

MORT PER VIDA

Estudi d'un dels mecanismes de mort cel·lular en neuroblastomes



ÍNDIX

Presentació.....	3
PART TEÒRICA.....	6
1. El càncer.....	7
1.1. Què és el càncer?.....	7
1.2. Les cèl·lules canceroses.....	8
1.3. El diagnòstic precoç del càncer	10
1.4. Tractaments.....	10
2. El neuroblastoma.....	12
2.1. Síntomes.....	14
2.2. El tractament.....	15
2.3. El diagnòstic.....	16
2.4. Estadis.....	17
3. L'apoptosi clàssica.....	19
3.1. Vies d'inducció.....	20
3.2. Morfologia cel·lular apoptòtica.....	22
4. Relació entre l'apoptosi i el càncer.....	25
PART PRÀCTICA.....	29
Esquema de l'estructura.....	30
5. Introducció.....	31
5.1. Objectiu.....	31
5.2. STP i DMBP.....	32

5.3.Experiències.....	34
6. Experiència inicial.....	38
7. Experiència I.....	44
8. Experiència II.....	50
9. Experiència III.....	55
10. Resultats.....	78
1. Resultats Experiència I.....	78
2. Resultats Experiència II.....	83
3. Resultats Experiència III.....	84
11. Conclusió.....	87
<i>ANNEX 1: Glossari de termes.....</i>	89
Bibliografia.....	99
Agraïments.....	100

PRESENTACIÓ

Des d'un primer moment tenia molt clar que el meu treball de recerca giraria entorn a un tema concret: el càncer. Senzillament perquè es una malaltia amb la que he tingut la desgràcia d'estar-hi constantment en contacte, i al veure des de tant a prop les repercussions que té sobre la societat i les persones, ja siguin els propis malalts o els seus familiars, m'ha fet pensar molt, qüestionar-me moltes coses i canviar per complet la concepció que tenia sobre els valors de la vida i les persones. Per això, i com que crec que és un tema interessant i molt important en la societat actual, ha estat la motivació principal de la meva recerca en aquest treball.

En un principi, la meva idea era enfocar el tema des d'un punt de vista més social: volia fer un estudi sobre les diferents institucions, fundacions i entitats que ajuden i col·laboren en tasques benèfiques per els malalts, sobretot aquelles centrades en infants, com AFANOC, els voluntaris de l'Hospital de Sant Joan de Déu, etc. No obstant això, gràcies a les meves tutores, l'Àngels Aregall i la Rosa Boleda, vaig conèixer el Programa Argó de la Universitat Autònoma de Barcelona. Em vaig estar informant sobre les propostes dels diferents treballs que oferien i en vaig veure una relacionada amb l'estudi de determinats tumors neurològics que em va interessar molt. Finalment, vaig ser acceptada en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Medicina on vaig poder realitzar tota la part de recerca que constitueix aquest treball. D'aquesta manera, he pogut enfocar la meva recerca relacionada amb el càncer des d'un punt de vista científic en concordança amb l'itinerari de batxillerat que estic cursant.

Per a mi, formar part d'aquestes estades no només m'ha permès elaborar el meu treball de recerca, si no que ha estat una gran experiència personal que m'ha fet gaudir de grans avantatges: he conegut l'entorn universitari, m'he familiaritzat amb el material i tasques d'un laboratori de recerca i m'ha permès aprofundir en temes mèdics de caràcter oncològic i bioquímic entre moltes altres coses. Per això, estic immensament agraïda al Programa Argó per haver-me permès formar part i gaudir d'aquestes estades tan profitoses i interessants que tant i tant m'han ajudat.

Objectiu del treball

Durant les estades a la UAB, dins l'equip de Víctor Yuste i amb la Mercè Garcia com a tutora, jo i la Gemma (la meva companya), vam realitzar una sèrie d'experiments sobre cèl·lules tumorals de neuroblastoma, les anomenades SH-SY5Y, un tipus de tumor neurològic comú en infants. Aquestes experiències consistien bàsicament en efectuar diversos tractaments en aquestes cèl·lules amb una droga o fàrmac concret, el DMBP, amb la finalitat d'estudiar el tipus de mort cel·lular que es desencadenava, concretament l'apoptosi clàssica.

La mort apoptòtica clàssica és un mecanisme de mort cel·lular programada que es dona en la majoria de casos i que té unes característiques morfològiques i bioquímiques molt concretes i fàcilment identificables mitjançant les diverses experiències que vaig dur a terme en el laboratori.

A partir d'aquí, vaig formular una hipòtesi que pogués respondre utilitzant la tasca efectuada al laboratori i els resultats obtinguts en les diferents experiències. És la següent:

ÉS EL DMBP UN FÀRMAC INDUCTOR DE MORT APOPTÒTICA CLÀSSICA EN CÈL·LULES DE LA LÍNIA SH-SY5Y DE NEUROBLASTOMA?

Per això, la meva hipòtesi i la recerca en general que he dut a terme en aquest treball consisteix en assolir els objectius següents:

- ➔ Determinar si es desencadena un procés de mort apoptòtica clàssica en tractar les cèl·lules SH-SY5Y de neuroblastoma amb el DMBP mitjançant les tres experiències de laboratori que permeten identificar les característiques morfològiques i bioquímiques més representatives de l'apoptosi. D'aquesta manera es podria determinar si el DMBP és un fàrmac inductor de mort que podria ser factible en el tractament de cèl·lules canceroses de neuroblastoma com a alternativa a les teràpies anticanceroses actuals tant nocives com la quimioteràpia o la radioteràpia.
- ➔ Conèixer més a fons el mecanisme de mort apoptòtic i la relació que estableix entre amb el desenvolupament de malalties greus com el càncer.

- Conèixer el neuroblastoma, el tipus de càncer sobre el qual es fa el tractament: origen, grau d'incidència, símptomes, patologies...

Estructura del treball

El meu treball es divideix en dos apartats principals:

- 1. Part teòrica:** s'exposen conceptes clau per entendre el treball en general i, sobretot, la part pràctica. Es defineix el concepte de càncer en general i el neuroblastoma, que és el tumor neurològic concret sobre el que es basa l'estudi. També s'explica detalladament el procés de mort apoptòtic: què és, els diferents tipus de vies activadores i mecanismes d'inducció i les característiques bioquímiques i morfològiques més representatives (científicament anomenats *hallmarks*). Finalment, es relaciona el concepte de mort cel·lular amb el desenvolupament de malalties i es concreta amb el càncer.
- 2. Part pràctica:** la part pràctica és la que constitueix la recerca en si amb tota la feina realitzada a la UAB. En ella s'expliquen els procediments seguits en les tres experiències efectuades que em permeten arribar a la conclusió final que respon la hipòtesi. Cada una d'aquestes experiències es centra en la identificació d'un dels tres *hallmarks* més representatius de l'apoptosi:
 - **Experiència I: La fragmentació i condensació del nucli cel·lular**
 - **Experiència II: La degradació oligonucleosomal del DNA cel·lular**
 - **Experiència III: L'activació de diverses caspases i substrats (caspasa-2, caspasa-3, caspasa-9 i iCAD en concret)**

*Aquesta part també inclou l'Experiència inicial, on s'explica el procediment que se segueix per elaborar una sembra i un cultiu de manteniment que es fa prèviament a la investigació. S'anomena així perquè no és determinant pels resultats ni per l'estudi en general, és un simple protocol de laboratori.

Finalment, hi ha l'anàlisi dels resultats obtinguts en les diferents pràctiques i les conclusions finals a les que he arribat que responen la hipòtesi anteriorment esmentada.

PART TEÒRICA

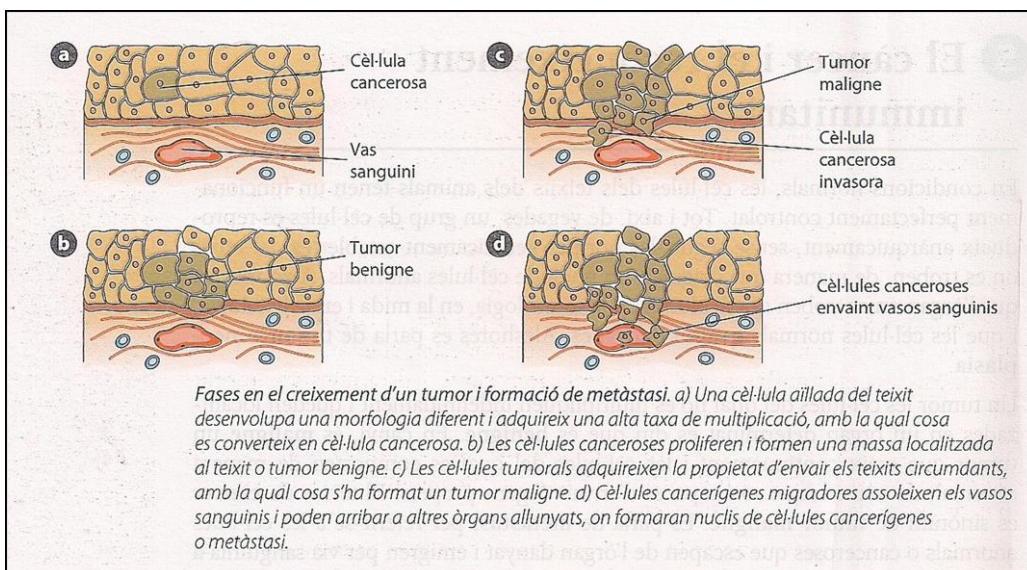
1. EL CÀNCER

1.1 QUÈ ÉS EL CÀNCER?

En condicions normals, les cèl·lules dels teixits tenen un funcionament perfectament controlat. Tot i així, de vegades, un grup de cèl·lules es reproduïxen anàrquicament, sense seguir les normes genèticament establertes del teixit on es troben, de manera que originen un nucli de cèl·lules anormals. Això fa que l'òrgan on es troben quedi afectat en la morfologia, en la mida i en la fisiologia, i que les cèl·lules normals quedin danyades. Aleshores es parla de **tumor** o **neoplàsia**.

Un tumor les cèl·lules del qual no es multipliquen indefinidament i quedin localitzades en un òrgan determinat es diu que és **benigne**. En canvi, es parla de tumor **maligne** quan el creixement és continu i les cèl·lules del qual es comporten de manera anormal, de manera que són capaces d'envair òrgans propers. El terme de **càncer** és sinònim de tumor maligne.

Es parla de **metàstasi** per referir-se a les cèl·lules anormals o canceroses que escapen de l'òrgan danyat i emigren per via sanguínia i/o limfàtica a altres òrgans sans on poden desenvolupar també altres tumors. Els efectes del càncer poden provocar el debilitament general de l'individu i l'alteració d'algunes de les seves funcions, que en molts casos condueixen a la mort de la persona.



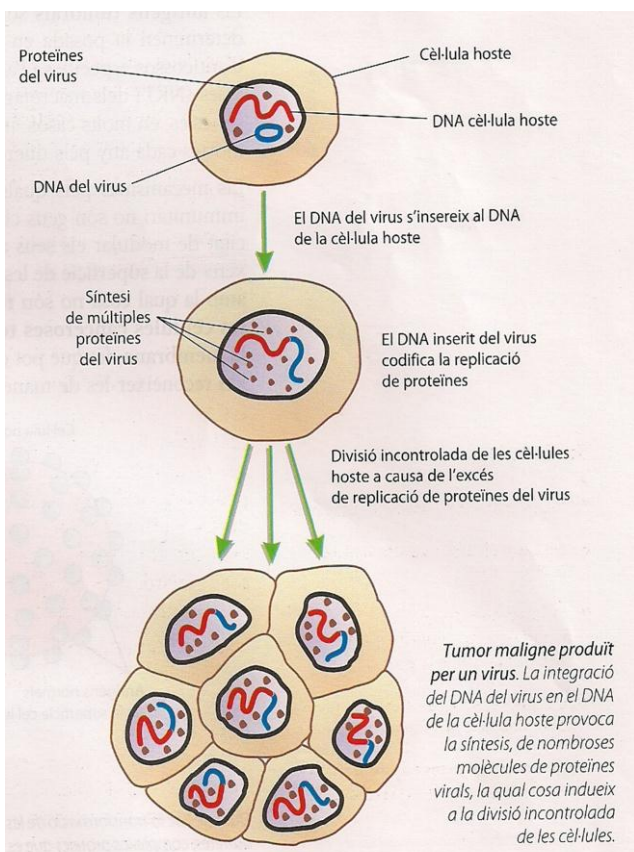
Esquema del procés de metàstasi [Font: Projecte La Casa Del Saber, Biologia 2n de batxillerat]

Generalment, el risc de tenir càncer augmenta amb l'edat, però pot afectar tots els intervals d'edat de les persones. L'especialitat mèdica que estudia el càncer és l'**oncologia** (del grec *onkos*, que vol dir "tumor").

1.2 LES CÈL·LULES CANCEROSES

Les cèl·lules normals dels teixits es poden transformar en cèl·lules canceroses quan es modifica per mutació el material genètic original. Això pot passar mitjançant diferents vies:

- Per l'acció d'**agents carcinògens o cancerígens**: aquests agents poden ser químics (procedents de la contaminació ambiental, del fum del tabac, de la indústria...) o bé físics (com ara la llum ultraviolada, radiacions ionitzants, radiacions nuclears...).
- Per l'acció de **determinats virus**, el DNA dels quals s'integra en el de la cèl·lula hoste i d'aquesta manera determinen l'expressió dels anomenats oncogenes o gens promotors de càncer¹, que indueixen a la formació de nombroses rèpliques de proteïnes virals i la duplicació incontrolada de les cèl·lules canceroses. L'exemple més important en els humans és el virus del papil·loma humà (VPH).



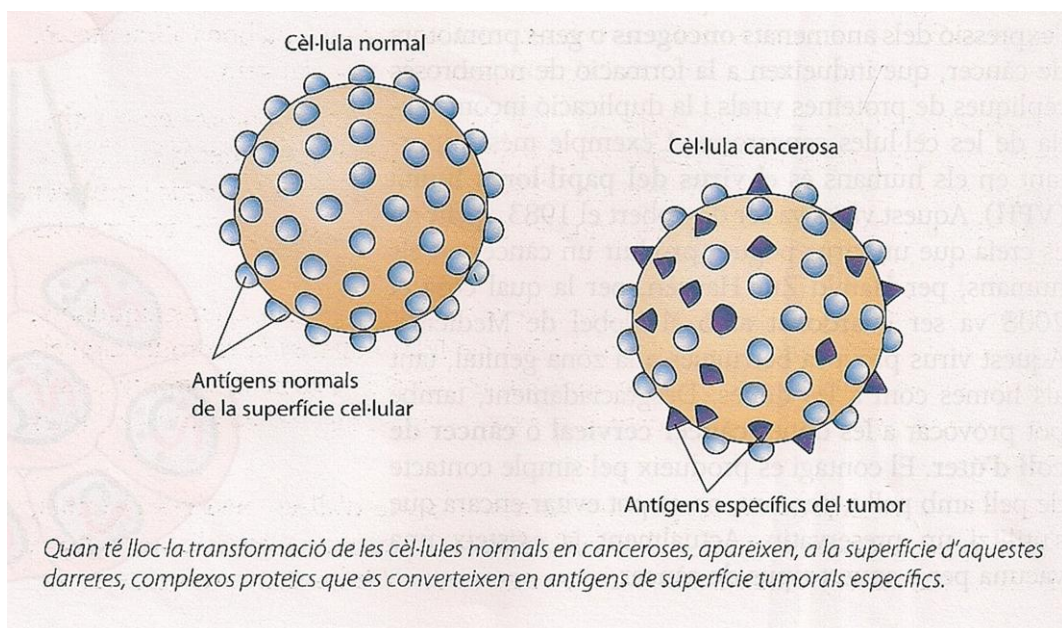
Procés de transmissió del DNA viral a una cèl·lula hoste sana, generant un tumor maligne

[Font: Projecte La Casa Del Saber, Biologia 2n de batxillerat]

Les **característiques de les cèl·lules canceroses** són, entre d'altres:

- L'origen clonal, és a dir, s'originen a partir d'una sola cèl·lula.
- La divisió indefinida
- Tenir un citoesquelet anormal
- Tenir una activitat bioquímica alterada
- Tenir anomalies cromosòmiques de tipus de les aneuploïdies (organisme amb una dotació cromosòmica que no és múltiple d'un genoma determinat)
- Presència d'antígens² tumorals a la membrana cel·lular, que són molècules antigèniques diferents de les que tenen les cèl·lules normals.

Els **antígens tumorals** són **específics** per a cada tipus de cèl·lules canceroses, i determinen la posada en marxa del sistema immunitari, com ara la producció d'anticossos específics i l'activitat dels limfòcits T citotòxics, de les cèl·lules assassines (NK) i dels macròfags. Tot i així, la resposta immune a les cèl·lules cancerígenes és, en molts casos, ineficaç, tal com demostren les estadístiques de persones mortes cada any pels diferents tipus de càncer.



Imatges esquemàtiques dels antígens específics de la superfície cel·lular de cèl·lules sanes i cèl·lules canceroses. [Font: Projecte La Casa Del Saber, Biologia 2n de batxillerat]

1.3 EL DIAGNÒSTIC PRECOÇ DEL CÀNCER

La lluita contra els tumors malignes es basa en el diagnòstic precoç, quan estan ben localitzats i encara no ha començat la fase invasora de la metàstasi. Ens aquests moments és quan cal intervenir quirúrgicament per extirpar el tumor. Però s'ha de tenir en compte que el període preclínic o ocult de molts tipus de càncer pot durar anys, de manera que, quan es detecta, la intervenció mèdica gairebé sempre sol ser tardana, i aleshores tan sols es pot retardar uns quants mesos l'evolució de la malaltia cancerosa.

Mètodes preventius

Els mètodes preventius contra el càncer són, ara per ara, el control sanitari de substàncies de les quals s'ha demostrat l'acció carcinògena, com ara els quitrans del tabac, algunes anilines³, les radiacions ionitzants i determinades hormones.

Es necessita estudiar la suposada acció carcinògena d'altres substàncies, així com potenciar la investigació, perquè sigui el mateix sistema immunitari el que controli el desordre de les cèl·lules tumorals.

Per als càncers més comuns en l'home i la dona els mètodes preventius són fer anàlisis concretes a partir d'una edat determinada. Així, per exemple, per prevenir el càncer de mama es recomana fer exploracions dels pits freqüentment i, a partir dels 40 anys, fer-se una mamografia anual. Per detectar el càncer de còlon i recte es fan proves específiques de detecció a partir dels 50 anys, edat a partir de la qual també que es fan per al càncer de pròstata, en el cas del sexe masculí. Per prevenir i detectar el càncer cervical i del coll uterí, es fan proves anuals a partir de l'inici de les relacions sexuals.

1.4 TRACTAMENTS

Pel que fa el tractament del càncer, dependrà del tipus de càncer, de la localització i de l'extensió que tingui al cos. Tipus de tractaments:

a) La cirurgia

La cirurgia és el millor element de tractament si el càncer està localitzat en un lloc concret del cos i no ha sofert metàstasi, com passa amb els càncers de pell. Si s'ha disseminat i no es pot extirpar tot quirúrgicament, el tractament consisteix en els dos mètodes següents.

b) La radioteràpia

Consisteix a aplicar radiacions ionitzants, com ara rajos X, electrons, protons i nuclis atòmics, sobre el teixit o la zona on es localitza el càncer. Les radiacions maten les cèl·lules malignes i impedeixen, a més, que es reproduïxin. Les sessions de radioteràpia s'han d'efectuar periòdicament durant un temps determinat, segons el tipus de càncer.

La radioteràpia té com a efectes secundaris sobre la persona l'aparició de cansament i fatiga, inflamació, envermelliment i sequedat de la pell a la zona tractada. Aquests efectes secundaris poden atenuar-se si la persona té una bona alimentació, descansa, fa activitat física lleugera i utilitza peces de roba lleugera.

c) La quimioteràpia

El tractament del càncer per mitjà de productes farmacèutics que maten o impedeixen el creixement de les cèl·lules tumorals s'anomena quimioteràpia. El problema de la quimioteràpia és que és un mètode de tractament inespecífic i que, per tant, actua sobre totes les cèl·lules que es troben en fase de divisió, incloses les cèl·lules normals.

Entre els fàrmacs quimioterapèutics contra el càncer destaquen agents alquilants, com ara el clorambucil, que danyen el DNA cel·lular i alteren la reproducció cel·lular; antimetabòlits⁴, com ara el metotrexat, **alcaloides** i antibiòtics antitumorals. La quimioteràpia debilita físicament la persona, ja que mata també moltes cèl·lules normals.

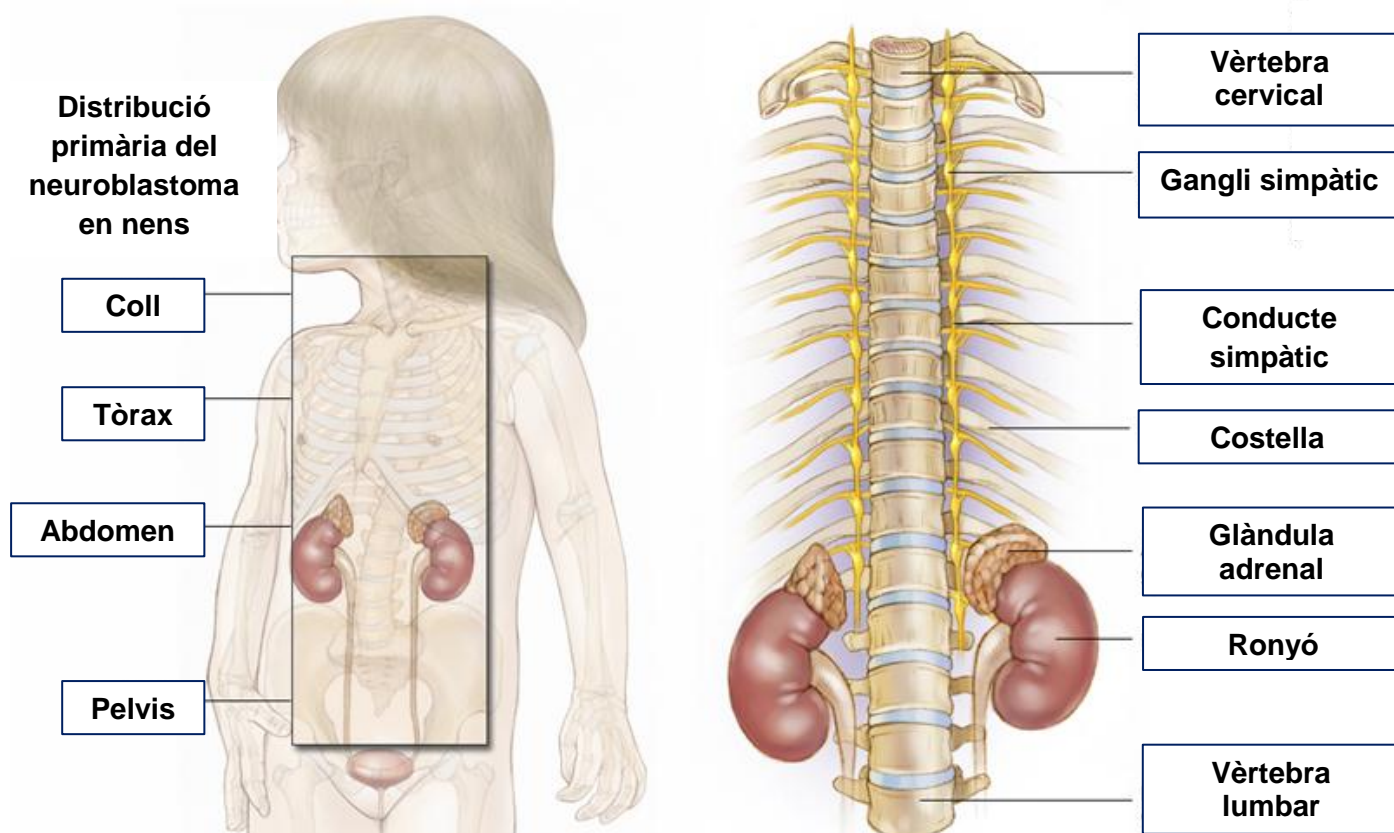
D'aquesta manera es pot explicar que molts pacients sotmesos a tractaments quimioterapèutics pateixen la caiguda del cabell. La quimioteràpia, entre altres coses, actua evitant la formació del fus mitòtic, essencial per a la divisió cel·lular, fent que les cèl·lules deixin de reproduir-se. Com que ataca tant a cèl·lules canceroses com a cèl·lules sanes, les cèl·lules capil·lars no poden reproduir-se i per això cauen els cabells sense tornar a renéixer fins la fi del tractament.

Els efectes secundaris de la quimioteràpia són, entre d'altres, nàusees i vòmits, anèmia, alopecia o caiguda del cabell, diarrea o restrenyiment, hemorràgies i immunosupressió⁵, ja que també queden danyades cèl·lules immunocompetents.

2. EL NEUROBLASTOMA

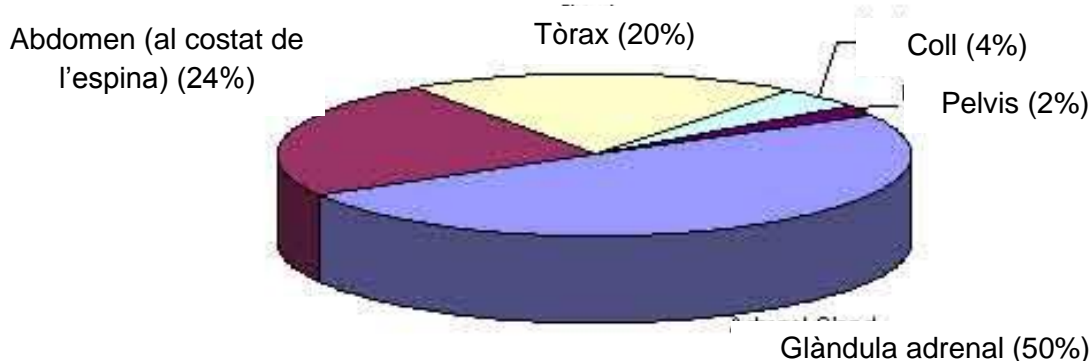
El neuroblastoma és un càncer poc comú del sistema nerviós simpàtic⁶, la xarxa nerviosa que envia els missatges des del cervell a través del cos. És el tumor més freqüent durant els dos primers anys de vida i, després dels tumors del sistema nerviós central⁷ en conjunt, el tumor sòlid més freqüent en nens. En total representa el 8-10% dels tumors pediàtrics. El seu grau d'incidència estimat és d'un infant per cada 7.000 nounats vius, el que significa que a Espanya es diagnostiquen uns 50 casos nous cada any. L'edat mitjana de diagnòstic és de 2 anys, tenint en compte que el 90% es diagnostiquen abans dels 5 anys.

El neuroblastoma és un tumor embrionari que es pot desenvolupar abans del naixement (entre 1-2% dels casos és congènit, és a dir, es pateix des del naixement). Els tumors poden formar-se en el teixit nerviós de la glàndula suprarenal ubicada sobre els ronyons (el lloc més freqüent) però també en el coll, el tòrax, l'abdomen i la pelvis. També poden estar disseminats en altres àrees o sistemes del cos, com els ossos o la medul·la òssia⁸.



Esquema de la distribució primària del neuroblastoma i del sistema nerviós simpàtic lligat al tumor
[Font: American Society of Clinical Oncology]

És un tumor agressiu amb una alta mortalitat (representa el 15% de les morts a causa de càncer en nens) i una gran afectació de l'estat general del malalt. En la majoria de casos, el tumor ja s'ha disseminat en el moment del seu diagnòstic, ja que normalment es diagnostiquen de manera accidental durant l'avaluació d'un traumatisme, infecció o símptomes respiratoris.

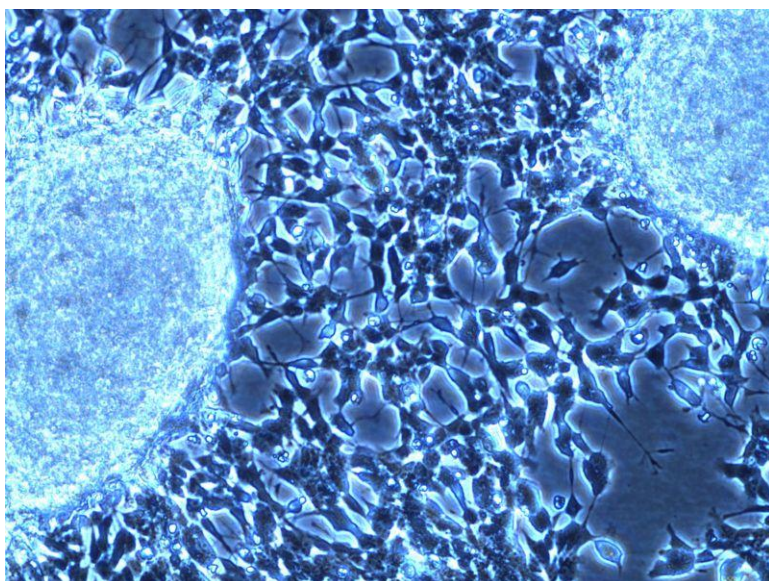


Aquest gràfic mostra els % dels tumors primaris segons el seu origen

[Font: American Pediatric Surgical Association]

Es desconeix l'origen o el factor que causa el neuroblastoma. S'han proposat varis factors de risc que actualment són objecte d'investigació, generalment relacionats amb el procés de concepció i gestació de l'infant, degut a la curta edat de l'individu en el moment del desenvolupament del tumor. Malgrat això, no existeix cap evidència actual que indiqui una associació clara amb cap factor ambiental, químic, biològic o per irradiacions i el desenvolupament del neuroblastoma, ja que encara s'està investigant i els resultats obtinguts fins ara no són del tot consistents. Malgrat això, hi ha evidències en diverses investigacions que relacionen el desenvolupament del neuroblastoma amb un protooncogen⁹ situat al braç curt del cromosoma 2, el *N-myc*, que presenta alteracions en el nombre de còpies en el procés d'amplificació (no és un gen mutat) en el 20% dels neuroblastomes diagnosticats.

