

Tesi doctoral presentada per En/Na

Albert SANTAMARIA MARTÍNEZ

amb el títol

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

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

Barcelona, 11 de juny de 2009.

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



UNIVERSITAT DE BARCELONA





És veritat que pots convertir coses en boletes de greix? I no ens podries convertir en un lleó?

Isac i Nil



4. RESULTATS

El lleó nas-morat, l'adipòcit i el mort vivent, Isac, Nil i Albert.

4. Resultats

4.1 Caracterització dels tumors *PAC-120*.

Es va dur a terme una caracterització dels tumors *PAC-120* tant funcional com fenotípica. Quant a la caracterització fenotípica dels tumors, es van realitzar assajos de FISH per discriminar cèl·lules humanes i murines en el tumor. La FISH va permetre identificar les cèl·lules murines i confirmar que l'estroma tumoral és completament murí (Figura R1).

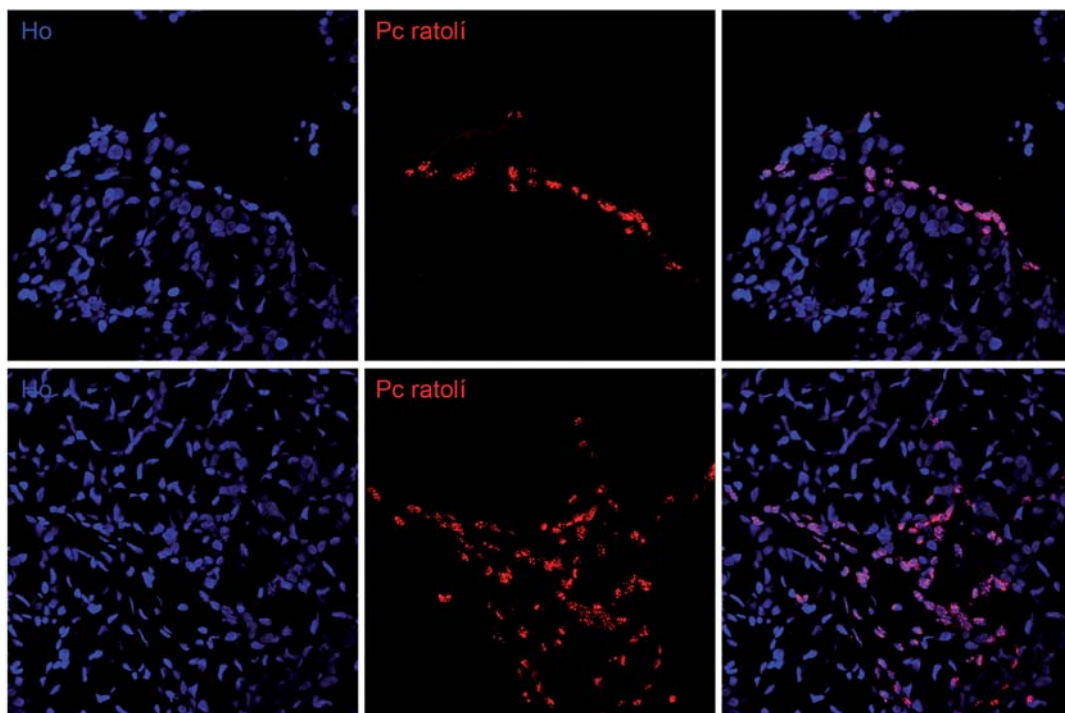


Figura R1: Hibridació in situ fluorescent (FISH) sobre talls parafinats de tumor *PAC-120* amb una sonda pancentromèrica específica murina (en vermell, al centre, Pc). A l'esquerra els nuclis tenyits amb *Ho33342* (en blau) i a la dreta la superposició de les dues imatges.

També es van realitzar tincions d'hematoxilina eosina, PAS i AA així com assajos d'immunohistoquímica per la CK8 i el receptor d'andrògens. Totes aquestes tincions van permetre definir que es tractava d'un adenocarcinoma mucinos amb cèl·lules en anell de segell, de grau *Gleason* entre 8 (4+4) i 10 (5+5), positiu per CK8 i CK18 i positiu també per AR (Figura R2).

