

**MECANISME DE  
RESISTÈNCIA  
CEL·LULAR ENVERS  
LA CITOTOXICITAT  
D'UN  
QUIMIOTERAPÈUTIC**

## **AGRAÏMENTS**

-Sobretot agraeixo l'esforç que m'ha dedicat la meva tutora dels laboratoris LEITAT del Parc científic de Barcelona.

-A la tutora del col·legi, que m'ha ajudat a dirigir i elaborar el guió i donar-me el seu punt de vista crític.

-Als meus pares per llegir i ajudar-me a polir el treball.

-A la meva germana per donar-me suport moral en els moments més complicats d'elaboració del treball.

## ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ.....	6
2. ANTECEDENTS.....	7
2.1 -Què és el càncer?.....	7
2.2 -Característiques de les cèl·lules canceroses.....	8
2.3 –Quines causes desenvolupen un càncer? Càncer hereditari i adquirit.....	9
2.4 -Importància de la prevenció.....	12
2.4.1 -Principals factors mutagènics als quals estem exposats: tabac i radiació ultraviolada.....	12
2.4.2 -Sedentarisme i dieta.....	13
2.5 – Teràpies aplicades.....	15
2.5.1 –Quimioteràpia.....	15
2.5.1.1 –Introducció a la tècnica.....	15
2.5.1.2 –Actuació.....	16
2.5.1.3 -Vies d'aplicació i tipus de règims de quimioteràpia.....	16
2.5.1.4 -Efectes secundaris més rellevants.....	17
2.5.2 –Radioteràpia.....	18
2.5.2.1 –Braquiteràpia.....	18
2.5.2.2 –Teleteràpia o radioteràpia externa.....	18
2.5.3 –Teràpies hormonals.....	19
2.6 –Estudi de dos agents quimioterapèutics: Gemcitabina i Doxorubicina. Descripció i acció.....	19

3. MECANISME DE RESISTÈNCIA CEL·LULAR ENVERS LA CITOTOXICITAT D'UN AGENT QIMIOTERAPÈUTIC.....	22
3.1 – Hipòtesi.....	22
3.2 –Línies cel·lulars utilitzades.....	22
3.3 –Metodologia.....	23
3.3.1 –Ressebra de cultiu de les dues línies cel·lulars.....	23
3.3.2 – Aïllament de la proteïna.....	28
3.3.2.1 –Bradford.....	28
3.3.2.2 –Electroforesi.....	32
3.3.2.3 –Western.....	35
3.3.3 –Mecanisme de resistència tumoral.....	42
3.3.3.1 –Comptatge de cèl·lules i preparació de la placa de sembra.....	42
3.3.3.2 –Addició d'agent quimioterapèutic i assaig amb MTT.....	44
3.3.3.3 –Formació de formazan i detecció amb espectrofotòmetre.....	46
3.3.3.4 –Determinació de la IC50 i addició a la placa la proteïna en qüestió.....	50
3.4 –Conclusions.....	53
4. FONTS D'INFORMACIÓ.....	55
4.1 –Bibliografia.....	55
4.2 –Webgrafia.....	55

5. ANNEXES.....	56
-Annex 1: Protocol de les tècniques emprades.....	56
-Bradford.....	56
-Electroforesi.....	57
-Western.....	59
-Annex 2: Fitxes tècniques de les línies cel·lulars.....	66
-BxPC3.....	66
-HT1080.....	67
-Annex 3: Estada a l'estabulari.....	68
-Annex 4: Càlculs.....	70
6. GLOSSARI.....	72

## 1. INTRODUCCIÓ

De ben segur que n'hem sentit a parlar, a la televisió, en articles de diari i revistes, de boca de la gent, etc. Tenim però una clara idea del què és? Com és provocat i quins factors poden estimular la proliferació de cèl·lules canceroses? Aquestes i altres qüestions són les que em van motivar a emprendre aquest treball, per veure des de quin punt de vista s'ho pren un expert en el tema i com agafar-t'ho per no deprimir-te al primer moment. Gràcies a tanta gent que hi treballa cada dia, barallant-se amb plaques de sembra, pipetes, provetes, etc. el càncer pot arribar a deixar de ser una de les principals causes de mort al món.

A part de les ganes per aprendre en el món científic, he tingut, com molta gent, una relació força directa amb el càncer, no a nivell personal però sí familiar. No està clar que algun dia surti algú per trobar-ne la cura, ni tan sols està clar que existeixi tal solució, però amb la contribució diària en la investigació es pot aconseguir reduir els efectes del càncer o fins i tot evitar contraure'l. És per això que l'objectiu d'aquest treball és establir un primer contacte amb la malaltia i fer un estudi per demostrar la implicació d'un tipus de proteïna, present en les línies cel·lulars de pàncrees i fibrosarcoma, que es capaç de frenar en gran mesura l'actuació dels agents citotòxics. veure la importància que té actualment, ja que conscienciar-nos de la seva implicació a la societat i intentar conèixer la seva naturalesa pot ser un pas cap a la seva cura.

S'ha estructurat el treball per capítols, començant per fer referència al càncer pròpiament dit, què és i quins són els principals factors de risc als quals estem exposats, entre d'altres coses, i seguint amb l'estudi dut a terme al part científic de Barcelona. Finalment, es conclouen els resultats obtinguts i es verifica la hipòtesi inicial, donant peu a una nova línia d'investigació referida a l'estudi proteic en els càncers. A més a més, es poden trobar referències a les tècniques emprades i experiències pròpies a l'apartat d'annexes.

## 2. ANTECEDENTS

### 2.1 -Què és el càncer?

Segons Salvador Macip, el càncer (figura 1) és una *expansió clonal*, on una sola cèl·lula es reproduïx indefinidament originant còpies seves. Per altra banda, l'OMS (Organització Mundial de la Salut) determina que és la generació ràpida de cèl·lules anòmales que creixen més de la normalitat i poden envair zones adjacents de l'organisme.

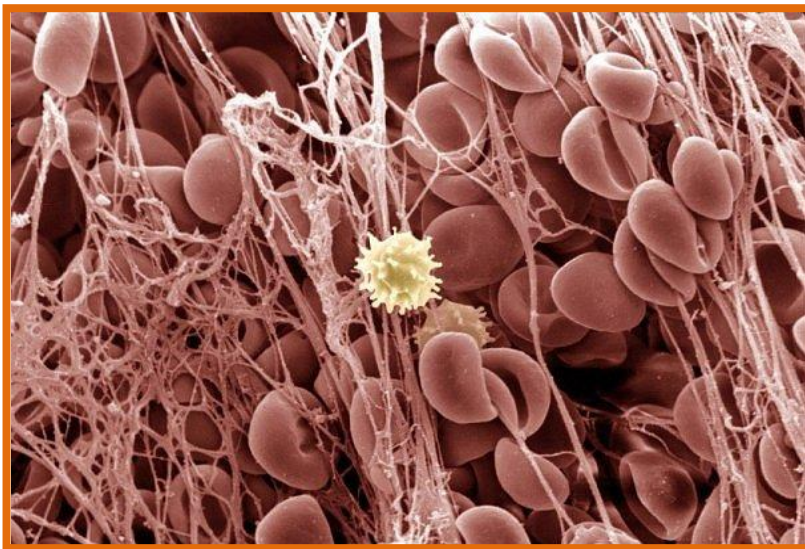


Fig. 1. Imatge obtinguda amb el microscopi electrònic d'una cèl·lula cancerosa del teixit pulmonar.

Font: <http://dom.cat/5wo>

Principals diferències entre tumor i càncer:

Un tumor és una agrupació de cèl·lules que han mutat i formen una massa sòlida. Altres mutacions que s'esdevinguin al tumor pot fer que aquest desenvolupi dues vies molt diferents, una és que esdevingui maligne (o Neoplàsia) i envaeixi altres teixits, donant lloc a un càncer, o bé esdevenir benigne (o Hiperplàsia) i no ser tant agressiu, de manera que pot ser extirpat fàcilment.

## 2.2 -Característiques de les cèl·lules canceroses

Les cèl·lules normals poden esdevenir canceroses quan un seguit de mutacions afecten a la seva fisiologia, és a dir, perden la funcionalitat que tenien i comencen a reproduir-se sense control, incloent-hi el fet de que no necessiten rebre un senyal per iniciar les divisions. Totes aquestes característiques noves que desenvolupa la cèl·lula li permeten anar originant una massa sòlida coneguda com a tumor. Tot i així, alguns casos de càncer no arriben a desenvolupar aquesta massa de cèl·lules, per exemple els diferents tipus de leucèmies.

Les cèl·lules mutades presenten diferents canvis respecte les normals:

- **Canvis al citoesquelet:** les mutacions que acumula una cèl·lula cancerosa poden produir una organització diferent al seu interior, per exemple en el cas dels microfilaments i microtúbuls. Aquestes estructures que tenen la funció, entre d'altres, d'organitzar les divisions cel·lulars i donar forma, poden canviar, donant una nova aparença a la cèl·lula i modificant les seves relacions amb el seu entorn.

- **Canvis en l'adhesió/mobilitat:** les cèl·lules per si soles no poden emigrar del teixit en el qual estan subjugades perquè moririen, ja que deixarien de ser subministrades pels vasos sanguinis. En un càncer però, les alteracions que aquestes cèl·lules pateixen poden fer que marxin del seu lloc i envair altres teixits, procés conegut amb el nom de **metàstasis**.

- **Canvis nuclears:** S'ha determinat que les mutacions que s'esdevenen en les cèl·lules causen també una modificació a nivell nuclear, i això pot resultar útil per al diagnòstic de l'etapa en la qual es troba el tumor.

- **Canvis enzimàtics:** partint d'un DNA mutat, la cèl·lula cancerosa pot produir la síntesi de proteïnes totalment diferents a les que han de ser creades en un moment determinat, donant lloc així a enzims amb funcionalitats diferents. Per exemple, hem trobat que les cèl·lules canceroses poden sintetitzar algun tipus d'enzim que degraden les matrius extracel·lulars d'unió entre cèl·lules i així poden emigrar.



## 2.3 –Quines factors poden portar a desenvolupar un càncer? Càncer hereditari o adquirit?

La principal pregunta que ens fem és, què és el que converteix una cèl·lula normal en cancerosa? La resposta d'entrada és simple: el càncer és una malaltia genètica, és a dir, a nivell de genoma, on una petita alteració pot generar grans repercussions a l'organisme. Tot aquest conjunt d'alteracions que podem patir s'engloben dins el terme de *mutacions*.

Per altra banda, les nostres cèl·lules estan constantment sotmeses a estressos ambientals i a substàncies tòxiques que ens poden malmetre el nostre ADN. Entre aquests podem trobar-hi:

**-Virus:** efectivament una infecció viral pot desenvolupar un càncer, especialment si no és tractat amb l'adequada mesura. Aquest grup inclou per exemple el VPH ( Virus del Papil·loma Humà), associat a càncers de coll d'úter; un virus de la família Herpes que s'associa al Sarcoma de Kaposi i que afecta al sistema limfàtic; un cas específic de retrovirus que causa leucèmia i altres tipus de carcinomes de laringe.

**-Agents químics:** l'alcohol (figura 2), el tabac, l'arsènic, alguns agents antitumorals, sutge, quitrà (un dels components del tabac, per exemple),etc. Totes aquests i d'altres substàncies són principals factors de risc que poden desenvolupar càncer. Més endavant tractarem alguns d'aquests agents químics en els quals hi estem diàriament exposats.



Fig. 2. Malgrat no es coneix ben bé el motiu, s'ha descobert que quan l'organisme metabolitza l'alcohol, es forma una substància anomenada acetaldehid la qual deteriora l'ADN.

Font: <http://dom.cat/5wp>

**-Dieta inadequada:** La ingesta excessiva de grasses provocant sobreprès, diferents tècniques de conservació d'aliments, la disminució de la ingesta d'antioxidants i fibra, etc. són factors de risc de càncer. En l'apartat 2.4 sobre la importància de la prevenció tractarem més a fons totes aquestes qüestions alimentàries.

**- Radiacions:** aquest és possiblement el factor de risc que més costa prevenir, ja que no podem evitar per exemple, no sotmetre'ns a radiacions quan ens hem trencat el braç i ens fem una radiografia per veure l'estat de l'os; també molts metges estan contínuament sotmesos a radiacions dins els hospitals, etc. Totes aquestes radiacions ens travessen contínuament, passant també pel nostre material genètic i quedant-ne afectat en algunes ocasions.

La finalitat de la radioteràpia és precisament la de trencar els enllaços que estableixen les cèl·lules canceroses entre elles fent ús d'aquestes radiacions. Sabem però que les cèl·lules canceroses tenen una major debilitat d'enllaç, de manera que més fàcilment la tècnica serà efectiva.

**- Errors involuntaris de l'ADN polimerasa:** aquest enzim està encarregat del procés de duplicació del material genètic quan la cèl·lula s'ha de dividir. Malgrat té capacitat correctora, és possible, encara que molt difícilment, s'introdueixi un canvi en la nova seqüència de nucleòtids, originant una mutació.

Totes aquestes mutacions susceptibles d'originar un canvi en la nostra seqüència genètica poden causar-nos greus problemes, per exemple que la proteïna sintetitzada a partir d'un gen determinat sigui diferent a la que havia de ser i per tant actuï diferent donant lloc a funcions diferents. Per aquest motiu, depèn de quin gen sigui l'afectat per la mutació, pot representar un trastorn terrible per a les funcions bàsiques de les cèl·lules. Aquesta mena d'agent mutat s'anomena *oncogen*.

Els oncògens van ser descoberts pels doctors Varmus i Bishop als anys setanta, cosa que els va fer guanyar el premi Nobel de medicina al 1989 i va obrir una nova via d'estudi de l'Oncologia i de com i per què es formen els càncers.

Abans d'entrar en el tema de si els càncers són malalties hereditàries o bé si són desenvolupats per factors ambientals, explicarem una mica si és que hi ha algun mecanisme del cos que sigui capaç d'oposar-se a aquest creixement descontrolat de les cèl·lules.

Bé, tal i com s'ha dit, una mutació podrà originar un canvi en la fisiologia d'un gen i causar una incorrecció funcional de la cèl·lula. Quan aquesta es divideixi, aquesta mutació es passarà a les filles, i així successivament. No hi ha res que pugui aturar això? La pregunta és que sí, a més que tal i com veurem, l'aparició del càncer no es tan senzilla com això.

Hi ha una proteïna, anomenada P53 que quan rep la informació de que alguna cosa de dins la cèl·lula no està funcionant degudament, acudeix al lloc en qüestió i intenta reparar-ho. La majoria de vegades la reparació resulta un èxit, però si no surt bé, la proteïna activa un programa de suïcidi anomenat *apoptosi* i la cèl·lula o cèl·lules trastornades s'autoeliminen. Com és possible doncs que el càncer es desenvolupi? La resposta és que una segona mutació és necessària per tal de que la cèl·lula no sintetitzi correctament aquesta proteïna i així no ser declarada a autoeliminar-se. El càncer, per tant, només es dona si s'acumulen tot un seguit de mutacions en certs gens clau. Una sola mutació no és suficient, se n'han de donar vàries per tal que la cèl·lula pugui dividir-se contínuament, evitar els senyals d'apoptosi i altres mecanismes de supressió tumoral i poder independitzar-se per tal d'anar a envair altres teixits (Figura 3).

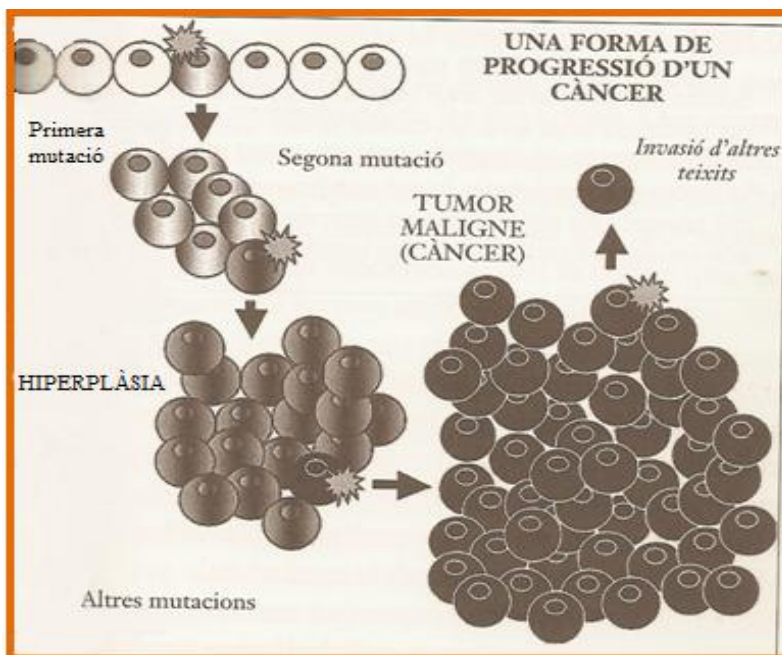


Fig. 3. Forma de progressió d'un càncer a partir de mutacions específiques consecutives

Font: MACIP, Salvador. *Immortals, sans i perfectes*

Tornant al tema del càncer hereditari o càncer adquirit, és evident la possibilitat de que hi pugui haver una certa predisposició genètica a desenvolupar un càncer, però en últim terme seran els factors ambientals els que tinguin l'última paraula. Segons el llibre de Salvador Macip, nombrosos estudis han confirmat que persones d'una regió en concret estaven més protegits a un determinat tipus de càncer, però al canviar-los de regió, les possibilitats s'equilibren amb els de la nova regió.

Amb un exemple molt clar es pot veure fàcilment la idea que s'explica: una persona que és fumadora tindrà més possibilitats d'adquirir càncer de pulmó que no pas algú que no fumi però que hi tingui més predisposició a nivell de gens. A part dels factors de risc ambientals que podem adquirir en funció de la nostra conducta, hi ha tota una sèrie de riscos que, encara que no acabem per desenvolupar un càncer, en tenim més predisposició, com els genètics. Per exemple, se sap que els humans de pell fosca tenen més tendència a desenvolupar càncers, com el de pròstata en els homes o de mama en les dones. No cal oblidar que els factors familiars també hi estan presents, incrementant moltíssim la possibilitat de contraure un càncer en les generacions posteriors si en tenien les anteriors.