En qualsevol cas el neuroblastoma es basa en la presència de cèl·lules anòmales que persisteixen en el desenvolupament normal del sistema nerviós simpàtic. Aquestes cèl·lules anòmales corresponen als neuroblasts, que són cèl·lules embrionàries de les quals deriven les neurones.



Cèl·lules de neuroblastoma conegudes com SH-SY5Y

[Font:
<http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:BiggeggSH-SY5Y.jpg>]

2.1 SÍMPTOMES

Els símptomes inicials del neuroblastoma són molt imprecisos i en general inclouen la fatiga i la pèrdua de la gana. A mesura que la malaltia progressa apareixen símptomes determinats segons la ubicació del tumor (al llarg del sistema nerviós simpàtic o els possibles llocs on hagi fet metàstasi):

LOCALITZACIÓ	SÍMPTOMES
Abdomen	Ventre una mica inflat, distensió i dolor abdominal, restrenyiment o diarrea, anorèxia...
Pulmó (poc freqüent)	Sensació de dificultat en respirar,...
Medul·la espinal	Debilitat muscular, dificultat per caminar i moure's, símptomes d'insuficiència medul·lar com anèmies, dolor a l'os,...
Sistema nerviós central	Mal de cap, alteracions en la visió i en el tamany dels ulls, hematomes al voltant dels ulls (sobretot si el tumor afecta el cervell)

Altres símptomes freqüents: febres elevades, paràlisis i debilitat corporal en tumors de gran tamany, dolor en ossos i articulacions, hipertensió arterial, síndromes paraneoplàsics¹⁰, síndrome de Horner¹¹ en tumors toràcics o cervicals...

En qualsevol cas la majoria de símptomes són comuns a moltes altres malalties, moltes d'elles sense importància com gripes, infeccions digestives o respiratòries, etc. i altres de més greus però més freqüents com malalties reumàtiques, infeccioses o neurològiques.

2.2 EL TRACTAMENT

El tractament del neuroblastoma varia en funció de diversos factors, fonamentalment l'estadi de la malaltia i l'edat del pacient. El programa terapèutic ha d'estar orientat en minimitzar l'ús d'aquelles substàncies més tòxiques, com la quimioteràpia o la radioteràpia, i fonamentar el tractament de la immunoteràpia, un model de tractament dissenyat per eliminar directament les cèl·lules del neuroblastoma reforçant les defenses del cos.

Quan el tumor es troba localitzat, generalment és curable. No obstant, la supervivència a llarg termini per a nens amb la malaltia avançada i majors de 18 mesos és pobre i complicada, malgrat l'agressiu tractament que se'ls hi aplica: quimioteràpia intensiva, cirurgia, radioteràpia, trasplantaments de cèl·lules mare, immunoteràpia amb anticossos monoclonals¹² o viroteràpia amb virus oncolítics entre altres.

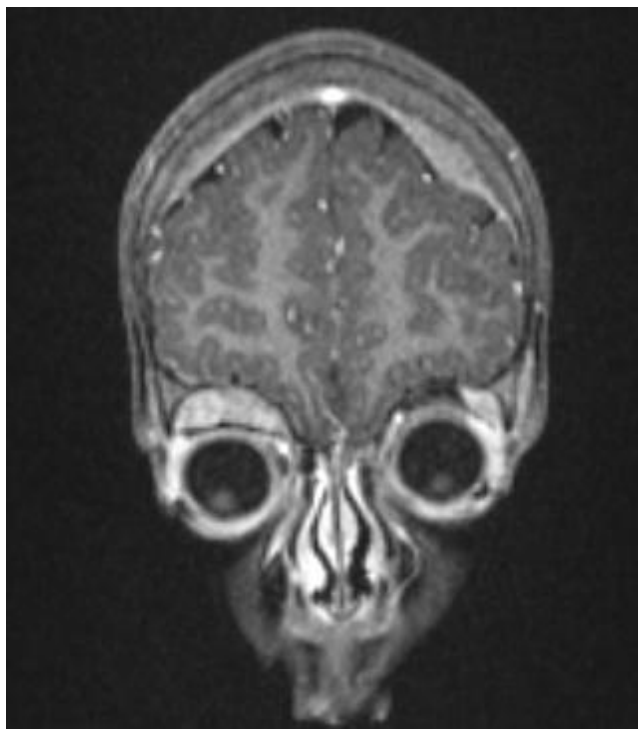
El tractament varia segons la categoria de risc en la que s'hagi classificat el tumor:

- Pacients de baix risc: són mantinguts en una conducta expectant i sota observació. Poden ser curats mitjançant cirurgia sola.
- Pacients de risc mitjà: són tractats amb cirurgia i quimioteràpia.
- Pacients d'alt risc: són tractats amb quimioteràpia intensiva, cirurgia, teràpia de radiació, trasplantaments de medul·la òssia o trasplantaments de cèl·lules mare, teràpies amb fonament biològic del 13-cis-àcid retinoic i la teràpia d'anticossos.

2.3 DIAGNÒSTIC

El diagnòstic del neuroblastoma ha de determinar l'estadi de la malaltia. Per això, l'equip mèdic especialista en oncologia pediàtrica ha de realitzar, a més a més d'un historial clínic i una exploració física adequada, una sèrie d'exàmens complementaris que seran els que ajudaran a determinar l'estadi de la malaltia amb l'objectiu d'adequar el tractament.

Tal i com s'indica en l'apartat anterior, com que el conjunt de símptomes són molt ambigus i comuns a altres malalties, el diagnòstic definitiu habitualment és complicat i retardat (entre el 50-60% dels neuroblastomes es diagnostiquen després de la metàstasi). La majoria dels oncòlegs diagnostiquen fàcilment aquesta malaltia una vegada han avaluat la biòpsia del tumor, l'examen d'orina, etc. La resta de les proves, com anàlisis de sang¹³, biòpsia¹⁴, aspiració i biòpsia medul·lar¹⁵, MIGB¹⁶, TAC¹⁷, Ressonància Magnètica¹⁸ i ecografies¹⁹, ajuden a confirmar el diagnòstic, serveixen per mesurar l'extensió i el seu estadi i permeten el seguiment de l'evolució i el tractament de la malaltia.



Exemple d'una ressonància magnètica (RMI) d'una nena de 2 anys amb neuroblastoma

[Font: http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Neuroblastoma_mets.JPG]

2.4 ESTADIS

Les proves mencionades s'utilitzen per diagnosticar el neuroblastoma i determinar un estadi de la malaltia. Estadi és un terme que fa referència a la localització i l'extensió del tumor, i que serveix per decidir el protocol de tractament, ja que pot variar substancialment d'un a un altre. El més correcte seria denominar-ho com a "tipus", perquè en realitat cada estadi defineix un tipus de neuroblastoma diferent.

Cal tenir clar que cada estadi és un tipus de neuroblastoma diferent: els que es troben en estadi 2 ho són des del principi, és a dir, no han estat estadi 1 abans ni seran mai estadi 3. Els estadis no signifiquen evolució. Un diagnòstic avançat implica menys disseminació o un menor tamany del tumor.

Característiques tumorals dels diferents estadis

Estadi 1	El tumor es troba en la zona en la que ha crescut, no hi ha disseminació ni metàstasi i pot ser extirpat completament mitjançant la cirurgia.
Estadi 2A	El tumor es troba en la zona en la que ha crescut, no hi ha disseminació ni metàstasi i no pot ser extirpat completament mitjançant la cirurgia.
Estadi 2B	El tumor es troba en la zona on ha crescut i no és possible extirpar-lo completament mitjançant cirurgia. Els <u>ganglis</u> ²⁰ adjacents al tumor presenten cèl·lules de neuroblastoma.
Estadi 3	El tumor no pot ser extirpat completament amb cirurgia i pot: - Estar disseminat a l'altra part del cos i presentar invasió dels ganglis adjacents. -Mantenir-se a la zona on ha crescut, però afectar els ganglis de l'altra part del cos. -Mantenir-se en la meitat del cos on ha aparegut i afectar a ganglis d'ambdues parts del cos.
Estadi 4	El tumor està disseminat als ganglis limfàtics, la medul·la òssia, l'os, el fetge i/o altres òrgans.
Estadi 4S	Només és aplicable a nens menors d'un any. El tumor es troba en la zona on creix, com en els estadis 1 i 2, però algunes cèl·lules poden aparèixer la medul·la òssia, el fetge o l'os.



Nena malalta de neuroblastoma

*[Font: St. Jude Children Research Hospital, en
<http://fundacionannavazquez.wordpress.com/2007/10/08/neuroblastoma>]*

3. L'APOPTOSI CLÀSSICA

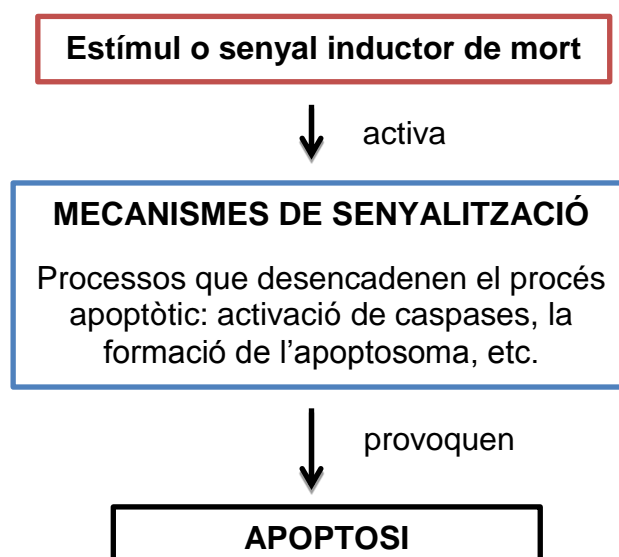
En l'organisme humà centenars de milers de cèl·lules són originades cada segon per mitosi, mentre que, al mateix temps, un nombre similar moren per apoptosi.

La gran majoria de cèl·lules dels animals pluricel·lulars estan internament programades per autodestruir-se en un moment concret del seu cicle o vida. Aquestes, un cop transcorregut aquest temps, moren per apoptosi. Com a conseqüència, podem parlar d'un mecanisme de mort estrictament programat. Així doncs, l'apoptosi com a mecanisme de mort cel·lular permet mantenir constant el nombre de cèl·lules i garanteix l'estabilitat homeostàtica²¹ de l'organisme. A més a més, a part de formar part d'aquest cicle, l'apoptosi també permet eliminar aquelles cèl·lules en mal estat (cèl·lules danyades) i aquelles que duen a terme la seva funció de manera anòmala.

Per tant, podem definir l'apoptosi de la manera següent:

L'apoptosi és un mecanisme fisiològic de mort programada que contribueix a regular el nombre de cèl·lules d'un organisme, de manera que totes aquelles cèl·lules que són excedentàries, estan lesionades o compleixen una funció transitòria, són eliminades.

L'apoptosi és un mecanisme de mort molt regulat i altament eficient que requereix la interacció d'una gran multitud de factors. Els components que duen a terme aquest procés, els mecanismes de senyalització, estan codificats genèticament en cèl·lules nucleades i a punt per ser activats mitjançant un estímul inductor de mort.

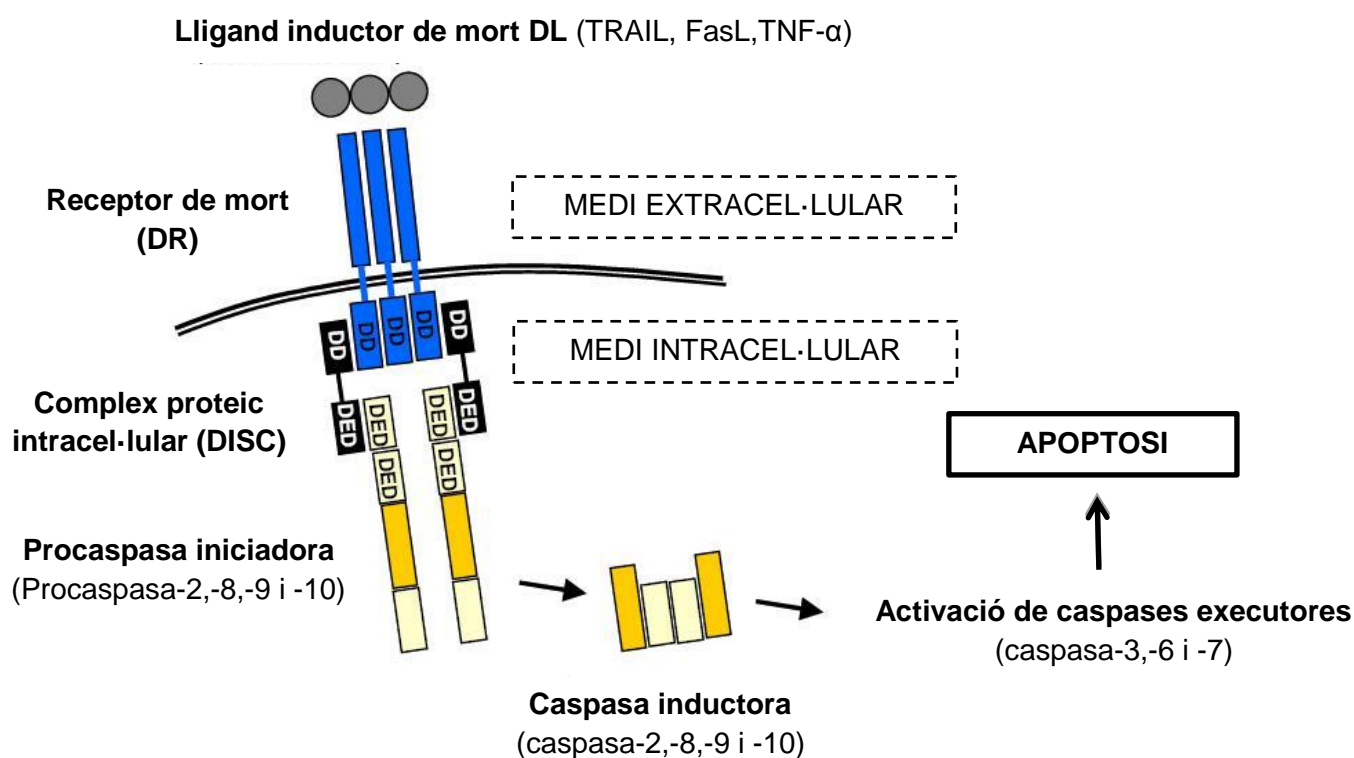


Aquests estímuls que posen en marxa l'apoptosi tenen l'origen en l'interior o bé en l'exterior de la cèl·lula. Alguns exemples són mitjançant la unió d'un inductor de mort en els receptors de membrana, la presència de danys en el DNA cel·lular a causa d'una mala acció per part dels mecanismes de reparació del DNA, el tractament amb drogues citotòxiques o radiacions, la impossibilitat de supervivència de la cèl·lula degut a un mal funcionament intern o el desenvolupament dels mecanismes de mort entre altres.

3.1 VIES D'INDUCCIÓ

Dins del procés apoptòtic es distingeixen dos tipus de vies d'inducció: la via extrínseca, iniciada per receptors de membrana que activen els mecanismes de senyalització, i la via intrínseca, que s'inicia en el mitocondri.

Via extrínseca



Fase 1

En la via extrínseca, els receptors de mort (DR de *Dead Receptor*) que es troben a la superfície externa de la membrana plasmàtica són els encarregats de transmetre les

senyals apoptòtiques externes a través de la unió amb un lligand específic (DL de *Death Ligand*) que actua com a estímul inductor de mort. Els lligands més freqüents solen ser FasL, TNF- α i TRAIL.

Fase 2

Un cop originada la unió entre els receptors de membrana i l'inductor (DR·DL), es forma un complex proteic intracel·lular anomenat DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*), on s'hi uneixen les procaspases iniciadores (procaspasa-2,-8,-9 i -10). Les procaspases són la forma en què es presenten les caspases²² quan estan inactives. Amb aquesta unió s'activen les caspases iniciadores (caspasa-2,-8,-9 i -10).

Fase 3

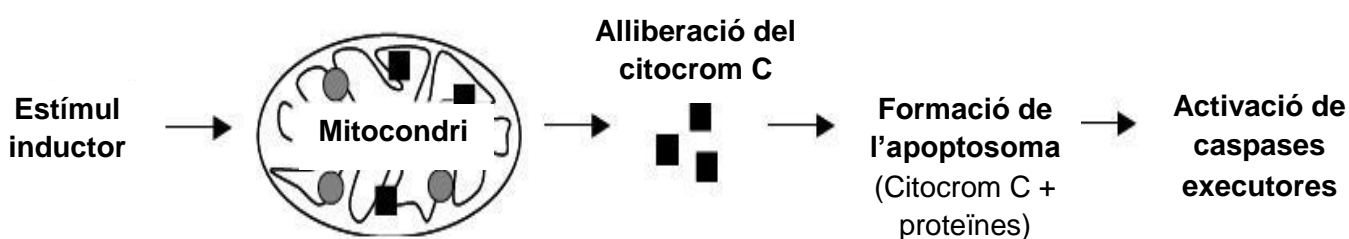
Les caspases iniciadores s'encarreguen d'activar a les caspases executores (caspasa-3, caspasa-6 i caspasa-7) que al seu torn activaran els respectius substrats²³ de mort i finalitzaran el procés apoptòtic.

Via intrínseca

Quan els nivells de caspasa-8 són baixos, l'activació de l'apoptosi es fa pel segon tipus de via, la via intrínseca, que es dona en el mitocondri.

Estímuls d'índole diversa com radiacions o tractament amb fàrmacs quimioterapèutics que danyen el DNA són els que activen aquesta via. Un cop activada es dona l'alliberació del citocrom C des de l'espai intermembranaral mitocondrial cap al citosol cel·lular, on s'uneix a altres proteïnes originant l'apoptosoma, que serà l'encarregat d'activar les caspases executores (caspasa-3, caspasa-6 i caspasa-7) per finalitzar el procés apoptòtic.

Figura 2



3.2 MORFOLOGIA CEL·LULAR APOPTÒTICA

L'activació de qualsevol d'aquestes dues vies dóna lloc a unes característiques morfològiques cel·lulars comunes en tot procés apoptòtic.

Aquests canvis morfològics són la conseqüència dels diferents processos moleculars i bioquímics que s'esdevenen en les cèl·lules apoptòtiques. Aquests processos inclouen l'activació d'enzims proteolítics encarregats de dur a terme la transformació del DNA en fragments oligonucleosomals²⁴ i l'activació de multitud de proteïnes (entre elles les caspases) i substrats específics que activen el procés de mort.

Així doncs, les cèl·lules apoptòtiques poden ser fàcilment reconegudes gràcies a l'estereotip de canvis morfològics i bioquímics que pateixen. Són els següents:

A: Deformació de la cèl·lula i disminució del volum cel·lular. Com a conseqüència, es perd el contacte amb les cèl·lules veïnes que l'envolten.

Condensació i migració de la cromatina cap a la perifèria nuclear seguida de la fragmentació del nucli.

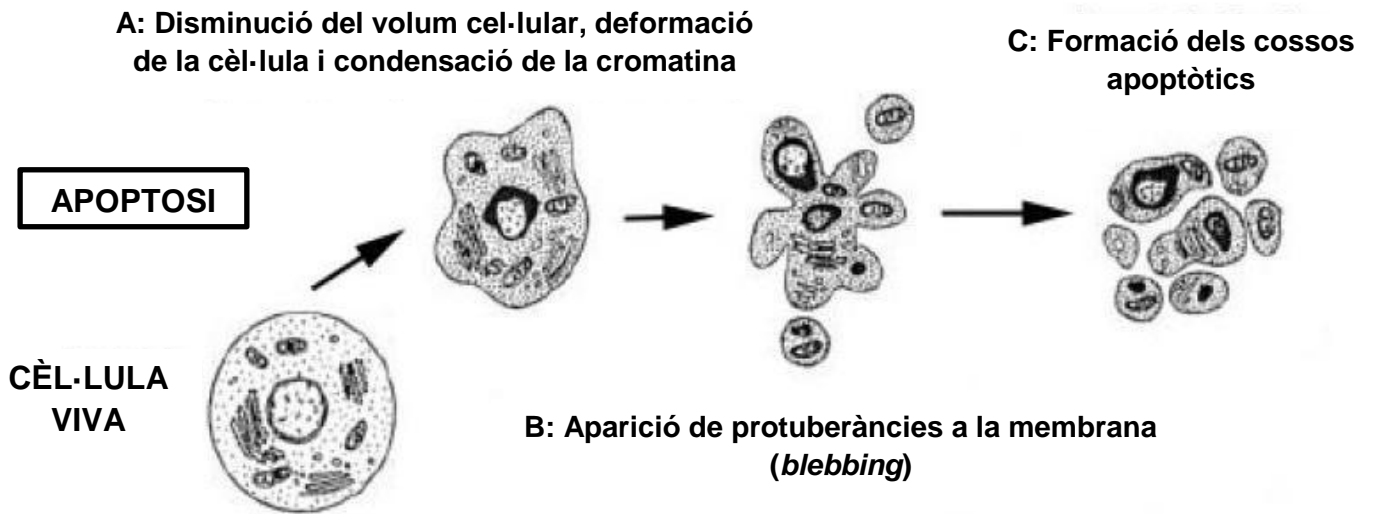
B: Aparició de protuberàncies a la membrana plasmàtica (*blebbing*)

C: Trencament de la membrana plasmàtica i, finalment, fragmentació de la cèl·lula en estructures compactes i tancades per la membrana. Aquestes estructures originades reben el nom de "cossos apoptòtics" i contenen citosol, la cromatina condensada i orgànuls cel·lulars.

Malgrat això, la característica bioquímica més representativa de l'apoptosi és:

La degradació oligonucleosomal del DNA en forma d'escala (*ladder*) quan es separa i visualitza en un gel d'agarosa. Aquesta fragmentació rep el nom de LMW (*Low Molecular Weight*).

Figura 3



Esquema dels canvis morfològics característics de l'apoptosi.

Els cossos apoptòtics són fagocitats per macròfags²⁵, els quals extreuen les restes de la cèl·lula morta del teixit sense provocar-li cap tipus d'inflamació.

No obstant això, hi ha altres tipus de mort cel·lular com la necrosi que, a diferència de l'apoptosi, es tracta d'un procés de mort accidental, és a dir, no és programada.

La mort necròtica es caracteritza per:

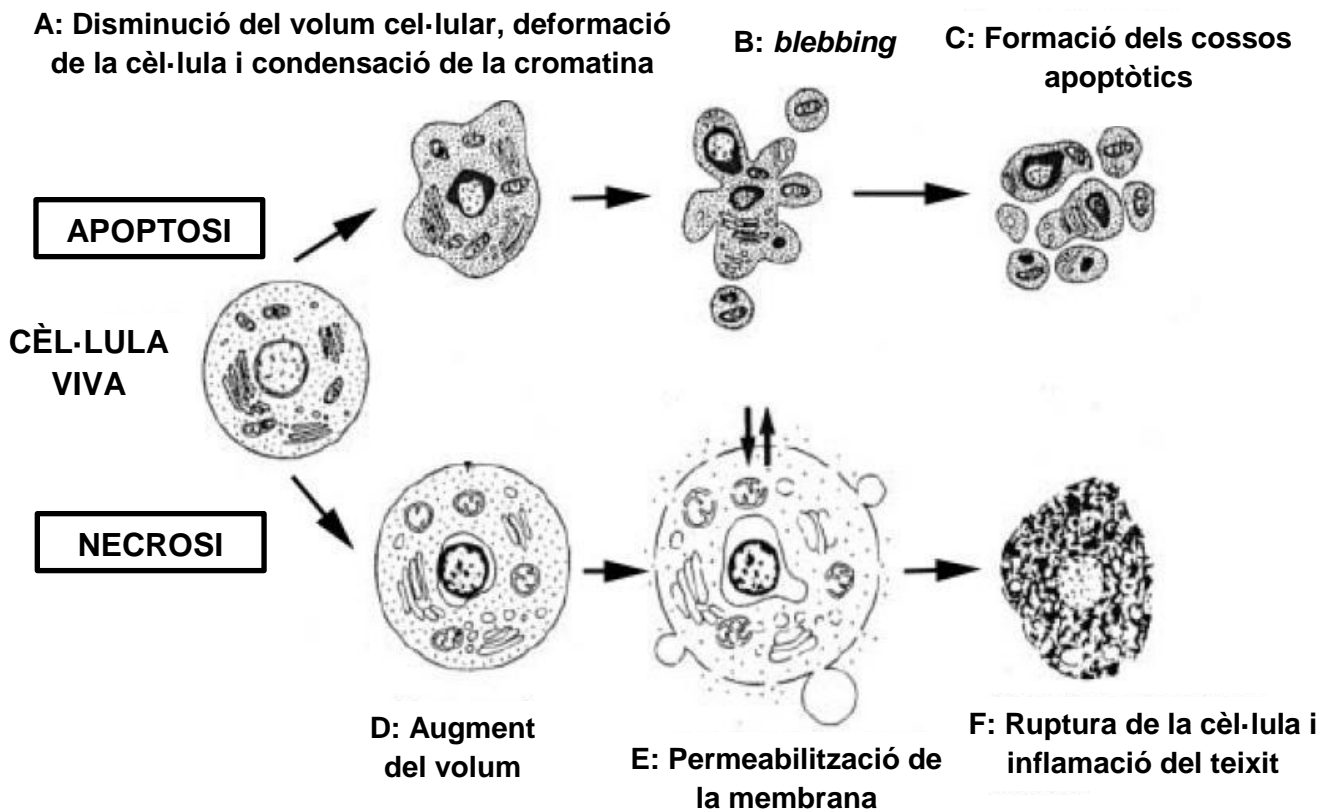
D: Augment considerable del volum cel·lular.

E: Pèrdua de la integritat i permeabilització de la membrana.

F: Ruptura de la membrana. Un cop trencada, el contingut cel·lular és expulsat sense control a l'exterior danyant les cèl·lules del voltant i provocant una important inflamació del teixit corresponent.

D'aquesta manera, en aquest tipus de mort, les cèl·lules i l'organisme en surten molt més perjudicats, ja que el teixit corresponent a la cèl·lula necròtica queda danyat.

Figura 4



Esquema comparatiu d'ambdós tipus de mort.

Interpretació:

L'apoptosi inclou una disminució del volum cel·lular, la condensació i la migració de la cromatina cap a la perifèria nuclear i "l'explosió" de la cèl·lula que dóna lloc als cossos apoptòtics. Aquests, finalment, són fagocitats sense causar cap resposta inflamatòria en el teixit.

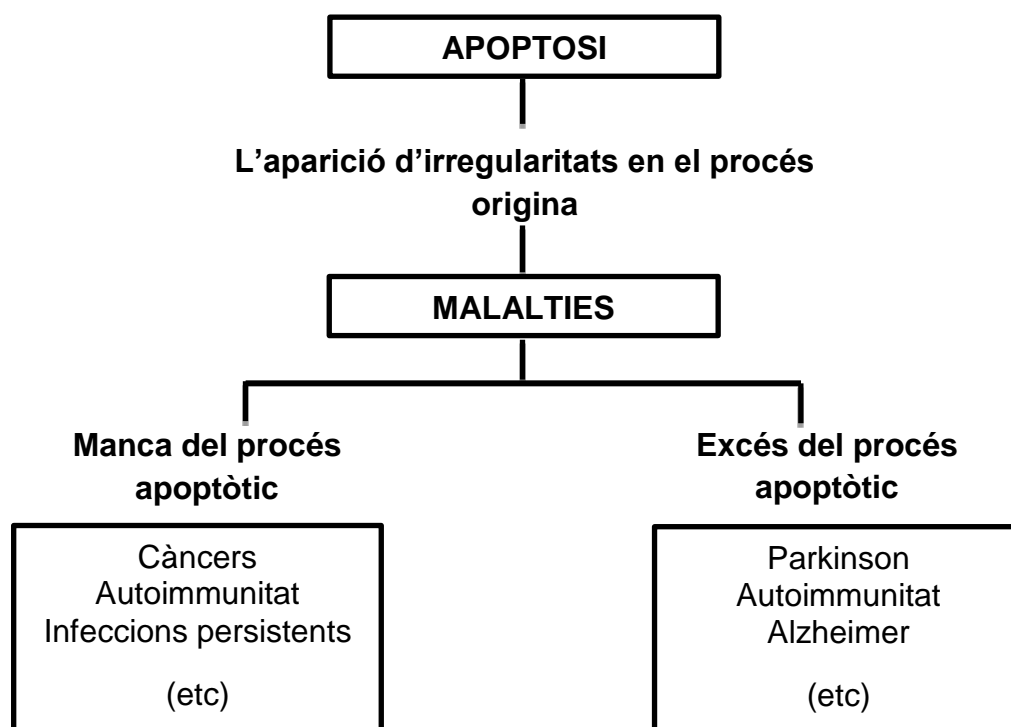
D'altra banda la necrosi es caracteritza per la inflamació i la permeabilització de la cèl·lula (deixa entrar l'aigua i altres substàncies a l'interior) que finalment es trenca i aboca tot el seu contingut a l'exterior, danyant les cèl·lules veïnes i provocant la inflamació del teixit.