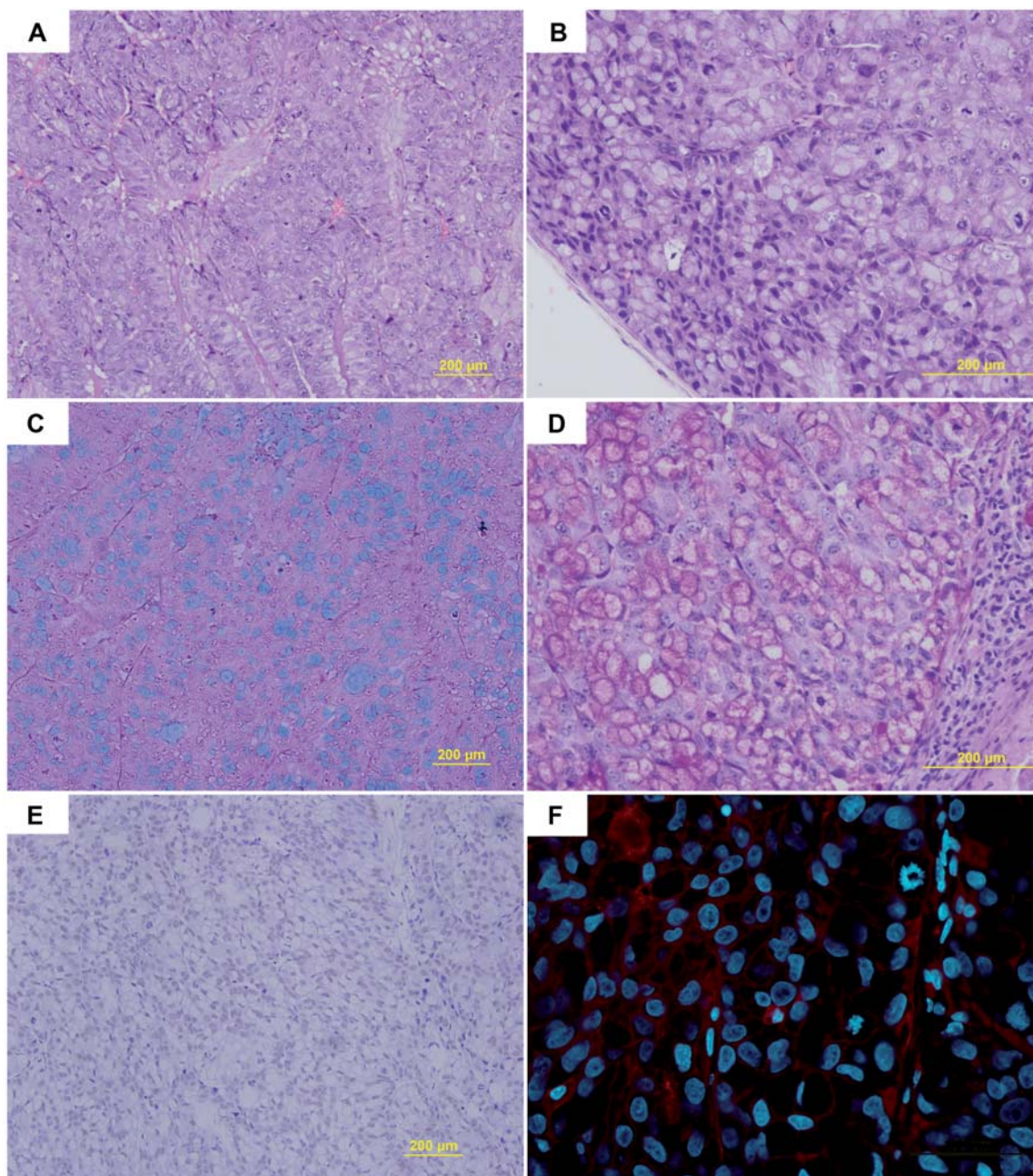


Figura R2: Tincions histològiques de talls parafinats del tumor *PAC-120*. El panell mostra tincions d'hematoxilina-eosina en què s'observen les característiques histològiques del tumor (A) i com aquest presenta una certa encapsulació (B). Les tincions de PAS i AA (C i D) mostren les característiques mucinoses del tumor. Els nuclis de les cèl·lules tumorals són positius pel receptor d'andrògens (E) i el citoplasma per la CK8 (F, en vermell, en blau els nuclis). A totes les imatges poden observar-se diverses figures de mitosi, ja que el *PAC-120* és un tumor amb una taxa de proliferació elevada.

4.1.2 Estudis de castració

Els estudis de castració quirúrgica en ratolins (n=5) van demostrar una aturada del creixement del tumor després de la castració o bé l'absència de creixement del tumor en aquells animals que es van castrar just després de trasplantar el tumor (Figura R3).