## **2.4 -Importància de la prevenció**

No es fàcil arribar a la conclusió que en comptes de lluitar contra el càncer amb agents quimioterapèutics que destrueixen les teves cèl·lules malignes, pot resultar més rendible prevenir-lo. Això no suposa un esforç gaire gros, senzillament consisteix en deshabituar-nos de consumir en excés substàncies tòxiques pel nostre organisme (alcohol, tabac, etc) i fer una vida més saludable començant per la dieta i acabant per realitzar un exercici físic regular i a diari.

### **2.4.1 -Principals factors mutagènics als quals estem exposats: tabac i radiació ultraviolada**

El tabac ha constituït en la nostra societat una substància molt freqüent. Això és degut a que alguns dels seus components són addictius, com la nicotina, però d'altres ens van fent mal cada vegada que n'aspirem el fum. Segons l'American Cancer Society, el tabac és el responsable del 30% dels casos de càncer i, malgrat això, hi ha gent que ens ha arribat a fer creure que la relació fumar-càncer no és tan evident, ja que hi ha exemples de persones que han fumat tota la vida i no l'han desenvolupat. Tal i com dèiem abans, això és una qüestió no només de predisposició sinó també de sort, com una espècie de loteria. Malgrat que uns estudis del National Cancer Institute d'Estats Units estableixen que fumar pot generar entre un 50% i 70% de possibilitats de tenir un càncer, xifres molt elevades, és possible que no l'acabem patint.

Per altra banda tenim la radiació ultraviolada provinent del sol. Aquest factor de risc sol passar desapercebut entre la societat, ja que es creu que la pell cremada només provoca pell morta i dolor i que al cap de pocs dies ja no queda cap símptoma. També que en dies ennuvolats la radiació és menor i que per tant ja no cal protegir-se la pell. La veritat és que els raigs ens afecten per igual, i la moda d'adquirir un to bronzejat ha conduït al descuit de milions de persones cada estiu de posar-se crema pel sol.

A diferència dels casos de càncer lligats al tabac, la majoria dels càncers de pell són relativament benignes, fàcilment detectables a simple vista i tractables eficaçment per cirurgia si es descobreixen en els estadis inicials. Tan sols els **melanomes** (figura 4), els càncers de pell més agressius, tenen un pronòstic dolent, sobretot per la seva gran capacitat de donar metàstasis en poc temps.



Fig. 4. Melanoma

Font: <http://dom.cat/5wq>

#### 2.4.2 -Sedentarisme i dieta

Tal i com sabem, la dieta és molt important a la nostra vida, ja que menjant correctament, variat i sense excés, és poden aconseguir grans resultats, com una bona forma física o un bon estat de salut que conduirà sens dubte a un immillorable estat d'ànim.

Resulta doncs que alguns estudis sobre el càncer han confirmat que un altre 30% dels casos de càncers van relacionats amb la dieta, i una proporció poc més baixa pel que fa al sedentarisme. És per això que si reduïssim aquests mals hàbits, podríem fer baixar el nombre de morts a causa del càncer en unes xifres força elevades. Això, per tant, demostra amb contundència que l'ambient, en aquest cas els hàbits adoptats, tindran gran pes en el desenvolupament d'un càncer.

Sabem que l'exercici físic incrementa l'activitat del sistema immunitari, ja que practicant-lo es té més bon pronòstic si s'arriba a desenvolupar un càncer, i més encara si es combina amb una dieta adequada i moderada. En un informe del WCRF (World Cancer Research Foundation) i l'AICR (American Institute for Cancer Research) s'apuntaven les recomanacions oficials per prevenir el càncer (Taula 1).



Per altra banda, es creu que alguns aliments són capaços d'oferir resistències en contra algun tipus de càncers. Malgrat que aquesta idea es basa en estudis estadístics i no resulten ser un remei definitiu, és cert que un consum amb moderació ens resulta beneficiós i favorable. Tenim per exemple el te verd, el qual és ric en antioxidants i altres substàncies que ajuden a prevenir algunes malalties.

<b><u>Informe preventiu del càncer (WCRF)</u></b>	
No utilitzar suplementes per protegir-nos contra el càncer	
Estar tan prim com sigui possible sense arribar a patir baix pes	
Estar actiu físicament com a mínim 30 minuts al dia	
Limitar el consum d'aliments rics en energia (aliments rics en greixos i / o sucres agregats i / o baixa en fibra) i evitar les begudes ensucrades	
Menjar més d'una varietat de verdures, fruites, cereals integrals i llegums	
Limitar el consum de carns vermelles i processades	
Si bé no del tot, limitar les begudes alcohòliques a dues al dia els homes i una a les dones	
Limitar el consum de sal als nostres àpats	

Taula 1. Fitxa oficial de recomanacions segons la WCRF i la AICR

## 2.5 -Teràpies aplicades

La primera teràpia que es pot fer i que resulta molt útil és localitzar el tumor a temps i extirpar-lo, evitant així que proliferi més del compte fins al punt en què estigui tan escampat que la cirurgia resulta ja inaplicable. Es per això que el diagnòstic precoç del càncer és una de les altres armes per combatre'l, per exemple realitzant anàlisis periòdiques com la mamografia, la colonoscòpia, TAC o bé la mesura de PSA en sang per al càncer de pròstata.

A vegades però resulta necessari atacar la massa de cèl·lules malignes, i és aleshores quan convé aplicar una dosi d'agent quimioterapèutic per reduir el nombre de cèl·lules cancerígenes. Estem parlant de la quimioteràpia.

### 2.5.1 –Quimioteràpia

Encara que hi ha altres tècniques agressives aplicades per combatre els càncers, farem especial esment a la quimioteràpia ja que els estudis realitzats a la part pràctica estan basats en agents quimioterapèutics.

Tal com indica el mateix nom, la quimioteràpia es basa en el tractament de malalties fent servir mètodes químics. Malgrat que la seva aplicació a la nostra societat és de bon tros més àmplia, sovint ens referim a aquesta tècnica com a mitjà de cura del càncer. Tot i això, en alguns casos curar la malaltia resulta ja inabastable, de manera que la tècnica pren un caràcter pal·liatiu, és a dir, millorar la vida del pacient.

La veritat és que és un mitjà molt efectiu, ja que tal i com veurem més endavant, el seu èxit radica en el fet de que les cèl·lules canceroses són més fràgils i més sensibles als tòxics que no pas les cèl·lules normals.

#### 2.5.1.1 -Introducció a la tècnica

Dit d'una manera molt objectiva, parlem de quimioteràpia quan una sèrie de fàrmacs anomenats agents citotòxics<sup>1</sup> són aplicats amb la principal funció d'impedir la reproducció massiva de les cèl·lules canceroses.

---

<sup>1</sup> Capacitat de ser tòxic a les cèl·lules amb la finalitat de produir-ne la seva necrosi o mort cel·lular.

### 2.5.1.2 -Actuació

Un sinònim de la quimioteràpia és *teràpia sistèmica*, perquè els medicaments es distribueixen per tot el cos, a través de la sang. Malgrat ser una tècnica molt precisa i localitzada al focus, els agents quimioterapèutics actuen destruint les cèl·lules que es divideixen ràpidament, propietat principal de la majoria de les cèl·lules malignes que configuren un càncer o neoplàsia, però també pot danyar les cèl·lules normals del nostre cos que ja de per si es divideixen ràpidament, com les cèl·lules de la medul·la òssia o del tracte digestiu. És per això que un cop s'ha aplicat la tècnica, és normal patir tota una sèrie de símptomes secundaris força molestos.

### 2.5.1.3 -Vies d'aplicació i tipus de règims de quimioteràpia

Majoritàriament, hi ha dues vies d'aplicació de la quimioteràpia als pacients:

-Per via intravenosa: és el mètode més comú. El medicament s'administra directament a través de la vena.

-Per via oral: els medicaments són administrats en forma de pastilles, càpsules o líquid.

La veritat és que un gran nombre de passos han calgut per arribar fins on estem ara. Molt al principi, quan es va descobrir l'eficàcia d'algunes substàncies químiques contra el càncer, algunes per exemple d'origen antibiòtic, no es tenia massa en compte les dosis amb què s'aplicava el tractament i això era font d'una multitud molt elevada d'efectes secundaris terribles. Més endavant, es va veure que la teràpia combinada (incloent més d'un fàrmac en el mateix tractament) era molt més efectiva i reduïa de bon tros els efectes posteriors a l'aplicació. Arribats a un punt, es van establir fins i tot les dosis màximes de cada fàrmac que es pot usar amb seguretat i quines combinacions són més eficaces en cada tipus de càncer. Malgrat els grans avenços, la quimioteràpia sol donar-se lligada a altres tècniques per fer més efectiu el tractament. Vegem-ho.

-Combinada: es sol aplicar juntament amb la radioteràpia o cirurgia i inclou règims de diferents agents quimioterapèutics junts. Aquest tipus de quimioteràpia és la forma més freqüent.

-Adjuvant: s'aplica un cop ja s'ha extret la massa tumoral amb cirurgia. La finalitat d'aquest tipus de quimioteràpia és la d'evitar que hagin pogut quedar cèl·lules cancerígenes a la perifèria de la massa i que no hagin estat extretes.

-Neoadjuvant: es dona en el sentit invers de l'anterior. S'aplica primer una dosi de quimioteràpia per tal de reduir la massa tumoral i facilitar-ne així l'extracció amb cirurgia.



-Pal·liativa: tal i com hem explicat anteriorment, la finalitat d'aquesta opció no és la de curar, sinó la de millorar la qualitat i l'esperança de vida del malalt reduint el tumor.

#### **2.5.1.4 -Efectes secundaris més rellevants**

Un dels principals problemes que comporta la quimioteràpia és que l'especificitat relativament baixa dels agents emprats fa que a part de les cèl·lules canceroses, en morin també moltes de sanes, cosa que causa un gran nombre d'efectes secundaris. La seva aparició depèn del tipus de quimioteràpia, però no se sap exactament quins són els efectes secundaris que tindrà una persona fins que comença el tractament. Per aquest motiu es practiquen durant aquest període controls rutinaris per avaluar el procés de tractament. La majoria dels efectes secundaris són temporals i controlables. El fet que apareguin alguns efectes secundaris que en teoria serien propis de l'actuació d'un tractament no vol dir que aquest estigui resultant eficaç. A més a més, tampoc implica que hagin d'aparèixer tots els símptomes. Entre d'altres símptomes, els més freqüents són:

- Pèrdua de la gana
- Restrenyiment
- Fatiga o cansament
- Caiguda del cabell (alopècia)
- Disminució dels glòbuls vermells (anèmia)
- Neuropatia sensorial perifèrica (formigueig i endormiscament dels dits de les mans i dels peus)
- Nàusees i vòmits
- Baixada de defenses (neutropènia)
- Diarrea

## 2.5.2 –Radioteràpia

El seu principi d'actuació és similar al de la quimioteràpia: danyar tant com sigui possible les cèl·lules canceroses, que són més sensibles, i procurar de no afectar gaire les altres. Per fer-ho s'emet una potent radiació ionitzant (Figura 5), incloent-hi els raigs X i gamma, que malmet les cèl·lules mutades per destrucció del seu ADN. El problema però segueix sent el mateix que en la quimioteràpia, que s'utilitzen fortes radiacions per suprimir les cèl·lules tumorals i això és justament una cosa nociva per a l'organisme. Per aquest motiu hi ha diferents tipus de radioteràpia, en funció de si la radiació al pacient està més localitzada o menys.



Fig. 5. Pacient sotmès a un tractament ionitzant.

Font: <http://dom.cat/5wu>

### 2.5.2.1 –Braquiteràpia

Aquest règim de radioteràpia és el més localitzat de tots, de manera que es minimitza la possibilitat d'afectar altres zones de l'organisme al acostar al màxim la font d'irradiació al teixit cancerós. També hi ha la possibilitat d'introduir petits cilindres radioactius al teixit afectat, tal i com es practica per exemple en el càncer de pròstata.

### 2.5.2.2 –Teleteràpia o radioteràpia externa

Tal com indica el nom, aquest tipus es practica des de certa distància del teixit cancerós. Aquesta forma és la més comuna, i el pacient sol acudir diàriament a l'hospital durant un període establert de temps en funció de la malaltia que s'està tractant.

### 2.5.3 –Teràpies hormonals

Com ja sabem, una infinitat del processos metabòlics que es duen a terme al nostre cos estan regulats per hormones. La principal funció d'aquestes és la d'activar o desactivar determinats gens per regular la síntesi de proteïnes.

Durant els anys setanta es va veure que processos que depenien molt del control d'hormones es veien terriblement afectats si hi havia una disfunció o una alteració en la producció hormonal. És per això que es va poder comprovar que alguns fàrmacs podien bloquejar les hormones alterades per evitar que això repercutís en el teixit en el qual anaven destinades. Per exemple aquest és el cas del Tamoxifè, que anul·la l'efecte dels estrògens (hormones sexuals femenines).

Gràcies a estudis realitzats a nivell hormonal s'ha pogut determinar el potencial d'aquest tipus de teràpies i ara és el tractament preferent per a un subtipus de càncers de mama que depenen dels estrògens per seguir creixent.

## 2.6 –Estudi de dos agents quimioterapèutics: Gemcitabina i Doxorubicina. Descripció i acció.

**-Gemcitabina** (Figures 6 i 7): Inicialment la destinació d'aquest agent era la d'actuar com a antiviral, però quan el doctor Larry Hertel va introduir-lo *in vitro* juntament amb cèl·lules leucèmiques, va descobrir que aquest era capaç de matar-les.



Fig. 6. Agent quimioterapèutic Gemcitabina comercialitzat amb el nom de GEMZAR

Font: <http://dom.cat/5wv>

**-Acció:** És un antimetabòlit de bases pirimidiques. Això implica que la Gemcitabina actua com a substrat alternatiu inhibitori en diversos processos enzimàtics claus per a la síntesi d'ADN. Després de la incorporació a l'ADN, sembla induir el procés d'apoptosi. En definitiva, actua inhibint la síntesi d'ADN, evitant així la proliferació cel·lular.

-Aplicacions: S'ha descobert que aquest tipus d'agent quimioterapèutic, que s'injecta per via intravenosa, resulta molt eficaç també en altres línies cel·lulars a part de les sanguínies, com en càncers localitzats al pàncrees, bufeta, limfomes o esòfag.

-Precaucions: Provoca hipersensibilitat. S'ha de vigilar també l'aparició de símptomes respiratoris, ja que podrien estar relacionats amb el tractament. Pot produir també un agreujament de la insuficiència renal o hepàtica en casos de pacients que ja en patissin amb anterioritat. No es recomana administrar la Gemcitabina durant l'embaràs ja que les seves característiques citotòxiques poden actuar sobre el fetus, i tampoc és recomanable l'administració a nens menors de 5 anys (edat aproximada).

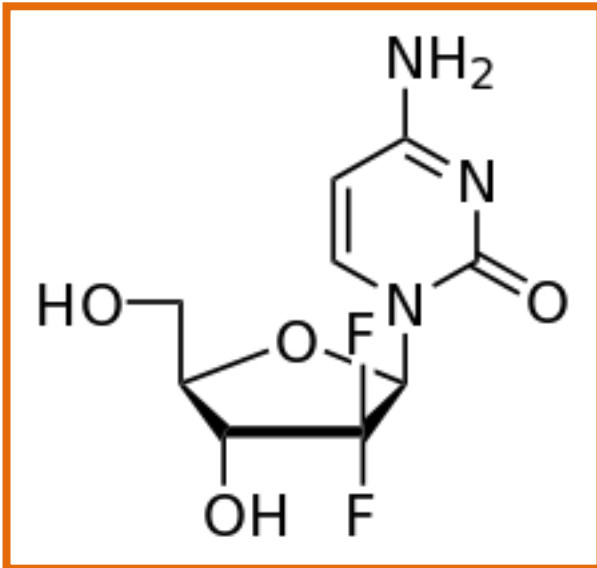


Fig. 7. Fórmula química del compost Gemcitabina

Font: <http://dom.cat/5x8>

-Doxorubicina<sup>2</sup>(Figura 8): La seva història comença quan un grup d'investigadors francesos volien obtenir algun fàrmac anticancerós dels microbis del terra, i aïllant una mostra van poder determinar el gran efecte que tenia per combatre leucèmies i limfomes de rates i ratolins.

-Acció: És un antibiòtic que exerceix els seus efectes sobre les cèl·lules canceroses per mitjà de dos mecanismes diferents:

- Intercalació: té paper d'agent intercalant. La Doxorubicina encaixa entre les bases de ADN i bloqueja la síntesis de la cadena i la seva transcripció.

<sup>2</sup>Es un material fotosensible per això a vegades es recobreix amb un embolcall d'alumini per evitar que li afecti la llum.

- Inhibició dels enzims: la Doxorubicina inhabilita l'activitat enzimàtica de la Topoisomerasa II, cosa que comporta a una desestabilització de les dues cadenes i per tant una ruptura a nivell de gens.

-Aplicacions: La Doxorubicina, administrada també per via intravenosa, és utilitzada per a una gran varietat de càncers i només pocs d'aquests no responen al medicament. Alguns d'aquests en els quals la Doxorubicina no és efectiva serien el càncer de colon, melanoma, leucèmies cròniques i el càncer renal. Aquest agent quimioterapèutic es troba vorejat per una capa lipídica, de manera que redueix la toxicitat del medicament al prevenir els seus efectes en teixits no cancerosos.

-Precaucions: Els fills de mares que han estat tractades amb Doxorubicina poden patir defectes des del naixement. Per tant no és recomanable engendrar quan s'està sotmès al tractament quimioterapèutic. Hi pot haver també complicacions més greus si el pacient ha tingut altres problemes de salut, com per exemple la varicel·la, càlculs renals i malalties cardíques o hepàtiques. Per aquest motiu els tractats han d'indicar sobre aquests riscos patits al doctor abans de començar a dosificar-se amb la Doxorubicina.

