

## **MATERIAL I MÈTODES.**

**Lloc i infraestructura.**

L'activitat s'ha desenvolupat a dos llocs diferents: el Departament de Càncer i Metàstasis de l'Institut de Recerca Oncològica, a l'Hospital Duran i Reynals, i al Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital de Bellvitge - Prínceps d'Espanya, ambdós a l'Hospitalet de Llobregat.

**Melanomes humans.**

Les mostres de melanomes malignes primaris humans, provinents del Servei de Dermatologia de l'Hospital de Bellvitge, totes elles amb nivell de Breslow  $\leq 1$  mm, han estat obtingudes a partir d'especimens conservats en blocs de parafina al Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital de Bellvitge. Igualment s'ha fet amb les mostres de metàstasis cutànies i ganglionars de melanoma, i els nevi melanocítics.

**Línies tumorals de melanoma.**

Les dues línies de melanoma emprades són la A375P i la A375MM. La línia A375P (“American Type Culture Collection” ATCC CRL 1619) és obtinguda a partir d'un melanoma humà. La línia A375MM és obtinguda a partir de les metàstasis pulmonars generades per la inoculació endovenosa de la A375P, i té un major potencial metastàtic intrínsec (Kozlowski, 1984-II). Aquestes línies van ésser en el seu moment cedides amablement pel Professor Ian Hart (St Thomas Hospital Medical School, London, U.K).

**Ratolins.**

Els ratolins amb els que s'ha treballat són ratolins atímics Balb/c nude. La ubicació i activitat sobre aquests ratolins ha estat a l'Animalari de l'Institut de Recerca Oncològica. Tots els treballs amb animals d'experimentació han estat realitzats d'acord amb les normatives internacionals i nacionals que regulen l'allotjament, experimentació i cura d'animals de laboratori, seguint els criteris establerts al Decret 214/97, publicat al DOG nº 2450, del 7-8-97, pàgina 9169.

### **Valoració de l'angiogènesi als melanomes humans.**

Sobre blocs de parafina dels melanomes cutanis primaris humans, cutanis metastàtics i ganglionars metastàtics s'ha practicat la tinció d' Hematoxilina - Eosina.

Per a la millor objectivació dels vasos sanguinis als melanomes humans s'ha emprat la tinció amb *Ulex-europaeus I* (Annex I).

S'ha valorat el grau d'infiltració tumoral mitjançant el nivell de Breslow, i l'índex angiogènic desenvolupat prèviament pel nostre grup de treball, que consisteix en la raó entre el nombre de vasos a la base del tumor dividit pel nombre de vasos a la pell normal adjacent al melanoma. Per mesurar el nombre de vasos es comptabilitza com a positiu qualsevol espai vascular, qualsevol cèl.lula endotelial i qualsevol acúmulo de cèl.lules endotelials suficientment diferenciat de la resta (Marcoval , 1997).

### **Valoració de l'expressió de VEGF als melanomes humans.**

Sobre blocs en parafina dels mateixos melanomes s'ha practicat una immunotinció amb un Anticòs policlonal anti-VEGF (A-20, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) que reconeix els 20 residus d'aminoàcids de l'extrem aminoterminal del factor. La tècnica de tinció s'explica a l'Annex II.

S'ha valorat la presència o absència del factor i la intensitat de la seva presència mitjançant una escala semiquantitativa de 0 a 3, prenent com a control intern el grau d'immunotinció dels queratinocits. La quantificació ha estat com segueix: 0, no diferències en la immunotinció per al VEGF entre melanocits i queratinocits; 1 a 3, major tinció als melanocits, de forma lleugera, moderada o intensa, respectivament. S'ha comparat el grau d'immunotinció amb el grau d'angiogènesi a tots els melanomes (amb Anàlisi de Variància o la prova de Kruskal-Wallis segons correspongui), i amb el grau d'invasió als melanomes cutanis primaris amb el test exacte de Fisher. Aquells melanomes amb immunotinció negativa per al VEGF han estat rebutjats.

### **Injecció de les línies tumorals als ratolins atímics.**

Per avaluar l'efecte de la coinjecció de Matrigel sobre el creixement tumoral, 26 ratolins atímics

## MATERIAL I MÈTODES

Balb/c nude han estat inoculats ortotòpicament com segueix: 13 ratolins amb la línia A375P, 13 ratolins amb la A375MM. A cada ratolí se li han practicat dos inòculs, un a cada flanc: el primer inòcul amb la línia sola, el segon amb la línia co-injectada amb Matrigel. L'inòcul ha estat sempre de  $10^6$  cèl.lules tumorals. Els tumors desenvolupats han anat estant extirpats seqüencialment en dies determinats extraient-se aquells de diàmetre major de cada grup, i s'ha mesurat el diàmetre del tumor intervingut. Han estat rebutjats aquells que no han desenvolupat tumor. Per a la comparació de les mitjanes dels diàmetres tumorals s'ha emprat la prova de t de Student.

Per a estudiar l'angiogènesi i l'expressió de VEGF, 16 ratolins atímics Balb/c nude han estat xenoempeltats ortotòpicament amb la línia A375P, i altres 16 amb la línia A375MM. L'inòcul ha estat sempre de  $10^6$  cèl.lules tumorals. A la meitat de cada grup, la línia de melanoma ha estat co-injectada amb Matrigel. Els tumors resultants han estat intervinguts seqüencialment entre els dies 2 i 37 post-inoculació.

### **Extracció dels tumors als ratolins inoculats.**

Els tumors han anat estant extirpats seqüencialment tal i com s'explica a l'apartat previ. Cada tumor ha estat mesurat. Posteriorment els tumors són fixats en formol per als següents procediments.

### **Valoració de l'angiogènesi als tumors inoculats als ratolins.**

Sobre els tumors inclosos en blocs de parafina, s'ha practicat la tinció d'Hematoxilina - Eosina. Per a la correcta visualització dels vasos sanguinis no és possible fer-ho amb la tinció per Ulex-europaeus I, doncs aquesta tinció identifica específicament els vasos sanguinis humans i no els de ratolí. La tècnica per visualitzar els vasos sanguinis ha estat amb la tinció pel factor VIII (von Willebrand) (Annex III).

### **Valoració de l'expressió de VEGF als tumors inoculats als ratolins.**

S'ha practicat novament la immunotinció per al VEGF tal i com es descriu prèviament. La comparació del grau d'immunotinció per al VEGF amb els altres paràmetres s'ha realitzat mitjançant el test exacte de Fisher.

