

## **ÍNDIX**

INTRODUCCIÓ .....	4
INTRODUCCIÓ TEÒRICA.....	6
1. ÀCIDS NUCLEICS .....	7
1.1. La unitat monomèrica: el nucleòtid .....	7
1.2. DNA: model de Watson i Crick.....	12
1.3. Replicació del DNA.....	16
2. EXPRESSIÓ GÈNICA: síntesi de proteïnes.....	19
2.1. Transcripció .....	19
2.2. Traducció .....	22
2.3. Regulació de l'expressió gènica .....	26
3. PROTEÏNES .....	28
3.1. La unitat monomèrica: l'aminoàcid.....	28
3.2. Estructures .....	31
3.3. Funcions.....	35
3.4. Propietats .....	36
4. TECNOLOGIA DEL DNA RECOMBINANT .....	38
4.1. Etapes de la clonació gènica .....	38
4.2. Aplicacions .....	41
5. TUMORS .....	43
5.1. Classificació.....	44

5.2.	Origen i causes dels tumors malignes.....	48
5.3.	Conseqüències dels tumors malignes .....	49
5.4.	Un tipus de carcinoma dels teixits connectius: el fibrosarcoma.....	51
MÈTODE EXPERIMENTAL .....		53
6.	LEITAT.....	54
7.	INTRODUCCIÓ AL MÈTODE EXPERIMENTAL.....	55
8.	DESCONGELACIÓ DE LÍNIES CEL·LULARS.....	61
8.1.	Passi o subcultiu de línia.....	64
8.2.	Comptatge de cèl·lules amb cambra de Neubauer.....	66
9.	OBTENCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE PROTEÏNES: assaig d'internalització de la proteïna X en les cèl·lules HT1080 .....	71
9.1.	Extracció de proteïna X de la sembra d'HT1080 .....	74
9.2.	Electroforesi en gels de poliacrilamida en presència de SDS (SDS-PAGE) .....	76
9.3.	Transferència dels gels a una membrana de PVDF.....	86
9.4.	Immunodetecció de membranes .....	90
9.5.	Resultats i interpretació de l'assaig d'internalització de la proteïna X en les cèl·lules HT1080 .....	97
10.	BRADFORD DE LÍNIES CEL·LULARS.....	102
10.1.	Resultats i interpretació del Bradford de línies cel·lulars .....	107
11.	ASSAIGS DE VIABILITAT CEL·LULAR: Alamar Blue i MTT.....	113

11.1. Resultats i interpretació dels assaigs de viabilitat cel·lular: Alamar Blue i MTT .....	125
12. CONCLUSIONS .....	129
ANNEXOS.....	135
13. Dissolucions tampó utilitzades en el mètode experimental.....	136
14. Fitxa tècnica de la línia cel·lular tumoral HT1080.....	140
15. Interpretació d'un informe anatomopatològic d'un fibrosarcoma.....	141
16. BIBLIOGRAFIA .....	144

## **INTRODUCCIÓ**

A nivell personal, des d'un primer moment tenia clar que volia centrar el meu treball en una recerca científica i, gràcies a que se'm va oferir la possibilitat de portar a terme el mètode experimental d'aquest en el Parc Científic de Barcelona, concretament en el laboratori biomèdic *Leitat*, vaig poder gaudir del fet de treballar en un laboratori d'aquesta mena, així com de participar en l'inici d'una investigació científica real centrada en la recerca molecular de teràpies contra el càncer. En un primer moment, però, el mètode experimental del treball havia estat plantejat en l'experimentació del procés d'obtenció de proteïnes partint de la molècula de DNA i, posteriorment, continuar la recerca centrant-se en la relació d'una proteïna concreta en els processos tumorals. Degut als elevats costos que l'elaboració del procés generava, així com els amplis coneixements i experiència que requeria i la llarga durada del procés, finalment, es va optar per, únicament, centrar la recerca experimental en aquesta segona part esmentada.

Pel que fa a l'estructura del treball, doncs, consta de dues parts relacionades. Primerament, es fa una explicació teòrica centrada en el procés d'obtenció de proteïnes tant a nivell de l'organisme, des de que el DNA conté i dóna les ordres per fabricar-les, fins arribar a la pròpia obtenció, així com en la seva elaboració de manera *in vitro*, en el laboratori (tot i que finalment la recerca experimental no tracti específicament aquest tema, és necessari explicar-lo per entendre conceptes posteriors). En aquesta primera secció, també s'exposen les principals característiques dels tumors, les quals permetran entendre determinats aspectes de les cèl·lules tumorals amb les quals es treballa en la segona part del treball, així com els trets fonamentals d'un tipus de tumor que originen les cèl·lules en qüestió. Com s'ha

esmentat anteriorment, el segon bloc del treball es centra en el mètode experimental que, tal i com s'exposarà en la introducció d'aquest, pretén comprendre com una proteïna és internalitzada per les cèl·lules tumorals, permetent relacionar-la amb tumors d'elevada malignitat. Finalment, en les conclusions es fa una anàlisi dels resultats obtinguts, se'n busca una explicació i es relaciona amb els conceptes teòrics i, en els annexos, s'exposa un cas mèdic real que permet relacionar aspectes treballats en ambdues parts del treball.

# **INTRODUCCIÓ TEÒRICA**

## 1. ÀCIDS NUCLEICS

Els àcids nucleics són les biomolècules orgàniques fonamentals de les cèl·lules. Aquests tenen capacitat per emmagatzemar i expressar la informació genètica necessària per produir i mantenir un organisme viu, així com per permetre la transmissió d'aquesta informació d'una cèl·lula a les seves descendents o d'un organisme a la següent generació. Aquestes característiques són emmagatzemades a l'interior de la cèl·lula en forma de *gens*<sup>1</sup>, els quals, a més a més, contenen les instruccions per produir proteïnes, les macromolècules que participen en la majoria de les funcions cel·lulars. D'aquesta manera, els àcids nucleics poden controlar totes les funcions que dur a terme la cèl·lula. Tal i com es mostrarà a continuació, hi ha dos tipus d'àcids nucleics: *l'àcid desoxiribonucleic (DNA)* i *l'àcid ribonucleic (RNA)*, els quals presenten diferències químiques fonamentals.

### 1.1. La unitat monomèrica: el nucleòtid

Els nucleòtids constitueixen la unitat monomèrica, és a dir, el component bàsic dels dos tipus d'àcids nucleics (DNA i RNA). La seva seqüència, doncs, és fonamental en el magatzem i l'expressió de la informació genètica. Segons l'àcid nucleic al qual pertanyen, es distingeixen dos tipus de nucleòtids: els *ribonucleòtids* (pertanyents al RNA) i els *desoxiribonucleòtids* (pertanyents al DNA).

---

<sup>1</sup> Seqüència lineal de nucleòtids de la molècula de DNA que constitueix la unitat genètica i hereditària bàsica. La majoria dels gens donen lloc a proteïnes.

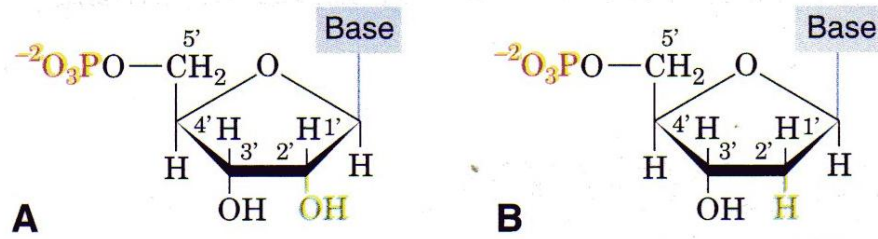


Fig. 1 Estructura química de A, ribonucleòtid i B, desoxiribonucleòtid.

Tal i com s'observa en la Fig. 1 els nucleòtids estan formats per tres components essencials: una base nitrogenada, una pentosa i un fosfat. La molècula formada per la unió covalent<sup>2</sup> dels dos primers components s'anomena *nucleòsid*.

Les *bases nitrogenades* són compostos heterocíclics<sup>3</sup> que es divideixen en *bases púriques* i *bases pirimidíniques*. Les primeres estan formades per dos anells fusionats de cinc i sis àtoms i corresponen a l'*Adenina*(A) i a la *Guanina*(G), mentre que les segones únicament estan constituïdes per un anell de sis àtoms i pertanyen a la *Citosina*(C), la *Timina*(T) i l'*Uracil*(U). La diferència bàsica pel que fa a les bases dels dos tipus d'àcids nucleics rau en aquest últim grup. Així, la Timina només és present en el DNA, mentre que l'Uracil és únicament propi del RNA.

<sup>2</sup> Tipus d'enllaç químic on dos àtoms d'electronegativitats similars i altes comparteixen un o més parells d'electrons.

<sup>3</sup> Compostos orgànics cíclics en els quals hi ha almenys un àtom diferent del carboni formant part del cicle. Els més habituals són l'oxigen, el nitrogen i el sofre.



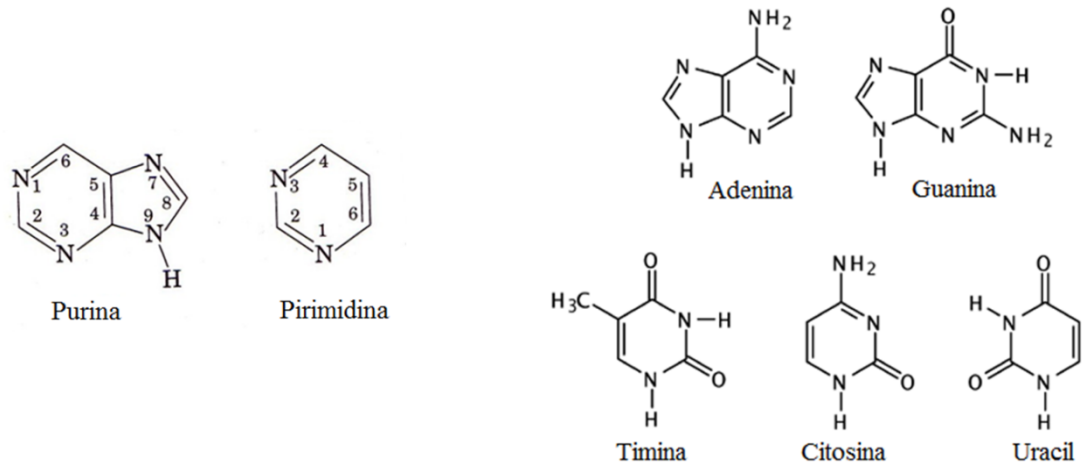


Fig. 2 A l'esquerre, estructura general dels dos tipus de bases nitrogenades. A la dreta, estructures químiques específiques de les diferents bases nitrogenades.

Degut a que els altres dos components dels nucleòtids no mostren diferències en un mateix tipus d'àcid nucleic, les bases nitrogenades li aporten l'anomenada *estructura primària*, és a dir, que la seqüència de bases nitrogenades, entesa com l'ordre i el tipus de bases que hi apareixen, són determinants en l'expressió de la informació genètica.

Pel que fa al segon component, les pentoses són glúcids, de tipus monosacàrid<sup>4</sup>, formats per cinc àtoms de carboni. Formant part dels àcids nucleics, existeixen dos tipus de pentoses: la *ribosa* i la *desoxiribosa*. La primera és la que forma part del RNA, mentre que la segona és exclusiva del DNA i en ambdós casos, tal i com es mostra a la Fig. 3, es presenten en forma heterocíclica.

<sup>4</sup> Tipus de glúcids més senzills que no es poden hidrolitzar per donar lloc a altres compostos. En la seva estructura contenen de tres a sis àtoms de carboni, grups alcohol (OH) i un grup carbonil (C=O) en posició aldehyd (en un extrem de la cadena) o cetona (al centre).

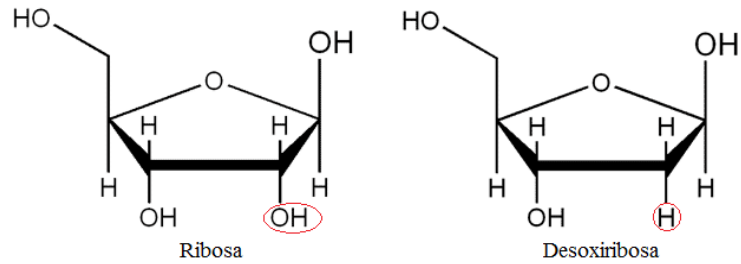


Fig. 3 Estructura de les pentoses. En vermell, grup químic que les diferencia: un hidroxil (OH) en la ribosa i un àtom d'hidrogen (H) en el cas de la desoxiribosa.

Finalment, el *fosfat* és un component comú en tots els nucleòtids dels dos tipus d'àcids nucleics.

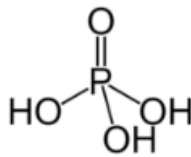


Fig. 4 Estructura química d'una molècula de fosfat en estat neutre.

La unió dels tres components dels nucleòtids es produeix de la següent manera: les bases nitrogenades s'uneixen al C1'<sup>5</sup> de la pentosa mitjançant *enllaços glucosídics*, on s'allibera una molècula d'aigua formada per la unió del grup hidroxil (OH) del monosacàrid i de la base, donant lloc al nucleòsid. La unió del nucleòsid al fosfat es produeix mitjançant *enllaços fosfomonoèsters*. A la vegada, els nucleòtids s'uneixen entre sí per *enllaços fosfodièsters*, donant lloc a cadenes ribopolinucleotídiques, en el cas que formin RNA, o desoxiribopolinucleotídiques si configuren el DNA. Aquestes cadenes polinucleotídiques resultants presenten un fosfat 5' i un grup hidroxil 3'(OH).

<sup>5</sup> Cal tenir en compte que les posicions en la pentosa es designen amb números primers per distingir-los de les posicions de les bases.

	DNA	RNA
<b>Composició química</b>		
Bases nitrogenades	A, T, G, C	A, U, G, C
Pentosa	Desoxiribosa	Ribosa
<b>Estructura</b>		
Tipus de cadena	Bicatenari (a excepció d'alguns virus).	Monocatenari (a excepció d'alguns virus).
Configuració	Doble hèlix	No hi ha configuracions especials (a excepció del tRNA, en forma de trèvol).
<b>Tipus</b>		
	B-DNA, A-DNA, Z-DNA	tRNA, mRNA, rRNA
<b>Localització (segons el tipus de cèl·lules)</b>		
Cèl·lula procariota <sup>6</sup>	En el nucleòide i altres DNA circulars, com els plasmidis <sup>7</sup> .	Sintetitzat directament en el citoplasma <sup>8</sup>
Cèl·lula eucariota <sup>9</sup>	En el nucli, separat per la membrana nuclear, i en els mitocondris <sup>10</sup> i els cloroplasts <sup>11</sup> .	Sintetitzat en el nucli i transportat fins al citoplasma, on realitza les funcions o bé, és traduït.
<b>Funcions</b>		
	Emmagatzemar la informació genètica, transmesa en la divisió cel·lular i d'una generació a una altra.	<i>mRNA</i> : molt important en el procés de transcripció i traducció. Permet la codificació de proteïnes.
	Les seqüències de bases contenen la informació per sintetitzar proteïnes.	<i>rRNA</i> : formació de ribosomes <sup>12</sup> , juntament amb proteïnes. Actuació en la síntesi proteica.
		<i>tRNA</i> : durant la traducció, adaptador entre el mRNA i els aminoàcids <sup>13</sup> .

Taula 1 Principals diferències entre els dos tipus d'àcids nucleics, el DNA i el RNA.

<sup>6</sup> Cèl·lules sense nucli diferenciat (nucleòide). El material genètic es troba directament al citoplasma.

<sup>7</sup> En l'apartat de tecnologia del DNA recombinant s'explica la funció d'aquest tipus de DNA circular.

<sup>8</sup> Part de la cèl·lula compresa entre la membrana plasmàtica i el nucli cel·lular, on es troben les estructures i els òrgans cel·lulars.

<sup>9</sup> Cèl·lula amb nucli diferenciat, on hi ha el material genètic separat per la membrana nuclear.

<sup>10</sup> Òrganul citoplasmàtic i esfèric, propi de cèl·lules eucariotes i responsable de la respiració cel·lular.

<sup>11</sup> Òrganul propi de cèl·lules eucariotes vegetals que conté clorofil·la i fa la fotosíntesi.

<sup>12</sup> Òrganul cel·lular que permet la síntesi de proteïnes.

<sup>13</sup> Molècula orgànica que conté un grup amino (-NH<sub>2</sub>) i un grup carboxil (-COOH). És la unitat monomèrica de les proteïnes. Aquesta informació s'amplia en l'apartat de proteïnes.

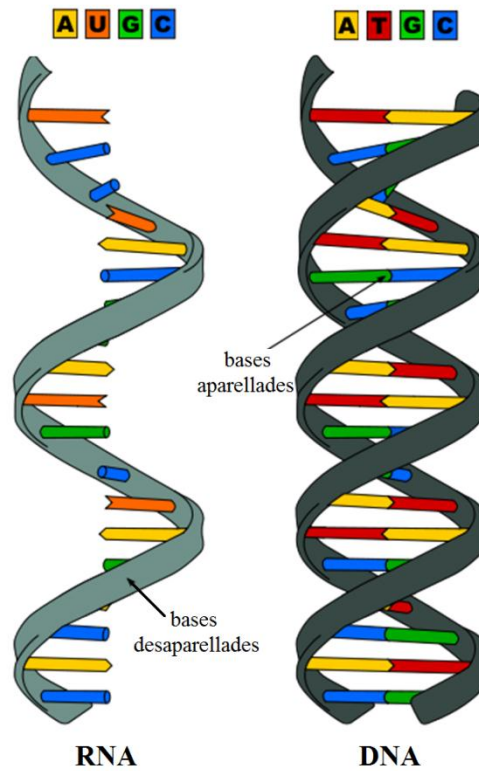
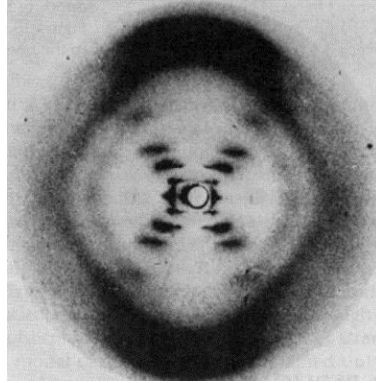


Fig. 5 Molècules de RNA i DNA.

## 1.2. DNA: model de Watson i Crick

Durant el segle XX, es va establir una “competició”, a vegades cooperativa i a vegades rival, entre investigadors d’arreu del món amb l’objectiu de determinar l’estructura del DNA. Concretament, participaven tres equips de científics: el prestigiós nord-americà Linus Carl Pauling, els anglesos Wilkins i Rosalind Franklin i els estatunidencs James D.Watson i Francis Crick. Finalment, van ser aquests dos últims, juntament amb Wilkins, els que s’endugueren el premi Nobel en fisiologia o medicina l’any 1962, nou anys després de l’eminent descobriment. R. Franklin, qui morí abans de l’entrega del premi, fou qui utilitzà la tècnica de difracció de raigs X que seria essencial per formular la hipòtesis de J.D.Watson i F.Crick de l’estructura en doble hèlix del DNA.



*Fig. 6 Imatge de difracció de raigs X del DNA on la forma en creu permet intuir la configuració en doble hèlix. Fou presa per Rosalind Franklin l'any 1952.*

Tal i com determina el model de Watson i Crick, doncs, el DNA es caracteritza per tenir forma de *doble hèlix*, formada per dues cadenes de desoxiribopolinucleòtids (és per tant, bicatenari) enrotllades l'una sobre l'altre que giren al voltant d'un eix imaginari comú. En aquesta cohesió, les bases nitrogenades de les dues cadenes s'uneixen, mitjançant enllaços *pont d'hidrogen*, en el centre de la hèlix de manera *complementària*, és a dir, la purina Adenina d'una cadena està sempre emparellada amb la pirimidina Timina de la cadena oposada, mentre que la purina Guanina sempre s'uneix amb la pirimidina Citosina. L'organització de les bases en l'espai, doncs, configuren l'*estructura secundària* del DNA. Tal i com anteriorment havia postulat el científic Chargaff, la proporció de bases púriques en les cadenes és igual a la de bases pirimidíniques, fet que aporta a la doble hèlix un *diàmetre constant* de 2nm<sup>14</sup>. A més a més, l'hèlix és *dextrògira*, ja que gira cap a la dreta. En ella, cada parell de bases rota 36 graus respecte als parells adjacents i al voltant de l'eix imaginari. D'aquesta manera, hi ha aproximadament deu parells de bases per volta de l'espiral helicoïdal. Per altra banda, el DNA es caracteritza per presentar *direccionalitat*, donat que les dues cadenes tenen un extrem 3' i un 5' de tal manera

---

<sup>14</sup> Nanòmetre. Unitat de longitud que equival a una mil·lionèsima part d'un metre (1nm = 1x10<sup>-9</sup>m).

que, en una direcció determinada, una de les cadenes està orientada en sentit 5' a 3' i l'altra de 3' a 5', és a dir, són *antiparal·leles* (l'orientació de les pentoses per tant, és també antiparal·lela).

El prominent descobriment de Watson i Crick, doncs, permetia afirmar que la seqüència de bases nitrogenades aporta la informació hereditària a les cèl·lules i, per tant, un canvi en l'ordre de les bases pot modificar aquesta informació i transmetre's a la descendència (en el cas que afecti a les cèl·lules germinals). Aquest fenomen es coneix com a *mutació* i és el principal causant dels tumors, dels quals se'n parlarà en un apartat posterior. A més a més, deixava entreveure el possible mecanisme de replicació de la molècula, del qual també es fa esment a continuació.

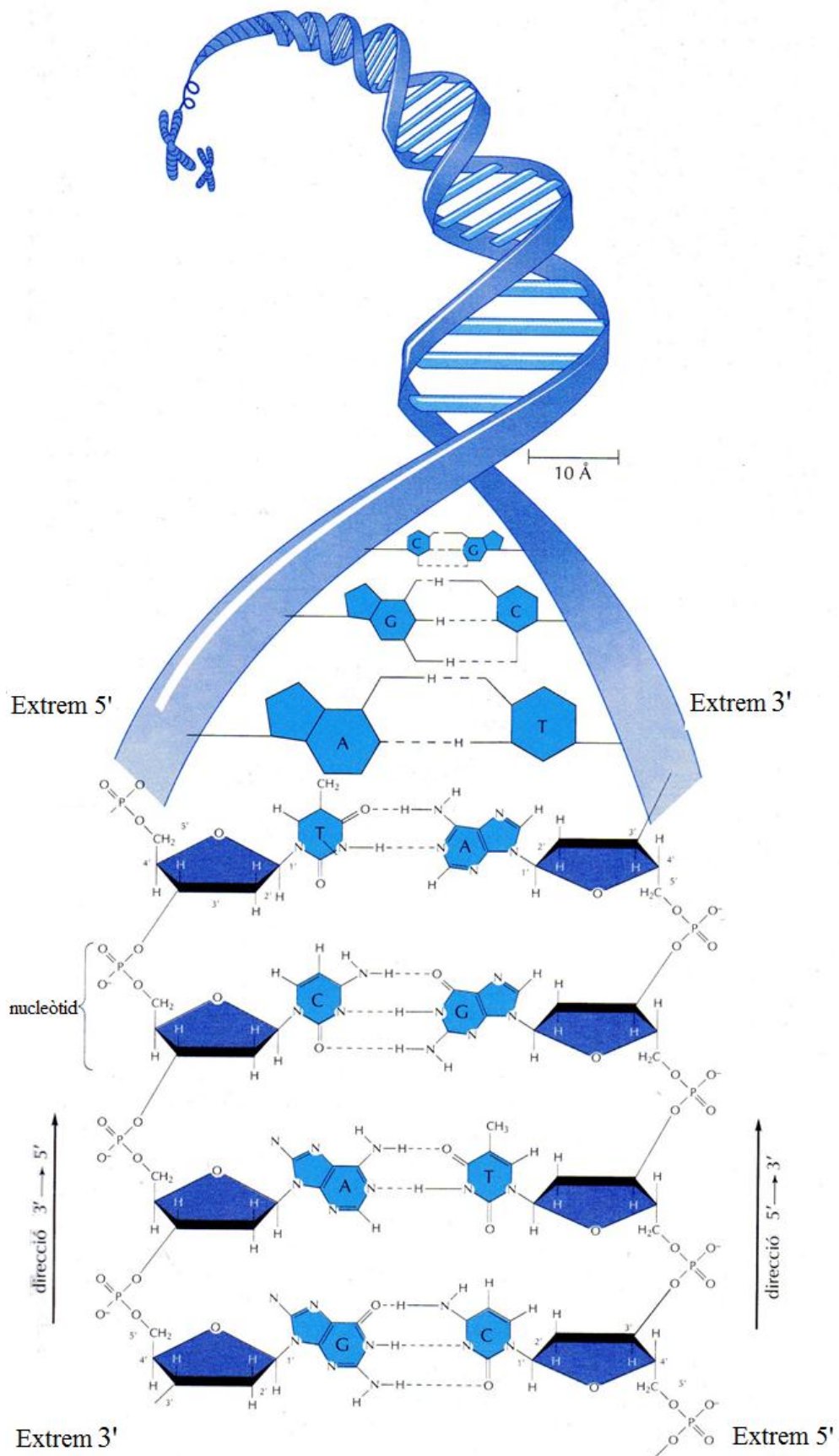


Fig. 7 Estructura del DNA. Es pot observar la disposició antiparal·lela de les cadenes i la complementarietat de bases, de les quals també en queda reflectida la seva estructura química.

El DNA es veu bàsicament sotmès a dos tipus de processos que recull el dogma central de la biologia molecular: la *replicació* i l'*expressió gènica*. Aquesta última, inclou la *transcripció* i la *traducció*, de les quals se'n parla en l'apartat següent.

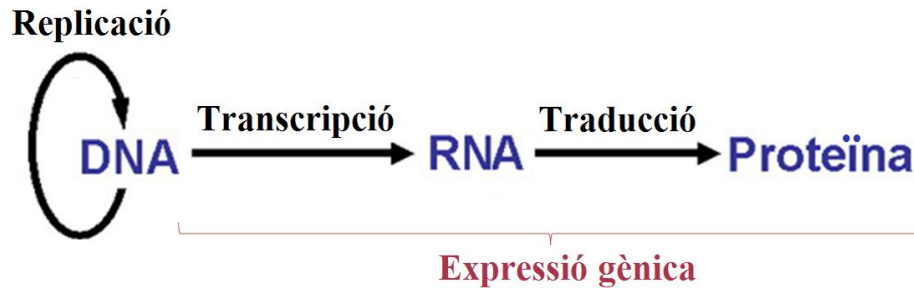


Fig. 8 Dogma central de la biologia molecular

### 1.3. Replicació del DNA

La replicació del DNA és un procés de còpia d'aquesta molècula previ a la divisió cel·lular, amb l'objectiu de transmetre la informació genètica per igual a les cèl·lules filles.

Aquest procés de replicació s'inicia amb el desenrotllament i la separació de les dues cadenes que formen la molècula de DNA, mitjançant unes proteïnes *helicases* que trenquen els enllaços pont d'hidrogen que uneixen les bases. La *DNA polimerasa* és l'enzim<sup>15</sup> encarregat de la síntesi del nou DNA. Mitjançant enllaços fosfodièsters, catalitza l'addició de nucleòtids de manera complementària i antiparal·lela a la cadena original. Per això, sempre llegeix la cadena parental en sentit de 3' a 5' i, en

---

<sup>15</sup> Molècula proteica que actua de biocatalitzador específic en cadascuna de les reaccions del metabolisme cel·lular.



canvi, l'elongació de la nova cadena es produeix en sentit contrari, de 5' a 3'. Com que la DNA polimerasa només té capacitat per sintetitzar nou DNA en un sentit, és necessari un mecanisme discontinu per polimeritzar la cadena amb sentit de 5' a 3'. Com a conseqüència d'això, en una de les cadenes, l'anomenada *cadena retardada*, es formen els fragments discontinus, anomenats *fragments d'Okazaki*, els quals, posteriorment, seran units mitjançant enllaços fosfodièsters pels enzims ligases, formant una nova cadena continua. En contraposició, la cadena sintetitzada de manera continuada és anomenada *cadena conductora*. La DNA polimerasa però, té un altre inconvenient, i és que no té capacitat d'iniciar la polimerització d'una cadena de DNA completament nova. Així doncs, la nova cadena de DNA la inicia sempre un enzim polimerasa diferent que actua d'encebador, un punt de partida a l'activitat de la DNA polimerasa. Per la cadena conductora només és necessari un encebador, mentre que la cadena retardada necessita periòdicament nous encebadors, donat que la DNA polimerasa inicia la polimerització diverses vegades. No obstant, tot i utilitzar una de les cadenes de DNA com a motlle per polimeritzar la complementària, l'encebador sintetitza una petita seqüència de RNA enlloc de DNA, fet que fa necessari el reemplaçament d'aquesta seqüència per DNA abans de finalitzar el procés. Finalment, el resultat de la replicació del DNA són dues dobles hèlixs completes (l'original i la còpia), essent les còpies idèntiques a la seqüència de la doble hèlix del DNA parental. La replicació del DNA, tal i com havien avançat Watson i Crick i posteriorment, van demostrar Meselson i Stahl, es considera *semiconservativa*, donat que les doble hèlixs filles contenen una cadena original "vella" i una completament "nova".

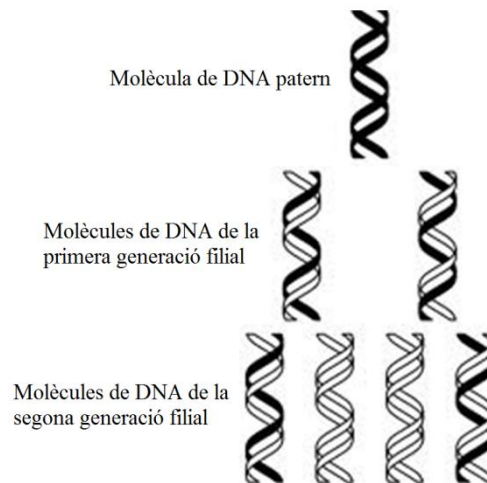


Fig. 9 Demostració de la replicació semiconservativa en dos cicles de replicació. En negre, cadenes parentals, en blanc, cadenes filles.

Durant la replicació del DNA, actuen diversos mecanismes de reparació que eviten les mutacions, tals com la comprovació que fa la DNA polimerasa de que l'aparellament de bases només s'ha produït entre A-T i G-C en sentit 5' a 3'. Com s'esmentava anteriorment, quan aquests processos no funcionen correctament en les cèl·lules somàtiques<sup>16</sup> es pot produir un tumor.

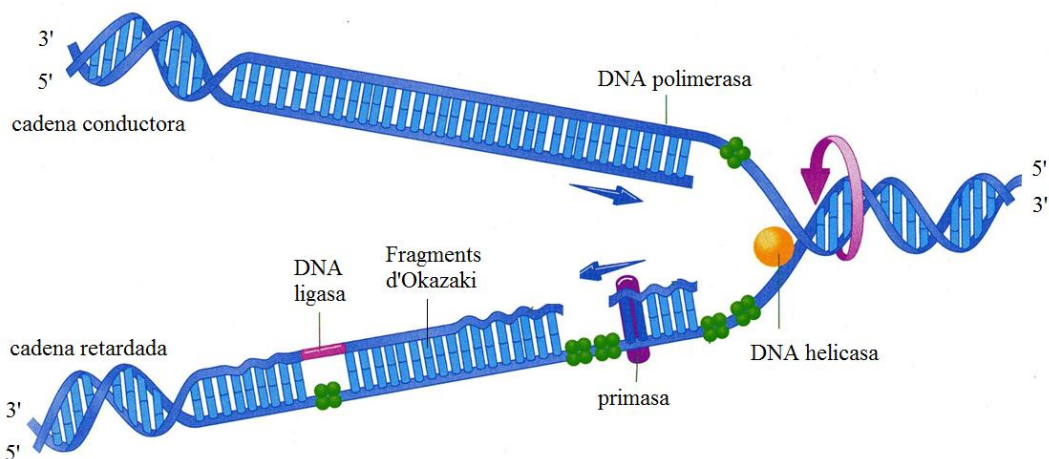


Fig. 10 Procés de replicació del DNA. En la imatge apareixen els enzims que actuen en aquest procés.

<sup>16</sup> Qualsevol de les cèl·lules de l'organisme pluricel·lular que no són cèl·lules germinals.

## **2. EXPRESSIÓ GÈNICA: síntesi de proteïnes**

Com s'ha vist fins ara, la informació genètica continguda en el DNA dirigeix la síntesi de proteïnes, determinant-ne la seva estructura i forma. Tot i així, la síntesi d'una proteïna no es produeix directament a partir del DNA, sinó que la seqüència de nucleòtids d'un gen és "copiada" en una seqüència de nucleòtids de RNA, en un procés anomenat *transcripció*. Rep aquest nom perquè, tot i que la informació s'expressa d'una forma química diferent, el llenguatge utilitzat en la "còpia" continua essent el dels nucleòtids. Posteriorment, en la *traducció*, el mRNA donarà lloc a la proteïna, és a dir, es traduirà de llenguatge de nucleòtids de RNA a aminoàcids. Ambdós mecanismes s'inclouen dins de *l'expressió gènica*.

### **2.1. Transcripció**

De la mateixa manera que en la replicació del DNA, el procés de transcripció s'inicia amb la separació i el desenrotllament d'una petita regió de DNA. Donat que en aquest cas només s'ha de transcriure una de les dues cadenes de la doble hèlix, és necessari un senyal, anomenat *promotor*, que indiqui l'inici de la transcripció. Gràcies a aquest, l'enzim *RNA polimerasa* s'uneix al DNA motlle i, llegint de 3' a 5', inicia la polimerització en sentit 5' a 3' del *transcrit*, la nova cadena de RNA. Així, la seqüència de nucleòtids del transcrit ve determinada per l'aparellament complementari de bases entre la cadena motlle i el transcrit: A-U i G-C. L'elongació de la cadena continua fins que l'enzim troba un altre senyal en el DNA que li indica la fi de la transcripció. Aquest distintiu és un *terminador* que permet a la RNA polimerasa alliberar-se del DNA i del RNA acabat de sintetitzar.