4. RELACIÓ ENTRE L' APOPTOSI I EL CÀNCER

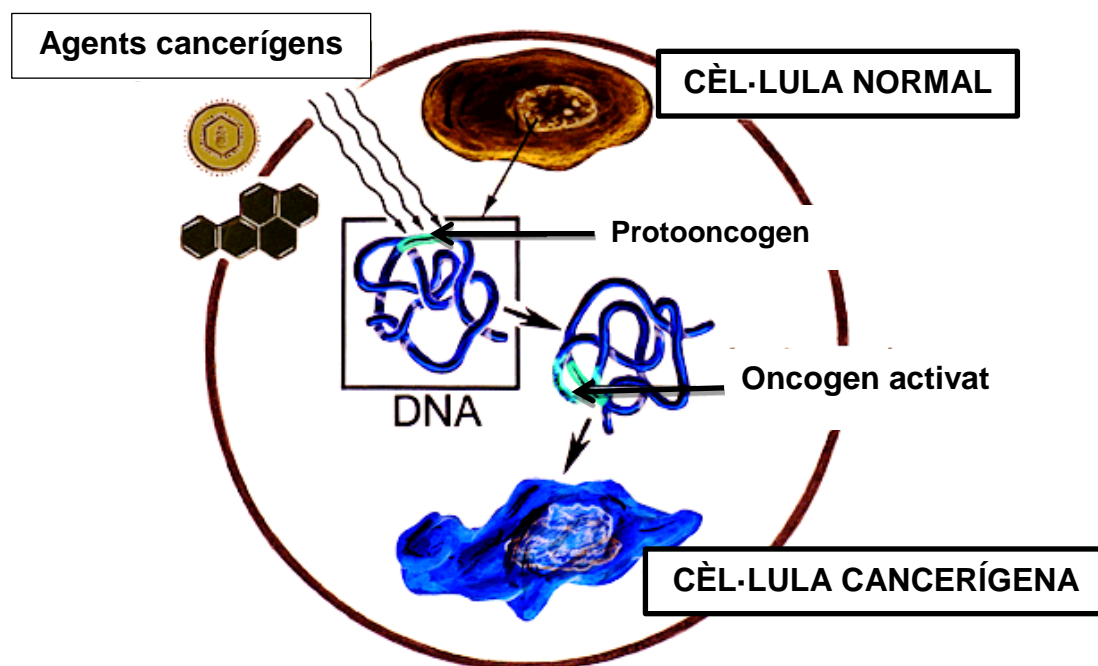
Com s'ha dit inicialment, en l'organisme humà centenars de milers de cèl·lules es creen cada segon per mitosi²⁶ mentre que un nombre similar moren per apoptosi amb la finalitat de mantenir constant l'homeòstasi, el nombre de cèl·lules de l'organisme, etc.

Com a conseqüència, l'existència d'irregularitats en el procés apoptòtic juga un paper molt important en el desenvolupament de varies malalties, ja que provoquen una insuficiència o un excés de cèl·lules apoptòtiques i, per tant, perjudiquen l'organisme perquè no s'aconsegueixen els objectius anteriorment esmentats. Alguns exemples de malalties provocades per falta de cèl·lules apoptòtiques són: el càncer (acumulació de cèl·lules, resistència de les quals a les teràpies inductores de mort, inefectivitat del sistema immunitari per contrarestar aquest excés de cèl·lules...), autoimmunitat (error del sistema immunitari, que és incapaç de reconèixer com a pròpies determinades molècules), infeccions persistents (incapacitat d'eliminar cèl·lules infectades)...

Per contra, un excés del procés apoptòtic també contribueix a originar malalties com: malalties neurodegeneratives²⁷ (l'Alzheimer, el Parkinson...), autoimmunitat (inducció descontrolada d'apoptosi en òrgans concrets), entre altres.



El mal funcionament dels mecanismes apoptòtics té l'origen en la mutació dels gens que codifiquen els factors directament o indirectament relacionats amb l'inici i l'execució de l'apoptosi. Aquestes mutacions que n'afecten el procés han estat identificades com a factor de causa i contribució en els mecanismes que originen algunes malalties de l'organisme humà.



Esquema de la mutació del DNA en oncogens degut als agents cancerígens

[Font: www.beltina.org, *encyklopedia of health*]

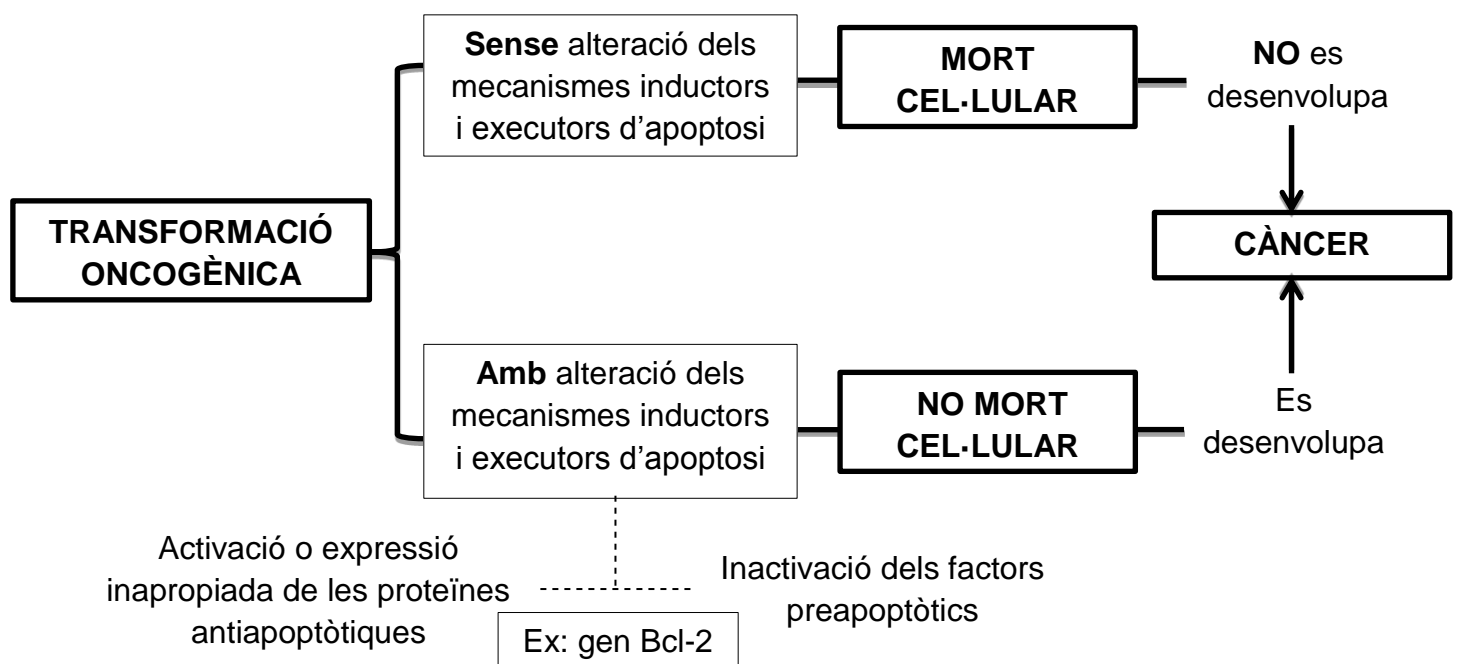
En l'actualitat, és d'especial interès la relació que hi ha entre un procés d'apoptosi defectuós i la formació, la progressió i la metàstasi d'un càncer i la seva resistència als tractaments anticancerosos amb múltiples fàrmacs o radiacions. En els darrers últims anys ha esdevingut cada vegada més evident que la tumorigènesi no és solament el resultat d'una excessiva proliferació de cèl·lules deguda a l'activació d'oncogens, si no que també depèn de la incapacitat de posar en marxa l'apoptosi de manera controlada. Aquests dos factors es donen freqüentment de forma simultània en la tumorigènesi.

Algunes d'aquestes alteracions que indueixen una transformació cel·lular maligna com la transformació i la proliferació descontrolada d'oncogens amb la posterior invasió o metàstasi, desencadenen l'apoptosi de la cèl·lula. Per això, les úniques cèl·lules

transformades oncogènicament que sobreviuran i es tornaran malignes seran aquelles que, a més a més, hauran patit alteracions en els mecanismes iniciadors i executors d'apoptosi ja que llavors estaran protegides de la inducció de mort apoptòtica i perduraran en l'organisme, és a dir, no moriran.

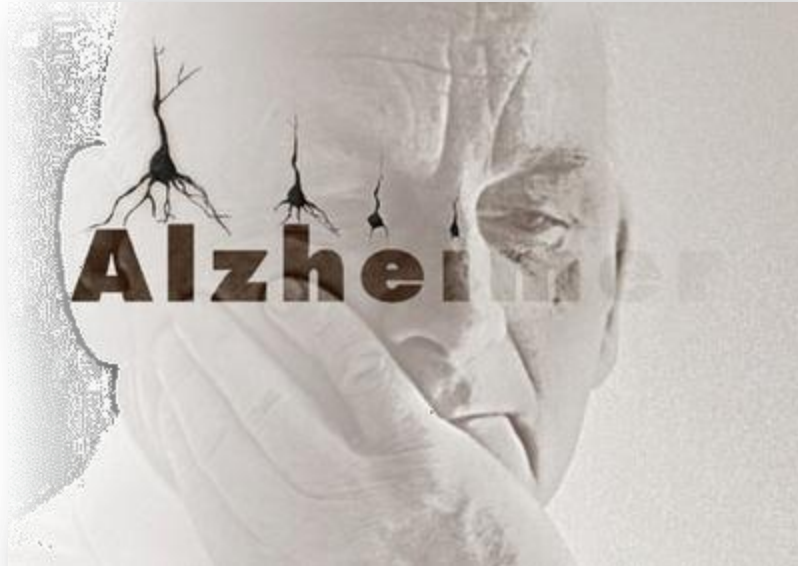
Una cèl·lula transformada oncogènicament, pot aconseguir protecció contra l'apoptosi mitjançant una activació o expressió inapropiades de les proteïnes antiapoptòtiques o bé a partir de la inactivació dels factors preapoptòtics.

Un exemple d'això és el Bcl-2, el primer gen descobert relacionat amb l'apoptosi. Es va descobrir que aquest gen juga un paper molt important en la tumorigènesi, ja que es troba sobreexpressat en una gran varietat de càncers, contribuint a la supervivència de les cèl·lules canceroses mitjançant una clara inhibició del procés apoptòtic sobre aquestes cèl·lules.



Aprofundir en els coneixements sobre els processos i les alteracions relacionades amb els mecanismes apoptòtics que contribueixen a diferents patologies permetria el desenvolupament de mètodes terapèutics més tolerables, efectius i específics. En el cas del càncer, aquests mètodes han d'incloure l'activació dels factors preapoptòtics que actuen com a supressors tumorals i que indueixen la mort cel·lular o el bloqueig dels oncogens antiapoptòtics que n'inhibeixen la mort. Pel que fa a altres malalties

neurodegeneratives com l'Alzheimer i el Parkinson, amb un excés de cèl·lules apoptòtiques, és estrictament necessari que aquests nous mètodes terapèutics garanteixin la inhibició dels components preapoptòtics clau com les caspases.



Alzheimer [Font: <http://www.vivaconsalud.es/alzheimer-analisis-sangre>]



Parkinson [Font: <http://cuidatusaludcondiane.com/enfermedad-de-parkinson/>]

PART PRÀCTICA

ESTRUCTURA DE LA PART PRÀCTICA

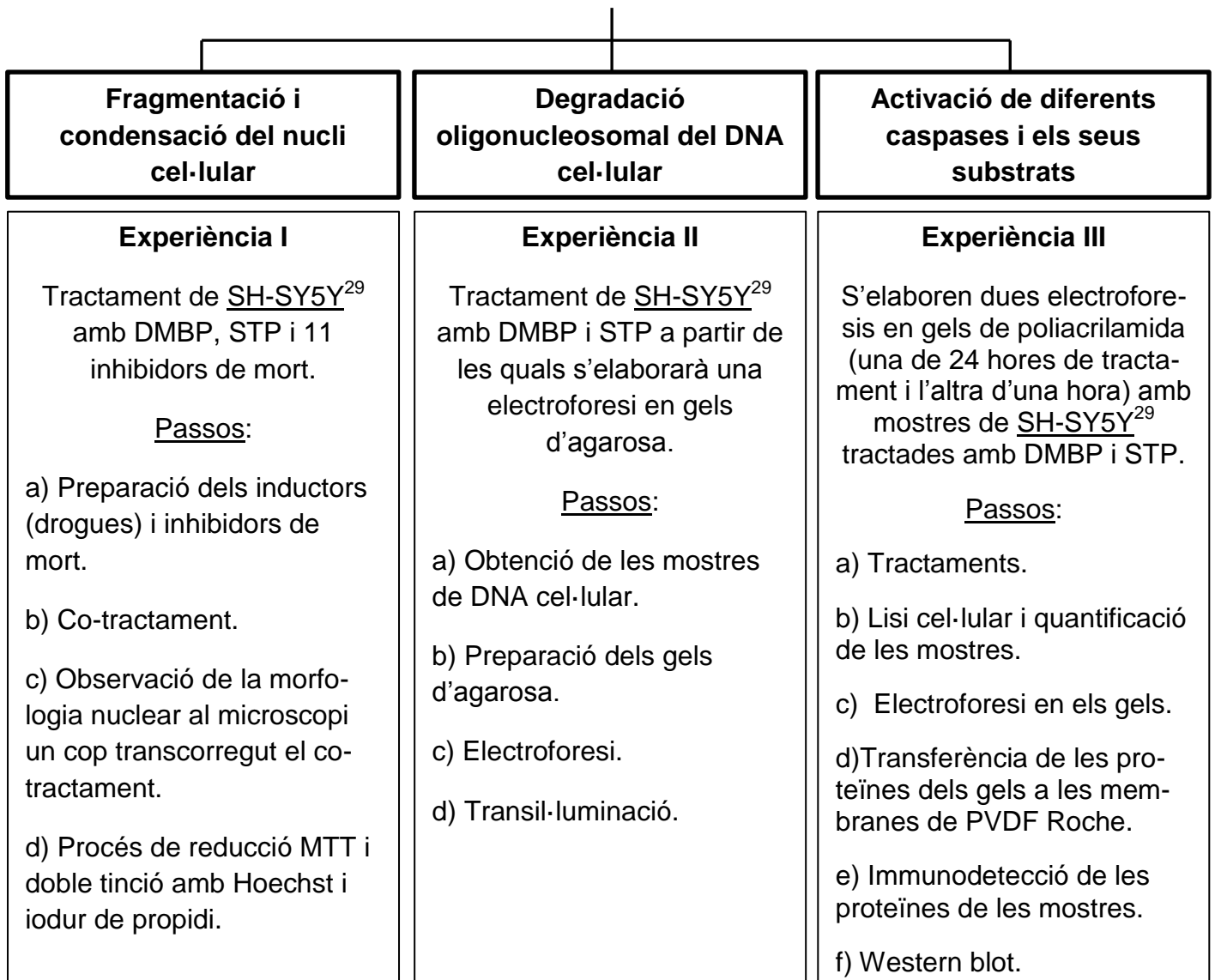
Objectiu

Donar resposta a la hipòtesi següent:

ÉS EL DMBP UN FÀRMAC INDUCTOR DE MORT APOPTÒTICA CLÀSSICA EN CÈL·LULES DE LA LÍNIA SH-SY5Y DE NEUROBLASTOMA?

Procediment

Per arribar a conclusions que permetin determinar-ne la resposta, s'analitzen les tres característiques principals (o *pathways*²⁸) que es desenvolupen a nivell cel·lular quan es desencadena un procés de mort apoptòtica clàssica.



Anàlisi dels resultats obtinguts

Conclusions i discussió final

5. INTRODUCCIÓ

L'aparició de cèl·lules tumorals és deguda a una reproducció anòmala i descontrolada de cèl·lules sanes que, al dividir-se sense control, proliferen cada cop més en l'organisme causant efectes nocius per a la salut i per el correcte funcionament de l'organisme en general.

Un dels grans problemes que presenten aquestes cèl·lules tumorals és que no pateixen el procés de mort cel·lular habitual i, com a conseqüència, no moren i s'excedeixen en nombre. Per això, la gran majoria de tractaments que s'efectuen per a contrarestar aquesta excessiva i anòmala reproducció cel·lular, com per exemple la quimioteràpia o la radioteràpia, es basen en aplicar fàrmacs, substàncies i/o radiacions que actuïn sobre les cèl·lules canceroses provocant-ne la mort i la desaparició. Aquests tractaments són molt nocius per a l'organisme ja que molts dels quals no tan sols ataca a les cèl·lules canceroses si no que també actua sobre cèl·lules sanes provocant-ne la mort o bé alteracions en el seu funcionament.

5.1. OBJECTIU

Com a conseqüència, la part pràctica d'aquest treball es basarà en demostrar si es desencadena un procés de mort apoptòtica clàssica en cèl·lules de la línia SH-SY5Y de neuroblastoma al ser tractades amb una droga concreta, el DMBP. D'aquesta manera, si és capaç d'induir un procés apoptòtic, es podrà determinar que el DMBP és un fàrmac factible en el tractament contra cèl·lules tumorals. Això significaria que, a molt llarg termini i després de posteriors investigacions sobre efectes secundaris i trastorns en l'organisme que pogués produir el fàrmac, el DMBP podria representar una alternativa als tractaments anticancerosos actuals, com la quimioteràpia i la radioteràpia, que són molt nocius i inespecífics.

El fet de centrar-nos en aquest tipus de mort en concret i no en d'altres com seria, per exemple, la necrosi, és degut a que l'apoptosi és el mecanisme de mort més estudiat i del qual es tenen més coneixements. Això permetria tenir un millor control del procés de mort de les cèl·lules canceroses i de les conseqüències que es puguin desencadenar durant el

tractament ja que, com ja s'ha esmentat, l'apoptosi és el tipus de mort habitual en cèl·lules i el més conegut funcionalment.

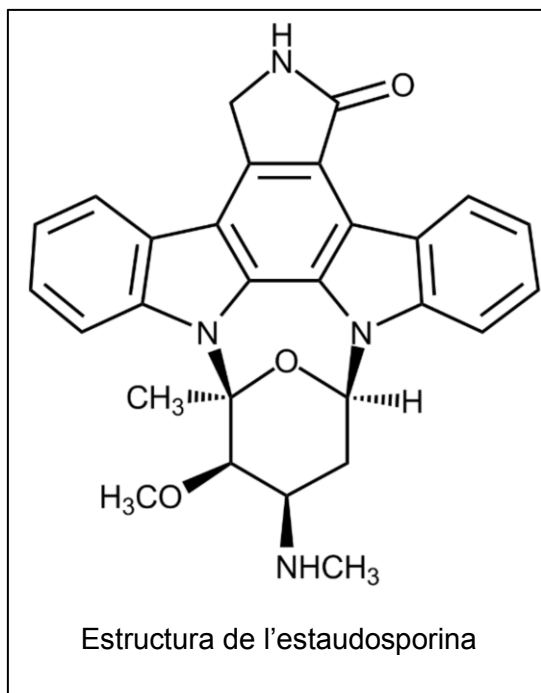
La investigació es durà a terme mitjançant l'anàlisi dels resultats de tres experiències concretes que ens permetran observar si els efectes que causa el fàrmac sobre les cèl·lules canceroses corresponen amb els tres *hallmarks*³⁰ característics de l'apoptosi clàssica. Paral·lelament als tractaments amb el fàrmac a estudiar en les diferents experiències, es farà el mateix tractament adjudicat al DMBP amb STP (staurosporine) per separat, una droga que ha estat confirmada com a inductora de mort apoptòtica clàssica en la línia cel·lular de neuroblastoma. D'aquesta manera es podran comparar els resultats de l'acció d'ambdues drogues i determinar si l'efecte del DMBP és semblant o no a l'efecte de l'STP per tal de trobar semblances i/o diferències que ens ajudin a establir si el tipus de mort que desencadena el DMBP és l'apoptosi o no.

5.2. STP i DMBP

L'STP i el DMBP són els dos fàrmacs (o drogues) utilitzats en aquesta investigació. Ambdues substàncies pertanyen al grup dels alcaloides: el DMBP és un tipus de *benzophenanthridine* *alkaloid* i l'STP és un alcaloide sintetitzat pel bacteri *streptomyces staurospores*.

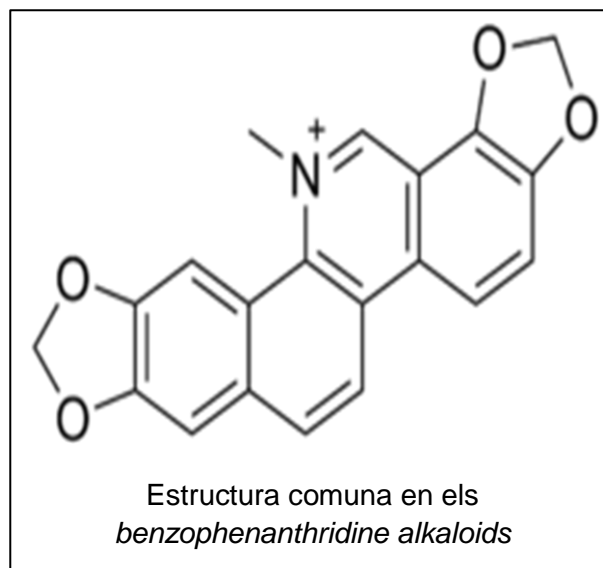
Un alcaloide és un compost orgànic nitrogenat d'origen natural, més o menys bàsic, de distribució restringida i dotat de propietats farmacològiques a baixes dosis. Poden ser sintetitzats per plantes, sintetitzats per bacteris o fongs (com és el cas de l'STP) o inclús per animals, tot i que en menor grau.

L'**estaudosporina** (STP) en concret és un alcaloide capaç de dur a terme activitats biològiques antifúngiques i ajudar a contrarestar la hipertensió. L'interès per conèixer i aprofundir en aquestes activitats que desenvolupa va conduir a un llarg i ampli procés d'investigació on es va descobrir el potencial que té en tractaments anticancerosos.



En recerca científica, l'estaurosporina s'utilitza per induir l'apoptosi cel·lular. S'ha trobat que una de les vies inductores d'apoptosi que empra és mitjançant l'activació de la caspasa-3. Malgrat això, ara per ara, el mecanisme pel qual ho fa no està del tot establert ja que encara resta dur a terme un llarg procés d'investigació.

Per altra banda el **DMBP**, és un alcaloide extret d'una planta anomenada *Chelidonium Majus L* de la família *Papaveraceae*. Els seus efectes i la seva funció són més aviat desconegudes. De totes maneres s'ha comprovat que molts tipus de *benzophenanthridine alkaloids*, com per exemple la *sanguinarine*, són capaços d'activar les vies inductores d'apoptosi. Això fa que també sigui un element desitjat per a la recerca científica. En aquesta investigació es determinarà la seva efectivitat en la inducció de mort cel·lular en cèl·lules canceroses, cosa que permetrà conèixer una mica més la seva activitat biològica i determinar si podria ser un fàrmac clínicament aplicable en tractaments anticancerosos.



5.3. EXPERIÈNCIES

Primerament es realitzarà una sembra de neuroblastomes a partir d'un cultiu inicial confluent i s'elaborarà un nou cultiu de la mateixa línia cel·lular amb les que no hagin estat sembrades. Això permetrà, respectivament, utilitzar les cèl·lules sembrades per a la investigació i mantenir la línia cel·lular de neuroblastoma per a futures investigacions.

La tasca al laboratori relacionada amb aquesta recerca es dividirà en les tres experiències següents:

EXPERIÈNCIA I

Observació de la morfologia nuclear de cèl·lules tractades amb DMBP

El primer *hallmark* a analitzar és la possible fragmentació i condensació del nucli que es dona durant el procés de mort apoptòtica clàssica. Simultàniament, es farà un segon estudi que consistirà en co-tractar les mateixes mostres amb 11 inhibidors diferents (substàncies que protegeixen les cèl·lules inhibint el procés de mort cel·lular) que permetran determinar el grau de protecció que ofereixen a les cèl·lules.

Per a dur a terme aquest experiment primer de tot s'efectuarà el co-tractament a les mostres. Un cop fet, s'observaran els nuclis de les cèl·lules mortes al microscopi i es compararà la morfologia nuclear de les mostres tractades amb DMBP i STP per tal de determinar-ne la possible fragmentació i condensació. Seguidament, s'utilitzarà la Reducció de MTT i el mètode de doble tinció.

La Reducció MTT mostra el grau de supervivència cel·lular enfront al tractament efectuat. Pel que fa al procés de doble tinció, com el seu propi nom indica, és un mecanisme format per dues tincions: el Hoechst que tenyeix els nuclis de totes les cèl·lules ja siguin vives o mortes, i la tinció amb iodur de propidi, que tansols tenyeix els nuclis de les cèl·lules mortes ja que és un colorant fluorescent que penetra en la membrana plasmàtica de les quals i s'uneix a les regions riques en timidina i adenosina de les cadenes de DNA sense produir cap efecte tòxic en l'estat de la cèl·lula.

Com a conseqüència, analitzant i comparant les imatges obtingudes en aquesta primera experiència, es podran determinar els factors següents:

- a) El grau de mortalitat que ofereix el DMBP sobre les SH-SY5Y de neuroblastoma, comparant el nombre de nuclis que s'observen entre la primera tinció, en la que es tenyeixen tots els nuclis, i la segona tinció en la que només es tenyeixen els nuclis de les cèl·lules mortes.
- b) La morfologia nuclear després del procés de mort que ha desencadenat el tractament amb DMBP. D'aquesta manera determinarem si es compleix un dels tres *hallmarks* característics de l'apoptosi clàssica.
- c) El grau de protecció que ofereixen els diferents inhibidors a les cèl·lules tractades amb el fàrmac. D'aquesta manera es coneixerà el grau d'eficiència amb què actua cada un a l'hora d'inhibir la mort cel·lular.

EXPERIÈNCIA II

Observació de la degradació oligonucleosomal del DNA

En la segona experiència el *hallmark* a observar és la degradació oligonucleosomal del DNA, la característica bioquímica més representativa de l'apoptosi, que es dona en forma d'escala (*ladder*) quan es separa i es visualitza en un gel d'agarosa.

El procediment es basarà en obtenir mostres de DNA de cèl·lules SH-SY5Y de neuroblastoma mortes, ja que hauran estat prèviament tractades amb DMBP 10 μ M i STP 1 μ M durant 24 hores.

Un cop s'hagin aconseguit, es preparen les mostres de DNA adequadament per tal de dur a terme el procés d'electroforesi³³ en gels d'agarosa³⁴. Un cop finalitzat, i havent fet el posterior procés de transil·luminació, permetrà observar aquesta possible degradació en forma d'escala del DNA.

Aquests gels d'agarosa permeten la separació i la identificació dels àcids nucleics gràcies a la migració per càrregues de les mostres en un camp elèctric, la qual ve determinada per el tamany i la conformació dels fragments de DNA. Com més degradació més migració i menys pes molecular de les mostres.

Com a conseqüència, els resultats d'aquesta segona experiència permetran observar els efectes que produeix el fàrmac en el DNA de les cèl·lules SH-SY5Y en un tractament de 24 hores i si es duu a terme la degradació oligonucleosomal en forma d'escala, un dels canvis bioquímics que es produeix en processos de mort apoptòtica clàssica.

EXPERIÈNCIA III:

Observació de la possible activació de diferents caspases

Les caspases són un tipus de proteïna que, juntament amb alguns dels seus substrats, s'activen quan es desencadena un procés de mort apoptòtica clàssica, ja sigui per via extrínseca o intrínseca.

Aquesta tercera experiència es centrarà en observar, a partir del western blot³⁵ final, la possible presència de caspases en el moment de la mort cel·lular en SH-SY5Y.