### **Obtenció del cDNA del VEGF en sentit i antisentit.**

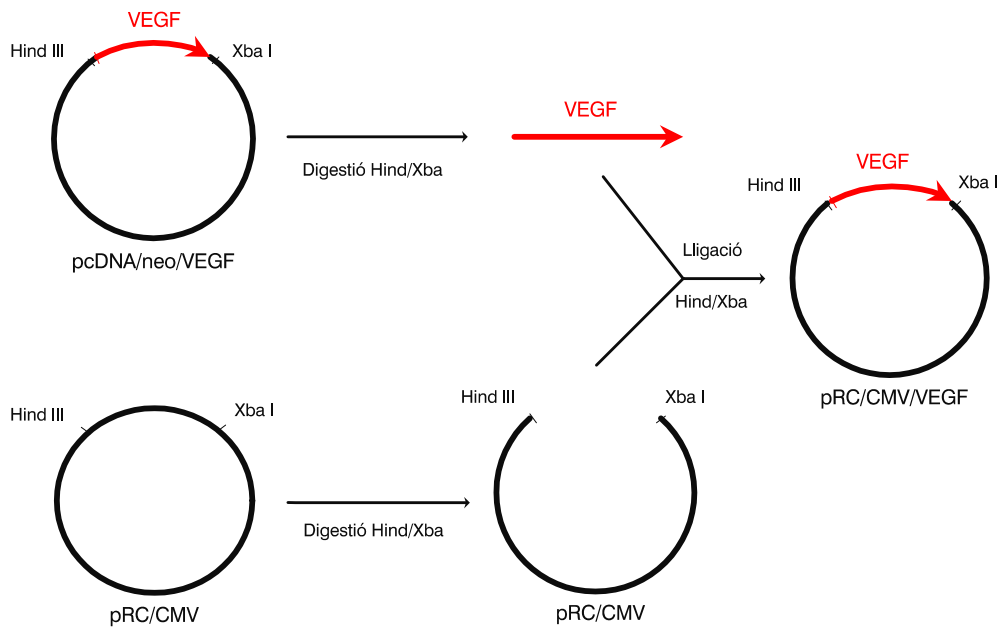
El cDNA o DNA complementari és aquell obtingut per transcripció inversa a partir del mRNA. D'aquesta manera obtenim els exons que volem i ens estalviem els introns. Hi ha diferents metodologies per introduir el cDNA del VEGF (“insert”) dintre les cèl.lules de melanoma (transfectar). Ens ha interessat fer-ho a través d'un plàsmid (vector), al que li haurem introduït prèviament l'“insert”. En el nostre cas hem construït o introduït l'insert dintre el plàsmid pRC/CMV (Invitrogen Corporation) a partir del plàsmid pcDNA/neo/VEGF, amablement cedit pel Dr. Len Seymour de la Universitat de Birmingham, tal i com s'indica a la Figura 1. En concret, l'insert es localitzava entre les dianes de restricció Hind III i Xba I dintre el pcDNA/neo/VEGF.

Es digereix d'una banda el plàsmid pcDNA/neo a nivell de Hind III i Xba I mitjançant enzims de restricció, i de l'altra es digereix igualment el plàsmid pRC/CMV per les mateixes dianes, Hind III i Xba I. Es rebutja el fragment petit del pRC/CMV i el fragment gran del pcDNA/neo. Lliguem posteriorment el fragment del pcDNA/neo/VEGF que conté el vector (amb un pes aproximat de 700 p.b.) amb el fragment del pRC/CMV, i obtenim així ja el cDNA del *VEGF en sentit* en el plàsmid que ens interessava (**pRC/CMV/VEGF**).

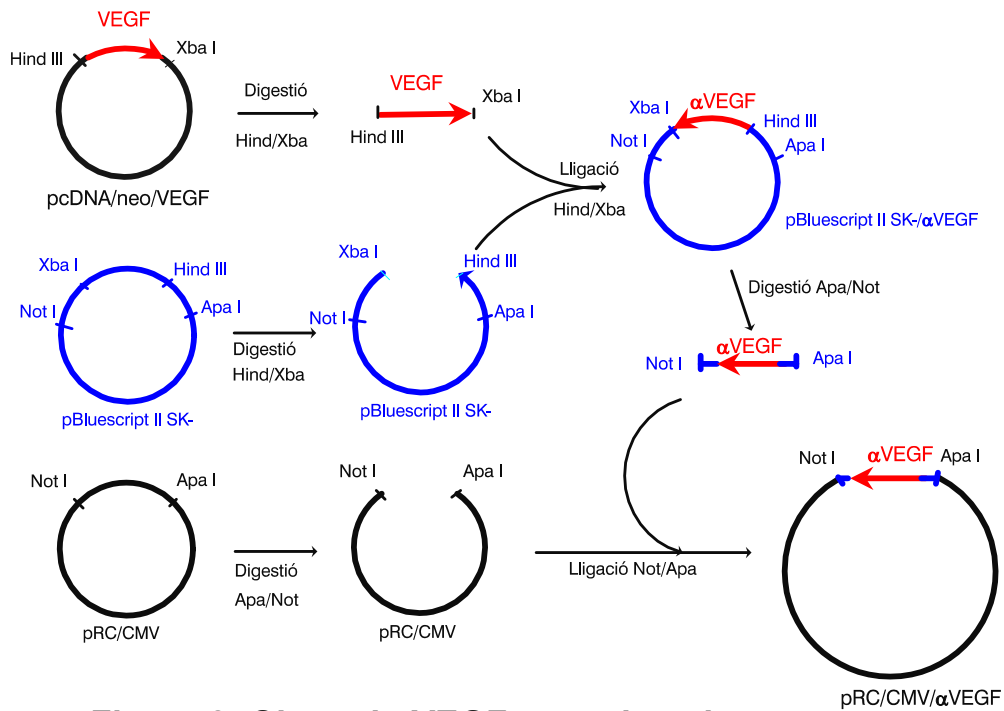
Per aconseguir el cDNA del VEGF en antisentit (Figura 2) emprarem un plàsmid, el pBluescript II SK- (Stratagene), que es caracteritza per la presència de les següents dianes de restricció que ens interessin: Apa I i Not I en la mateixa disposició que el pRC/CMV i el pcDNA/neo, i Hind III i Xba I en disposició contrària al pRC/CMV. Tant al pRC/CMV com al pBluescript II SK-, Hind III i Xba I es troben entre Apa I i Not I. Així, fem primer una digestió amb Hind III i Xba I tant del pcDNA/neo/VEGF com del pBluescript II SK-. En un segon pas, lliguem pels mateixos Hind III i Xba I el pBluescript II SK- digerit i el cDNA del VEGF alliberat, aconseguint així el cDNA del VEGF en “antisentit” integrat dintre el pBluescript II SK-. A continuació, digerim pRC/CMV i pBluescript II SK- / VEGF per Apa I i Not I. Finalment, lliguem també per Apa I i Not I el fragment pRC/CMV i el cDNA del VEGF obtinguts d'aquesta darrera digestió, i obtenim finalment així el cDNA del *VEGF en antisentit* integrat al pRC/CMV: **pRC/CMV/ $\alpha$ VEGF**.

## MATERIAL I MÈTODES

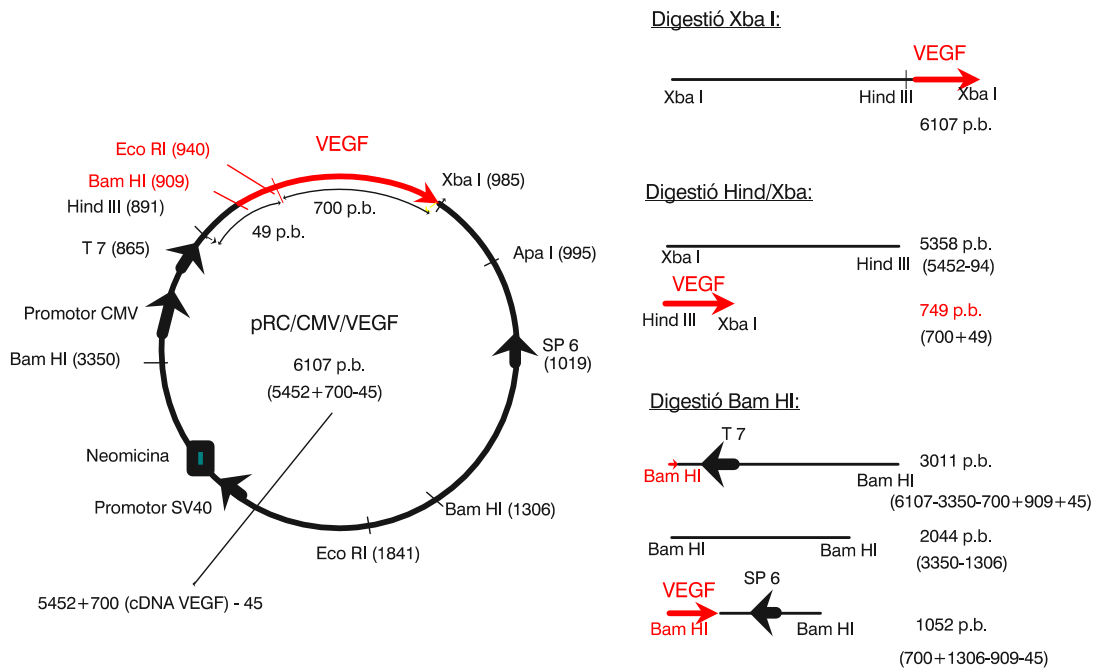
L'obtenció del cDNA del VEGF en sentit i antisentit s'esquematitzen a les Figures 1 i 2 annexes. Les Figures 3 i 4 mostren una descripció més àmplia dels plàsmids resultants, amb les posicions dels llocs que ens interessen per a les següents comprovacions. Les reaccions de digestió i lligació de nucleòtids es descriuen a l'Annex IV.