Tal i com es mostrava en la taula comparativa de DNA i RNA (*Taula 1*), la transcripció dels gens del DNA dóna lloc a diferents tipus de RNA, el *RNA missatger (mRNA)*, el *RNA ribosòmic (rRNA)* o el *RNA de transferència (tRNA)*.

Durant el procés de transcripció, la RNA polimerasa no comprova si els nucleòtids polimeritzats són els correctes. Aquesta absència de verificació de lectura és una demostració de que la transcripció no necessita ser tan precisa com la replicació del DNA, ja que el RNA no és utilitzat com a magatzem permanent d'informació genètica a la cèl·lula.

La base del mecanisme de transcripció dels gens a RNA és semblant en cèl·lules procariotes i eucariotes. No obstant, degut a la major complexitat de les últimes, existeixen diferències significatives.

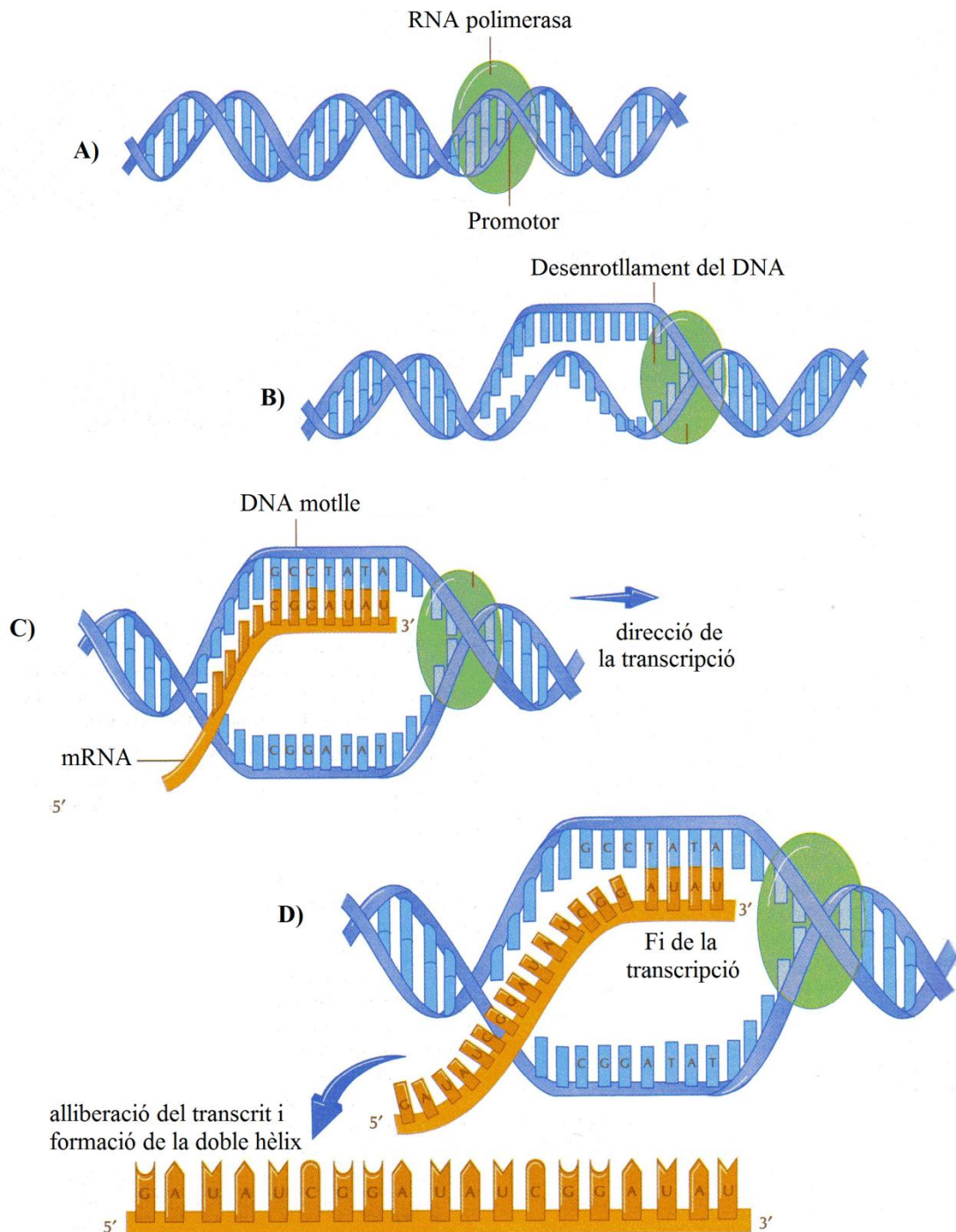


Fig. 11 (A) Unió de la RNA polimerasa al DNA pel promotor. (B) Desenrotllament de la doble hèlix. (C) Inici de la polimerització del transcrit: es col·loquen les bases de RNA complementàries i antiparal·leles a les del DNA. (D) Fi de la transcripció marcada per un terminador.

## 2.2. Traducció

Un cop obtingut el mRNA per transcripció d'un gen del DNA, la informació present en la seqüència de nucleòtids ja pot ser traduïda a aminoàcids per sintetitzar una proteïna. En el mRNA, però, només hi ha quatre tipus de nucleòtids diferents (A, U, G, C), mentre que d'aminoàcids n'hi ha vint, per la qual cosa la traducció no es pot realitzar mitjançant una correspondència directa d'un nucleòtid a un aminoàcid. La seqüència de nucleòtids, doncs, s'ha de llegir per triplets, coneguts com a *codons*. Així, alguns dels aminoàcids seran codificats per més d'un triplet perquè hi ha 64 combinacions possibles. Tres d'aquests codons són utilitzats com a senyals per interrompre la síntesis de la proteïna, els anomenats triplets de stop (UAA, UAG i UGA). Les regles de correspondència entre codons i aminoàcids es defineixen en el *codi genètic*, desxifrat a principis de la dècada del 1960. Aquest codi és universal i degenerat, ja que és igual per tots els éssers vius i alguns aminoàcids estan codificats per més d'un codó.

		Segona lletra				
		U	C	A	G	
Primera lletra (extrem 5')	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } stop UAG } stop	UGU } Cys UGC } UGA } stop UGG } Trp	Tercera lletra (extrem 3')
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	
	A	AUU } Ile AUC } AUA } Met AUG }	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	

Fig. 12 Codi genètic. Els codons (en taronja) es troben ordenats: la primera base (extrem 5') correspon a les files de l'esquerra; la segona base, a les columnes; i la tercera base (extrem 3') s'identifica per les files de la dreta, dintre de cada casella. S'observa la correspondència amb els aminoàcids (en negre), la degeneració del codi genètic i els codons de stop.

Les molècules que intervenen en la traducció són:

- RNA missatger sintetitzat en la transcripció.
- Varis RNA de transferència, els quals actuen d'adaptadors entre el mRNA i els aminoàcids.
- Ribosomes, que estan formats per una subunitat petita que s'encarrega d'enllaçar els tRNA als codons del mRNA i una subunitat gran, que catalitza la formació dels enllaços peptídics<sup>17</sup>.
- Aminoàcids, dels quals se'n parlarà específicament en l'apartat dedicat a proteïnes.
- Enzims *aminoacil-tRNA sintetases*, que faciliten la unió del tRNA a l'aminoàcid corresponent.

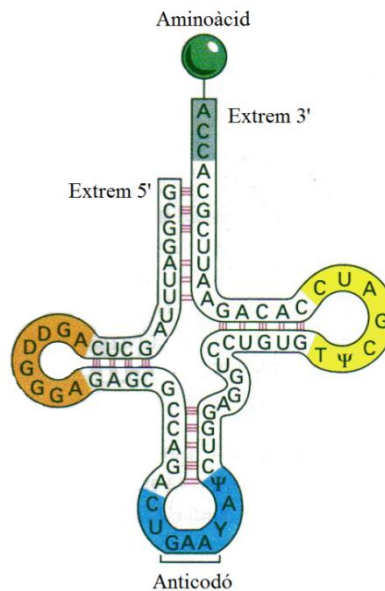


Fig. 13 El tRNA té unes regions de doble cadena que li donen forma de trèvol. Un extrem de la molècula reconeix i uneix l'aminoàcid. L'altre extrem és anomenat anticodó, que consta de tres bases complementàries al codó del mRNA, a més de permetre-li a l'enzim aminoacil-tRNA sintetasa reconèixer l'aminoàcid que li correspon al tRNA.

<sup>17</sup> Enllaços que uneixen els aminoàcids entre sí per formar la cadena polipeptídica. Aquesta informació s'amplia en l'apartat de proteïnes.

El procés de traducció s'inicia quan un enzim aminoacil-tRNA sintetasa carrega un aminoàcid al tRNA. En les cèl·lules eucariotes l'aminoàcid inicial és sempre la Metionina. Paral·lelament, es forma l'associació de la subunitat petita del ribosoma al mRNA per l'extrem 5' d'aquest i, seguidament, també s'uneix la subunitat gran. A partir d'aquí, la unió del mRNA i un tRNA es produeix tenint en compte que el codó del primer és complementari a l'anticodó del segon. En el cas de la Metionina, per exemple, el codó d'inici del mRNA és AUG i l'anticodó complementari del tRNA, UAC. La cadena es va elongant a mida que el ribosoma es desplaça per la molècula de mRNA i es van traduint un a un els codons d'aquest a aminoàcids. Les posicions que ocupa el tRNA en cada moment de l'elongació depenen dels tres llocs que tenen els ribosomes: lloc A (*aminoacil*), lloc P (*peptidil*) i lloc E. El primer representa el punt d'entrada dels tRNA carregats amb els aminoàcids, el segon és on se situa la cadena polipeptídica en formació i l'últim, és la sortida del tRNA ja descarregat. La cadena polipeptídica en creixement es va plegant mentre és sintetitzada, fins que el ribosoma es troba amb un codó de stop. Aquest no és reconegut per cap tRNA i no especifica cap aminoàcid. Amb l'ajuda d'altres proteïnes, els *factors d'alliberació*, que s'uneixen al codó de stop, s'atura la formació dels enllaços peptídics, de manera que la proteïna ja complerta s'allibera al citoplasma. El ribosoma se separa del mRNA i se'n dissocien les dues subunitats.



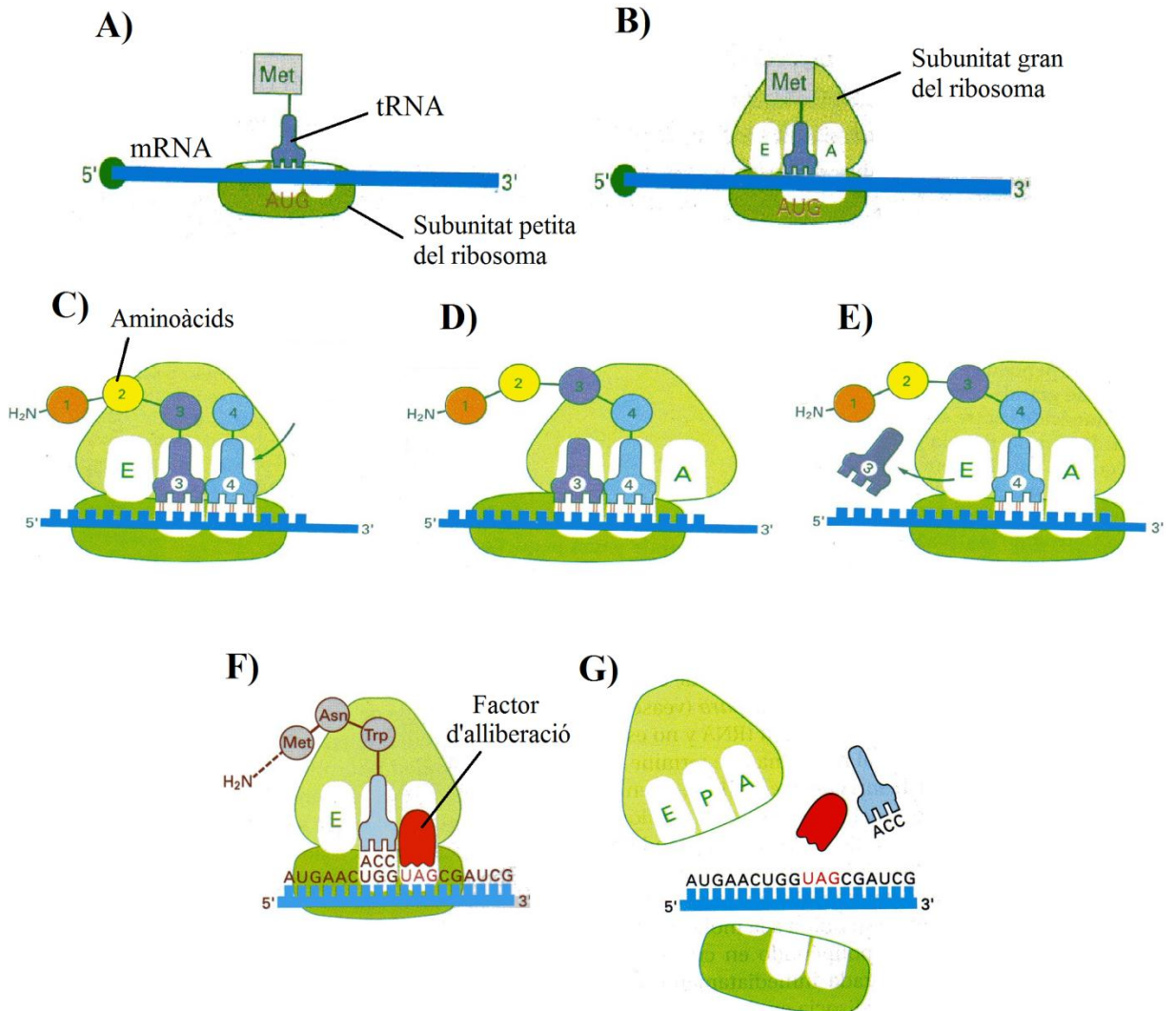


Fig. 14 (A) i (B) Inici de la traducció en cèl·lules eucariotes; el tRNA carregat amb l'aminoàcid Metionina es desplaça pel mRNA buscant el triplet AUG. S'uneixen la subunitat petita i posteriorment, la subunitat gran del ribosoma. (C), (D) i (E) Elongació de la cadena representada diverses etapes després de les anteriors; (C) entrada d'un tRNA carregat amb un aminoàcid al lloc A del ribosoma. (D) El tRNA anterior se situa en el lloc P del ribosoma i es forma un enllaç peptídic. (E) Desplaçament de la subunitat petita del ribosoma d'una distància de tres nucleòtids del mRNA i expulsió del tRNA ja utilitzat. (F) i (G) Fase final de la síntesi de proteïnes; (F) unió d'un factor d'alliberació a un codó de stop i fi de la traducció. (G) La proteïna ja s'ha alliberat i el ribosoma es dissocia en les seves subunitats.

### **2.3. Regulació de l'expressió gènica**

És important que la cèl·lula sintetitzi únicament les proteïnes que necessiti, donat que produir-ne més del compte suposaria un desgast d'energia innecessari i, pel contrari, fabricar-ne menys privaria a la cèl·lula de components essencials. Els mecanismes mitjançant els quals la cèl·lula aconsegueix una eficiència màxima constitueixen la *regulació metabòlica*. Un tipus de regulació metabòlica és la *regulació de l'expressió gènica*, consistent bàsicament en canviar la taxa de síntesis d'enzims segons les necessitats de la cèl·lula. Aquesta regulació es pot produir en totes les etapes de l'expressió gènica, de manera global o amb mecanismes més específics per a cada etapa del procés. La regulació de l'expressió gènica, però, és especialment important en la transcripció.

Durant el procés de transcripció la cèl·lula pot adoptar diferents mètodes per regular l'expressió dels gens, tals com *l'ús de proteïnes reguladores que s'uneixen al DNA* o *l'atenuació*. Tal i com el seu nom indica, en el primer mètode, la cèl·lula utilitza proteïnes reguladores que s'uneixen al DNA i canvien la seva interacció amb la RNA polimerasa. Aquestes proteïnes s'uneixen a regions específiques del DNA properes al promotor on s'uneix la RNA polimerasa, anomenades *operadores*, de tal manera que la proteïna pot regular l'acció de la RNA polimerasa, evitant la transcripció d'aquell gen. De la mateixa manera, aquestes proteïnes estan regulades per unes altres *molècules efectores* que canvien la capacitat de les proteïnes per unir-se al DNA, és a dir, que deixen que les proteïnes s'uneixin al DNA només quan sigui necessari evitar la transcripció d'un gen. El segon mètode de regulació és l'atenuació. Aquest és emprat de manera semblant a una "balança", és a dir, l'expressió dels gens ve regulada segons les taxes de transcripció i de traducció. Així per exemple, l'atenuació pot regular la biosíntesi d'un aminoàcid, tenint en compte que els

aminoàcids els sintetitzen enzims i que els enzims són proteïnes que es formen pel procés de l'expressió gènica, quant la concentració<sup>18</sup> intracel·lular d'un aminoàcid en particular augmenta fins a una concentració superior a la que la cèl·lula necessita per produir una proteïna durant la traducció, el que fa l'atenuació és disminuir la transcripció de l'enzim que dóna lloc a aquest aminoàcid, detenen així la seva síntesi. De la mateixa manera, quan la concentració del aminoàcid descendeix fins a un nivell insuficient, comença de nou la transcripció i la síntesi de l'enzim i, per tant, de la formació de l'aminoàcid en qüestió.

Tot i que no es dóna amb tanta freqüència, l'expressió dels gens també pot ser regulada durant el procés de traducció. Aquest és el cas de la síntesi de les proteïnes que formen els ribosomes. Els gens que codifiquen aquestes proteïnes estan agrupats en *operons*, és a dir, en conjunts de gens que es regulen i es transcriuen conjuntament, de tal manera que cada operó conté un gen que codifica una proteïna que té dues funcions: incorporar-se al ribosoma i unir-se al seu propi mRNA i inhibir la traducció. Quan l'acció d'aquesta proteïna no és excessiva la traducció es produeix amb normalitat, en cas contrari s'arriba a evitar la síntesi de la proteïna.

---

<sup>18</sup> Quantitat de massa o volum d'un solut per unitat de volum de dissolvent.

### 3. PROTEÏNES

Després de l'aigua, les proteïnes són els components més abundants de les cèl·lules, constituint la meitat del pes sec d'aquestes i essent les molècules centrals dels processos biològics que es duen a terme a la cèl·lula. Presenten estructures molt característiques, íntimament lligades al tipus de funció que realitzen i funcions molt variades i específiques. Així per exemple, els enzims són proteïnes que catalitzen les reaccions químiques que es porten a terme a la cèl·lula, les proteïnes de membrana formen canals i bombes que controlen el pas de petites molècules a l'interior i l'exterior de la cèl·lula, altres proteïnes com les hormones que actuen de missatgers químics, proteïnes tant especialitzades com els anticossos...

#### 3.1. La unitat monomèrica: l'aminoàcid

Tal i com es mostrava en el procés de traducció de les proteïnes, el component essencial d'aquestes és l'aminoàcid. Estan constituïdes a partir de, bàsicament, vint aminoàcids diferents que comparteixen una estructura bàsica comuna fonamentada en un àtom de carboni unit a quatre grups diferents: un grup carboxil (COOH), un grup amino (NH<sub>2</sub>), un àtom d'hidrogen (H) i un grup R o cadena lateral variable, que és el que caracteritza a cada aminoàcid.

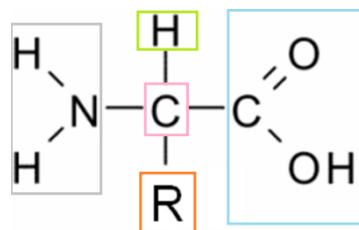


Fig. 15 Fórmula estructural general dels aminoàcids. En rosa carboni alfa, en verd àtom d'hidrogen, en gris grup amino, en blau grup carboxil i en taronja cadena lateral variable.

Tot i que hi ha diverses classificacions dels aminoàcids, la més estesa es basa en la distinció segons el grup lateral R, i els classifica en els següents grups: polars sense càrrega, apolars, carregats negativament, carregats positivament i aromàtics.

La unió de les cadenes laterals a l'àtom central de carboni, anomenat carboni alfa o asimètric, dóna lloc a l'aparició de dues configuracions espacials. Aquesta característica és coneguda com *isomeria* i determina les *imatges especulars D i L*, no superposables segons la situació del grup R a la dreta (D) o a l'esquerre (L). No obstant, els aminoàcids que constitueixen les proteïnes presenten únicament la forma L.

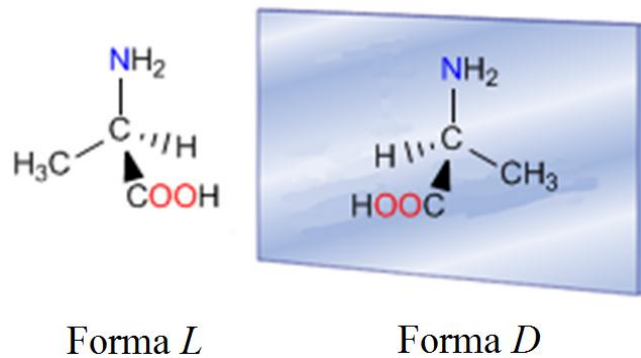


Fig. 16 Imatge especular de l'aminoàcid alanina.

Una altra qualitat destacable que aporta la isomeria és *l'activitat òptica*: les imatges especulars desvien la llum polaritzada cap a la dreta quan són *dextrògires*, o cap a l'esquerre i s'anomenen *levògires*. Aquesta situació és característica de substàncies que contenen àtoms de carboni tetraèdrics amb quatre substituents diferents, com és el cas dels aminoàcids, exceptuant la *glicina*, on el grup R és un hidrogen i per tant, no té carboni asimètric.

Els grups químics que formen la molècula de l'aminoàcid poden ionitzar-se, és a dir, guanyar o perdre un protó, segons les condicions de pH. Els grups carboxil i amino poden adoptar càrrega negativa i positiva, respectivament. El pH en el qual aquests dos grups estan ionitzats i, per tant, les càrregues es compensen i la molècula no té càrrega elèctrica neta s'anomena *punt isoelèctric*. En l'escala fisiològica i en solució aquosa, les càrregues elèctriques els permeten actuar com a àcids o bases, és a dir, són substàncies *amfòteres*.

Durant el procés de traducció, els aminoàcids s'uneixen per formar proteïnes mitjançant *enllaços peptídics*, formats per la unió covalent del grup carboxil d'un aminoàcid i el grup amino del següent, de tal manera que l'enllaç resultant presenta l'estructura CO-NH. En aquesta reacció s'allibera una molècula d'aigua (H<sub>2</sub>O). La successió d'enllaços peptídics dona lloc als pèptids.

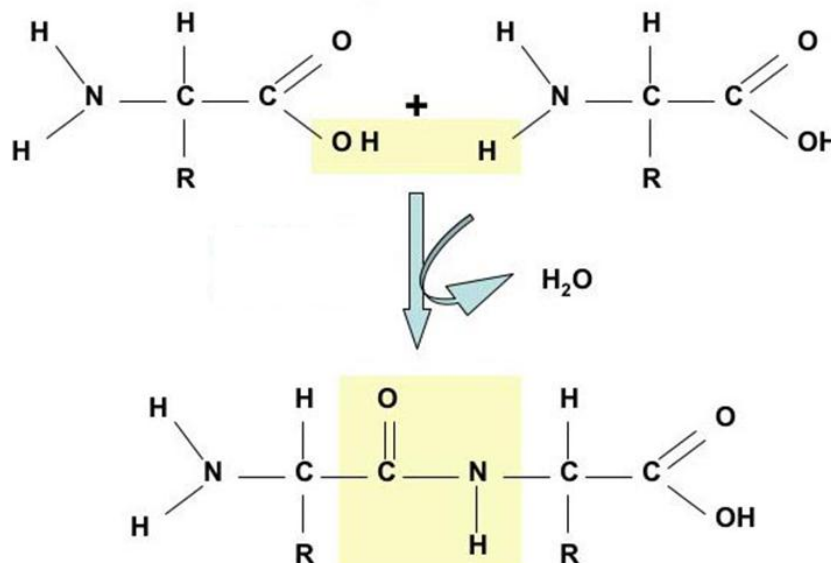
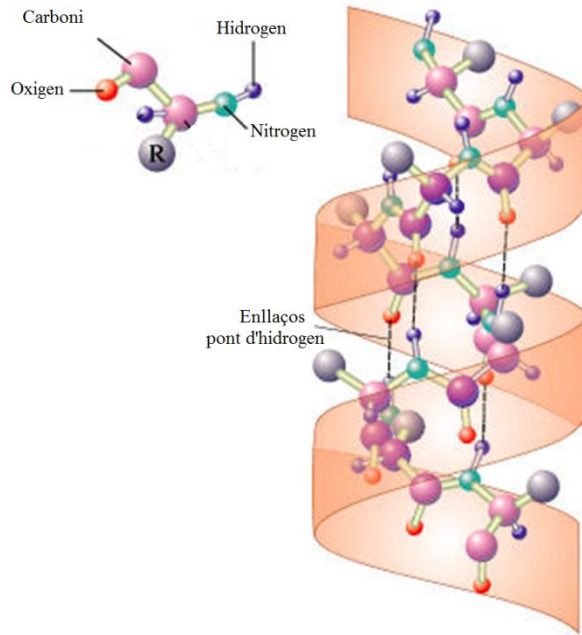


Fig. 17 Condensació de dos aminoàcids per formar un dipèptid. En groc, enllaç peptídic.

### 3.2. Estructures

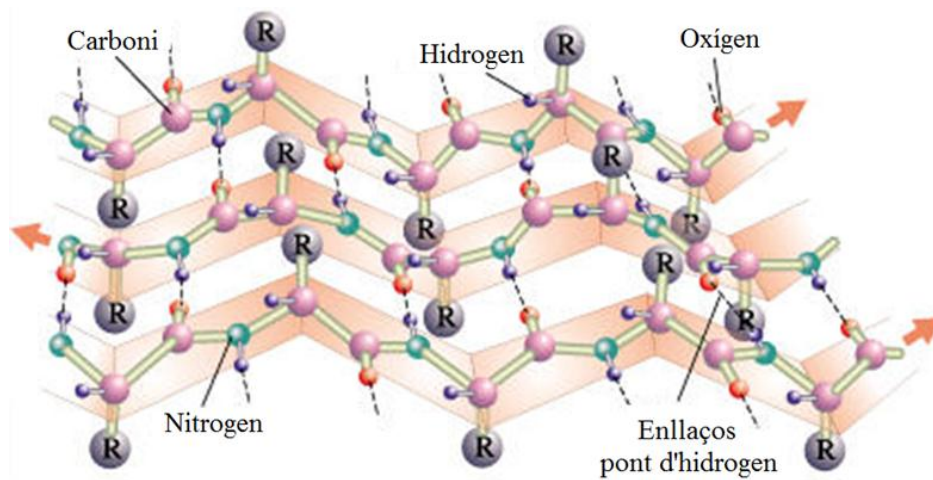
Les estructures pròpies de les proteïnes es divideixen bàsicament en dos tipus: l'*estructura primària* i les *estructures tridimensionals*. La primera ve determinada pels aminoàcids específics i la seva seqüència. Realment però, les proteïnes no es presenten com a cadenes lineals d'aminoàcids sinó que es pleguen en estructures tridimensionals precisades de diferents nivells d'organització. Així, una proteïna pot adoptar una configuració *secundària*, *terciària* o *quaternària*. El fet que presentin una determinada estructura i no una altra s'explica pel plegament en la conformació que requereix menys energia. L'estructura funcional d'una proteïna s'anomena *estructura nativa*.

Pel que fa a les estructures secundàries, representen la disposició espacial local de tots els àtoms que formen l'esquelet d'un polipèptid. Es formen gràcies a la unió dels grups N-H i C=O mitjançant enllaços pont d'hidrogen entre aminoàcids no adjacents. A més de les estructures irregulars, s'ha demostrat l'existència de dues conformacions típiques: l'*hèlix-alfa* i la *làmina-beta*. En el primer cas, el polipèptid presenta una elevada flexibilitat que li permet a la molècula patir torsió al voltant d'un eix central, formant una hèlix regular, que es manté constant gràcies als enllaços pont d'hidrogen formats cada quatre aminoàcids.



*Fig. 18 Estructura d'una proteïna en hèlix alfa. En ella s'observen els aminoàcids que la componen units per enllaços pont d'hidrogen.*

La làmina-beta o també anomenada làmina plegada està formada per una sola cadena que es plega repetides vegades sobre sí mateixa. La fibroïna, el principal constituent de la seda, és un exemple de proteïna que presenta aquesta estructura.



*Fig. 19 Estructura d'una proteïna en làmina-beta. En ella s'observen els aminoàcids que la componen units per enllaços pont d'hidrogen.*



No obstant, aquestes dues conformacions no sempre es presenten soles en una mateixa proteïna, sinó que poden aparèixer regions d'hèlix alfa i de làmina-beta barrejades. Aquests casos però, s'inclourien en les estructures terciàries, tal i com s'explicarà posteriorment.

Un cas especial d'estructura secundària és l'anomenada *hèlix del col·lagen*. El col·lagen és una proteïna fibrosa sintetitzada per les cèl·lules pròpies dels teixits connectius, els quals realitzen una funció estructural. Aquesta, és expulsada al medi extracel·lular per formar estructures tals com els ossos, el cartílag o els vasos sanguinis, esdevenint així, la proteïna més abundant en els vertebrats. Presenta una estructura nativa en forma de triple hèlix que es coneix com a *tropocol·lagen*. Cada unitat de tropocol·lagen està formada per tres cadenes polipeptídiques que s'organitzen paral·lelament, enrotllant-se una al voltant de l'altra mitjançant un gir levògir. A vegades, la hèlix del col·lagen és considerada com a estructura quaternària pel fet d'estar formada pel conjunt de tres cadenes polipeptídiques.

Les estructures terciàries sorgeixen del plegament de l'estructura secundària, juntament amb les disposicions espacials i interaccions entre els grups R dels seus aminoàcids. Així, s'originen conformacions molt específiques per a cada molècula, tals com la forma globular que presenten molts enzims, formada per hèlix alfa i làmina-beta unides mitjançant seccions anomenades  *$\beta$ -turns*.

Existeixen altres proteïnes d'estructures més grans i complexes que estan compostes per dues o més cadenes polipeptídiques, anomenades subunitats, que s'associen donant lloc a estructures quaternàries. Les subunitats agrupades poden ser idèntiques o diferents. En el primer cas, a la proteïna se l'anomena *oligòmer* i a les seves subunitats idèntiques *protòmers*. Segons el número de cadenes polipeptídiques que

s'associen es distingeixen els *dímers* (dues cadenes), *tetràmers* (quatre cadenes), *pentàmers* (cinc cadenes), etc. La RNA polimerasa és un exemple d'enzim que presenta una estructura quaternària en forma de pentàmer.

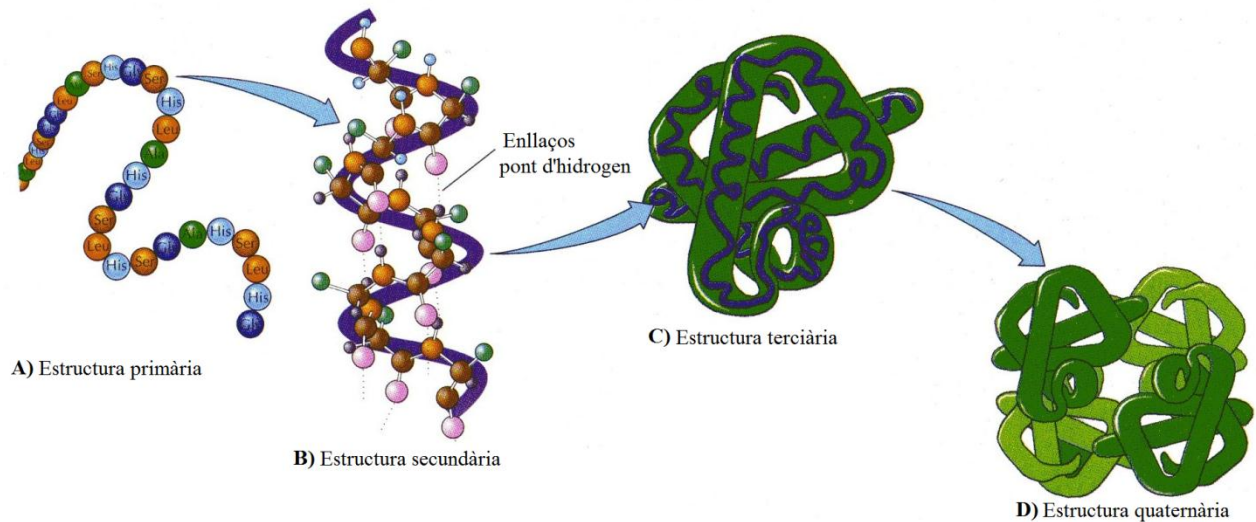


Fig. 20 Representació de les estructures proteiques. (A) Seqüència d'aminoàcids d'una proteïna. (B) Disposició de la cadena d'aminoàcids en funció dels enllaços pont d'hidrogen. (C) Plegament d'una proteïna helicoidal gràcies a las interaccions dels grups R. (D) Disposició de diferents cadenes polipeptídiques en una sola proteïna.

