil·lina o kanamicina, atès que el vector comercial presenta resistència a ambdós antibiòtics i es va deixar tota la nit a 37°C.

Les colònies es van picar i es féu una PCR amb uns encebadors del vector M13 per comprovar les colònies que presentaven la inserció. El DNA plasmídic es va extreure dels bacteris mitjançant minipreps, amb el sistema *Wizard Plus SV* (Promega Biosciences, Inc., Madison, WI) i s'utilitzà directament per seqüenciar amb un dels encebadors de l'M13.

### 3.9.2 Seqüenciació

Per seqüenciar fragments de DNA es va utilitzar el *Big Dye 1.1 Terminator kit* (Applied Biosystems) i el seqüenciador *ABIPrism 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems/Hitachi) tot seguint el mètode de Sanger. Les reaccions de seqüència es van fer a partir dels productes de PCR que van ser extrets de fragments de gels d'agarosa amb el quit *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) tal i com recomana el fabricant.

## 3.10 Anàlisi de metilació

### 3.10.1 Conversió del DNA

En primer lloc es va procedir a l'extracció de DNA genòmic amb el kit *DNA QIAmp microkit* (Qiagen) i a sotmetre'l a una reacció de conversió amb l'*EZ DNA Methylation-Gold Kit™* (Ecogen). En aquesta reacció, tots els residus de citosina no metilats són desaminats i convertits en residus de timina, mentre que els residus de 5-metilcitosines no s'alteren pel tractament. Es van utilitzar 20 µl de DNA genòmic, que, un cop afegit el reactiu de conversió, es van sotmetre a un cicle de 10 minuts a 98°C i 2

hores 30 minuts a 64°C. Després es va procedir a unir el DNA a la columna i a la seva desulfonació. Es van fer els rentats corresponents i es va eluir el DNA modificat. La quantificació d'aquest es va realitzar amb el *NanoDrop-1000*.

### 3.10.2 PCR de metilació

Es va dissenyar dues parelles d'encebadors per amplificar una regió del promotor d'*Abcg2* (muri) i *ABCG2* (humà) després d'haver fet la reacció de bisulfitació. Els encebadors utilitzats s'especifiquen a continuació: *Abcg2* sentit 5'-GGTGAAGGTATTTTGAGTATATT-3', antisentit 5'-CTAAACTATCAATCCTTATTTCC-3'; *ABCG2* sentit 5'-GATTA AATTTAGTTAGGTTAG-3', antisentit 5'-AAAACCACCAAACATATACA-3'. En el cas de l'*Abcg2* muri, l'amplicó té 467 parells de bases i comprèn 46 CpGs, i en el cas de l'*ABCG2* humà, l'amplicó fa 694 parells de bases i comprèn 69 CpGs. La situació genòmica de la regió d'*ABCG2* amplificada és -316 +379, on +1 és el l'inici de transcripció principal del gen. Per fer la reacció de PCR es va utilitzar una concentració final d'encebadors de 0,25 µM cadascun i la PCR es va realitzar sota les següents condicions: 5 minuts a 94°C, i 40 cicles de 30 segons a 94°C, 30 segons a 57°C i 40 segons a 72°C, i un darrer pas de 10 minuts a 72°C. El producte es va córrer en un gel d'agarosa a l'1% i les bandes es van retallar amb un bisturí i es van recollir en tubs eppendorf. Per tal d'extreure el DNA del gel d'agarosa es va utilitzar el kit d'extracció de DNA de gels d'agarosa *QIAquick Gel extraction Kit* (QIAGEN), i aquest es va quantificar novament amb el *Nanodrop-1000*. Es van utilitzar un mínim de 20 ng del producte de la PCR per realitzar una reacció de seqüenciació tot seguint els passos descrits a l'apartat de seqüenciació.

## 3.11 Transferència *western*

Les mostres la proteïna de les quals es va voler estudiar van ser pulveritzades amb nitrogen líquid en un morter sobre neu carbònica. Immediatament després se'ls va afegir tampó RIPA (150 mM Tris HCl, 50 mM Na Cl, 1% SDS, 1% NP-40 i 0,5% deoxicolat de sodi) fred i es van mantenir en agitació durant 20 minuts a 4°C. Un cop fet això es va passar el material per una xeringa de 27G diverses vegades i es va fer una centrifugació de 10 minuts a 14000 rpms. El sobrenedant es va recollir en un tub diferent i es va guardar a -20°C fins al moment del seu ús. La quantificació de la proteïna es va realitzar amb els reactius del *Bio-rad Dc Protein Assay* (Bio-rad Laboratories Inc, Hercules, CA) seguint el protocol descrit pel proveïdor. Tot seguit es van agafar els