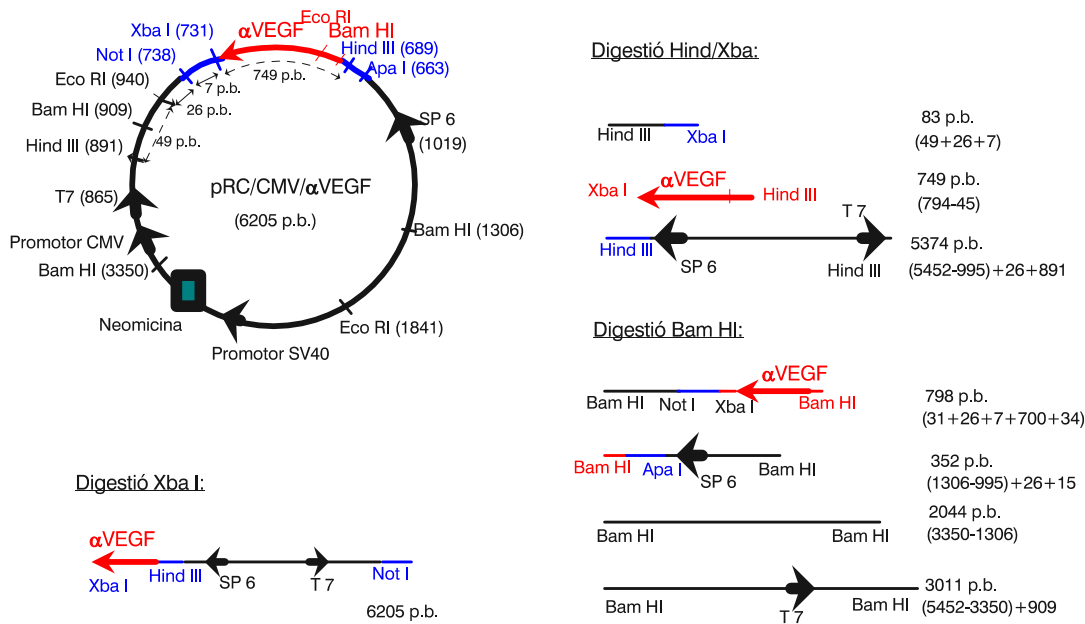
**Figura 1: Obtenció VEGF en sentit**



**Figura 2: Obtencio VEGF en antisentit**



**Figura 3: Plasmid VEGF en sentit (pRC/CMV/VEGF)**



**Figura 4: Plasmid VEGF en antisentit (pRC/CMV/αVEGF)**

**Transformació dels bacteris.**

Consisteix en la introducció dintre els bacteris del plàsmid que ens interessa.

Treballarem amb bacteris E. Coli MC 1061/P3, que són resistents a la kanamicina, i sensibles a la tetraciclina i l'ampicil.lina (Annex V).

Després del creixement tota la nit a 37°C, observem que a la placa amb ampicil.lina dels bacteris transformats (amb el plàsmid sol, i amb el plàsmid amb l'insert tant en sentit com en antisentit), han crescut unes quantes colònies, que seran les que han integrat correctament el plàsmid (Recordem que el pRC/CMV és portador del gen de la resistència a la neomicina i a beta-lactàmics), i eventualment alguna colònia que hagi patit una mutació espontània i s'hagi tornat resistent a l'ampicil.lina.

Posem a créixer unes hores en LB a 37°C aquestes colònies de bacteris transformats que han sobreviscut en la placa amb ampicil.lina.

**Extracció del plàsmid a partir del cultiu de bacteris transformats.**



Es realitza segons el protocol comercial de Promega Technical Bulletin, "Magic™ DNA purification systems" (Annex VI). El seu objectiu és aïllar el DNA plasmídic dels bacteris, per processar-lo / analitzar-lo / obtenir-lo en suficients quantitats per transfectar-lo.

Una vegada obtingut el DNA plasmídic, podem fer les comprovacions i operacions pertinents:

- mitjançant electroforesi en un gel d'agarosa, fem córrer plàsmid sense insert i plàsmid amb insert, i tenim posteriorment amb bromur d'etidi (que té afinitat per les bases nitrogenades), amb la qual cosa comprovem la presència efectiva del DNA plasmídic i deduem la presència de l'insert segons les diferents mides del DNA.

- mitjançant diverses digestions amb enzims de restricció i posterior electroforesi, comprovació de la presència de l'insert i en la posició correcta, tant en sentit com en antisentit.

- mitjançant digestions amb enzims de restricció, podem obtenir l'insert i emprar-lo com a sonda per a fer Northern blot i Southern blot.

Finalment i una vegada fetes les comprovacions, tenim el plàsmid en suficient quantitat (o sinó el podem obtenir transformant bacteris competents que tenim congelats) per a transfectar-lo a les cèl.lules de melanoma.

### **Comprovació de la presència correcta de l'insert dintre el vector.**

Una vegada hem extret els plàsmids dels bacteris tal com s'esmenta a l'apartat anterior, procedim a digerir-los amb determinats enzims de restricció.

Els fragments esperables, com es mostra a les Figures 3 i 4, seran els següents:

1.- pRC/CMV/VEGF:

- a) digestió Xba I: - un sol fragment de 6107 p.b.
- b) digestió Hind III : - un sol fragment de 6107 p.b.
- c) digestió Eco RI: - fragment de 4551 p.b.  
- fragment de 1556 p.b.

2.- pRC/CMV/ $\alpha$ VEGF:

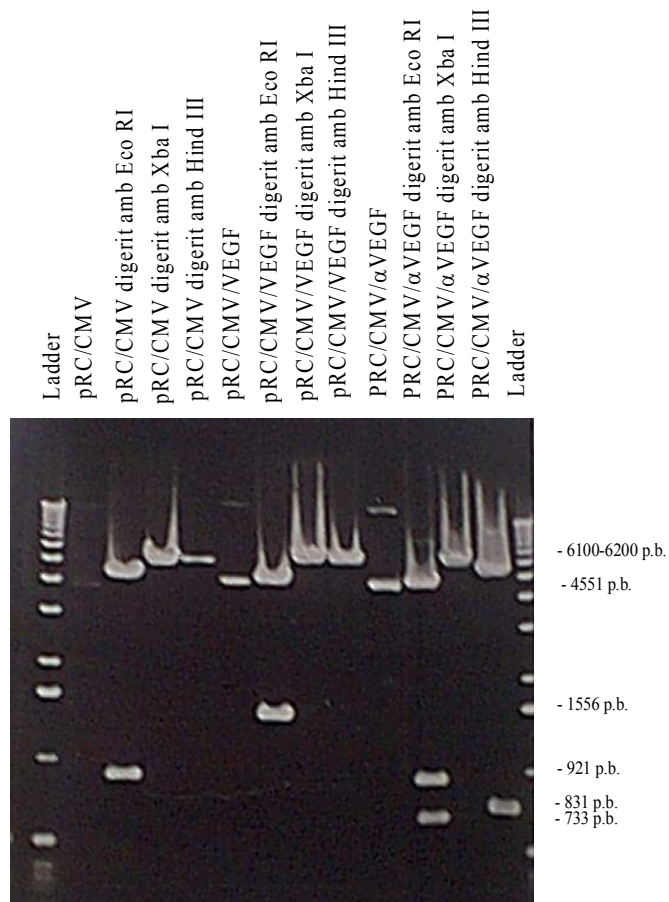
- a) digestió Xba I: - fragment de 6205 p.b.
- b) digestió Hind III: - fragment de 831 p.b.