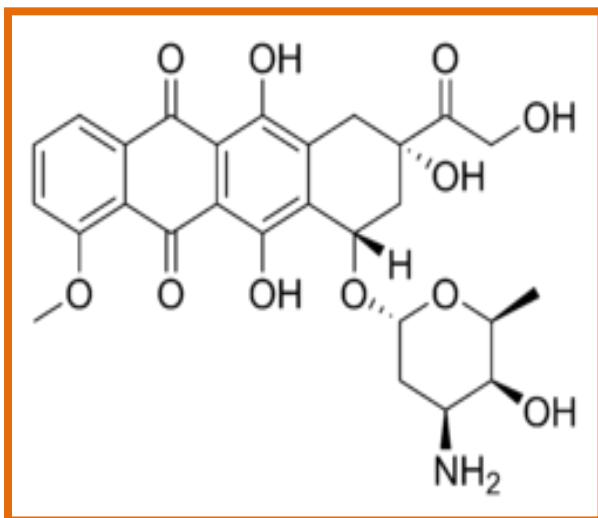


Fig. 8. Fórmula química del compost Doxorubicina

Font: <http://dom.cat/5x7>

### **3. MECANISME DE RESISTÈNCIA CEL·LULAR ENVERS LA CITOTOXICITAT D'UN AGENT QUIMIOTERAPÈUTIC**

#### **3.1 -Hipòtesi**

Les línies cel·lulars BxPC3 i la HT1080 sintetitzen una proteïna molt específica que està implicada en el mecanisme de resistència cel·lular respecte a la citotoxicitat d'un agent quimioterapèutic, de manera que es pot arribar a un punt del tractament en què l'ús d'aquest tipus de medicament pot resultar ineficaç.

#### **3.2 -Línies cel·lulars**

Aquest treball s'ha basat en l'estudi de dues línies cel·lulars: l'HT1080 i la BxPC3. Malgrat algunes de les tècniques realitzades s'han complementat amb altres línies, aquestes dues són de les que s'han elaborat les conclusions respecte a l'addició de la proteïna associada al mecanisme de resistència a un agent quimioterapèutic.

La primera línia és de Fibrosarcoma, i això implica que el càncer desenvolupat a la línia s'origina en un teixit conjuntiu com pot ser als ossos, cartílags, músculs, vasos sanguinis, etc.

- El Fibrosarcoma és un tumor molt poc freqüent, de cèl·lules fusiformes malignes que poden presentar-se amb diferents graus de diferenciació. La zona de més probabilitat que aparegui és al voltant del genoll al fèmur distal i la tibia proximal seguits de la pelvis.
- Es sol presentar en adults entre 30 i 60 anys d'edat i afecta a homes i dones per igual.
- La configuració que presenta el tumor és una massa dolorosa localitzada.

L'altra línia és la de pàncrees, i sol desenvolupar-se a la glàndula pancreàtica.

- Tot i que depèn de l'extensió del tumor en el moment del diagnòstic, el pronòstic és generalment molt dolent ja que pocs malalts sobreviuen més de cinc anys després del diagnòstic i la remissió completa és extremadament rara. Aquest càncer té un índex de mortalitat molt elevat.
- S'han identificat alguns factors de risc associats al càncer de pàncrees, com l'alcohol o el tabac, el fet de viure en un món urbà es creu que pot generar més possibilitats de contraure'l, factors genètics, dieta, etc.

- La detecció del càncer de pàncrees sol ocórrer a través d'una ecografia abdominal, en què s'apreciï la formació del teixit neoplàsic al voltant del pàncrees. Lamentablement, això sol passar quan el càncer ja s'ha expandit a altres òrgans.

### 3.3 –Metodologia

#### 3.3.1 -Ressembrament del cultiu de les dues línies cel·lulars

**-Objectiu:** S'ha de mantenir viu en tot moment l'objecte d'estudi que tenim en cultiu. És per això que contínuament s'han d'anar practicant ressembres per evitar així que les cèl·lules que tenim morin degut als propis residus que generen. Cal mantenir unes normes d'higiene i esterilitat ja que estem tractant amb material viu i sensible.

**-Material:**

-Guants esterilitzats per tocar el material

-Bata

-Alcohol desinfectant de 96° (Figura 8)



Fig. 8 Cal netejar amb alcohol desinfectant cada vegada que es deixa el lloc d'estudi. També fer una ruixada a les mans i a sobre els guants abans de tocar qualsevol reparació a l'interior de la campana de flux laminar.

-Cambra de Flux Laminar (Figura 9): En aquesta cambra és on es manipulen les línies cel·lulars i altres materials vius, ja que disposa d'un filtre anomenat HEPA que genera un aire estèril a l'interior de la vitrina i impedeix l'entrada de substàncies nocives pel material amb el qual s'està treballant. A més a més l'obertura de la cabina és regulable, de manera que en funció del nostre objecte d'estudi, podrem obrir més o menys el vidre frontal. En definitiva, la cambra de flux laminar resulta molt útil per manipular les mostres





Fig. 9. Vistes frontal i de perfil de la cambra de flux laminar. Trobem el filtre HEPA a la part superior

- Incubadora (Figura 10): És on es guarden els cultius, essent un lloc idoni ja que es mantenen unes condicions invariables de temperatura i humitat. Aquestes mesures són de 37 °C i 5% de CO<sub>2</sub> (humitat). La incubadora té la mida d'una nevera aproximadament, amb la diferència que la primera és més ample.



Fig. 10 Incubadora amb diferents preparacions al seu interior

Fig. 11 Centrifugadora



- Centrifugadora (Figura 11): La funció principal d'aquest aparell és la de concentrar la preparació que nosaltres hi posem. Convé equilibrar la centrifugadora sempre que s'utilitza, de manera que si a l'interior hi posem un pot a qualsevol dels quatre llocs, convé posar un altre pot amb un volum aproximat de líquid al lloc oposat. No es pot aplicar la centrifugació just sortir de la nevera, s'ha d'esperar a que es temperi.

-Nevera: cal tenir present també la nevera on es guarden els medis de cultiu. Aquests medis provenen d'estoc ja elaborats i en pots, de manera que ens limitem a abocar-ne el volum desitjat a la nostra placa de sembra. Al medi s'hi sol afegir un sèrum<sup>3</sup> a base de proteïnes, aliment concentrat per la cèl·lula perquè creixi. Així doncs, la finalitat de la refrigeració dels medis en les neveres es la de conservar.

**-Procediment:** a més a més, les ressembres són necessàries si s'està mantenint un cultiu pel seu posterior estudi. Principalment perquè les cèl·lules, igual que les del nostre cos, experimenten divisions i algunes proliferen ràpidament. Per aquest motiu, quan hi ha una **confluència** massa elevada a la paret del recipient on hi ha les cèl·lules, cal ressemar-les de nou. A més a més, és important mantenir un pH que no els hi resulti perjudicial, i els **detritus** que en resulten del seu metabolisme són àcids, de manera que si no vigiléssim el cultiu pràcticament cada dia, les cèl·lules acabarien morint. Aquest canvi es pot apreciar ja que el medi de cultiu, tal i com es veuen a la fotografia de l'incubadora, és de color vermellós, i en canvi un medi àcid tendeix a tornar-se de color groc. Quan passa això, s'ha de llençar el medi i afegir-n'hi de nou. És per aquest motiu que es practiquen les ressembres.

Els cultius de les nostres línies cel·lulars es guarden en frigorífics a uns -80°C. D'allà agafem les nostres dues línies, fibrosarcoma (Figura 12) i adenocarcinoma de pàncrees (Figura 13). Abans de realitzar la ressema, cal un estudi morfològic dels tipus de línies amb el microscopi, amb la finalitat de identificar-les i saber-les diferenciar.

---

<sup>3</sup> Cal anar molt en compte de no confondre el sèrum emprat en cultius del sèrum fisiològic utilitzat als hospitals. Aquest últim és una dilució d'aigua amb glucosa i altres molècules energètiques, i es fa servir com a substitut de la sang.

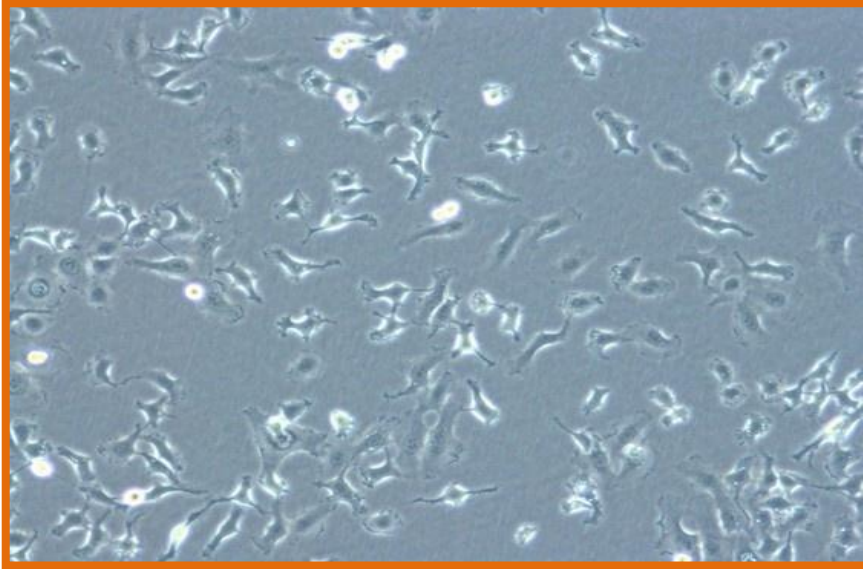


Fig. 12. Vista al microscopi òptic de la línia cel·lular de Fibrosarcoma. Les seves cèl·lules presenten aquesta morfologia, solen ser allargades i formant petites ramificacions.

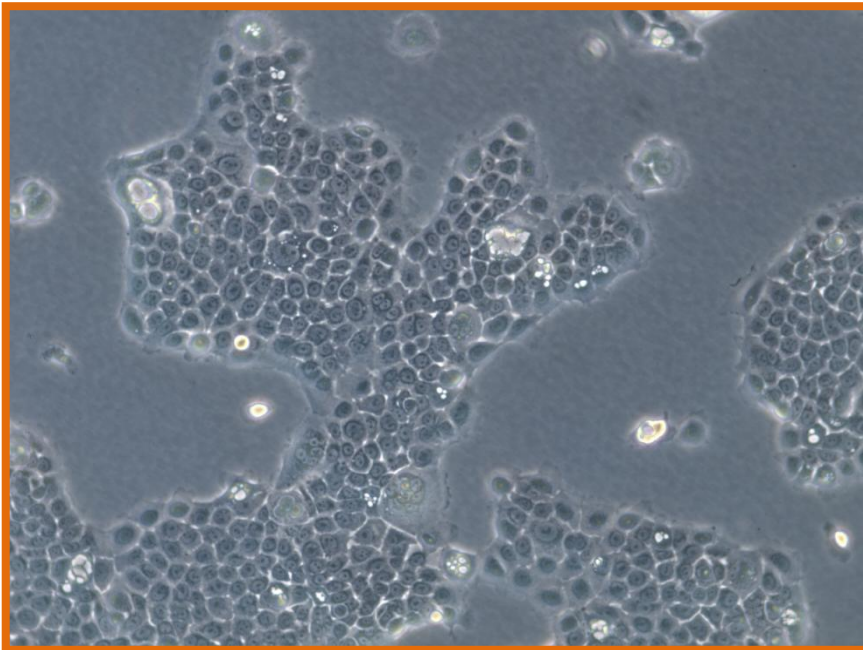


Fig. 13. Línia cel·lular de pàncrees vista amb el microscopi òptic. Aquesta línia forma agrupacions d'illes molt característiques del pàncrees, conegudes com a illots de Langerhans.

Després d'obtenir les línies es posen a descongelar en un bany a 37°C de manera que quan estiguin a la temperatura òptima, ja es pot iniciar la pràctica. El procés segueix a continuació desenganxant les cèl·lules de la paret amb un extracte específic, abocar la solució a un tub de treball i centrifugar-lo per tal de concentrar les cèl·lules disperses. D'aquesta manera es forma un **pellet** de cèl·lules i ja podem aspirar amb una pipeta (Figura 14) el medi amb detritus, i abocar l'acumulació de cèl·lules en un nou tub amb medi renovat. Seguidament s'agita el tub amb el pellet per tal de dissociar-lo arrel de la centrifugació i es trasllada el contingut al nou recipient, tenint en compte de posar una substància abans que permetrà la fixació de les cèl·lules a la paret, del contrari aquestes moririen.



Fig. 14. Les pipetes resulten un estri de gran utilitat a l'hora d'aspirar volums força precisos. La punta de la pipeta és variable, i dependrà del volum que sigui capaç d'aspirar.

En algunes ocasions però, establir una passada de la línia d'un cultiu a un altre per motius d'espai o toxicitat del medi, requereix descartar un volum de cèl·lules. Per aquest motiu, la ressembrança de les nostres dues línies va generar un pellet de cèl·lules. Nosaltres vam aprofitar aquest per obtenir-ne les proteïnes implicades en el mecanisme de resistència tumoral. Centrifugant aquest pellet amb PBS (Tampó fosfat salí) 1x a 13000 rpm durant 10 minuts, s'obté el **sobrenedant** les proteïnes en qüestió. Ara només falta agafar un mil·lilitre d'aquest sobrenedant i dipositar-lo a l'interior d'un eppendorf etiquetat amb el nom de la línia. És d'aquí d'on s'extreurà el líquid amb la línia cel·lular que s'ha emprat en les tècniques que es descriuran: Bradford, Electroforesis i Western.

### 3.3.2 -Aïllament de la proteïna

Aquest apartat inclou les diferents tècniques emprades al laboratori per aïllar la proteïna implicada en el mecanisme de resistència cel·lular.

#### 3.3.2.1 -Bradford

**-Objectiu:** El Bradford és un colorant anomenat Comassive Blue que s'uneix a les proteïnes i en permet la quantificació. Després de centrifugar la nostra línia cel·lular i obtenir la solució proteica, aquesta tècnica ens permet saber la concentració per microlitre de proteïna.

**-Material:**

<u>Equipament</u>	<u>Reactius</u>
-21 Cubetes	-Bradford
-Espectrofotòmetre	-Línies cel·lulars i BSA
-Dispensador automàtic	-Tampó RIPA

**-Procediment:**

-Es preparen 8 cubetes per a la realització de la recta patró (4+4 de rèplica) i 6 cubetes més per a la nostra línia cel·lular amb les seves respectives rèpliques<sup>4</sup>. (Figura 15). La finalitat de doblar el nombre de cubetes necessàries és la d'obtenir més precisió en els resultats.

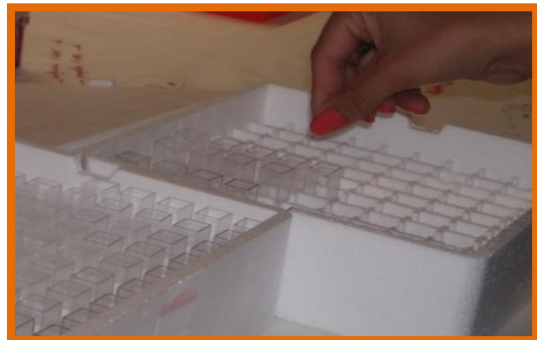


Fig. 15. Cubetes

-Es calcula la quantitat de Bradford i dissolvent necessaris per a cada cubeta. És necessària una dilució 1/5 de 25 ml, per tant el volum de Bradford emprat es correspondrà a 5 ml. Un cop feta la dilució en un tub, tapem el contorn d'aquest amb paper de plata ja que el reactiu Bradford és sensible a la llum.

-Es posen 2 ml de dilució dins de cada cubeta amb un dispensador automàtic (Figura 16).

---

<sup>4</sup> Fan un total de 21 ja que n'hem preparat una mostra *blanca*, nom que rep el control al ser el Bradford sense proteïnes.



Fig. 16. Dispensador automàtic

-S'elabora la recta patró afegint BSA (proteïnes pures de vaca) a les cubetes patró en la mesura indicada segons la taula (Figura 17).

**Mètode de Bradford**

- Preparar corba patró BSA : estoc de BSA 1,5mg/ml

[µgr/ml]	3µgr -----	2µl
	7,5µgr -----	5µl
	13µgr -----	10µl
	19,5µgr -----	13µl

Fig. 17. Taula pe a la realització de la recta patró

-Un cop posat el BSA a cada cubeta patró, s'agita bé per barrejar-ne els components. Seguidament es llegeix amb l'**espectrofotòmetre** (Figura 18) l'absorbància proteica i elaborem la recta patró. El resultat seria una recta ascendent.

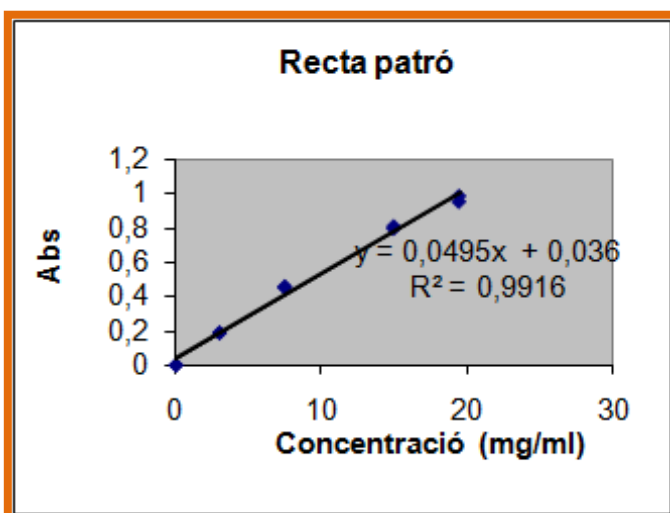


Fig. 19. Tal i com podem veure pel valor de  $R^2$ , la nostra recta patró ha resultat quasi de 1 (totalment recta)



-A continuació es col·loquen les cubetes de les nostres línies i la mostra blanca d'una amb una dins l'espectrofotòmetre. L'aparell emetrà un raig que, incidint en la cubeta, determina l'absorció proteica de la mostra. Com més alt sigui el valor, més quantitat de proteïna hi haurà.



Fig. 18. Espectrofotòmetre

### **-Anàlisi de resultats:**

Si ara consultem a la recta patró (Figura 19) l'absorbància obtinguda a les nostres cubetes, podem determinar la concentració per microlitre.