volums adequats per carregar de 30 a 75 µg de proteïna i se'ls va afegir la quantitat adequada de tampó laemmli (100mM Tris HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 0,001% blau de bromofenol) en funció del volum. Es van carregar quantitats iguals de proteïna en un gel de poliacrilamida al 10% i es va resoldre l'electroforesi a 90 volts durant dues hores i mitja. El gel es va transferir a 67 mA durant 16 hores o a 350mA durant 2 hores a una membrana de *PVDF Immobilon-P* (Millipore Corp.) prèviament activada. Van bloquejar-se les unions inespecífiques submergint les membranes en una solució que contenia PBS + 0,1% Tween-20 + 3% llet descremada en pols durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació lleu. Aquestes mateixes membranes es van incubar amb els anticossos primaris tota la nit a 4°C en agitació. Les concentracions dels anticossos s'especifiquen a la taula M6. Els rentats es van fer amb PBS+0,1% Tween-20. Pels revelats es va utilitzar el substrat *Immobilon* (Millipore Corp., Bedford, MA) i les membranes es van exposar durant períodes de temps que oscil·len entre 1 segon i 30 minuts.

<b>Anticòs</b>	<b>Espècie</b>	<b>Dilució</b>	<b>Casa comercial</b>
p-smad 2	Conill	1/1000	Cell signaling
AR	Conill	1/500	Santa Cruz
β-catenina	Ratolí	1/1000	BD
β-tubulina	Conill	1/2000	Santa Cruz
α-actina	Conill	1/2000	Abcam
ABCG2	Ratolí	1/100	eBioscience

**Taula M6:** Relació d'anticossos utilitzats per transferència *western*.

### 3.12. Bioinformàtica

Per a la cerca d'informació bioinformàtica es van utilitzar les bases de dades del National Center for Biotechnology Information (*NCBI*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Per a la recerca de seqüències de DNA i RNA es van utilitzar les bases de dades Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>) i *AceView* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/AceView>).

Per a contrastar o comparar seqüències es va utilitzar el *Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

Per a la recerca bibliogràfica es va utilitzar el *Pubmed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed>).

També es van utilitzar les bases de dades de l'*Institut Europeu de Bioinformàtica*, *EMBL-EBI* (<http://www.ebi.ac.uk>) i les del *Genecards* del *Weizmann Institute of Science* (<http://www.genecards.org/>).

Per a la cerca de regions promotores, primers exons alternatius i illes CpG es va utilitzar l'*EMBOSS CpGReport* (European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute, *EMBL-EBI*, <http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot>), el *FirstEF* (Cold Spring Harbor Laboratory, <http://rulai.cshl.org/tools/FirstEF>), el *Promoter 2.0* (Center for Biological Sequence Analysis, BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark, <http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter>) i el *Proscan v1.7* (Bioinformatics and Molecular Analysis Section, Center for Information Technology; *NIH*, <http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan>). Pel que fa al disseny d'alguns encebadors amb modificacions pel tractament amb bisulfit es va utilitzar el *BiSearch* (<http://bisearch.enzim.hu>), de l'*Institute of enzymology* (la resta d'encebadors es van dissenyar manualment).

### 3.13 Anàlisi estadística

Per a l'anàlisi estadística es va fer ús del *software* estadístic *SPSS 11.0* (*Statistical Package for Social Science*, Inc., Chicago, IL).

En el cas de l'estudi de les diferències entre els percentatges d'SP al moll d'os del grup d'animals amb tumor vers els que no en portaven, el percentatge d'SP al moll d'os dels animals es va considerar com una variable numèrica dependent i contínua dividida

en dos grups (els animals que duïen tumor i els que no). Com que no es va assumir que les dades presentessin una distribució normal es va aplicar el test de la U de Mann-Whitney, amb un nivell de significació de  $p \leq 0,05$ .

Pel que fa a l'estudi de les diferències entre la quantitat de RNA en el mateix número d'*SP* i no *SP* separades es va aplicar una anàlisi de la variància en blocs (atès que es van fer dos experiments diferents de sis extraccions cada un i se sospitaven diferències en els rendiments de les extraccions de cada dia) i per tant es va fer una ANOVA.

Quant a l'anàlisi de les diferències entre la incorporació de BrdU dels clons tractats amb SB431542 i no tractats es va realitzar un test de Wilcoxon i es va requerir una  $p < 0,05$  per a la significació.

L'anàlisi de les diferències entre les mitjanes dels valors obtinguts de la raó densitomètrica de les bandes de PCR per *ABCG2* i *L19* es va fer utilitzant un t-test per dades aparellades, i es va requerir una  $p < 0,05$  per a la significació.

L'anàlisi primària dels *microarrays* va ser encarregada i duta a terme a la Unitat d'Estadística i Bioinformàtica de l'Institut de Recerca de Vall d'Hebron.