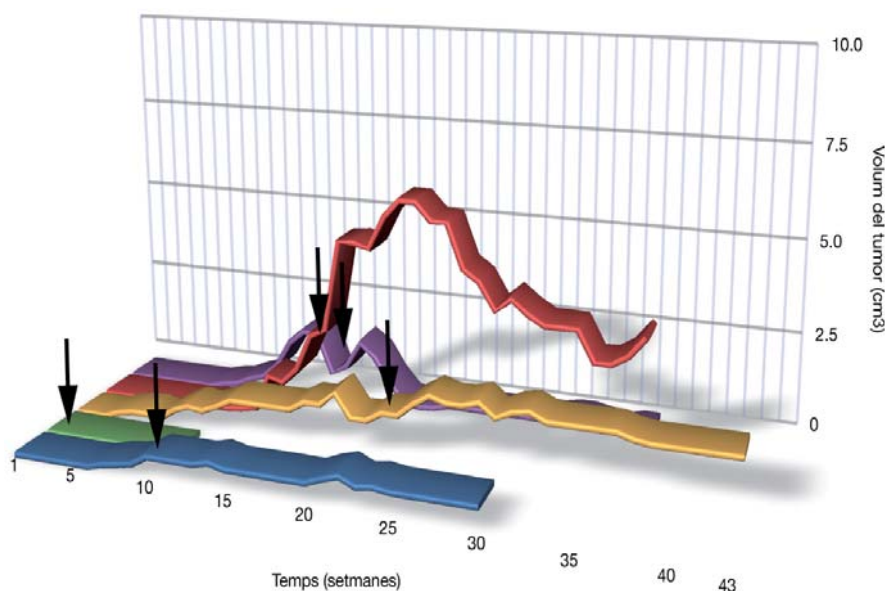


Figura R3: Gràfica de creixement del tumor *PAC-120* després de la castració quirúrgica. Les fletxes indiquen el punt temporal de castració. El creixement del tumor va aturar-se en 2 animals (groc i blau), va disminuir en dos animals (vermell i lila) i el tumor no va arribar a créixer en un d'ells (verd).

Histològicament, als tumors dels animals castrats s'observa una reducció important del component epitelial. A més, la immunohistoquímica pel receptor d'andrògens en aquells animals castrats va revelar una absència total de marcatge nuclear en les mostres analitzades (n=3), mentre que els controls no castrats presentaven un marcatge

abundant (n=4) (Figura R4). Aquests resultats demostren

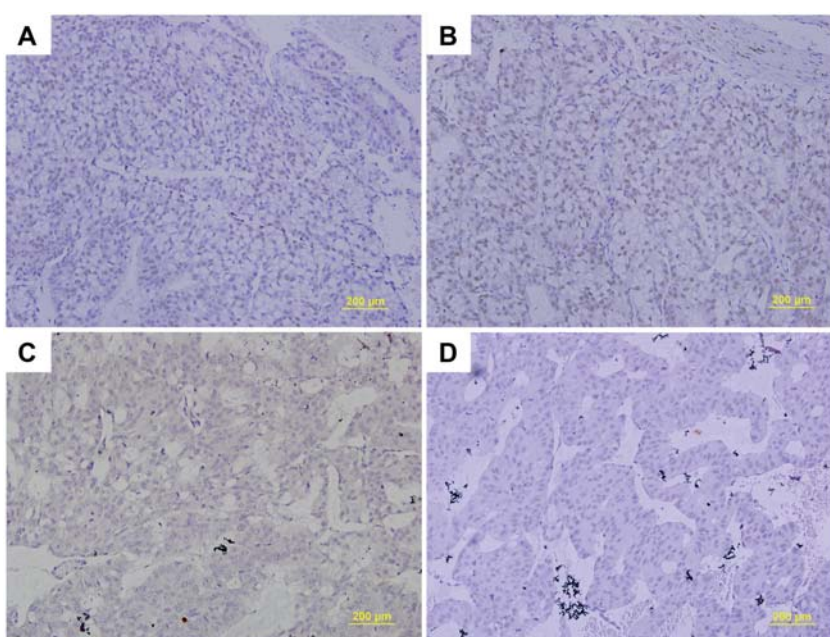


Figura R4: Immunohistoquímica pel receptor d'andrògens en els tumors *PAC-120* de 2 ratolins no castrats (A i B) i en els de 2 ratolins castrats (C i D). Als tumors dels ratolins no castrats el marcatge és clar i nuclear. Als tumors dels ratolins castrats hi ha una absència total de marcatge. Escala: 200 µm

que després de la castració es produeix una pèrdua d'expressió del receptor d'andrògens al *PAC-120*.