Els resultats obtinguts han estat sintetitzats en un full de càlcul (Taula 2). S'han utilitzat 5 línies més (OVCA, DAOY, HT29, MCF7 i PANC-1) per complementar l'experiment. A la dreta dels nombres de les línies en qüestió hi ha l'absorbància que ens ha mesurat l'espectrofotòmetre. Ara mirem a la taula de la recta patró i establim la concentració en mg/ml (és el mateix que  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) en funció de l'absorbància obtinguda. Veiem que aquest resultat ha estat dividit per dos, perquè inicialment havíem preparat 2 ml de solució per cubeta en comptes de 1 ja que per al volum de 1, l'espectrofotòmetre no és capaç de llegir-ne l'absorbància.

Si continuem avançant en la taula, veiem que de les dues rèpliques que vam preparar de cada línia n'efectuem la mitjana aritmètica i seguidament calculem els  $\mu\text{l}$  que suposen tenir una concentració de 80  $\mu\text{g}$ . Això es fa per tenir una concentració igual de proteïna quan ho posem a cada un dels pouets de la següent tècnica que farem.

Amb aquest volum obtingut per a 80  $\mu\text{g}$ , hi afegim un valor exacte de 10  $\mu\text{l}$  tampó Laemmli 4x que el que farà és facilitar la desnaturalització de les proteïnes, cosa que necessitem per avançar en l'experiment. A continuació, com que el volum màxim que cap a cadascun d'aquests pouets és de 40  $\mu\text{l}$ , restem aquest valor del volum de cada línia sumat amb el tampó per saber la quantitat necessària de tampó RIPA que necessitem per enrasar el pouet.

Taula. 2. Resultats obtinguts de les diferents línies cel·lulars en la tècnica de Bradford.

<b>Bradford</b>										
Recta patró										
[ ]	Abs	Mostra	Abs	Conc µg/µl	Volum (µl)	Conc/Vol µg/µl	Mitjana	80µg	4x (tampó Leemill)	µl RIPA
0	0	OVCAR	0,2/4	4,846	2	2,423	2,889	27,689	10	2,311
0	0		0,357	6,711	2	3,355				
3	0,187	DAOY	0,728	13,948	2	6,974	7,330	10,915	10	19,085
3	0,188		0,799	15,371	2	7,685				
7,5	0,449	HT29	1,16	22,508	2	11,254	11,053	7,238	10	22,762
7,5	0,457		1,11	21,505	2	10,803				
15	0,807	MCF7	0,892	17,235	2	8,618	8,633	9,267	10	20,733
15	0,793		0,895	17,295	2	8,648				
19,5	0,949	PANC-1	0,802	15,431	2	7,716	7,640	10,471	10	19,529
19,5	0,982		0,737	15,130	2	7,565				
		HT1080	0,358	6,530	2	3,265	3,360	23,807	10	6,193
			0,377	6,911	2	3,456				
		BxPC3	0,382	6,610	2	3,305	3,275	24,426	10	5,574
			0,350	6,490	2	3,245				

### 3.3.2.2 -Electroforesi

**-Objectiu:** Aplicar un corrent elèctric a les proteïnes que tenim barrejades per identificar, a partir de la seva massa, la proteïna que a nosaltres ens interessa.

**-Material:**

<u>Equipament</u>	<u>Reactius</u>
-Spin centrifugador	-acrilamida (gel)
-Kit <i>mini-protean</i>	-MiliQ (aigua molt destil·lada)
-Font de corrent, ànode i càtode	-TEMED
-Carcassa per sostenir el gel i vidres	-Isopropanol
-Pipetes	-Substància reguladora de pH

**-Procediment:**

-Es munta la carcassa (Figura 20) on deixarem que el gel es solidifiqui. Això implica col·locar durant el procés dos vidres sobreposats amb un petit espai entremig on hi anirà el gel.

-Formació del gel. Aquest està dividit horitzontalment en dues parts: la superior, anomenada *Stacking*, té la funció de retenir les proteïnes un cop són inserides als pouets, i la inferior, anomenada *running*, és la part per on les proteïnes es desplaçaran quan s'hi apliqui el corrent elèctric.



Fig. 20. Les dues palanques que sobresurten tenen la funció de subjectar el vidre

-Preparació del *running gel*: acrilamida + MiliQ + Subs. Reguladora de pH. Preparem la dilució en funció de si volem que les xarxes que forma el gel estiguin més unides, i per tan més difícil de passar a través seu, o més distanciades. En el nostre cas, com que la proteïna que ens interessa té una massa molt petita, la xarxa que formarem serà molt concentrada per evitar que caigui i perdre-la al fons del gel. (Veure Annex 3 dins l'apartat de *protocol de les tècniques emprades* per saber la quantitat de cada component utilitzat).

-S'omple de gel *running* amb una pipeta l'interior dels dos vidres sense arribar a la franja superior verda de la carcassa.



-Addició del TEMED: aquesta substància farà que s'iniciï la polimerització del gel. També l'afegim amb una pipeta. Esperem uns minuts perquè solidifiqui.

-Enrasem amb isopropanol fins a la franja verda. Aquest component té la funció d'estabilitzar la formació del gel (estat sòlid) partint de la solució líquida. Passats uns minuts, s'enretira l'isopropanol del gel.

-Preparació de l'*stacking gel*: Aquesta part del gel conté els mateixos components (Figura 21) que l'anterior. En funció de la concentració que volem la xarxa, variarà el volum que hem de posar de cada component a l'*stacking*.



Fig. 21. Components per elaborar el gel

- S'afegeix el TEMED per solidificar aquesta part i col·loquem una pinta a sobre per formar els pouets.

-Quan el gel estigui totalment solidificat, s'enretira la pinta i es desmunta la carcassa. S'agafa el gel, subjectat pels dos vidres, i es col·loca a l'interior del Kit-miniprotean.

-Es centrifuguen amb un spin (figura 22) els eppendorfs amb 40  $\mu$ l de cada línia cel·lular. Recordem que aquest valor inclou el volum de sobrenedant que té 80  $\mu$ g de proteïnes més els 10  $\mu$ l de tampó Laemmli més un valor variable de tampó de lisis RIPA. La solució final de 40  $\mu$ l adquireix un color blavós a causa de tampó Laemmli (Figura 23).



Fig. 22. Spin que centrifugarà les proteïnes per concentrar-les

-Un cop centrifugada la solució, es procedeix a col·locar els eppendorfs a l'interior d'un aparell que escalfarà fins a 95 °C amb la finalitat de desnaturalitzar totes les proteïnes que hi ha.

-Amb una pipeta es recullen 40 µl d'un eppendorf i s'aboquen al segon pouet del gel començant per l'esquerre. Es repeteix el procés afegint aquest mateix volum a cada pouet, de manera que es tinguin les proteïnes de les diferents línies cel·lulars repartides pels pouets.

- S'aboca sèrum a la capsa del Kit-miniprotean i es tapa, connectant l'ànode (pol positiu) i el càtode (pol negatiu) a una font d'alimentació (Figura 24). Es veu com passa el corrent ja que es generen bombolletes ascendents entorn del filament, situat en la part posterior del muntatge.



Fig 23. En aquesta fotografia es pot apreciar cada un dels pouets amb la seva dilució de Laemmli i proteïnes en el Stacking gel.

Malgrat hi ha un període d'espera establert per a l'electroforesi, el temps depèn força de la massa de la nostra proteïna (**12'9** kilo Daltons<sup>5</sup>), per tant es para el corrent quan convingui, sense deixar-se activat massa temps per evitar perdre la proteïna cap al fons del gel. Així, passat el temps i formades les columnes de proteïna al llarg del running, es desmunta el kit i queden amb els dos vidres sobreposats amb el gel a l'interior. Aquest gel convindrà no llençar-lo encara ja que serà necessari per seguir el treball amb la següent tècnica.

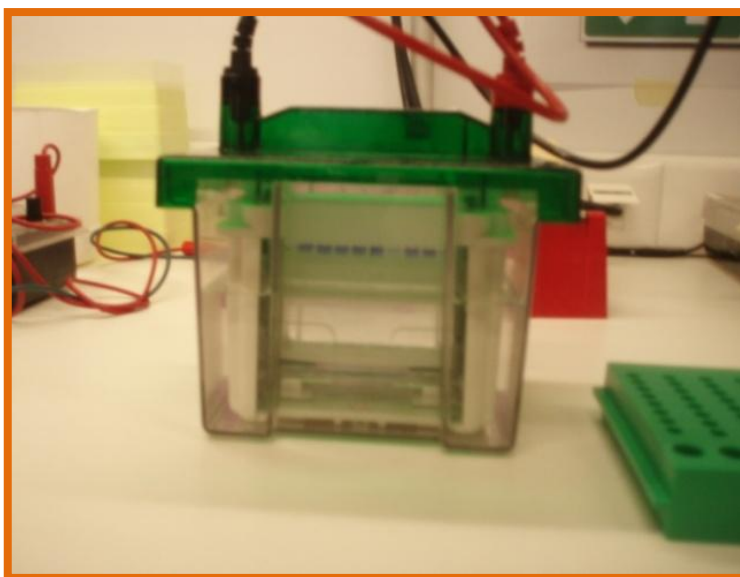


Fig. 24. Kit mini-protean connectat a una font d'alimentació

<sup>5</sup> 1 Dalton (Da) =  $1'66 \times 10^{-24}$  grams

### 3.3.2.3 -Western

**-Objectiu:** Detectar les proteïnes de les nostres línies cel·lulars. Això s'estudiarà a partir de 1) Transferència proteica del gel a la membrana, 2) Incubar-la posteriorment amb anticossos per detectar les bandes de proteïna i 3) Fer un revelatge a la Cambra Fosca.

#### **-Material:**

##### Equipament

- Sandvitx (2 esponges + 2 papers de filtre + coberta externa de plàstic)
- Membrana activada
- Gel d'electroforesi
- Cubeta mini-protean de transferència Western
- Font d'alimentació
- Tinys: Ponceau i Comassie
- Belly Dancer

#### **-Procediment:**

-Abans de qualsevol muntatge, cal activar la membrana a la qual se li transferiran les proteïnes. Aquesta activació consisteix en una sèrie de remullades per tal de fer-la permeable. Tot això es realitza en una cubeta al Belly Dancer, la funció del qual és mantenir la mostra en agitació.

- 3 minuts amb metanol
- 10 minuts amb aigua destil·lada
- Un cop fet els dos passos anteriors, es submergeix la membrana en tampó transfer fins que s'iniciï la tècnica.

- Paral·lelament a l'activació, submergim dues esponges en tampó de transferència i també dos papers de filtre, anomenats papers *Whatman*, fins que iniciem la tècnica.

- Passada l'estona acordada en el protocol de la tècnica per a l'activació de la membrana, ens disposarem a muntar el complex de transferència, anomenat "sandvitx" per la seva configuració per capes.

- Muntem el “sandvitx” (Figura 25): es col·loquen les dues làmines d'esponja en contacte amb les parets del plàstic, que són les dues superfícies quadrades amb forats unides per una banda amb una tira. A continuació es torna a fer ús del gel creat a la tècnica anterior: com que aquest estarà a l'interior dels dos vidres, s'enretira un i al lloc d'aquest s'hi adhereix un paper de filtre, de manera que molt delicadament s'empeny amb una palanca el gel del vidre per tal que aquest quedi sobre el filtre. És important col·locar correctament les capes en el procés, de manera que l'ordre és, partint de la cara negra de l'estri: esponja, paper de filtre, gel, membrana, paper i esponja. La transferència es realitzarà del negre (negatiu) al vermell (positiu).

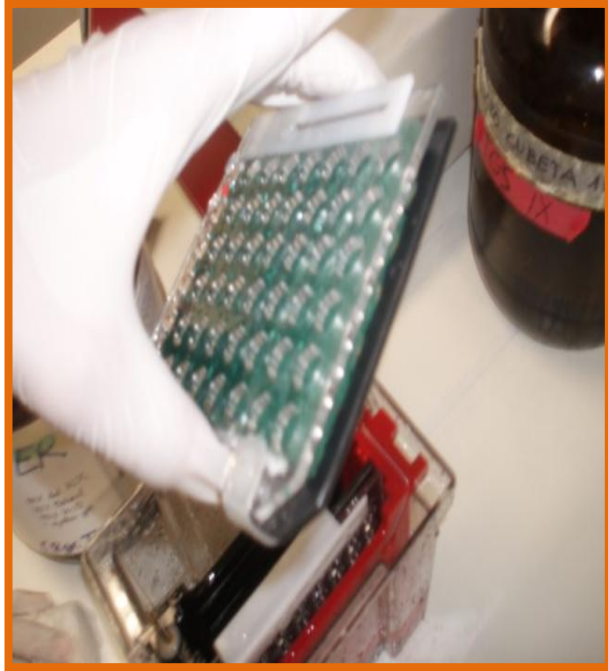


Fig. 25. Aparença que adopta el sandvitx un cop muntat

Cal tenir en compte que quan s'enretira el gel del vidre i s'adhereix al filtre, molt possiblement quedaran bombolles entremig, de manera que hi passarem per sobre un rodet per eliminar-les, ja que si hi fossin podrien impedir que el corrent passi i es realitzi la transferència.

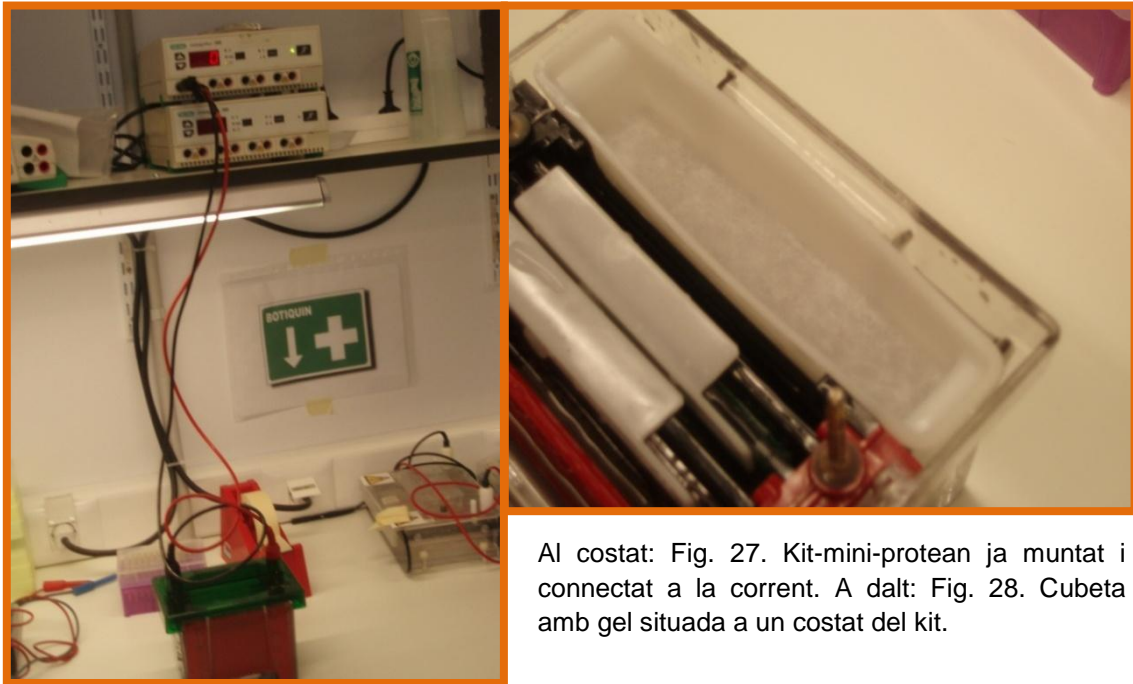
- Un cop disposat tot en capes, es procedeix a tancar-ho i es col·loquen dins el suport, amb la cara negra del sandvitx tocant la cara negra del suport. A continuació es posa dins la cubeta mini-protean de transferència Western i s'hi aboca a l'interior tampó transfer 1x fins a cobrir-ho totalment (Figura 26).



Fig. 26. Abocar Tampó Transfer 1x a l'interior de la cubeta mini-protean

- Es connecta de nou al corrent elèctric (Figura 27). A més a més, juntament amb el sandvitx es col·loca a l'interior una altra cubeta més petita on hi haurà gel (Figura 28), el qual refredarà el procés ja que es desprèn molta calor durant la transferència.

Cal tenir en compte quines són les condicions d'amperatge per tal que el procés sigui dut a terme correctament. Així doncs, és necessari un valor constant de 350mA, durant aproximadament 60 minuts. Important no passar-se de l'hora de transferència. Un cop parada desmuntar-la, no es pot deixar muntada.



Al costat: Fig. 27. Kit-mini-protean ja muntat i connectat a la corrent. A dalt: Fig. 28. Cubeta amb gel situada a un costat del kit.

- Acabada la transferència, que dura tres quarts d'hora aproximadament, es desconnecta el corrent i es desmunta el kit-miniprotean de transferència. S'enretira el suport i es treu el sandvitx, el qual serà desmuntat per obtenir el gel i la membrana.

- Es banya la membrana en una cubeta amb Ponceau (Figura 29) amb la finalitat de comprovar si la transferència s'ha produït. Això dura aproximadament 15 minuts. També es submergeix el gel en aigua per a rentar-lo.

-A continuació es posa tot al Belly-Dancer perquè s'agiti (Figura 30). És molt important la hidratació de la membrana durant el procés, ja que s'ha de permeabilitzar. Per tant, quan no utilitzem la membrana, es deixa en agitació.



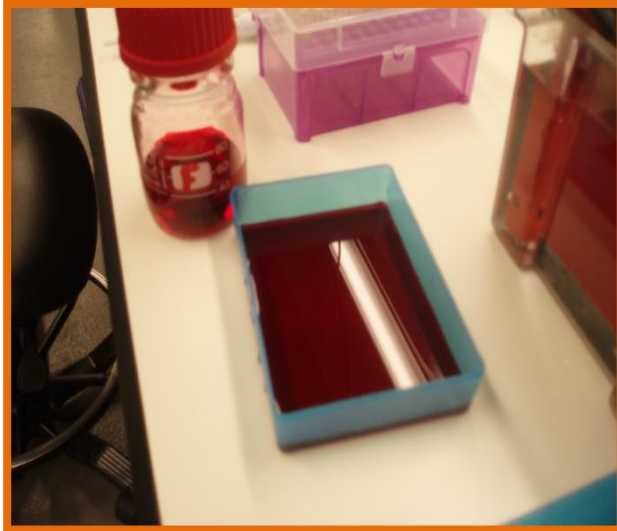


Fig. 29. Membrana submergida en la solució vermella de Ponceau.