Independentment de la classificació d'estructures anterior, la majoria de proteïnes presenten *dominis proteics*, entesos com qualsevol part de la cadena polipeptídica que pugui plegar-se aïlladament de la resta. Les proteïnes són pèptids que sovint interactuen amb altres molècules mitjançant *regions d'unió*, fet que els pot provocar un lleuger canvi en un dels seus dominis, que a la mateixa vegada, facilita a un altre domini proteic l'execució de la seva funció i pot, fins i tot, formar proteïnes de mida major si la segona molècula és proteica i els seus dominis també reconeixen altres polipèptids. Aquest, doncs, és el procediment que una proteïna utilitzaria per formar una estructura quaternària.

### 3.3. Funcions

Com s'esmentava anteriorment, les proteïnes són biomolècules molt importants en la cèl·lula ja que gairebé tots els processos biològics depenen de l'activitat d'aquestes. Dins del metabolisme cel·lular però, la varietat de tipus de reaccions químiques que es duen a terme és molt elevada, fet que explica que les funcions de les proteïnes siguin altament específiques i, conseqüentment, també ho siguin les estructures. Tot i no poder determinar amb exactitud totes les funcions que realitzen les proteïnes, a continuació s'especifiquen les principals, juntament amb exemples de proteïnes que realitzen la funció en qüestió:

<b>Funció</b>	<b>Definició</b>	<b>Exemples</b>
<b>Enzimàtica o catalítica</b>	Acceleració de totes les reaccions químiques que es produeixen a la cèl·lula.	DNA polimerasa
<b>Estructural</b>	Formació d'estructures a nivell cel·lular i de teixits, a nivell d'organismes.	<i>A nivell cel·lular:</i> microtúbuls, cilis i flagels.
		<i>A nivell d'organismes:</i> col·lagen i queratina
<b>Transport</b>	Moviments de partícules a diferents nivells de l'organisme.	Transport d'oxigen <i>En sang:</i> hemoglobina <i>En múscul:</i> mioglobina
		<i>A nivell cel·lular:</i> proteïnes de membrana que permeten la permeabilitat selectiva <sup>19</sup> .
<b>Reconeixement</b>	Actuació com a antígens de superfície <sup>20</sup>	Glicocàlix
<b>Reserva</b>	Magatzem d'aminoàcids	Caseïna i albúmina
<b>Contràctil</b>	Escurçament dels músculs durant la contracció.	Actina i miocina
<b>Hormonal</b>	Regulació d'activitats cel·lulars	Insulina
<b>Defensiva</b>	Protecció contra agents patògens	Anticossos/Immunoglobulines
<b>Homeostàtica</b>	Manteniment de factors com la temperatura o la coagulació de la sang, a nivells constants	Factors de coagulació
<b>Nutricional</b>	Aportació dels aminoàcids essencials <sup>21</sup> a l'organisme.	Caseïna
<b>Tòxica</b>	Destrucció d'estructures	Verins de bacteris o serps

Taula 2 Principals funcions de les proteïnes.

<sup>19</sup> Pas controlat i específic a l'interior de la cèl·lula d'únicament determinades substàncies.

<sup>20</sup> Punts de reconeixement cel·lular

<sup>21</sup> Aminoàcids que la cèl·lula per si sola no pot sintetitzar.

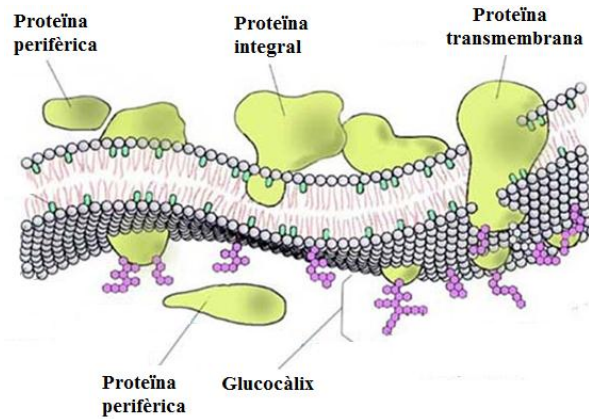


Fig. 21 Representació de les funcions de transport i de reconeixement a la membrana plasmàtica. S'observen les proteïnes que participen en la permeabilitat selectiva i el glucocàlix, un antigen de superfície de la membrana plasmàtica format per l'associació de proteïnes i glúcids.

### 3.4. Propietats

De la mateixa manera que l'estructura, les propietats de les proteïnes estan relacionades amb la funció que realitzen en la cèl·lula i són, per tant, força variables. Tot i així, des del punt de vista bioquímic, aquests polipèptids presenten unes característiques determinades tals com la desnaturalització, la capacitat amortidora, la solubilitat, la propietat osmòtica i l'especificitat.

Com es mostrava en el punt anterior, les estructures tridimensionals de les proteïnes depenen generalment d'interaccions moleculars relativament dèbils, tals com els enllaços pont d'hidrogen, que es poden veure fàcilment alterades per efectes de canvis en el medi com una variació de temperatura, pH o concentració de sals. Aquestes alteracions provoquen l'anomenada *desnaturalització*, entesa com la destrucció de l'estructura tridimensional que sovint comporta l'eliminació de l'activitat biològica del pèptid. Per evitar-la, doncs, és important que les cèl·lules visquin en condicions del medi constants. Tot i això, hi ha determinades proteïnes que un cop desnaturalitzades tenen la capacitat de recuperar la seva conformació estructural originària, és a dir, *renaturalitzar-se*.

Els aminoàcids de les proteïnes presenten una propietat anomenada *capacitat amortidora* que permet mantenir el pH, entès com l'acidesa del medi, constant, és a dir, produir *l'efecte tampó*. En termes generals, els nivells de pH neutre que permeten realitzar les funcions cel·lulars en òptimes condicions es troben al voltant de 7.

Pel que fa a la solubilitat, les proteïnes presenten una *capa de solvatació* que li aporta a la molècula l'estabilitat en dissolució aquosa que necessita per realitzar les funcions.

Per altra banda, les proteïnes exerceixen un efecte osmòtic quan existeixen barreres que limiten la seva lliure difusió. Així, si hi ha dos compartiments aquosos separats per una membrana semipermeable i en un d'ells hi ha proteïnes, aquestes tendiran a captar aigua del compartiment veí, tal i com ocórrer en l'aparell circulatori, l'aigua del qual és retinguda per les proteïnes de la sang.

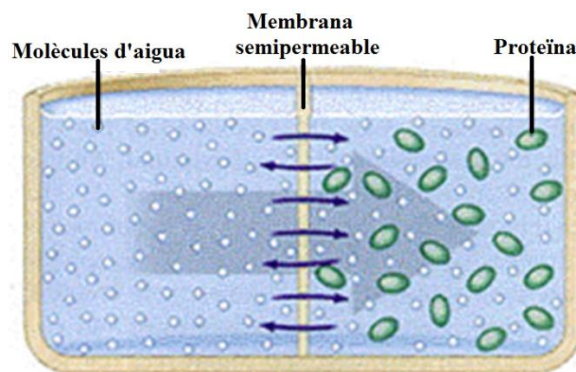


Fig. 22 Propietat osmòtica de les proteïnes. A la dreta, una dissolució d'aigua i proteïnes que atrau l'aigua del compartiment esquerre.

Finalment, les proteïnes presenten una doble especificitat ja que són característiques de cada espècie i pròpies per realitzar una funció concreta. Aquesta propietat fa entendre la gran importància que tenen les proteïnes en les cèl·lules ja que permet realitzar infinitat de funcions.

## **4. TECNOLOGIA DEL DNA RECOMBINANT**

La tecnologia del DNA recombinant és un conjunt de procediments per extreure DNA d'una cèl·lula, manipular-lo *in vitro* i introduir-lo en una altra cèl·lula, generalment d'una espècie diferent, obtenint així, una molècula de DNA recombinant formada per la unió de seqüències de DNA d'espècies diferents. Aquesta molècula en ser introduïda en un organisme produeix una modificació genètica que permet expressar nous caràcters o modificar-ne d'existents. Així, la tecnologia del DNA recombinant ofereix importants aplicacions de les quals se'n parla posteriorment.

### **4.1. Etapes de la clonació gènica**

La tecnologia del DNA recombinant es fonamenta en la *clonació dels gens*, entenent aquesta com el procés d'obtenció d'un conjunt elevat de còpies idèntiques que provenen d'un únic gen, necessàries per poder ser inserides en la cèl·lula receptora.

La clonació de gens es realitza en cinc etapes:

- 1. Obtenció del DNA que conté el *gen x* que es vol clonar:** consisteix en la purificació del DNA, és a dir, la separació d'aquesta molècula de la resta de components cel·lulars a partir d'un extracte de cèl·lules lisades.
- 2. Unió del fragment de DNA que conté el *gen x* a un *vector de clonació*:** els vectors de clonació són molècules de DNA generalment petites i circulars que es repliquen amb facilitat en la cèl·lula receptora i que en ser units al *gen x*, permeten que aquest també es repliqui. La inserció del *gen x* es fa tallant el vector de clonació en extrems cohesius mitjançant enzims de restricció que reconeixen

seqüències de bases nitrogenades específiques. Els extrems cohesius són extrems del DNA de cadena senzilla i complementaris que poden hibridar-se amb el *gen x*. Així doncs, s'introdueix el gen en qüestió per les puntes del tall i es torna a recircular el vector unint-ne els extrems. A més del *gen x*, als vectors de clonació se'ls introdueix un gen que codifica resistència a antibiòtics. Normalment, fan la funció de vectors de clonació alguns genomes de virus i els plasmidis, molècules de DNA circular pròpies de bacteris que poden replicar-se independentment del cromosoma bacterià (de la molècula de DNA principal).

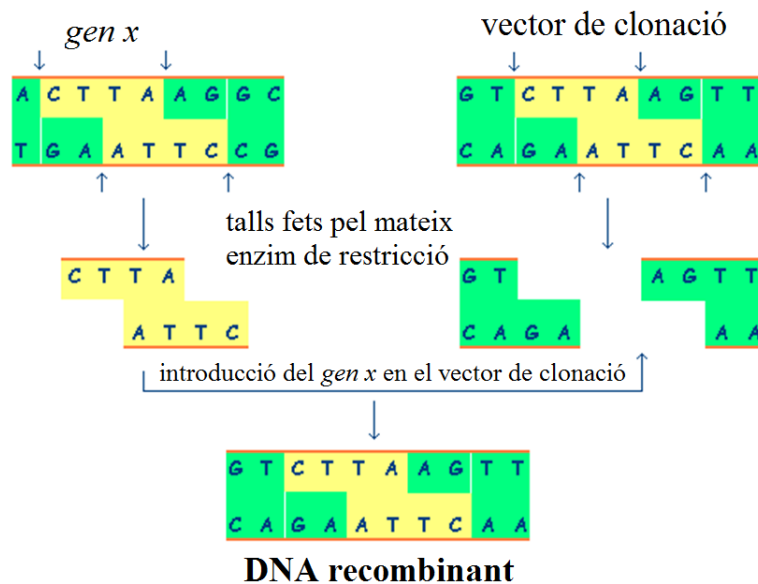


Fig. 23 Unió del *gen x* a un vector de clonació gràcies al tall en extrems cohesius del mateix enzim de restricció.

3. **Introducció del DNA recombinant**, és a dir, el vector de clonació amb el *gen x* i el gen que codifica resistència a bacteris, **a una cèl·lula receptora**: tot i que el *gen x* estigui inserit en un vector de clonació, no té capacitat per replicar-se independentment, és a dir, necessita ser introduït en una cèl·lula on es replicarà. Existeixen diferents mètodes que ho permeten: la transformació, consistent en la

captació del DNA del medi per un bacteri; la transducció, que utilitza virus com a vectors que, per la seva naturalesa, tenen una elevada capacitat d'infecció en cèl·lules; la microinjecció, que consisteix en inserir el DNA recombinant "manualment" dins una cèl·lula; i finalment, l'electroporació, que utilitza impulsos elèctrics que desestabilitzen les membranes cel·lulars permetent l'entrada del DNA recombinant.

- 4. Comprovació que el gen s'ha inserit correctament en la cèl·lula receptora:** el gen que codifica resistència a bacteris que havia estat introduït, juntament amb el *gen x*, en el vector de clonació, permet identificar fàcilment a les cèl·lules receptores que realment contenen el vector. Així, aquestes cèl·lules tindran l'habilitat per créixer en medis que contenen antibiòtic i permetrà diferenciar-les i seleccionar-les d'aquelles que no han incorporat el vector. Aquesta etapa de la clonació gènica és necessària perquè les reaccions biològiques no són 100% eficients i per tant, no totes les cèl·lules hauran inserit el vector.
- 5. Propagació de la cèl·lula receptora** per obtenir un conjunt de cèl·lules portadores del gen: es deixa que les cèl·lules que contenen el *gen x* es reproduïxin i formin colònies, que contindran moltes còpies del gen.

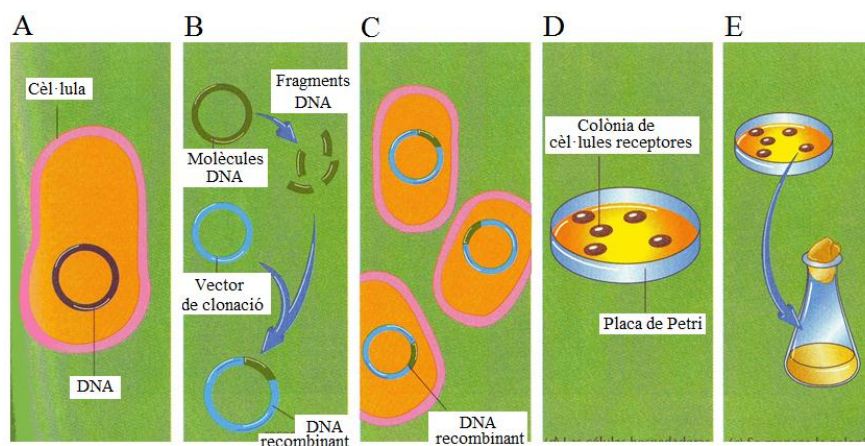


Fig. 24 (A) Purificació del DNA que conté el *gen x*. (B) Tall del DNA en fragments i unió a vectors de clonació. (C) Introducció del DNA recombinant en cèl·lules receptores. (D) Identificació de les cèl·lules que contenen el *gen x* mitjançant antibiòtics. (E) Propagació de la colònia de cèl·lules amb el *gen x*.



#### 4.2. Aplicacions

La tecnologia del DNA recombinant permet obtenir organismes modificats genèticament (OMG) que presenten multitud d'aplicacions en àmbits tan diversos com la medicina, l'agricultura, la indústria o la medicina forense. A continuació doncs, es mostren les principals aplicacions que aporta aquesta tecnologia així com la seva importància en les diferents àrees.

Àmbit	Aplicació	Importància
<b>Biologia molecular</b>	Seqüenciació del DNA	Permet determinar l'estructura dels gens, les seves funcions, les relacions entre ells i els organismes i dona resposta a la base genètica de moltes malalties.
<b>Medicina</b>	Proteïnes d'interès mèdic	Permet produir proteïnes humanes per tractar malalties tals com la diabetis, el nanisme o l'hemofilia.
	Teràpia gènica	Permet la inserció de gens sans que reemplacin altres gens causants de malalties. Aquest procés s'acostuma a fer durant la fecundació <i>in vitro</i> per tal que totes les cèl·lules sorgides a partir del zigot <sup>22</sup> siguin sanes.
<b>Indústria</b>	Microorganismes modificats	Milloreres en la producció d'antibiòtics, vitamines, etc i de productes alimentari. Eliminació de residus tòxics i depuració de l'aigua.
<b>Agricultura</b>	Plantes modificades	Creixement ràpid de plantes millorades i resistents a malalties i plagues.
<b>Ramaderia</b>	Animals modificats	Obtenció de races de creixement més ràpid i que donen productes millorats (llet i formatge enriquits, etc).
<b>Medicina forense</b>	Empremta de DNA	Permet determinar si una mostra biològica (sang, teixits...) correspon a una persona en concret.

Taula 3 Principals aplicacions de la tecnologia del DNA recombinant.

<sup>22</sup> Primera cèl·lula d'un nou individu amb doble dotació cromosòmica obtinguda a partir de la fusió d'un gàmeta femení amb un gàmeta masculí.

A part de les aplicacions mostrades en la *Taula 3*, la tecnologia del DNA recombinant permet produir proteïnes recombinants per estudis científics, enteses com aquelles proteïnes que s'obtenen a partir d'una espècie o línia cel·lular diferent a la original, és a dir, creades *in vitro*. Durant la part pràctica d'aquest treball es presentarà la proteïna X, una proteïna que existeix en la vida real participant en processos tumorals però que, en aquest cas, ha estat fabricada en el laboratori mitjançant enginyeria genètica per a poder ser estudiada, és a dir, és una proteïna recombinant. Els vectors de clonació utilitzats en la seva obtenció són plasmidis bacterians i les cèl·lules receptores, que s'han reproduït eficientment donant lloc a gran quantitat de proteïna X, pertanyen al bacteri *Escherichia coli*.

## 5. TUMORS

Un tumor és una massa anormal de teixit que creix incontroladament i sense coordinació amb la resta de teixits normals, els quals tenen factors que controlen la seva proliferació. Aquest creixement a més de ser excessiu, manca de finalitat i pot envair als teixits del seu voltant o a teixits llunyans, donant lloc a la *metàstasi*. Els tumors tenen un comportament autònom donat que poden realitzar funcions independents tals com la producció pròpia d'hormones o enzims. Aquests últims, juguen un paper important en el creixement i proliferació del tumor ja que es troben en concentracions elevades i per tant, les reaccions químiques produïdes en les cèl·lules tumorals són altament accelerades. No obstant, aquesta autonomia és relativa perquè depenen de l'hoste per la seva nutrició i aportació sanguínia.

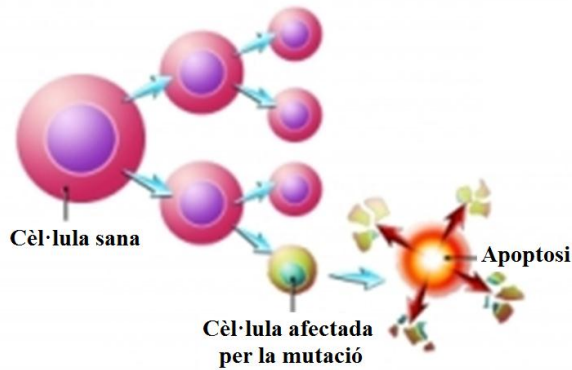
Pel que fa a l'origen dels tumors, conegut com *histogènesi*, aquests es formen a partir de la proliferació excessiva, mitjançant mitosis<sup>23</sup>, d'una cèl·lula derivada d'un teixit prèviament normal. Els tumors són més freqüents en aquells teixits en els quals es produeix de forma activa l'apoptosi, és a dir, la mort i el reemplaçament cel·lular, i en aquells que estan exposats a diversos agents nocius del seu voltant, tals com la pell o l'aparell respiratori, que com s'explicarà més endavant, poden estar perjudicats per factors com els raigs solars i el tabac respectivament. Molts altres tumors són

---

<sup>23</sup> Procés de divisió cel·lular propi de cèl·lules eucariotes somàtiques (qualsevol cèl·lula de l'organisme exceptuant les sexuals) on a partir d'una cèl·lula diploide es formen dues més, idèntiques a la original, és a dir, amb la mateixa dotació cromosòmica, mantenint la constància numèrica entre les espècies.

originats en cèl·lules que presenten un elevat grau d'especialització com són el fetge o la glàndula tiroides.<sup>24</sup>

### Mitosis normals



### Mitosis aberrants

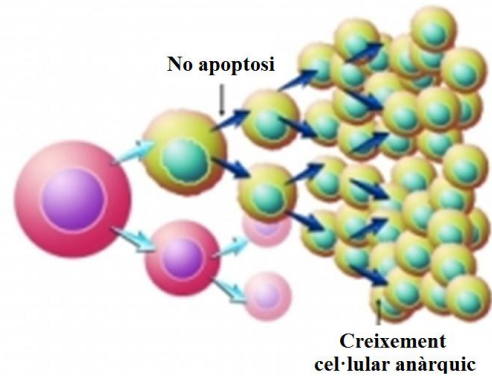


Fig. 25 En el procés normal de divisió cel·lular hi ha mecanismes que provoquen l'apoptosi per eliminar les mutacions. Quan aquests mecanismes fallen es desenvolupa el tumor.

### 5.1. Classificació

Els tumors es classifiquen, segons el seu comportament, en *benignes* i *malignes*. Aquests últims són popularment coneguts com a *càncer*, independentment de quin sigui el seu origen. En àmbits científics, també són denominats *neoplàsia* o *carcinoma*. Existeixen uns paràmetres definits que permeten classificar el tumors en un dels dos tipus. Primerament, la *taxa de creixement* del tumor que està determinada per l'índex de proliferació de les cèl·lules tumorals, és a dir, *l'índex mitòtic*. Així, existeix una gradació molt àmplia pel que fa al creixement tumoral; mentre que els tumors benignes presenten un índex de proliferació baix, de manera que el creixement del tumor és mínim en el temps, els tumors malignes mostren un ràpid desenvolupament que permet, fins i tot, veure diferències de grandària en molt poc

<sup>24</sup> Glàndula secretora d'hormones situada sota la fàrinx.

temps. El *pleomorfisme nuclear*, entès com la gran varietat de formes del nucli cel·lular, les *mitosis aberrants*, és a dir, l'índex mitòtic elevat que indica dotació cromosòmica anormal i l'increment de RNA citoplasmàtic, científicament conegut com a *basofília*, són també una forta evidència de malignitat del tumor. La *capacitat d'invasió i disseminació* és un altre paràmetre que determina el comportament tumoral. En el cas dels tumors benignes, les cèl·lules que el constitueixen romanen en el seu lloc d'origen i la massa que formen s'envolta d'una càpsula de teixit fibrós que impedeix la seva disseminació. En contrast, les cèl·lules dels tumors malignes inicien la invasió de manera local, perjudicant als teixits propers a la zona d'inici i, posteriorment, a través dels vasos limfàtics<sup>25</sup> i/o la circulació sanguínia, formen tumors secundaris en llocs llunyans al punt d'origen, tals com els pulmons, el fetge, ossos, cervell, etc. donant lloc al fenomen de la metastasi. Aquesta és produïda gràcies a la capacitat de moviment, coneguda com a *motilitat*, que presenten aquest tipus de cèl·lules, de manera que l'estudi de la inhibició d'aquesta motilitat amb anticossos podria tenir possibilitats terapèutiques. Un altre dels criteris que permet la classificació dels tumors segons el seu comportament és la *diferenciació*, basada en el grau de semblança d'un tumor amb el seu teixit d'origen, aplicat tant a la morfologia com a la funció de les cèl·lules tumorals. D'aquesta manera, científicament s'utilitzen els termes "poc diferenciat" en tumors malignes, els quals presenten un grau de semblança amb el teixit d'origen molt baix, anomenat *displàsia*, o nul, conegut com a *anaplàsia*, mentre que "ben diferenciat" s'aplica als tumors benignes, els quals presenten un elevat grau de semblança respecte al teixit original.

---

<sup>25</sup> Vasos que condueixen la limfa, un líquid transparent que conté abundants limfòcits que tenen funcions defensives.

Benignes	Malignes
----------	----------

**Taxa de creixement**

mitosis	Poques i normals	Abundants i anormals
nuclis cel·lulars	Poc alterats	Grans i pleomòrfics
nuclèols <sup>26</sup>	Poc alterats	Grans
Basofília citoplasmàtica	Lleugera	Intensa
Hemorràgia i necrosi <sup>27</sup>	Poc importants	Intenses

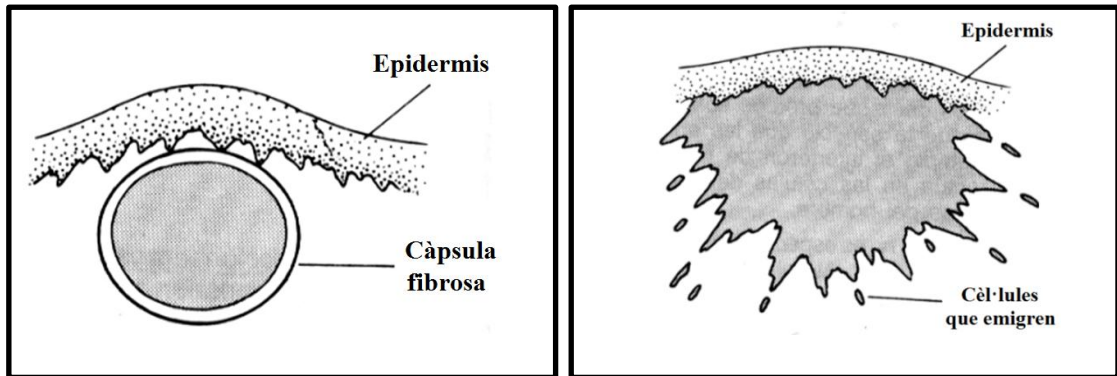
**Capacitat d'invasió i disseminació**

Presència de càpsula	Present	Absent
Invasió local	Absent	Molt freqüent
Metàstasi	Absent	Freqüent

**Diferenciació**

Semblança macroscòpica amb el teixit d'origen	Semblant	Variable
Semblança microscòpica amb el teixit d'origen	Acusat	Escàs
Funcions cel·lulars	Normals	Normals, absents o fabricació de productes anormals
Metaplàsia <sup>28</sup>	Absent	Acusat

Taula 4 Principals paràmetres de classificació dels tumors benignes i malignes.<sup>29</sup>



*Tumor benigne*

*Tumor maligne*

Fig. 26 La càpsula en el tumor benigne evita la disseminació del tumor, mentre que el tumor maligne envaeix localment i a distància.

<sup>26</sup> Zona més condensada del nucli que conté l'organitzador nucleolar (els gens per fabricar el rRNA).

<sup>27</sup> Mort dels teixits.

<sup>28</sup> Canvi en el tipus de les cèl·lules d'un teixit que dona lloc a una forma anormal.

<sup>29</sup> Els paràmetres tractats en aquesta taula són generals i variables ja que el comportament dels tumors en els diferents òrgans és també variable.

Els tumors benignes no produeixen la mort de l'individu a menys que pressionin estructures vitals, mentre els tumors malignes poden provocar la mort per invasió local, per efecte de la metàstasi o per ambdós fenòmens. Així doncs, la identificació dels tumors segons els seu comportament és de gran importància i la detecció precoç del mateix facilita notablement la seva teràpia i millora el seu pronòstic.

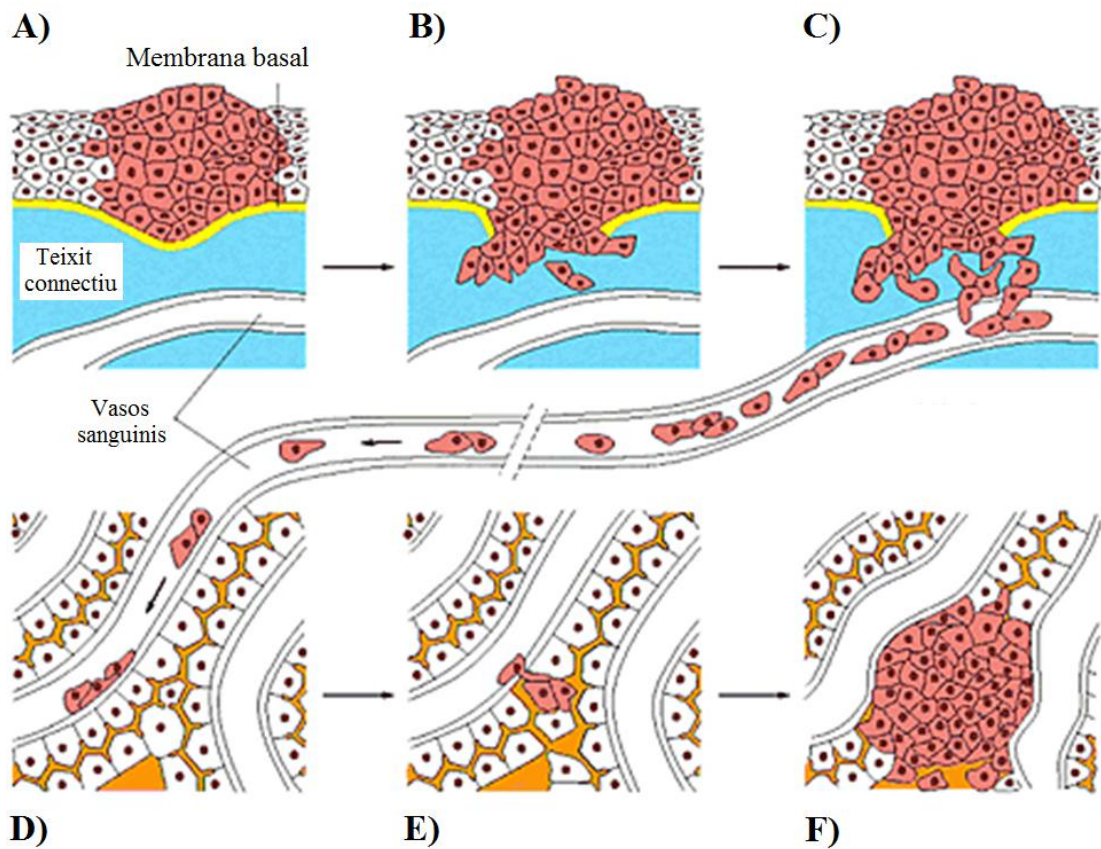


Fig. 27 Procés de disseminació de cèl·lules tumorals malignes: metàstasi. (A) Creixement del tumor. (B) Trencament de la membrana basal<sup>30</sup> i invasió dels teixits veïns. (C) Entrada de cèl·lules tumorals al torrent sanguini. (D) Adhesió de les cèl·lules tumorals a parets d'òrgans diana. (E) Inici de la invasió del tumor en aquests òrgans. (F) Aparició del tumor metastàtic.

Tot i que la classificació dels tumors segons el seu comportament és la més usual, existeix un altre classificació basada en la histogènesi, en referència al tipus de teixit

<sup>30</sup> Capa cel·lular de sosteniment de densitat variable situada en la base dels teixits epitelials.

on s'origina el tumor. Segons aquest criteri, es poden distingir tumors epitelials, anecdòticament, els més freqüents, tumors de teixits connectius, de vasos sanguinis i limfàtics, del sistema nerviós, del teixit limfoide i hematopoètic i d'altres teixits secundaris.

## **5.2. Origen i causes dels tumors malignes**

El procés de transformació d'una cèl·lula normal a una cèl·lula neoplàsica s'anomena *carcinogènesi* i és produïda per una mutació somàtica que es transmet durant la mitosi de la cèl·lula és causada per agents anomenats *carcinògens*. Aquests carcinògens poden ser *factors determinats genèticament* o *factors exògens*. Els primers, determinen la susceptibilitat de l'individu per desenvolupar càncer com a resultat d'una anomalia genètica, produïda per l'acumulació de mutacions espontànies en el DNA dels diferents individus d'una família. Aquestes mutacions podran donar lloc a un mateix tipus de càncer que es vagi repetint en la família o a càncers de diferents orígens. Pel que fa als factors exògens, l'individu pot estar exposat a agents potencialment carcinògens depenent bàsicament d'aspectes geogràfics i hàbits de l'individu. En el primer cas, les característiques naturals de les diferents àrees de la Terra són les que poden provocar major o menor risc de patir càncer. Tal i com s'esmentava anteriorment doncs, un d'aquests factors són les hores d'exposició al sol, juntament amb altres com la geologia de l'àrea en qüestió, degut a la possible presència de compostos químics en el sòl. Aquestes característiques a més, són incrementades per accions de l'home com la contaminació industrial i l'ús inadequat de material radioactiu. Així per exemple, després del desastre nuclear de *Fukushima Daiichi* al Japó, produït l'onze de març de 2011, és d'esperar que el



càncer en aquella població augmenti. Pel que fa als hàbits de l'individu, concretament els dietètics, la influència de la naturalesa dels aliments, la quantitat, els mètodes de preparació d'aquests i la seva composició química són influents en la presència o absència de carcinògens en la dieta. A més a més, una altra font important de carcinògens ve donada per l'ús de fertilitzants químics, insecticides i substàncies conservants d'aliments usades en excés. Els factors ocupacionals de l'individu també influeixen en l'aparició dels tumors. Així, per exemple, individus que treballen en mines o indústries amb productes químics poc controlats, representen grups de població de risc. Tot i que l'home pugui estar sovint exposat a carcinògens de forma "natural", uns dels agents més causants de càncer, però que alhora podrien ser els més evitables, són el tabac i l'alcohol.



*Fig. 28 Principals carcinògens.*

### **5.3. Conseqüències dels tumors malignes**

Les conseqüències dels tumors afecten a diferents nivells de l'organisme i són molt variades. A nivell local, la presència d'una massa tumoral pot donar lloc a la compressió d'estructures properes importants, tals com els vasos sanguinis, els nervis o els òrgans. Això ocorre tant en els tumors benignes com en els malignes però, a més, aquests últims s'infiltraen en aquestes estructures i poden destruir-les. Així, en el cas dels òrgans, la presència del tumor maligne provoca la disminució funcional

d'aquest, l'afectació en ossos dona lloc a fractures, la invasió o obstrucció dels nervis produeix els dolors aguts que percep l'hoste, etc. A nivell general, la presència d'un tumor provoca la competitivitat entre aquest i els teixits normals pels nutrients essencials, tals com els aminoàcids i les vitamines que, a la vegada, produeix l'increment de l'angiogènesi<sup>31</sup> que per circulació sanguínia, fa arribar aquests nutrients al tumor. Aquesta necessitat imperiosa de nutrients es veu agreujada quan el malalt redueix la ingesta d'aquests a conseqüència directa de l'afectació del tumor en zones gastrointestinals o per les nàusees que li pot provocar la quimioteràpia<sup>32</sup>, de tal manera que l'hoste es mostra dèbil i fins i tot caquètic en la fase final de la malaltia. A més a més, els malalts de càncer són especialment propensos a patir infeccions a causa de la debilitació que pateixen els mecanismes de defensa, que novament, es veu incrementada pels tractaments (quimioteràpia i radioteràpia) que predisposen a l'organisme a patir els efectes de l'exposició a agents oportunistes com virus o bacteris. És també freqüent l'aparició d'anèmia, hemorràgies de tumors ulcerats, la febre, etc. En els casos més extrems, es pot produir la necrosi dels teixits que envolten el tumor.