D'altra banda es van implantar els tumors en dues femelles per comprovar la seva dependència d'hormones per al creixement. Després de 12 mesos es van sacrificar sense cap indicatiu de creixement del tumor. Tanmateix, l'anàlisi per ecografia als set mesos va

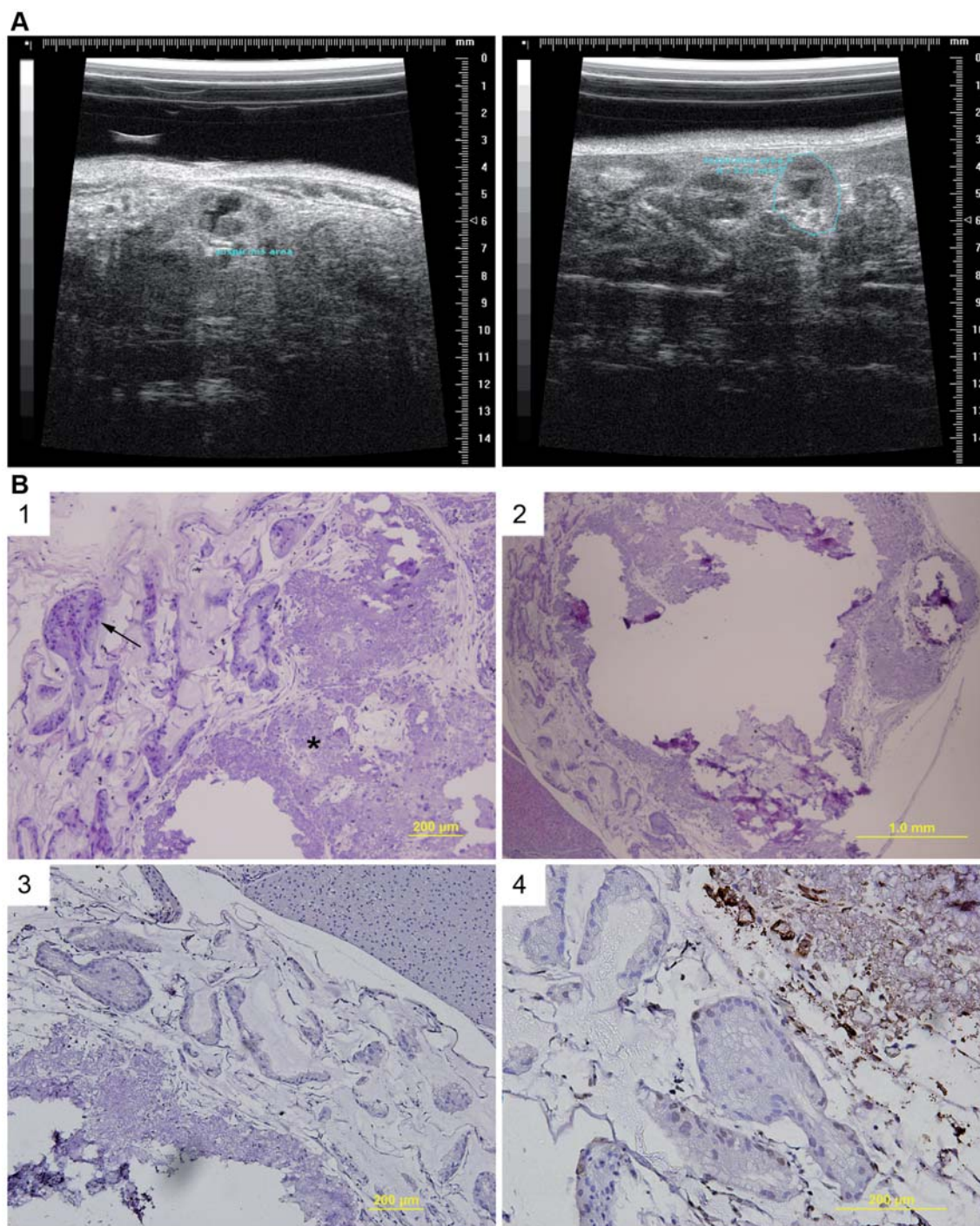


Figura R5: Estudi del tumor *PAC-120* en femelles. Al panell A s'hi mostra una ecografia del teixit subcutani dorsal, zona on 7 mesos abans s'havia implantat el tumor *PAC-120* (regió cerclada, àrea=5,56 mm). Al panell B, la histologia del tumor un any després de la implantació per HE (B1, B2) a diferents augments on s'observa la necrosi general (estrella) però també cèl·lules del tumor (fletxa). A sota, les IHQs per AR (B3), que és negativa, i per p-Smad2 (B4), que marca el nucli d'algunes cèl·lules.