## MATERIAL I MÈTODES

- fragment de 5374 p.b.
- c) digestió Eco RI: - fragment de 4551 p.b.
- fragment de 733 p.b.
- fragment de 921 p.b.

Les reaccions de digestió es descriuen a l'Annex IV, amb l'enzim de restricció i el tampó adequats per a cada reacció.

Una vegada feta la digestió, comprovem la presència de les bandes esperades mitjançant electroforesi en gel d'agarosa i tinció amb bromur d'etidi dels plàsmids digerits i d'un ladder guia; ho veiem a continuació:



Digestió dels plàsmids pRC/CMV, pRC/CMV/VEGF i pRC/CMV/αVEGF

**Seqüenciació.**

Cal comprovar que, a part de què estructuralment haguem col.locat bé l'insert, aquest codifiqui correctament.

Per seqüenciar emprarem el mètode de Sanger, que es basa en l'ús de terminadors específics de l'elongació de la cadena del DNA: 2'3'dideoxinucleòtids-5'-trifosfats (ddNTP). Aquests anàlegs deoxinucleòsid trifosfats es poden incorporar amb la DNA polimerasa a una cadena de DNA en formació a través dels seus grups 5'-trifosfats. Malgrat tot, com que aquests anàlegs són mancats d'un grup hidroxil en posició 3' no poden formar ponts fosfodiester amb el següent dNTP entrant, i la còpia de la cadena s'acaba quan s'incorpora un anàleg. Així, quan s'inclou a cada reacció un ddNTP específic junt als quatre dNTPs requerits per a la síntesi normal del DNA, els productes d'extensió resultants són una sèrie de cadenes de DNA discretes que s'acaben al residu dideoxi corresponent.

Per a la determinació d'una seqüència completa, es necessiten 4 reaccions, una per a cada nucleòtid (dG, dA, dT i dC). Cada mescla de reacció conté la mostra de DNA a ser seqüenciada, un encebador o "primer", fòsfor radiactiu, DNA polimerasa (Ampli Taq, CS), 7-deaza-dGTP, dATP, dTTP, dCTP i un dels 4 ddNTPs. L'extensió de la cadena del DNA sintetitzada s'atura cada vegada que incorpora un ddNTP; la incorporació selectiva dels ddNTPs produeix una població diferent de productes d'extensió per a cada nucleòtid. La població de cada reacció es pot separar per electroforesi en un gel de poliacrilamida, i analitzar després en una autoradiografia. Hem emprat el protocol Ampli Cycle<sup>TM</sup> sequencing kit - Perkin Elmer (Annex VII).

**Els liposomes.**

Per transfectar el cDNA del VEGF en sentit i antisentit a les cèl.lules de melanoma s'han emprat liposomes. Els liposomes són absorbits per les cèl.lules per endocitosi. En concret, hem emprat liposomes catiónics (Lipofectamine<sup>TM</sup> Reagent, Life Technologies) per la seva millor interacció amb el DNA (que és de càrrega negativa) i millor capacitat d'entrada a la cèl.lula (Vlassov, 1994; Capaccioli, 1993; Smith, 1993).

### **Cultius de les línies tumorals de melanoma.**

Les dues línies de melanoma emprades són la A375P i la A375MM. La línia A375P (ATCC CRL 1619) és obtinguda a partir d'un melanoma humà (Giard, 1973). La línia A375MM és obtinguda a partir de la A375P, i té un major potencial metastàtic. Ambdues línies creixen *in vitro* de forma adherent al terra dels flascons, adoptant les cèl.lules una morfologia fusocel.lular.

Les característiques per al cultiu de les cèl.lules de melanoma es descriuen a l'Annex VIII.

### **Transfecció del cDNA del VEGF en sentit i antisentit a les línies de melanoma humà A375P i A375MM mitjançant liposomes.**

D'una banda hem obtingut el plàsmid pRC/CMV amb l'insert (VEGF ó  $\alpha$ VEGF) en suficient quantitat. De l'altra, tenim ja prou cèl.lules de melanoma en cultiu, tant de la línia A375P com de la A375MM.

Procedim seguint el protocol del fabricant (Lipofectamine<sup>TM</sup> Reagent, Life Technologies) a una transfecció permanent sobre cultiu de cèl.lules adherents (Annex IX).

### **Creixement de les cèl.lules de melanoma transfectades.**

Una vegada practicada la transfecció, creixem les cèl.lules de melanoma en nombre suficient per a, en un primer temps, comprovar que la transfecció hagi estat exitosa i funcionalment correcta (mitjançant PCR, Southern blot, Northern blot i Western blot) i, en un segon terme, obtenir prou volum per inocular-les als ratolins atímics.

El medi de cultiu emprat i la tècnica ja es comenta a una secció anterior (Annex VIII), però aquí ja hi hem afegit la geneticina. La concentració de geneticina que posarem al medi serà de 500  $\mu$ g/ml. Una vegada obtingut el nombre de flascons desitjats per a cada clon cel.lular, procedirem a la seva conservació mitjançant congelació. Cada vegada que necessitem cèl.lules per a qualsevol tècnica, simplement les haurem de descongelar tal com es protocolitza (Annex VIII).

**Comprovació de la integració correcta del vector mitjançant la reacció de la cadena de la polimerasa (PCR).**

Les cèl.lules de melanoma transfectades ja creixen amb geneticina. Això és suficient per pensar que han integrat correctament el plàsmid de forma estable.

De tota manera, cal demostrar que el plàsmid segueixi tenint correctament l'insert. Això ho farem mitjançant la PCR, amb els "primers" o encebadors específics que estan localitzats a una i altra banda de l'insert dintre el plàsmid, en concret SP6 i T7 (veure esquema dels plàsmids, Figures 3 i 4). Aquests encebadors ja venen amb el pRC/CMV original (Invitrogen Corporation) i estan situats a ambdós extrems del "polylinker". Caldrà fer-ho, clar, a totes les cèl.lules transfectades, tant A375P com A375MM, tant les transfectades en sentit com en antisentit com amb el plàsmid sol. Val la pena fer notar que la PCR, a l'identificar encebadors específics del cDNA exògen, no ens identificarà el VEGF endògen.

Encabat de les PCR amb SP6-T7, sobre els resultats d'aquestes, farem una nova PCR "nested" o niuada a partir de 2 altres encebadors que estan entre SP6 i T7, dintre l'insert: F i R2. Això ens permetrà incrementar molt més el resultat en quantitat i en especificitat fent-lo ben visible al tenyir, doncs la PCR sobre tot el DNA cel.lular íntegre moltes vegades és difícil d'interpretar. En concret, l'encebador R2 és a l'exó 8 del cDNA del VEGF, i l'encebador F és a l'exó 3. Els encebadors F i R2 són de la casa Pharmacia Biotech.