---

<sup>31</sup> Procés fisiològic consistent en la formació de vasos sanguinis nous a partir d'altres preexistents. Es tracta d'un fenomen normal durant el desenvolupament embrionari, el creixement de l'organisme i la cicatrització de les ferides. No obstant, és un procés fonamental en la transformació maligne del creixement tumoral.

<sup>32</sup> Tractament del càncer amb agents químics.

#### **5.4. Un tipus de carcinoma dels teixits connectius: el fibrosarcoma**

Tal i com es mostrarà més endavant i en un dels annexos, durant la part experimental d'aquest treball s'ha utilitzat, principalment, la línia cel·lular tumoral HT1080 per dur a terme els assaigs de laboratori. Aquesta línia cel·lular és la causant d'un tipus de carcinoma pertanyent als teixits connectius anomenat fibrosarcoma. El nom atorgat a aquest carcinoma ve determinat pel prefix *fibro-* que fa referència a la naturalesa fibrosa del teixit d'origen i pel sufix *-sarcoma* que indica malignitat dels teixits connectius. Tot i poder-se localitzar en qualsevol part de l'organisme degut a que el teixit connectiu es troba en la majoria d'òrgans i sistemes, els fibrosarcomes són més freqüents en les fàscies<sup>33</sup> i teixits subcutanis, especialment en braços, cames, cap i coll. Normalment la seva aparició es produeix en l'edat adulta i la majoria d'ells són clarament malignes des del principi però a la vegada, presenten gran variabilitat pel que fa al grau de diferenciació. Així doncs, es poden formar fibrosarcomes de baix grau de malignitat, de malignitat intermèdia o malignitat elevada. En els primers, les cèl·lules tumorals difereixen poc respecte els fibroblasts<sup>34</sup>, són masses fermes que produeixen abundant col·lagen per formar un estroma<sup>35</sup> adequat, creixen lentament i a menys que el tumor no es detecti en un estadi molt avançat, no acostuma a produir metàstasi i es pot curar fent una escissió local adequada. En el segon cas, els tumors tendeixen a créixer una mica més ràpid i produeixen metàstasi, la fabricació de col·lagen descendeix però encara presenten certa semblança amb els fibroblasts. El pitjor pronòstic, però, el donen els

---

<sup>33</sup> Capa de teixit fibrós que forma un revestiment per músculs i òrgans.

<sup>34</sup> Cèl·lula del teixit connectiu de forma allargada i plana que forma els teixits fibrosos del cos, tendons i fàscies i té funció estructural.

<sup>35</sup> Teixit o matriu de sosteniment d'un òrgan.

fibrosarcomes pleomòrfics que es caracteritzen per desenvolupar-se molt ràpidament, estar formats per cèl·lules amb nuclis grans i irregulars, gairebé sense col·lagen, molt poca evidència del teixit d'origen i metàstasis molt precoces disseminades a través de la circulació sanguínia, especialment dirigides als pulmons. Es produeix abundant angiogènesi però els vasos sanguinis resultants mai arriben a estar ben formats, fet que provoca abundants hemorràgies. Les necrosis i els dolors aguts que pateix l'hoste són també destacables.

# **MÈTODE EXPERIMENTAL**

## 6. LEITAT

El mètode experimental d'aquest treball s'ha portat a terme al *Centre Tecnològic Leitat*, un laboratori privat del Parc Científic de Barcelona que actualment col·labora amb institucions públiques, organismes estatals, universitats i altres centres tecnològics. Aquest laboratori va ser fundat l'any 1906 a Terrassa per donar suport a l'emergent indústria tèxtil. En els darrers anys, segueix amb el seu principi de suport a la indústria però ha diversificat les activitats en diferents sectors:

- Materials avançat
- Energies renovables.
- Química
- Nous processos de producció
- Productes de gran consum
- Biomedicina

Concretament, la divisió de *Leitat* creada l'any 2008 que tracta temes de biomedicina és *Biomed Division*. Actualment, aquesta divisió ha centrat la seva recerca en oncologia preclínica amb l'objectiu de cercar noves dianes i generar noves entitats moleculars en càncer, a més d'oferir models oncològics *in vitro* i *in vivo*, histologia<sup>36</sup> i generació d'anticossos monoclonals<sup>37</sup>, a empreses o institucions públiques o privades.



Fig. 29 Façana de l'edifici Hèlix del Parc Científic de Barcelona, on es troba el laboratori Leitat.

---

<sup>36</sup> Estudi del creixement dels teixits, animals o vegetals, des dels períodes germinatius fins que completen la seva formació.

<sup>37</sup> Anticossos que reconeixen les proteïnes per una única regió o epítop.

## 7. INTRODUCCIÓ AL MÈTODE EXPERIMENTAL

Tenint en compte el *dogma central de la biologia molecular*, el mètode experimental d'aquest treball es centra directament en la traducció del mRNA en proteïnes, concretament en la caracterització d'aquests polímers. Així doncs, durant l'estada al laboratori *Leitat* s'ha treballat en el comportament d'una proteïna X<sup>38</sup> recombinant sobre la línia cel·lular tumoral HT1080, aquella que origina un fibrosarcoma.

Pel que fa a les característiques que identifiquen la proteïna X, pertany a una família que necessita calci per la seva correcte conformació. Bibliogràficament, s'ha demostrat que realitza funcions extracel·lulars i intracel·lulars, essent la seva conformació estructural essencial per executar-les. Pel que fa a la seva forma nativa, la proteïna X es presenta en forma de dímer, formada per dos monòmers amb aquesta estructura bàsica:

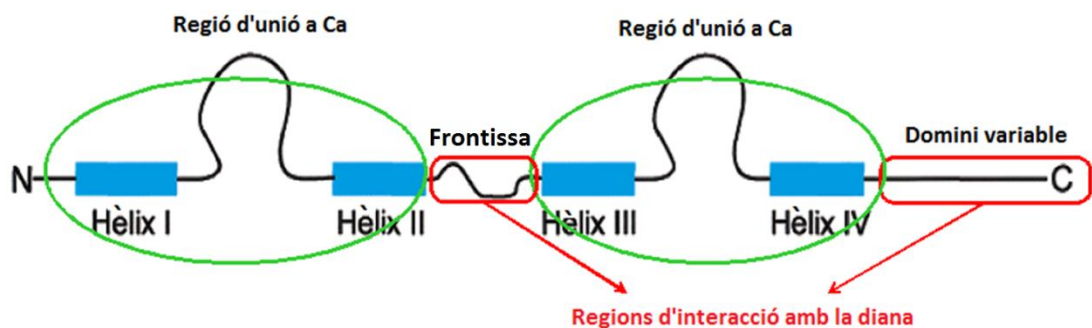


Fig. 30 Estructura nativa de la proteïna X.

<sup>38</sup> Durant l'explicació de la part experimental, s'anomenarà X a la proteïna amb la qual es treballa donat que, pel fet de tractar-se d'un laboratori privat, el nom de la proteïna en qüestió és confidencial.

Tal i com mostra la *Fig. 30*, la proteïna X està formada per dues regions d'unió a calci juntament amb una regió central que proporciona flexibilitat, la frontissa, i una regió C terminal variable. Aquestes regions interaccionen amb les diferents proteïnes diana<sup>39</sup>:

- La proteïna X a l'unir-se a un possible receptor activa l'estimulació de diferents vies d'inflamació i proliferació.
- S'uneix a una proteïna del citoesquelet<sup>40</sup> i provoca la migració de la cèl·lula.

Tot i que encara no es coneix la seva funció, la proteïna X es troba en l'organisme de manera fisiològica<sup>41</sup>. No obstant, se sap que té una elevada sobreexpressió en tumors cancerígens de diferents orígens relacionats amb pronòstics fatals en els pacients que els pateixen. Cal destacar l'efecte d'aquesta proteïna sobre el fibrosarcoma ja que és el tipus de tumor originat per les cèl·lules HT1080 estudiades. Per aquest motiu, en un dels annexos (pàg. 141) es mostrarà un informe mèdic real on es relaciona el fibrosarcoma i la proteïna en qüestió.

<b>Tipus de càncer</b>	
Carcinoma pancreàtic	Carcinoma de pròstata
Carcinoma colorectal	Carcinoma gàstric
Carcinoma de mama	<b>Fibrosarcoma</b>
Carcinoma de pulmó	Leucèmia
Carcinoma d'ovari	Carcinoma escamós oral

*Taula 5 Tipus de càncer on s'ha demostrat la sobreexpressió de la proteïna X.*

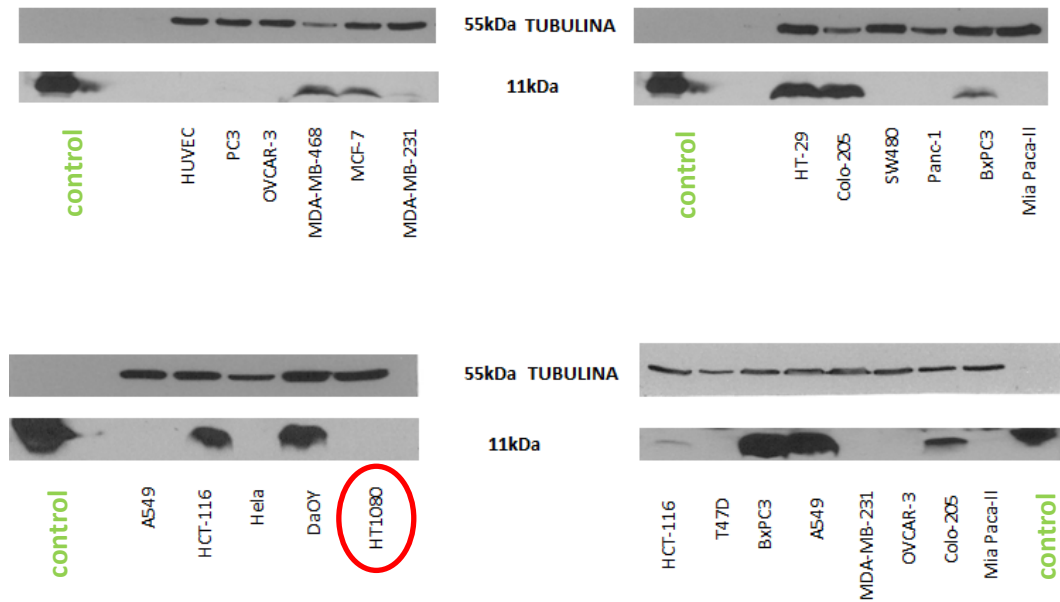
<sup>39</sup> Possible objectiu d'actuació de la proteïna X.

<sup>40</sup> Xarxa de microtúbuls, microfilaments i filaments intermedis que s'estén pel citoplasma de les cèl·lules eucariotes i en comunica les diverses parts.

<sup>41</sup> Condicions normals de l'organisme.



Al laboratori *Leitat*, gràcies a la tècnica de *Western Blot*<sup>42</sup>, de la qual se'n parlarà més endavant, s'ha pogut observar l'expressió de proteïna X en línies cel·lulars tumorals que provoquen els diferents tipus de càncers exposats a la *Taula 5*.



*Fig. 31 Resultats del Western Blot. Els tres primers revelatges pertanyen a línies cel·lulars tumorals creades in vitro mentre que l'última imatge pertany a un tumor cancerigen en ratolí (in vivo). En vermell, la línia cel·lular amb la qual es treballarà. En verd, el control de proteïna X per comprovar que aquesta és reconeguda per un anticòs.*

A mode de resum i tal i com mostra la *Fig. 31*, els resultats de l'anàlisi d'aquesta tècnica sobre extractes proteics X, indiquen que es tracta d'una proteïna altament expressada en línies cel·lulars tumorals tals com les HT-29, BxPC3, A549, etc. donat que en el revelatge hi apareixen "taques negres" indicant la presència de la proteïna. A més a més, el revelatge del Western en l'extracte cel·lular HT1080 indica que inicialment aquesta línia cel·lular no expressa la proteïna que es pretén estudiar, fet que demostra que si durant el procés es detecta proteïna en aquestes cèl·lules és degut a la seva internalització i no pas a la pròpia producció.

<sup>42</sup> Veure explicació de la tècnica al capítol "immunodetecció de membranes" (pàg. 90)

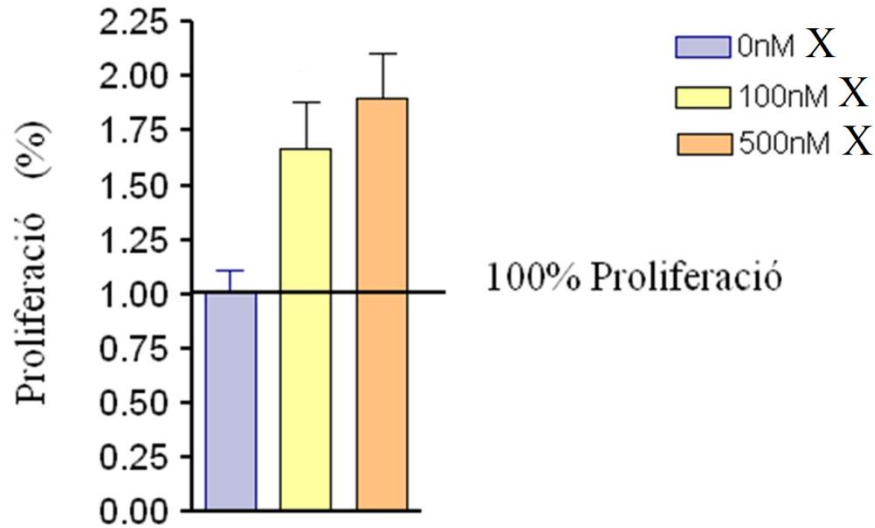


Fig. 32 Gràfic on es mostra la inducció de la proliferació a les HT1080 per part de la proteïna X de manera dosi dependent, a les 48h.

El gràfic de la Fig. 32 mostra el creixement de les cèl·lules HT1080 exposant-les a diferents concentracions (nM)<sup>43</sup> de proteïna X. Així doncs, en blau, es representa el creixement natural de la línia cel·lular, és a dir sense presència de proteïna X. Aquest, s'estableix com a creixement del 100%. En groc, s'exposa el creixement cel·lular al sotmetre les cèl·lules a una concentració proteica de 100nM i en taronja, de 500nM. En ambdós últims casos, el creixement cel·lular supera notablement el que es considera creixement del 100%, això demostra el fet que la proteïna X tingui una funció important en el creixement del tumor i, degut a aquest ràpid desenvolupament, es relacioni amb pronòstics fatals. A més a més, que sigui “dosi dependent” reafirma que en augmentar la concentració de proteïna X augmenti la proliferació de les cèl·lules HT1080, és a dir, són directament proporcionals. Les “fletxes” que es mostren sobre cada barra del gràfic indiquen la desviació estàndard

<sup>43</sup> Nanomolar.  $nM = 10^{-9}$  molar. La molaritat és una mesura de concentració que representa la quantitat de solut per unitat de volum de dissolució.

d'aquestes, és a dir, el que es podria obtenir repetint aquests assaigs múltiples vegades.

Partint dels coneixements bibliogràfics exposats fins al moment i amb la finalitat de conèixer l'inici del procés d'investigació sobre la influència d'aquesta proteïna en les línies tumorals, s'ha plantejat el mètode experimental d'aquest treball com una recerca. Així doncs, tot i que es coneix un possible receptor de la proteïna X, bibliogràficament encara no s'ha demostrat la seva via de senyalització, entenent aquesta com allò que es troba la proteïna X en entrar a les cèl·lules. A més a més, se sap que la proteïna té capacitat per internalitzar-se juntament amb el seu receptor per fer les seves funcions dins de la cèl·lula. **L'objectiu d'aquest treball, doncs, serà esbrinar en quin moment es produeix la internalització de la proteïna** per tal de trobar el moment òptim per bloquejar aquesta acció mitjançant un anticòs o molècula química amb la finalitat última d'aturar el creixement tumoral.

Per assolir l'objectiu plantejat, aquestes pràctiques han estat dividides en dues parts. La primera, s'enfoca a conèixer i utilitzar les tècniques que, freqüentment, un laboratori com és *Leitat* emprava en les investigacions sobre proteïnes i per tant, on es farà referència a l'assaig d'internalització de X sobre la línia tumoral HT1080 que, sense tenir en compte el tipus de transport que la cèl·lula utilitza per internalitzar la proteïna, permetrà veure el moment en que ho fa. Dins d'aquesta mateixa part, s'inclourà l'explicació de la tècnica Bradford, elaborada amb diferents línies cel·lulars. En la segona part del treball, es fa esment als cultius cel·lulars, basant-se en mètodes que permeten determinar la viabilitat dels mateixos. Aquesta part és una ampliació de tècniques que freqüentment s'utilitzen en un laboratori i que permeten aprendre a manipular cèl·lules i fer-ne els càlculs necessaris, sense estar directament relacionada amb l'objectiu principal del treball.

Tal i com s'esmenta anteriorment, la línia tumoral HT1080 ha estat la línia escollida per portar a terme els assaigs funcionals. Aquesta tria és deguda a l'àmplia informació bibliogràfica de la que es disposa, a més d'ésser una línia cel·lular de fàcil accés i manipulació pel laboratori *Leitat*, tenir experiència prèvia del creixement *in vitro* i oferir la possibilitat de crear un model *in vivo* de les mateixes.

Actualment, el laboratori *Leitat* treballa amb la línia cel·lular HT1080 i amb moltes altres línies tumorals, juntament amb l'expressió i la funció de la proteïna X implicada en processos tumorals, amb la intenció de cercar noves dianes en angiogènesi<sup>44</sup> tumoral per trobar una teràpia que ajudi a millorar el tractament contra el càncer, ja sigui inhibint l'expressió de proteïnes o bloquejant l'acció extracel·lular que tenen en els processos tumorals.

Per facilitar la comprensió del mètode experimental, al final de cada assaig realitzat es mostraran, a mode de “conclusions parcials”, els resultats i la interpretació dels mateixos, a més de fer-ne una síntesi d'aquests en les conclusions finals del treball. Amb el mateix objectiu, a continuació es concreta l'ordre d'aparició dels diferents assaigs:

1. Descongelació de línies cel·lulars.
2. Obtenció i caracterització de proteïnes: assaig d'internalització de la proteïna X en les cèl·lules HT1080.
3. Bradford de línies cel·lulars.
4. Assaigs de viabilitat cel·lular: Alamar Blue i MTT.

---

<sup>44</sup> Veure peu de pàgina número 31.

## **8. DESCONGELACIÓ DE LÍNIES CEL·LULARS**

### **Objectiu**

Com és freqüent en els laboratoris, a *Leitat* comptem amb un banc de línies cel·lulars on emmagatzemen i informatitzen els diferents tipus cel·lulars que tenen. D'allà, periòdicament, en fan línies de treball amb l'objectiu de poder utilitzar aquestes cèl·lules per realitzar assaigs mitjançant diferents passis o subcultiu. Preparant aquest estoc de treball es tindrà certesa de que totes les proves seran realitzades amb el mateix tipus de cèl·lula i permetrà evitar, per tant, la variabilitat. El primer que s'ha fer, doncs, és descongelar les línies cel·lulars de les quals es vol fer un passi per poder sembrar-les i treballar amb elles. Aquestes, es troben conservades en nitrogen líquid a  $-180^{\circ}\text{C}$ .

En aquest cas, les cèl·lules amb les quals es pretén treballar, les HT1080, ja estan preparades per fer els assaigs i per tant, s'ha descongelat una altra línia cel·lular amb la qual també treballa el laboratori, les OVCAR-3 per aprendre'n la tècnica, que és igual en tots els casos.

### **Materials i aparells**

- Dipòsit de nitrogen líquid a  $-180^{\circ}\text{C}$
- Flascó de  $75\text{ cm}^2$  (F-75)
- on s'emmagatzemi l'eppendorf (tub
- Bany Maria a  $37^{\circ}\text{C}$
- d'assaig) amb les cèl·lules a
- Centrífuga
- descongelar.
- Campana de flux laminar
- Guants i màscara.
- Estufa/incubador de  $\text{CO}_2$
- Tub de 15 i 50 ml
- Pipetes

- Pipetboy
- Aspirador
- Microscopi invertit
- Cambra de Neubauer
- Cobreobjectes
- Comptador de cèl·lules



Fig. 33 D'esquerre a dreta, pipeta i pipetboy, l'estri que facilita la manipulació de les pipetes.



Fig. 34 Centrífuga

## Productes

- Medi DMEM +10% FCS (*Dulbecco's Modified Eagle Medium + 10% fetal*)
- Diluent DMSO (*dimetilsulfòxid*)
- Tripsina
- Blau de tripà
- Tampó<sup>45</sup> PBS1 w/o CaCl<sub>2</sub> i Mg+

<sup>45</sup>Dissolució per mantenir el pH (acidesa del sistema) estable.

## Procediment

1. Preparar un tub de 15 ml amb 10 ml de medi complet, el sèrum que enriquirà i permetrà que les diferents línies cel·lulars visquin i creixin en condicions adequades. En aquest cas, el medi complet apropiat per les OVCAR-3 i per les HT1080 és el DMEM + 10% FCS.
2. Mirar a l'arxiu del banc de treball la situació d'emmagatzematge de les cèl·lules a descongelar en el banc de nitrogen líquid: el Rack (columna), el calaix i la posició (lletra/nº). En aquest cas, les cèl·lules que es pretenen descongelar es troben al Rack 3, calaix 5 i a la posició H7.
3. Anar al dipòsit de nitrogen líquid, situat tres plantes per sota del laboratori, ficar-se els guants i la màscara per obrir-lo i treure el calaixet.



*Fig. 35 Dipòsit de nitrogen líquid a -180°C.*

4. Treure l'ependorff on es troben les cèl·lules que es necessiten i tornar a posar la vareta que sosté els calaixos que conserven altres materials.
5. Descongelar amb les mans fins arribar al laboratori i ficar al bany Maria a 37°C, agitant suaument fins que quedi una pedreta de gel a dins.

6. Amb l'ajuda d'una pipeta, passar el contingut de l'eppendorf al tub de 15 ml. Per fer-ho, cal afegir una mica de medi del tub inicial de 15 ml a l'eppendorf on es troben les cèl·lules, barrejar i aspirar.
7. Fer un rentat extra de les parets de l'eppendorf amb medi i diluent DMSO. Aquest pas ha de ser molt ràpid per diluir al màxim el DMSO ja que a temperatura ambient és tòxic per les cèl·lules.
8. Centrifugar el tub a 1400 revolucions per minut (rpm), durant 5 min i a 4°C, per tal d'eliminar el DMSO.
9. Aspirar el sobrenedant<sup>46</sup> vigilant no tocar el "pellet", és a dir, les cèl·lules sedimentades al fons del tub.
10. Resuspendre<sup>47</sup> el "pellet" afegint al tub 1 ml de medi complet amb una pipeta.
11. Sembrar les cèl·lules en un flascó de 75 cm<sup>2</sup> (F-75) afegint 20 ml de medi complet.
12. Guardar a l'estufa a 37°C.

### **8.1. Passi o subcultiu de línia**

Durant els dies posteriors a la descongelació de la línia cel·lular, se'n ha de fer una observació i quan, amb l'ajuda del microscopi invertit, es detecta una confluència<sup>48</sup> propera al 90% es fa un passi o subcultiu de la línia. Aquest, permetrà fer els assaigs de laboratori i reduir-ne el cost ja que no caldrà utilitzar altres línies cel·lulars.

---

<sup>46</sup> Resta de substàncies de densitat inferior que queda en forma líquida.

<sup>47</sup> Solubilitzar de nou el pellet mitjançant pipeteig continuat.

<sup>48</sup> Densitat cel·lular observada al microscopi.



1. 15 minuts abans de fer el passi, posar el DMEM + 10% FCS a temperar.
2. Aspirar el medi que s'havia posat en el flascó de 75 cm<sup>2</sup> on es troben les cèl·lules, vigilant no tocar amb l'aspirador la boca del flascó. Al aplicar aquesta tècnica no s'aspiren les cèl·lules ja que estan enganxades a les parets del flascó.

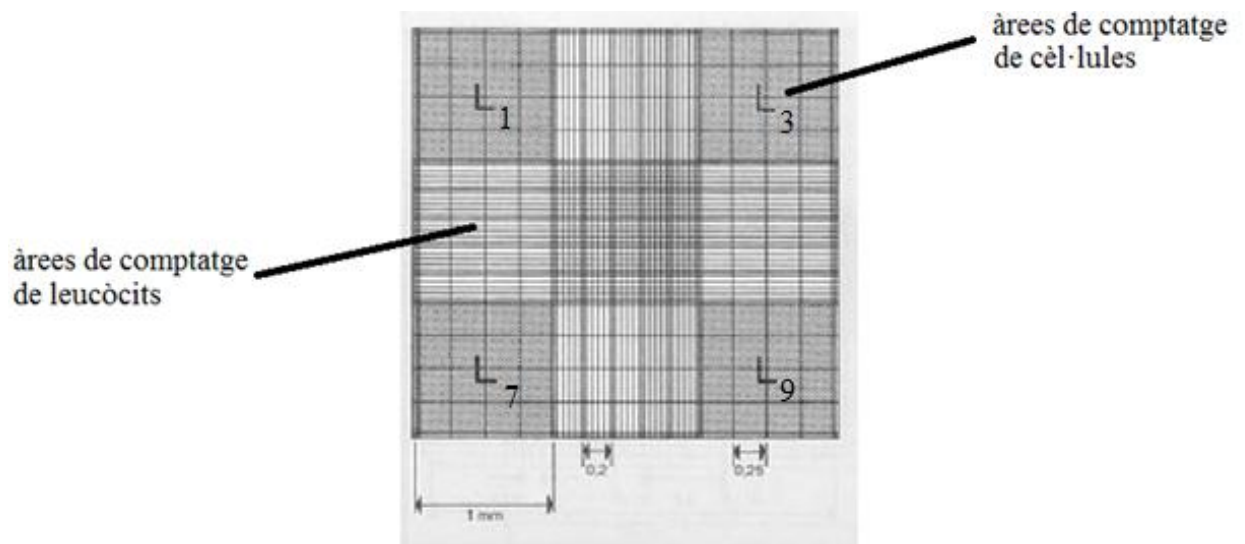


*Fig. 36 Aspiració del medi del flascó.*

3. Rentar amb el tampó PBS1 w/o CaCl<sub>2</sub> i Mg<sup>+</sup> fent servir 20 ml per a cada rentada. Aspirar i repetir dos vegades el rentat per tal de desenganxar les cèl·lules del flascó. En aquest punt s'ha de veure que ja no es forma escuma dins el flascó, això indica que ja no hi ha medi complet. En cas que hi haguessin restes de sèrum, s'inactivaria l'efecte de la tripsina, la substància que permetrà acabar de desenganxar les cèl·lules.
4. Afegir 2 ml de tripsina 0'5x, agitar i deixar-ho 3 minuts dins l'incubador de CO<sub>2</sub> a 37°C, controlant al microscopi i a simple vista, que les cèl·lules es desenganxen.
5. Un cop les cèl·lules s'han desenganxat, amb l'ajuda d'una pipeta de 10 ml, repetint la operació dues vegades, afegir 10 ml de medi complet (és a dir, 20 ml).

6. Recollir el medi fent rentats acurats per les parets del flascó utilitzant el pipetboy i posant-lo en un tub de 50 ml.
7. Centrifugar a 1400 rpm, 5 minuts i 4°C per poder recollir el pellet i acabar d'eliminar el medi.
8. Aspirar el sobrenedant i afegir un volum de 5ml de medi nou per resuspendre el pellet i aconseguir una suspensió homogènia.
9. Fer el recompte de cèl·lules mitjançant la cambra de Neubauer.

### 8.2. Comptatge de cèl·lules amb cambra de Neubauer



*Fig. 37 Esquema de la cambra de Neubauer*

La cambra de Neubauer permet fer el comptatge de cèl·lules per conèixer la viabilitat del cultiu i el número total de cèl·lules d'aquest. Per fer-ho, s'utilitza el blau de tripà, un colorant vital que permet detectar les cèl·lules mortes. Gràcies a que aquestes tenen la membrana cel·lular trencada, el blau de tripà s'introdueix al seu interior i tenyeix les cèl·lules de manera que, al observar-les al microscopi, es detecten petites taques blaves representant les cèl·lules mortes.

La cambra de Neubauer és un portaobjectes amb una depressió central i amb unes incissions formant una quadrícula de 3x3 mm, amb una separació entre dues línies consecutives paral·leles de 0.25mm. Tal i com indica la *Fig. 37* les zones marcades amb la lletra L permeten fer el comptatge de qualsevol tipus de cèl·lula, exceptuant els leucòcits<sup>49</sup>, i tenen una superfície d'1mm<sup>2</sup>. La depressió central del cobreobjectes s'enfonsa 0,1mm respecte la superfície, per tant, l'espai que resta al col·locar un cobreobjectes respecte de la superfície és de 0,1mm. El volum comprès entre l'àrea L i el cobreobjectes és de 0,1mm<sup>3</sup> o 0,1µl. Al comptar les quatre àrees L i, independentment del total de cèl·lules que hi hagi en elles, la concentració serà 10000 cèl·lules/ml per cada àrea L. Aquesta última dada s'utilitza en la fórmula per calcular el número total de cèl·lules del cultiu.

En aquest cas, el comptatge de cèl·lules amb cambra de Neubauer ja s'ha fet amb la línia tumoral HT1080 al passí 15<sup>50</sup>, mentre que les OVCAR-3 es troben a l'incubador de CO<sub>2</sub>.

1. Fer una dilució 1/3 (1µl cèl·lules + 2µl de blau de tripà). Així, per exemple, s'utilitzaran 40µl de blau de tripà per cada 20µl de cèl·lules.
2. Amb l'ajuda d'una pipeta, posar 5µl de dissolució en el cobreobjectes sobre la cambra de Neubauer.
3. Utilitzant el microscopi invertit i el comptador, comptar les cèl·lules vives i mortes presents d'1 a 4 camps (1 camp = 16 quadres). En aquest cas, s'han comptat 3 camps.

---

<sup>49</sup> Tipus de cèl·lules sanguínies que defensen l'organisme contra substàncies i agents infecciosos.

<sup>50</sup> El fet que sigui passí 15 vol dir que d'aquesta línia cel·lular s'han fet, contant aquest, fins a quinze subcultius.

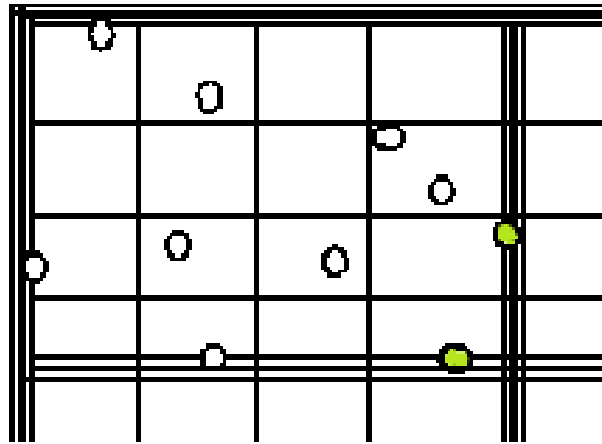


Fig. 38 Representació de l'àrea  $L_1$  de la cambra de Neubauer. Criteri per comptar cèl·lules: es compten les del costat superior i esquerre (cèl·lules blanques) i no es compten els costats inferior i dret (cèl·lules en verd)

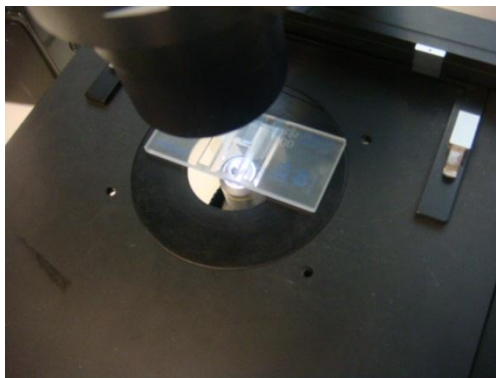


Fig. 39 D'esquerra a dreta, comptatge de cèl·lules HT1080 amb cambra de Neubauer i comptador.

Àrees de la cambra	Cèl·lules vives	Cèl·lules mortes
$L_1$	45	1
$L_3$	57	0
$L_9$	47	0
	<b>Total: 149</b>	<b>Total: 1</b>

Taula 6 Resultats del comptatge de cèl·lules HT1080 al p.15 amb cambra de Neubauer.