revelar la presència del fragment de tumor implantat després de 10 mesos (Figura R5). També l'examinació postmòrtem va revelar la presència del fragment implantat, que un cop analitzada la histologia del teixit va demostrar que, enmig d'una necrosi generalitzada, encara hi restaven unes poques cèl·lules. Les immunohistoquímiques van demostrar l'absència de marcatge pel receptor d'andrògens i la presència de marcatge en algunes cèl·lules pel p-Smad2. Aquests resultats indiquen que el tumor *PAC-120* necessita els andrògens per créixer però no per sobreviure i per tant són hormonosensibles però no hormonodependents.

4.3 Estudi comparatiu de la població SP al moll d'os dels ratolins *PAC-120* i dels ratolins control: els ratolins amb tumor presenten un increment en el percentatge de cèl·lules de la SP respecte dels animals sense tumor.

Amb l'objectiu d'estudiar els possibles canvis en la població SP del moll d'os dels ratolins que portaven el tumor respecte dels ratolins que no en portaven es féu un estudi comparatiu entre ambdós grups mitjançant la realització d'assaigs de *side population*.

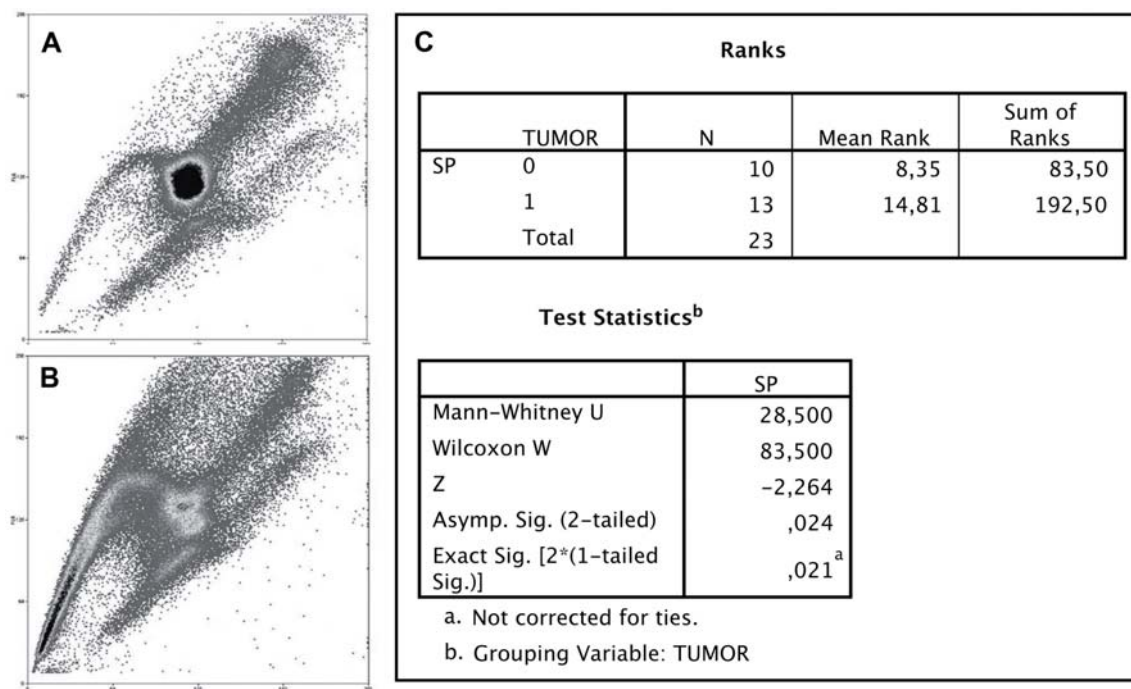


Figura R6: Comparació dels percentatges de cèl·lules de la *side population* als molls d'os dels animals amb tumor i sense tumor. Els molls d'os dels ratolins controls (A, un assaig representatiu) presenten uns percentatges d'SP inferiors als dels ratolins amb tumor (B), que presenten percentatges que poden arribar al 50%. L'anàlisi estadística (C) indica que hi ha diferències significatives entre els dos grups d'animals (Sig < 0,05).