Per a dur a terme aquesta observació es farà una extracció de proteïnes en cèl·lules prèviament tractades amb DMBP i STP que provocaran la mort cel·lular. Aquest procediment és llarg, ja que està format per diferents parts que presenten un cert grau de complexitat:

Passos:

1. Primer de tot, un cop les cèl·lules han estat tractades amb les dues drogues, es duu a terme la lisi cel·lular, procés pel qual es trenca la membrana plasmàtica dels neuroblastomes i s'expulsa el contingut intracel·lular. D'aquesta manera, les proteïnes, entre elles les possibles caspases, queden lliures.
2. Un cop les proteïnes han estat alliberades, es fa una quantificació dels diferents pous on es determina la quantitat de proteïna de cada pou i els seus nivells d'absorbància.
3. Seguidament es duu a terme una electroforesi en gels de poliacrilamida³⁶ amb presència de SDS, on les proteïnes de les mostres es transfereixen als gels.
4. Un cop les proteïnes han migrat als gels, es transfereixen en membranes de PDVF Roche mitjançant un procés de transil·luminació. Seguidament, es tracten les membranes amb diferents anticossos³⁷ concrets que actuaran específicament detectant les proteïnes concretes que es volen observar al *western blot* que en aquest cas són les diferents

caspases.

5. Un cop les membranes estan a punt i l'anticòs ha actuat sobre les proteïnes s'obté el *western blot*, el film on es pot observar l'estat d'activació de les diferents caspases mitjançant l'anàlisi de les diferents bandes de proteïnes que hi apareixen en el cas de que la proteïna estigui present.

En total, es realitzaran dues extraccions de proteïnes:

A: Primera extracció

En aquesta primera extracció les algunes cèl·lules són tractades amb DMBP a diferents concentracions i altres amb STP durant 24 hores. Algunes d'aquestes mostres també es tractaran amb inhibidor³⁸ de caspasa-2 (IC2). L'objectiu és observar la possible activació de la caspasa-2, la caspasa-3, la caspasa-9 i iCAD, com també la protecció que ofereix IC2 a la inhibició de l'activació de la caspasa-2.

B: Segona extracció

En la segona extracció es fa una repetició semblant a la primera amb dues diferències: el tractament serà d'una hora enlloc de 24 i cap de les mostres serà tractada amb inhibidor de caspasa-2 (IC2). D'aquesta manera es podrà observar si els efectes del tractament amb menys durada són els mateixos o canvien respecte el de major durada, és a dir, es determinarà si la durada del tractament és o no un factor que altera l'efecte de les drogues.

6. EXPERIÈNCIA INICIAL

Sembra i manteniment d'un cultiu de neuroblastomes

Primerament, a partir d'un cultiu inicial confluent de neuroblastomes, es sembrarà una part del pèl·let de cèl·lules d'aquest cultiu per tal de poder utilitzar-les per a dur a terme les diferents experiències centrades en la investigació. Amb el nombre de cèl·lules restant, les que no han estat sembrades, s'elaborarà un nou cultiu no confluent. D'aquesta manera les cèl·lules es podran reproduir i es mantindrà la línia cel·lular de neuroblastoma en aquest cultiu.

Per dur a terme aquest procés de sembra i manteniment de la línia cel·lular, es treballarà a la sala de cultius, una sala aïllada que disposa de les instal·lacions i material necessari per a garantir el menor risc possible de contaminació de les mostres.



Sala de cultius del laboratori M2-003 de la facultat de Medicina de la UAB

Per això, abans de començar a treballar amb el cultiu, és estrictament necessari esterilitzar i desinfectar tot el material i les eines que s'empraran utilitzant etanol, que garantirà una major seguretat contra la contaminació de les mostres. És important ruixar de manera abundant el cul i el coll dels tubs, els falcons, ja que són el principal focus de contaminació.

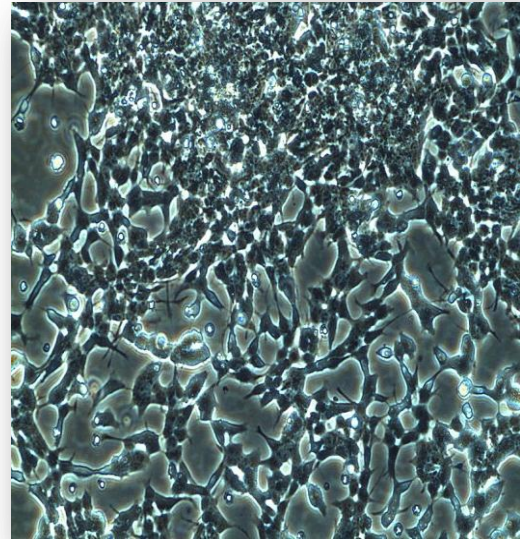
1.Preparació de les cèl·lules del cultiu per a la sembra

Primer de tot s'observa l'estat de les cèl·lules del cultiu inicial a partir del qual es durà a terme la sembra:

Dins d'aquesta placa de cultiu hi ha:

→Medi: és el medi de creixement de les cèl·lules on, entre altres substàncies, hi ha sèrum (que evita la mort cel·lular), nutrients i antibiòtics. És important mantenir-lo calent, a 37°C aproximadament.

→Cèl·lules: aquestes cèl·lules corresponen a la línia cel·lular SH-SY5Y de neuroblastoma que són les cèl·lules amb les que s'efectua la investigació.



El cultiu és confluent, és a dir, les cèl·lules que s'han anat dividint han arribat a ocupar tota la superfície de la placa i han deixat de reproduir-se per falta d'espai. També s'observa que les cèl·lules tenen una forma molt irregular. Això és degut a que estan enganxades a la placa.

Un cop observat l'estat de les cèl·lules a sembrar, es prepara el cultiu pel corresponent procés de sembra i manteniment de la línia.

Primer de tot, s'afegeix PBS a la placa, una substància detergent que té com a funció rentar la mostra de medi de creixement i, sobretot, del sèrum que el qual conté. Seguidament, amb l'ajuda de la bomba d'aspiració s'aspiren les restes de PBS, de medi i de cèl·lules mortes o soltes, és a dir, les que no es troben enganxades a la placa.

Un cop el medi ha estat aspirat, s'afegeix una solució al 0'25% de tripsina (tripsina-EDTA) a la mostra. Cal destacar que les cèl·lules de neuroblastoma són molt sensibles a aquest enzim i una quantitat excessiva de tripsina provocaria toxicitat, per tant, és molt important introduir-ne la quantitat adequada evitant excessos.

La tripsina és un enzim proteolític (Trip-EDTA) que actua com a agent calant de ions bivalents com el Ca o el Mg, els quals són presents en les unions intercel·lulars. Com a conseqüència, la tripsina és l'encarregada de trencar les unions establertes entre les cèl·lules i la placa per tal de desenganxar-les i que les quals quedin soltes. També cal tenir en compte que el sèrum és una substància que desactiva l'acció de la tripsina. Per això és necessari que durant els processos de rentat del medi amb PBS i d'aspiració, s'elimini la major quantitat possible de sèrum del medi per tal de garantir la funció de la tripsina.

Es deixa actuar la tripsina durant 1 minut a 37°C a l'incubador, temps en què la tripsina actuarà aixecant les cèl·lules, és a dir, les desenganxarà de la placa. Un cop passat aquest temps, s'afegeix de nou medi de creixement a la mostra per tal de que el sèrum desactivi l'acció de la tripsina.

Es centrifuga el falcon a la centrifugadora a una velocitat de 180xg durant 5 minuts aproximadament. Un cop acabat el procés de centrifugació, els components del falcon s'han separat de la següent manera:



Centrifugadora



Falcon

Sobrenedant: constituït per les restes de medi, de PBS, tripsina i altres substàncies de residu, situat a la part superior del falcon.

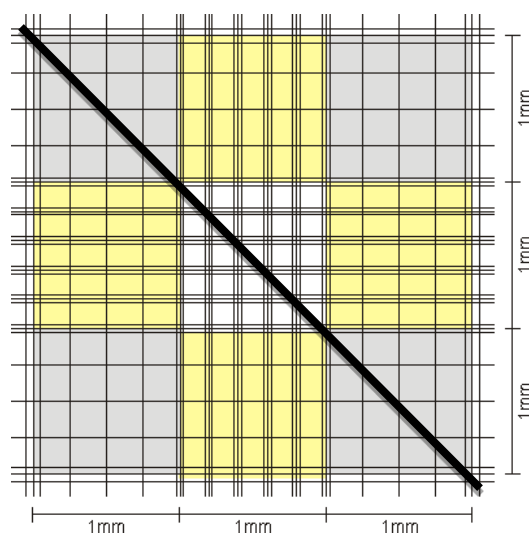
Pèl·let: format per la massa de cèl·lules del cultiu que es troba precipitat a la part inferior del falcon.

A continuació, s'aspira el sobrenedant, ja que és compost per les substàncies de rebuig. Seguidament s'introdueix medi al falcon per tal de suspendre de nou el pèl·let de cèl·lules i es transfereix el contingut del falcon a una placa. En acabar, s'observa l'estat de les cèl·lules.

En observar el pèl·let de cèl·lules al microscopi, es veu que les cèl·lules es troben separades, ja que el medi no és confluent, i que presenten forma rodona, perquè no estan adherides a la placa ja que al aixecar-se s'han desenganxat. Ara es troben soltes.

Abans de començar a dur a terme qualsevol dels dos processos a realitzar, es necessita determinar la quantitat de cèl·lules del pèl·let que es destinaran a la sembra i quina quantitat s'utilitzarà per a elaborar el nou cultiu.

Per això, primer de tot és necessari contar la quantitat de cèl·lules de les quals es disposa mitjançant una cambra de Neubauer. Una cambra de Neubauer és una placa dividida en 9 quadrants que al mateix temps estan dividits en 16 quadrats cada un, originant així 144 requadres. Malgrat això, se'n poden trobar altres dividides de maneres diferents.



Esquema que presenta una cambra de Neubauer

a) Primer es transfereix el contingut del falcon on es troben les cèl·lules a la cambra de Neubauer i s'observa al microscopi.

b) Seguidament, es procedeix a contar el nombre de cèl·lules per mL. Hi ha dues maneres possibles de fer-ho:

1. Contar les cèl·lules situades a l'interior d'un quadrant, normalment el d'un extrem. Aquest mecanisme pot originar problemes d'exactitud en el resultat, ja que podria ser que les cèl·lules es concentrassin de manera irregular a cada un dels diferents quadrants.

2. Contar les cèl·lules que es troben properes a la diagonal que divideix la placa. Aquest és el mètode més adequat, ja que no origina problemes d'imprecisió ja que la possible concentració de les cèl·lules en un punt concret no influeix.

El mètode més factible és el segon, així que es decideix contar les cèl·lules seguint la diagonal i, un cop s'ha obtingut el resultat, es determina que es destinaran 2/3 de la mostra a la sembra i 1/3 al procés de divisió cel·lular que mantindrà la línia de neuroblastoma. A partir dels càlculs pertinents fem la partició.

Un cop dut a terme tot aquest procés, es pot començar la sembra.

2.Sembra

Per a començar, es necessiten dues piscines (recipients), on en una s'hi introduirà medi de creixement i en l'altre la quantitat de cèl·lules a sembrar.

A continuació, en una placa de 96 pous s'introdueix medi i una petita mostra del contingut cel·lular a 64 pous (8x8) mitjançant una multicanal. A cada pou hi haurà un total de 100 µl de mostra a una concentració determinada més aviat diluïda.



Exemple d'una placa de 96 pous amb mostres



Exemple d'aplicació de medi de creixement a la placa mitjançant la multicanal

Un cop finalitzada la sembra, es posa la placa de 96 pous amb les mostres ja sembrades a l'incubador, en un ambient de 37°C de temperatura i a una concentració de CO₂ del 5%. Les mostres han d'estar a l'incubador mínim 24 hores (aquest temps varia en funció de la línia cel·lular amb la que s'estigui treballant), que és el temps que tarden les cèl·lules a

adherir-se a la placa de nou. Una vegada ha transcorregut aquest temps, les cèl·lules estan preparades per a ser tractades en les futures experiències de la investigació.



Incubador de la sala de cultius del laboratori M2-003

3.Manteniment de la línia cel·lular mitjançant l'elaboració d'un nou cultiu

El procés següent és dut a terme amb l'objectiu de crear un nou cultiu amb un menor nombre de cèl·lules per tal de que les quals es puguin dividir i així mantenir la línia cel·lular de neuroblastoma en aquell cultiu. D'aquesta manera s'evitarà perdre la línia.

Aquest procés és tan senzill com introduir la tercera part de les cèl·lules del cultiu confluent inicial a una placa de petri, on també s'hi introduirà medi de creixement perquè les cèl·lules puguin dividir-se en l'ambient corresponent i a una concentració determinada.

Finalment s'introdueix la placa amb el nou cultiu al congelador a una temperatura de -80°C .

7. EXPERIÈNCIA I

Observació de la morfologia nuclear de les SH-SY5Y tractades amb DMBP

Aquest experiment consisteix en observar la morfologia nuclear que presenten les cèl·lules de la línia SH-SY5Y que han estat co-tractades amb dues drogues (STP i DMBP) i amb onze inhibidors diferents (10 a estudiar i un, el QVD, que s'utilitza com a patró).

A partir d'aquí, l'objectiu final serà determinar si la droga DMBP provoca la fragmentació i la condensació dels nuclis cel·lulars d'una manera igual o semblant a la que provoca l'STP que és característica de l'apoptosi clàssica. D'aquesta manera se'n podran extreure les conclusions tan sols comparant les imatges obtingudes en ambdós tractaments. Simultàniament també es determinarà si algun d'aquests inhibidors ofereix protecció a les cèl·lules inhibint el procés de mort cel·lular que provoca el tractament amb les drogues. A més a més, també es podrà observar el grau de mortalitat que provoca el tractament amb les drogues sobre les SH-SY5Y.

Inicialment es parteix de les mostres cel·lulars de neuroblastoma sembrades anteriorment que es tractaran a la sala de cultius per evitar-ne la contaminació.

1.Preparació de les mostres

Abans de començar a treballar, cal esterilitzar amb etanol tot el material que s'utilitzarà per tal d'eliminar el risc de contaminació. També és necessari incorporar elements de protecció com ara els guants de làtex i la bata.

Primer de tot s'observa l'estat de les cèl·lules a tractar, que són les que s'havien sembrat anteriorment. Es treu la placa de 96 pous on es van col·locar les cèl·lules sembrades i s'introdueix al microscopi, on s'observa que les cèl·lules tenen forma irregular fet que garanteix que es troben adherides.

En un full en brut es fa un esquema i els càlculs pertinents de les característiques que tindran les mostres de cada pou: nom de la droga i de l'inhibidor presents, quantitat, concentració... Després, seguint aquestes dades, retolem la placa de 96 pous les característiques de cada fila i de cada columna de pous.

S'introdueix la placa a l'incubador de nou per evitar que les cèl·lules es deteriorin mentre es procedeix a preparar els diferents tractaments.

CO-TRACTAMENT DE SH-SY5Y AMB DROGUES I INHIBIDORS A 24 HORES

Controls NT	DMBP 10µM	STP 1µM
CONTROLS^(*)		
NT (cèl·lules soles) ⁽¹⁾	Control (cèl·lules i DMBP) ⁽¹⁾	Control (cèl·lules i STP) ⁽¹⁾
QVD 20µM + cèl·lules ⁽²⁾	QVD 20µM + DMBP 10µM ⁽²⁾	QVD 20µM + STP 1µM ⁽²⁾
INHIBIDORS^(**)		
ZVADfmk 50µM + cèl·lules	ZVADfmk 50µM + DMBP 10µM	-
ZFAfmk 100µM + cèl·lules	ZFAfmk 100µM + DMBP 10µM	-
Leupeptin 100µM + cèl·lules	Leupeptin 100µM + DMBP 10µM	-
Cathepsin S 50µM + cèl·lules	Cathepsin S 50µM + DMBP 10µM	-
Calpain I 50µM + cèl·lules	Calpain I 50µM + DMBP 10µM	-
Calpain II 50µM + cèl·lules	Calpain II 50µM + DMBP 10µM	-
Pepsatin A 100µM + cèl·lules	Pepsatin A 100µM + DMBP 10µM	-
TPCK 20µM + cèl·lules	TPCK 20µM + DMBP 10µM	-
AEBSF 300µM + cèl·lules	AEBSF 300µM + DMBP 10µM	-
LLF 50µM + cèl·lules	LLF 50µM + DMBP 10µM	-
ZLLnV 50µM + cèl·lules	ZLLnV 50µM + DMBP 10µM	-

^(*)En aquesta franja de la taula, totes les mostres són controls: ⁽¹⁾Són els respectius a la droga, que ens permetrien detectar alguna anomalia en el seu funcionament i ⁽²⁾són els controls amb QVD. QVD, és l'inhibidor patró, és a dir, l'inhibidor capaç d'inhibir satisfactòriament la mort apoptòtica i que, com a conseqüència, s'utilitza com a guia en la comparativa final dels resultats que s'obtenen per saber si la resta d'inhibidors ofereixen protecció.

^(**)Aquestes dues columnes pertanyen al tractament amb inhibidors: la primera són simplement controls de substrat cel·lular + inhibidor que s'utilitza per saber si l'inhibidor provoca toxicitat a les cèl·lules i la segona pertany al co-tractament en si (tractament de SH-SY5Y amb els inhibidors i la droga a estudiar).

1.1 Preparació dels inhibidors

Es retolen els empeldors amb el nom dels set inhibidors diferents i s'hi introdueix una determinada quantitat de medi a cada un segons la concentració establerta. El medi actuarà com a diluent de la mostra. Seguidament es pipeteja la quantitat exacta de l'inhibidor corresponent a cada un dels empeldors i s'aboca el contingut a l'interior.



Medi de creixement

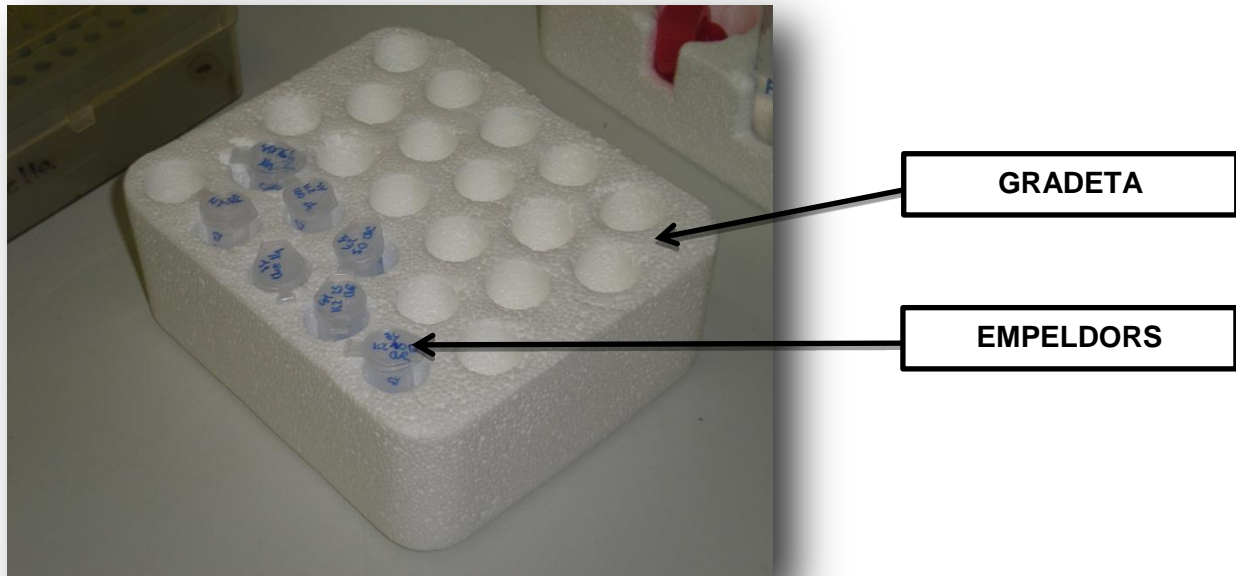
1.2 Preparació de les drogues (STP i DMBP)

Es tracten les cèl·lules amb STP i DMBP. La primera s'utilitza com a patró, ja que se sap del cert que indueix a apoptosi clàssica. D'aquesta manera permetrà saber si el DMBP provoca una morfologia nuclear característica de l'apoptosi clàssica només comparant les imatges de cèl·lules tractades amb una droga i amb l'altra.

Es preparen els empeldors afegint la quantitat de droga i de medi corresponent per a cada mostra per tal d'aconseguir la concentració desitjada en un volum total de 50 µl.

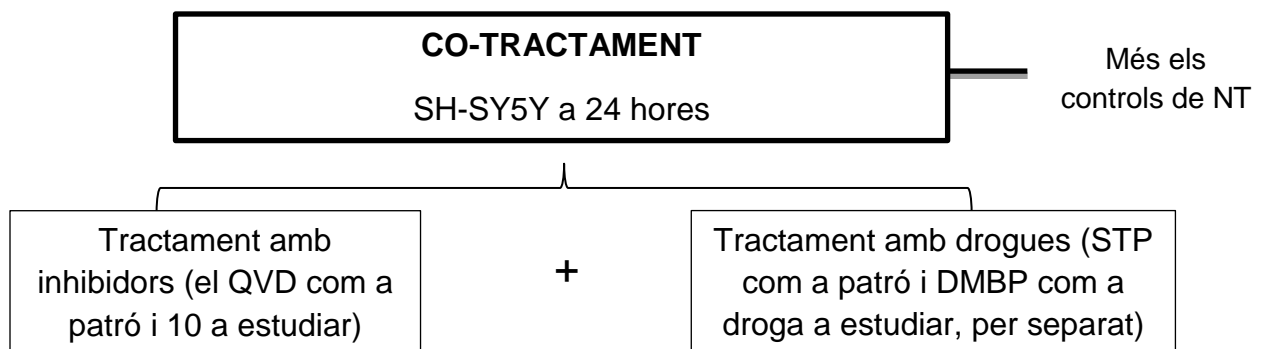
La majoria de drogues comercials (o en stock), com és el cas del DMBP, estan dissoltes en compostos químics orgànics segons les seves propietats. Per descartar que el DMSO

(compost en què està dissolt el DMBP) provoqui algun efecte sobre les cèl·lules i que, per tant, alteri el comportament de les mostres i els consegüents resultats, es fa un blanc, és a dir, una mostra amb medi de creixement i DMSO que s'utilitzarà com a control.



2. Co-tractament

Parlem de co-tractament quan una o varies mostres cel·lulars són tractades amb dos o més tractaments de forma simultània. En aquest cas, amb droga i inhibidors.



Fases del co-tractament:

2.1 Tractament amb inhibidors

El primer pas consisteix en efectuar un primer contacte entre les cèl·lules a tractar i els diferents inhibidors, cosa que permetrà una major eficàcia en la seva acció. Passos:

- Primer s'aspiren els laterals dels pous de la placa de 96 on hi ha les mostres cel·lulars per eliminar el medi del cultiu. Cal aspirar de manera igual a cada pou, de forma que, si s'aspiren cèl·lules de la mostra, es farà en quantitats semblants a cada pou.
- Es tracta la placa. Es pipeteja el contingut dels diferents empeldors, que contenen medi i inhibidor, i s'introdueix a cada un dels pous de manera que es compleixin les condicions següents:
 - Els pous corresponents als controls de no-tractat (pertinents a la primera columna de la taula de mostres que són els que no hi intervenen les drogues) han de tenir 100µl de la mostra d'inhibidor. Aquests pous, com s'ha dit anteriorment, només tenen la funció de descartar efectes de toxicitat cap a les cèl·lules per part de l'inhibidor. Per tant, la totalitat del volum de la mostra estarà format per inhibidor i el substrat cel·lular.
 - Els pous restants (corresponents al tractament amb droga) han de tenir 50µl de la mostra d'inhibidor, és a dir, la meitat que els superiors ja que després del pre-tractament amb els inhibidors, els 50 µl restants del volum de la mostra serà droga.
- Finalment, s'incuba la placa durant una hora.

2.2 Tractaments amb les drogues (STP i DMBP)

El segon pas consisteix en afegir a les mostres anteriors les dues drogues (cal destacar que cada pou només es tracta amb una droga, mai amb les dues alhora). És important que, en fer-ho, la llum de la campana de cultiu estigui apagada, ja que el DMBP és una droga fotosensible.

Passos del tractament:

- S'afegeixen 50 µl de cada una de les drogues preparades anteriorment en els pous restants, aquells que només contenen 50µl d'inhibidor. D'aquesta manera el volum de cada mostra és equivalent (100µl).
- S'introdueixen en els diferents pous fregant el lateral amb la punta de la pipeta ja que les cèl·lules es troben adherides a baix.

- S'introdueix la placa a l'incubador durant 24 hores perquè es dugui a terme el tractament.

3. Observació de les mostres al microscopi

Finalment, es realitza un assaig i una doble tinció a les mostres per poder visualitzar-ne l'estat al microscopi i d'aquesta manera determinar el grau de protecció que ofereixen els inhibidors i observar la morfologia nuclear de les SH-SY5Y després del tractament amb DMBP.

3.1 Assaig MTT

Primer de tot es realitza una reducció MTT que permetrà determinar la capacitat de supervivència de les cèl·lules enfront el tractament efectuat. Amb aquest assaig es calcula el % de supervivència de les cèl·lules a partir dels resultats que ofereix el tractament de les mostres amb el reactiu MTT, que en el cas de que hi hagi respiració mitocondrial (la cèl·lula estigui viva) formaran un precipitat violeta.

3.2 Doble tinció

La tinció de Hoechst és un colorant fluorescent que penetra a la membrana plasmàtica de totes les cèl·lules de la mostra (tan vives com mortes) i s'uneix a les regions riques en adenosina i timidina de la cadena de DNA. Un cop s'hi ha unit s'excita amb els rajos ultraviolats (UV) emetent llum blava que permet detectar-ne els nuclis.

Seguidament es farà la segona tinció amb iodur de propidi. El iodur de propidi és el colorant encarregat de tenyir només els nuclis de les cèl·lules mortes de color vermell.

3.3 Observació al microscopi

Un cop les mostres han estat tenyides es durà la placa al microscopi electrònic on s'observaran els resultats.

D'aquesta manera es podran comparar el nombre de nuclis totals de la mostra de la primera tinció amb el nombre de nuclis de cèl·lules mortes de la segona per a poder observar el grau de mortalitat que provoquen les dues drogues i la protecció que ofereixen els inhibidors a les mostres cel·lulars. Fent això, també es podrà observar la morfologia nuclear que permetrà saber si té lloc la fragmentació i la condensació del nucli.

8. EXPERIÈNCIA II

Observació de la degradació oligonucleosomal del DNA en SH-SY5Y

La següent experiència té com a objectiu observar si té lloc el procés de degradació oligonucleosomal del DNA cel·lular, un dels pathways de l'apoptosi clàssica, en cèl·lules de la línia SH-SY5Y tractades amb DMBP.

L'experiència consisteix en realitzar una electroforesi de mostres de DNA que han estat "purificades" prèviament, és a dir, han estat separades dels diferents tipus de RNA i complexos proteics que el formen, i que han estat tractades durant 24 hores amb DMBP 10 μ M i amb STP 1 μ M amb el respectiu control de no-tractat (NT).

1. Obtenció de les mostres de DNA

Es realitza un tractament de 24 hores amb les dues drogues a estudiar en cèl·lules de la línia SH-SY5Y seguint les següents pautes:

TRACTAMENT DE LES MOSTRES DE DNA

Tractament de 24 hores		
NT (Control de no-tractat)	DMBP 10 μ M*	STP 1 μ M*

**Són les concentracions estàndard de cada droga, és a dir, la concentració amb la que es treballa sempre, a no ser que es realitzi un estudi més ampli emprant diferents concentracions.*

Un cop transcorregudes les 24 hores de tractament, es prossegueix a l'obtenció de les mostres de DNA cel·lular per a dur a terme l'anàlisi amb els gels d'agarosa on migraran les mostres de DNA.