4. Fer la mitjana aritmètica de cèl·lules vives dels camps comptats.

$$\bar{x} = (45+57+47)/3=49,6 \text{ cèl·lules vives}$$

Càlcul del percentatge de viabilitat de les cèl·lules d'HT1080 al p<sup>51</sup>.15:

$$\% \text{ Viabilitat} = [\text{n}^\circ \text{ cèl·lules vives} / (\text{n}^\circ \text{ cel. vives} + \text{n}^\circ \text{ cel. mortes})] \times 100$$

$$\% \text{ Viabilitat HT1080 al p.15: } [149 / (149 + 1)] \times 100 = \mathbf{99,3\%}$$

Càlcul del nombre total de cèl·lules HT1080 al p.15:

$$\text{Cèl·lules totals: } \bar{x} \text{ cèl·lules} \times \text{factor dilució} \times 10000 \times \text{ml totals}$$

$$49,6 \times 3 \times 10000 \times 1 = 1,49 \cdot 10^6 \text{ cèl·lules/ml}$$

$$1,49 \cdot 10^6 \text{ cèl·lules/ml} \times 5 \text{ml de dissolució} = \mathbf{7,5 \cdot 10^6 \text{ cèl·lules HT1080 totals al p.15}}$$

Per calcular el número total de cèl·lules del passi s'ha utilitzat el factor de dilució indicat anteriorment 1/3.

La viabilitat adequada per poder realitzar assaigs cel·lulars d'un cultiu amb la seguretat que les cèl·lules es troben en bon estat ha de ser superior al 85%. En aquest cas i tal i com s'observa en els resultats, la viabilitat del cultiu d'HT1080 en el p.15 és del 99,3%, xifra molt propera al 100%, que indica l'estat gairebé òptim d'aquest. Per terme general, el nombre de passis o subcultius que es podrà fer amb una mateixa línia cel·lular, dependrà del tipus de cèl·lules amb les que s'estigui tractant. El fet que les HT1080 pertanyin a una línia tumoral i que per tant, siguin cèl·lules amb una elevada capacitat reproductora, explicaria que, tot i tractar-se del passi 15, la viabilitat del passi és molt elevada. Amb facilitat, doncs, es podria arribar a fer uns 25 passis d'aquesta mateixa línia. La mateixa explicació demostra que el número de cèl·lules/ml i cèl·lules totals que conté el passi es considerin elevats. De totes maneres i especialment durant els primers passis, s'han d'observar paràmetres com el

---

<sup>51</sup> Passi

número de cèl·lules en divisió, la presència de detritus, l'acidificació del medi, etc. que ajudaran a indicar l'estat de les cèl·lules en cada moment.

Càlcul dels  $\mu\text{l}$  de cèl·lules HT1080 a sembrar:

Per fer un altre subcultiu o passi d'aquesta línia cel·lular (p.16) es sembraran dos flascons de  $75\text{ cm}^2$  amb un inòcul de sembra de  $0,7 \cdot 10^6$  cèl·lules, tenint en compte que en el cultiu hi ha  $1,49 \cdot 10^6$  cèl·lules/ml:

$$\frac{0,7 \cdot 10^6 \text{ cèl·lules/flascó}}{1,49 \cdot 10^6 \text{ cèl·lules/ml}} = 430 \mu\text{l/flascó}$$

L'elaboració d'aquest nou passi o subcultiu de línia permetrà que després de fer els assaigs necessaris, es pugui mantenir la línia en cultiu per a pròximes tècniques i per tant, evita la necessitat de descongelar un altre eppendorf d'aquesta línia cel·lular, a més de tenir un accés ràpid a les cèl·lules en cas d'haver de repetir un assaig.



Fig. 40 Cèl·lules HT1080 al p.16

## **9. OBTENCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE PROTEÏNES: assaig d'internalització<sup>52</sup> de la proteïna X en les cèl·lules HT1080**

La primera part de l'experimentació es fonamenta en el tractament de tècniques instrumentals bàsiques que permetran conèixer determinades característiques de la proteïna X. Per fer-ho, s'ha elaborat un assaig d'internalització temporitzat on, primerament, es sembren les cèl·lules HT1080 afegint proteïna X recombinant directament al medi extracel·lular (ja que, inicialment, aquestes cèl·lules no contenen proteïna). Transcorregudes 24 hores, es fa l'extracció proteica i la separació de les proteïnes mitjançant una electroforesi en gels de poliacrilamida i es transfereix el gel utilitzat a una membrana de PVDF per poder observar els resultats. Finalment, la immunodetecció de membrana permetrà reconèixer les bandes que contenen proteïna X.

El projecte, doncs, s'ha iniciat amb la sembra de les cèl·lules HT1080 al p.16 a les quals, transcorregudes 24 hores, se'ls ha afegit la proteïna X amb la intenció d'observar-ne el comportament. Per realitzar l'assaig, s'han sembrat sis pous d'HT1080, tenint en compte que el primer pou, considerat el temps 0'<sup>53</sup>, és un control i per tant, són cèl·lules que no contenen proteïna X. Els cinc pous restants, són considerats temps 5', temps 10', temps 20', temps 30' i temps 60' i contenen una concentració proteica 100nM. Aquestes referències de temps indiquen que la primera mostra de proteïna ha estat afegida al cultiu en el temps 60' i durant el transcurs d'aquesta hora, s'ha anat introduint la proteïna a la resta de pous en els temps

---

<sup>52</sup> Pas de les molècules de fora a dins de la cèl·lula.

<sup>53</sup> Aquestes referències de temps (en minuts) serviran per posteriorment, realitzar el Bradford i veure si en algun moment les cèl·lules han internalitzat la proteïna.

indicats, de manera que, l'últim pou, només conté proteïna durant 5 minuts. Així doncs, l'anàlisi dels resultats de l'assaig permetran comprovar quant temps necessita la cèl·lula per internalitzar la proteïna.

Dades per la sembra d'HT1080 al p.16:

- 6 pous (els càlculs es realitzen sobre 7 pous per obtenir volum en excés)
- Densitat cel·lular: 250.000 cèl·lules/pou (és necessària una densitat cel·lular elevada per poder extreure una quantitat de proteïna suficient per veure si aquesta ha estat internalitzada per les cèl·lules).
- Comptatge: 1.672.500 cèl·lules/ml
- Volum final/pou: 1ml/pou = 1000µl/pou

Càlcul del volum necessari de cultiu cel·lular:

$$250.000 \text{ cp}^{54} \times 7 \text{ pous} = 1,75 \cdot 10^6 \text{ cèl·lules/placa}$$

Nº de µl necessaris a sembrar a la placa per tenir 1,75.10<sup>6</sup> cèl·lules/placa:

$$1,75 \cdot 10^6 \frac{\text{cèl} \cdot \text{lules}}{\text{placa}} \cdot \frac{1 \text{ ml}}{1672500 \text{ cèl} \cdot \text{lules}} = 1,04633 \text{ ml/placa}$$

$$1,04633 \frac{\text{ml}}{\text{placa}} \cdot \frac{1000\mu\text{l}}{1\text{ml}} = \mathbf{1046,33\mu\text{l} / \text{placa}}$$

Càlcul del volum total:

$$7 \text{ pous} \times 1000\mu\text{l/pou} = 7.000 \mu\text{l/placa}$$

Càlcul del volum de medi (DMEM + 10% FCS):

**Volum total = volum cèl·lules + volum medi**

---

<sup>54</sup> Cèl·lules/pou



7.000µl v. total = 1046,33µl v. cèl·lules + v. medi

7.000 – 1046,33 = 5953,67µl medi

$5953,67\mu\text{l medi} \cdot \frac{1\text{ ml}}{1000\mu\text{l}} = \mathbf{5,95367\text{ ml DMEM} + 10\% \text{ FCS}}$

Dades de la quantitat de proteïna X necessària:

- 6 pous (només hi ha 5 pous als quals se'ls afegeix proteïna ja que el restant és el control, tot i així, els càlculs es realitzen sobre 6 pous per obtenir volum en excés).
- La proteïna X en estoc té una concentració inicial de  $100\mu\text{M}$  o el que és el mateix,  $100000\text{nM}$  mentre que la concentració final ha de ser de  $100\text{nM}$ .
- Volum final de X amb medi/pou =  $500\mu\text{l}$  de X amb medi/pou
- Equivalències utilitzades:  $100\mu\text{M} = 100000\text{nM}$

$$100\text{nM} = 0,1\mu\text{M}$$

Càlculs de la quantitat de proteïna X necessària:

$500\mu\text{l de X amb medi/pou} \times 6 \text{ pous} = 3000\mu\text{l de X amb medi/placa}$

Amb la fórmula següent es calcula la quantitat de volum de proteïna X en estoc necessària:

$$v_i \cdot c_i = v_f \cdot c_f \quad ^{55}$$

$$v_i \cdot 100000\text{nM} = 3000\mu\text{l} \cdot 100\text{nM}$$

$$v_i = \frac{3000\mu\text{l} \cdot 100\text{nM}}{100000\text{nM}} = \mathbf{3\mu\text{l de X en estoc} + 3\text{ ml DMEM } 3\% \text{ FCS}} \quad ^{56}$$

---

<sup>55</sup>  $v$  = volum,  $c$  = concentració,  $i$  = inicial,  $f$  = final.

<sup>56</sup> S'utilitza DMEM+3% FCS en lloc del medi complet d'ús habitual per les HT1080 (DMEM+10% FCS), ja que conté una quantitat de sèrum inferior i, per tant, les cèl·lules reben menys nutrients, essent les condicions de vida més forçades. Això, podria afavorir a la internalització de les proteïnes.

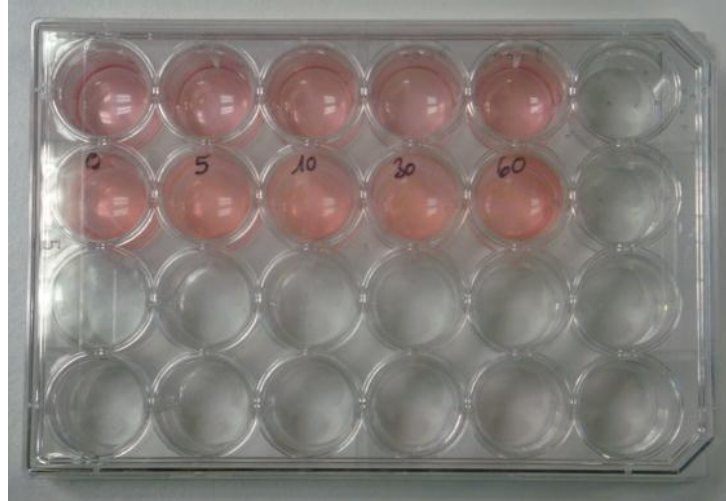


Fig. 41 Placa de cèl·lules HT1080 per fer l'extracció de proteïna.<sup>57</sup>

### **9.1. Extracció de proteïna X de la sembra d'HT1080**

#### **Objectiu**

L'objectiu d'aquesta pràctica és fer l'extracció de proteïna X. Anteriorment, s'han sembrat les cèl·lules HT1080 deixant-les un dia per a que s'adhereixin a la placa i, al dia següent, s'ha introduït la proteïna X en el cultiu, complint els temps explicats.

#### **Materials i aparells**

- Centrífuga
- Eppendorfs (amb temps marcats)
- Pipetes
- Vòrtex
- Gel

---

<sup>57</sup> En aquesta placa no surt el temps 20' ja que afegir-lo fou una decisió d'últim moment i aquesta imatge és anterior.

## Productes

- Tampó de lisi (RIPA)
- Tampó PBS 1x

## Procediment

Primerament, cal preparar una solució tampó, anomenada RIPA, que permetrà lisar la cèl·lula per extreure la proteïna. El que fa aquesta solució és trencar la membrana de la cèl·lula i, per tant, provoca l'apoptosi. Partint de 10 ml de tampó RIPA estoc i afegint els productes següents inhibidors de proteases<sup>58</sup> es prepara la solució de treball:

- 100µl de PMSF
- 100µl de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (*ortovanadat sòdic*)
- 20µl de NaF

Abans de fer l'extracció proteica cal fer 3 rentats a cada pou amb 1ml de tampó PBS1x. A continuació, es procedeix a la lisi de les cèl·lules:

1. Afegir 45µl de tampó RIPA a cada pou.

---

<sup>58</sup> És necessari utilitzar inhibidors de proteases ja que quan a la cèl·lula se li trenca la membrana activa diferents vies de supervivència (vies S.O.S.) per evitar la mort cel·lular. Una d'elles és la formació i l'activació de les proteases, enzims que degraden proteïnes. Aquestes, però, són poc específiques perquè la cèl·lula està reduint la seva eficiència i, per tant, degraden totes les molècules, sense distingir les que han entrat a la cèl·lula pel trencament de la membrana i li poden resultar nocives, d'aquelles que, per contra, li són beneficioses. Així, la cèl·lula podria arribar a degradar la proteïna X introduïda i, per tant, són necessaris inhibidors que inactivin la funció d'aquestes proteases.

2. Rascar literalment amb una punta de pipeta per tal de desenganxar les cèl·lules dels pous.
3. Recollir el màxim de cèl·lules i volum intentant no fer bombolles donat que a les bombolles es queda proteïna atrapada.
4. Deixar la solució 30 minuts en gel, mentre que, amb l'ajuda del vòrtex, cada 10 minuts es lisen les cèl·lules mecànicament.



Fig. 42 Vòrtex

5. Centrifugar a 13000 rpm i a 4°C durant 15 minuts per tal de separar el pellet, és a dir, les restes cel·lulars (DNA, membrana...) del sobrenedant, la proteïna.
6. Agafar el sobrenedant i descartar el pellet.
7. Les mostres amb els diferents temps marcats es guarden a -20°C fins el dia següent per fer la electroforesi i el Western Blot.

## **9.2. Electroforesi en gels de poliacrilamida en presència de SDS<sup>59</sup> (SDS-PAGE)**

La electroforesi és una tècnica de transport sota l'acció d'un camp elèctric d'aquelles molècules tals com les proteïnes, que posseeixen càrrega elèctrica. Aquest tipus de càrrega dóna a la molècula mobilitat electroforètica, entesa com la velocitat de migració per unitat de camp. És variable segons la càrrega, la forma i la mida

---

<sup>59</sup> (Dodecilsulfat de sodi). Tipus de detergent.

d'aquestes molècules. Per fer una electroforesi és necessària una font d'alimentació que proporcioni el camp elèctric, mitjançant dos electrodes, positiu (ànode) i negatiu (cànode). Entre aquests, s'estableix una diferència de potencial, és a dir, una distància entre electrodes mesurada en volts, que determinarà la velocitat de migració de les molècules (a major voltatge, major velocitat de migració). També s'ha d'utilitzar una cubeta on se situen els electrodes, el suport electroforètic i un tampó d'electroforesi. Aquest últim component, és essencial en la realització de la electroforesi ja que durant el procés es produeix electròlisi de l'aigua, és a dir, es generen protons en el ànode i ions hidroxil (OH) en el cànode. Sense el tampó, doncs, el pH del medi, variaria i influiria en tot el procés.

Actualment, es realitzen *electroforesis zonals* on la mostra es diposita en una zona reduïda del suport i, posteriorment, el va recorrent impulsada pel camp elèctric. El tipus d'electroforesi zonal que es realitza depèn d'aquest suport, el qual ha d'impedir la difusió i la convecció, permetent l'entrada d'aigua i el pas de molècules voluminoses com les proteïnes. En aquest cas, el suport que dóna nom al tipus d'electroforesi realitzat és el gel de poliacrilamida (*PAGE*, de l'anglès *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). Aquest, es caracteritza per participar en el procés de separació de les proteïnes donat que conté porus, la mida dels quals és similar al de les proteïnes. Així, crea un efecte de tamisat molecular que permet la separació electroforètica segons la densitat de la càrrega i la mida de les molècules (les de mida gran tenen més dificultat per avançar que les petites). La electroforesi en gels de poliacrilamida és el mètode zonal més utilitzat degut als nombrosos avantatges que presenta el suport:

- La seva transparència permet observar el procés amb més facilitat.
- Presenta estabilitat en un ampli interval de pH, temperatura i força iònica.

- Són mecànicament estables ja que poden ser deshidratats i emmagatzemats en forma de pel·lícula fina.
- Permeten preparar-se amb porus de mida molt variada i per tant, es poden separar proteïnes molt diverses.

Els gels de SDS-poliacrilamida es divideixen en dues parts: el gel superior o empaquetador (“stacking gel”) i el gel inferior o separador (“running gel”). El gel superior conté una proporció d'acrilamida més baixa que el gel de separació i el pH és inferior perquè així les molècules trobin menys impediments i corrin més ràpides. Això, originarà una acumulació de material en el límit dels dos gels i la mostra entrarà suaument en el running, donant lloc a bandes molt fines, augmentat la resolució. D'aquesta manera, les mostres comencen a córrer al mateix moment i s'evita la difusió.

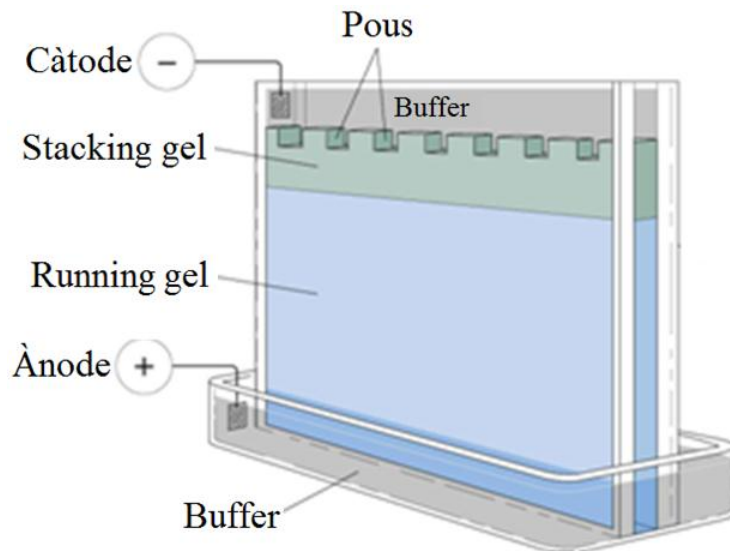


Fig. 43 Esquema de la cubeta d'electroforesi

## Objectiu

L'objectiu d'aquesta electroforesi és separar i visualitzar les diferents proteïnes de l'extracte cel·lular. En aquest cas, el pes molecular de la proteïna X ja és conegut: 11KDa<sup>60</sup>. Tal i com mostra la *Taula 7*, degut a que el pes de la proteïna X es troba entre 10 i 20 KDa, el *running gel* ha de tenir un percentatge d'acrilamida del 12%, mentre que el *stacking gel* sempre es prepara a una concentració del 4% d'acrilamida. Tot i que només es necessita un gel, s'elaboraran dues rèpliques en previsió de que, degut a algun possible error experimental, un d'ells pugui no ser útil.

<b>KDa</b>	<b>% Acrilamida</b>
<10	15
<b>10-20</b>	<b>12</b>
20-50	10
50-60	7,5

*Taula 7 Relació entre el pes molecular de la proteïna d'interès i el % d'acrilamida necessari.*

## Materials i aparells

- Cubeta d'electroforesi
- Suport (amb connexió pels electrodes)
- Suport per preparar gels
- Separadors de vidre d'1,5 cm de gruix.
- Pinta d'1,5 de gruix i 10 pous.
- Pipetes automàtiques
- Font d'alimentació
- Guies per la càrrega de mostres
- Espàtula
- Gel

---

<sup>60</sup> KiloDalton. 1 KDa=1000 Da, corresponent a una dotzena part de la massa de l'isòtop 12 del carboni. Es poden expressar en Kg/mol.

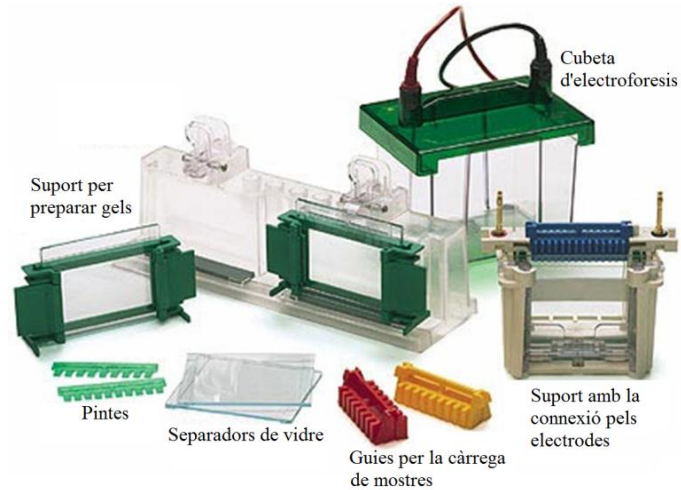


Fig. 44 Alguns dels materials i aparells necessaris per la electroforesi.

### Productes

- Alcohol
- Isopropanol
- Aigua Milli-Q<sup>61</sup>
- Tampó d'electroforesi "Running Buffer"
- Marcador de pes molecular
- Tampó de càrrega 4x

Running gel 12%		➔	Stacking gel 4%	
Acrilamida 30%	6,666 ml		Acrilamida 30%	1,3 ml
H <sub>2</sub> O Milli-Q	5,58 ml	H <sub>2</sub> O Milli-Q	6,1 ml	
TRIS-HCl pH 8,8 1,5 M	4,166 ml	TRIS-HCl pH 6,8 0,5 M	2,5 ml	
SDS 10%	166,66 µl	SDS 10%	100 µl	
Amonium persulfate 10%	149,6 µl	Amonium persulfate 10%	50 µl	
TEMED <sup>62</sup>	33,32 µl	TEMED	20 µl	

Taula 8 Volums per 2 gels d'1,5 cm de gruix

<sup>61</sup> Aigua destil·lada desionitzada.

<sup>62</sup> Tetrametilendiamida. Reactiu que polimeritza la formació de poliacrilamida per unió de monòmers d'acrilamida.



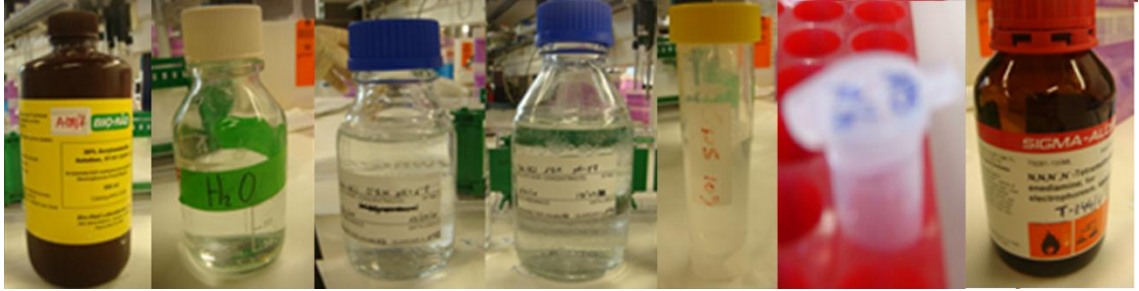


Fig. 45 D'esquerre a dreta, Acrilamida 30%, H<sub>2</sub>O Milli-Q, TRIS HCl pH 6,8 i 0,5M, TRIS HCl pH 8,8 i 1,5 M, SDS 10%, Amonium persulfate 10% i TEMED.

## Procediment

### Preparació del suport

La electroforesi s'inicia amb la preparació del suport. En aquest cas, cinc dies abans de posar en pràctica la tècnica, s'han preparat els gels de SDS-poliacrilamida:

1. Netejar els suports de vidre amb alcohol.
2. En els suports de vidre i per separat, preparar la barreja del *running gel* i el *stacking gel*. És important seguir l'ordre que indica la *Taula 8*, ja que el TEMED ha d'iniciar la polimerització en el moment adequat.
3. Afegir unes gotes d'isopropanol per engrasar<sup>63</sup> i poder eliminar les possibles bombolles que s'hagin format.
4. Deixar polimeritzar.
5. Eliminar l'isopropanol, assecar amb paper de filtre i afegir el *stacking gel* sobre el *running gel*.
6. Posar la pinta de manera que no quedin bombolles d'aire.

<sup>63</sup> Omplir el recipient fins a la marca de la quantitat desitjada.



Fig. 46 Gels d'electroforesi.

Quan el gel ja ha estat gelificat es pot prosseguir a muntar la cubeta:

7. Treure la pinta intentant no trencar els gels.
8. Netejar els pous amb aigua, procurant no fer-los malbé.
9. Muntar la cubeta amb els gels afegint el tampó “*Running buffer*” fins a la meitat.

#### Preparació de mostres per carregar el gel

1. Transcorregudes 24h després de l'extracció de proteïna dels pous, posar les mostres en gel, i afegir tampó de carrega 4x. Aquest tampó, farà que totes les proteïnes corrin a través del gel segons el pes molecular, a més de permetre visualitzar aquest procés gràcies al color blau que li aporta el *bromofenol blue* del qual està format.
2. Bullir les mostres durant 5minuts i a 95°C per tal de desnaturalitzar les proteïnes.



*Fig. 47 Aparell per bullir les mostres.*

3. Posar les mostres en gel durant 2 minuts per evitar la renaturalització.



*Fig. 48 Eppendorfs en gel i marcats amb el temps de la mostra de proteïna corresponent.*

4. Fer una centrifugació ràpida de 7 segons per a que baixi tot el volum al fons del tub.

### Electroforesi

1. Carregar 4 $\mu$ l de marcador de pes molecular per tal de saber a quina alçada corren les mostres, aquest doncs, s'estableix a mode de control.
2. Amb l'ajuda de les guies, carregar 45  $\mu$ l a cada pou de les mostres de proteïna que es tenen marcades amb els temps corresponents (només es carrega un dels dos

gels). S'ha de vigilar que la mostra no surti del pou ni que passi d'un pou a un altre.

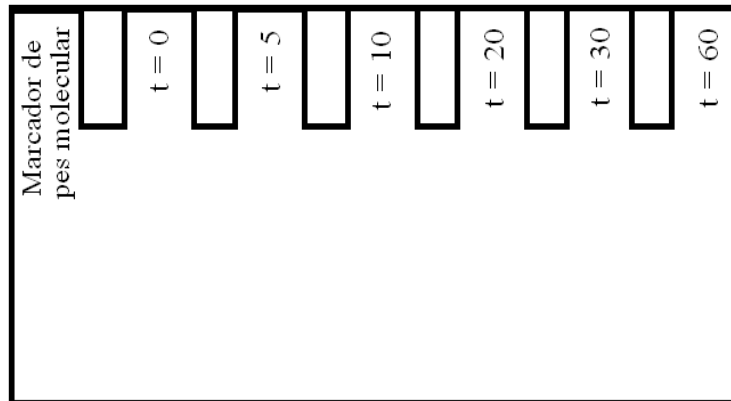


Fig. 49 Esquema de la cubeta d'electroforesi amb els pous marcats amb cada mostra de proteïna.



Fig. 50 Càrrega de les mostres de proteïna X.

3. Inmediatament després de la càrrega de les mostres, connectar la cubeta a la font d'alimentació durant una hora i a 150V. L'ànode, el born vermell, s'ha de connectar de la font de tensió a la cubeta interior mentre que el càtode, el born negre, ha d'anar al dipòsit exterior. És important no deixar les mostres carregades més temps del compte per a que no es produeixi difusió. Per evitar que les proteïnes s'escapin del gel es fa servir els fronts de control, com el front blau que indicarà que les proteïnes petites no hagin caigut.

4. Desconnectar la cubeta de la font d'alimentació, treure el tampó i amb l'ajuda d'una espàtula, treure els vidres que aguanten els gels.

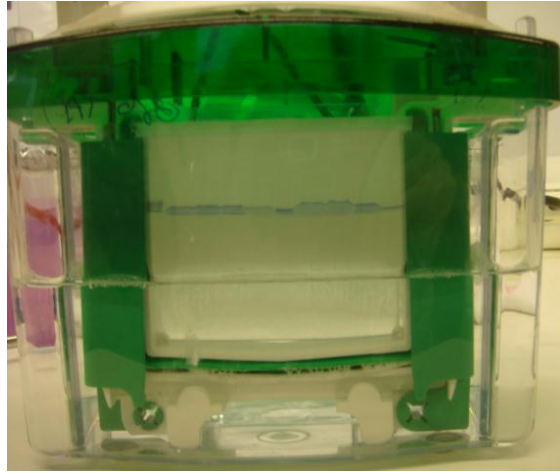


Fig. 51 Mostres de proteïna corrent durant la electroforesi.

Tal i com s'esmentava anteriorment, la proteïna té un pes molecular de 11kDa i per tant, durant la electroforesi, s'ha hagut de vigilar que mentre corrien les proteïnes, la banda 10 del marcador de pes molecular que indica la presència de proteïnes entre 6 i 14,8 KDa no arribés a caure per no perdre proteïnes X.

	Nº banda	Pes molecular
1	1	181.8 kDa
2	2	115.5 kDa
3	3	82.2 kDa
4	4	64.2 kDa*
5	5	48.8 kDa
6	6	37.1 kDa
7	7	25.9 kDa
8	8	19.4 kDa
9	9	14.8 kDa
10	10	6.0 kDa

\*Banda rosa d'orientació

Fig. 52 Bandes o fronts que orienten en la posició de les proteïnes segons el seu pes molecular.

### 9.3. Transferència dels gels a una membrana de PVDF

#### Objectiu

Un cop acabada la electroforesi, cal transferir les proteïnes separades que es troben en el gel per facilitar el treball d'immunodetecció, és a dir, la posterior detecció de proteïnes amb anticossos.

#### Materials i aparells

- Gels d'electroforesi que ja han corregut
- Membrana de PVDF
- 2 papers de filtre
- 2 espongetes
- Rodet
- Cubeta de transferència
- Suport on s'enganxen els electrodes
- Pinces
- Paleta
- Gel
- Agitador

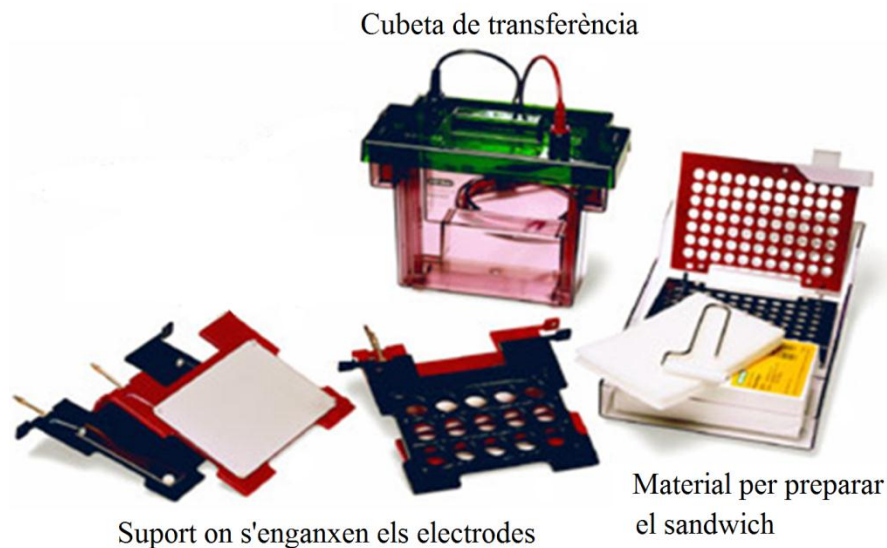


Fig. 53 Alguns dels materials i aparells necessaris per la transferència del gel a una membrana.

## Productes

- Metanol al 100%
- Tampó de transferència 1x
- Ponceau
- Àcid acètic
- Comassie
- Aigua Milli-Q
- Aigua destil·lada

## Procediment

1. Retallar una membrana de PVDF de 6,5 x 8,5.
2. Hidratar la membrana seguint el següent procediment i manipulant-la sempre amb pinces:
  - 3 minuts en metanol 100%.
  - 10 minuts en aigua destil·lada.
  - Es deixa en tampó de transferència fins a la seva utilització.
3. Mular dos papers de filtre prims i dues espongetes en tampó de transferència.
4. Fer el muntatge de la transferència:

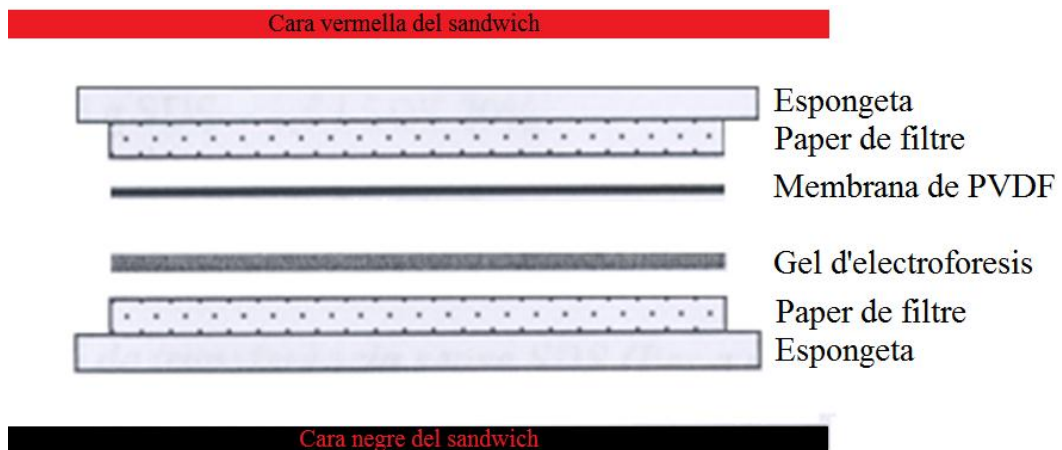


Fig. 54 "Sandwich" per fer la transferència.



Durant el muntatge, i amb l'ajuda del rodet, s'han d'anar eliminant les possibles bombolles d'aire que impedeixen que el corrent elèctric passi i es realitzi la transferència.

5. Tancar el “sandwich” i posar-lo dins del suport, amb la cara negra i la vermella d'aquest tocant la part negra i la vermella del suport, respectivament. És molt important que es col·loqui d'aquesta manera per tal que les proteïnes es transfereixin a la membrana i no pas a un altre element del “sandwich”.
6. Posar-ho tot dins la cubeta i cobrir amb tampó de transferència 1x fins a dalt.
7. Posar la cubeta en gel ja que durant la transferència es desprèn molta calor.
8. Connectar la cubeta a la font d'alimentació durant 45 minuts a 350mA<sup>64</sup>
9. Desconnectar la cubeta de la font d'alimentació i desmuntar el “sandwich”.
10. Posar la membrana en Ponceau per comprovar la transferència i el gel en aigua destil·lada per rentar-lo, deixant-ho tot a l'agitador.