Les anàlisis de *side population* van mostrar que, en general, els ratolins amb tumor presentaven percentatges de cèl·lules de la SP més elevats que els ratolins que no en portaven (Figura R6 A i B). Per tal d'estudiar si hi havia diferències significatives entre el grup d'animals que no portaven el tumor (n=10) i el grup que sí que el porten (n=13) es va realitzar un test de Mann-Whitney. Es tracta d'una variable numèrica contínua i dependent dividida en dos grups no relacionats i no s'assumeix que les dades presentin una distribució normal. Un valor de significació inferior a 0,05 indica que els dos grups presenten percentatges d'SP estadísticament diferents. Els resultats del test indiquen que el grup d'animals que porten el tumor presenten, en conjunt, percentatges de cèl·lules de la SP més elevats que els animals que no porten tumor (Figura R6 C).

La localització del tumor no semblava afectar els percentatges de cèl·lules de la SP al moll d'os dels animals, ja que l'anàlisi dels percentatges d'SP dels molls d'ossos dels animals que portaven el tumor a una determinada localització i la seva comparació amb altres localitzacions no semblava mostrar diferències percentuals significatives.

4.4 Procedència de l'augment de la SP

Per tal d'investigar la procedència de les cèl·lules SP que es trobaven augmentades en nombre al moll d'os dels ratolins portadors de tumors, es va procedir a la seva caracterització. En primer lloc es va voler comprovar si el seu origen era hematopoètic. Per això es va procedir a comprovar la positivitat de les cèl·lules per Cd45, marcador de cèl·lules hematopoètiques. Abans, però, es va haver de valorar si la soca de ratolins amb què es treballava era Cd45.1 o bé Cd45.2. L'anàlisi va demostrar que la soca era Cd45.2 (Figura R7 A), i el marcatge de la població SP va diferenciar dues poblacions clares a les

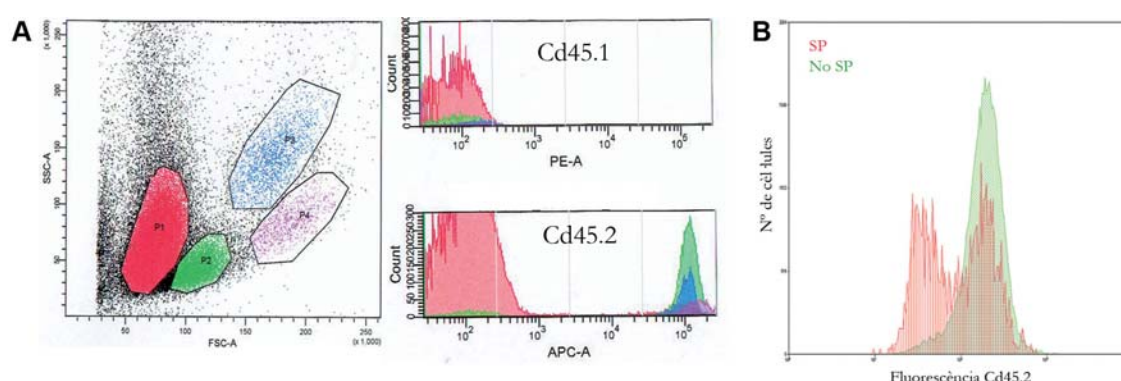


Figura R7: Marcatge amb Cd45. Al panell A, s'hi mostra la determinació de la forma al·lèlica de la soca. A panell B s'hi pot veure el gràfic que representa un marcatge de Cd45.2 sobre una anàlisi prèvia d'SP. El gràfic evidencia la presència de dues poblacions ben diferenciades quant al marcatge de Cd45 a les cèl·lules i, mentre que les no SP són pràcticament en la seva totalitat positives, tot i que es dona un cert solapament de la cua.