La tècnica de la PCR es troba descrita a l'Annex X.

Pesos esperables de les bandes amb la PCR (Figures 3 i 4):

1.- pRC/CMV/VEGF:

- PCR SP6-T7:  $(940-865) + 700 + 10 + (1019-995) = 809$  p.b.

- PCR "nested" o niuada F-R2: 426 p.b.

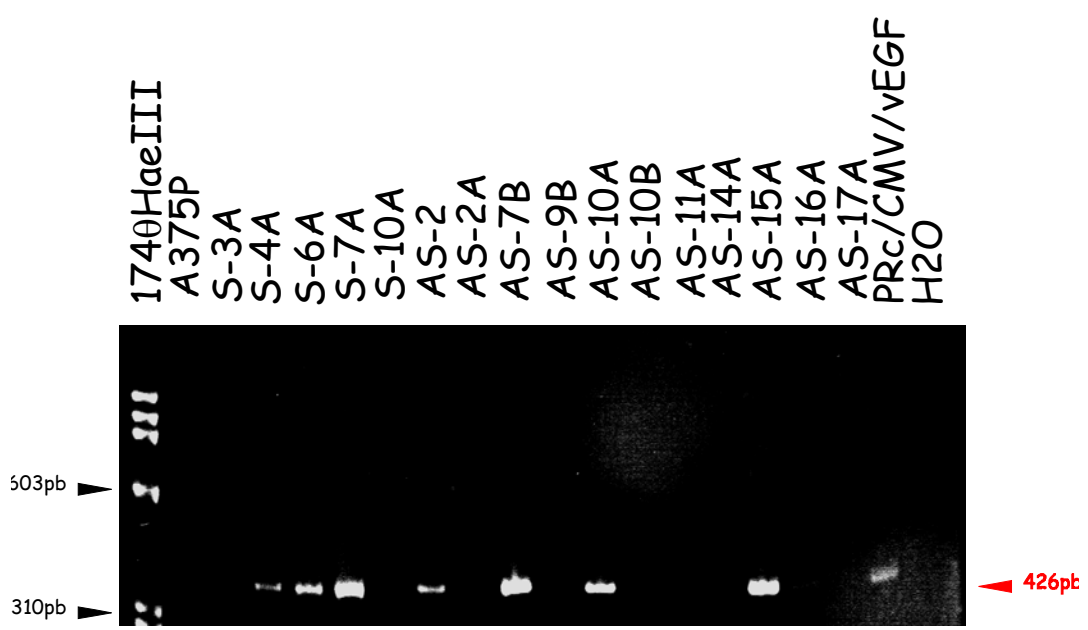
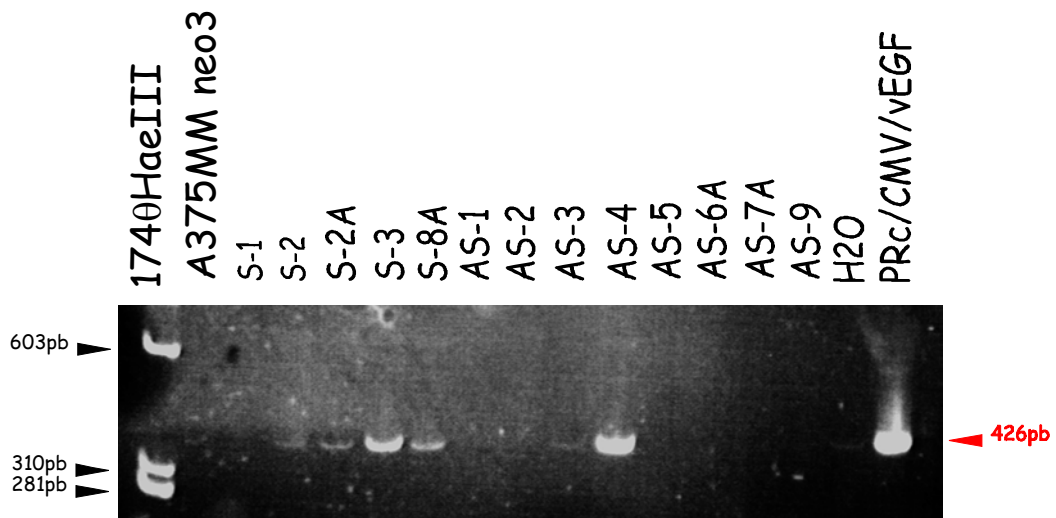
2.- pRC/CMV/ $\alpha$ VEGF:

- PCR SP6-T7:  $(940-865) + 26 + 7 + 749 + (689-663) = 883$  p.b.

- PCR niuada F-R2: 426 p.b.

3.- pRC/CMV control:

- no hi ha VEGF; així, la PCR niuada no sortirà, ha de ser SP6-T7 i prou. La banda esperada serà:  $2325 - 2171 = 154$  p.b.



PCR niuada (“nested”) per seleccionar els clons.

**Comprovació de la integració estructural correcta del DNA de l'insert a les cèl·lules de melanoma transfectades mitjançant Southern blot. Identificació dels clons de melanoma que tinguin transfectat l'insert de forma episòmica.**

Es procedeix a l'extracció del DNA (Annex XI) dels “pellets” o precipitats cel·lulars dels diferents clons. Es practica encabat Southern blot sobre les mostres de DNA extret seguint el protocol (Annex XII).

Comparant els revelats dels Southern blots dels DNAs dels diferents clons de melanoma transfectats ens farem una idea de la presència del DNA transfectat, i ens servirà per triar les colònies amb el plàsmid insertat de forma adequada: existeix la possibilitat que la transfecció, tot i que correcta, no hagi integrat el DNA exògen al DNA del nucli, sinò que estigui fora d'aquest, per exemple al citoplasma, o al mateix nucli però no junt al DNA endògen (DNA episòmic). La presència del DNA transfectat en forma episòmica pot conduir a la seva absència a les futures generacions cel·lulars.

Per identificar i descartar els clons amb el DNA episòmic, procedirem de la següent manera:

- Southern blot del plàsmid amb l'insert, tant en sentit com en antisentit, digerit amb Hind III/XbaI, amb Bam HI i amb Xba I.
- Southern blot del DNA dels clons de melanoma transfectats, també digerits amb Hind III/XbaI, Bam HI i Xba I.

Ens hem de trobar els següents resultats:

- digestió Hind III i Xba I: ens aïlla la banda del VEGF insertat, que pesarà uns 700 parells de bases, i ha de ser present tant al plàsmid com al DNA cel·lular.
- digestió Xba I: la digestió del plàsmid + l'insert ha de donar un fragment d'un pes determinat. La digestió del clon cel·lular ha de donar un fragment de pes diferent, el que voldrà dir que el plàsmid s'ha integrat al DNA cel·lular. Si el plàsmid no s'hagués integrat al DNA cel·lular (per tant seria DNA episòmic), el Southern blot del clon cel·lular digerit amb Xba I donaria un

## MATERIAL I MÈTODES

fragment idèntic al del plàsmid digerit amb Xba I.

- digestió Bam HI: la digestió amb un tercer enzim permet descartar l'eventual casualitat que el DNA s'hagués integrat correctament però que al digerir amb Xba I donés un fragment idèntic al del plàsmid digerit també amb Xba I, cosa ja d'entrada poc probable.