*Fig. 55 Agitador*

11. Comprovar que la transferència s'ha produït correctament vigilant que no hi hagi bombolles.

---

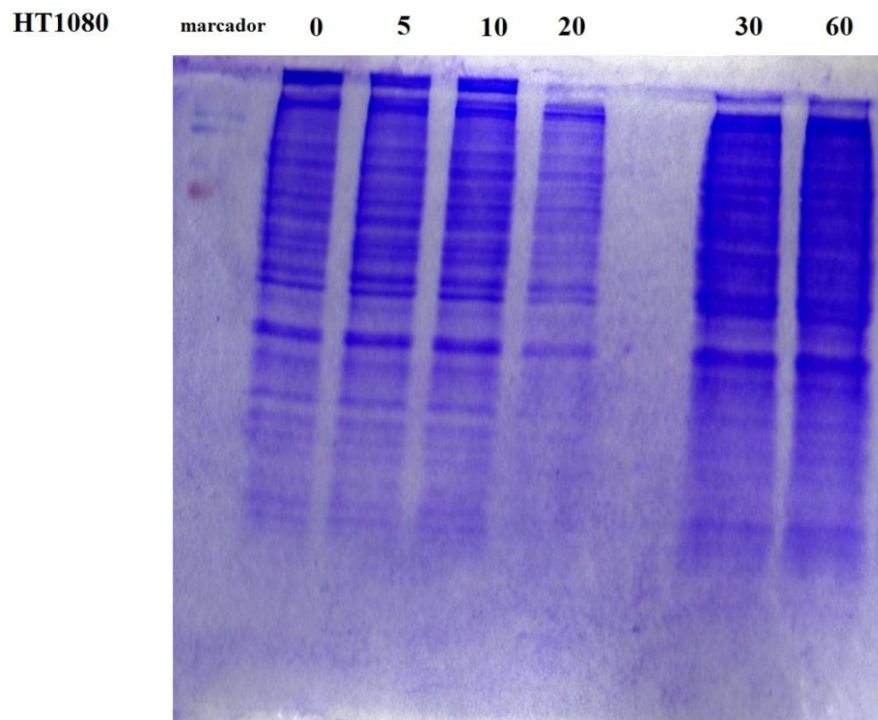
<sup>64</sup> MiliAmpers. Unitat d'intensitat del corrent elèctric.



12. Destenyir la membrana amb àcid acètic.
13. Deixar la membrana en agitació i submergida en aigua Milli-Q fins que s'afegeix el bloqueig.
14. Tenyir el gel en Comassie que, gràcies al seu color blau, permetrà veure el que no s'ha transferit a la membrana.
15. Assecar el gel.



*Fig. 56 Assecador de gels*



*Fig. 57 Gel d'electroforesi assecat. Les línies blaves són les proteïnes que han corregut en el gel en cada temps (en minuts) indicat.*

#### **9.4. Immunodetecció de membranes**

Els anticossos (Ab) o immunoglobulines<sup>65</sup> (Ig) són glicoproteïnes<sup>66</sup> globulars pertanyents al sistema immunitari<sup>67</sup>. La seva funció es basa en identificar i eliminar cossos estranys que poden perjudicar a l'organisme, tals com bacteris, virus o paràsits. Aquests, són sintetitzats per un tipus de leucòcit anomenat *limfòcit B* i la seva producció és la funció principal del sistema immunitari humoral. L'estructura típica d'un anticòs està formada per la unitat bàsica, anomenada monòmer d'immunoglobulina, que a la vegada es compon en dues unitats estructurals d'un total de 150.000 KDa de pes. Cadascuna d'aquestes unitats divideix el seu pes en una *cadena pesada* de 50.000 KDa i una *cadena lleugera* de 25.000 KDa, unides per enllaços disulfur. En elles es distingeixen les regions constants i les regions variables. Aquestes últimes, contenen la *regió hipervariable (CDR)*, localitzada a la part apical de l'anticòs, que aporta la gran diversitat d'immunoglobulines existents i permet la unió específica d'aquesta regió amb la seva diana, l'antigen (Ag). La part de l'antigen que la regió hipervariable té capacitat per identificar i a la qual s'uneix és anomenada epítop. L'existència d'aquesta, doncs, facilita al sistema immunitari la detecció de gran quantitat d'antígens i l'elevada especificitat dels anticossos permet l'eliminació de gran varietat d'agents patògens.

---

<sup>65</sup> El terme anticòs és més utilitzat per a designar la funció mentre que immunoglobulina fa referència a l'estructura.

<sup>66</sup> Proteïnes amb cadenes de glúcids unides a determinats aminoàcids.

<sup>67</sup> Conjunt de mecanismes d'un organisme que el protegeixen contra les malalties per mitjà de la identificació i eliminació de patògens i cèl·lules tumorals.

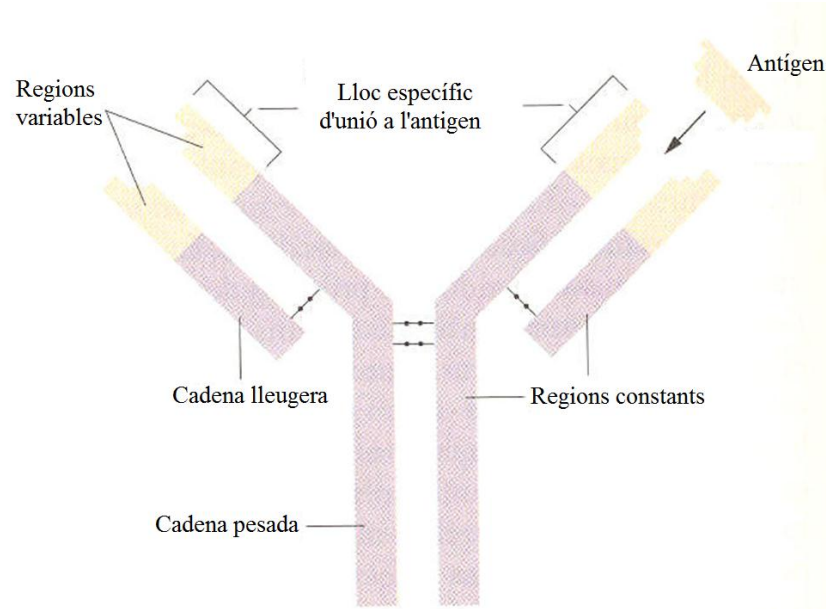


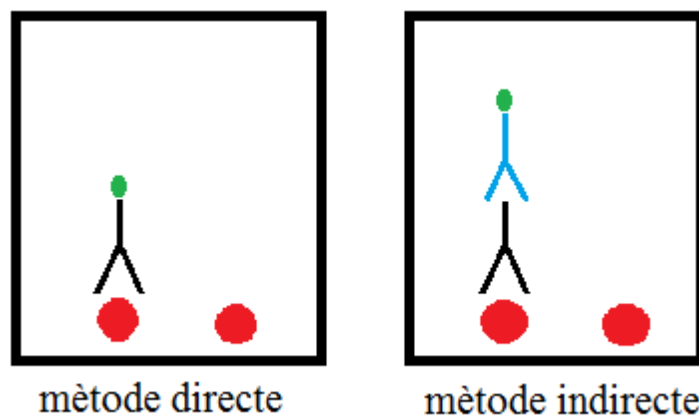
Fig. 58 Estructura d'un anticòs

A la vegada, les infeccions són minimitzades gràcies a la supervivència durant anys de determinats limfòcits B, els quals permeten al sistema immunitari recordar els antígens i actuar en futures exposicions a aquests de manera ràpida i eficaç. Moltes malalties, doncs, són diagnosticades mitjançant proves clíniques que determinen nivells alts d'anticossos que lluiten contra els antígens.

En investigació científica, els anticossos purificats tenen moltes aplicacions: són utilitzats per identificar i localitzar proteïnes intracel·lulars i extracel·lulars; per diferenciar els tipus cel·lulars segons les proteïnes que expressen; en la tècnica *Western Blot*, per identificar proteïnes separades per electroforesi, etc. Es poden utilitzar anticossos monoclonals o policlonals purificats. Els primers, en aquest cas, són produïts en ratolí i es caracteritzen per ser idèntics i específics per a un únic epítop d'un antígen. Provenen de la hibridació d'un limfòcit B descendent d'una única cèl·lula mare i una cèl·lula plasmàtica tumoral. Els anticossos policlonals, en canvi, se solen obtenir del sèrum del conill. Així, després d'immunitzar l'animal amb

una determinada proteïna, s'aconsegueix un "pool" de molts anticossos que tenen capacitat per reconèixer una mateixa proteïna per diferents epítops.

La immunodetecció de membranes és un mecanisme que permet detectar bandes de proteïnes en una membrana de PVDF utilitzant anticossos específics per a cada tipus de proteïna que es vol detectar. Per fer-ho, existeixen bàsicament dos mètodes: el mètode directe i el mètode indirecte. El primer, utilitza un únic anticòs monoclonal marcat amb una molècula que detecta, únicament, la proteïna per la qual és específic. Posteriorment, mitjançant la tècnica Western Blot i, gràcies a que aquest anticòs porta el marcatge que el permet reconèixer, es detecta el complex proteïna-anticòs. Degut a que els anticossos són específics i, per tant, han de ser diferents segons la proteïna que es pretén detectar i, a la vegada, tots ells necessiten diferents marcatges, el mètode directe té un cost molt elevat i s'utilitza poc. El mètode indirecte, en canvi, usa un anticòs primari monoclonal específic per la proteïna sense estar marcat i un altre anticòs secundari policlonal marcat que s'uneix a l'anticòs primari. Degut a que aquest anticòs secundari marcat té capacitat per unir-se a molts primaris i, per tant, el mateix tipus d'anticòs secundari marcat pot ser usat en molts processos immunodetecció, el cost del procés és inferior i conseqüentment, és el més utilitzat.



*Fig. 59 Mètodes de detecció de proteïnes. En vermell, proteïna; en negre, anticòs primari monoclonal; en blau anticòs secundari policlonal i en verd, marcatge de l'anticòs.*

## **Objectiu**

Després de fer l'electroforesi i transferir-ne els gels a una membrana, aquests contenen, a més de la proteïna X, totes les altres proteïnes pròpies del extracte cel·lular d'HT1080 amb el qual s'ha treballat. Mitjançant la immunodetecció de membranes, doncs, es podran observar les bandes de la proteïna d'interès, la X. Per fer-ho s'usarà el mètode de detecció indirecte, incubant la membrana amb l'anticòs primari 4B12 (produït a *Leitat*), específic per la proteïna X, i un anticòs secundari marcat amb un enzim que detectarà el 4B12. La unió de l'anticòs i la proteïna es detectarà mitjançant la tècnica Western Blot.

## **Materials i aparells**

- Agitador
- Cassettes
- Cubetes
- Pel·lícula fotogràfica
- Pinces

## **Productes**

- Llet en pols
- Tampó TBS-1% Tween 20
- Anticòs primari i secundari
- Reactiu ECL

## **Procediment**

1. Incubar la membrana amb 5gr de llet en pols diluïda en TBS-1% Tween 20 a temperatura ambient durant 30 minuts. La llet és un producte que conté gran

quantitat de proteïnes que s'enganxen inespecíficament a la membrana, per tant, l'ús de la llet permet bloquejar unions inespecífiques de l'anticòs 4B12.

2. Per preparar l'anticòs primari 4B12 es fa una dilució 1/5000 de l'anticòs en 10 ml de TBS-1% Tween 20 + 5% de llet en pols (2µl). Aquest serà l'anticòs que detecti la proteïna X.
3. Es deixa tota la nit en agitació a la càmera freda a 4°C.
4. Al dia següent, fer 3 rentats de 10 minuts amb tampó TBS-1% Tween 20. (Entre cada rentat deixar-ho a l'agitador).
5. Afegir l'anticòs secundari (volum final = 12 ml diluït en TBS-1% Tween 20 + 5% llet en pols) i deixar-lo en agitació durant 1 hora a temperatura ambient.
6. Transcorregut el temps d'incubació de l'anticòs secundari, fer tres rentats amb tampó TBS-1% Tween 20 durant 10 minuts.
7. Afegir a la membrana 2ml d'ECL i deixar reaccionar durant un minut en una cubeta nova.

El ECL fa referència a un kit comercial dissenyat específicament per a revelar membranes i poder visualitzar la senyal a les pel·lícules fotogràfiques. Aquest, és un mètode que utilitza quimioluminescència<sup>68</sup> d'alta sensibilitat que detecta anticossos marcats amb HRP (*Horseradish peroxidase*), l'enzim peroxidasa de rave. Els anticossos secundaris utilitzats a *Leitat* estan marcats amb aquesta molècula. El kit consisteix en dues ampolles de les quals s'ha de barrejar 1:1 de cada ampolla, és a dir, 1ml d'una ampolla + 1ml de l'altra ampolla. En posar-ho a

---

<sup>68</sup> Fenomen que es produeix en algunes reaccions químiques on l'energia alliberada no només s'emet en forma de calor o energia química sinó en forma de llum.





*Fig. 61 Revelatge del Western Blot.*

10. Dibuixar el marcador de pes molecular per valorar resultats.

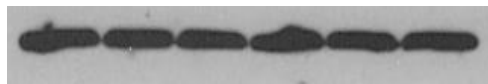


### **9.5. Resultats i interpretació de l'assaig d'internalització de la proteïna X en les cèl·lules HT1080**

Una vegada fet tot aquest procés i revelat el Western Blot, s'aconsegueix una pel·lícula amb els resultats de la internalització de la proteïna X en les cèl·lules HT1080 següents:

#### **HT1080**

t = 0' 5' 10' 20' 30' 60'



55kDa TUBULINA



11kDa proteïna X

Fig. 62 Pel·lícula del revelatge del Western Blot.

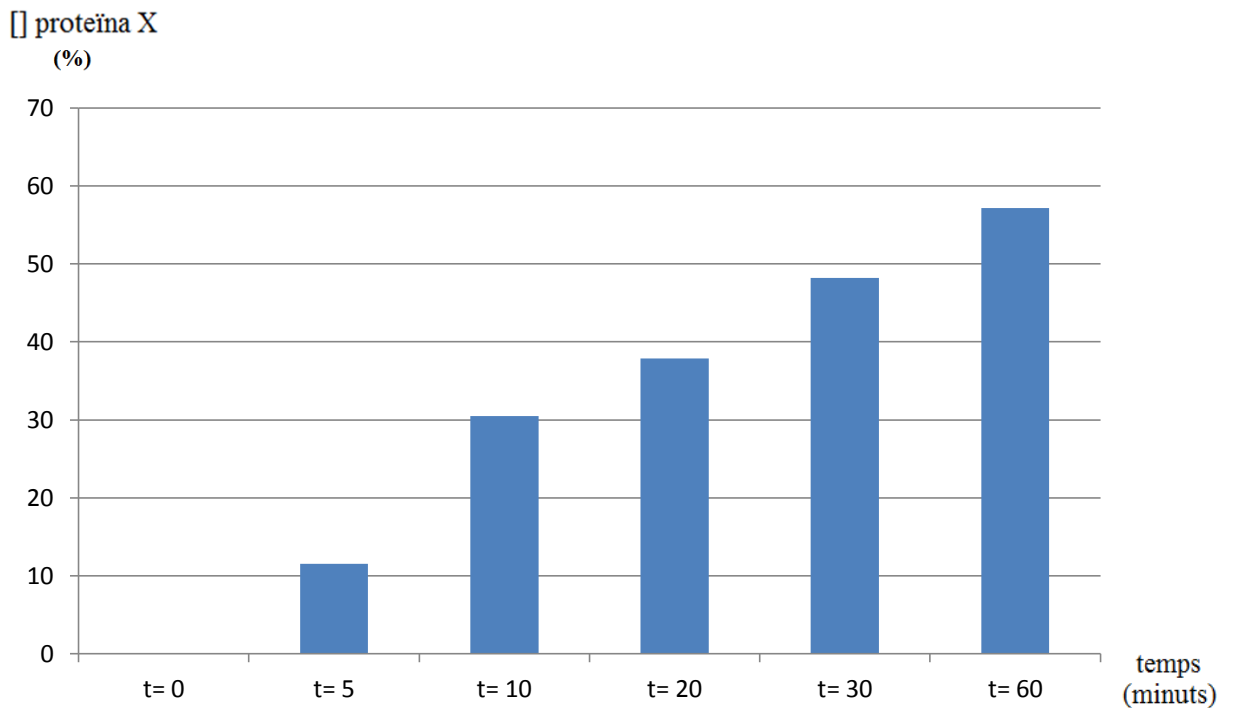


Fig. 63 Percentatge de proteïna X internalitzada per les cèl·lules HT1080 a cada temps.

Tal i com s'esmentava en la introducció al mètode experimental, bibliogràficament s'ha demostrat que la proteïna X té capacitat per realitzar funcions extracel·lulars i intracel·lulars, gràcies a la seva configuració tridimensional. Cal recordar que l'objectiu principal d'aquest treball és esbrinar en quin moment s'inicia el procés d'internalització de la proteïna X en la línia cel·lular tumoral HT1080, deixant de banda el tipus de transport que la cèl·lula utilitzi per internalitzar-la i recordant que, tal i com es demostrava en el revelatge del Western Blot de la introducció (*Fig. 31*), inicialment aquesta línia cel·lular no expressa la proteïna en qüestió. Un cop finalitzat l'assaig, el revelatge del Western Blot (*Fig. 62*) ha permès veure que la proteïna X té una elevada capacitat d'internalització. Això es demostra observant que en el temps 5' ja es detecta una concentració del 10% de proteïna X dins les cèl·lules HT1080 (*Fig. 63*), és a dir, que la proteïna no necessita més de cinc minuts per iniciar la seva entrada a la cèl·lula. A més a més, és fàcilment visible en la pel·lícula del Western Blot, on s'observen taques negres que indiquen una determinada concentració de proteïna X en cada temps (les concentracions que apareixen en el gràfic). Aquest gràfic s'ha fet utilitzant un programa anomenat *Image J* que està dissenyat específicament per quantificar bandes de pel·lícules de Western Blot, fent l'increment de proteïna X en funció de la tubulina, una proteïna el revelatge de la qual s'estableix com a control. Concretament, la tubulina és una proteïna que forma part dels microtúbuls del citoesquelet que té un pes molecular de 55 KDa i s'expressa en forma constitutiva a la cèl·lula. Això vol dir que és expressada per uns gens que tots els estirps cel·lulars necessiten activar per a fer les seves funcions i, per tant, la seva regularitat en la cèl·lula permet establir-la a mode de control. L'ús de la tubulina allera que els resultats de l'assaig són fiables, assegurant que la concentració de proteïna X internalitzada en cada temps en les cèl·lules HT1080, no és deguda a

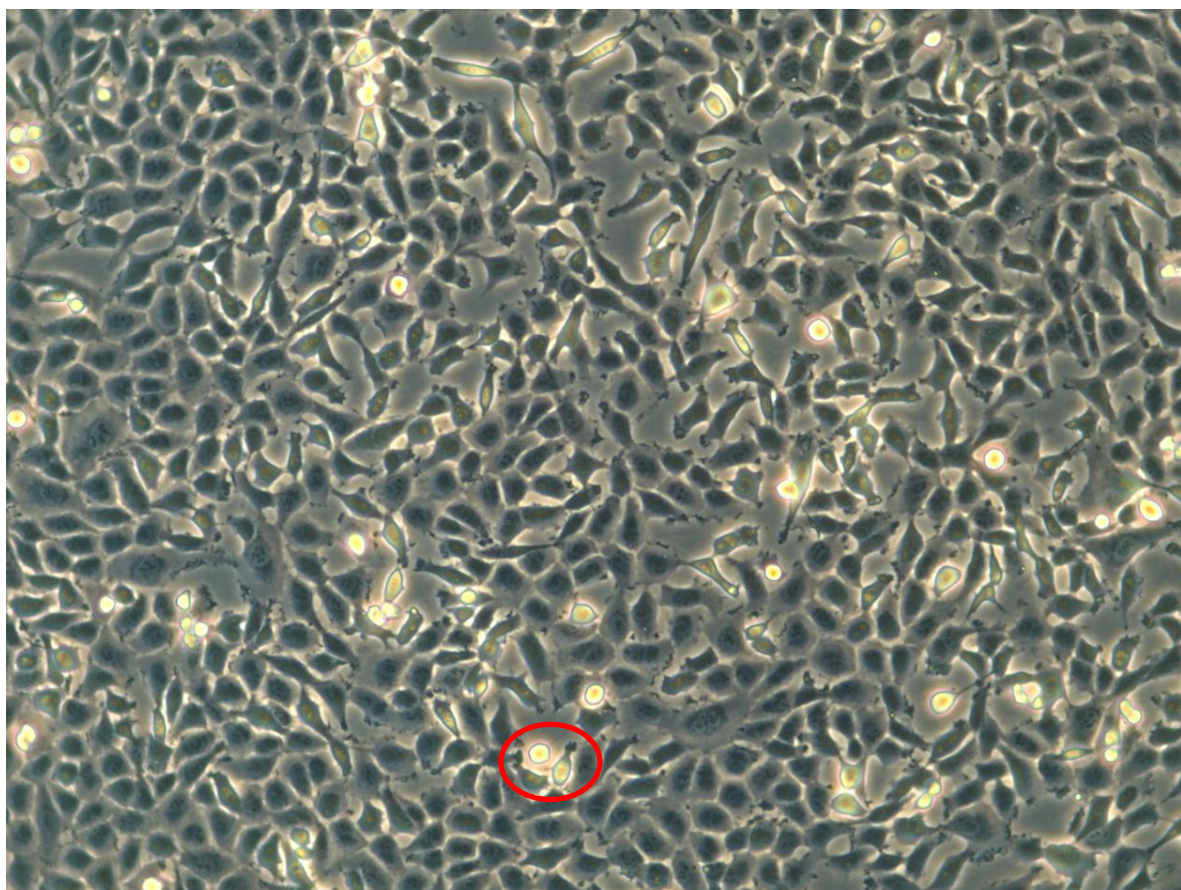
un error experimental durant la sembra de les cèl·lules (un hipotètic error causat perquè no hi hagi la mateixa concentració cel·lular en cada pou, ja que és important que la quantitat de cèl·lules sigui constant). Per entendre com s'estableix la tubulina a mode de control només cal fixar-se en el temps 0' de la pel·lícula obtinguda en el revelatge del Western. En aquest, encara no hi ha presència de proteïna X a l'interior de la cèl·lula i per això no apareix cap taca negra en la banda d'aquesta proteïna (la segona). No obstant, en la primera banda, la referida a la tubulina, sí s'observa una taca negra, és a dir, sí hi ha concentració de tubulina. Donat que sí es detecta aquesta concentració, l'absència de X no és deguda a la poca o nul·la concentració de cèl·lules sinó a la real inexistència de proteïna X internalitzada. El fet que la tubulina sigui constant en les cèl·lules explica que les taques negres de la primera banda siguin pràcticament idèntiques. Així doncs, tal i com s'esmentava fins ara, la proteïna X ha necessitat només cinc minuts per internalitzar-se i, a mesura que ha augmentat el temps d'exposició de la proteïna en les cèl·lules, la concentració també ha augmentat. Es conclou, per tant, afirmant que **el temps òptim per aturar la internalització de la proteïna X en les cèl·lules HT1080 és el temps 5'**. En altres temps, els nivells de concentració de X a les cèl·lules són molt elevats i la seva aturada no asseguraria l'absència de la proteïna X en les cèl·lules HT1080. La interrupció de la internalització de la proteïna s'hauria de fer utilitzant un anticòs específic per aquesta o una molècula química determinada. L'anticòs que aturi la internalització de X en les cèl·lules HT1080 no ha de ser necessàriament el 4B12, utilitzat durant el revelatge del Western Blot per detectar la proteïna en qüestió, sinó que s'hauria de buscar un anticòs que s'uneixi al epítop de la proteïna més adequat per aturar-la (no tots els epítops de la proteïna serien igual d'eficaços per la interrupció de la internalització). El 4B12, per tant, durant el Western Blot utilitza un

epítot determinat per detectar la proteïna que no té perquè ser el millor per aturar la internalització. Així doncs, aquest anticòs només seria funcional per exercir les dues funcions en l'hipotètic cas que l'epítot que utilitzi durant el Western Blot coincideixi amb el més eficaç per aturar la internalització, ja que un mateix anticòs només és específic per a un únic epítot.

Per altra banda, interpretant els resultats obtinguts, es dedueix que, degut a la ràpida internalització de la proteïna en les cèl·lules, les seves funcions intracel·lulars són de major importància que les funcions extracel·lulars, tot i estar comprovat que d'aquest últim tipus també en realitza. Les funcions que fa dins les cèl·lula són les que es relacionen amb la malignitat dels tumor cancerígens. Com es comentava fins ara, l'estudi de com interrompre la internalització és clau en la recerca oncològica ja que podria fer aturar el desenvolupament del tumor. Es podrien elaborar fàrmacs que inhibissin el creixement d'aquest utilitzant les molècules que atuessin la internalització. És per això, que actualment a *Leitat* s'està investigant molt sobre aquesta proteïna, pretenent trobar una teràpia que en bloquegi l'acció extracel·lular. Per cercar aquesta teràpia i ampliar el marge de recerca, també seria important investigar el comportament de la proteïna X sobre altres línies cel·lulars, tals com les HUVEC, amb les quals *Leitat* també treballa i s'ha elaborat el Bradford que es mostrarà a continuació. Aquestes, són unes cèl·lules d'endoteli que fan angiogènesi<sup>70</sup> i, sabent que els tumors s'alimenten de les venes, podrien tenir una funció important en la metastasi del tumor. Així doncs, coneixent el màxim d'informació de la proteïna i el seu comportament en diferents línies cel·lulars, es podria trobar aquest tractament contra el càncer.

---

<sup>70</sup> Veure peu de pàgina número 31.



*Fig. 64 HT1080 vistes al microscopi invertit a 40 augments. S'observa la gran densitat de cèl·lules causada per les mitosis aberrants. En vermell, cèl·lules desenganxades del flascó.*

## **10. BRADFORD DE LÍNIES CEL·LULARS**

La tècnica del Bradford és molt utilitzada en assaigs amb proteïnes ja que permet quantificar la proteïna total que es troba en una mostra determinada de cèl·lules. En l'assaig d'internalització de la proteïna X sobre les cèl·lules HT1080 no ha estat necessari posar en pràctica aquest mètode ja que la quantitat de proteïna X, la única proteïna d'interès en l'assaig, ha estat afegida a l'extracte cel·lular en un inici i per tant, la quantitat ja era coneguda. Tot i això, per aprendre'n la tècnica, s'ha elaborat un Bradford amb diferents línies cel·lulars amb les quals el laboratori *Leitat* també treballa. Així doncs, s'ha utilitzat un cultiu primari<sup>71</sup> de cèl·lules endotelials, les *HUVEC* i les línies cel·lulars tumorals *Mia Paca* i *BXPC3*, pertanyents a tumors de pàncreas, les *SW480* pròpies de càncer de colon i les *Daoy* de medul·loblastoma. En aquest cas, la tècnica permetrà conèixer la quantitat de proteïna que contenen els extractes cel·lulars, independentment de si es tracta de proteïna X o no. Amb aquestes línies cel·lulars també es podria posar en pràctica un assaig d'internalització com l'exposat anteriorment, utilitzant el mateix procediment, és a dir, després de fer el Bradford i extreure la proteïna dels cultius cel·lulars, es posarien a carregar els gels d'electroforesis amb les proteïnes, es faria la transferència a una membrana i la immunodetecció de proteïnes amb la tècnica Western Blot.

Com s'ha esmentat anteriorment, el Bradford és una tècnica per quantificar els extractes proteics. El funcionament d'aquesta tècnica es fonamenta en què quan el reactiu Bradford reacciona amb les proteïnes dels extractes cel·lulars canvia de color

---

<sup>71</sup> Cultiu obtingut directament d'òrgans o teixits animals que permet dividir-lo *in vitro* de cinc a deu vegades.

ja que aquestes s'uneixen al Bradford formant un complex proteïna-reactiu, de tal manera que a major concentració de proteïna major canvi de color. Aquest canvi de color el determina l'absorbància mesurada amb l'espectrofotòmetre. De manera simplificada, el que fa l'espectrofotòmetre és fer incidir una determinada quantitat de llum a la cubeta i després mesura la quantitat d'aquesta llum que la cubeta ha deixat travessar per determinar el canvi de color de la mostra. Per preparar un Bradford cal treballar de manera paral·lela amb les mostres que serviran per fer una recta patró i amb les mostres de línies cel·lulars. La recta patró servirà de model per les mostres que es pretenen quantificar, de tal manera que aquesta és obtinguda a concentracions conegudes de proteïna i permet fer una interpolació de la proteïna present en les mostres. Per preparar la recta patró es fa servir una proteïna model, el BSA (*bovine serum albumin*), a més d'aigua Milli-Q i reactiu Bradford. En el cas de la recta patró el BSA reacciona amb el Bradford i també canvia el color de la dissolució.

### **Objectiu**

Determinar la concentració de proteïna present en les mostres dels extractes cel·lulars *HUVEC*, *Mia Paca*, *BXPC3*, *SW480* i *DaoY*.

### **Materials i aparells**

- Cubetes
- Pipetes
- Eppendorfs
- “Parafilm”
- Espectrofotòmetre

### **Productes**

- Reactiu Bradford
- Aigua Milli-Q

- BSA
- Línies cel·lulars *HUVEC*, *Mia*  
*Paca*, *BXPC3*, *SW480* i *Daoy*.

## Procediment

1. Fer una dissolució 1/5 de reactiu Bradford estoc que està guardat a 4°C, és a dir,  $\frac{5\text{ml de Bradford estoc}}{25\text{ ml totals}} = 5\text{ml Bradford estoc} + 20\text{ ml d'aigua MillQ}$ . S'ha de fer aquesta dissolució perquè el Bradford inicialment està molt concentrat. És important que la concentració de reactiu que s'utilitzarà per fer la recta patró sigui la mateixa que la que s'aplicarà a les mostres. D'aquesta manera, es podrà fer la comparació de les absorbàncies entre elles de manera fiable.
2. Preparar recta patró. Aquesta es prepara en diferents cubetes afegint 1ml de reactiu Bradford i BSA a unes concentracions de 0 (blanc), 3, 7'5, 15, 19'5mg/ml respectivament. De cada concentració de BSA es realitzen dues rèpliques, és a dir, en total hi ha 10 cubetes per preparar la recta patró. Com es pot observar en els valors exposats, la recta patró que es pretén establir presentarà un ampli valor de concentracions de BSA. D'aquesta manera, es podran englobar totes les possibles concentracions de proteïna que hi hagi en els extractes cel·lulars.
3. Preparar el blanc afegint només 1ml de reactiu Bradford en una cubeta. El blanc serveix per eliminar la possible senyal del reactiu Bradford per si sol. Això permet que després es mesurin les absorbàncies únicament de les mostres i no de la dissolució total d'aquestes (amb reactiu Bradford).
4. Per una altra banda, preparar les mostres a quantificar afegint 2µl de cada línia cel·lular i 1ml de reactiu Bradford. El volum de cèl·lules s'agafa del tap de l'ependorff per no arrossegar més volum a la punta de la pipeta i aconseguir



rèpliques més exactes. Les mostres també es preparen per duplicat per a què els resultats del procés siguin comparables i en cas de detectar un error, poder eliminar alguna de les absorbàncies. En total doncs, hi ha 10 cubetes de mostres.

5. Barrejar les cubetes (10 cubetes de la recta patró i 10 de mostres) per immersió amb “parafilm”, és a dir, movent la cubeta amunt i avall i assecant bé el “parafilm” per evitar contaminacions entre mostres.
6. Deixar reposar de 5-15 minuts.
7. Amb l’espectrofotòmetre, fer la lectura de l’absorbància a 595nm ja que és la longitud d’ona<sup>72</sup> que absorbeix el reactiu Bradford en reaccionar amb les proteïnes.



*Fig. 65 Espectrofotòmetre*

- Posar la cubeta que només conté reactiu Bradford per a fer el blanc (absorbància 0).
- Posar les 8 cubetes per fer la recta patró i mesurar l’absorbància. El valors obtinguts han estat els següents:

---

<sup>72</sup> Magnitud física que indica la mida d’una ona, és a dir, la distància entre el principi i el final d’una ona completa. Es representa amb la lletra grega lambda ( $\lambda$ ).

<b>Concentració de proteïna BSA (mg/ml)</b>	<b>Absorbància</b>	
0	0	0
3	0,123	0,106
7,5	0,405	0,395
15	0,771	0,852
19,5	0,968	0,981

*Taula 9 Representació de l'absorbància mesurada en cada concentració de BSA, tenint en compte que es fan dues rèpliques de cada concentració.*

- Posar les 10 cubetes de mostres i mesurar l'absorbància. Els valors obtinguts han estat els següents:

<b>Mostra</b>	<b>Absorbància</b>	
<i>HUVEC</i>	0,252	0,25
<i>Mia Paca</i>	0,685	0,671
<i>SW480</i>	0,735	0,597
<i>BXPC3</i>	1,208	1,071
<i>Daoy</i>	0,887	0,875

*Taula 10 Representació de l'absorbància de cada mostra cel·lular. Es fan dues rèpliques de cada mostra.*

8. Amb l'ajuda del programa informàtic *Excel*, elaborar la recta patró i amb aquesta calcular les concentracions de proteïna de cada mostra. Ambdues coses es mostren a continuació en els resultats de l'assaig.