cèl·lules de la SP i una de sola a les No SP (Figura R7 B). Tanmateix, tal i com s'observa a la figura, la població SP Cd45 negativa no es pot purificar completament perquè la cua de la població no SP se solapa. L'anàlisi de les diferents poblacions trobades mitjançant la combinació del marcatge SP i el Cd45, va revelar que als molls d'ossos dels ratolins control (sense tumor) la població SP Cd45 negativa representa un valor de mitjana de $18,57\% \pm 1,34\%$ del total, mentre que als animals amb tumor aquesta representa un $21,93\% \pm 4,76\%$ del total (Figura R8). Si bé és cert que aquestes dades no demostren cap variació significativa pel que fa als percentatges de cèl·lules Cd45 negatives als molls d'ossos dels animals amb i sense tumor (la $n=2$ per cada grup), sí que és interessant remarcar que, l'anàlisi de la contribució d'aquestes cèl·lules Cd45 negatives a la SP va revelar que, en el cas dels animals amb tumor, el percentatge mitjà es del $44,18\% \pm 5,27\%$ mentre que en el cas dels ratolins sense tumor aquest valor és del $29,43\% \pm 3,81\%$. És a dir, que la població SP no hematopoètica estava augmentada en els ratolins amb tumor.

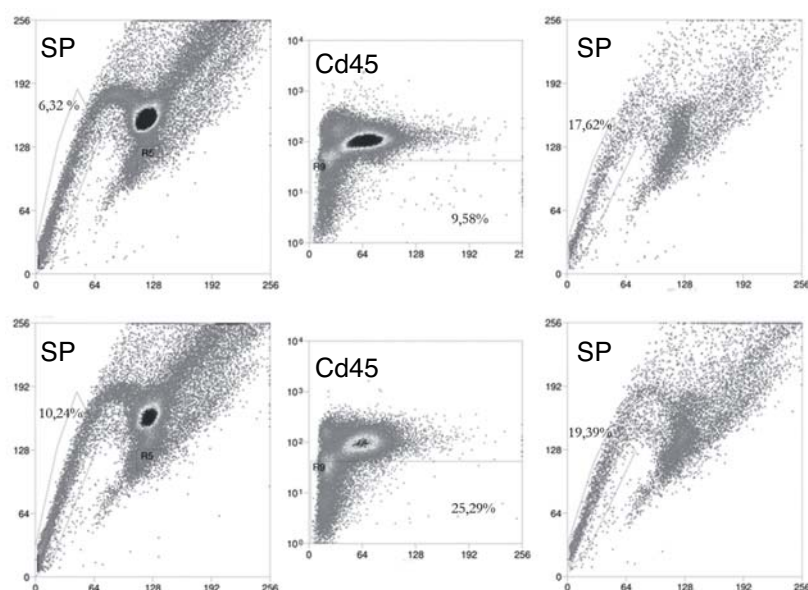


Figura R8: Combinació de l'assaig d'SP (citograma de l'esquerra) i l'immunomarcatge per Cd45 (citograma central) al moll d'os d'un animal sense tumor (superior) i un amb tumor (inferior). Els citogrames de la dreta mostren el perfil i percentatge d'SP de la fracció Cd45 negativa.

Sabent que gran part de la població no era hematopoètica i partint de la hipòtesi que podria tractar-se d'una invasió de cèl·lules del tumor cap al moll d'os o/i una reacció de l'hoste vers la presència del tumor, es va utilitzar una bateria d'anticossos per caracteritzar fenotípicament la població SP d'aquests animals i poder discriminar una població humana. La majoria d'anticossos utilitzats per distingir entre cèl·lules humanes i murines no van donar un marcatge que definís clarament dues poblacions (Taula R1), cosa que podria ser deguda a una baixa concentració antigènica a la superfície d'aquestes cèl·lules o a la no detecció de les mateixes per baix nombre o absència. Els anticossos utilitzats per poder distingir una reacció de l'hoste contra el tumor com Ter-119, marcador eritroblàstic que podia resultar útil per valorar si aquest augment

podia ser degut a un augment d'eritroblasts, tampoc no van resoldre clarament la qüestió a favor d'una hipòtesi o l'altra.

Anticòs	Discriminació	Conjugació	Casa Comercial
CD1a	Negativa	FITC	BecktonDickinson
CD14	Negativa	FITC	BecktonDickinson
CD36	Positiva	FITC	BecktonDickinson
CD45.2	Positiva	APC	BecktonDickinson
CD56	Negativa	PE	BecktonDickinson
CD71	Lleu	FITC	BecktonDickinson
CD80	Negativa	PE	BecktonDickinson
CD83	Negativa	PE	MytleniBiotec
CD133	Negativa	PE	MytleniBiotech
HLA-ABC	Lleu	FITC	Immunotech
HLA-DR	Lleu	PE	Immunotech
Toll R4	Negativa	PE	cBioscience
ABCG2	Negativa	PE	SantaCruz
Pancytokeratin	Positiva	FITC	BecktonDickinson
β 2- μ globulin	Negativa	PE	BioLegend
NK1.1	-	PE	BecktonDickinson
Ter119	-	PE/Cy5	BioLegend