2.Preparació del gel de migració

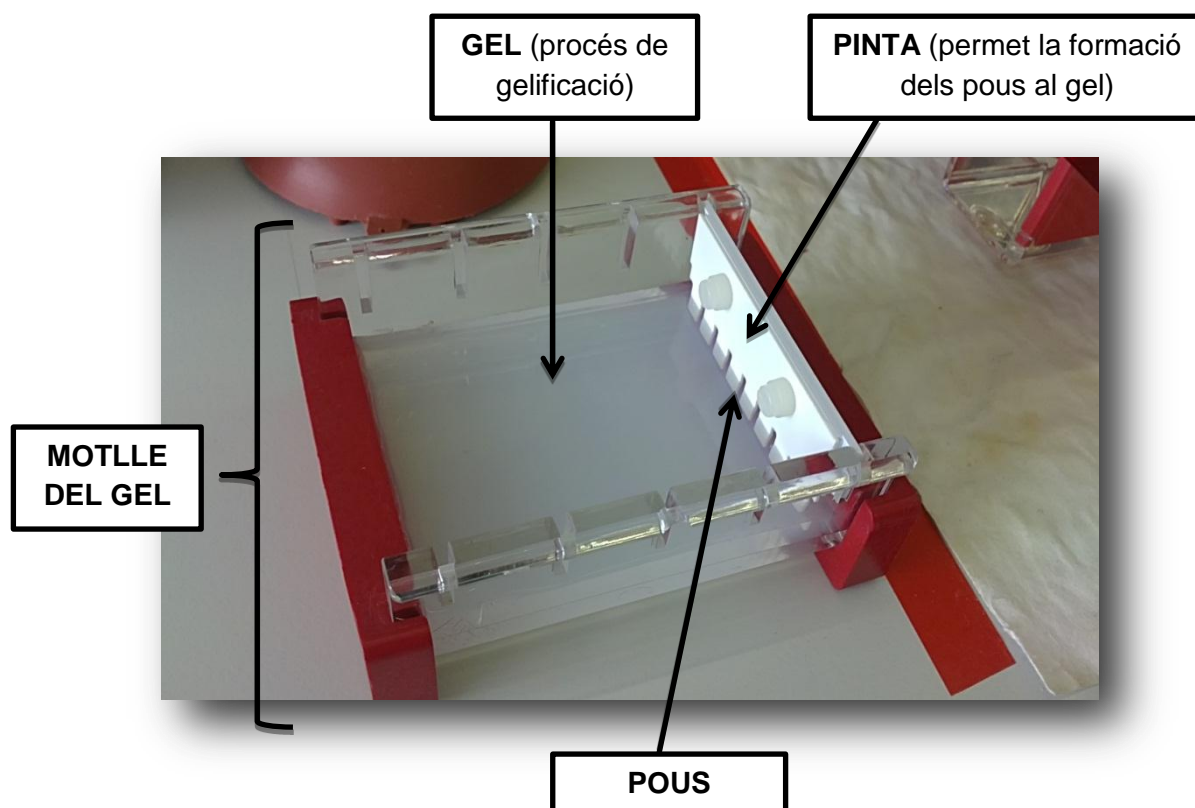
Es preparen 50mL de gel d'agarosa al 1'8% per fer córrer les mostres en l'electroforesi. Per a fer-ho, es pesa a la balança 0'9mg d'agarosa i s'introdueixen en un erlenmeyer.

Seguidament s'afegeix 50mL de tampó d'electroforesis TAE (Tris-acetat-EDTA) que és el factor que fa que la solució, sotmesa a altes temperatures, adquireixi una textura gelatinosa per formar el gel.

S'escalfa el contingut de l'erlenmeyer al microones fins que passi de ser translúcid a ser transparent. Aquest procés dura aproximadament 2 o 3 minuts. Simultàniament, és important remenar el contingut amb una vareta de vidre per tal d'ajudar a que l'agarosa es dissolgui en el tampó, ja que només és soluble en dissolvents aquosos que es troben a temperatures altes. Escalfant-ho també s'aconsegueix la textura gelatinosa necessària.

Un cop escalfat, es refreda el contingut passant aigua freda pel cul de l'erlenmeyer i agitant de tant en tant per eliminar bombolles.

Després, s'introdueix la solució a l'interior del motlle prèviament preparat segons el tamany que es desitja i amb la pinta incorporada que permetrà que es formin els pous on es carregaran les mostres. És important eliminar les possibles bombolles que es puguin formar en omplir-la.



Finalment, es deixa reposar la solució al motlle durant uns 15 minuts aproximadament perquè es gelifiqui adoptant la forma desitjada.

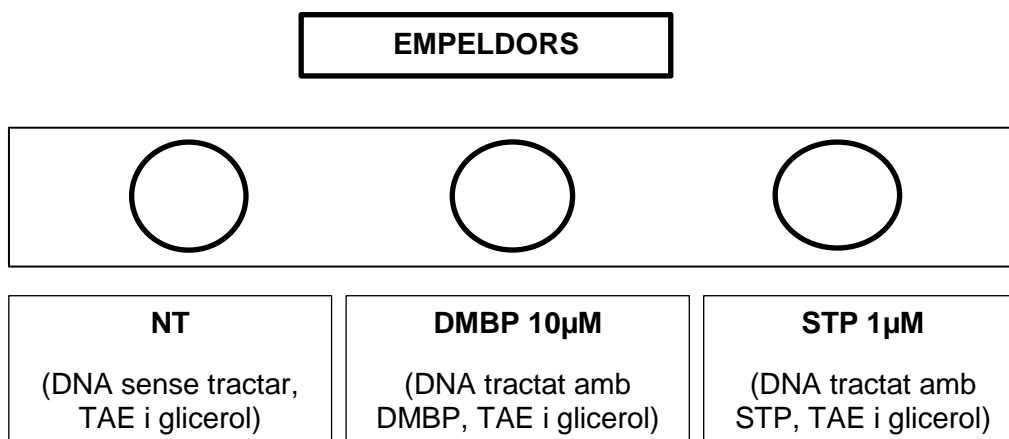
3. Electroforesi

Una vegada acabat el procés anterior es preparen les mostres de DNA ja tractades amb les drogues per a l'electroforesi.

Primer de tot, es descongelen les mostres de DNA ja obtingudes i es preparen els diferents empeldors que contindran les mostres a carregar seguint les pautes següents:

Contingut de les mostres (per empeldor)			Volum total
4 µl de la mostra del DNA cel·lular	12 µl del tampó (TAE)	4 µl de glicerol al 50%*	20 µl

*Dóna densitat a la mostra



Seguidament, s'afegeix el reactiu blau de bromofenol que tenyirà les mostres de DNA i permetrà detectar el front de l'avanç de l'electroforesi.

Un cop les mostres estan a punt, es prepara la cubeta amb els gels i les mostres per a l'electroforesi de la manera següent:

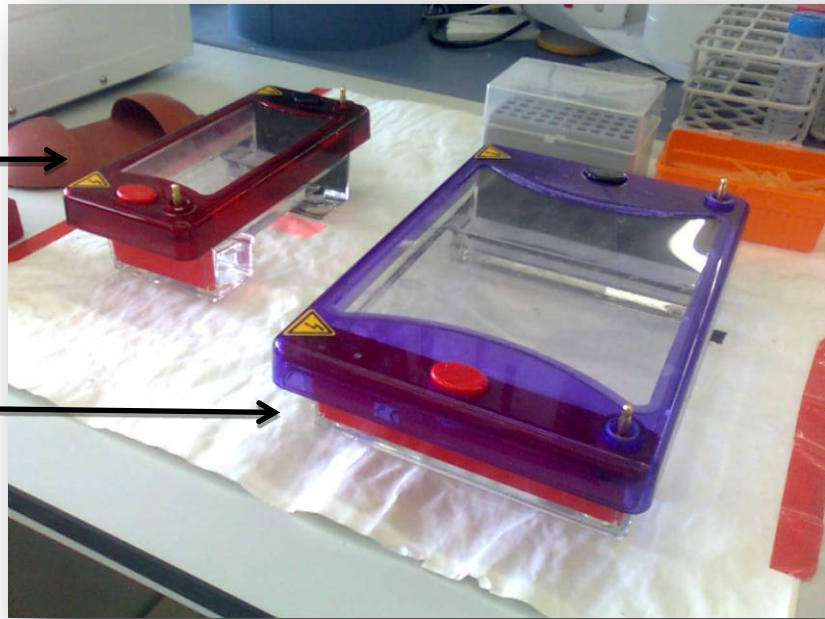
Primer es submergeix el gel a l'interior de la cubeta i s'omple de tampó TAE, el mateix que hem utilitzat per elaborar el gel. Es carreguen les mostres en els diferents pous (el contingut d'un empeldor per pou) mitjançant una pipeta i es connecta la cubeta a la font d'alimentació entre 1-10 V/cm.

Una vegada iniciada l'electroforesi, es deixen córrer les mostres de DNA durant 45 minuts fins a 2/3. El front blau originat pel blau de bromofenol indicarà el progrés de l'electroforesi.

Les mostres de DNA correran des del pol negatiu (càtode) fins el pol positiu (ànode) ja que els fosfats que constitueixen els nucleòtids del DNA tenen càrrega negativa.

CUBETA
(A l'interior hi ha el gel en remull amb el TAE)

FONT D'ALIMENTACIÓ
(Durant l'electroforesi la cubeta amb el gel s'introdueix a dins)



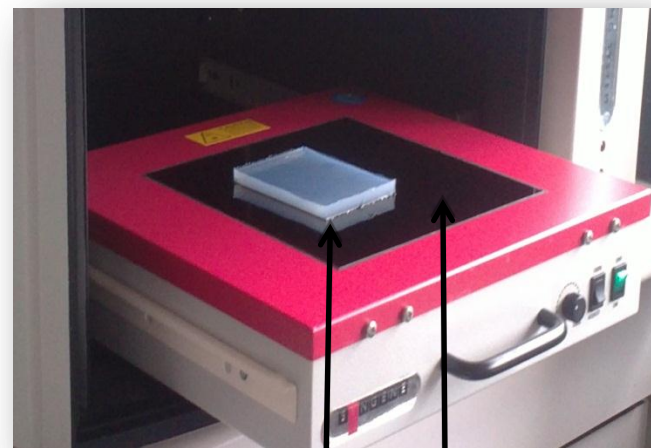
4.Obtenció de resultats

Un cop transcorreguts aquests 45 minuts es treu el gel de la cubeta i es posa en remull en un recipient que conté bromur de tidi. El bromur de tidi és un agent mutagen que s'uneix al DNA i el tenyeix. D'aquesta manera és possible detectar el DNA durant el procés de transil·luminació posterior.

Seguidament, es treu el gel del recipient amb bromur de tidi i es posa en un altre recipient en remull amb aigua per tal de netejar el gel de substàncies i residus (restes de bromur de tidi, de TAE...)

Finalment, s'extreu el gel del recipient i es duu a terme el procés de transil·luminació, on s'obtenen les imatges de l'estat de degradació del DNA de les diferents mostres. La transil·luminació és el procés que permet obtenir el film on s'observa la migració que han seguit les mostres de DNA durant l'electroforesi. En cas de degradació del DNA s'observarà una banda vertical en forma d'escala. En canvi, si no hi ha degradació, només es veurà una franja horitzontal a la part superior.

PROCÉS DE TRANSIL·LUMINACIÓ



GEL

TRANSIL·LUMINADOR

9. EXPERIÈNCIA III

Observació de la possible activació de diferents caspases

En aquesta experiència l'objectiu principal és detectar o no i amb més o menys grau d'activació, la presència de les diferents caspases i alguns dels seus substrats. Les caspases són proteïnes que, en activar-se, desencadenen processos de mort cel·lular, entre ells, l'apoptosi clàssica. Per això, si després del tractament de les mostres amb la droga, es detecten caspases activades en el contingut intracel·lular, podria ser que el procés de mort que s'ha desencadenat sigui apoptosi clàssica.

Amb aquest tipus d'extracció podem estudiar la identitat de les proteïnes, les seves possibles modificacions postraduccionals (anomalies en l'elaboració de la cadena polipeptídica) i la seva quantitat perquè els paràmetres que s'utilitzen es basen en la seqüència d'aminoàcids de les proteïnes i no requereixen la preservació de les estructures secundàries, terciàries o quaternàries.

L'extracció en si es basa en la permeabilització o trencament de les membranes lipídiques de les cèl·lules (lisi) i la posterior solubilització de les proteïnes intracel·lulars que perden la seva configuració espacial i es presenten en estructura primària (cadena aminoacídica).

En total es realitzaran dues extraccions de proteïnes que tindran les característiques i els objectius següents:

A: Primera extracció (I)

Tractament de 24 hores a diferents concentracions

En la primera extracció les mostres seran tractades amb DMBP a diferents concentracions i amb STP a concentració estàndard per tal d'observar l'estat d'activació de la caspasa-2, caspasa-3, caspasa-9 i iCAD en tots els casos. Hi haurà mostres que també s'hauran tractat amb inhibidor de caspasa-2 (IC2) cosa que ens permetrà observar el grau de protecció que aquest inhibidor ofereix.

Mostres:

Primera extracció de proteïnes						
Tractament de 24 hores en SH-SY5Y						
NT ¹ (no tractat)	DMBP 10 µM	DMBP+IC2 25 µM	DMBP+IC2 50 µM	DMBP+IC2 100 µM	IC2 ² 100 µM	STP ³ 1 µM

¹Control de no-tractat. No s'hi ha efectuat cap tractament. Permet controlar qualsevol anomalia de les cèl·lules durant el tractament.

²Control de l'inhibidor: està format per neuroblastomes més l'inhibidor de caspasa-2. En aquesta mostra es controlen els efectes de l'inhibidor sobre cèl·lules que no han estat tractades. D'aquesta manera, es pot comparar amb l'acció que duu a terme l'inhibidor en presència de les drogues i descartar efectes de toxicitat sobre les cèl·lules per part de l'inhibidor.

³El tractament amb STP només es duu a terme a concentració estàndard ja que només es fa per poder comparar els resultats d'una droga amb l'altre en el *western blot*, perquè sabem segur que el tractament amb STP hi ha activació de caspases.

B: Segona extracció (II)

Tractament de 1 hora a diferents concentracions

En aquesta segona extracció s'efectua un tractament d'una hora amb DMBP a diferents concentracions i STP a concentració estàndard sense l'inhibidor de caspasa-2 (IC2). En processos apoptòtics, l'activació de caspases a una hora de tractament no és gaire normal. Per això, a partir d'aquesta segona extracció, es podrà determinar si la possible activació de caspases és la pròpia de l'apoptosi i no la d'un altre mecanisme de mort cel·lular.

Mostres:

Segona extracció de proteïnes						
Tractament d'1 hora en SH-SY5Y						
NT (no tractat)	DMBP 10 µM	DMBP 25 µM	DMBP 50 µM	DMBP 100 µM	DMBP 150 µM	STP 1 µM

Cal tenir en compte que, com que en cada extracció es vol veure l'estat d'activació de quatre caspases diferents, les mateixes mostres s'hauran de preparar un total de quatre vegades per extracció.

Una extracció de proteïnes és un procés llarg i complex que està format per diferents parts:

1. Tractament de les cèl·lules: primer té lloc el tractament dels neuroblastomes amb els respectius fàrmacs i amb les concentracions i hores determinades (especificat en les tres taules anteriors).
2. Lisi cel·lular: procés pel qual es trenquen les membranes cel·lulars per tal d'alliberar les proteïnes i altres substàncies contingudes en el medi intracel·lular.
3. Quantificació de les mostres: procés on, gràcies a un lector de proteïnes, es determina la quantitat de proteïna d'una mostra i els seus nivells d'absorbància.
4. Electroforesi en gels de poliacrilamida: procés pel qual les proteïnes presents en cada mostra migraran en els gels.
5. Transferència de les proteïnes dels gels a membranes de PVDF Roche: les proteïnes que han migrat en els gels es transfereixen a les membranes emprant la transferència humida o *submarine method*.
6. Immunodetecció de les proteïnes mitjançant anticossos: tractament de les membranes amb diferents anticossos (compostos per un anticòs primari i un secundari) que detecten les proteïnes concretes a estudiar presents a les membranes.
7. Obtenció del *western blot*: procés on s'obté el film³⁹ amb els resultats de l'experiment. En ell s'observen les bandes de proteïnes que ens permetran determinar el seu estat d'activació per a cada mostra i per a cada caspasa a observar.

Un cop s'han esmentat els passos a seguir, s'explica el procés més exhaustivament en els següents apartats seguint l'ordre anterior.

(Malgrat haver-hi dues extraccions de proteïnes, el procediment sempre és el mateix. Per tant, s'explicarà una sola vegada i, en el cas que hi hagin variacions respecte una extracció a una altra, s'especificarà mitjançant A (primera extracció) o B (segona extracció)).

PROCEDIMENT

1. Tractament de les cèl·lules

Es comença duent a terme el tractament especificat en les taules anteriors per a A i B. En una placa de 96 pous, prèviament retolada, s'hi introdueixen les quantitats exactes de contingut cel·lular (neuroblastomes), la droga concreta, l'inhibidor si és el cas i es deixa incubar les hores que precisi el tractament. Un cop transcorregut el temps, les mostres de cada pou es traspassen als respectius empeldors prèviament retolats on hi ha medi de creixement i, finalment, es congelen.

2. Lisi cel·lular (trencament de la membrana cel·lular)

Després dels respectius tractaments de les diferents mostres, es duu a terme el procés de lisi on es trenquen les membranes cel·lulars per tal d'alliberar el contingut intracel·lular on hi ha les proteïnes.

Primer es descongelen les mostres i s'aspiren les restes de medi.

S'afegeix H₂O als empeldors per tal de diluir la mostra i facilitar l'acció del *set buffer* que s'afegirà posteriorment. Seguidament, es realitza un rentat de les mostres amb PBS (pH=7.2) per a la immediata obtenció dels substrats cel·lulars. Les proteïnes han de ser extretes de manera eficient i sense degradació per assegurar-nos una representació fidel del seu estat fisiològic en la cèl·lula viva.

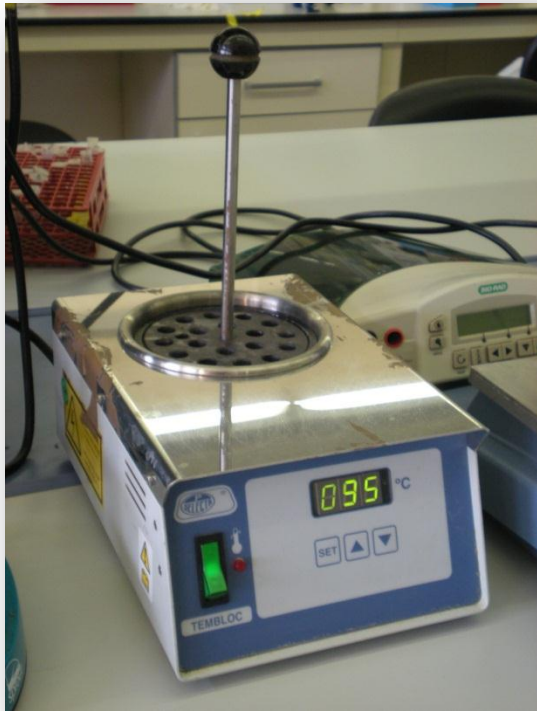
A continuació s'introdueix en els empeldors el *buffer* de lisi (o *set buffer*, *SDS*), substància que efectuarà el trencament de la membrana cel·lular i n'expulsarà tot el contingut intern per tal d'alliberar les proteïnes. Seguidament es fa un *spin* (agitació) a les mostres i s'escalfen a 100°C al termobloc durant un temps aproximat de cinc minuts. Finalment, es deixen reposar les mostres durant 10 minuts perquè es refredin i després se n'observa l'estat:

- Si la mostra presenta un aspecte totalment transparent, les cèl·lules s'han lisat completament i estan preparades per a ser utilitzades.

-Si hi ha grumolls o la mostra no presenta un aspecte regular significa que les cèl·lules no s'han lisat o bé que no ho han fet completament. En aquest cas cal tornar a escalfar les

mostres a 100°C durant cinc minuts i tornar a fer un *spin*. Llavors les mostres haurien de presentar un aspecte homogeni i regular.

Un cop s'ha assegurat que el procés de lisi s'ha dut a terme completament, amb la punta d'una pipeta es pipeteja el contingut de la mostra per tal que perdi viscositat.



Termobloc

Aparell on s'escalfen les mostres. S'introdueixen els empeldors als forats de la part superior i es deixen el temps necessari a una temperatura concreta.



Spinner

Aparell on s'agiten les mostres. S'introdueixen els empeldors als forats, es baixa la tapa i es selecciona la velocitat màxima prement el botó negre. Un cop comença a girar, es deixa el temps necessari fins que es para.

A partir d'aquí les mostres ja estan a punt:

- ✓ La membrana cel·lular s'ha trencat gràcies a l'acció de l'SDS i com a conseqüència les proteïnes s'han alliberat. Per tant, ja poden ser detectades.
- ✓ Les mostres han estat adaptades per a ser carregades després d'eliminar els grumolls i reduir-ne la viscositat.

3. Quantificació de les mostres

Seguidament es preparen les mostres per dur a terme el procés de quantificació de proteïnes, procés pel qual es determina la quantitat de proteïna present en cada mostra i els seus nivells d'absorbància.

En una placa de 96 s'afegeix en els diferents pous el reactiu que té com a objectiu tenyir les mostres de color blau per tal de que el lector de proteïnes pugui detectar el substrat proteic de les diferents mostres.

Aquest reactiu forma part d'un *kit* de quantificació de proteïnes comercial format per dos reactius que completen la funció: el reactiu A i el reactiu S. La tinció es duu a terme afegint als diferents pous una mescla elaborada amb els dos reactius. Aquesta mescla per ser efectiva ha de complir una proporcionalitat concreta: per cada 2µl de S n'hi ha d'haver 100µl d'A segons el volum total de reactiu que es necessita per a les mostres. Aquest *kit* detecta les proteïnes de les mostres tenyint-les de blau de manera que, al introduir-les al lector de proteïnes, són reconegudes i se'n determina la quantitat.

Un cop el reactiu es troba als pous, s'afegeix 1µl de les mostres proteiques obtingudes anteriorment a cada un dels pous i, per facilitar-ne l'acció, s'introdueix la placa a l'incubador durant uns 30 minuts.

Un cop han transcorregut aquests minuts, s'introdueix la placa al lector de proteïnes i se'n fa la quantificació.



Lector de proteïnes

S'introdueix la placa de 96 pous amb les mostres i se'n determina la quantitat de proteïnes i els seus nivells d'absorbància gràcies al reactiu que les tenyeix de blau.

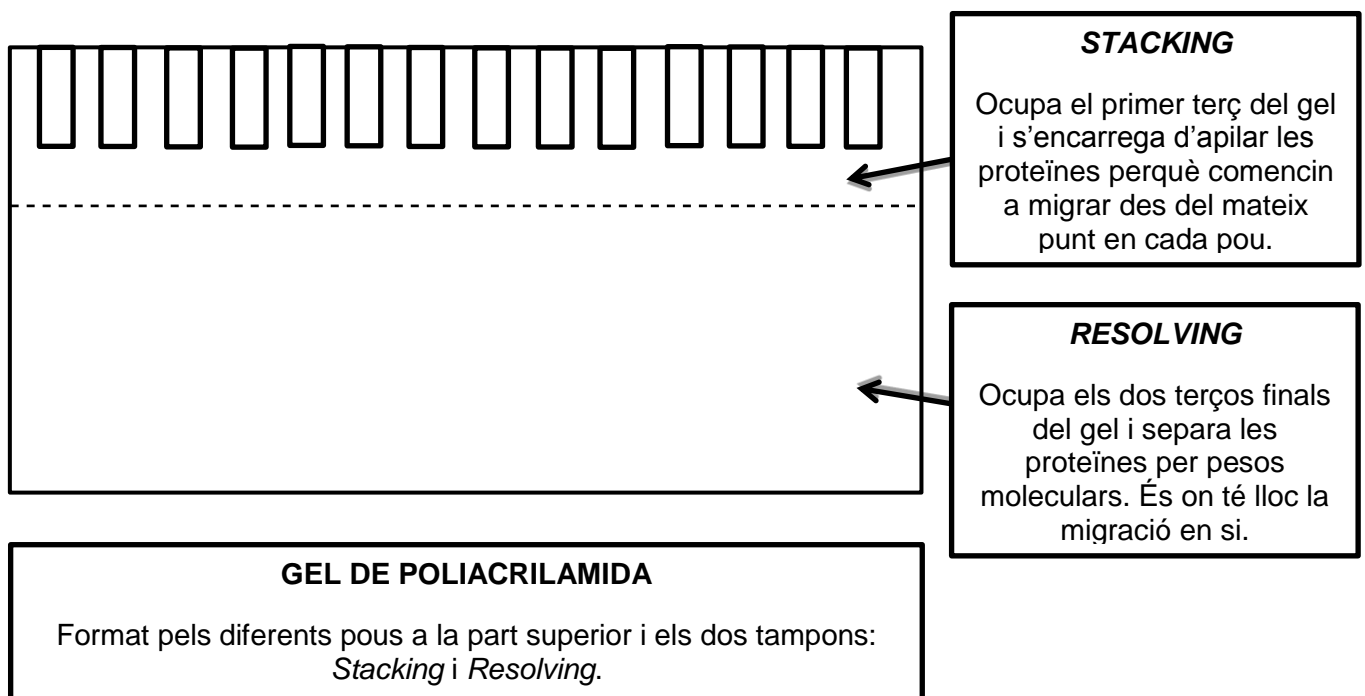
Placa de 96 pous

4. Electroforesi en gels de poliacrilamida

Per detectar les mescles complexes de proteïnes presents a les mostres s'utilitza l'electroforesi en gels de poliacrilamida amb presència de SDS (substància que s'encarrega de desnaturalitzar les proteïnes amb configuració espacial). Aquests gels es formen per la polimerització de l'acrilamida un cop tots els seus components s'han mesclat i gràcies a l'acció d'un agent *cross-linking* (la bis-acrilamida), un iniciador i un catalitzador. Degut a aquests components i al posterior procés de polimerització⁴⁰ que desencadenen, les mescla inicial esdevé gelatinosa.

Generalment, per a aquest tipus d'electroforesi s'empra el sistema discontinu o de dos tampons que permet la separació de volums relativament grans de mostra i sense pèrdua de resolució. Aquests dos tampons, que formen un mateix gel, tenen una funció diferent i alhora molt concreta:

- El primer tampó, l'**Stacking**, assegura la migració de totes les proteïnes en el front de migració, és a dir, és l'encarregat d'apilar tot el substrat proteic de les mostres carregades en els fronts de migració perquè comencin a migrar des d'un mateix punt.
- El segon tampó, el **Resolving**, és el que realment separa les proteïnes per pesos moleculars, ja que es considera que la separació en si comença quan el front de migració traspasa la frontera entre el primer i el segon tampó.

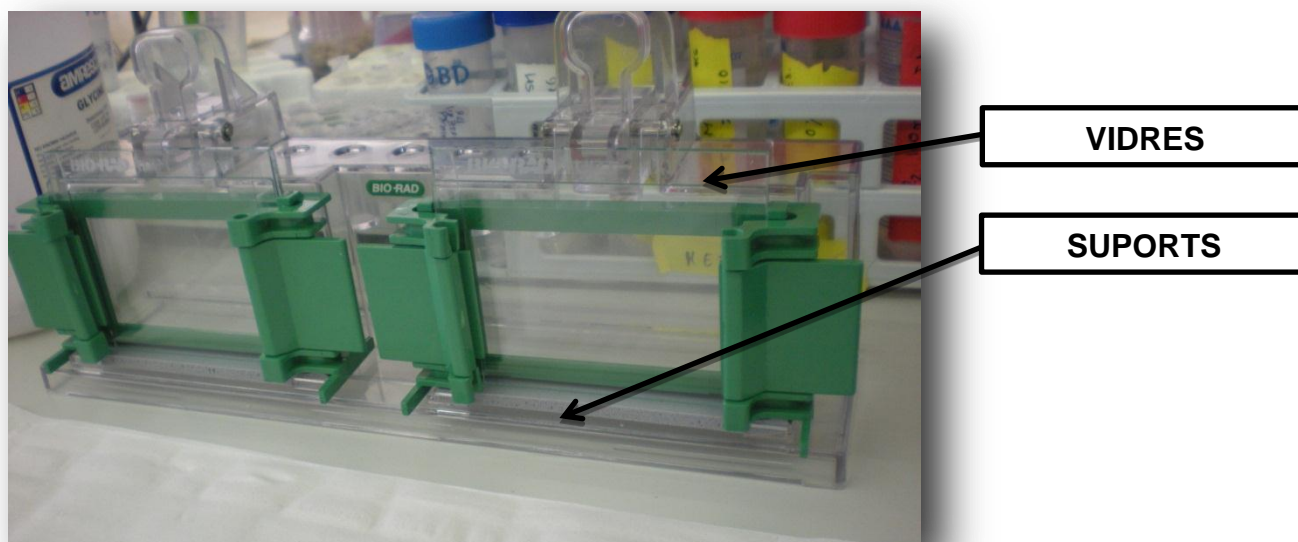


L'electroforesi es realitza en cubetes MINI-PROTEAN, a amperatge constant i amb l'interior ple de tampó de transferència (TRIS-Glicina-SDS).

A continuació s'expliquen més detalladament els passos que cal seguir per a dur a terme l'electroforesi:

4.1 Preparació dels gels

Primer de tot es netegen els suports i els vidres amb aigua destil·lada i, seguidament es munten els dos motlles que es necessitaran encaixant correctament els dos vidres que formen cada motlle, el prim i el gruixut, en el suport. Es comprova que no vessin omplint-los amb aigua i buidant-los posteriorment.



Motlles dels gels

Com s'ha esmentat anteriorment, cada un dels gels està format per dos components: l'*Stacking* i el *Resolving*.

L'*Stacking* és el component que es situa a dalt, ocupant 1/3 del total del gel. Té com a funció apilar les proteïnes, és a dir, centrar-les de manera que quan comencin a córrer des d'un mateix punt i en una mateixa direcció, ja que si surten des de diferents punts no es pot fer un anàlisi i comparació dels resultats, és a dir, el gel no és vàlid.

El *Resolving* és el component que es situa a la part inferior del gel ocupant-ne els 2/3 restants. Té com a funció separar les proteïnes segons el seu pes molecular, de manera que fa que les de major pes es situïn a la part superior de la part del gel ocupada pel *Resolving* i les de menor pes molecular a la part inferior. És el component més abundant del gel, ja que és el tampó on comença i es produeix la migració en si (l'*Stacking* només apila les mostres en el front de migració).