Fig. 30. El *Belly Dancer* manté en constant hidratació la substància que hi ha en el líquid de la cubeta.

- Un cop la membrana s'ha tenyit de vermell per l'acció del colorant Ponceau, es prepara 1L d'àcid acètic ( $\text{CH}_3\text{-COOH}$ ) a l'1% per destenyir la membrana<sup>6</sup>, i després es deixa amb aigua altament destil·lada en agitació fins que es començarà amb la hibridació per identificar les proteïnes que acabem de transferir. Hibridar significa tractar la membrana amb anticossos per detectar les bandes de proteïnes.

- Un cop rentat el gel, aquest es tenyeix amb Comassie per veure el que no s'ha transferit a la membrana. Veiem que dona força coloració perquè com que ens interessava una proteïna de baix pes molecular, es va formar una xarxa molt concentrada i per això moltes proteïnes més grosses que la nostra han quedat acumulades al gel i no s'han transferit, a part perquè el temps de Western ha estat de poca durada.

- Ara la feina amb el gel ja s'ha acabat, però es pot conservar i no eliminar-lo. Així que s'asseca el gel amb un filtre (Figures 31 i 32) i, aplicant el buit a seixanta graus durant aproximadament dues hores, el gel queda completament unit a un paper, de manera que adquireix resistència i no es trenca tan fàcilment (Figura 33).

---

<sup>6</sup> El primer cop que posem l'acètic ràpidament la cubeta adquirirà un to vermellós, de manera que remenem una mica i el descartem, per començar a fer així els 2 o 3 rentats necessaris fins que la membrana estigui totalment destenyida.

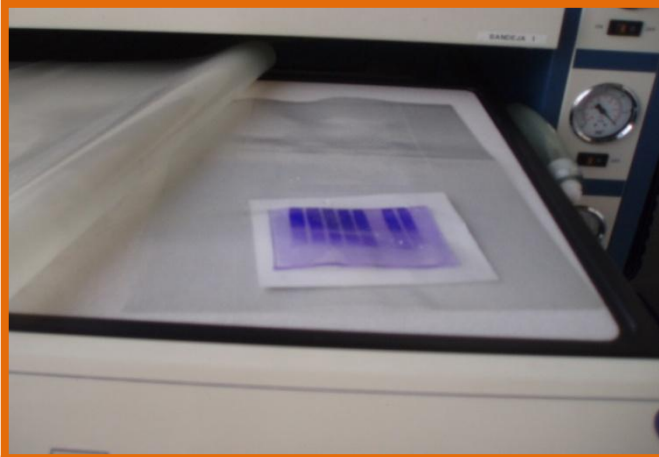


Fig. 31. El gel està col·locat sobre el paper i tot junt sobre la reixeta de l'aparell, oberta horitzontalment cap a nosaltres. Una vegada cobrim el gel amb el plàstic, pressionem la reixeta i la tanquem, de manera que s'iniciarà el procés d'adherir el gel al paper a partir d'aplicar-hi el buit. Passada l'estona, el gel hi estarà completament unit, i ja es podrà manipular sense risc de trencar-lo.



Fig. 32. Aparell emprat per a la conservació del gel.

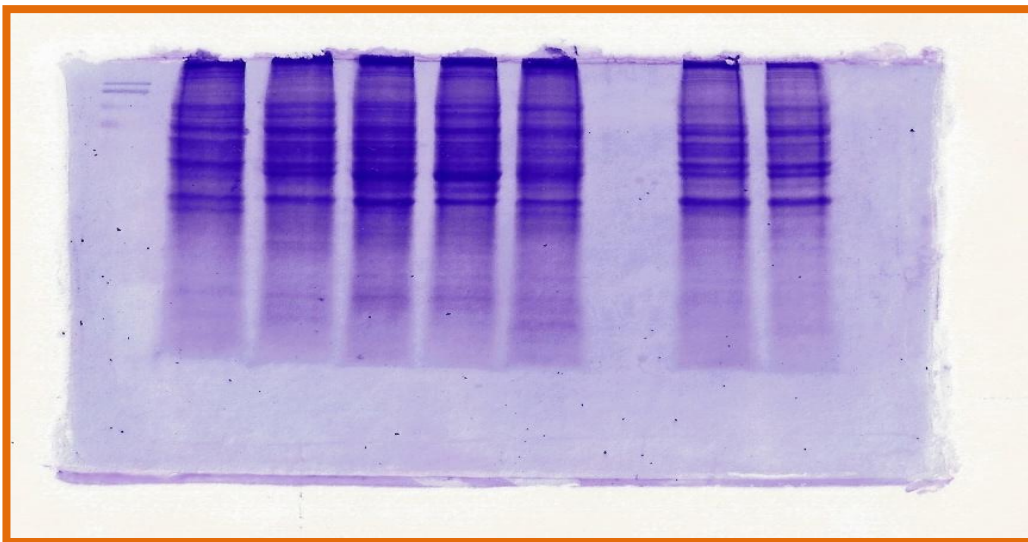


Fig. 33. A la fotografia es poden apreciar clarament les franges blavoses de proteïna que no s'han traspasat a la membrana. També es pot veure l'indicador de massa en kDa a l'esquerre del gel.

Un cop tractat el gel i la membrana, es procedeix a la Immunodetecció, que consistirà en detectar proteïnes en una membrana a partir de incubar-la prèviament amb un anticòs<sup>7</sup> específic. Es pot detectar aquesta unió a partir de diferents mecanismes: coloració, fluorescència, etc.

- Primerament s'incuba la membrana on hi ha les proteïnes en una solució de molico (llet en pols) al 5%, de manera que hi hauran 5g de llet en 100 ml de TBS-tween 20 (Figura 34). La llet és proteïna pura, i el que ens permetrà serà bloquejar les unions específiques de l'anticòs, per exemple amb altres compostos orgànics. El procés de bloqueig de membrana dura com a mínim 1 hora.



Fig. 34. Solució en Stock de TBS-tween 20

- A continuació es realitzen els càlculs de la quantitat d'anticòs necessari. S'utilitzarà l'Ab (sigles d'*anti-body*, en anglès) 4B12, el qual prové d'stock en la mesura de 1 mg en 1 ml de solució, i es vol el volem en  $\mu\text{g/ml}$ . De manera que amb factors de conversió es passen els mg a  $\mu\text{g}$  i obtenim una mesura de 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Per la pràctica, el protocol de l'anticòs determina que per ser efectiu és necessari un volum de 10 ml, per tant la mesura final és de 10  $\mu\text{l}/10000 \text{ ml}$ .

- Un cop establerta la quantitat, s'afegeix l'anticòs a la solució de molico al 5%, i es deixa durant una nit en agitació a 4 graus per assegurar-ne l'eficàcia de la incubació de molico en la membrana.

- Un cop es té l'anticòs primari unit a la proteïna, es fan tres rentats consecutius de 10 minuts cada un de la membrana amb Tween, de manera que s'elimina l'excés d'Anticòs que no s'ha unit. A continuació es procedeix a preparar l'anticòs secundari que és el que s'unirà al primari i, al tenir aquest un enzim anomenat peroxidasa, emetrà una resposta al senyal que nosaltres hi efectuem.

D'aquesta manera es sabrà si l'anticòs s'ha unit correctament i per tant si hi ha proteïna de la membrana.

---

<sup>7</sup> Els **anticossos** (també anomenats immunoglobulines o popularment com a defenses) són estructures proteiques, en concret glicoproteïnes, la funció de les quals és identificar i neutralitzar formes estranyes que el propi cos ha detectat d'antígens. La configuració de l'anticòs té una part variable, motiu pel qual hi ha una gran diversitat d'anticossos i és possible tenir una gran quantitat d'antígens diana diferents. Tot i això, malgrat la gran quantitat de formes i funcions diferents, ens centrarem bàsicament en dos tipus d'anticossos, els primaris i els secundaris. Aquests primers poden tenir la capacitat de ser monoclonals, de manera que només detecten una sola configuració d'antigen, però això els hi proporciona una major especificitat en comparació amb els secundaris, els quals són policlonals i són capaços de detectar multitud de formes d'una sola substància.



Tal com s'ha dit, es prepara la solució d'anticòs secundari i s'afegeix a la cubeta amb la membrana. L'anticòs secundari emprat dependrà potencialment del primari utilitzat, de manera que es farà servir un *anti* d'aquest. Així doncs, alguns dels més emprats podrien ser els anticossos secundaris *anti-mouse* o bé l'*anti-rabbit*. Un cop afegit el volum amb l'Ab, es deixa reposar la cubeta durant aproximadament una hora en agitació i a temperatura ambient.

### Revelat de la membrana

Continuant amb el Western, es submergeix la membrana amb anticossos en una cubeta amb un líquid anomenat ECL<sup>8</sup>, s'agita una miqueta per tal que el fluid s'impregni bé i de seguida ja s'enretira, amb compte i amb unes pinces per una punta i es col·loca a sobre un plàstic no gaire més gros que la membrana (Figura 35).



Fig. 35. Tractat de la membrana un cop s'ha aplicat l'ECL.

- Es doblega aquest plàstic i es cobreix la membrana, passant després per sobre un paper i pressionant molt lleugerament per eliminar els excessos de ECL.

- A continuació, s'agafa el plàstic que conté la nostra membrana i s'introdueix dins d'un *cassette* de revelatge (Figura 36). Ara ja es pot anar a la cambra fosca a fer el revelat. És recomanable fer tots aquest passos amb agilitat.



Fig. 36. Col·loquem la membrana al cassette per dur a terme el revelat a la cambra fosca

<sup>8</sup> Substància líquida no radioactiva d'emissió de llum per a la detecció d'antígens de manera directa o indirecta amb peroxidasa.

Cal anar molt en compte amb les pel·lícules, ja que són molt sensibles i es velaran molt fàcilment. S'ha d'evitar deixar-les exposades al lloc de treball. Cada vegada que se n'utilitza una, cal tancar correctament la caixa de la resta de pel·lícules.

- Un cop a la cambra fosca, amb precaució s'enretira una de les pel·lícules de la caixa i es col·loca a l'interior del *cassette*, de manera que quan s'enengeui el llum, el revelat es donarà automàticament. Passat el temps establert, es tanca el llum i quasi a les fosques, obrim el *cassette* i la pel·lícula del seu interior s'introdueix en un aparell de revelat, el qual mostrarà si realment la pel·lícula s'ha velat correctament amb la informació de la proteïna. Quan l'aparell hagi acabat, emetrà un so suau i agut que indicarà final de procés, llavors ja es podrà analitzar la pel·lícula i determinar si les proteïnes han sortit a l'alçada correcte.

### 3.3.3 -Mecanisme de resistència tumoral

Un cop hem obtingut la proteïna implicada en el procés de resistència d'un agent quimioterapèutic per mitjans de purificació molt complexos, comprovem la validesa de la nostra hipòtesi posant-ho en pràctica.

#### 3.3.3.1 -Comptatge de cèl·lules i preparació de la placa de sembra

Aquest procediment ens permetrà conèixer la viabilitat cel·lular, que és la relació de cèl·lules entre cèl·lules vives i mortes, per estimar si la preparació es pot seguir cultivant. Si aquesta relació dona baixa (per sota del 95% de cèl·lules vives del total ja es considera baixa), la preparació té poca viabilitat i no es recomana utilitzar-la per a experiments. A continuació hi ha algunes il·lustracions de com es realitzarà el comptatge de cèl·lules amb la cambra i un exemple ampliat d'aquesta.

Per realitzar el comptatge s'utilitza la Cambra de Neubauer (figures 37 i 38).

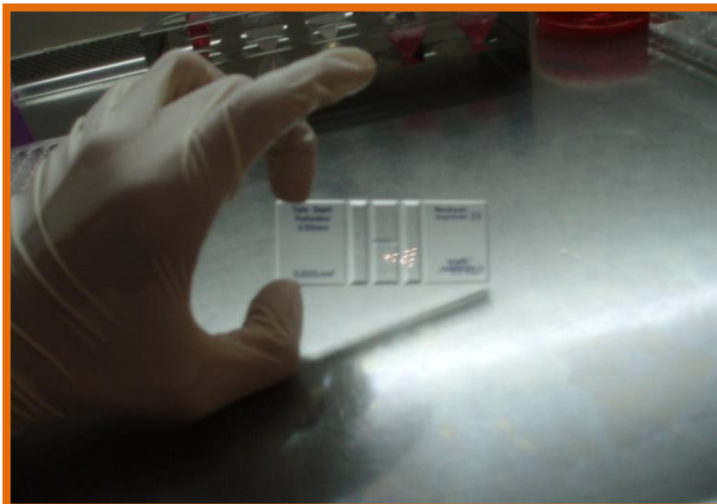


Fig. 37. La cambra de Neubauer està adaptada al microscopi, i és un portaobjectes amb una depressió al centre i unes incisions formant una quadricula de 3x3 mm, amb una separació entre les línies paral·leles de 0.25 mm.

Per iniciar l'activitat, cal saber que la cambra de Neubauer és un vidre força fràgil, de manera que amb molt de compte el retirarem del seu embolcall i li col·locarem a sobre, tant centrat com es pugui, un cobreobjectes.

- A continuació, s'absorbeix una petita quantitat de líquid de la nostra línia cel·lular amb una pipeta i, amb molt de compte, s'aboca en un tub on s'hi afegirà blau de Tripán, un colorant que penetrarà a l'interior de les cèl·lules mortes ja que la seva membrana altament selectiva no ho impedirà. D'aquesta manera, es podran comptar el nombre tant de cèl·lules mortes com vives, i podrà establir així la viabilitat.

- Es torna a recollir un valor qualsevol del medi de la línia amb Tripán i s'acosta molt delicadament la punta de la pipeta a la part superior de la placa, i pel fenomen de la capil·laritat, el fluid entrarà i es repartirà per tot l'espai que hi ha entre la cambra i el cobreobjectes. Ara ja només faltaria col·locar-lo al microscopi i anar comptant una per una les cèl·lules.

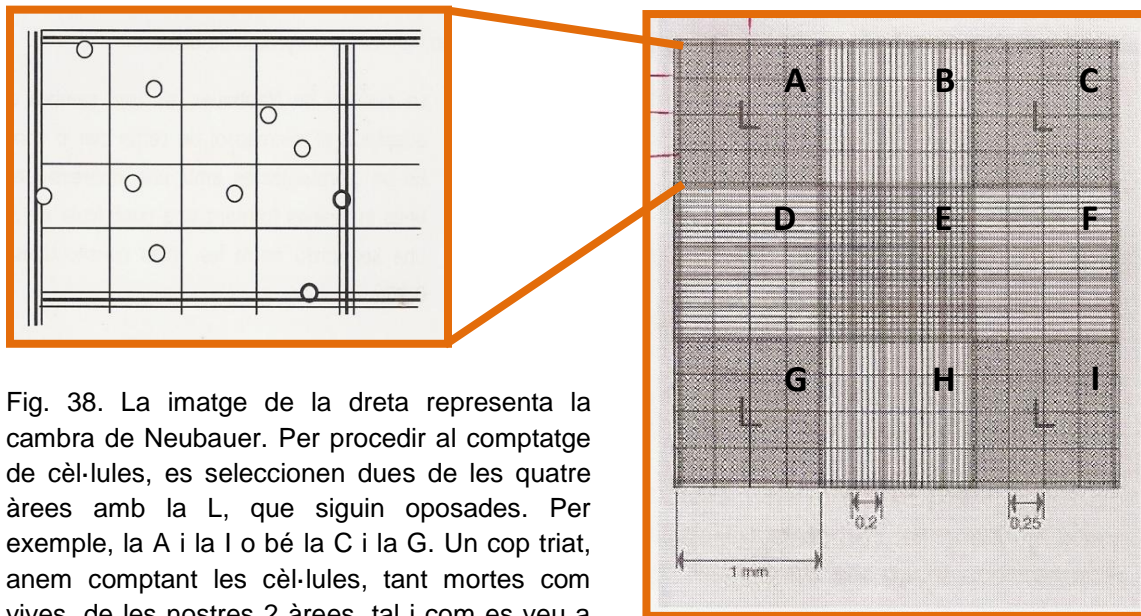


Fig. 38. La imatge de la dreta representa la cambra de Neubauer. Per procedir al comptatge de cèl·lules, es seleccionen dues de les quatre àrees amb la L, que siguin oposades. Per exemple, la A i la I o bé la C i la G. Un cop triat, anem comptant les cèl·lules, tant mortes com vives, de les nostres 2 àrees, tal i com es veu a la imatge de l'esquerra.

Per fer del comptatge una activitat més senzilla ens podem valer d'un polsador, de manera que podem establir el nombre de cèl·lules que nosaltres vegem sense haver d'apartar els ulls de l'ocular del microscopi.

- Després de calcular la viabilitat cel·lular de la mostra i haver establert l'equació per a estimar el nombre de cèl·lules per mil·lilitre de solució, ja es pot agafar una pipeta i aspirar 1 ml del cultiu amb la línia cel·lular i abocar-lo a cada

un dels 96 pouets que componen la placa de sembra<sup>9</sup> (els càlculs corresponents a aquest apartat estan detallats a l'annex 4). Els resultats obtinguts després d'efectuar el càlcul són:

- Per a la BxPC3, en la placa de la qual hi caben 6000 cèl·lules per pou, són necessaris 334,72 µl de la línia.
- Per a la HT1080, en la placa de la qual hi caben 5000 cèl·lules per pou, són necessaris 292,4 µl de la línia.

Ara aquestes plaques de sembra (en total són quatre, dues per cada línia) s'hauran de conservar a la incubadora fins que s'iniciï la seva corresponent pràctica amb els agents quimioterapèutics. Aquests agents són: Doxorubicina per la HT1080 i la Gemcitabina per la BxPC3.