Els resultats d'aquestes digestions sobre el plàsmid amb l'insert, atenent a l'esquema del que disposem (Figures 3 i 4), seran com segueix (s'indica només el fragment que conté el cDNA del VEGF, que és el que serà identificat al Southern Blot):

a) digestió Hind III / Xba I:

- pRC/CMV/VEGF: fragment de 749 p.b.
- pRC/CMV/ $\alpha$ VEGF: fragment de 749 p.b.

b) digestió Xba I:

- pRC/CMV/VEGF: fragment de 6107 p.b.
- pRC/CMV/ $\alpha$ VEGF: fragment de 6205 p.b.

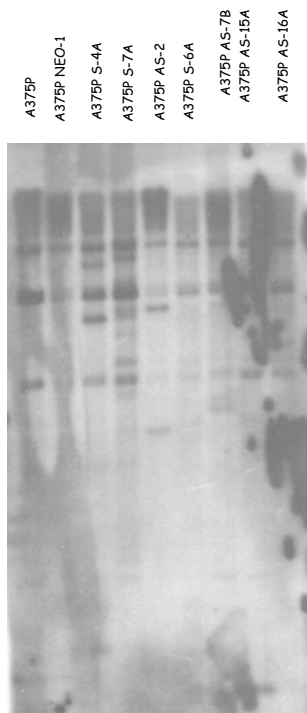
c) digestió Bam HI:

- pRC/CMV/VEGF: fragment de 1052 p.b.
- pRC/CMV/ $\alpha$ VEGF: fragment de 798 p.b.

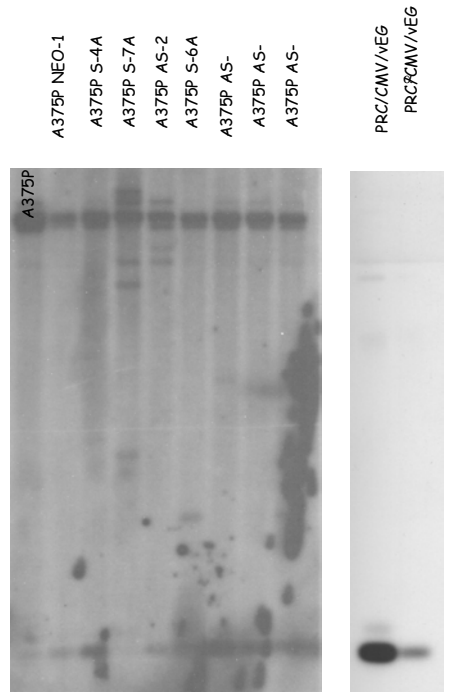
A les planes següents trobem els revelats dels Southern blots, que ens seleccionaran aquells clons que ens interessin.



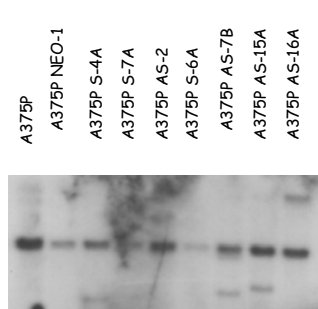
DIGESTIO Bam HI



DIGESTIO Hind III / Xba I

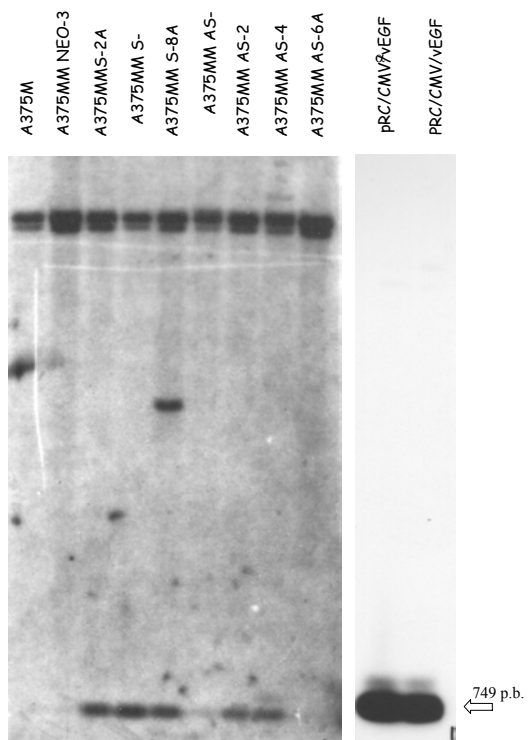


DIGESTIÓ Xba I

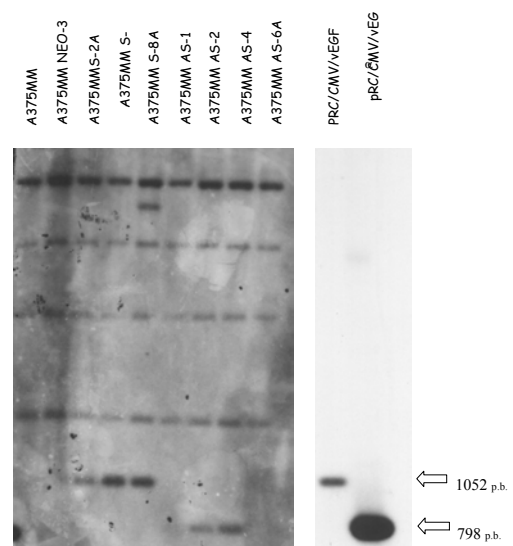


# MATERIAL I MÈTODES

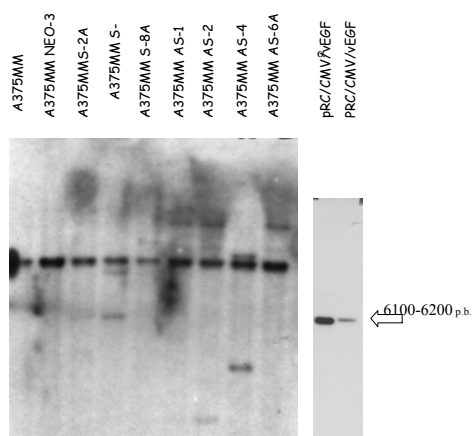
## DIGESTIÓ Hind III / Xba I



## DIGESTIÓ Bam HI



## DIGESTIÓ Xba I



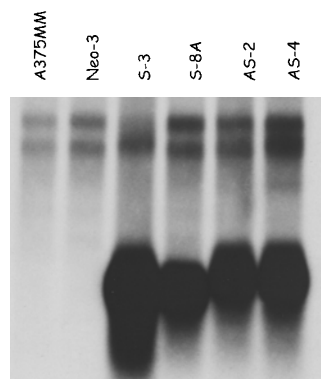
**Comprovació de la transcripció correcta de l'insert a les cèl.lules de melanoma transfectades mitjançant Northern blot.**

Es practica l'extracció del mRNA segons el protocol de Becton-Dickinson (Annex XIV), i es procedeix a la pràctica de Northern blot per comprovar la diferent expressió de mRNA entre els diferents clons (Annex XV).

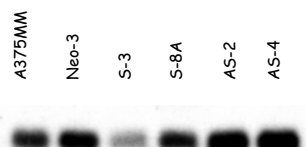
Al revelar, comparem l'expressió de mRNA entre els diferents clons, i triem aquells que més mRNA produeixin per treballar-hi. Per a escollir el control, triarem qualsevol clon que produeixi el VEGF endògen. Hibridarem també amb una sonda GADPH com a control, per comprovar que la càrrega de RNA sigui equivalent a totes les mostres i que no estigui degradat (el GADPH és present a tots els tipus cel.lulars).