### 10.1. Resultats i interpretació del Bradford de línies cel·lulars

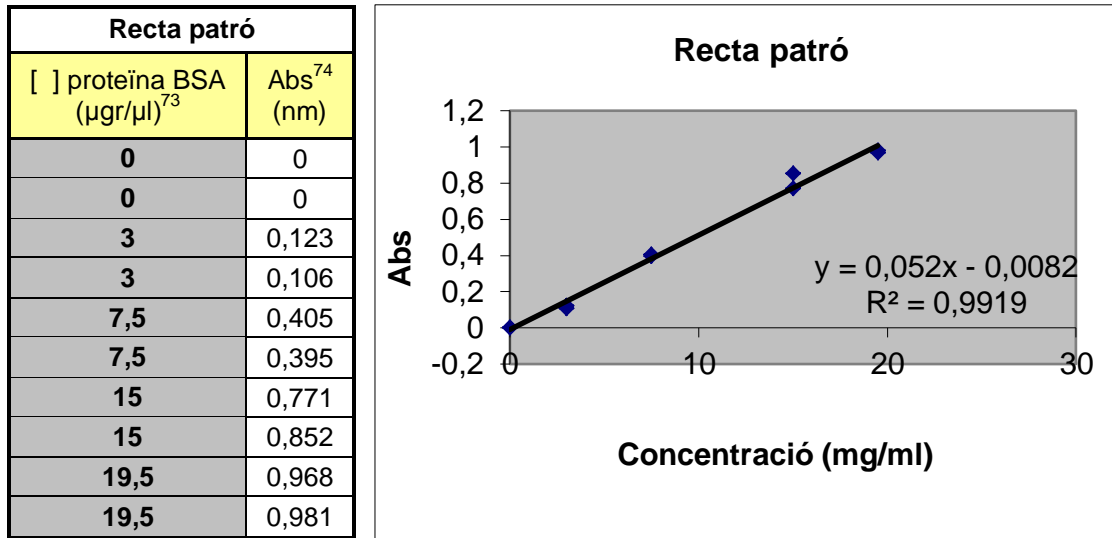


Fig. 66 Recta patró obtinguda a partir de les concentracions de BSA establertes i l'absorbància d'aquestes.

Com s'esmentava anteriorment, la recta patró s'ha establert de model per les mostres permetent relacionar absorbància amb concentració proteica. Per fer-la, s'ha mesurat l'absorbància de concentracions conegudes amb l'espectrofotòmetre, és a dir, de 0, 3, 7'5, 15 i 19'5 $\mu\text{gr}/\mu\text{l}$  de BSA i s'ha elaborat la recta relacionant l'absorbància que li correspon a cada concentració, és a dir, utilitzant els valors presentats en la primera taula de la Fig. 66. De les mostres a quantificar s'ha determinat l'absorbància amb l'espectrofotòmetre (Taula 10) però, òbviament, la concentració de proteïna no es coneix, ja que trobar-la és l'objectiu que es pretén aconseguir. A partir de la recta patró, doncs, es podrà fer una extrapolació de la proteïna present en les mostres, determinant quina concentració proteica equival a cada absorbància obtinguda de les mostres.

<sup>73</sup>  $\mu\text{gr}/\mu\text{l}$  és el mateix que mg/ml

<sup>74</sup> Absorbància

La recta patró presenta la forma  $y=mx+n$ . A l'eix de coordenades ( $x$ ) hi apareix la concentració de proteïna de cada mostra de BSA (0, 3, 7'5, 15 i 19'5 $\mu$ gr/ $\mu$ l) mentre que a l'eix d'ordenades ( $y$ ) es representa l'absorbància d'aquestes a 595nm. La  $m$  és el pendent de la recta que en aquest cas és de 0,052. La  $n$  és l'ordenada en origen, és a dir, el punt on la recta talla l'eix d'ordenades i, en aquesta recta, té un valor de 0,0082. La recta patró és de regressió ja que determina la distància quadrada dels punts que relacionen l'absorbància amb la concentració coneguda a la recta mínima. El fet de que la distància sigui quadrada permet que els valors obtinguts siguin sempre positius. Per a que es tracti de la recta mínima, és a dir la recta que minimitza la distància entre tots els punts, en el cas que alguna de les absorbàncies mesurades es surti molt de la recta, el propi programa, descartaria aquest punt, considerant-lo com un error. Així doncs, a més quantitat de punts de la patró vàlids més fiable serà la recta. Aquesta proximitat dels punts a la recta es determina amb la  $R^2$  que apareix al lateral del gràfic amb un valor de 0,9919. El valor òptim d'aquesta  $R^2$  és 1, degut a que el valor obtingut s'hi aproxima notablement, és pot considerar una recta patró fiable. En el cas de que el valor de la  $R^2$  es trobés per sota de 0,9 no es podria considerar una recta patró adequada.

Mostra	Abs	Conc $\mu$ g/ $\mu$ l	Volum ( $\mu$ l)	Conc/Vol $\mu$ g/ $\mu$ l	Mitjana ( $\mu$ g/ $\mu$ l)
HUVEC	0,252	5,033	2	2,516	<b>2,507</b>
	0,25	4,995	2	2,497	
Mia Paca	0,685	13,288	2	6,644	<b>6,577</b>
	0,671	13,021	2	6,510	
SW480	0,735	14,241	2	7,120	<b>6,463</b>
	0,597	11,610	2	5,805	
BXP3	1,208	23,258	2	11,629	<b>10,976</b>
	1,071	20,646	2	10,323	
Daoy	0,887	17,139	2	8,569	<b>8,512</b>
	0,875	16,910	2	8,455	

Taula 11 Representació de les concentracions de proteïna de cada extracte cel·lular.

Després d'haver mesurat les absorbàncies de les dues rèpliques de cada mostra cel·lular amb l'espectrofotòmetre, amb l'ajuda del programa informàtic *Excel*, s'han extrapolat aquestes dades a la recta patró, de tal manera que s'han obtingut les concentracions de proteïna en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  que corresponen a cada absorbància. Així, en la primera columna de la *Taula 11* apareix el nom de cada mostra cel·lular, en la segona columna l'absorbància de cadascuna d'elles, determinada amb l'espectrofotòmetre, i en la tercera, la concentració proteica que equival a aquesta. Per obtenir aquesta concentració proteica s'utilitza la fórmula de la recta de regressió  $y=mx+n$ . Així per exemple, fent servir el primer valor d'absorbància (0,252) pertanyent a la primera rèplica de cèl·lules HUVEC, s'han de fer els següents càlculs:<sup>75</sup>

1. Substituir els valors de la  $m$  i la  $n$  en la forma de la recta  $y=mx+n$ , especificant el que representen les variables  $x$  i  $y$ .

$$\text{Abs} = 0,052 \cdot [\ ] - 0,0082$$

2. Substituir el valor de l'absorbància de la primera mostra de les HUVEC i fer els càlculs de l'equació que resulta.

$$0,252 = 0,052 \cdot [\ ] - 0,0082$$

$$0,052 \cdot [\ ] = 0,252 + 0,0082$$

$$0,052 \cdot [\ ] = 0,2602$$

$$[\ ] = \frac{0,2602}{0,052}$$

---

<sup>75</sup> Cal tenir en compte que en aquests càlculs no s'especifiquen tots els decimals i per tant, apareix algun resultat aproximat per a obtenir el mateix valor que en la *Taula 11*, on són valors que sí han estat calculats amb tots els decimals amb el programa *Excel* i per tant, són els més correctes.

$$[\ ] = 5,003\mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Com es pot observar, el valor de concentració de proteïna obtingut és el mateix que el que apareix en el primer quadre de la tercera columna de la *Taula 11*. Aquesta concentració fa referència a 1 $\mu\text{l}$  de mostra. Per calcular la concentració de la segona rèplica de les HUVEC es segueix el mateix procediment:

$$0,25 = 0,052 \cdot [\ ] - 0,0082$$

$$0,052 \cdot [\ ] = 0,25 + 0,0082$$

$$0,052 \cdot [\ ] = 0,2582$$

$$[\ ] = \frac{0,2582}{0,052}$$

$$[\ ] = 4,995\mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Aquest és el valor de concentració de proteïna de la segona rèplica de les HUVEC que es mostra en el segon quadre de la tercera columna de la *Taula 11*. Aquesta concentració també fa referència a 1 $\mu\text{l}$  de mostra.

En la quarta columna de la taula s'especifica que el volum inicial de cèl·lules de cada mostra és de 2 $\mu\text{l}$ . Així, en la cinquena columna es calcula la concentració de proteïna que hi ha en aquest volum. Seguint l'exemple anterior, per obtenir la concentració de proteïna que hi ha en 2 $\mu\text{l}$  de la primera rèplica de les HUVEC s'ha de fer la següent divisió:

$$5,033/2 = 2,516 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

En el cas de la segona rèplica de les HUVEC s'obté el valor:

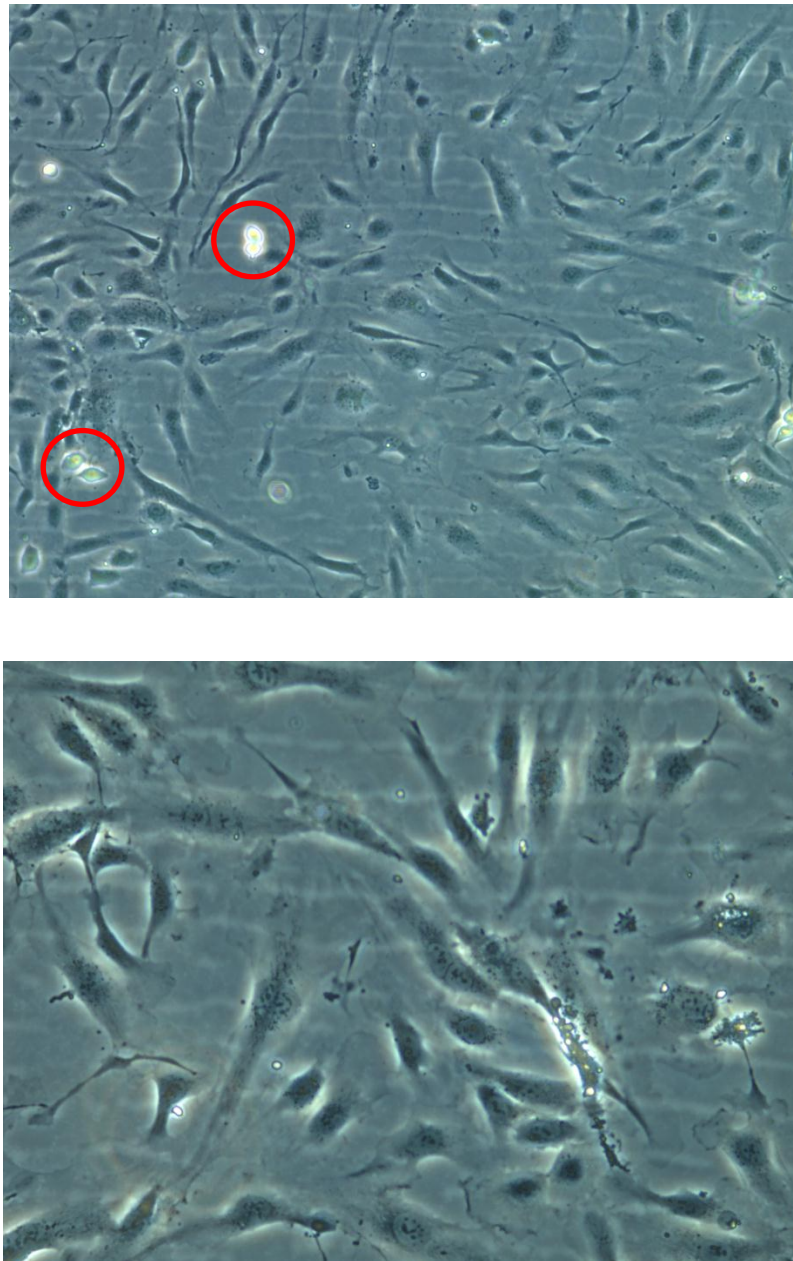
$$4,995/2 = 2,497 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

En la darrera columna apareixen els resultats definitius de la quantitat de proteïna que conté cada extracte cel·lular, fent la mitjana entre les dues rèpliques. Així, per les cèl·lules HUVEC s'obté:

$$\frac{2,516 + 2,497}{2} = 2,507 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

**Concentració de proteïna que hi ha en l'extracte cel·lular HUVEC.**

Per calcular les concentracions proteiques de la resta de mostres s'ha seguit el mateix procediment que en el cas de les HUVEC i finalment, s'han obtingut les concentracions de proteïna que es mostren en la darrera columna de la *Taula 11*.



*Fig. 67 HUVEC, un dels extractes cel·lulars utilitzats per fer el Bradford, vist al microscopi invertit. A dalt, 40 augments, a baix, 100 augments. En vermell, exemples de cèl·lules en divisió desadherides del flascó. Donat que es tracta d'un cultiu primari i no pas de cèl·lules tumorals, la proliferació cel·lular es troba dins els marges de la normalitat i, per això, s'observa una densitat de cèl·lules baixa.*



## **11. ASSAIGS DE VIABILITAT CEL·LULAR: Alamar Blue i MTT**

Sovint, en els laboratoris cal realitzar assaigs per comprovar la viabilitat d'un cultiu cel·lular. Aquesta, es mesura mitjançant la citotoxicitat cel·lular, és a dir, l'alteració de les funcions cel·lulars bàsiques que permet, per exemple, comprovar l'eficàcia i el comportament de determinats biomaterials, així com predir els efectes tòxics de drogues o compostos químics. És per això que aquests tipus d'assaigs són molt usats en investigació preclínica. En els darrers temps, s'han optimitzat les tècniques i l'elaboració d'aquests assaigs ha portat fins i tot a poder fer un estudi de la integritat de la membrana, el metabolisme cel·lular, l'activitat mitocondrial, la síntesi de proteïnes totals o la proliferació cel·lular de les cèl·lules estudiades. Es tracta típicament de proves realitzades *in vitro* que, tot i tenir un cost superior, representen una alternativa adequada a l'experimentació animal. Dos dels assaigs de viabilitat més usats per cèl·lules que creixen adherides a la superfície són l'*Alamar Blue* i el *MTT*.

L'*Alamar Blue* és un indicador que incorpora un colorant per detectar les reaccions d'oxidació-reducció (redox)<sup>76</sup>, en resposta a la reducció química del medi resultant del creixement cel·lular. Aquest assaig està dissenyat per mesurar quantitativament la proliferació de diferents línies cel·lulars tant d'animals com d'humans, bacteris i fongs. Així doncs, s'usa el canvi de pH del medi per determinar la viabilitat cel·lular en determinats nivells d'acidesa.

---

<sup>76</sup> Veure peu de pàgina número 69.

L'any 1983 Mosmann va descriure el mètode MTT per determinar la viabilitat cel·lular d'un cultiu. Aquesta, ve definida per l'activitat d'un enzim dels mitocondris de la cèl·lula i es basa en la reducció metabòlica del reactiu MTT a formazan. Aquesta reacció, per tant, és la que determina la funcionalitat mitocondrial i permet valorar-ne la supervivència o viabilitat cel·lular. El MTT reduït es pot quantificar gràcies al canvi de color que la reacció genera.

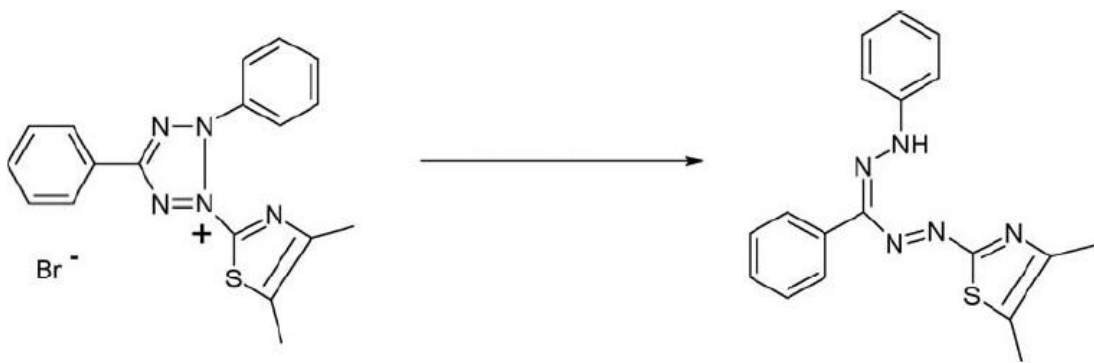


Fig. 68 Reducció del MTT a formazan.

Per altra banda, la capacitat de reducció del MTT sotmès a l'exposició d'un compost permet obtenir informació sobre la toxicitat del compost avaluat. En l'assaig de MTT que es mostrarà a continuació, s'utilitza aquest mètode per determinar el nivell de toxicitat del DMSO a les cèl·lules. Al final del procediment, els resultats són mesurats mitjançant la densitat òptica<sup>77</sup> (D.O.) amb l'ajuda d'un espectrofotòmetre, essent la quantitat de cèl·lules vives proporcionals a la quantitat de formazan produït. En tot moment, cal tenir en compte que l'assaig s'ha de realitzar en condicions d'esterilitat per evitar la contaminació de les cèl·lules i dels medis.

<sup>77</sup> Absorció d'un element òptic per unitat de distància a una longitud d'ona determinada.

## Objectiu

Un cop fet el subcultiu o p. 16 de la línia cel·lular HT1080, s'utilitzarà aquesta línia tumoral per determinar el possible efecte citotòxic d'un agent sobre ella. Aquest agent és el *DMSO* (*dimetilsulfòxid*) que ha estat triat perquè és un bon compost per dissoldre productes per utilitzar-los tant *in vivo* com *in vitro*, però, a determinades concentracions, resulta tòxic per les cèl·lules. A més, és interessant el seu ús perquè és un compost prèviament conegut, donat que s'ha utilitzat en altres assaigs d'aquest treball.

Mitjançant els assaigs MTT i l'Alamar Blue, es realitzarà la corba de DMSO que permetrà veure a quina concentració aquest diluent deixa de ser tòxic per les cèl·lules. Per fer-ho, es prepararà una dilució seriada amb diferents concentracions de DMSO que s'aplicarà a la placa on s'hauran sembrat les cèl·lules HT1080.

Abans de sembrar les cèl·lules per fer-ne els assaigs, s'ha calculat la viabilitat i el número total de cèl·lules HT1080 al p.16 per comprovar-ne el seu estat. En aquest cas, s'han comptat quatre àrees de la cambra de Neubauer.

Àrees de la cambra	Cèl·lules vives	Cèl·lules mortes
<b>L<sub>1</sub></b>	59	1
<b>L<sub>3</sub></b>	66	1
<b>L<sub>7</sub></b>	56	0
<b>L<sub>9</sub></b>	42	0
	<b>Total: 223</b>	<b>Total: 2</b>

Taula 12 Resultats del comptatge de cèl·lules HT1080 al p.16 amb cambra de Neubauer.

$\bar{x}$  de cèl·lules vives:  $(59+66+56+42)/4=55,75$  cèl·lules vives

Càlcul del percentatge de viabilitat de les cèl·lules d'HT1080 al p.16:

$$\% \text{ Viabilitat} = [\text{n}^\circ \text{ cèl·lules vives} / (\text{n}^\circ \text{ cel. vives} + \text{n}^\circ \text{ cel. mortes})] \times 100$$

$$\% \text{ Viabilitat HT1080 al p.16: } [223 / (223 + 2)] \times 100 = \mathbf{99,1\%}$$

Càlcul del nombre total de cèl·lules HT1080 al p.16:

$$\text{Cèl·lules/ml: } \bar{x} \text{ cèl·lules} \times \text{factor dilució} \times 10000$$

$$55,75 \times 3 \times 10000 = 1.672.500 \text{ cèl·lules /ml}$$

$$1.672.500 \text{ cèl·lules/ml} \times 3\text{ml de dilució} = \mathbf{5.017.500 \text{ cèl·lules totals}}$$

Els resultats indiquen que, com és normal, la viabilitat d'aquest següent passi (p.16) ha disminuït lleugerament respecte del passi anterior (p.15) però continua essent molt proper al 100% i, per tant, les cèl·lules es troben en un estat adequat per ser sembrades i realitzar els assaigs MTT i Alamar Blue. Pel que fa al nombre de cèl·lules/ml, ha augmentat en aquest últim passi ja que, com s'esmentava anteriorment, al tractar-se d'una línia tumoral, les cèl·lules presenten una elevada capacitat de proliferació, molt superior a la d'un cultiu primari. Amb l'ajuda del microscopi, en aquest passi s'ha determinat una confluència<sup>78</sup> del 80%.

Després de comprovar-ne la viabilitat i el número de cèl·lules totals del p.16, s'ha de calcular el volum de medi i cèl·lules que s'usaran d'aquest passi per preparar-ne la sembra.

Dades per la sembra d'HT1080 al p.16

- Placa de 96 pous (els càlculs es realitzen sobre 100 pous per obtenir volum en excés)

---

<sup>78</sup> Veure peu de pàgina número 48.

- Densitat cel·lular: 3.000 cèl·lules/pou
- Comptatge: 1.672.500 cèl·lules/ml
- Volum final/pou: 100µl/pou

Càlcul del volum necessari de cèl·lules:

$$3.000 \text{ cp} \times 100 \text{ pous} = 3 \cdot 10^5 \text{ cèl·lules/placa}$$

Nº de µl necessaris a sembrar a la placa per tenir  $3 \cdot 10^5$  cèl·lules/placa:

$$\frac{3 \cdot 10^5 \text{ cèl} \cdot \text{lules}}{\text{placa}} \cdot \frac{1 \text{ ml}}{1672500 \text{ cèl} \cdot \text{lules}} = 0,17937 \text{ ml/placa}$$

$$0,17937 \frac{\text{ml}}{\text{placa}} \cdot \frac{1000 \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} = \mathbf{179,37 \mu\text{l} / \text{placa}}$$

Càlcul del volum total

$$100 \text{ pous} \times 100 \mu\text{l/pou} = 10000 \mu\text{l/placa}$$

Càlcul del volum de medi (DMEM + 10% FCS)

**Volum total = volum cèl·lules + volum medi**

$$10\,000 \mu\text{l v. total} = 179,37 \mu\text{l v. cèl·lules} + \text{v. Medi}$$

$$10\,000 - 179,37 = 9820,63 \mu\text{l medi}$$

$$9820,63 \mu\text{l medi} \cdot \frac{1 \text{ ml}}{1000 \mu\text{l}} = \mathbf{9,82063 \text{ ml DMEM}+10\% \text{ FCS} \approx \mathbf{10 \text{ ml DMEM}+10\% \text{ FCS}}$$

Una vegada sembrades les cèl·lules a la placa, s'han de deixar 24 hores per afavorir-ne l'adherència d'aquestes als pous.

Al dia següent, una vegada comprovat al microscopi que les cèl·lules es troben en bones condicions i no estan contaminades, es procedeix a preparar la corba de DMSO que s'aplicarà a la sembra:

Dades per fer la corba de DMSO:

- Partint d'un DMSO amb una concentració estoc del 100%, es realitza una primera dilució al 40% amb medi de cultiu i 8 dilucions seriades  $\frac{1}{2}$  més, fins a obtenir una concentració de DMSO tan baixa que no afectarà a la supervivència cel·lular.
- Les dilucions es fan amb el DMSO i el medi adequat pel desenvolupament de la línia cel·lular: DMEM+10% FCS.
- Fer triplicats de cada condició<sup>79</sup> per poder contrastar els resultats. Per tant, s'usaran 6 pous amb la mateixa concentració de DMSO (3 pous Alamar Blue + 3 pous MTT). Els càlculs es realitzen sobre 8 pous de cada condició per fer dissolucions en excés.
- Volum final/pou = 100µl dissolució/pou

Càlculs per fer la dilució seriada de DMSO

$$100\mu\text{l dissolució/pou} \times 8 \text{ pous} = 800\mu\text{l dissolució/condició}$$

Per preparar la corba de DMSO cal tenir en compte les quantitats de cada dissolució que es necessiten. Així doncs, de cada condició és necessitaran 800µl de dissolució per omplir els sis pous, a més d'una quantitat determinada amb la qual preparar la següent dissolució. Les dilucions seriades es prepararan a  $\frac{1}{2}$  de concentració respecte l'anterior. Els càlculs s'iniciaran per la dissolució menys concentrada, és a dir, la dissolució de DMSO al 0'15625% i es continuaran per les dissolucions de 0'3125; 0'625; 1'25; 2'5; 5; 10; 20; 40 %. A continuació, es mostra l'exemple dels càlculs de les dues primeres dissolucions, la resta es farien seguint el mateix procediment, és a dir, utilitzant una quantitat (µl) de la dissolució amb el doble de concentració i una quantitat de dissolvent (medi) per reduir-ne la concentració.

---

<sup>79</sup> Cadascun dels percentatges de DMSO de les dissolucions.

### 1. DMSO al 0,15625%

$$\text{DMSO al 0,15625\%} = \frac{0,15625\mu\text{l DMSO}}{100\mu\text{l totals}}$$

Mitjançant la fórmula següent i tenint en compte que la dissolució de doble concentració és de DMSO 0,3125%, s'obté el volum de dissolució d'aquesta última concentració que serà necessari per preparar la dissolució menys concentrada.

$$v_i \cdot c_i = v_f \cdot c_f$$

$$v_i \cdot 0,3125\% = 800\mu\text{l} \cdot 0,15625\%$$

$$v_i = \frac{800\mu\text{l} \cdot 0,15625\%}{0,3125\%} = 400\mu\text{l DMSO al 0,3125\%}$$

Coneixent els  $\mu\text{l}/\text{condició}$  i la quantitat de DMSO al 0,3125%, s'obté el volum de medi (DMEM + 10% FCS ) necessari:

$$\mu\text{l DMSO} + \mu\text{l medi} = \mu\text{l totals}^{80}$$

$$800\mu\text{l totals} - 400 \mu\text{l DMSO al 0,3125\%} = 400 \mu\text{l DMEM} + 10\% \text{FCS}$$

Per tant, la dissolució de DMSO 0,15625% és igual a:  $\frac{400\mu\text{l DMSO al 0,3125\%}}{800\mu\text{l totals}}$

### 2. DMSO al 0,3125%

$$\text{DMSO al 0,3125\%} = \frac{0,3125\mu\text{l DMSO}}{100\mu\text{l totals}}$$

Per preparar la dissolució DMSO al 0,3125% cal tenir en compte els 400 $\mu\text{l}$  especificats a la concentració anterior i els 800 $\mu\text{l}/\text{condició}$ :

$$800\mu\text{l}/\text{condició} + 400\mu\text{l per preparar DMSO al 0,15625\%} = 1200\mu\text{l DMSO al 0,3125\%}$$

Volum de dissolució DMSO al 0,625% necessari:

$$v_i \cdot 0,625\% = 1200\mu\text{l} \cdot 0,3125\%$$

---

<sup>80</sup> Els microlitres totals representats fan referència als microlitres totals de cada condició.

$$v_i = \frac{1200\mu\text{l} \cdot 0,3125\%}{0,625\%} = 600\mu\text{l DMSO al } 0,625\%$$

Quantitat de medi necessari:

$$1200\mu\text{l totals} - 600\mu\text{l DMSO al } 0,625\% = 600\mu\text{l DMEM} + 10\% \text{FCS}$$

Per tant, la dissolució de DMSO 0,3125% és igual a:  $\frac{600\mu\text{l DMSO al } 0,625\%}{1200\mu\text{l totals}}$

Un cop realitzats els càlculs per cada concentració de DMSO seguint aquest procediment, s'han obtingut els resultats següents:

Concentració (%) de la dissolució de DMSO	Volums necessaris
0'15625	$\frac{400\mu\text{l DMSO al } 0,3125\%}{800\mu\text{l totals}}$
0'3125	$\frac{600\mu\text{l DMSO al } 0,625\%}{1200\mu\text{l totals}}$
0'625	$\frac{700\mu\text{l DMSO } 1,25\%}{1400\mu\text{l totals}}$
1'25	$\frac{750\mu\text{l DMSO } 2,5\%}{1500\mu\text{l totals}}$
2'5	$\frac{800\mu\text{l DMSO al } 5\%}{1600\mu\text{l totals}}$
5	$\frac{800\mu\text{l DMSO } 10\%}{1600\mu\text{l totals}}$
10	$\frac{800\mu\text{l DMSO } 20\%}{1600\mu\text{l totals}}$
20	$\frac{800\mu\text{l DMSO al } 40\%}{1600\mu\text{l totals}}$
40	$\frac{640\mu\text{l DMSO al } 100\%}{1600\mu\text{l totals}}$

Taula 13 Resultats dels càlculs de la corba de DMSO.



Les dissolucions es començaran a preparar partint de l'estoc de DMSO 100% utilitzant-ne 640µl i afegint 960µl DMEM + 10% FCS. D'aquesta manera, s'obté la primera dissolució de DMSO 40%.



Fig. 69 Preparació de la corba de DMSO, en vermell, percentatge de DMSO de cada dilució.

Es deixaran sis pous que seran controls positius, és a dir, en aquests pous en lloc d'afegir DMSO s'afegirà medi complet per tal de tenir les cèl·lules intactes i gairebé al 100% de viabilitat.

### Materials i aparells

- Incubadora CO<sub>2</sub> (37°C i 5% humitat)
- Espectrofotòmetre
- Micropipetes
- Microscopi invertit
- Campana de flux laminar

### Productes

- Reactiu Alamar Blue
- Reactiu MTT
- DMEM+10% FCS
- Tritó x-100 al 20%

– DMSO

– Tampó d'extracció del MTT

## **Procediment**

### **1. Alamar Blue**

*DIA 0:*

Plauejar les cèl·lules en un volum final de 100µl/pou amb medi complet, fent els triplicats de cada condició.

*DIA 3 (72 hores incubació):*

1. Abans d'iniciar l'assaig, afegir a tres pous 20µl/pou de tritó al 20% durant 10 minuts. El tritó és un detergent que lisa les cèl·lules i, per tant, permetrà definir un control on totes les cèl·lules estaran mortes (control negatiu).
2. Transcorreguts 10 minuts, afegir 100µl/pou d'Alamar Blue amb una dilució 1/10 (3ml medi + 300µl Alamar Blue).
3. Incubar a 37°C durant 3 hores amb la placa destapada.
4. Treure la placa de l'incubador de CO<sub>2</sub> i, sense tapar, deixar a les fosques durant 30 minuts.
5. Amb l'espectrofotòmetre, llegir l'absorbància a una longitud d'ona d'excitació 535nm i d'emissió 590nm.
6. Observar la placa al microscopi invertit.
7. Analitzar les dades.

### **2. MTT**

*DIA 0:*

Plauejar les cèl·lules en un volum final de 100µl/pou amb medi complet, fent els triplicats de cada condició.

*DIA 3 (72 hores incubació):*

1. Preparar el reactiu MTT a la concentració de 5mg/ml en PBS 1x (protegir de la llum amb paper de plata).
2. Filtrar amb filtre de 0,22mm.
3. Afegir 10µl/pou de MTT.
4. Incubar a 37°C durant 3 hores per permetre la formació de cristalls de formazan.
5. Afegir 100µl/pou de tampó d'extracció i deixar reposar durant 30 minuts perquè els cristalls es dissolguin.
6. Amb l'espectrofotòmetre, llegir l'absorbància a una longitud d'ona de 570nm.

PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
PBS	40%	20%	10%	5%	2,5%	1,25%	0,625%	0,3125%	0,15625%	C+	C- tritó	PBS
PBS	40%	20%	10%	5%	2,5%	1,25%	0,625%	0,3125%	0,15625%	C+	C- tritó	PBS
PBS	40%	20%	10%	5%	2,5%	1,25%	0,625%	0,3125%	0,15625%	C+	C- tritó	PBS
PBS	40%	20%	10%	5%	2,5%	1,25%	0,625%	0,3125%	0,15625%	C+	C- tritó	PBS
PBS	40%	20%	10%	5%	2,5%	1,25%	0,625%	0,3125%	0,15625%	C+	C- tritó	PBS
PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

*Taula 14 Disseny de la placa utilitzada pels assaigs d'Alamar Blue (blau) i MTT (verd). S'observen les tres rèpliques de cada concentració de DMSO juntament amb els controls positius, on totes les cèl·lules estan vives perquè no contenen DMSO, i el control negatiu, on totes les cèl·lules estan mortes. Al voltant, s'afegeixen 200µl de PBS 1x per evitar l'evaporació del contingut de la placa.*

**HT1080**                      **3000cp**                      **72h**  
**incubació**

**MTT**

Filter: 570nm

DMSO (%)	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625	c+	c-
<i>Rèplica 1</i>	0,227	0,291	0,314	0,363	0,444	0,498	0,507	0,535	0,518	0,517	0,325
<i>Rèplica 2</i>	0,241	0,3	0,33	0,39	0,433	0,453	0,499	0,485	0,476	0,479	0,316
<i>Rèplica 3</i>	0,242	0,297	0,313	0,395	0,459	0,461	0,5	0,472	0,499	0,484	0,318
<i>Mitjana de les tres rèpliques</i>	0,23666667	0,296	0,319	0,382666667	0,44533333	0,470666667	0,502	0,497333333	0,49766667	0,49333333	0,31966667
<i>Concentracions de DMSO en relació al c+</i>	0,47972973	0,6	0,646621622	0,775675676	0,9027027	0,954054054	<b>1,0175676</b>	<b>1,008108</b>	<b>1,0087838</b>	<b>1</b>	0,64797297

**ALAMAR BLUE**

Excitació: 544nm, Emissió: 590nm

DMSO (%)	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625	c+	c-
<i>Rèplica 1</i>	4,946	4,625	7,473	14,25	13,31	23,13	24,19	24,5	23,5	22,89	6,292
<i>Rèplica 2</i>	4,797	5,008	5,893	13,5	12,7	23,36	23,83	21,65	22,58	22,7	6,102
<i>Rèplica 3</i>	4,859	4,554	6,035	11,89	13,5	23,58	21,27	23,2	23	22,89	6,345
<i>Mitjana de les tres rèpliques</i>	4,867333333	4,729	6,467	13,213333333	13,17	23,35666667	23,09666667	23,1166667	23,0266667	22,826667	6,24633333
<i>Concentracions de DMSO en relació al c+</i>	0,21323014	0,20717	0,283308995	0,57885514	0,5769568	<b>1,0232185</b>	<b>1,0118283</b>	<b>1,012704</b>	<b>1,0087617</b>	<b>1</b>	0,27364194

Taula 15 Resultats dels assaigs de viabilitat cel·lular: MTT i Alamar Blue.