### **3.3.3.2 -Addició d'agent quimioterapèutic i assaig amb MTT**

En aquest punt de l'experiment, el que farem és afegir quantitats decreixents d'agent quimioterapèutic (expressades en nanòmetres) als pouets d'una de les dues plaques de sembra de cada línia cel·lular de manera que quedi un agent per placa, i veurem en quin volum de quimioterapèutic només hi resten el 50% de les cèl·lules. Les altres dues plaques les guardarem per fer l'experiment afegint la proteïna.

- Per començar, afegim un volum determinat d'agent a cada un dels pouets, de manera que cada columna en tindrà la mateixa quantitat. Partirem de la concentració de 4000 nM d'agent a la columna de l'esquerra i s'avança cap a la dreta dividint entre tres la concentració d'agent anterior en el cas de la Gemcitabina. Arribat a 1, es col·loca encara a la dreta una altra columna sense agent, on les cèl·lules proliferaran al màxim (Figura 39). En una altra placa, es fa el mateix amb la Doxorubicina. És evident que com més agent hi hagi, més mort cel·lular hi haurà, però a nosaltres en interessa saber el punt d'equilibri entre proliferació i mort cel·lular, conegut com a IC50<sup>10</sup> en el qual, tal i com hem dit, sobreviuen només el 50% de les cèl·lules.

- Es posa agent quimioterapèutic en totes les columnes de la manera explicada menys a l'última de la dreta, on hi haurà una substància inhibidora del creixement anomenada TRITÓ. Malgrat això, aquesta substància no matarà a

---

<sup>9</sup> Si ens hi fixem, les plaques de sembra són molt utilitzades en els laboratoris per a temes de cultius. Això es degut a que per a l'estudi, la placa ocupa molt menys volum que si la pràctica es dugués a terme en una càpsula de Petri, per exemple.

<sup>10</sup> La IC50 és la dosi d'agent quimioterapèutic que mata al 50% de les cèl·lules, de manera que la placa ni tendeix a proliferar més del compte ni acabar desapareixent. Així doncs, aquesta mesura exacte s'obté a partir de llegir l'absorbància de la placa de sembra del quimioterapèutic en qüestió.

totes les cèl·lules, i per això ens servirà de control negatiu. Podem dir que aquest control funciona com a tara o *background* en anglès. S'incorpora el control negatiu tant en la placa amb Doxorubicina com amb la de Gemcitabina.

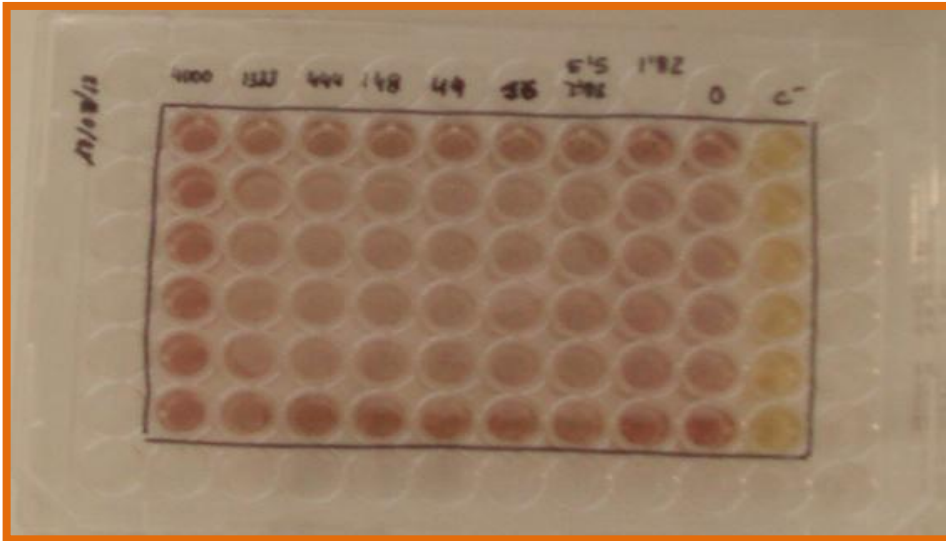


Fig. 39. Placa de sembra de la corba amb Gemcitabina. A la dreta del tot es pot veure la columna groga que equival al control negatiu. A sobre, els valors amb negreta indiquen la concentració en nano mols d'agent quimioterapèutic que hi ha a la columna.

- Un cop afegides les quantitats específiques a cada columna de pouets, es deixa que l'agent quimioterapèutic actuï deixant-lo reposar 3 dies (72 hores).

Passat el temps d'espera, ja es pot seguir amb la pràctica fent ja l'assaig colorimètric amb MTT. Aquest és un assaig que es practica per determinar el nombre de cèl·lules d'una mostra. Sol aplicar-se per determinar la supervivència cel·lular quan s'hi aplica un agent citotòxic que és capaç de produir-ne la mort o bé la proliferació. El component MTT, inicialment en pols groga, és degradat per els enzims mitocondrials de les cèl·lules i es transformat a formazan, de manera que com més formazan produït, més cèl·lules hi hauràn, i per tant més color adquirirà la mostra.

- Es prepara el reactiu MTT en un tub a la concentració de 5mg/ml de PBS 1x. Aquest reactiu és una pols groga sensible a la llum, de manera que és important recobrir amb paper d'alumini el tub en el qual hi estigui contingut. Doncs bé, seguidament afegim 10µl per pouet i afegim el TRITÓ al control negatiu.



Convé no tocar el fons del pouet amb la pipeta quan afegim tan l'MTT com el TRITÓ, ja que aquest assaig requereix molta precaució i molt fàcilment s'obtenen resultats no desitjables per una simple modificació de la quantitat. A més a més, es recomana l'ús de pipetes multicanal (Figura 40) ja que així ens assegurem que a cada pouet hi anirà el mateix volum d'MTT. Aquest és un sistema molt més precís que no pas haver de posar-lo pou per pou amb una pipeta normal.



Fig. 40. Dos models diferents de pipetes multicanal

La creació de Formazan implica 3 hores de repòs a l'incubadora. Un cop passades, només faltaria llegir l'absorbància a 570nm, tal i com ho vam fer amb la tècnica Bradford.

### 3.3.3.3 -Formació de formazan i detecció amb espectrofotòmetre

Partint doncs del color grogós del reactiu MTT i després d'hores d'actuació, el formazan adquireix un color lilós, que variarà en funció de la quantitat de cèl·lules de cada pouet. La progressió és visible, ja que es va modificant la concentració de quimioterapèutic a cada columna i aquest va reduint la proliferació cel·lular.

- Un cop creat el formazan, es llegeix l'**absorbància** a una longitud d'ona de 570 nm en un espectrofotòmetre.

És important saber que la finalitat pràctica del MTT en aquest experiment és veure com la funció de l'agent quimioterapèutic és eliminar les cèl·lules diana del medicament. Després, un cop apliquem la proteïna implicada en el mecanisme de resistència, veiem que malgrat hi hagi un agent tòxic com és el quimioterapèutic actuant a la línia, aquest no resultarà eficaç malgrat haguem vist que sí que ho era sense la presència de la proteïna en qüestió.

Un cop llegida l'absorbància, anotem els resultats en un full de càlcul (taules 3 i 4).



**-Anàlisi de resultats:**

Per interpretar les dades de les dues taules, cal tenir present que el que busquem és, tal com s'ha mencionat anteriorment, en quin punt les cèl·lules viuen en un 50% (IC50). Aquest punt s'ha buscat per poder tenir un nombre suficient de cèl·lules per tal de poder veure l'efecte de la nostra proteïna. Si matem més cèl·lules del compte, el cultiu no avançaria i es moririen totes. A part tampoc veuríem l'efecte de la proteïna perquè l'efecte citoquímic de l'agent seria molt fort.

Ara només falta buscar en quina concentració de l'agent quimioterapèutic obtenim valors de 0,5 (sense multiplicar per cent). Es determina que l'IC50 de la Gemcitabina es troba entre els valors de 4000 i 1333'33 nM, en la concentració aproximada de 1500 nM (1'5 µM). Si es fan els mateixos passos per a la Doxorubicina, el seu IC50 es troba a la concentració de 1333'33 nM i 444'44 nM, més o menys a 1000 nM (1µM). Els valors entre els quals està la IC50 de cada agent està subratllat amb groc a les taules 3 i 4.

BxPC3 6000cp	48h	corba gemcitabine										
Measurement count: 1 Filter: 570												
	1											
A	0,045	0,044	0,047	0,053	0,05	0,04	0,043	0,043	0,043	0,046	0,044	
B	0,05	0,98	1,1	1,602	1,798	1,773	1,464	1,196	1,866	1,685	0,044	
C	0,043	0,954	1,124	1,938	1,975	2,071	1,948	1,351	2,152	1,84	0,3	
D	0,058	0,921	1,121	1,739	1,93	2,024	1,876	1,333	1,366	1,754	0,279	
E	0,048	0,98	1,12	1,852	1,54	1,367	1,322	1,251	1,657	1,698	0,291	
F	0,044	0,954	1,114	1,902	1,473	2,001	1,507	1,34	1,801	1,785	0,292	
G	0,053	0,965	1,116	1,641	1,553	1,321	1,51	1,573	1,704	1,854	0,298	
H	0,048	0,051	0,043	0,046	0,053	0,047	0,047	0,045	0,048	0,049	0,048	
<b>nM</b>												
		<b>4000</b>	<b>1333,3333</b>	<b>444,44444</b>	<b>148,14815</b>	<b>49,382716</b>	<b>16,460905</b>	<b>5,4869684</b>	<b>1,8289895</b>	<b>0</b>	<b>ctrl -</b>	
		0,98	1,1	1,602	1,798	1,773	1,464	1,196	1,866	1,685	0,3	
		0,954	1,124	1,938	1,975	2,071	1,948	1,351	2,152	1,84	0,295	
		0,921	1,121	1,739	1,93	2,024	1,876	1,333	1,366	1,754	0,279	
		0,98	1,12	1,852	1,54	1,367	1,322	1,251	1,657	1,698	0,291	
		0,954	1,114	1,902	1,473	2,001	1,507	1,34	1,801	1,785	0,292	
		0,965	1,116	1,641	1,553	1,321	1,51	1,573	1,704	1,854	0,298	
		0,959	1,11583333	1,779	1,7115	1,7595	1,6045	1,6045	1,34066667	1,76933333	0,2925	
		0,6665	0,82333333	1,4865	1,419	1,467	1,312	1,312	1,04816667	1,47683333	0	
		0,45130346	0,55749915	1,00654554	0,96083963	0,99334161	0,88838732	0,88838732	0,70973931	1		

A la part superior de la taula hi ha una representació de tots els punts de la placa en funció de la columna (1, 2, 3, etc.) i la fila (A, B, C, etc.) amb les seves respectives concentracions proteïques. S'agafa una mostra d'aquests valors (la mostra emprada per l'estudi són els valors de dins el requadre de sota) i s'efectua la mitjana aritmètica de cada columna de la mostra. També es fa el mateix per al control negatiu, i com que és la tara de l'experiment, es resta aquest valor a la mitjana de cada columna de la mostra. Aquest resultat és apuntat a sota de les mitjanes.

Sabem que la màxima proliferació cel·lular és en el punt 0, a l'esquerra del control negatiu. Si anem dividint la mitjana del punt sense quimioterapèutic restada de la tara amb cada un dels altres 9 valors (incloent el mateix punt 0), obtindrem, si després ho multipliquem per cent, el percentatge de proliferació cel·lular de cada columna.

Taula 3. Corba de proliferació cel·lular amb Gemcitabina en la línia BxPC3, 6000 cp (cèl·lules per pou) a les 48 hores de l'actuació de l'agent quimioterapèutic.

HT1080	5000cp	48h	corba doxorubicine										
	Measurement count: 1 Filter: 570												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
A	0,038	0,041	0,043	0,042	0,046	0,043	0,045	0,04	0,044	0,04	0,043		
B	0,038	0,593	1,55	1,91	2,084	1,963	2,563	1,958	2,254	2,349	0,248		
C	0,041	0,519	1,693	1,847	2,352	2,457	2,34	2,667	2,232	2,927	0,269		
D	0,043	0,364	1,531	2,062	2,39	1,925	2,37	2,491	2,457	2,751	0,221		
E	0,043	0,478	1,736	2,43	2,548	3,202	2,676	2,529	3,111	2,69	0,239		
F	0,046	0,554	1,849	2,407	2,475	2,447	3,048	3,108	3,05	3,297	0,311		
G	0,042	0,503	1,814	2,338	2,16	2,246	2,797	2,302	2,814	2,691	0,29		
H	0,048	0,049	0,049	0,049	0,051	0,048	0,047	0,04	0,046	0,051	0,044		
	<b>nM</b>												
		<b>4000</b>	<b>1333,3333</b>	<b>444,4444</b>	<b>148,14815</b>	<b>49,382716</b>	<b>16,460905</b>	<b>5,4869684</b>	<b>1,8289895</b>	<b>0</b>	<b>cntrl -</b>		
		0,593	1,55	1,91	2,084	1,963	2,563	1,958	2,254	2,349	0,248		
		0,519	1,693	1,847	2,352	2,457	2,34	2,667	2,232	2,927	0,269		
		0,364	1,531	2,062	2,39	1,925	2,37	2,491	2,457	2,751	0,221		
		0,478	1,736	2,43	2,548	3,202	2,676	2,529	3,111	2,69	0,239		
		0,554	1,849	2,407	2,475	2,447	3,048	3,108	3,05	3,297	0,311		
		0,503	1,814	2,338	2,16	2,246	2,797	2,302	2,814	2,691	0,29		
		0,50183333	1,6955	2,16566667	2,33483333	2,37333333	2,63233333	2,50916667	2,653	2,78416667	0,263		
		0,23883333	1,4325	1,90266667	2,07183333	2,11033333	2,36933333	2,24616667	2,39	2,52116667	0		
		0,09473128	0,56818933	0,75467707	0,82177563	0,83704634	0,93977656	0,89092351	0,94797382	1			

Taula 4 . Corba de proliferació cel·lular amb Doxorubicina en la línia HT1080, 5000 cp a les 48 hores de l'actuació de l'agent quimioterapèutic.

#### **3.3.3.4 -Determinació de la IC50 i addició a la placa la proteïna en qüestió**

Havent buscat la IC50 dels nostres agents quimioterapèutics, agafem aquesta concentració i la posem en tots els pouets de les altres dues plaques de sembra que vam apartar momentàniament de l'experiment (resten a la incubadora) menys les dues columnes de l'esquerra, on en una s'hi ha tirat el TRITÓ i a l'altra no s'hi ha tirat agent quimioterapèutic. Ara procedim a afegir concentracions diferents per columna de la proteïna, essent la concentració màxima de 3000 nM a l'esquerra de les columnes escollides, i anar dividint per dos el resultat anterior. A continuació es realitza de nou l'assaig amb MTT per determinar la implicació de la proteïna sobre l'efecte de l'agent quimioterapèutic.

#### **-Anàlisi de resultats:**

Partint de la columna on no hi ha proteïna, tant en la Taula 5 com en la 6 veiem que com més proteïna afegim a la placa de sembra, més viabilitat cel·lular hi ha ja que els valors superen el 50% proliferació, cosa que significa que l'agent quimioterapèutic resulta cada vegada més ineficaç. Però amb la concentració de 750 nM de proteïna és quan més es reverteix l'efecte citotòxic de l'agent i, a partir d'aquest valor, la proteïna que sintetitza la pròpia línia cel·lular resulta tòxica, ja que els valors de la viabilitat comencen a decreixer.



HT1080	5000cp	48h	corba proteïna amb 1µM de doxorubicine											
			Measurement count: 1 Filter: 570											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,044	0,042	0,041	0,046	0,045	0,043	0,043	0,042	0,042	0,043	0,043	0,044	0,041	0,049
B	0,042	1,289	1,455	1,658	1,885	1,787	1,299	1,299	1,284	1,284	1,11	1,01	1,783	0,325
C	0,048	1,285	1,308	1,69	1,864	1,754	1,265	1,254	1,254	1,268	1,113	0,98	1,843	0,319
D	0,044	1,265	1,398	1,634	1,798	1,725	1,254	1,268	1,268	1,264	1,116	0,98	1,709	0,31
E	0,045	1,311	1,391	1,589	1,84	1,689	1,287	1,287	1,264	1,264	1,116	1,12	1,876	0,354
F	0,047	1,285	1,528	1,665	1,96	1,654	1,295	1,295	1,284	1,284	1,124	1,1	1,762	0,33
G	0,05	1,305	1,565	1,596	1,745	1,684	1,198	1,198	1,222	1,222	1,25	1,115	1,64	0,338
H	0,048	0,048	0,045	0,051	0,049	0,049	0,047	0,047	0,043	0,043	0,043	0,048	0,047	0,045
			<b>Concentració de proteïna (en nM)</b>											
			<b>3000</b>	<b>1500</b>	<b>750</b>	<b>375</b>	<b>187,5</b>	<b>93,75</b>	<b>46,875</b>	<b>23,4375</b>	<b>0 no doxo</b>	<b>0 no doxo</b>	<b>cntrl</b>	<b>-</b>
			1,289	1,455	1,658	1,885	1,787	1,299	1,284	1,11	1,01	1,783	0,325	
			1,285	1,308	1,69	1,864	1,754	1,265	1,254	1,115	0,998	1,843	0,319	
			1,265	1,398	1,634	1,798	1,725	1,254	1,268	1,113	0,98	1,709	0,31	
			1,311	1,391	1,589	1,84	1,689	1,287	1,264	1,116	1,12	1,876	0,354	
			1,285	1,528	1,665	1,96	1,654	1,295	1,284	1,124	1,1	1,762	0,33	
			1,305	1,565	1,596	1,745	1,684	1,198	1,222	1,25	1,115	1,64	0,338	
			1,29	1,440833333	1,638666667	1,848666667	1,7155	1,266333333	1,262666667	1,138	1,053833333	1,768833333	0,329333333	
			0,96066667	1,1115	1,309333333	1,519333333	1,38616667	0,937	0,933333333	0,80866667	0,7245	1,4395	0	
			0,66736135	0,77214311	0,90957508	1,05545907	0,9629501	0,65092046	0,64837328	0,56176913	0,50329976	1		

Taula 6. Corba de proliferació cel·lular de la línia HT1080 amb la proteïna i 1 µM de Doxorubicina



### 3.4 -Conclusions

El càncer, malaltia generada a causa d'una mutació a nivell genètic, està resultant ser una de les principals causes de mort en tot el món. No és que no s'hi hagi investigat al respecte, el principal problema és que quan la malaltia es manifesta, ja és massa tard.