NORTHERN BLOT A375MM

HIBRIDACIÓ VEGF

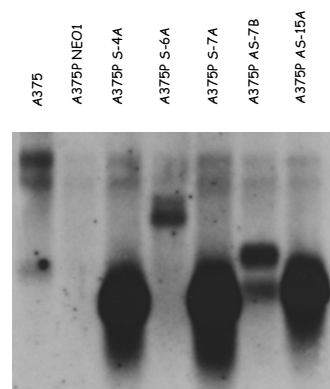


HIBRIDACIÓ GADPH

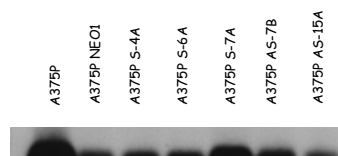


NORTHERN BLOT A375P

HIBRIDACIÓ VEGF



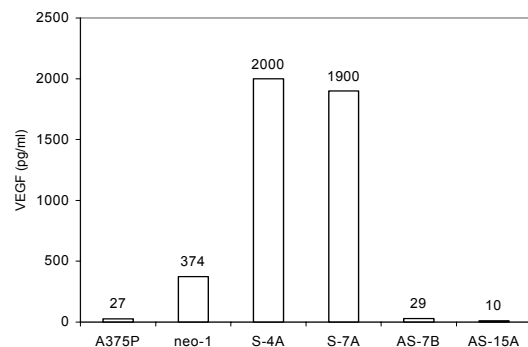
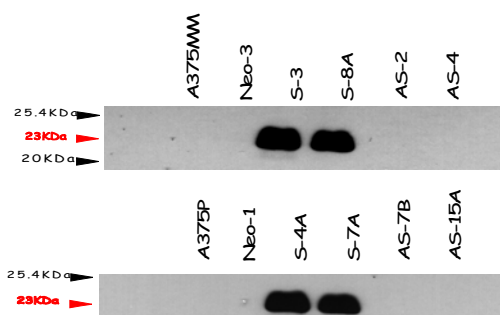
HIBRIDACIÓ GADPH



**Demostració de la producció a nivell proteic del VEGF transfectat mitjançant Western blot.**

La tècnica ha estat practicada sobre el medi condicionat extret directament dels cultius de les cèl.lules de melanoma, doncs al fer-la sobre les cèl.lules sortia repetidament negativa degut a la baixa concentració relativa del factor en els lisats proteics dels precipitats cel.lulars. El Western blot ha estat practicat sobre el medi condicionat dels cultius de cèl.lules de melanoma tant al 50% com al 100% de confluència (al 100% de confluència trobarem major quantitat de proteïnes en el medi). L'extracció de proteïnes del medi condicionat s'explica a l'Annex XVI. Encabat procedim a fer el Western blot (Annex XVII).

Com que el Western blot només ha pogut detectar la presència de VEGF als clons amb la transfecció en sentit, s'ha practicat fora de la nostra institució (gentilesa del Dr Francisco Jesús González, del Departament d'Oncologia Mèdica de l'Hospital Clínic Universitari, de Màlaga) la tècnica d'ELISA sobre una de les línies, la A375P, per demostrar una diferència quantitativa real en la producció del factor.



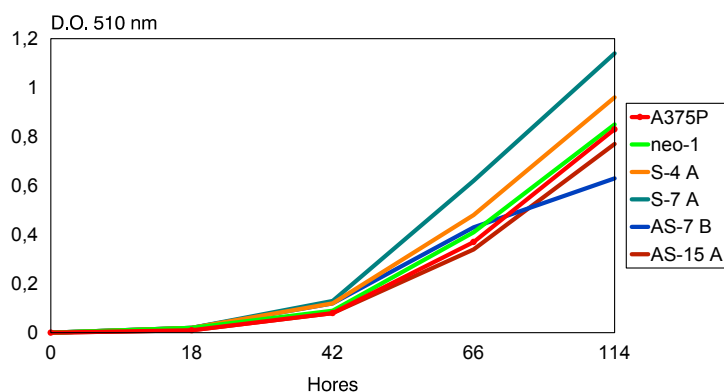
Es demostra així amb ambdues tècniques que la transfecció en sentit genera gran quantitat de VEGF a nivell proteic, i amb la tècnica d'ELISA que efectivament la transfecció en antisentit inhibeix la producció del factor molt per sota del control (neo-1).

### Corba de creixement *in vitro* de les línies de melanoma transfectades.

La introducció de material genètic estrany dintre una cèl.lula modifica el seu genoma. Aquesta modificació podria suposar per a la cèl.lula un canvi de la seva pròpia capacitat proliferativa, tant de forma positiva com negativa. Cal comprovar *in vitro* que les nostres transfeccions no hagin modificat la capacitat proliferativa de les línies abans d'inocular-les *in vivo*. Per a fer-ho s'han emprat dues metodologies diferents: incorporació de timidina tritiada i corba de biomassa per SRB. A l'annex XVIII s'hi descriu la tècnica. S'exemplifica a continuació els resultats trobats amb la corba de biomassa per SRB (Gràfics 1 i 2 i Taules 1 i 2), restant demostrat doncs que no s'ha modificat la corba de creixement *in vitro* amb les transfeccions practicades.

#### Corba creixement *in vitro* A375P

SRB (biomassa)



Corba creixement in vitro A375MM

Temps (hores)	Clon	Mesura 1 DO 510 nm	Mesura 2 DO 510 nm	Mesura 3 DO 510 nm	Mitjana medicions	Desviació standard
18	A375P	0,011	0,004	0,003	0,01	0
18	neo-1	0,017	0,013	0,029	0,02	0,01
18	S-4 A	0,024	0,025	0,016	0,02	0
18	S-7 A	0,021	0,028	0,025	0,02	0
18	AS-7 B	0,013	0,022	0,015	0,02	0
18	AS-15 A	0,007	0,004	0,009	0,01	0
42	A375P	0,067	0,085	0,074	0,08	0,01
42	neo-1	0,075	0,121	0,086	0,09	0,02
42	S-4 A	0,113	0,138	0,12	0,12	0,01
42	S-7 A	0,108	0,137	0,133	0,13	0,02
42	AS-7 B	0,117	0,119	0,109	0,12	0,01
42	AS-15 A	0,101	0,079	0,06	0,08	0,02
66	A375P	0,34	0,407	0,357	0,37	0,03
66	neo-1	0,341	0,448	0,43	0,41	0,06
66	S-4 A	0,499	0,468	0,478	0,48	0,02
66	S-7 A	0,549	0,853	0,468	0,62	0,2
66	AS-7 B	0,425	0,482	0,387	0,43	0,05
66	AS-15 A	0,358	0,376	0,272	0,34	0,06
114	A375P	0,855	0,837	0,804	0,83	0,03
114	neo-1	0,852	0,847	0,855	0,85	0
114	S-4 A	0,964	0,994	0,927	0,96	0,03
114	S-7 A	1,106	1,178	1,125	1,14	0,04
114	AS-7 B	0,622	0,664	0,604	0,63	0,03
114	AS-15 A	0,963	0,669	0,682	0,77	0,17

DO: Densitat Òptica

Clon	Mitjanes			
	18 hores	42 hores	66 hores	114 hores
A375P	0,01	0,08	0,37	0,83
neo-1	0,02	0,09	0,41	0,85
S-4 A	0,02	0,12	0,48	0,96
S-7 A	0,02	0,13	0,62	1,14
AS-7 B	0,02	0,12	0,43	0,63
AS-15 A	0,01	0,08	0,34	0,77

Taula 1: Corba de creixement A375P per SRB (biomassa)