COMPOSICIÓ DELS TAMPONS	
<i>Stacking</i> (5% X2)	<i>Resolving</i> (15% X2)
8'333µl d'acrilamida al 30% 1'4mL de Tris 1M de pH 8'8 2'687mL H ₂ O milliQ 50mL de SDS al 10% Catalitzadors*: 25µl d'APS al 10% i 5µl de TEMED	5mL d'acrilamida al 30% 1'250mL de Tris 3M de pH 8'81 3'595 mL d'H ₂ O milliQ 100µl de SDS Catalitzadors*: 50µl d'APS al 10% i 5µl de TEMED

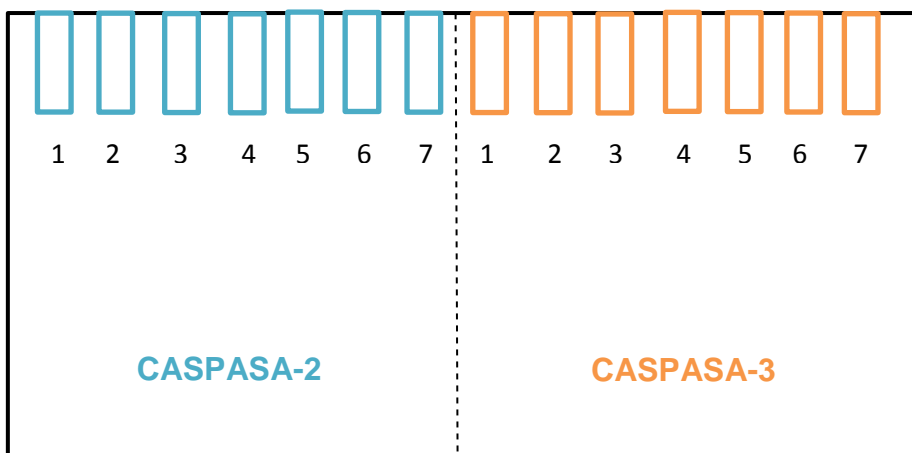
*Els respectius catalitzadors⁴¹ de cada component, l'APS i el TEMED, són els encarregats de donar lloc a una reacció de polimerització que fa que s'uneixin els diferents monòmers i, com a conseqüència, que els gels adquireixin la textura gelatinosa desitjada.

Es preparen els dos components seguint les seves respectives composicions i s'introdueixen a l'interior dels motlles, primer el *Resolving* a la part inferior i després l'*Stacking* a la part superior. Entre el *Resolving* i l'*Stacking* s'afegeix amb una pipeta un solvent orgànic que pot ser etanol, propanol... Aquest tindrà com a funció alinear el límit del *Resolving* perquè polimeritzi bé i en línia recta sense bombolles. Es deixa reposar durant 20 minuts i s'afegeix l'*Stacking*.

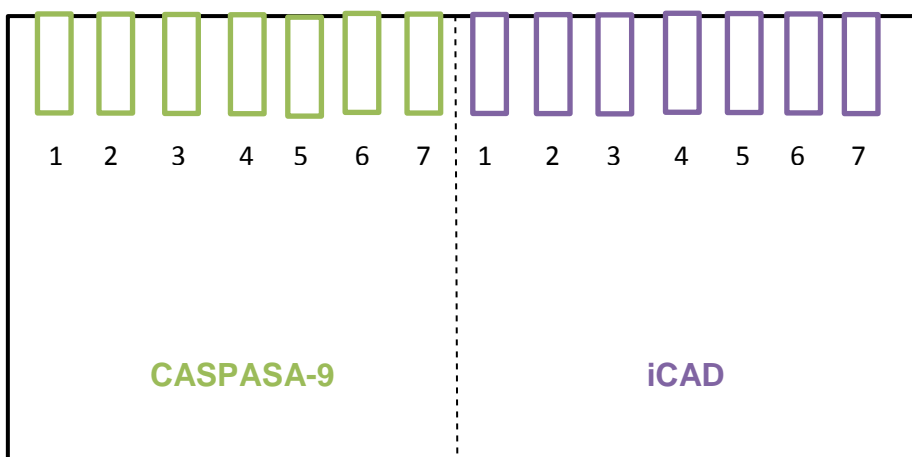
4.2 Càrrega de les mostres en els gels

Seguidament es prepara la càrrega de les mostres en els gels seguint els esquemes anteriors en funció de quina extracció es tracti. Com que es vol veure l'estat d'activació de quatre caspases diferents, caldrà carregar les mateixes mostres quatre vegades, un per a cada caspasa.

Extracció A: es carreguen les set mostres quatre vegades en dos gels diferents

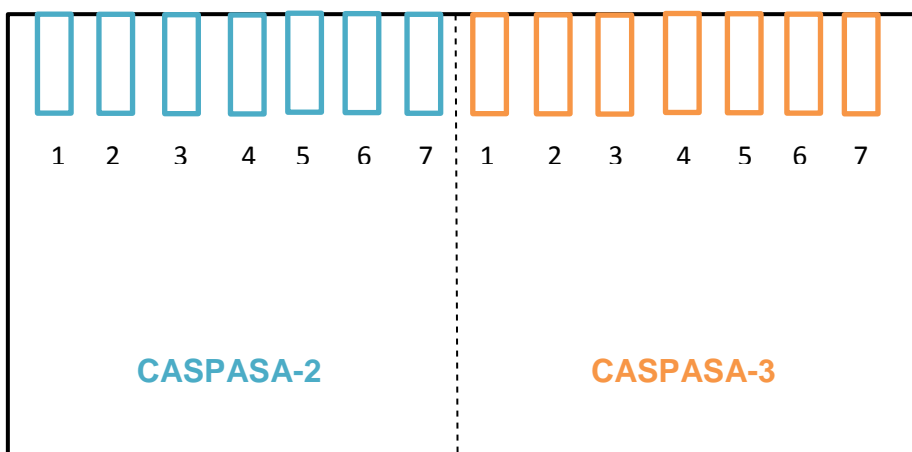


1. NT (no-tractat)
2. DMBP 10 μ M
3. DMBP+IC2 25 μ M
4. DMBP+IC2 50 μ M
5. DMBP+IC2 100 μ M
6. IC2 100 μ M
7. STP 1 μ M

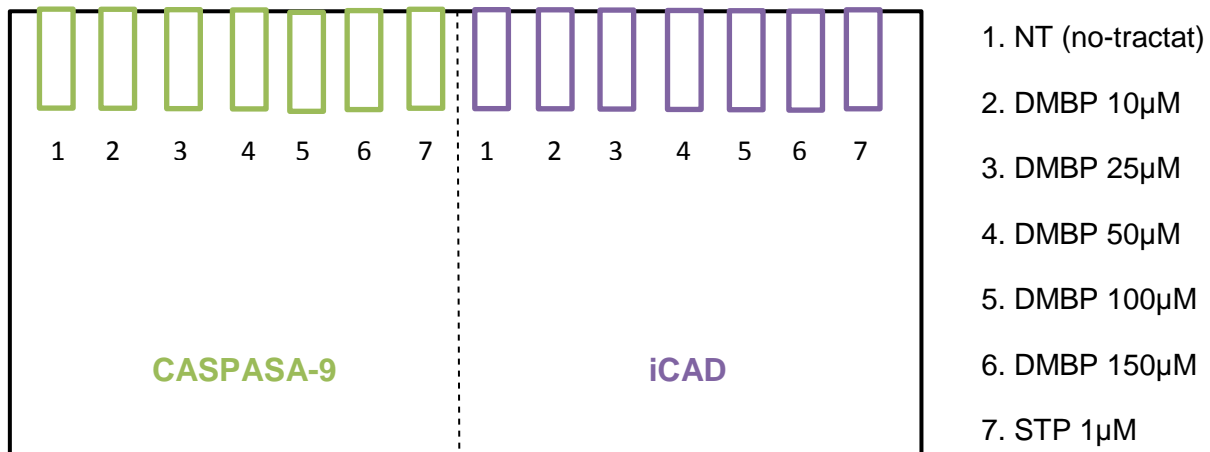


1. NT (no-tractat)
2. DMBP 10 μ M
3. DMBP+IC2 25 μ M
4. DMBP+IC2 50 μ M
5. DMBP+IC2 100 μ M
6. IC2 100 μ M
7. STP 1 μ M

Extracció B: es carreguen les set mostres quatre vegades en dos gels.



1. NT (no-tractat)
2. DMBP 10 μ M
3. DMBP 25 μ M
4. DMBP 50 μ M
5. DMBP 100 μ M
6. DMBP 150 μ M
7. STP 1 μ M



Pas1: Primer de tot es preparen les mostres per a carregar:

En empeldors buits s'hi introdueix primer el *loading buffer* (tampó de càrrega) 5X i després una quantitat concreta del mateix tampó 1X. És la mateixa substància amb diferent concentració per tal d'aconseguir que totes les mostres tinguin el mateix volum (20µl).

El *loading buffer* és el tampó de transferència que s'utilitza perquè les mostres es transfereixin en el gel i es pugui dur a terme el procés de migració. Està compost per:

- DTT: una substància desnaturalitzant que trenca els ponts disulfur que s'estableixen en la configuració de les proteïnes.
- SDS: un detergent iònic que fa que les proteïnes adquireixin càrrega negativa i migrin cap al pol positiu.
- Glicerol: dóna densitat a les mostres.
- Colorant blau: permet visualitzar el front d'avanç de la migració.

Pas 2: Seguidament s'introdueixen als empeldors les mostres de proteïnes. Per preparar les mostres cal seguir les taules de quantitats següents:

EXTRACCIÓ A: Taula de quantitats				
	5X	1X	Mostra proteica (ja conté IC2)	Volum total (aproximat)
Blanc ¹	--	15µl	5µl	20µl
NT	1µl	16µl	3'0µl	20µl
DMBP 10µM	1µl	17µl	2'6µl	20µl
DMBP+IC2 25µM	1µl	17µl	2'4µl	20µl
DMBP+IC2 50µM	1µl	17µl	2'4µl	20µl
DMBP+IC2 100µM	1µl	17µl	2'4µl	20µl
IC2 100µM	1µl	17µl	2'4µl	20µl
STP 1µM	1µl	16µl	3'2µl	20µl

¹El blanc és només un control, no es carrega en els gels. En aquest cas es controla que el *buffer* de transferència no alteri l'estat de les proteïnes.

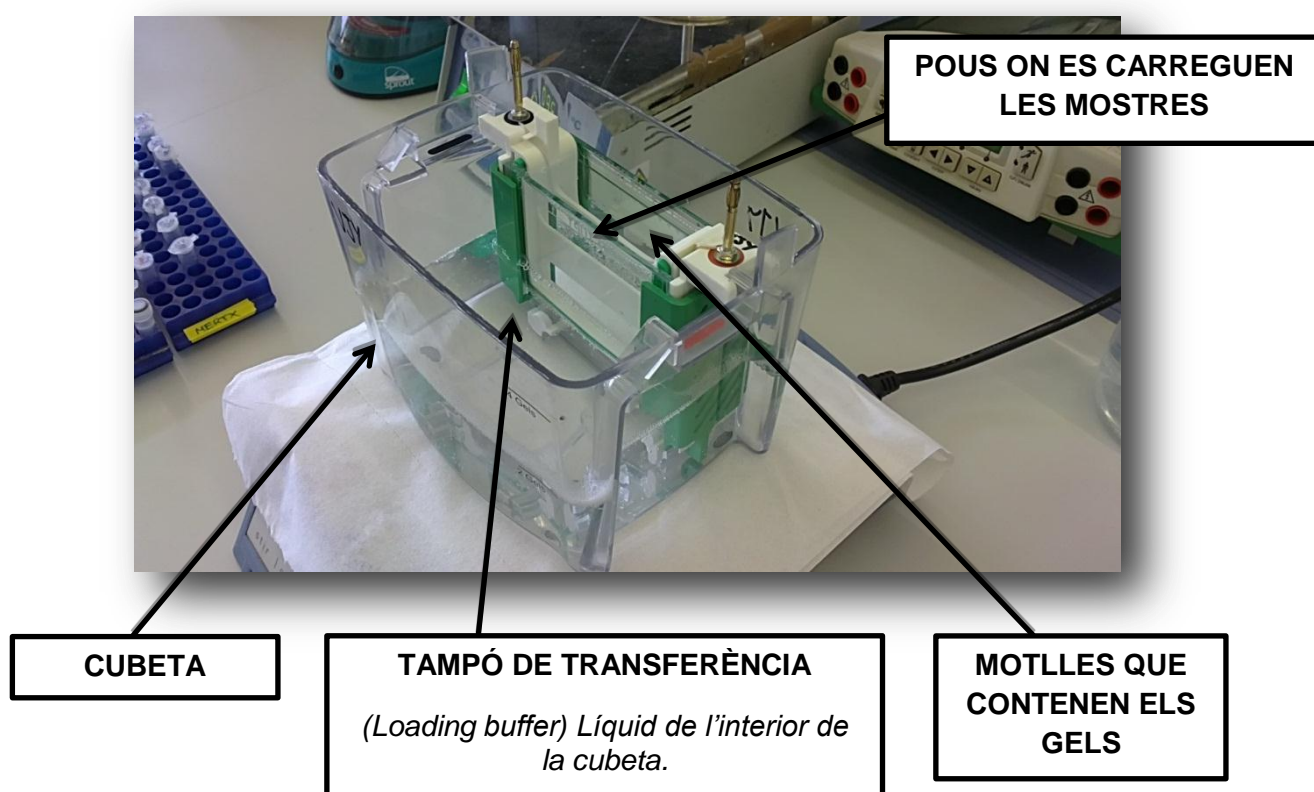
EXTRACCIÓ B: Taula de quantitats				
	5X	1X	Mostra proteica	Volum total (aproximat)
Blanc ¹	--	15µl	5µl	20µl
NT	1µl	16µl	3'0µl	20µl
DMBP 10µM	1µl	17µl	2'6µl	20µl
DMBP 25µM	1µl	17µl	2'4µl	20µl
DMBP 50µM	1µl	17µl	2'4µl	20µl
DMBP 100µM	1µl	17µl	2'4µl	20µl
DMBP 150µM	1µl	17µl	2'4µl	20µl
STP 1µM	1µl	16µl	3'2µl	20µl

¹El blanc és només un control, no es carrega en els gels. En aquest cas es controla que el *buffer* de transferència no alteri l'estat de les proteïnes.

Un cop les mostres ja estan preparades es fa un *spin* als empeldors per tal de desenganxar possibles components de la mostra que s'hagin pogut adherir a les parets i, després, es posen a escalfar a 100°C al termobloc durant uns cinc minuts. Cal que els empeldors tinguin un forat a la part superior. Si no el tenen, es fan amb una agulla abans d'introduir-los al termobloc. Un cop transcorreguts aquests minuts, es fa un altre *spin* a les mostres.

Pas 3: Les mostres ja estan preparades per a ser carregades, de manera que ara toca preparar la cubeta i carregar les mostres per tal de començar amb la transferència de les proteïnes als gels.

Primer de tot s'introdueix el suport on hi ha els motlles amb els gels a l'interior de la cubeta. Abans però, es renten amb aigua destil·lada les restes d'acrilamida dels gels i s'omple la cubeta de *running buffer*, omplint primer, la part interior dels dos gels de manera que, quan vessi, s'omplirà la resta de la cubeta. La quantitat de *loading buffer* a la cubeta és específica segons el nombre de gels amb què es treballi. De manera que, com que en aquest cas s'està treballant amb dos gels, el nivell de *loading buffer* ha d'arribar a la línia que especifica la quantitat per a dos gels.



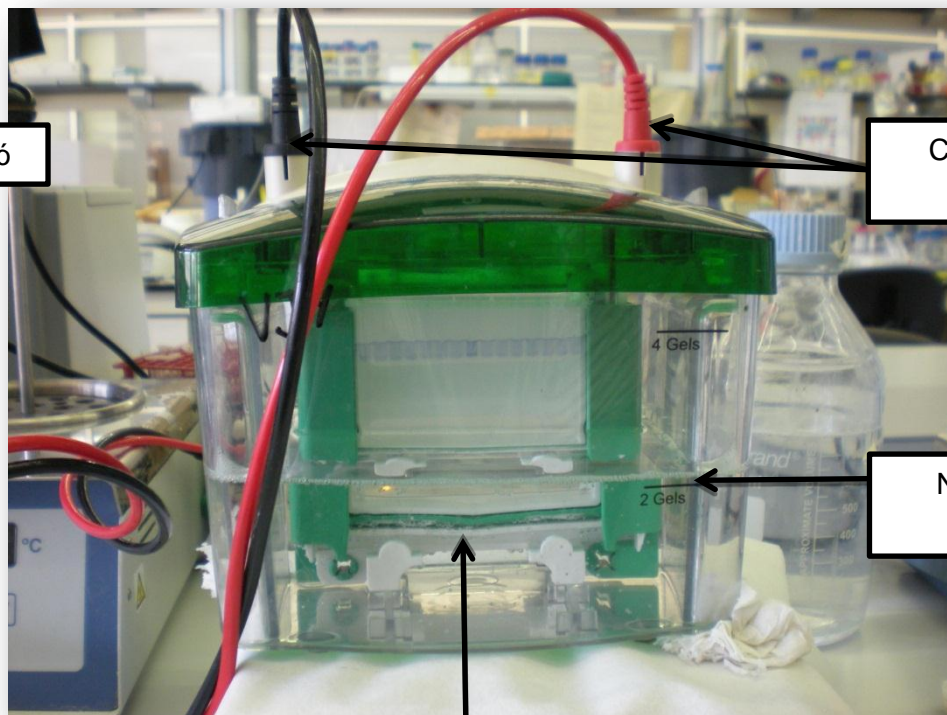
Un cop la cubeta està a punt es prossegueix a carregar les diferents mostres en els pous quatre vegades seguint els esquemes esmentats al principi. Es pipetegen 20µl de la mostra dels empeldors i amb molt de compte s'introdueixen en els diferents pous dispersant lentament i amb molt de compte amb la pipeta.

Un cop s'han carregat totes les mostres es tapa la cubeta i s'endolla a la font d'alimentació (0'05A, 5W i a voltatge variable).

4.3 Migració de les proteïnes en els gels

Un cop s'ha endollat la font d'alimentació comença el procés de migració de les proteïnes en els gels. Les proteïnes corren des del pol negatiu (a dalt) cap el pol positiu (a baix) gràcies al detergent iònic del *loading buffer* (SDS) que fa que les proteïnes hagin adquirit càrrega negativa. Aquest procés de migració dura aproximadament una hora, el final del qual ve determinat per l'avanç del front de franges blaves originat pel colorant blau del *loading buffer*. Quan aquest front traspasa el límit dels suports dels gels, el procés de migració ha finalitzat.

Migració de les proteïnes en els gels



Sentit de migració

Pol +

Pol -

Connexió a la font d'alimentació

Nivell a 2 gels de *Loading buffer*

Un cop acabada la migració el front de color blau hauria de passar per aquí sota

Al cap d'una hora aproximadament, quan el front ha traspassat els suports dels gels, es desendolla la font d'alimentació i es treuen els suports separant-los de la cubeta.

Seguidament, es treu el *running buffer* de la cubeta i s'introdueix en un recipient per tal de reciclar-lo. Es neteja la cubeta i els suports amb aigua destil·lada per eliminar les restes de

running buffer. També es renten els gels tirant aigua milliQ⁴² amb una xeringa a la seva superfície.

5. Transferència de les proteïnes dels gels a membranes de PVDF Roche

A continuació es transfereixen les proteïnes dels gels a les membranes de PVDF Roche que, després del posterior tractament de les quals amb anticossos, permetran observar l'estat d'activació de les diferents proteïnes que volem estudiar en el *western blot*.

Aquestes membranes de PVDF Roche són fragments rectangulars d'uns 10x7 cm aproximadament, semblants a una cartolina, formades per un tipus de paper constituït per un polímer⁴³ apolar que permet la fixació de les proteïnes del gel un cop han estat activades.

Passos a seguir:

5.1 Activació de les membranes

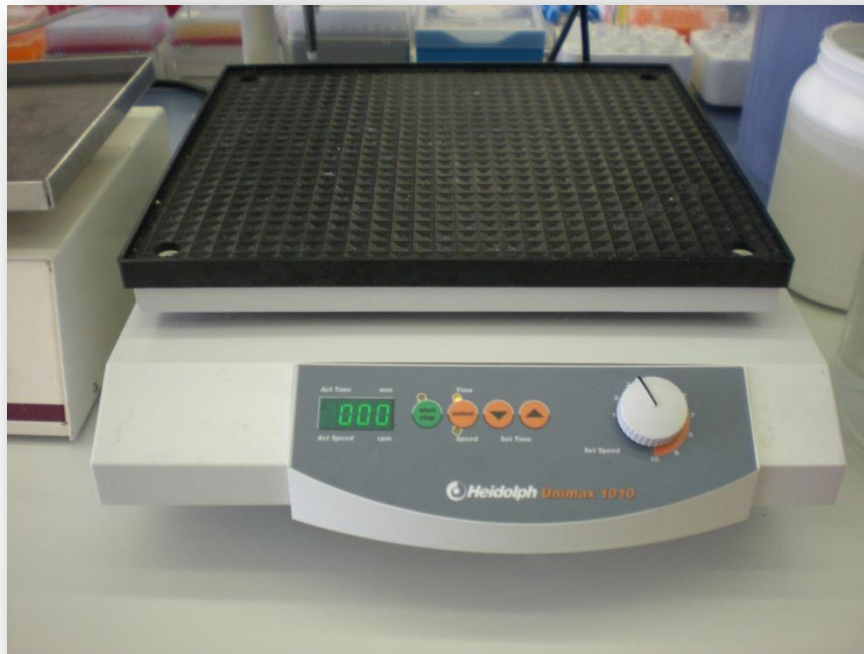
**Activació de les
membranes**

Primer de tot s'activen les membranes que s'utilitzaran introduint-les en dos recipients prèviament retolats amb el nom de la proteïna que determinaran i s'efectuarà el primer rentat amb metanol 100%. El metanol és l'agent que farà que les membranes (apolars) esdevinguin polars per a poder interaccionar amb l'aigua posteriorment.

Seguidament, en els mateixos recipients i després de netejar-los de metanol, es fan uns quants rentats (uns tres o quatre) amb aigua milliQ per tal d'hidratar-les fins que la membrana adquireixi una forma corbada. Simultàniament a l'execució d'aquests rentats és important anar girant la membrana, de manera que les dues cares estiguin en contacte amb l'aigua. Aquests rentats fan que, al corbar-se les membranes, les proteïnes s'adhereixin millor a elles i es puguin hidratar després d'haver estat en contacte amb metanol.

A continuació s'efectuen tres rentats de cinc minuts cada un amb *buffer* de transferència al *shaker*.

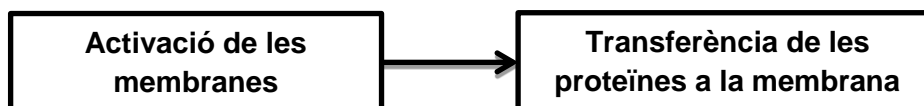
És molt important que les membranes es mantinguin sempre molles o en remull durant aquest procés d'activació, ja que si no perden funcionalitat i els resultats són erronis o imprecisos.



Shaker

Els recipients amb les membranes i el *buffer* de transferència es col·loquen a la “safata” de la part superior i es sacsegen durant el temps desitjat.

5.2 Transferència de les proteïnes a la membrana

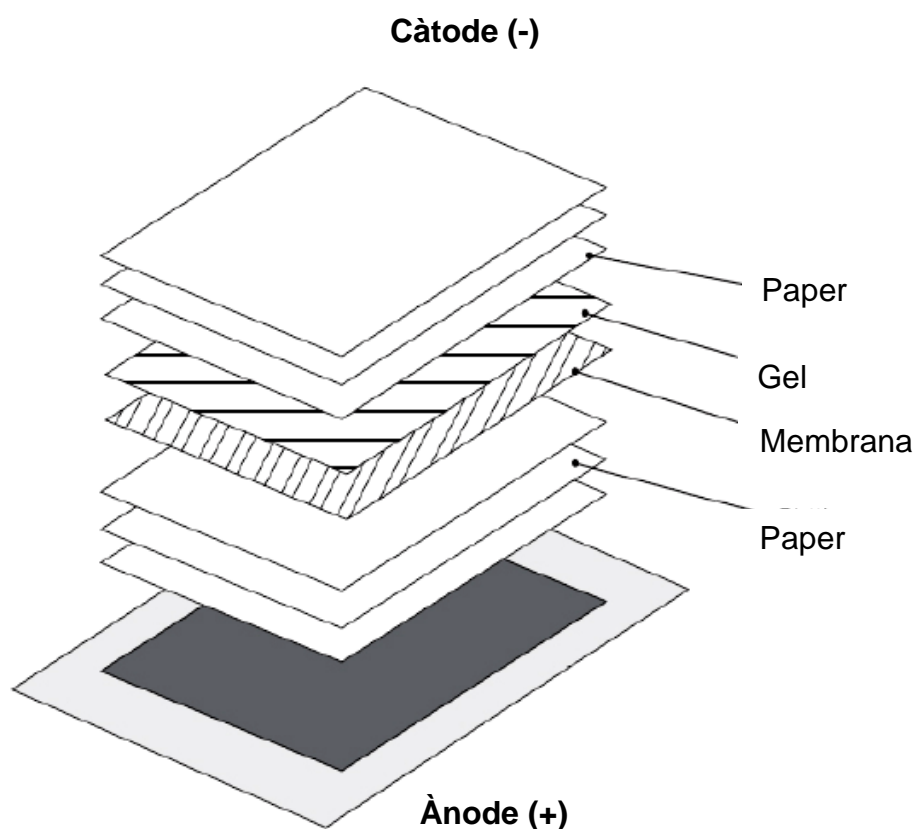


Un cop fet això les membranes estan activades i es procedeix a la transferència de les proteïnes dels gels utilitzant l'anomenat “*submarine method*” o la transferència húmida. Per a fer-ho, primer de tot es preparen els *sandwiches* de transferència seguint els passos següents:

1. Es posen en remull amb *buffer* de transferència (TBS) els gels i la resta de materials que s'utilitzaran per a muntar els *sandwiches* (plaques, papers, esponges i membranes). Cal

que en cap moment cap d'aquests components deixi d'estar en remull i és important que no hi hagin bombolles, ja que no pot quedar aire a l'interior.

2. Es munten els dos *sandwiches* seguint l'esquema següent: (el paper i l'esponja actuen com a aïllants de la calor).



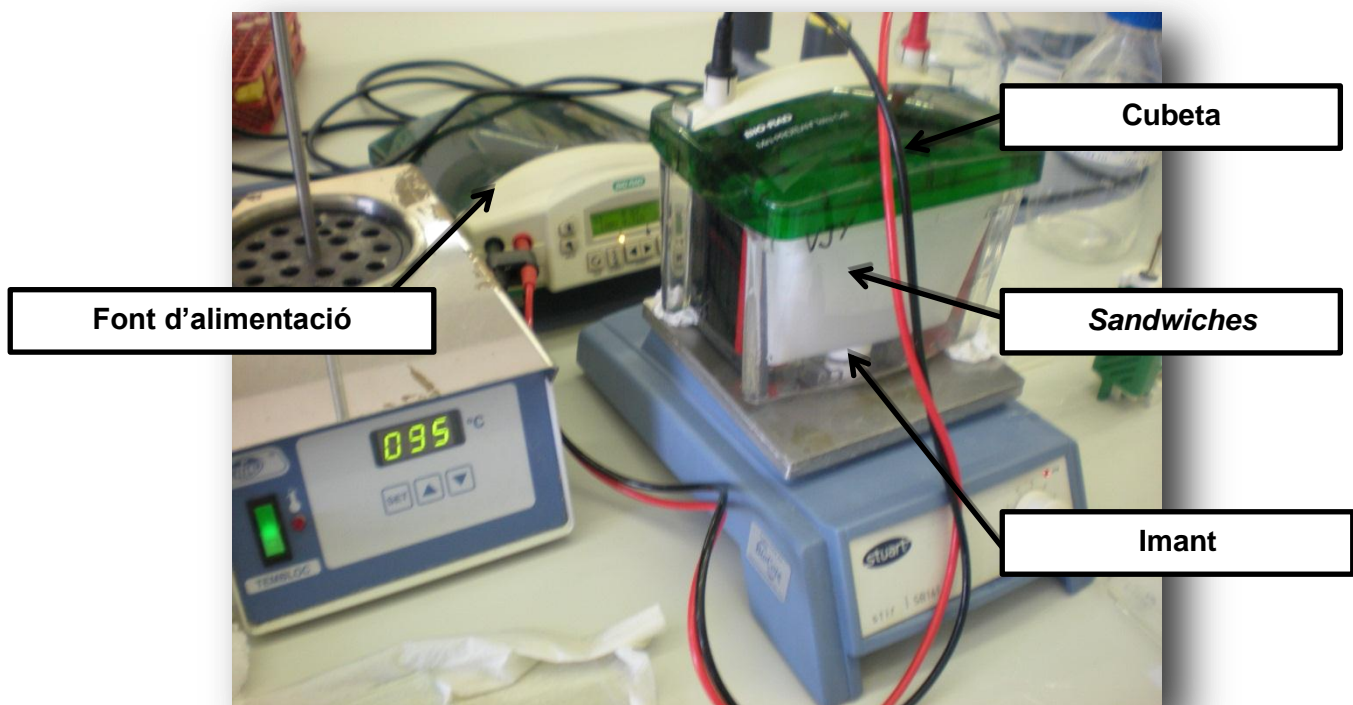
[Font: Estudio de la funcionalidad del sistema ICAD·CAD en la línea celular U87MG frente al tratamiento con estaurosporina, Jorge Urresti]

*És necessari que tots els components de l'estructura tinguin la mateixa mida que el gel o siguin lleugerament més petits.