Es coneix fins i tot com es comença a produir, quins són els canvis que presenten les cèl·lules afectades respecte les normals, els principals factors de risc als quals estem exposats, com per exemple el tabac o el sol, etc. A més a més, hem de tenir en compte que algunes de les tècniques més potents que s'apliquen per intentar curar-lo resulten a vegades inefectives. Tal i com molts científics conclouen, caldria donar tot el pes de la lluita contra el càncer a la prevenció, per exemple evitar mals hàbits dietètics i el sedentarisme. Si que és cert que perquè es doni el càncer són necessàries encadenar moltes mutacions específiques en una sola cèl·lula, i que per tant contraure'l o no és una qüestió de sort.

A la part pràctica del treball, hem utilitzat un seguit de tècniques que tenien per funció quantificar, separar i identificar la proteïna marcada com a causant de la resistència a un agent quimioterapèutic. Tal com s'ha mencionat en la hipòtesi, la finalitat d'aquest treball era estrictament la d'observar com una proteïna sintetitzada pel mateix teixit (entre les centenars de milions que corren pel nostre organisme) és capaç de generar resistència a un agent citotòxic i revertir-ne l'efecte. Un cop realitzat el treball, podem afirmar amb èxit que la nostra afirmació era certa, que existeix un tipus de proteïna capaç de protegir a la cèl·lula de substàncies que en condicions normals la matarien. S'ha pogut quantificar la relació proteïna-efecte i s'ha treballat amb aquestes dades per elaborar taules que sintetitzen aquesta idea.

Tal i com es mostren a les Taules 5 i 6, la proteïna que sintetitzen aquestes dues línies cel·lulars reverteix l'efecte de l'agent quimioterapèutic com més concentració d'aquesta n'hi hagi, de manera que arribats fins a un punt, que varia en funció de la línia i l'agent utilitzat, la proliferació cel·lular és màxima. Hem obtingut que aquests valors eren pel que fa a la línia cel·lular BxPC3 amb Gemcitabina de 750 nM i de 375 nM en la línia cel·lular HT1080 amb Doxorubicina. Malgrat tot, quan la concentració proteica supera aquests valors, la proliferació cel·lular comença a decreixer progressivament, de manera que podem establir que en concentracions superiors als valors de màxima proliferació, la proteïna resulta inclús tòxica per a la pròpia cèl·lula.

Partint d'aquesta sorprenent observació, podem veure una nova via de investigació en oncologia, ja que addicionant altes concentracions de proteïna a la línia ja podríem eliminar-la, però el problema és que l'expressió del gen que codifica aquesta proteïna és desconegut en altres línies, de manera que no se sap si la proteïna pot ser sintetitzada en altres casos o no. Es per això que hi ha encara molt per descobrir i estudiar sobre el càncer, i això està constituint un dels majors reptes del segle XXI.

## 4. FONTS D'INFORMACIÓ

### 4.1 -Bibliografia

1. COOK, Robin. *Intervención*. Barcelona: Plaza Janés, novembre 2010.
2. MACIP, Salvador. *Immortals, sants i perfectes*. Barcelona: edicions 62, setembre 2008.
3. Desconegut. Bacterias contra el càncer, *Geo*. Madrid: juny nº 303, pàgina 22.

### 4.2 -Webgrafia

1. BioCancer. <http://www.biocancer.com/journal/208/alcohol-y-tabaco-factores-de-riesgo-de-cancer>. [Consulta: 03.7.2012]
3. Viquipèdia. [http://ca.wikipedia.org/wiki/Assaig\\_MTT](http://ca.wikipedia.org/wiki/Assaig_MTT). [Consulta: 10.7.2012]

## 5. ANNEXES

### Annex 1: Protocols de les tècniques emprades

#### Bradford

Reactiu de Bradford:

- Guardat a 4°C
- Bio Rad (P-97/1)
- Abans d'utilitzar s'ha de filtrar amb un filtre de 0,22µm perquè pot formar precipitats. (Aquest pas es pot obviar).
- S'ha de fer una dilució 1:5 de l'ampolla stock amb aigua.
- El reactiu, una vegada utilitzat es recull en una ampolla apart que està a l'armari de inflamables (NO es llença per la pica). I les cubetes es tiren al cubell negre de cultius.

#### Mètode de Bradford

- Posar en cubetes d'espectrofotòmetre 1 ml del reactiu de Bradford. A una d'aquestes cubetes no afegirem res més i ens servirà per fer el blanc. Seran 9 per la corba patró i 2 per cada mostra que vulguem quantificar.
- Preparar per duplicat una **corba patró de BSA (al calaix d'aliquotes comuns hi un Stock de BSA a 1,5mg/ml)**.

Concentració BSA que volem	Volum de Stock que hem d'afegir / 1ml de Bradford
3µgr	2µl
7,5µgr	5µl
13µgr	10µl
19,5µgr	13µl

- Afegir per duplicat el mateix volum conegut de mostra a quantificar, 2µl per exemple (un consell és agafar el volum de mostra del tap del eppendorf per no arrossegar volum a la punta i aconseguir repliques més exactes).
- Barrejar per immersió amb parafilm i esperar un mínim de 5 minuts i un màxim de 30 abans de llegir.

- Tornar a barrejar per immersió amb parafilm just abans de fer les lectures, assecant bé per evitar contaminacions entre mostres.
- Fer la lectura de l'absorbància a 595 nm:
  - Primer posar la cubeta amb reactiu de Bradford i fer el blanc.
  - Posar la corba de BSA i mesurar absorbància: apuntar les dades.
  - Mesurar l'absorbància de la mostra i a partir dels valors obtinguts en la recta patró i, tenint en compte la dilució utilitzada en les mostres, calculem la concentració de proteïna.
  - Introduir les dades en un full Excel.

## **Electroforesis**

Relació entre el pes molecular de la proteïna d'interès i el % de acrilamida necessari:

<b>KDa</b>	<b>%Acrilamida</b>
<b>&lt;10</b>	15
<b>10-20</b>	12
<b>20-50</b>	10
<b>50-60</b>	7.5

### **Preparació de les mostres:**

- Per extractes cel·lulars es posa tampó de càrrega 4x (1/4 de volum total), un volum X de mostra segons la quantitat de proteïna que volem carregar i Ripa fins al volum final que haguem dit. (Uns 45µl màxim, per a gels de 1.5mm de gruix)
- Un cop preparades les mostres amb tampó de càrrega, ja no cal que les posem en gel.
- Abans de carregar el gel bullim les mostres 5 minuts al banc a 95°C. Immediatament després les posem en gel 5 minuts més perquè la proteïna no es renaturalitzi. A continuació fem un pols de centrifuga de 10 segons.

### **Condicions de electroforesis:**

- Quan desmuntem el gel del suport i traiem la pinta rentem els pous amb aigua i un cop al suport amb una xeringa els hi posem tampó a pressió per eliminar les restes d'acrilamida.
- Fem el muntatge dels gels i posem tampó TGS 1x per dins i fora dels gels al mateix nivell.
- Carregem les mostres amb una pipeta de 20µl per evitar la formació de bombolles.
- El voltatge serà constant, normalment 150V, El deixem córrer durant 1 hora aproximadament segons ens interressi.

- El tampó es llença per la pica un cop fet servir. No el reciclem.

Un cop corregut si el volem fer servir per WB, veure el protocol de Western-Blot. Si no, tenyir-lo amb Comassie.

### **Tinció amb Comassie i assecatge:**

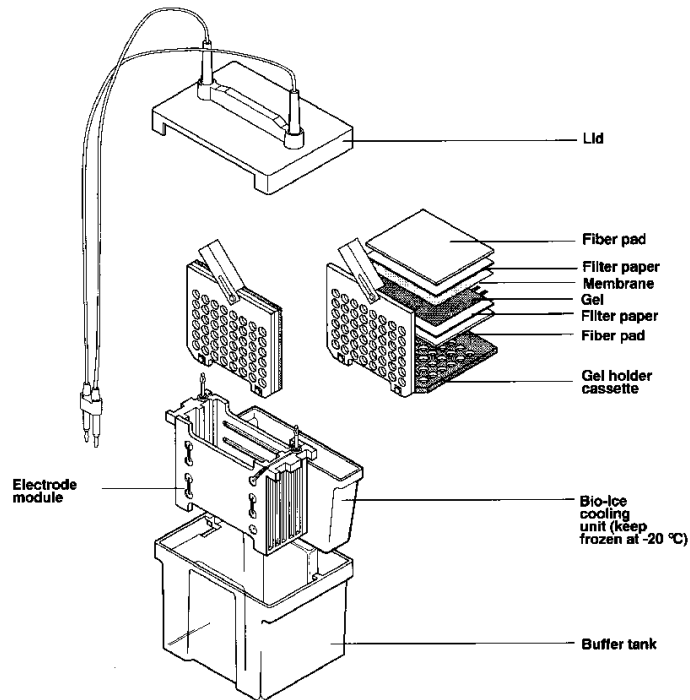
- Posem el gel directament en Comassie blue i el deixem uns 20 minuts en agitació, fins que veiem les bandes.
- Descartem el Comassie a l'ampolla que posa metanol i posem el tampó per destenyir amb un paper perquè vagi xuclant totes les partícules de Comassie.
- El deixem així en agitació fins que considerem que està prou ben destenyit, canviant el paper cada cop que estigui saturat de blau i vigilant que hi hagi prou volum de destenyidor com perquè cobreixi el gel de sobres, sinó, s'arrugarà el gel.
- Si l'hem de deixar tota la nit o durant el cap de setmana el tapem amb film amb bastant destenyidor perquè no s'evapori gaire i el deixem quiet a TA.
- Quan estigui ben destenyit i es vegin les bandes bé, el posem sobre un plàstic per la banda rugosa i li posem a sobre un full de paper Wathman. Girem. Un cop està sobre el paper no pot moure's.
- El deixem a la màquina d'assecar gel.
- Per recollir-lo s'apaga l'interruptor del buit i es treu el gel que està enganxat al full.



## Western

### Transferencia de proteínas

Esquema general de ensamblaje del equipo Mini Trans-Blot:



### Preparación del material

Antes de desmontar el sistema de electroforesis para sacar el gel, conviene preparar el material necesario para la transferencia. Además del equipo Mini Trans-Blot se necesita:

- papel de filtro Whatman: se utilizan 2 por gel y se deben recortar según la medida del gel; es importante no tocar este papel directamente con las manos, porque la grasa de la piel podría afectar a la transferencia: usar guantes y pinzas millipore.
- membrana de nitrocelulosa: se necesita 1 por gel y también se recorta según la medida del gel; también es importante no tocarla con las manos: usar guantes y pinzas millipore.
- esponjas: se necesitan 2 por gel y se encuentran junto al equipo.

Se aconseja colocar todo este material en una cubeta y sumergirlo en tampón de transferencia 1x al menos durante 15 minutos antes de montar el sistema de transferencia.

Se desmonta el sistema de electroforesis y se saca el *cassette* que contiene el gel. Este se sumerge en la cubeta que contiene el tampón de transferencia con el material y se separan los dos vidrios haciendo palanca suavemente. Con la ayuda del vidrio pequeño se elimina el gel concentrador. Finalmente el gel se separa fácilmente del vidrio al bañarlo en el tampón.

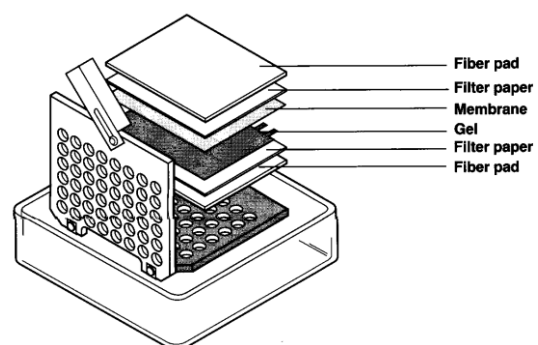
**Importante:** en este proceso es muy importante saber en todo momento cual es el primer pocillo del gel para asegurarnos que lo colocamos en la orientación correcta para hacer la transferencia; se aconseja hacer una marca en una de las esquinas del gel que nos sirva de referencia.

### **Montaje del *sandwich***

El orden en que se colocan los componentes dentro del *sandwich* es fundamental para que la transferencia se realice correctamente. El *sandwich* se monta también dentro de la cubeta que contiene el tampón.

Se coloca el lado negro del *cassette* abajo y se van colocando encima y por este orden:

- 1 esponja
- 1 filtro de papel Whatman
- GEL
- Membrana de Nitrocelulosa
- 1 filtro de papel Whatman
- 1 esponja



Las proteínas migran en dirección transversal del costado negro del *cassette* hasta el costado blanco. Por esto es fundamental que el gel se coloque por delante de la membrana y nunca al contrario. Además se debe tener en cuenta que el paso de las proteínas del gel a la membrana se realiza como una imagen en el espejo, de manera que esto se debe tener en cuenta al orientar el gel si se desea que el primer pocillo quede en la parte superior izquierda de la membrana.

Antes de cerrar el *cassette* conviene eliminar las posibles burbujas de aire que se hayan podido formar entre las capas. Para ello se puede utilizar un tubo de vidrio haciéndolo rodar suavemente sobre el sandwich.

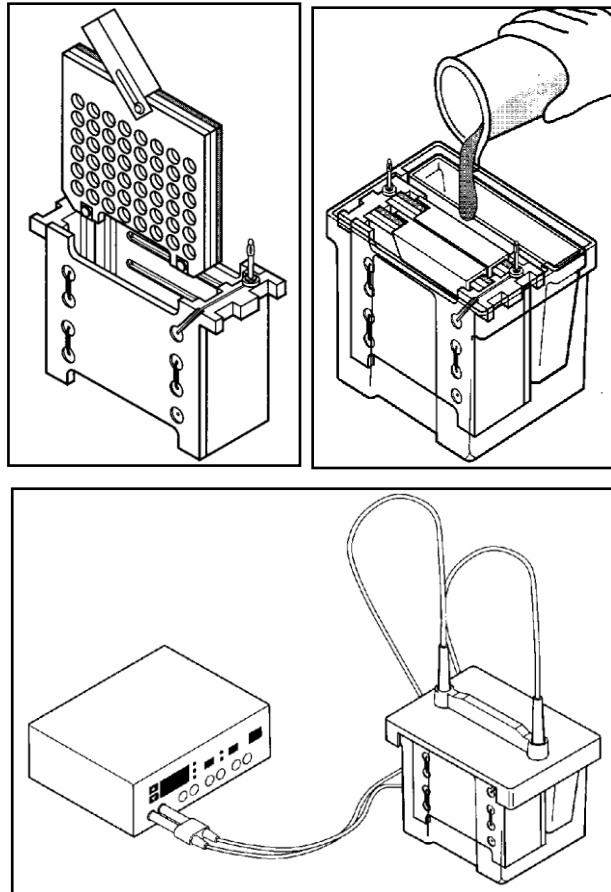
El *cassette* se cierra sujetando firmemente ambos lados, con cuidado de no desplazar el contenido, y ajustando la pinza superior.

### **Montaje del sistema de transferencia**

Se introduce el *cassette* en el módulo con los electrodos.

En el módulo hay espacio para dos geles. Si solamente tenemos uno, se cierra el segundo *cassette* conteniendo solamente las esponjas y se coloca en su lugar. Es importante colocar el *cassette* con el costado negro orientado hacia la parte negra del tanque para que las proteínas migren del gel a la membrana de nitrocelulosa correctamente.

Se pasa el módulo al interior del tanque y se introduce también una cubeta con hielo. Se llena el tanque hasta arriba con tampón de transferencia 1x, se coloca la tapa y se conecta a la fuente de electroforesis teniendo en cuenta el color de los electrodos.



### **Transferencia**

La fuente de electroforesis se pone en funcionamiento. Los parámetros que se utilizan los determina el operador en función de las necesidades del experimento. Habitualmente la transferencia se realiza trabajando en modo amperaje constante, 350 mA de trabajo y 50 minutos de actuación.

### **Inmunodetección de proteínas**

Una vez finalizada la transferencia, se desconecta el equipo y se desmonta. Se abre el sandwich y se saca la membrana cogiéndola con unas pinzas. En este punto es aconsejable hacer una marca en uno de los extremos de la membrana que sirva de referencia para saber el orden en que se encuentran los pocillos.

### **Tinción con Rojo Ponceau**

Para evaluar si la transferencia ha ocurrido exitosamente, terminada la corrida se sumergirá la membrana durante 5 minutos en una solución del colorante inespecífico y reversible Rojo Ponceau 0.1%. Visualizaremos las bandas de proteínas (rojas) que se transfirieron del gel a la membrana (siempre es un buen control teñir también con Comassie blue el gel que ha sido transferido ver apartado 2.2.1.6.). Una vez tenemos las bandas en la membrana, hemos de eliminar el *background* del fondo. Hacemos un lavado rápido de la membrana con solución desteñidora (agua bidestilada con 1% de ácido acético). Posteriormente realizamos dos lavados de 5 minutos (en agitación a temperatura ambiente), con solución desteñidora.

Como la tinción es reversible y desaparece con los siguientes pasos del proceso de inmunoblotting se debe escanear o hacer una fotocopia de la membrana (envuelta en una hoja de nylon) para que queden almacenados los datos de cómo se realizó la carga de proteínas por pocillos y de la efectividad de la transferencia. Luego se puede continuar con el protocolo.

### **Bloqueo de la membrana**

Primero se lava la membrana con una solución tipo TBS Tween 0.1% (tampón y detergente que decida utilizar el operador en función de las necesidades del experimento).