Temps (hores)	Clon	Mesura 1 DO 510 nm	Mesura 2 DO 510 nm	Mesura 3 DO 510 nm	Mitjana medicions	Desviació standard
18	A375MM	0,146	0,209	0,188	0,179	0,032
18	neo-3	0,139	0,154	0,155	0,149	0,009
18	S-3	0,12	0,138	0,135	0,131	0,01
18	S-8 A	0,147	0,113	0,109	0,122	0,021
18	AS-2	0,165	0,165	0,159	0,163	0,003
18	AS-4	0,152	0,154	0,151	0,152	0,002
42	A375MM	0,454	0,518	0,469	0,48	0,033
42	neo-3	0,496	0,496	0,454	0,482	0,024
42	S-3	0,436	0,434	0,433	0,434	0,002
42	S-8 A	0,338	0,343	0,341	0,341	0,003
42	AS-2	0,465	0,464	0,523	0,483	0,034
42	AS-4	0,382	0,464	0,462	0,434	0,047
66	A375MM	0,92	1,058	1,003	0,992	0,069
66	neo-3	0,87	0,896	0,854	0,873	0,021
66	S-3	0,874	0,883	0,809	0,855	0,04
66	S-8 A	0,681	0,719	0,657	0,685	0,031
66	AS-2	0,863	0,912	0,916	0,897	0,03
66	AS-4	0,716	0,919	0,886	0,835	0,109
114	A375MM	1,369	1,515	1,541	1,473	0,093
114	neo-3	1,582	1,55	1,589	1,574	0,021
114	S-3	1,539	1,539	1,491	1,523	0,028
114	S-8 A	1,569	1,468	1,409	1,481	0,081
114	AS-2	1,627	1,573	1,437	1,544	0,098
114	AS-4	1,391	1,705	1,451	1,51	0,167

DO: Densitat Òptica

Clon	Mitjanes			
	18 hores	42 hores	66 hores	114 hores
A375MM	0,179	0,48	0,992	1,473
neo-3	0,149	0,482	0,873	1,574
S-3	0,131	0,434	0,855	1,523
S-8A	0,122	0,341	0,685	1,481
AS-2	0,163	0,483	0,897	1,544
AS-4	0,152	0,434	0,835	1,51

Taula 2: Corba de creixement A375MM per SRB (biomassa)

**Injecció de les línies tumorals transfectades als ratolins atímics.**

Treballem altra vegada sobre ratolins atímics Balb/c nude. La quantitat de cèl.lules tumorals ha de ser de  $10^6$  cèl.lules per inòcul. Es practica injecció ortotòpica (intradèrmica / subcutània). S'han agafat 50 ratolins atímics Balb/c nude, i s'han dividit en gàbies de 5 ratolins cadascuna.

A les 5 primeres gàbies es treballa amb la línia de melanoma humà A375P ja esmentada abans com segueix:

- gàbia A: grup control, amb injecció d'un clon de la línia A375P transfectada amb el plàsmid sense l'insert (A375P neo-1).
- gàbia B: grup "sentit", A375P transfectada amb un clon de cèl.lules amb el plàsmid i el VEGF en sentit (A375P S-4 A).
- gàbia C: grup "sentit", A375P transfectada amb un altre clon amb el plàsmid i el VEGF en sentit, amb transfecció diferent a la gàbia B (A375P S-7 A).
- gàbia D: grup "antisentit", A375P transfectada amb un clon amb el plàsmid i el VEGF en antisentit (A375P AS-7B).
- gàbia E: grup "antisentit", A375P transfectada amb un clon amb el plàsmid i el VEGF en antisentit, amb transfecció diferent a la gàbia D (A375P AS-15 A).

A les següents 5 gàbies, es treballa amb la línia A375MM tal i com s'indica:

- gàbia F: grup control, amb la línia A375MM transfectada amb un clon amb el plàsmid sense l'insert (A375MM neo-3).
- gàbia G: grup "sentit", línia A375MM transfectada amb un clon amb el plàsmid amb el VEGF en sentit (A375MM S-3).
- gàbia H: grup "sentit", A375MM transfectada amb un altre clon amb el plàsmid i el VEGF en sentit, amb transfecció diferent a la gàbia G (A375MM S-8 A).
- gàbia I: grup "antisentit", A375MM transfectada amb un clon amb el plàsmid i el VEGF en antisentit (A375MM AS-2).
- gàbia J: grup "antisentit", A375MM transfectada amb un altre clon amb el plàsmid i el VEGF en antisentit, amb transfecció diferent a la gàbia I (A375MM AS-4).

A cada ratolí se li practiquen dos inòculs, de  $10^6$  cèl.lules cadascun, de la mateixa línia tumoral segons correspongui a cada gàbia, un a cada banda de l'esquena. Les inoculacions són practicades en la seva totalitat per la mateixa persona, per tal d'evitar variabilitat inter-individual. Com a control d'inoculació del nombre correcte de cèl.lules, s'efectua un recompte de cèl.lules



mitjançant cambra de Neubauer en la suspensió immediatament abans i immediatament després de la inoculació.

### **Seguiment del creixement dels tumors inoculats.**

El creixement dels tumors inoculats és controlat sempre pel mateix investigador per evitar diferències de mesura inter-individuals.

Quan els tumors assoleixin una mida considerada mínima però ja detectable a tots els ratolins, s'efectua a cada ratolí l'extracció d'un dels dos tumors inoculats per valorar l'efecte de la transfecció als primers estadis del desenvolupament tumoral.

El segon tumor ha estat deixat per a créixer fins assolir la mida de 1 · 1 cm ó equivalent, moment en el que ha estat intervingut.

### **Processament dels tumors operats.**

Tumors petits:

- s'ha mesurat el seu volum, i s'han comparat les mitjanes dels volums entre les diferents gàbies mitjançant la prova de U de Mann-Whitney.
- s'han inclòs en formalina tamponada al 10%.

Tumors grans:

- s'ha calculat la corba de creixement de volums tumorals per a cada gàbia i s'han comparat la taxa de creixement de les diferents corbes mitjançant la prova estadística t de Student.
- els tumors es processen una part en formalina al 10% per a estudi amb H & E i factor VIII i una part congelada amb Nitrogen líquid per a posterior estudi de proteïnes, RNA i DNA.

El volum tumoral es calcula a partir de la fórmula:  $\text{volum tumoral (cm}^3\text{)} = (a \cdot b^2) / 2$   
on "a" és el diàmetre major en cm i "b" el diàmetre menor en cm.

### **Mesura de la vascularització dels tumors petits.**

## MATERIAL I MÈTODES

És d'interès l'avaluació de la vascularització a les fases inicials del desenvolupament tumoral, doncs més endavant la densitat vascular és tan elevada que no és mesurable amb la nostra metodologia.

S'ha practicat la tècnica per a la tinció pel Factor VIII, que ja ha estat explicada a l'annex corresponent (III).

La densitat vascular ha estat mesurada en 3 camps de 200 augments per dos observadors independents, mitjançant el recompte en cada camp del nombre d'interseccions entre els vasos tenyits i una gradeta. Es comptabilitza com a positiu qualsevol espai vascular, qualsevol cèl.lula endotelial i qualsevol acúmulo de cèl.lules endotelials suficientment diferenciat de la resta (Marcoval, 1997). S'ha calculat la mitjana del nombre de vasos per camp per a cada ratolí i per a les diferents gàbies. Les mitjanes dels comptatges entre les diferents gàbies han estat comparades mitjançant la prova estadística d'Anàlisi de la Variància.

### **Seguiment de la supervivència dels ratolins i necròpsia.**

Després de la intervenció dels dos tumors, els ratolins han estat seguits fins a la mort natural, per metàstasis o per sacrifici als 12 mesos. S'han calculat les diferències en la supervivència entre les diferents gàbies. S'ha practicat necròpsia de tots els ratolins, fent descripció anatòmica de totes les troballes, i processant sempre els pulmons i aquelles troballes considerades patològiques.