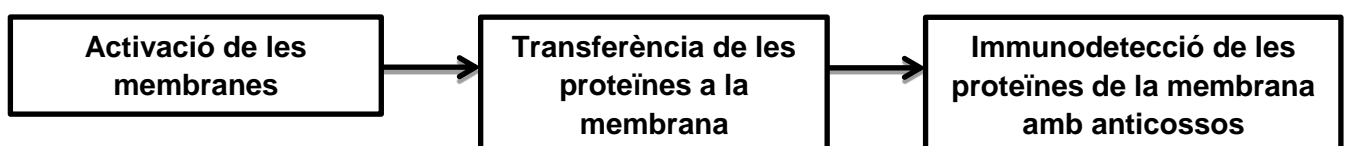
3. Es col·loca el muntatge damunt la superfície metàl·lica, que és l'ànode⁴⁴ de l'estructura, i es cobreix amb la tapa que és el càtode⁴⁵. Una vegada muntades les estructures anteriors s'introdueixen als suports i, els quals, a l'interior de la cubeta.

4. S'omple la cubeta al màxim amb *buffer* de transferència i es col·loca un imant damunt de l'agitador que es troba a la part inferior de la qual. S'endolla la cubeta a la font d'alimentació a 100V a 0'3A.

5. Un cop s'ha iniciat el procés de transferència i mentre es duu a terme s'observen bombolles a la part del darrere de la cubeta cosa que indica que el procés de transferència de les proteïnes a les membranes s'està duent a terme correctament. Aquest procés genera molta energia, per això el *buffer* de transferència s'utilitza a temperatures baixes i es col·loca un imant damunt l'agitador, ja que així la calor disminueix i no es fan malbé les membranes. Aquest procés dura entre tres quarts d'hora i una hora aproximadament.



6. Immunodetecció de les proteïnes mitjançant anticossos



Després de l'activació de les membranes i del posterior procés de transferència, toca tractar les membranes amb quatre anticossos diferents que actuaran de manera específica per a detectar les quatre proteïnes que es volen analitzar.

Aquests anticossos són comercials i estan formats per l'anticòs primari, que és el genèric i igual per a tots els organismes, i el secundari, que és específic i concret per a cada organisme. Per exemple, l'anticòs primari que detecta la caspasa-2 és igual per a tots els organismes tant en les rates, les serps, els conills... però en canvi l'anticòs secundari de la caspasa-2 serà diferent segons es tracti d'una rata, d'un conill, etc. La funció de l'anticòs primari és detectar la proteïna d'interès, per tant serà diferent en funció de les proteïnes que es vulguin detectar i l'anticòs secundari s'uneix al primari durant la incubació completant-ne la funció.

S'utilitzaran quatre anticossos procedents de diferents organismes que actuaran especificant cada caspasa de la manera següent:

	Origen dels anticossos	Dilució* (anticòs primari)
Caspasa-2	Cat (gat)	---
Caspasa-3	Rabbit (conill)	1:1.000
Caspasa-9	Mouse (rata)	1:40.000
iCAD	Mouse (rata)	1:40.000

*La dilució s'efectua amb *TBS Tween* 0'1%.

D'aquesta manera en cada membrana només obtindrem l'estat d'activació de la proteïna concreta segons l'anticòs amb què hagi estat tractada.

Passos a seguir en la immunodetecció de proteïnes:

6.1 Preparació de les membranes per al tractament amb anticossos

Primer de tot, un cop acabat el procés de transferència de les proteïnes del gel a la membrana, es preparen les membranes per a ser tractades amb els anticossos. Per a fer-ho, es treuen les membranes dels *sandwiches* i es duu a terme un procés de bloqueig mitjançant un rentat amb una solució de llet en pols i aigua que té com a finalitat evitar

inespecificitats en l'acció dels anticossos, és a dir, fa que l'anticòs actui més específicament per a cada proteïna. Això és gràcies a les proteïnes de la llet que s'uneixen als espais de la membrana on no hi ha proteïna i la bloquegen. Aquest procés de bloqueig de les membranes dura aproximadament una hora al *shaker* i a temperatura ambient.

A continuació es fan tres rentats a les membranes amb una solució de *TBS tween* al 0'1% durant cinc minuts cada un per tal d'eliminar la resta d'agent bloquejant (solució de llet en pols) que no s'ha adherit a la membrana.

Un cop les membranes estan a punt després del rentat, es fa al tractament amb els anticossos; primer amb l'anticòs primari i, després, amb el secundari.

6.2 Incubació de l'anticòs primari

Per a fer el tractament amb l'anticòs primari existeixen dos mecanismes diferents: el tractament es pot fer durant una hora a temperatura ambient o bé *overnight*, és a dir, un tractament de tota una nit a 4°C.

L'escollit és el segon. Per tant, es deixen les membranes dins els recipients en remull amb *TBS tween* i 1µl de l'anticòs primari corresponent durant tota la nit a la nevera a 4°C.

Un cop acabat el tractament, es recicla el contingut del recipient i es fan tres rentats de les membranes de 5 minuts amb *TBS tween* al 0'1% al *shaker* per tal d'eliminar les restes de l'anticòs que no s'ha adherit.

6.3 Incubació de l'anticòs secundari

Un cop les membranes han estat tractades amb l'anticòs primari, es tracten amb l'anticòs secundari, el que és específic segons l'organisme d'on procedeixi l'anticòs primari.

Com a anticossos secundaris s'empren anticossos obtinguts inoculant en l'espècie productora (conill, gat, rata...) les immunoglobulines de l'espècie a detectar, és a dir, si l'anticòs primari és obtingut d'un conill, s'inoculen immunoglobulines en un conill. La dilució del qual es realitza amb *TBS Tween* més un 5% de llet lliure en grasses.

El tractament amb els anticossos secundaris no és tan llarg però és més laboriós. Es comença preparant una solució de 5mL de llet en pols i 10mL d'aigua milliQ en un falcon i posteriorment es reparteix el contingut en tres falcons diferents, un per a cada anticòs que utilitzem (*rabbit*, *cat* i el *mouse* que el repetim). Es dilueix la solució de cada falcon afegint aigua milliQ fins a aconseguir la concentració desitjada.

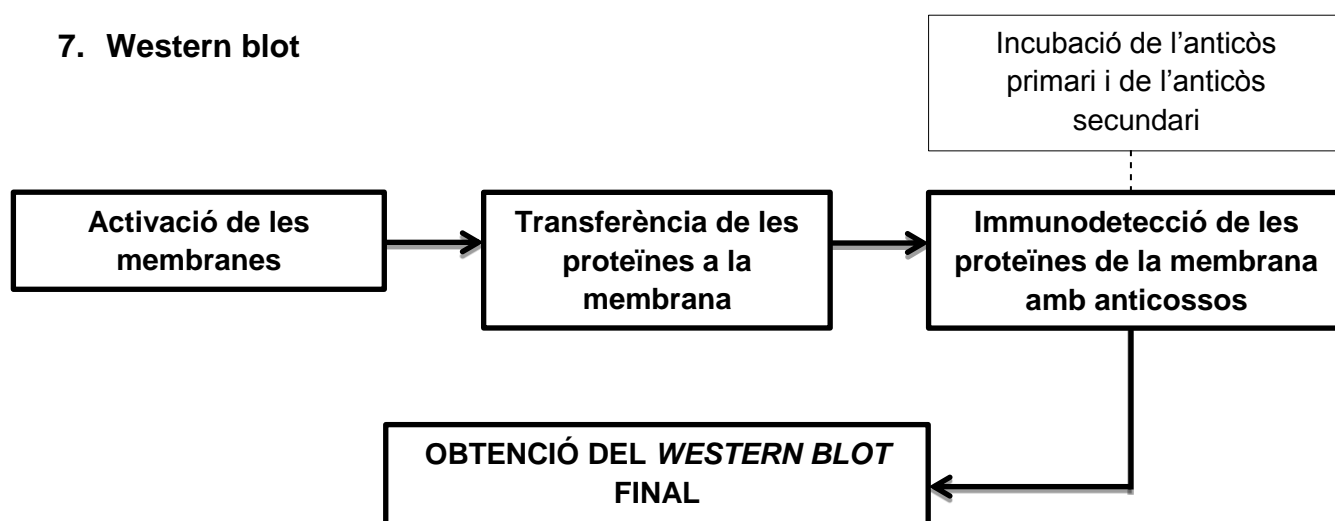
Seguidament, un cop tenim la solució a punt, es retola en cada falcon el nom de l'anticòs secundari que contindrà per saber la proteïna que determinarà i, a continuació, s'introdueix 1µl de l'anticòs secundari i s'agita el contingut dels falcons al *bortex* per tal que l'anticòs es dilueixi més fàcilment en la solució.

S'aboca el contingut dels falcons a l'interior dels recipients que contenen les membranes després de reciclar el *TBS tween* que s'ha utilitzat per a fer els rentats per extreure l'anticòs primari no adherit. Es retola en el recipient el nom de l'anticòs que s'hi ha introduït per tal de saber quina proteïna determinarà cada membrana. Es deixen els recipients uns 15 minuts al *shaker* i seguidament s'introdueixen a l'incubador durant una hora.

En el moment en què les membranes es troben a l'incubador, l'anticòs secundari s'uneix a l'anticòs primari i actuen reconeixent la proteïna en concret.

Un cop ha transcorregut l'hora de tractament, es fan tres rentats de 5 minuts a les membranes amb el *TBS tween* 0'1% al *shaker* per tal d'eliminar les restes d'anticòs i d'agent bloquejant (solució de llet en pols). Finalment s'obtenen les membranes amb els dos tractaments d'anticossos que han actuat sobre les proteïnes desitjades.

7. Western blot



Un cop els anticossos ja han actuat sobre les proteïnes de les membranes, es preparen les membranes per a ser revelades per tal d'obtenir el *western blot* on es podrà observar l'estat d'activació de les diferents proteïnes.

Paral·lelament al rentat de les membranes, es preparen dues plaques (recipients) amb solució de revelatge. Les membranes es col·loquen cap per avall sobre la solució, és a dir, que la part inferior de la membrana que és on hi ha les proteïnes estigui en contacte amb la solució. Es deixa durant dos o tres minuts.



Seguidament s'introdueixen les membranes a l'interior del caset i es va a la sala de revelatge, una sala totalment a les fosques com si d'una cambra fotogràfica es tractés, on s'introdueix el caset a la màquina i es passa el film.

El temps d'exposició del film va en funció del que es vulgui veure i del temps que un cregui necessari per a detectar i revelar les proteïnes. Es fa un primer film d'un minut d'exposició i un segon film de cinc minuts i s'escull en quin s'aprecien més bé els resultats.

Finalment obtenim dos *western blots* a partir dels quals s'observarà l'estat d'activació de les diferents proteïnes mitjançant l'anàlisi de les bandes de proteïnes. D'aquesta manera es podran treure les conclusions pertinents segons el que es vulgui observar sobre els efectes que el DMBP en l'activació de les caspases.



Sala de revelatge



Caset

10. RESULTATS

Un cop finalitzades les diferents experiències es procedeix a realitzar un anàlisi exhaustiu dels resultats obtinguts per tal de poder treure les pertinents conclusions.

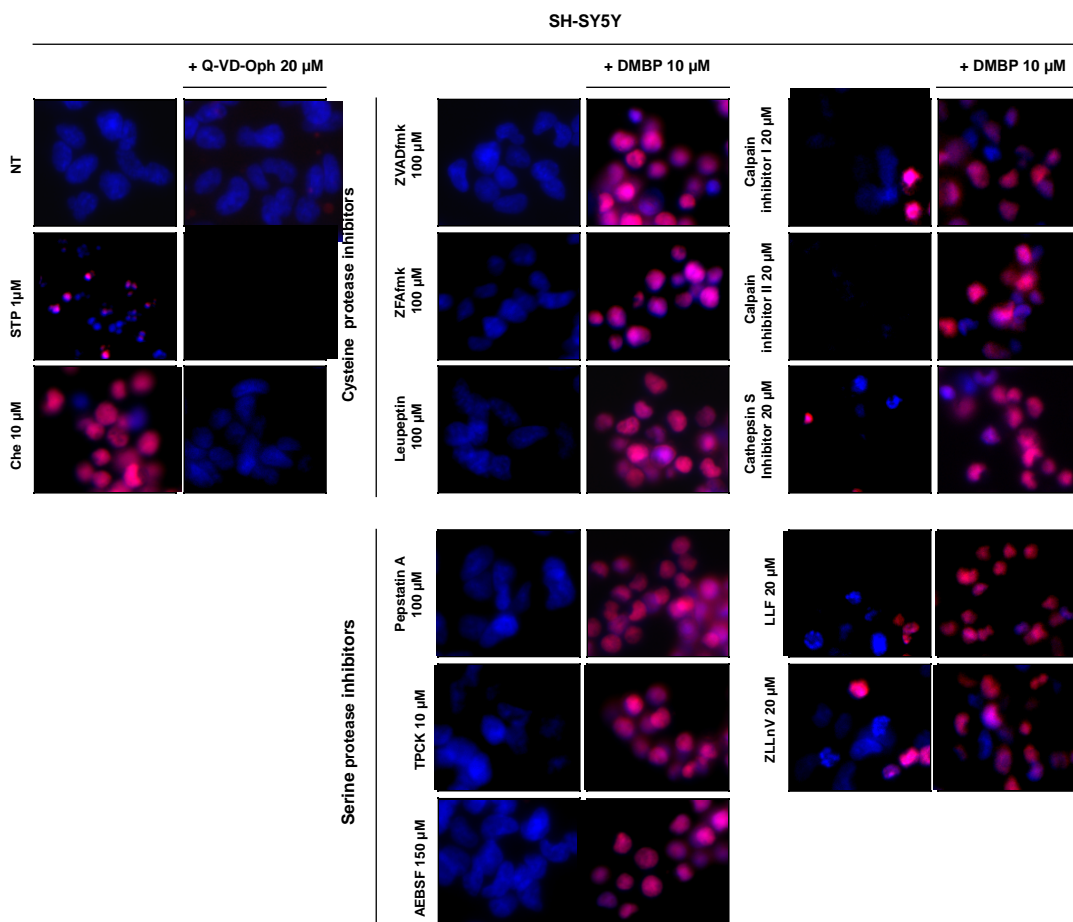
1. Observació de la morfologia nuclear de les SH-SY5Y tractades amb DMBP

Les cèl·lules SH-SY5Y NO presenten una morfologia nuclear característica de l'apoptosi clàssica després del tractament amb DMBP, ja que no hi ha una fragmentació clara del nucli cel·lular després del tractament.

Cap dels inhibidors a estudiar ofereix protecció a les cèl·lules davant el tractament amb DMBP.

Justificació:

Figura A



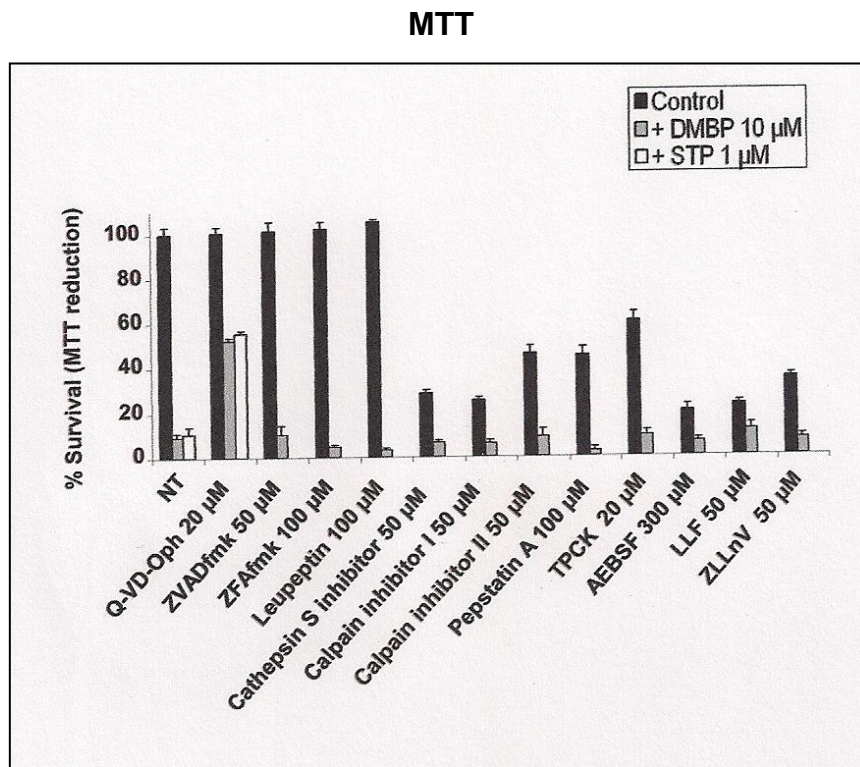
Aquestes imatges són les resultants del procés de doble tinció.

Interpretació:

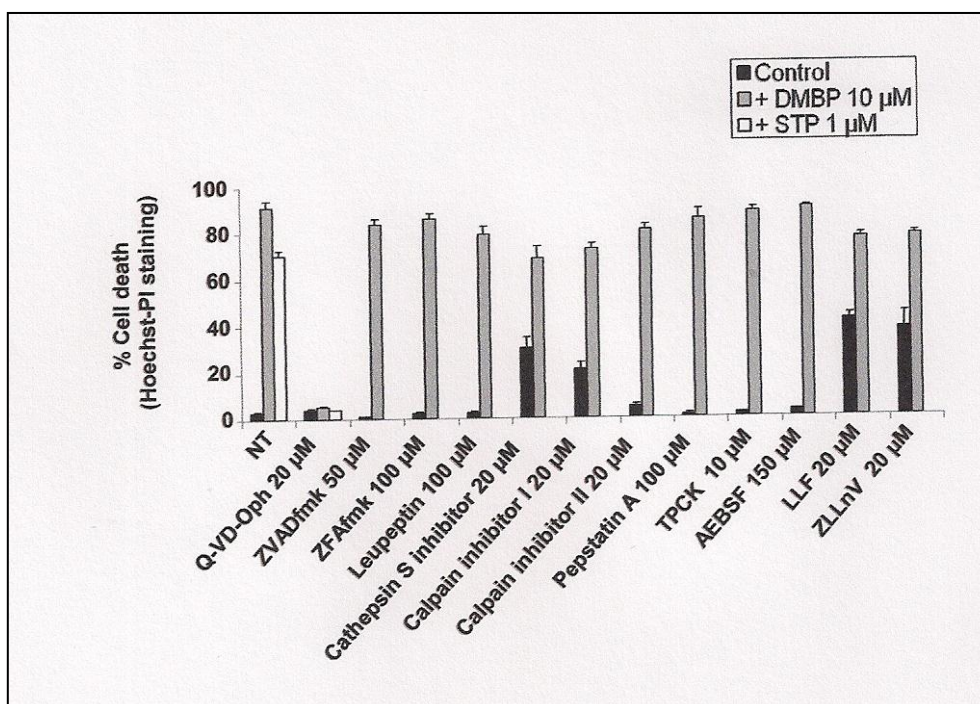
El Hoechst, que forma la primera tinció del procés, és el que tenyeix de color blau els nuclis de totes les cèl·lules de la mostra, tant vives com mortes. El iodur de propidi, que és la segona tinció, només tenyeix els nuclis de les cèl·lules mortes de color vermell, per sobre de la tinció blava del Hoechst. Per això, en les imatges, degut a la mescla de la tinció blava del Hoechst i la posterior tinció vermella del iodur de propidi, els nuclis cel·lulars apareixen de color rosa.

A partir d'aquestes imatges es realitza un comptatge de cèl·lules mortes respecte el de cèl·lules totals de la mostra. D'aquesta manera es pot determinar el grau de mortalitat cel·lular de cada mostra i elaborar-ne gràfics que reflecteixin els resultats (gràfica **HCT**). També es poden treure conclusions sobre el grau de supervivència cel·lular enfront els tractaments efectuats mitjançant els resultats de la reducció MTT (gràfica **MTT**).

Figura B



HCT



Gràfiques elaborades a partir dels % obtinguts en la Figura A i la reducció MTT

* Hi ha algunes concentracions d'inhibidor que varien respecte els dos assajos (CathepsinS, Calpain I i II, TPCK, AEBSF, LLF i ZLLnV). Això és degut a que en el primer assaig de MTT es van observar certs signes de toxicitat de l'inhibidor cap a les cèl·lules i es va decidir reduir-ne la concentració en el posterior assaig.

En els gràfics de la figura B s'hi observen els resultats de l'assaig de supervivència de la Reducció MTT (**MTT**) i de l'assaig de mort cel·lular mitjançant la doble tinció de Hoechst i iodur de propidi (**HCT**).

Les barres negres d'ambdós gràfics pertanyen al tractament amb inhibidor sol (controls), les barres grises pertanyen al tractament amb inhibidor i inductor de mort DMBP i, finalment, les barres blanques al tractament amb l'inhibidor i l'inductor de mort STP.

Interpretació:

a) MTT (assaig de supervivència)

Aquest gràfic ens permet observar els efectes dels inhibidors (si hi ha protecció o no) sobre les mostres.

Primer de tot, observant les característiques de les tres barres del control NT, es pot determinar que l'experiència s'ha dut a terme en les condicions correctes, és a dir, no hi ha anomalies en la funcionalitat dels inductors de mort, ja que tant les mostres tractades amb DMBP (barra grisa) i amb STP (barra blanca) els nivells de supervivència cel·lular són molt baixos, cosa que indica que la droga està actuant (indueix la mort de les cèl·lules).

Per altra banda, amb el control de la mostra tractada amb l'inductor STP i l'inhibidor QVD (droga i inhibidor patrons de control positiu) corresponent a la barra blanca de la segona columna, es pot observar que el QVD està actuant correctament, ja que els nivells de supervivència són superiors al del control de NT de STP, cosa que indica que està protegint.

Pel que fa al tractament amb inhibidor sol (controls, pertinents a la barra negra) efectuats amb l'objectiu de determinar possible toxicitat sobre les cèl·lules per part dels inhibidors, en general hi ha valors elevats de supervivència, cosa normal. Tot i així, s'observa que en determinats inhibidors (Cathepsin S, Calpain I i II, TPCK, AEBSF, LLF i ZLLnV) les barres disminueixen per sota un 60% de supervivència. Això no és normal, per tant, podem determinar que aquests inhibidors provoquen toxicitat. Per això, i tal i com s'ha esmentat anteriorment, les concentracions d'inhibidor es redueixen en el següent assaig per evitar-ne l'efecte tòxic i l'alteració dels resultats.

En el cas de les barres grises, pertinents al tractament amb inhibidors i DMBP, els nivells de supervivència cel·lular són tots molt baixos (inferiors al 20%). Això indica que els inhibidors no ofereixen protecció a les cèl·lules quan són tractades amb DMBP. Malgrat això, hi ha l'excepció del QVD (inhibidor de control positiu de protecció), l'únic inhibidor amb nivells de supervivència superiors al 20% i suficientment alts (equivalents al 50% aproximadament) per decretar que ofereix protecció.

b) HCT (mortalitat cel·lular)

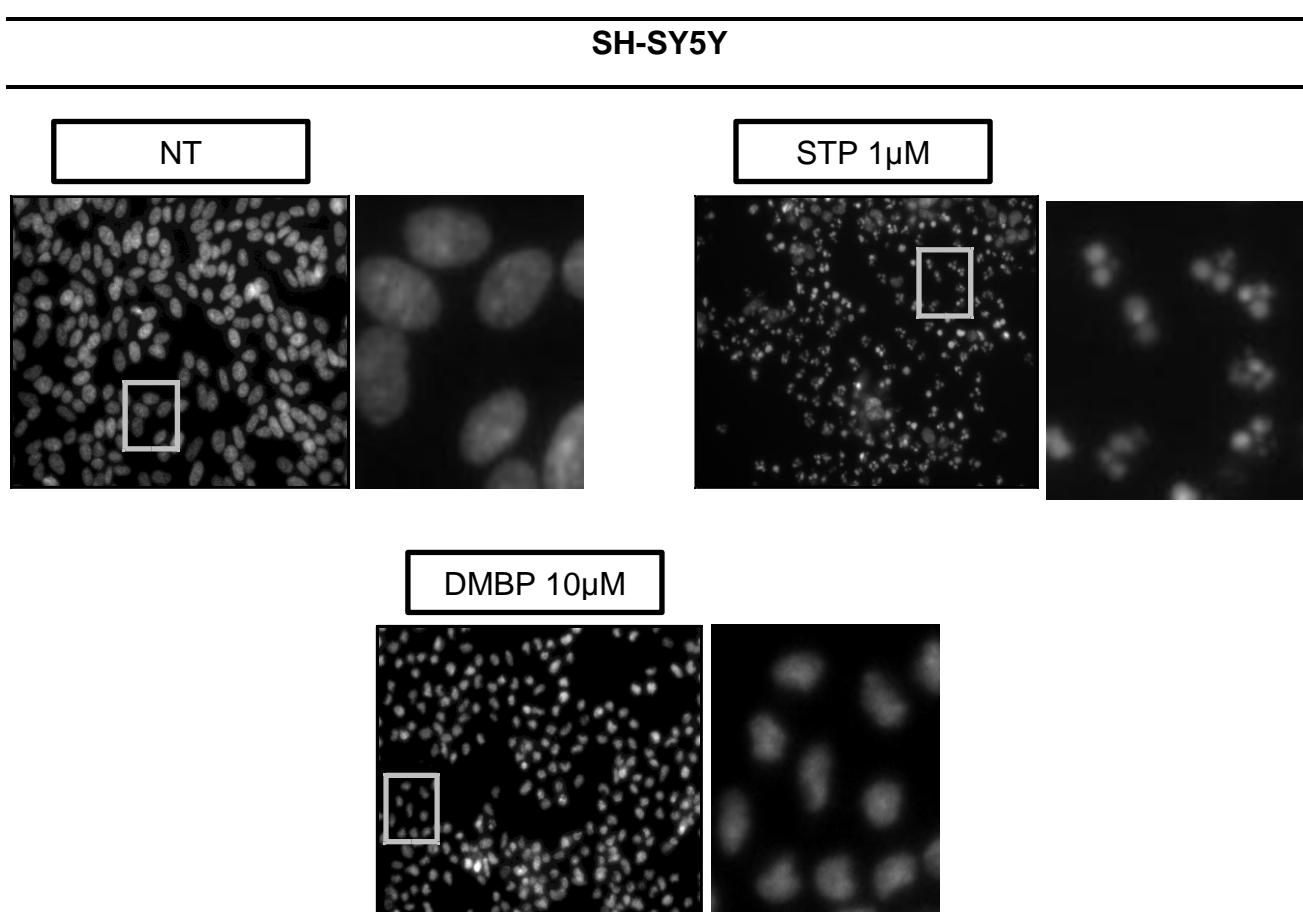
El que aquest gràfic ens indica és molt semblant a l'anterior.

D'una banda, totes les mostres amb inductor de mort DMBP tenen un alt percentatge de mortalitat (superiors al 70%). Això ens reforça la falta de protecció dels inhibidors que ja s'ha vist en MTT.

Per altra banda, seguim observant un cert nivell de mortalitat en els controls de no-tractat dels inhibidors Cathepsin S, Calpain I, LLF i ZLLnV, degut a que la reducció de concentració que s'ha efectuat a les mostres no ha estat suficient.

També es pot observar que, de nou, els controls d'inducció de mort DMBP i STP funcionen correctament ja que provoquen valors de mortalitat alts (barra grisa i blanca de la columna NT), excepte quan les mostres són co-tractades amb QVD, que inhibeix l'efecte de les drogues. Per això, els nivells de mortalitat són baixos tal com indiquen les barres grisa i blanca de la segona columna.

Figura C



Posteriorment al procés de reducció de MTT i de doble tinció es van observar les mostres corresponents als controls de NT, NT+DMBP i NT+DMBP de les gràfiques anteriors (MTT i HCT) al microscopi amb l'objectiu de determinar la morfologia que presentaven els nuclis cel·lulars després dels respectius tractaments de 24 hores.