### **11.1. Resultats i interpretació dels assaigs de viabilitat cel·lular: Alamar Blue i MTT**

Com s'esmentava en un inici, l'objectiu d'aquest assaig de viabilitat cel·lular és determinar a quina concentració el DMSO deixa de ser tòxic per les cèl·lules. Un cop fet el procediment explicat i després d'haver deixat les cèl·lules HT1080 en incubació, amb l'ajuda d'un espectrofotòmetre s'ha mesurat la densitat òptica de cèl·lules vives, obtenint els resultats que s'expliquen a continuació.

Tal i com mostra la *Taula 15*, els resultats dels dos assaigs han estat dividits en dos quadres. En el primer, es representen els resultats del MTT mentre que els de l'Alamar Blue s'exposen en la segona taula. Per mesurar la densitat òptica de cèl·lules se li han d'indicar uns valors en nanòmetres, ja preestablerts, a l'espectrofotòmetre. Aquests, representen la longitud d'ona que les cèl·lules poden absorbir. En el cas del MTT, 570nm i per l'Alamar Blue, dos valors diferents; 544nm d'excitació i 590nm d'emissió. Aquest últim cas, és degut a que s'exciten les cèl·lules exposades a l'Alamar Blue a una longitud d'ona de 544nm i com les molècules d'aquest reactiu són fluorescents, després de l'excitació absorbeixen l'energia i la tornen a emetre en forma de llum d'una longitud d'ona superior (590nm), que és la que es detecta. En qualsevol cas, la quantitat de llum emesa per les partícules fluorescents i detectada serà proporcional a la quantitat de cèl·lules vives de la mostra. Així, si la quantitat de cèl·lules és molt elevada, l'emissió serà superior perquè hi haurà més molècules que emetran més fluorescència.

Com es pot veure en les dues darreres columnes de la *Taula 15*, per dur a terme els assaigs s'ha utilitzat el control positiu, del qual se'n explica la funció a continuació, i el control negatiu, que únicament serveix per assegurar-se que els resultats obtinguts són fiables. En aquest cas, s'ha observat un petit error ja que, tot i haver aplicat el

tritó, no han mort el 100% de cèl·lules. Això podria ser degut a no haver-se deixat incubar les cèl·lules suficient temps o a que la quantitat de tritó aplicada és insuficient. En qualsevol cas, però, això no té perquè afectar als resultats. En negreta, en la primera fila de cada taula es mostren els percentatges de concentració de les dissolucions de DMSO que s'aplica a les cèl·lules HT1080 (40; 20; 10; 5; 2'5; 1'25; 0'625; 0'3125 i 0'15625%). En les tres files següents, es representa la densitat òptica dels triplicats de cada condició de DMSO, és a dir, tres rèpliques establertes per a poder comparar i obtenir resultats fiables. En la fila posterior hi apareix la mitjana de densitat òptica de les tres rèpliques anteriors. Finalment, en la darrera fila, s'agafa el valor mitjà del control positiu (0'49333333) i es divideix per ell mateix per obtenir el 100% de cèl·lules vives, és a dir 1, (a la taula apareix en vermell) ja que  $0'49333333/0'49333333=1$ . Amb això, es pretén representar en tant per 1 el màxim de cèl·lules vives que hi podrien haver en les mostres. Seguidament, s'agafen totes les altres mitjanes mostrades en la quarta fila i s'extrapolen al valor 1 del control positiu. D'aquesta manera, es pot veure si la quantitat de cèl·lules de cada mostra ha augmentat o ha disminuït en relació a cada concentració de DMSO. Així, per exemple, en el cas de la dissolució de concentració 40% de DMSO en l'assaig MTT, les densitats òptiques obtingudes en les tres rèpliques són de 0'227, 0'241 i 0'242 i la mitjana d'aquestes, per tant, pren un valor de 0,23666667, ja que  $(0'227+0'241+0'242)/3=0,23666667$ . Aquest, en ser dividit entre la mitjana del control positiu s'obté una densitat òptica de 0,47972973 ( $0,23666667/0'49333333=0,47972973$ ). Donat que aquest valor es troba notablement per sota del nivell màxim de cèl·lules vives (1), es pot afirmar que el DMSO a una concentració del 40% és tòxic i mata a les cèl·lules. En ambdues taules apareixen uns valors marcats en groc, aquests representen les concentracions de DMSO on no hi ha

menys cèl·lules vives respecte el control positiu, és a dir, on el DMSO no ha matat a les cèl·lules. Com es pot observar, aquests paràmetres varien d'una manera mínima d'un assaig a l'altre. Això és degut a la sensibilitat de les tècniques que presenta cada mètode. A més a més, és important tenir en compte que aquests resultats són únicament vàlids per treballar amb cèl·lules de la línia tumoral HT1080, donat que altres cèl·lules, les quals necessiten altres condicions de vida, poden tenir una resistència variable a les elevades concentracions de DMSO. Així doncs, es conclou dient que, en l'assaig MTT, el DMSO no és tòxic per les cèl·lules a concentracions iguals o inferiors a 0,625%. En contraposició, a concentracions de DMSO superiors a 0,625% aquest és tòxic i mata a les cèl·lules. En el cas de l'assaig Alamar Blue, les concentracions de DMSO que deixen de ser tòxiques per les HT1080 són iguals o inferiors a 1'25%. La resta de concentracions, doncs, provocarien l'apoptosi cel·lular. Tot i no haver obtingut resultats exactament iguals en els dos mètodes, la diferència es pot considerar mínima i, per això, cal remarcar la similitud en els mateixos. Així, es pot considerar que **les concentracions de DMSO òptimes per treballar amb les cèl·lules són iguals o inferiors a 1'25%.**

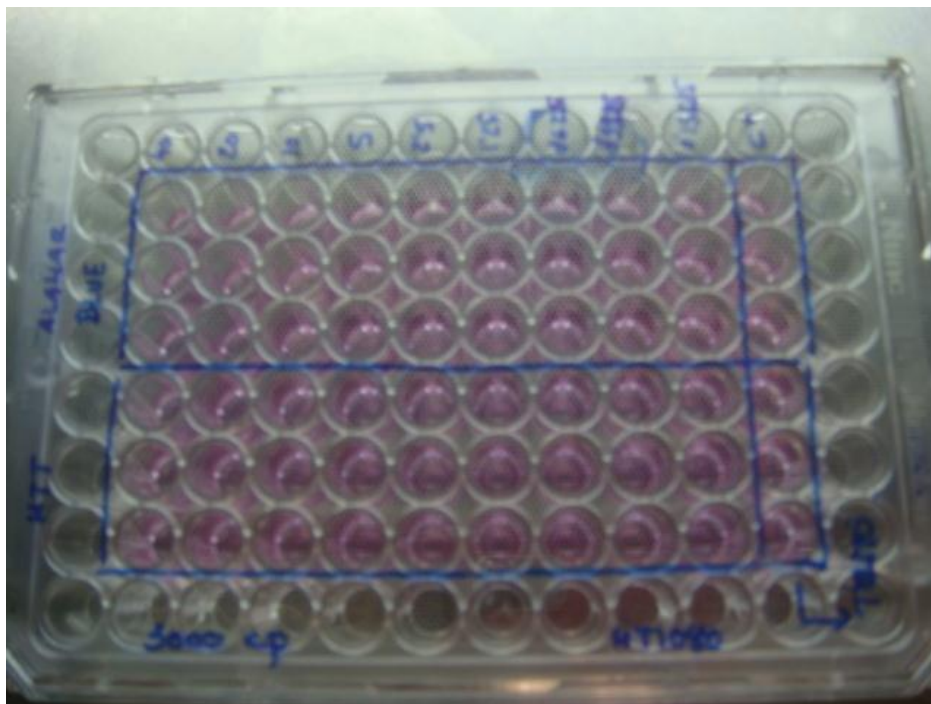


Fig. 70 Dia 0: Alamar Blue i MTT en HT180.

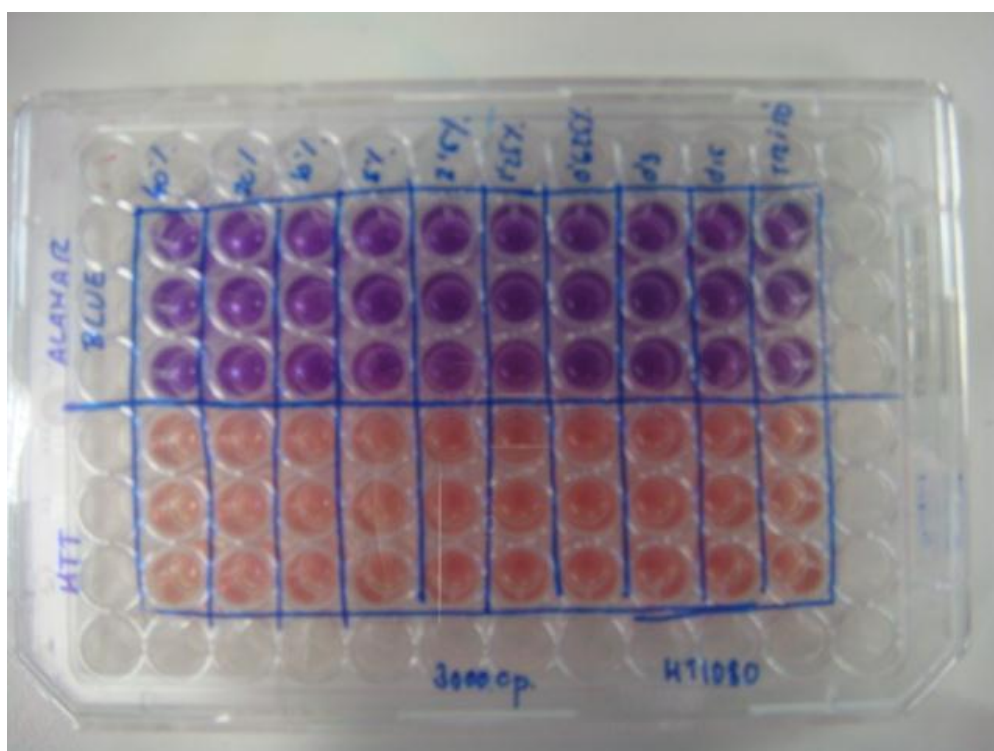


Fig. 71 Dia 3: Alamar Blue i MTT en HT1080. S'observa un canvi de coloració causat per la reducció del MTT a formazan (en el cas del MTT) i per efecte del colorant del propi reactiu (en el cas de l'Alamar Blue).



## **12.CONCLUSIONS**

Un cop finalitzat el treball i partint dels objectius plantejats inicialment, cal extreure les conclusions que permetin relacionar els conceptes teòrics amb els resultats del mètode experimental. Al final de cada assaig s'han presentant els resultats i les seves interpretacions i, per això, a continuació, se sintetitzen totes les conclusions parcials obtingudes.

El treball es va iniciar amb les pràctiques de laboratori al Parc Científic de Barcelona i, a arrel d'aquesta recerca, es van establir els conceptes teòrics necessaris per comprendre-la. Primerament, però, es va definir un objectiu, el qual dóna nom al treball: veure la implicació que les proteïnes poden tenir en els processos tumorals. Aquest s'ha assolit principalment amb la determinació del temps exacte que la proteïna X necessita per internalitzar-se en les cèl·lules tumorals HT1080 i les interpretacions del mateix, les quals s'esmenten més endavant. Donat que els objectes d'estudi del mètode experimental són la proteïna X i les cèl·lules tumorals HT1080, era necessari fer un estudi conceptual basat en la caracterització d'aquestes biomolècules, l'expressió gènica i la seva regulació i la formació i classificació dels tumors. A la vegada, era ineludible fer esment de la tecnologia del DNA recombinant, donat que la proteïna X amb la qual s'ha treballat, ha estat elaborada en el laboratori mitjançant aquestes tècniques.

En referència al mètode experimental del treball i amb la finalitat de trobar resposta a la recerca establerta, s'ha elaborat l'assaig "obtenció i caracterització de proteïnes: assaig d'internalització de la proteïna X en les cèl·lules HT1080". A priori a aquest estudi, però, s'ha hagut de treballar sobre altres tècniques bàsiques d'experimentació en citologia i proteïnes per, posteriorment, comptar amb el material i coneixements

necessaris per assolir l'objectiu. Durant aquestes primeres pràctiques s'ha après a comptar cèl·lules amb el mètode de la cambra de Neubauer, a fer els càlculs necessaris per obtenir diversos passis o subcultius d'una única línia cel·lular, a més d'haver adquirit la familiarització necessària amb els estris del laboratori per, seguidament, iniciar amb més destresa, l'assaig principal.

Paral·lelament, s'han fet dos assaigs: el Bradford de línies tumorals, l'objectiu del qual ha estat aprendre'n la tècnica; i el de viabilitat cel·lular, que pretén trobar la concentració del diluent DMSO adequada per treballar amb les HT1080. Els resultats d'aquest últim conclou en que el DMSO deixa de ser tòxic per les cèl·lules HT1080 en concentracions iguals o inferiors a l'25%.

Els denominadors comuns d'aquests assaigs porten a unes conclusions de tipus tècnic que cal remarcar. En primer lloc, la necessitat d'**establir controls** en l'experimentació, que permetran obtenir resultats contrastables. En el cas del Bradford s'ha utilitzat el blanc, un control sense variable (sense mostra de cèl·lules). El control en l'assaig d'internalització, en canvi, ha estat el temps 0', que representen les cèl·lules sense exposició a la proteïna X. En els assaigs de viabilitat s'han establert els controls positiu i negatiu de mortalitat. En segon lloc, cal remarcar la necessitat d'**ús de rèpliques**, ja que permeten minimitzar els efectes d'un error experimental, comparant les rèpliques entre elles. Finalment, un altre denominador comú és l'**especificitat dels assaigs** que significa que els resultats obtinguts únicament són vàlids per les cèl·lules i la proteïna amb la qual s'ha treballat. Cada element biològic amb el qual s'investiga en el laboratori necessita unes condicions concretes i respon de manera diferent davant dels mateixos estímuls.

Centrant-se en l'assaig d'internalització és rellevant destacar el fet que la proteïna X, tot i trobar-se de manera fisiològica en l'organisme, no és produïda per les cèl·lules HT1080, per tant, la detecció de la proteïna en l'interior de la cèl·lula és deguda a la internalització i no pas a la pròpia producció. Per altra banda, ha quedat palesa l'elevada capacitat de proliferació de les HT1080, al veure la gran densitat de cèl·lules que s'observen en el microscopi després d'haver-ne fet els passos necessaris per treballar amb aquesta línia cel·lular. I això, es relaciona amb la malignitat que presenten els fibrosarcomes, els tumors cancerígens originats per aquestes cèl·lules i amb els quals s'associa la proteïna en qüestió. Reiterant els resultats obtinguts en l'assaig d'internalització de X en les cèl·lules HT1080, es conclou que la proteïna té una elevada capacitat d'internalització, donat que no necessita més de cinc minuts per iniciar l'entrada a la cèl·lula. El revelatge del Western Blot ha estat el que ha indicat que el temps òptim per aturar la internalització de la proteïna en les cèl·lules HT1080 és el temps 5 minuts. A mesura que augmenta el temps d'exposició de X en les cèl·lules, la concentració també incrementa i, per això, es pot preveure que aturar la internalització en altres temps no asseguraria l'absència de proteïna en el seu interior i, consegüentment, tampoc l'èxit d'intent de bloqueig. Els resultats també permeten concloure que les funcions realitzades per la proteïna dins la cèl·lula són de major importància que les funcions extracel·lulars. Les funcions intracel·lulars són les que es relacionen amb la malignitat dels tumors cancerígens, ja que s'ha demostrat que existeix una correlació entre la presència d'aquesta proteïna i un pitjor pronòstic de la malaltia.

Tanmateix, es pot afirmar que l'estructura nativa de la proteïna amb la qual s'ha treballat és essencial en l'execució de les seves funcions i que la seva configuració tridimensional, la qual compta amb la presència de frontisses i hèlixs que li aporten

major mobilitat, facilitaria a la proteïna l'entrada a la cèl·lula. Aquests aspectes, per tant, podrien esdevenir altres objectes d'estudi. La recerca es basaria en interrompre el procés d'internalització interferint en el mecanisme de transport, amb el fi últim d'aturar la malaltia.

La sobreexpressió de la proteïna X en les cèl·lules tumorals es pot interpretar, doncs, com un biomarcador, ja que la seva presència s'ha d'entendre com un factor de proliferació de les cèl·lules malignes, correlacionada amb l'empitjorament del pronòstic de la malaltia, és a dir, amb l'augment en les possibilitats de metastasi i de fracàs dels tractaments. Per tant, té un valor predictiu important. Aquesta reflexió dona arguments per afirmar que aquest assaig té unes clares **aplicacions mèdiques**, donat que, a nivell diagnòstic, conèixer la sobreexpressió de la proteïna X en un tumor cancerigen suposa poder preveure el comportament de la malaltia i, per tant, disposar d'un factor pronòstic. Per altra banda, a nivell terapèutic, constitueix un punt de partida en la recerca oncològica, donat que, aconseguir interferir en el mecanisme d'internalització, que com hem vist actua com un "aliment" vitalitzant la cèl·lula maligne, suposaria un fre en el mecanisme de proliferació tumoral i, per tant, una eina terapèutica valuosa.

Actualment, la teràpia contra el càncer més estesa és la quimioteràpia basada en produir la mort cel·lular indiscriminada de les cèl·lules de creixement ràpid, és a dir, les tumorals, però amb una escassa capacitat selectiva. Això implica que també s'eliminen altres cèl·lules sanes de l'organisme amb un desenvolupament diligent, com poden ser les cèl·lules de les mucoses o les cèl·lules hematopoètiques que constitueixen la sang, provocant símptomes col·laterals nocius en l'organisme, tals

com les mucositis<sup>81</sup>, anèmies, baixada de defenses, caiguda del cabell, etc. Si s'aconseguís tractar els tumors actuant des dels diferents nivells primaris, com el mecanisme d'internalització vist en el treball, presumptament s'evitarien els símptomes indesitjables dels tractaments convencionals i els efectes tòxics secundaris, el que suposaria també una millora en la qualitat de vida del malalt de càncer.

Molt relacionades amb l'aplicació pràctica del treball que s'acaba d'explicar, poden sorgir altres línies d'investigació. Així, com s'ha dit anteriorment, seria molt interessant i útil estudiar el mecanisme de transport que la cèl·lula utilitza per internalitzar la proteïna, ja que, partint del seu coneixement, es podria trobar la manera d'aturar-lo. Per altra banda, i tal i com ja s'havia comentat en els resultats i interpretació de l'assaig principal, seria molt profitós elaborar l'experimentació en línies cel·lulars diferents de les HT1080. Així s'obtidria nova informació bibliogràfica i es podria conèixer a fons els mecanismes de comportament d'aquesta proteïna. A la vegada, poder aprofundir en l'estudi de la seva estructura podria afavorir el fi últim de la recerca oncològica, ja que, com s'ha vist, l'estructura de les proteïnes està íntimament lligada a la seva funció. Especulant en aquest terreny, es podria plantejar la hipòtesi que la presència de la regió variable en la seva configuració constituís un paper clau. Aquest determina l'afinitat selectiva de la proteïna vers certs tumors i això podria explicar que aquesta no es trobi en el 100% dels tumors. A la vegada, la presència d'aquesta regió variable podria ser la causa de la dificultat de trobar l'anticòs que s'uneixi millor al epítot, ja que si realment el millor lloc d'unió de la proteïna i l'anticòs és aquesta regió, no pot existir un anticòs universal per aturar la internalització. Continuant amb les especulacions, també

---

<sup>81</sup> Inflamació i ulceració de les mucoses del tracte digestiu.

caldrà abordar el paper del receptor com a peça important en la internalització. Sembla ser, però, que el millor camí en aquesta recerca i, per tant, el que actualment s'està posant en pràctica a Leitat, se centra en buscar l'anticòs o molècula que s'uneixi millor al epítip de la proteïna per bloquejar l'acció extracel·lular que té lloc en el procés tumoral.

Està clar que existeix un ampli ventall de possibilitats en la recerca oncològica amb múltiples i laboriosos camps a desenvolupar. El present i el futur en la investigació biomèdica, però, ha de centrar l'esforç en el diagnòstic molecular dels tumors cal abordar el càncer a nivell dels seus mecanismes biomoleculars més bàsics, investigant les característiques de cadascun i cercant les seves "debilitats". Així s'han d'estudiar els gens i proteïnes anormals, les molècules defectuoses i dominants, i s'ha de detectar quina conducta cel·lular alterada és susceptible de ser modificada, per poder controlar l'aparició i progressió del càncer i poder tractar-lo de manera eficaç. Això suposa un abordatge específic per cada tipus de càncer i la possibilitat d'oferir a cada malalt un tractament que es podria considerar "personalitzat". Certament una fita difícil, donada la gran variabilitat de tumors que existeixen, l'elevat cost econòmic que suposa i la multiplicitat de factors que intervenen en cada procés. Aconseguir-ho suposaria el major impacte en la recerca oncològica i en la pràctica de la medicina. Sens dubte un dels reptes del segle XXI.

# ANNEXOS

### **13. Dissolucions tampó utilitzades en el mètode experimental**

Les dissolucions tampó, també anomenades amortidores o reguladores, serveixen per mantenir el pH d'un sistema estable, és a dir, mantenir el pH en el valor necessari per a dur a terme una reacció.

A continuació es mostra la preparació de les dissolucions tampó utilitzades durant el mètode experimental:

#### Passi o subcultiu de línia

##### **1. PBS1 w/o i Mg<sup>+</sup>**

*Leitat* compra aquesta dissolució ja feta i no ha estat necessari preparar-la.

#### Extracció de proteïna

##### **2. Tampó de lisi (RIPA)**

	<b>Concentració de treball</b>	<b>Solució estoc</b>	<b>Volum (ml) per preparar 500ml</b>
<b>Tris-HCl pH 7.4</b>	50 mM	1.5M	16.6 ml
<b>Igepal CA630</b>	1%	Igepal 100%	5 ml
<b>EDTA</b>	5 mM	0.5M	1 ml
<b>NaCl</b>	150 mM	5M	15 ml
			<b>H<sub>2</sub>O fins a 500 ml</b>

*Taula 16 Preparació de la solució estoc.*



	<b>Concentració de treball</b>	<b>Solució estoc</b>	<b>Volum (ml) per preparar 10ml</b>
<b>PMSF</b> <sup>82</sup>	100µgr/ml	10 mg/ml	100µl
<b>Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub></b> (ortovanadat sòdic)	1mM	0.1M	100µl
<b>NaF</b>	1mM	0.5M	20 µl

Taula 17 Preparació de la solució de treball.

### 3. Tampó PBS 1x (volum final = 5 litres)

- 500ml PBS 10x
- 4500ml H<sub>2</sub>O
- pH=7,2 amb HCl 1M

### Electroforesis

#### 4. Tampó d'electroforesis *Running Buffer*.

- 100ml TGS 10x
- Enrasar amb aigua destil·lada fins a un volum final de 1000 ml

#### 5. Tampó de càrrega 4x (volum final = 50ml)

- 12 ml de Tris pH 6,8 i 1M
- 4gr SDS
- 20ml Glycerol 100%
- Bromofenol Blue

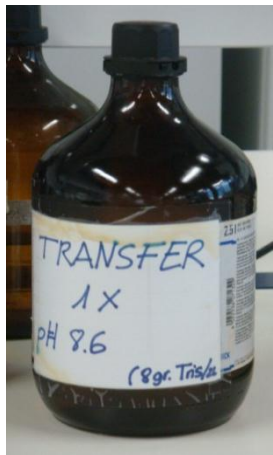
<sup>82</sup> Inhibidors de proteases que permetran extraure les proteïnes intactes, sense que pateixin cap dany.

- 5ml  $\beta$ -mercaptoetanol
- 14 ml H<sub>2</sub>O Milli-Q

#### Transferència a membrana de PVDF

#### **6. Tampó de transferència 1x** (volum final = 2000 ml)

- 200 ml de Transfer 10x
- Afegir aigua destil·lada fins a 1600 ml
- En últim lloc, afegir 400 ml de metanol perquè precipita.
- Ajustar pH a 8,6 amb Tris



*Fig. 72 Tampó de transferència*

#### **7. Ponceau**

(Afegir en ordre de la llista)

- 10 ml aigua Milli-Q
- 3 ml àcid acètic glacial
- 0.033 g de Ponceau
- Enrasar a 30 ml amb aigua Milli-Q.

(Guardar a temperatura ambient)

### **8. Dissolució de tinció de gels amb Comassie**

- Àcid acètic al 10%
- Etanol al 25%
- Comassie al 0.1%

### Immunodetecció de membrana

### **9. Tampó TBS-Tween (volum final: 2000ml)**

- 2ml Tween 20
- 200ml TBS 10x
- 1800 H<sub>2</sub>O Milli-Q

### Assaig de viabilitat cel·lular

### **10. Tampó d'extracció del MTT**

- 15% SDS
- 50% sodi N.N dimetil formamida pH 4,7
- PBS

(Preparar 25ml PBS + 25ml N.N dimetil formamida pH 4,7 i escalfar-ho a 50°C, després, afegir 7,5 gr SDS poc a poc, deixant que es dissolgui).

## 14. Fitxa tècnica de la línia cel·lular tumoral HT1080

**LEITAT**  
 Technological Center  
 Biomed Division

Banc de cèl·lules

<b>Línia:</b>  <b>HT 1080</b>	<b>Nº Biomed:</b>  <b>3</b>
-------------------------------------	-----------------------------------

<b>1-Dades de la línia:</b>	
Espècie:	Human
Tipus histològic / Teixit:	Fibrosarcoma
Centre de procedència:	ECACC
Nº ref / lot / passi / data congelació:	85111505 / 06A029 / +3 / 26/01/06
Manipulador:	
<b>2-Medi de cultiu:</b>	
Medi de creixement (Biomed):	Ref: 31966 (GIBCO) DMEM High Glucose
Suplements:	Ref: Glutamina (medi)
Sèrum fetal:	Ref: 10% FCS (10106-169 GIBCO)
Antibiòtics / Medis selectius:	NO
Medi original:	DEMEM
Suplements:	2 mM Glutamine
Sèrum fetal:	10% FCS (Ref:
Antibiòtics / Medis selectius:	NO
Medi congelació:	90% FCS + 10% DMSO
<b>2-Condicions de cultiu:</b>	
Ratio subcultiu:	1:3, cada dos dies
Concentració inòcul:	7x10 <sup>6</sup> a flascó gran
Temps de duplicació:	<1 dia
Nº cels en flascó mitjà (90% confl):	15x10 <sup>6</sup>
Nº cels en flascó gran (90% confl):	30x10 <sup>6</sup>
Tractament enzimàtic:	0.5X Trypsin/EDTA
<b>2-Characterització:</b>	
Expressió proteïna/RNA:	
Creixement <i>in vivo</i> (condicions):	
Micoplasma (Nº sbnt / Nº test / passi):	
Alamar Blue:	3000 cel/pou

**15. Interpretació d'un informe anatomopatològic<sup>83</sup> d'un  
fibrosarcoma**

**Sexe: dona**  
**Edat: 68 anys**

**MACROSCÒPIC:**

Es rep en formol fragment irregular de teixit fibrós de 4 x 3 x 2,5 cm. Inclusió total.  
(7 Bloc/s)

**MICROSCÒPIC:**

Proliferació mesenquimal fibroblàstica amb marcada atípia cel·lular, pleomorfisme (pseudolipoblastes), nuclis hiper cromàtics i activitat mitòtica sobre un estroma amb vasos primis curvilinis.

Grau histològic: grau 2/3  
- Diferenciació tumoral: (2/3)  
- Índex mitòtic: 10 x 10 cga (2/3)  
- Índex de proliferació (ki67): 25-50%  
- Sense evidència de necrosi (0/3)  
IHQ: NEGATIVITAT: proteïna X

**DIAGNÒSTIC:**

**Mama esquerra, unió de quadrants externs-regió periareolar, tumorectomia:**

**FIBROSARCOMA**

- Marges de resecció: AFECTATS

**Data validació**      **07/07/2011**  
**Dr/Dra:**

A la capçalera de l'informe apareixen les dades del pacient i la identificació del mateix, en aquest cas, s'han obviat per respecte a la confidencialitat. A continuació, el metge patòleg fa una descripció macroscòpica de la peça, on descriu la mida i altres característiques definides a ull nu, així com el nombre de blocs analitzats (aquí s'han fet 7 talls de la peça). Seguidament, fa una descripció microscòpica tenint en compte els criteris definits en l'apartat teòric de classificació dels tumors (pàg. 44).

---

<sup>83</sup> Anàlisi de l'estructura d'un tumor. Es fa sistemàticament en les peces extretes quirúrgicament.

Concretament, fa referència al grau histològic que defineix objectivament l'agressivitat del tumor, basant-se en una escala preestablerta. En ella el grau I es refereix a un tumor ben diferenciat, el grau II moderadament diferenciat i el grau III pobrament diferenciat. Aquest tumor és valorat com a moderadament diferenciat. L'índex mitòtic observat en deu camps de gran augment (CGA), utilitza els següents criteris: l'1 significa de 0-9 mitosis/10CGA, el 2 de 10 a 20 mitosis/10CGA i el 3 més de 21 mitosis/10CGA. En aquest informe s'atorga un 2 perquè s'han observat 10 mitosis/10CGA. L'índex de malignitat també és valorat amb la proliferació de la proteïna ki67 en les cèl·lules, detectada mitjançant tècniques d'immunohistoquímica (IHQ) les quals utilitzen anticossos monoclonals per la seva visualització. Així, la major presència d'aquesta, indica major malignitat. En aquest cas, el 25-50% de presència de ki67 confirma la malignitat moderada del tumor. La necrosi en aquest és inexistent, fet que, de nou, es correlaciona amb malignitat moderada. La IHQ per la detecció de la proteïna X (la proteïna amb la qual s'ha treballat en el mètode experimental), ha resultat negativa. Això pot ser degut a que aquest tumor presenta una malignitat moderada, mentre que la proteïna X s'associa a tumors d'alta malignitat. En aquest informe s'ha substituït el nom real de la proteïna perquè no pugui ser associat amb la recerca que, actualment, s'està fent en el laboratori Leitat. Finalment, en l'apartat diagnòstic es concreta la localització en l'organisme del tumor i n'identifica el tipus, tractant-se d'un fibrosarcoma de mama. Aquí, també s'especifica que els marges de resecció estan afectats, és a dir, que, amb la tumorectomia, no s'ha extret el tumor en la seva totalitat. Per tant, aquesta dona s'haurà de tornar a operar per eliminar-ne les restes de tumor. Es considera marges de resecció lliures de malaltia a partir d'1mm de teixit sa al voltant del tumor. A peu d'informe es posa la data d'emissió del dictamen, juntament amb el nom del patòleg

responsable de l'anàlisi. En aquest cas, el nom del doctor i l'hospital al qual pertany, també s'han obviat.

## **16.BIBLIOGRAFIA**

### **Libres**

- ANDERSON, J.R.: *Patología de Muir*, Editorial Espaxs, Barcelona, 1977.
- BRUCE, A.; DENNIS, B.; ALEXANDER, J.; JULIAN. L.; MARTIN, R; KEITH, R; PETER, W.: *Introducción a la biología celular*, Ediciones Omega, Barcelona 1999.
- GARCÍA-SEGURA, J.M.; GAVILANES, J.G.; MARTÍNEZ DEL POZO, A.; MONTERO, F.; OÑADERRA, M.; VIVANCO, F: *Técnicas instrumentales de análisis en Bioquímica*, Editorial Síntesis, tercera edició, Madrid, Octubre 2007.
- GÓMEZ, C.; SANCHO, J.; *Estructura de Proteínas*, Editorial Ariel Ciencia, Madrid 2003.
- INGRAHAM, J. L.; INGRAHAM, C. A.: *Introducción a la microbiología*, Editorial Reverté, Barcelona, 1998.
- PRESCOT; HARLE; KLEIN: *Microbiología*, Editorial Mc.Graw Hill, setena edició, Madrid, Setembre 2009.
- VOET, D.; VOET, J. G.: *Bioquímica*, Editorial médica Panamericana, tercera edició, Buenos Aires, Agost 2006.
- VV.AA.: *Acadèmia de ciències mèdiques de Catalunya i Balears*, Editorial la llar del llibre, Barcelona, 1987.
- VV.AA.: *Diccionario médico de bolsillo*, Editorial interamericana McGraw Hill, vint-i-tresè edició, Madrid, 1989.
- VV.AA.: *Gran Enciclopedia Médica*, Editorial Sarpe, 1978.



- WATSON, J.D.; BAKER T.; BELL, S.P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R.: *Biología Molecular del Gen*, Editorial médica Panamericana, cinquena edició, Madrid 2006.

### **Documents electrònics**

- Anticossos. Espanya  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Anticuerpo>
- Assaig de viabilitat cel·lular. Cuba  
[http://www.sertox.com.ar/img/item\\_full/19003.pdf](http://www.sertox.com.ar/img/item_full/19003.pdf)
- Biología Celular. Espanya  
<http://biologiacelularb.com.ar>
- La célula. Espanya  
<http://recursos.cnice.mec.es/biosfera>