Después se pasa al bloqueo de la membrana con una solución al 5% de leche en polvo en TBS Tween 0.1%. Se incuba durante 45 minutos-1 hora en agitación a temperatura ambiente. También se puede utilizar como solución bloqueante BSA al 3% en TBS Tween 0.1%. De esta manera quedan saturadas las uniones inespecíficas.

### **Detección de la proteína con un anticuerpo primario**

Después del bloqueo se lava la membrana de nuevo con TBS Tween 0.1%(o similar).

A continuación se prepara la dilución del anticuerpo primario: específico para la proteína de interés. Cada anticuerpo tiene una dilución de trabajo determinada para Western-blot. Esta debe estar indicada en la ficha técnica del archivo de anticuerpos.

La dilución se realiza en solución de bloqueo (5% leche en polvo en D-PBS ó 5% BSA en D-PBS).

El tiempo de incubación puede ser variable pero en general se pueden tomar como referencia dos condiciones: a temperatura ambiente durante 1 hora o bien a 4°C o/n. En cualquier caso la incubación debe realizarse siempre en agitación.

### **Detección del anticuerpo primario con un anti-Ig marcado**

Después de la incubación se hacen una serie de lavados con la solución TBS Tween 0.1% (o similar) a criterio del operador. La serie puede ser de 5 lavados de 5 minutos en agitación, 3 lavados de 10 minutos en agitación, etc.

Seguidamente se procede a incubar el anticuerpo secundario. Se trata de un anticuerpo anti-inmunoglobulina marcado enzimáticamente. Este reconocerá la fracción constante de nuestro anticuerpo primario y se unirá específicamente a él. Al estar marcado se puede detectar su posición sobre la membrana.

Para escoger el anticuerpo secundario se debe tener en cuenta la especie de origen del anticuerpo primario. Es decir, si el anticuerpo primario proviene de ratón (Ab monoclonal) se debe utilizar un secundario anti-mouse. En cambio si el primario proviene de conejo (Ab policlonal) se debe utilizar un secundario anti-rabbit.

El anticuerpo secundario se incuba, generalmente, durante 45 minutos-1 hora a temperatura ambiente en agitación. La dilución se realiza en solución de bloqueo y la dilución suele ser 1:2000.



### **Revelado ECL**

Después de incubar con el anticuerpo secundario se hace de nuevo una serie de lavados, en general: 3 lavados de 10 minutos con TBS Tween 0.1% seguidos de 2 lavados de 5 minutos con D-PBS. En este punto la membrana está lista para ser revelada.

Se mezclan a partes iguales los dos reactivos que componen el kit de revelado ECL y se incuba la membrana durante 1 minuto a temperatura ambiente. Seguidamente se procede a revelar la membrana en un film de autorradiografía para lo cual se utiliza un *cassette* de revelado. Se ha de trabajar en la cámara oscura de los Servicios Científico-Técnicos del Parc Científic de Barcelona, con la luz roja encendida. Se coloca la membrana dentro del *cassette*, se pone el film encima y se cierra el *cassette*. Se mantiene el contacto durante el tiempo que se estime necesario y finalmente se saca el film y se revela en el revelador automático situado en la misma cámara oscura.

La solución de ECL preparada puede conservarse a 4°C durante una semana para ser reutilizada.

## Annex 2: Fitxes tècniques de les línies cel·lulars

### **BxPC3**

#### **1-Dades de la línia:**

Espècie:	<b>Humana</b>
Tipus histològic / Teixit:	<b>Pàncrees</b>
Centre de procedència:	<b>ECACC</b>
Nº ref. / lot / passi / data congelació:	<b>93120816/ 10h020/</b>

#### **2-Medi de cultiu:**

Medi de creixement (Biomed): **DMEM High Glucose + Glutamax**  
**(Ref: 31966 ) GIBCO . Indistintament es podria fer servir RPMI 1640 + 2mM**  
**Glutamine + 10% (FBS)**

**(Medi recomanat per ECACC)**

Suplements:	<b>No</b>
Sèrum fetal:	<b>10% FCS (Ref.: 10106-169 GIBCO )</b>
Antibiòtics / Medis selectius:	<b>No</b>
Medi original:	<b>RPMI1640 + 2Mm de glutamina</b>
Sèrum fetal:	<b>10%</b>
Antibiòtics / Medis selectius:	<b>No</b>

Medi congelació: **90% FCS + 10% DMSO**

#### **2-Condicions de cultiu:**

La BxPC3 és una línia de creixement lent, creix formant illes, i probablement els passes es reduiran a dos cops per setmana i fer no més d' una dilució ½ o 1/3.

És molt important fer inòculs generosos, ja que si l'inòcul és baix al cultiu li costa molt arrencar.

Les BxPC3 son unes cèl·lules que un cop arriben a monocapa s'apreten i poden aguantar confluències altes mantenint la viabilitat al voltant del 95% - 100%.

Ràtio subcultiu: **1:2-1:3** cada tres dies

Concentració inòcul: **4 x 10<sup>6</sup>** en FG amb 3 dies de cultiu obtenim un 90% de confluència.

I entre **2.5 i 3 x 10<sup>6</sup>** per FM per obtenir un 90% de confluència al tercer dia.

Temps de duplicació: **cada 36h**

Nº cels en flascó gran (90% confluència): **12-13 x 10<sup>6</sup> cell**

Nº cels en flascó mitjà (90% confluència): **4.5 x 10<sup>6</sup> cell i 5 x 10<sup>6</sup>**

Tractament enzimàtic:	Tripsinar <b>0.5X tripsin-EDTA (GIBCO)</b>
<b>2-Characterització:</b>	
Creixement <i>in vivo</i> (condicions):	<b>4*106/animal</b>
Micoplasma (Nº sbnt / Nº test / passi):	<b>negatiu</b>

### **HT1080**

<b>1-Dades de la línia:</b>	
Espècie:	<b>Humana</b>
Tipus histològic / Teixit:	<b>Fibrosarcoma</b>
Centre de procedència:	<b>ECACC</b>
Nº ref. / lot / passi / data congelació:	<b>85111505 / 06A029 / +3 / 26/01/06</b>
<b>2-Medi de cultiu:</b>	
Medi de creixement (Biomed):	<b>DMEM High Glucose Ref: 31966 (GIBCO)</b>
Suplements:	<b>Ref.: Glutamina (medi)</b>
Sèrum fetal:	<b>10% FCS (Ref.: 10106-169 GIBCO)</b>
Antibiòtics / Medis selectius:	<b>NO</b>
Medi original:	<b>DEMEM</b>
Suplements:	<b>2 mM Glutamine</b>
Sèrum fetal:	<b>10% FCS</b>
Antibiòtics / Medis selectius:	<b>NO</b>
Medi congelació:	<b>90% FCS + 10% DMSO</b>
<b>2-Condicions de cultiu:</b>	
Ràtio subcultiu:	<b>1:3, cada dos dies</b>
Concentració inòcul:	<b>7x10<sup>6</sup> a flascó gran</b>
Temps de duplicació:	<b>&lt;1 dia</b>
Nº cels en flascó mitjà (90% confluència):	<b>15x10<sup>6</sup></b>
Nº cels en flascó gran (90% confluència):	<b>30x10<sup>6</sup></b>
Tractament enzimàtic:	<b>0.25% Tripsina/EDTA</b>
<b>2-Characterització:</b>	
Micoplasma (Nº sbnt / Nº test / passi):	<b>negatiu</b>
Alamar Blue:	<b>3000 cel/pou</b>

## Annex 3: Estada a l'Estabulari

### Introducció

Malgrat no formar part directament del meu treball ja que l'estada ha estat purament visual i lúdica, he decidit incloure-la de totes maneres ja que se'm va oferir la possibilitat d'assistir-hi i resulta realment complicat entrar-hi si no es tenen permisos especials, cosa que no els tinc. A més, la curiositat que tenia per saber com és un estabulari de dins i la mena de treball relacionat amb la investigació que s'hi duu a terme, van ajudar a decidir-me.

Abans de tot, anuncio que en aquest annex no hi ha cap testimoni fotogràfic, i és que són extremadament cautelosos amb la seguretat del material a l'estabulari perquè amb la mínima ja es pot engegar tot a rodar, de manera que em vaig reservar el dret de fer fotografies. A part d'això, em van recordar que el meu contacte amb els animals havia de ser nul, és a dir, no pots tocar animals si no disposes d'un curs de manipulació d'aquests.

### Abans d'entrar

Va ser necessari canviar d'edifici per assistir a l'estabulari, i és que a l'Hèlix, que és on jo he realitzat la meva part pràctica, no n'hi ha. Així doncs, un cop al lloc correcte i havent baixat fins als vestidors, va tenir lloc tot un ritual de seguretat. Allà calia tenir en compte les dues parts en les quals es dividia el canviador: una part blava contaminada on deixes les pertinences en taquilles i una part vermella on hi entraves ja un cop amb la roba adequada. Primerament t'havies de treure tota la roba (excepte la interior) i posar-te un vestit que ja et facilitaven allà. També em vaig posar bosses de roba i peücs als peus, mascareta, i coberta pels cabells al cap i guants a les mans. Així que vaig estar a punt, vaig passar a la zona vermella, on tot just sortir de l'habitació vaig entrar a una altra on uns corrents d'aire t'acabaven d'expulsar partícules que podien ser nocives pels animals. Molt fàcilment us preguntareu, igual que jo m'ho vaig plantejar al principi, per què és necessària tanta filigrana per entrar a veure uns animals (perquè fins i tot en algun estabulari et fan dutxar), perquè aquestes bèsties, majoritàriament rates i ratolins, són **immunodeprimits**, a més costen preus elevadíssims. Així doncs ja s'entenen aquestes precaucions extremes que es segueixen als estabularis.

### Un cop a dins

Tal com he dit abans, la meva estada fou d'exploració i per veure com és l'estabulari, sense dur-hi cap mena d'activitat. És per això que la meva tutora del Parc em va fer de guia pels passadissos que el formen i em va anar portant a veure com treballaven la gent allà, dins en cambres de flux laminar o bé mantenint estable el creixement de milers d'animals. Vaig poder veure com són els ratolins emprats en laboratoris, que era el principal objectiu, i de passada

aprendre una mica més sobre com es practiquen les biòpsies pel que fa a la localització del tumor. Són molts dies d'estudi, des de que se'ls injecta la massa de cèl·lules tumorals fins que és extirpada, mesurant la massa<sup>11</sup> del ratolí constantment, la dieta, la relació amb els altres (separant mascles i femelles), etc. Tot plegat suposa realment un esforç.

Per concloure la visita, vam estar en algunes cambres concretes, com la zona de cria, on s'hi veien nombrosos ratolins acabats de néixer, o una sala força especial on es feia ús de l'enginyeria genètica per introduir un gen al ratolí que quan era observat a través d'una màquina, emetia un senyal i a la pantalla es podia observar on es localitzava el tumor. Aquesta tècnica és molt útil per detectar l'estadi del càncer, si ha fet metàstasi o no, i per determinar la posició en cas que el tumor no sigui subcutani, és a dir, que si per exemple la línia cel·lular introduïda és de pàncrees, les cèl·lules siguin introduïdes en l'òrgan en qüestió. Aquest tipus de tumor rep el nom de ortotòpic. A vegades però, la línia cel·lular no és introduïda al lloc del qual prové, sinó que s'injecta a la pell, de manera que la pràctica d'extirpació resulta més senzilla. Aquest tipus de tumor s'anomena subcutani. Òbviament, si tenim un cas de càncer de pell, aquest serà ortotòpic perquè està al lloc d'on prové la línia en qüestió, però també subcutani perquè es troba a la pell.

### Conclusió

La meua estada a l'estabulari va ser fructífera, i és que em va ensenyar com de delicada i precisa pot ser la ciència i l'immens esforç que hi dediquen cada dia els investigadors. Que del càncer costa trobar-ne la cura, sí, però que contínuament s'avança respecte el tema, també.

---

<sup>11</sup> És important mesurar la massa del ratolí, que en l'espècie emprada és d'uns 260 grams, perquè si aquest valor varia massa, és perquè el tumor maligne està consumint el ratolí i aviat deixarà de ser útil per a la investigació.

## Annex 4: Càlculs

En aquest apartat s'hi detallaran els processos duts a terme per calcular el volum final de cèl·lules que s'ha de col·locar a la placa de sembra.

### Línia BxPC3

Quadrant 1 (L1): **133** cèl·lules vives i **2** de mortes  
Quadrant 9 (L9): **106** cèl·lules vives i **3** de mortes

Mitjana: **119'5** cèl·lules

### Línia HT1080

Quadrant 1 (L1): **102** cèl·lules vives i **4** de mortes  
Quadrant 9 (L9): **126** cèl·lules vives i **4** de mortes

Mitjana: **114** cèl·lules

Un cop hem obtingut les mitjanes, calculem el factor de dilució:

Sabem que el volum necessari és 25 µl + 50µl de Tripà. Això és

$$\frac{75 \text{ (cèl.+tripà)}}{25 \text{ (cèl.lules)}} = \mathbf{3}.$$

NOTA: ara aquest nombre es pot expressar per indicar la proporció de dues maneres diferents, o bé  $\frac{1}{3}$ , on el 3 indica que hi ha 1 quantitat de cèl·lules més dues de dissolvent, o bé 1:2, on el 2 indica les dues parts de dissolvent.

Aplicant l'equació següent obtindrem un valor aproximat del nombre de cèl·lules que hi ha a la cambra de Neubauer:

***Nº cèl·lules x factor dilució x 10000 x ml totals***

- Nº cèl·lules BxPC3:  $119'5 \times 3 \times 10000 = 3585000 \text{ cèl. lules/ml}$

- Nº cèl·lules HT1080:  $114 \times 3 \times 10000 = 3420000 \text{ cèl. lules/ml}$



Ara ja sabem quantes cèl·lules tenim per ml, però no sabem quants ml necessitem per omplir tots els pouets de la placa de sembra. De manera que:

### BxPC3

En aquesta placa hi caben 6000 cèl·lules per pou, i si tenim 200 pous, llavors necessitem:

$6000 \times 200 = 1200000$  cèl·lules.

A continuació, amb una senzilla regla de tres, determinem els ml necessaris per omplir els pous:

3585000 cèl·lules ————— 1 ml

1200000 cèl·lules totals ————— x       $x = \frac{1200000}{3585000} = 0'335 \text{ ml}$

Passant-ho a microlitres:

$$0'334 \text{ ml} \times \frac{1000 \text{ } \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} = 334,72 \text{ } \mu\text{l}$$

-Repetim el procediment amb l'altra línia:

Aquí només n'hi caben 5000 de cèl·lules per pou. Multipliquem això pel nombre de pous, obtenim:

$5000 \times 200 = 1000000$  cèl·lules.

A continuació:

3420000 cèl·lules ————— 1 ml

1000000 cèl·lules totals ————— x       $x = \frac{1000000}{3420000} = 0'292 \text{ ml}$

$$0'292 \text{ ml} \times \frac{1000 \text{ } \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} = 292,4 \text{ } \mu\text{l}$$

## 6. GLOSSARI

**Absorbància:** mètode emprat freqüentment en la química analítica per determinar la quantitat de substància que hi ha en una mostra. Això es determinarà a partir d'una equació que té com a variables la llum que incidirà a la mostra i la llum restant que l'ha travessat. Aquest procediment és realitzat per un aparell anomenat espectrofotòmetre.

**Cambrà fosca de revelat:** aquesta cambra és força delicada perquè és on s'hi duen a terme processos de revelat i és possible que hi hagi pel·lícules d'altres estudis a dins, de manera que la porta d'accés és negra i de moviment rotatori. A l'interior hi ha dos tipus de il·luminacions:

**Apagada:** s'encén el llum vermell, de manera que es limiten els raigs que poden velar les pel·lícules i es pot treballar igualment.

**Encesa:** font de llum natural, per treballar els revelats o altres tipus d'accions.

**Confluència:** terme emprat en laboratoris per a determinar el grau d'ocupació de la mostra de cèl·lules en un placa de cultiu. És per això que depenent de la confluència de la mostra, és necessari practicar una ressembla per tal de d'assegurar que sobrevisqui. Es calcula que és necessària una confluència del voltant del 90%.

**Detritus:** no són res més que els residus, generalment sòlids, que provenen de la descomposició de fonts orgàniques tant vegetals com animals. En biologia, quan es practiquen cultius hi ha un elevat grau de matèria d'aquest tipus a la placa, és necessari dur a terme les ressembres per evitar la mort per intoxicació del material d'estudi.

**Espectrofotòmetre:** instrument emprat en l'anàlisi química que serveix per mesurar, en funció de la longitud d'ona assignada, la concentració de substància que hi ha en una mostra.

**Immunodeprimit:** és quan un individu, en el cas del treball es parla de rosegadors, se li ha suprimit el sistema immunitari, de manera que molt fàcilment adquirirà malalties. S'empra aquest tipus d'animals immunodeprimits ja que quan se'ls hi injecta l línia cel·lular, si tinguessin immunitat, possiblement aquests anticossos destruirien les cèl·lules tumorals i no es podria realitzar cap tipus d'investigació.

**Laemmli buffer:** Elaborat per a preparacions proteiques, està compost per substàncies que faciliten la separació entre proteïnes, li atorguen a la mostra un color blavós amb la finalitat d'identificar-se durant el *running gel* i fer la mescla més densa per tal de que quedi al fons del tub on estigui. Té un pH proper a la neutralitat.

**Melanoma:** tipus de tumor cutani caracteritzat per produir metàstasis molt ràpidament.

**Metàstasi:** procés causat a partir d'una mutació a nivell cel·lular, en el qual les cèl·lules poden emigrar del teixit on es troben per introduir-se al torrent sanguini i envair així altres teixits.

**Pellet:** petita porció de material aglomerat o comprimit, en aquest cas degut a una centrifugació. Depenent de les revolucions per minut emprades, es pot fer sobreviure a un conjunt de cèl·lules o bé malmetre-les per obtenir-ne altres finalitats.

**Sobrenedant:** medi resultant d'una ultracentrifugació cel·lular. Aquest procés és molt emprat en citologia ja que es poden haver després orgànuls i altres components, talment com proteïnes, que poden ser aïllats i estudiats amb més detall posteriorment.