Interpretació:

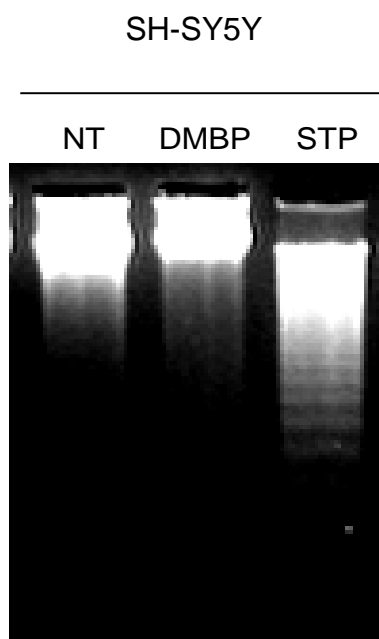
La primera imatge, NT, són nuclis de cèl·lules vives sense tractar. Són nuclis de forma ovalada i de tamany gran. La segona imatge pertany al control amb STP (cèl·lules tractades només amb STP 1 μ M), que ens indueix apoptosi clàssica i, per tant, provoca la fragmentació i condensació nuclear característica del procés. Com es pot apreciar, hi ha una clara fragmentació nuclear ja que els cossos originats en la fragmentació són de tamany més petit i presenten una forma arrodonida. Pel que fa a la tercera imatge, corresponent al tractament amb DMBP (cèl·lules tractades només amb DMBP 10 μ M), s'observen nuclis de forma irregular i un pèl més petits respecte els de la imatge NT. Prenent com a referència la morfologia de la mostra amb STP característica de l'apoptosi, es pot determinar que no hi ha fragmentació ni condensació nuclear quan les SH-SY5Y són tractades amb DMBP ja que la morfologia nuclear que s'observa en ambdues imatges no són iguals ni tan sols semblants.

2. Observació de la degradació oligonucleosomal del DNA en SH-SY5Y

El tractament de les cèl·lules SH-SY5Y amb DMBP NO provoca una clara degradació oligonucleosomal del DNA cel·lular.

Justificació:

Figura D



En la figura D es mostra el resultat de l'electroforesi en gels d'agarosa. En ell es pot observar el grau de degradació oligonucleosomal que presenta el DNA cel·lular de les mostres a estudiar: el control de no-tractat, SH-SY5Y tractades amb DMBP 10 μ M i SH-SY5Y tractades amb STP 1 μ M.

Interpretació:

En l'electroforesi en els gels d'agarosa les mostres de DNA que han patit degradació migren formant una columna en forma d'escala (*ladder*) tal i com es veu en la mostra tractada amb STP que seria la degradació característica de l'apoptosi clàssica. Per altra banda, quan el DNA de la mostra no ha patit degradació, aquesta migració no és present i només s'aprecia la franja de DNA compacta a la part superior tal i com es pot observar en la mostra de DMBP i en el control de no-tractat.

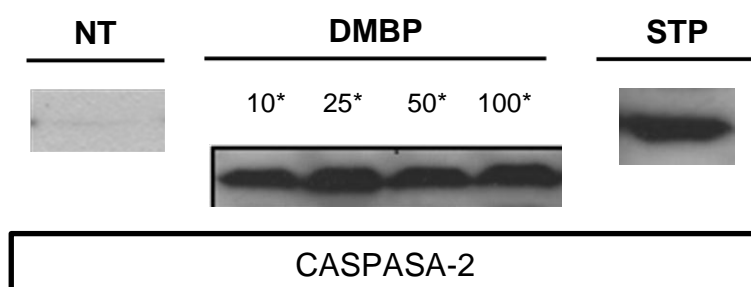
Per tant, es determina que al tractar SH-SY5Y amb DMBP no hi ha degradació oligonucleosomal del DNA, ja que tal i com s'aprecia en la figura D, la mostra amb DMBP no presenta la degradació amb forma d'escala i només es veu la banda compacta de DNA a la part superior. Per considerar una possible degradació, la mostra amb DMBP hauria de presentar un aspecte semblant a la mostra de STP.

3. Observació de la possible activació de diferents caspases

El tractament de les cèl·lules SH-SY5Y amb DMBP provoca l'activació de caspasa-2, caspasa-3, caspasa-9 i iCAD, proteïnes inductores de mort apoptòtica clàssica.

Justificació:

Figura E



(*)Aquestes mostres també han estat tractades amb inhibidor de caspasa-2 (IC2).

En la Figura E s'observen els resultats del primer western blot corresponent al tractament de 24 hores. Concretament, aquest western blot pertany a l'observació de caspasa-2 tal i com s'indica.

Interpretació:

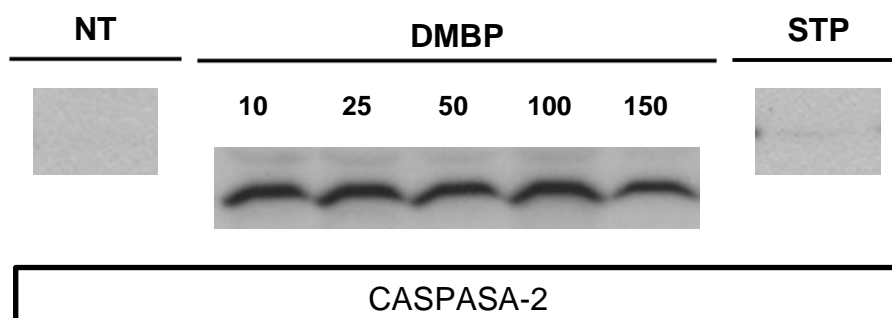
En el cas de detectar la presència de caspases actives per a una mostra, el western blot presenta marcada una franja negra a la part superior. En el cas de no haver-hi activació, no hi ha cap franja visible.

Per tant, observant la imatge es pot determinar que sí hi ha activació de caspasa-2 quan es tracten cèl·lules SH-SY5Y amb DMBP a diferents concentracions, ja que la franja negra hi és present. A més, el control de no-tractat no presenta activació (cosa normal) i el tractament amb STP sí. Aquests respectius controls indiquen que l'experiment s'ha dut a terme de forma correcte.

Per altra banda, aquesta activació de caspasa-2 també indica que l'inhibidor de caspasa-2 (IC2) no actua, no duu a terme la seva funció d'inhibir l'activació de la caspasa quan es tracta amb DMBP, ja que si actués la caspasa no estaria activa i, per tant, la franja negra no apareixeria.

Pel que fa els resultats de la resta de caspases a estudiar (caspasa3, caspasa-9 i iCAD) són iguals que en la figura E. Per tant també es troben activades en el tractament a 24 hores amb DMBP.

Figura F



Resultats de la segona extracció de proteïnes corresponent al tractament a 1 hora.

En la Figura F es mostren els resultats del western blot corresponent a la caspasa-2 del tractament a 1 hora amb DMBP a diferents concentracions i STP a concentració estàndard (1 μ M). Com es pot observar hi ha activació de caspasa-2 a una hora a totes les concentracions quan les SH-SY5Y són tractades amb DMBP. En canvi no hi ha activació en el tractament amb STP.

Pel que fa a les altres caspases (caspasa-3 i caspasa-9) i el substrat (iCAD) els resultats són els mateixos: hi ha activació en el tractament amb DMBP però no amb STP.

L'activació de caspases en un tractament de 1 hora i en un procés apoptòtic clàssic no és normal. A més, en el tractament amb STP que és la droga patró no hi ha activació de cap caspasa ni substrat, per això, hi ha alguna cosa irregular en el procés de mort que es desenvolupa.

Ara s'ha de determinar a què és degut aquest comportament anormal. Hi ha dues opcions possibles: primer, pot ser que sigui problema de la dosi de droga emprada o, segon, pot ser degut a que el mecanisme de mort que desencadena el DMBP en les cèl·lules sigui rar o desconegut.

Mitjançant l'extracció de proteïnes es pot descartar o verificar la primera. Com que en la segona extracció realitzada (Figura F) amb DMBP a diferents concentracions hi ha activació de caspases en totes les concentracions es descarta que el problema sigui degut a la dosi.

Per tant, el problema és del mecanisme de mort que desencadena el DMBP. Com que hi ha activació a una hora en totes les concentracions de DMBP, es verifica que la droga desencadena un procés de mort cel·lular només amb una hora de tractament, cosa molt estranya. Llavors, aquest fet s'atorgaria als efectes que produeix la droga sobre les cèl·lules a l'hora de provocar-los-hi la mort. A partir d'aquí s'hauria de seguir investigant per tal de conèixer les característiques del procés de mort que desencadena el DMBP.

11. CONCLUSIÓ

Després d'analitzar els tres *hallmarks* característics de l'apoptosi clàssica en el tractament de les cèl·lules SH-SY5Y de neuroblastoma, s'han aconseguit els següents resultats:

Experiència I: Observació de la morfologia nuclear de les SH-SY5Y tractades amb DMBP

Les cèl·lules SH-SY5Y NO presenten una morfologia nuclear característica de l'apoptosi clàssica després del tractament amb DMBP, ja que no hi ha una fragmentació clara del nucli cel·lular després del tractament.

Cap dels inhibidors a estudiar ofereix protecció a les cèl·lules davant el tractament amb DMBP.

Experiència II: Observació de la degradació oligonucleosomal del DNA en SH-SY5Y

El tractament de les cèl·lules SH-SY5Y amb DMBP NO provoca una clara degradació oligonucleosomal del DNA cel·lular.

Experiència III: Observació de la possible activació de diferents caspases

El tractament de les cèl·lules SH-SY5Y amb DMBP provoca l'activació de caspasa-2, caspasa-3, caspasa-9 i iCAD, proteïnes inductores de mort apoptòtica clàssica, en tractaments de 24 hores i 1 hora.

L'inhibidor de caspasa-2 no ofereix protecció de cara el desenvolupament de mort cel·lular, ja que no inhibeix l'activació de caspasa-2.

Per tant, es pot donar resposta a la hipòtesi inicial:

ÉS EL DMBP UN FÀRMAC INDUCTOR DE MORT APOPTÒTICA CLÀSSICA EN CÈL·LULES DE LA LÍNIA SH-SY5Y DE NEUROBLASTOMA?

NO, PERQUÈ NOMÉS ES COMPLEIX UN DELS TRES *HALLMARKS* CARACTERÍSTICS DE L'APOPTOSI CLÀSSICA.

Per considerar que el DMBP és un fàrmac inductor de mort apoptòtica clàssica, cal que es duguin a terme els tres *hallmarks* característics. Com que els resultats obtinguts determinen que no hi ha degradació oligonucleosomal del DNA i no hi ha la fragmentació i la condensació del nucli cel·lular, llavors no podem donar com a vàlid que el DMBP és inductor d'apoptosi clàssica malgrat haver-hi activació de caspases. És més, s'ha comprovat que el mecanisme de mort que aquest fàrmac indueix és rar, desconegut, ja que l'activació de caspases en un tractament d'una hora tampoc és comú en el procés apoptòtic.



[Font: <http://www.google.es/imgres?q=battle4acure.jpg>]

ANNEX 1

Glossari de termes

ANNEX 1

Glossari de termes

1. Oncogen: un **oncogèn** és un gen que, quan ha mutat o s'expressa en nivells alts, ajuda a convertir una cèl·lula normal en una cèl·lula tumoral. Els oncogens activats poden causar que aquestes cèl·lules sobrevisquin i proliferin. La majoria dels oncògens necessiten un pas addicional, com les mutacions d'un altre gen, o factors mediambientals, com una infecció de virus per causar càncer.

2. Antigen: un **antigen** és una molècula (generalment una proteïna o un polisacàrid) que pot ser (Antigen A per al grup sanguini A) (Antigen B per al grup sanguini B) (Antigen A i B per al grup sanguini AB) i (Sense anticossos per al grup sanguini 0) de superfície cel·lular, que pot induir a la formació d'anticossos. Hi ha molts tipus de molècules que poden actuar com a antígens, com les proteïnes, polisacàrids i més rarament, altres molècules com els àcids nucleics. Cada antigen està definit pel seu anticòs, els quals actuen per complementarietat espacial. Els antígens es troben a la superfície de virus, bacteris, fongs, espores, pol·len i partícules de pols, i tanmateix a les cèl·lules dels òrgans trasplantats (cor, ronyó...).

3. Anilines: l'**anilina**, també coneguda com a fenilamina o aminobenzè, és un compost orgànic líquid, entre incolor i lleugerament groc, d'una olor característica. No s'evapora fàcilment a temperatura ambient. L'anilina és lleugerament soluble en aigua i es dissol fàcilment en la majoria dels dissolvents orgànics. L'anilina es fa servir per fabricar una àmplia varietat de productes com ara l'escuma de poliuretà, productes químics agrícoles, pintures sintètiques i colorants industrials, antioxidants, estabilitzadors per a la indústria del cautxú, herbicides, vernissos i explosius. S'ha demostrat que té repercussions cancerígenes sobre rates, per tant, hi ha probabilitats que també sigui cancerígena en éssers humans.

4. Antimetabòlits: un **antimetabòlit** és una substància que reemplaça, inhibeix o competeix amb un compost químic específic a l'interior d'una cèl·lula, la funció del qual és per tant, la de desestabilitzar.

5. Immunosupressió: és l'ús de medicaments (dits immunosupressors) en teràpia immunosupressora per a inhibir l'activitat del sistema immunitari. Clínicament s'utilitzen per a prevenir el rebuig d'un òrgan trasplantat i pel tractament d'una malaltia autoimmune o malalties que poden ser d'origen autoimmune. Aquests medicaments no estan exempts d'efectes secundaris i riscos. Degut al fet que la majoria d'ells no actua de manera selectiva, el sistema immune perd la capacitat de resistir a infeccions i a l'extensió de cèl·lules canceroses.

6. Sistema nerviós simpàtic (o SNS): està format per els tubs que hi ha en ambdós costats de la columna vertebral que els connecta amb els nervis espinals. Des del punt de vista psicològic ens prepara per l'acció. El funcionament del sistema nerviós simpàtic està associat amb la psicopercepció d'un estímul de caràcter emocional.

7. Sistema nerviós central: el **sistema nerviós central** o SNC està constituït per l'encèfal i la medul·la espinal. Estan protegits per tres membranes denominades genèricament meninges. A més, l'encèfal i la medul·la espinal estan protegits per estructures òssies, que són el crani i la columna vertebral respectivament.

8. Medul·la òssia: la **medul·la òssia** o **moll de l'os** és un tipus de teixit que es troba a l'interior dels grans ossos, com el crani, les vèrtebres, les costelles, l'estèrnum, la cintura escapular i la cintura pelviana. Se'n diferencien dos tipus per la seva coloració i funcions: la medul·la òssia vermella i la medul·la òssia groga. A la medul·la òssia és on es produeix la sang (hematopoesi) gràcies a les cèl·lules mare hematopoètiques que conté que originen els tres tipus de cèl·lules sanguínies: els leucòcits (glòbuls blancs), els eritròcits (glòbuls vermells) i els trombòcits (que originaran les plaquetes).

9. Protooncogen: els **protooncogens** són gens en els que la funció normal del seu producte gènic és promoure la divisió cel·lular. Les mutacions patogèniques els confereixen un guany de funció, donant lloc a un augment de la proliferació cel·lular. Als protooncogens alterats se'ls denomina oncògens. Les alteracions són dominants, car afecten sols un al·lel. Fins ara se n'han descobert més d'un centenar pertanyents a diferents grups de proteïnes. Els protooncogens poden activar-se a través de diferents

mecanismes: per mutació puntual, per amplificació gènica, per sobreexpressió o per reordenament gènic.

10. Síndromes paraneoplàsics: els síndromes paraneoplàsics són diferents conjunts de símptomes que afecten als pacients de càncer i que no poden ser explicats per l'efecte local del tumor, per la metastasi ni per l'elaboració d'hormones pròpies del teixit del que procedeix el tumor. Els més comuns inclouen endocrinopaties, hipoglucèmia i trombosis venoses entre molts altres.

11. Síndrome de Horner: el síndrome de Claude Bernard-Horner, és un síndrome causat per una lesió en el nervi simpàtic de la cara i caracteritzat per la contracció de les pupil·les (miosis), parpelles caigudes (ptosis), ulls enfonsats i sequedat facial que a vegades s'acompanya amb la vermellor dels ulls.

12. Anticossos monoclonals: un anticòs monoclonal és un anticòs homogeni produït per una cèl·lula híbrida que és el resultat de la fusió d'un clon de limfòcits B descendents d'una sola i única cèl·lula mare i una cèl·lula plasmàtica tumoral.

13. Anàlisi de sang: en funció del grau d'invasió de la medul·la òssia que presenti el neuroblastoma, afectarà en més o menys grau a la producció de cèl·lules sanguínies, les de defensa (glòbuls blancs), les de transport (glòbuls vermells) i les de coagulació (plaquetes). També, en certa mesura i segons els tipus de cicle de quimioteràpia la medul·la òssia es veu afectada. Els resultats de l'anàlisi orienten la necessitat de transfusions si els nivells són molt baixos, o perill de patir infeccions i per tant la necessitat d'un tractament amb antibiòtic. Els anàlisis són rutinaris i també permeten monitoritzar la salut del pacient i del funcionament de diferents òrgans.

14. Biòpsia: en una biòpsia es prenen mostres de forma quirúrgica d'un teixit que seran examinades pel patòleg per identificar la presència de cèl·lules de neuroblastoma o de qualsevol altre càncer i definir el seu estadi.

15. Aspiració i biòpsia medul·lar: la diferència entre les dues biòpsies es la quantitat de mostra que es pren, essent en la biòpsia una mica més gran i il·lustrativa del teixit. En ambdues es pren una mostra de la zona de l'os que és la zona on té lloc la formació dels elements que formen la sang (glòbuls vermells, blancs i plaquetes). Habitualment l'os seleccionat és el maluc i segons el protocol més usual es fa en cada ocasió en quatre preses corresponents a la zona anterior i posterior de cada maluc de la part dreta i l'esquerra del cos. Només que una d'aquestes quatre mostres sigui positiva és suficient per determinar una infiltració i fa falta que els quatre siguin negatius per dir que no.

16. MIGB: La Metaiodobenzilguanidina (MIGB) és una substància radioactiva que s'adhereix a les cèl·lules de neuroblastoma. El procediment consisteix en injectar-la per via endovenosa i es practica una mesura radiològica a les 24 hores. El MIGB provoca que les cèl·lules de neuroblastoma brillin en projectar la imatge i d'aquesta manera els professionals poden identificar la localització i l'extensió de la malaltia en el cos.

17. TAC: el TAC és un model de radiografia molt sofisticada que proporciona imatges molt detallades dels òrgans i dels teixits. En el pacient amb neuroblastoma s'utilitza per localitzar i determinar la possible presència, tamany i localització del tumor. Les imatges són especialment útils abans de la cirurgia.

18. Ressonància Magnètica (RMI): igual que el TAC és una imatge radiològica d'elevades prestacions. És especialment útil per identificar alteracions en el sistema nerviós, cervell i medul·la espinal. A diferència dels rajos X o el TAC, la RMI no produeix radiacions.

19. Ecografies: es basa en l'obtenció d'imatges mitjançant un sistema que produeix ultrasons. S'utilitza també per demostrar la presència de tumors en certs òrgans. En els noutats i els nens petits és molt útil ja que, a diferència de les altres proves, TAC i RMI no es necessita anestesia.

20. Ganglis: els **ganglis limfàtics** o **nòduls limfàtics** són components del sistema limfàtic que actuen com a filtres per a partícules estranyes i contenen leucòcits. Es troben en

moltes parts del cos. Els ganglis limfàtics actuen com a filtres, amb teixit connectiu reticular en forma de "bresca" omplert per limfòcits que recullen i destrueixen bacteris i virus. Quan el cos es troba lluitant contra una infecció, els limfòcits es multipliquen ràpidament i produeixen una tumefacció característica.

21. Estabilitat homeostàtica o homeòstasi: és la tendència a mantenir l'equilibri i l'estabilitat interns en els diferents sistemes biològics. Aquesta condició d'equilibri en el medi intern és deguda a una contínua interrelació dels múltiples processos de regulació corporal. L'estat d'equilibri del cos pot alterar-se dins d'uns estrets marges compatibles amb la vida, fet que es dona per a adaptar-se als canvis del medi que l'envolta. Es pot dir simplement, que l'homeòstasi és l'equilibri intern de l'organisme.

22. Caspases: les caspases són un grup de proteïnes pertinents al grup de cisteïno-proteases. Són mediadores essencials dels processos d'apoptosi. Per aquest motiu, errors en els processos mediat per caspases són alguns dels principals responsables del desenvolupament de tumors i malalties autoimmunes, de la mateixa manera que desenvolupa Alzheimer quan hi ha un excés d'activació. N'hi ha de dos tipus: les iniciadores (caspasa-2, caspasa-8, caspasa-9 i caspasa-10) que inicien a les caspases efectores (caspasa-3, caspasa-6 i caspasa-7).

23. Substrats: els substrats dins del procés apoptòtic són proteïnes que formen part dels mecanismes de senyalització de l'apoptosi, i que per tant contribueixen en l'execució de l'apoptosi. Són activats per les diferents caspases.

24. Fragments oligonucleosomals: s'originen durant la degradació oligonucleosomal del DNA (són els fragments de DNA degradats) en el procés apoptòtic.

25. Macròfags: és una cèl·lula amb capacitat immunològica present al teixit conjuntiu. Els macròfags són capaços de migrar mitjançant un moviment ameboide en resposta a estímuls determinats com el sistema del complement. Tenen el seu origen en els monòcits circulants, precursors presents en la medulla òssia. Són components del sistema fagocític-

mononuclear que tenen com a funció: netejar i defensar els diferents teixits de l'organisme, fagocitar bacteris i/o altres cossos i substàncies i participar en la resposta immunitària, entre altres coses.

26. Mitosi: és una fase del cicle cel·lular en que es produeix la divisió del nucli cel·lular de les cèl·lules eucariotes mitjançant el qual es reparteixen les dues còpies del material genètic en dues meitats iguals, per formar els nuclis de les cèl·lules "filles". Normalment conclou amb la formació de dos nuclis separats (cariocinesi), seguit de la partició del citoplasma (citocinesi), per a formar aquestes dues cèl·lules filles.

27. Malalties neurodegeneratives: són malalties caracteritzades per la pèrdua progressiva de l'estructura o la funció de les neurones, incloent la mort de la neurona. Moltes malalties neurodegeneratives incloent les malalties de Parkinson, Alzheimer, i Huntington ocorren com resultat de processos neurodegeneratius. Hi ha molts paral·lelismes entre les diferents malalties neurodegeneratives com la mort induïda de la cèl·lula.

28. Pathways: nom anglès que reben els mecanismes de senyalització de l'apoptosi, és a dir, tots els processos que ajuden a desencadenar aquest tipus de mort com: caspases, l'apoptosoma, les dues vies inductores de mort...

29. SH-SY5Y: nomenclatura que reben les cèl·lules de neuroblastoma en el laboratori.

30. Hallmarks: terme anglès que fa referència a trets distintius o característics cap a una cosa o persona, en aquest cas, referent a l'apoptosi clàssica.

31. Quinases: una quinasa (o cinasa), també anomenada fosfotransferasa, és un enzim capaç de transferir un grup fosfat des d'una molècula donadora cap a un substrat. Aquest procés de transferència s'anomena fosforilació, és a dir, intervé en el procés de transmissió d'energia procedent de molècules d'ATP.

32. Sembra: procés pel qual les cèl·lules d'un cultiu inicial es transfereixen en plaques per a iniciar diversos tractaments d'una investigació.

33. Electroforesi: l'electroforesi en gel és un grup de tècniques de laboratori emprades per aïllar molècules presents en mescles, basades en les seves propietats biofísiques tals com la mida, la forma, la càrrega elèctrica o el seu punt isoelèctric. L'electroforesi en gel té usualment un propòsit analític, però també tenen utilitat com a tècnica preparativa per a purificar parcialment molècules abans d'emprar altres tècniques com el *Western blot* per a la posterior caracterització.

34. Agarosa: és un polisacàrid format per galactosa alfa i beta que s'extreu de les algues dels gèneres *Gellidium* i *Gracillaria*, capaç de gelificar-se. L'agarosa és un producte natural que forma una matriu inert i no tòxica que suposa una eina indispensable en gran quantitat de tècniques de biologia molecular, bioquímica i biologia cel·lular. El seu ús més estès és per construir gels que permetin separar molècules d'ADN mitjançant electroforesi, a més de ser utilitzada per a fixar molècules a la seva estructura com anticossos, antígens i enzims.

35. Western blot: la transferència western (de l'anglès *western blot*) o transferència de proteïnes és una tècnica utilitzada en biologia molecular, bioquímica, biotecnologia i immunogenètica per detectar proteïnes en una mostra de teixit o extracte. Utilitza l'electroforesi en gel per separar proteïnes desnaturalitzades. Les proteïnes són, llavors, transferides fora del gel i es transfereixen a una membrana (normalment feta de nitrocel·lulosa) on es tornen a testar utilitzant anticossos específics per cada proteïna. Un cop s'uneixen anticòs i proteïna, es pot detectar la unió mitjançant diferents mecanismes: color, fluorescència, radiació...

36. Poliacrilamida: és un dels gels més utilitzats amb més freqüència per a realitzar tècniques d'electroforesi, les quals tenen com a objectiu realitzar un anàlisi i/o separació per càrregues i tamany moleculars dels fragments d'aminoàcids o nucleòtids que formen les mostres escollides de proteïnes o àcids nucleics. L'electroforesi en gels amb una matriu de poliacrilamida és una de les tècniques més utilitzades per a caracteritzar mescles complexes de proteïnes. Un avantatge important dels gels de poliacrilamida és que són

químicament inerts, transparents i estables en un ampli rang de PH, temperatura i força iònica.

37. Anticossos: els anticossos (també coneguts com immunoglobulines o, popularment, "defenses") són glicoproteïnes del tipus gamma globulina. Existeixen en forma soluble a la sang o altres fluids corporals dels vertebrats. Disposen d'una forma idèntica que actua com a receptor dels limfòcits B i són utilitzats pel sistema immunitari per identificar i neutralitzar elements estranys al cos, com ara bacteris, virus o paràsits.

38. Inhibidor: els inhibidors enzimàtics són molècules que s'uneixen als enzims i fan disminuir la seva activitat. Per mitjà del bloqueig de l'activitat dels enzims, es pot matar a un patogen i corregir el desbalanç metabòlic; tal com fan moltes drogues, les quals són inhibidors enzimàtics.

39. Film: és la transparència que s'obté al final d'una extracció de proteïnes que conté els resultats del *western blot*.

40. Polimerització: la polimerització és el procés pel qual s'obté un polímer a partir de la repetició d'un component base (monòmer). Els polímers són productes d'alta massa molecular, propietat que els concedeix la característica de ser materials plàstics.

41. Catalitzadors: en química, un catalitzador és una substància que incrementa la velocitat d'una reacció química (catalitzadors positius o promotors) o qui la disminueix (catalitzadors negatius o inhibidors). El catalitzador, que en general està en una quantitat molt menor que els reactius, no es consumeix i es troba sense canvis al final de la reacció.

42. MilliQ: és un tipus d'aigua més pura que l'aigua destil·lada que s'utilitza en el laboratori.

43. Polímer: els polímers són macromolècules (generalment orgàniques) formades per la unió de molècules més petites anomenades monòmers.

44. Ànode: s'anomena ànode l'elèctrode positiu d'una cel·la electrolítica cap on es dirigeixen les càrregues negatives (anions) dins l'elèctrode.

45. Càtode: s'anomena càtode l'elèctrode negatiu d'una cel·la electrolítica cap on es dirigeixen les càrregues positives (cations) dins l'elèctrode.

BIBLIOGRAFIA

JIMENO, Antonio BALLESTEROS, Manuel. *Biología 2 BATXILLERAT*. Projecte La Casa Del Saber. Grup Promotor/Santillana. 2009.

Estudio del funcionamiento del sistema iCAD·CAD en la línea celular U87MG frente al tratamiento con estaurosporina. 2010. Jorge Urresti. UAB.

Introduction to Apoptosis. 2003. Andreas Gewies.

Medline Plus. Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU i Instituts Nacionals de la Salut. <http://medlineplus.gov/spanish>

Morphologic and Biochemical hallmarks of apoptosis. 1999. Antti Saraste i Kari Pulkki.

NEN, Asociación de Padres de Niños Enfermos de Neuroblastoma. 2011. Asociación NEN. www.asociacion-nen.org

Oncologia (butlletí periòdic per a famílies de pacients). Novembre 2011 Número 2.

Programa Argó. 2011. (Inclou tots els documents i informació de les pràctiques que em van proporcionar durant les estades a la UAB).

PubMed. US National Library of Medicine & National Institutes of Health. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Viquipèdia, l'enciclopèdia lliure. 2001. <http://ca.wikipedia.org/wiki/> (consultada en català, castellà i anglès).

AGRAÏMENTS

M'agradaria donar les més sinceres gràcies al Programa Argó per haver-me donat l'oportunitat de formar part de les Estades d'Estiu aquest juliol de 2011.

En elles he pogut gaudir d'una gran quantitat d'avantatges que m'han estat de gran ajuda tant per l'elaboració del treball de recerca com pel meu propi enriquiment personal. M'han permès familiaritzar amb l'entorn universitari, conèixer i treballar en un laboratori universitari amb tècniques i material especialitzat i realitzar recerques més específiques i molt avançades. A més, com que encara no tinc massa clar què estudiar un cop acabat el batxillerat, m'ha ajudat a orientar-me de cara saber què m'agrada i què no.

També m'agradaria agrair l'ajuda i la paciència que m'han ofert les meves tutores, l'Àngels Aregall i la Rosa Boleda, i dedicar-lo molt especialment al meu pare i a l'Aida ja que, siguin on siguin, m'han donat i em segueixen donant la motivació i la força necessària per tirar sempre endavant.

També a la meva mare, per ser-hi sempre.