Taula R1: Relació d'anticossos utilitzats per citometria de flux, amb els marcatges que porten conjugats i les seves cases comercials respectives. En els casos dels anticossos que es van utilitzar amb aquest objectiu també s'apunta el grau de discriminació entre poblacions murines i humanes que van permetre. FITC: *fluorescein*; APC: *allophycocyanin*; PE: *phycoerythrin*; Cy5: *cyanin 5*

Els assajos de FISH sobre molls d'ossos de ratolins per comprovar la presència de cèl·lules humanes amb sondes pancentromèriques específicament humanes no va donar resultat, però tampoc no va ser possible hibridar aquestes sondes humanes a altres teixits com el tumor.

Per altra banda, els estudis més estesos per tal de valorar la presència de cèl·lules

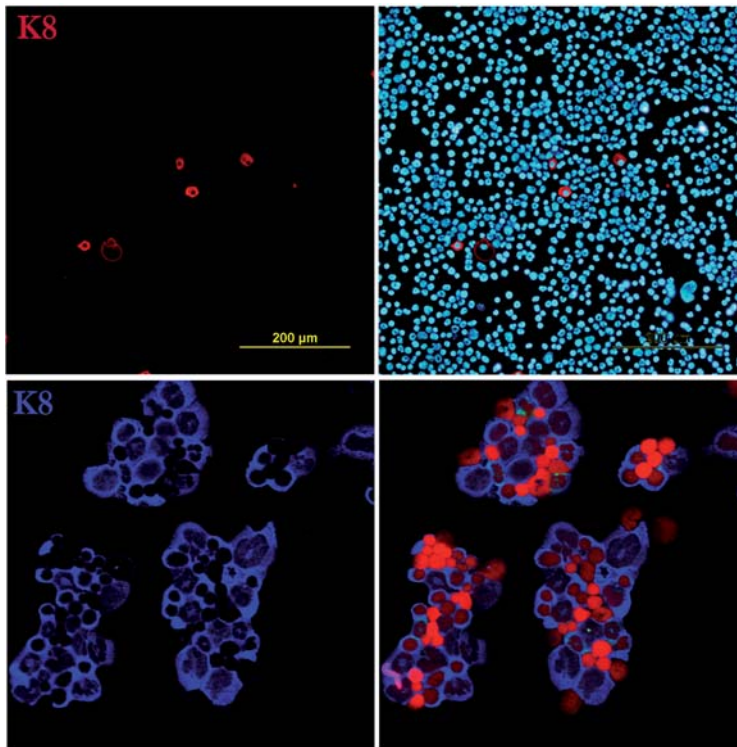


Figura R9: Immunocitofluorescència per la CK8 sobre moll d'os. Les imatges superiors corresponen al citospín del moll d'os d'un ratolí control sense tumor (en vermell la CK8 i en blau els nuclis). La immunofluorescència detecta unes poques cèl·lules que semblen positives, possiblement, però, són cèl·lules plasmàtiques. Les imatges inferiors (a més augments) pertanyen al citospín del moll d'os d'un animal que portava tumor i que presentava un 50% de cèl·lules *SP* al moll d'os (en blau la CK8 i en vermell els nuclis). La immunofluorescència detecta moltes cèl·lules positives, tot i que també se n'observen de negatives.

epitelials (que generalment són considerades d'origen tumoral) al moll d'os es basen en l'ús de citoqueratines per a fer immunomarcats (vegeu la introducció). Per això també es van fer estudis d'aquest tipus que van revelar que, tot i que els animals sense tumor presentaven algunes cèl·lules positives per la citoqueratina 8 al moll d'os, els molls d'alguns dels animals amb tumor presentaven moltes cèl·lules positives per citoqueratina. A més, els animals amb més cèl·lules positives per la citoqueratina 8 eren els que presentaven un alt percentatge de cèl·lules *SP* al moll d'os (Figura R9).

La injecció subcutània de cèl·lules extretes del moll d'os per *flushing* directe i sense purificar d'animals que portaven el tumor a animals controls ($n=7$) no va resultar en el creixement de tumors (0/7) en aquests animals després d'un temps màxim de 14 mesos. Els animals es van sacrificar quan van presentar els primers símptomes d'envelliment. L'analisi postmòrtem no va revelar cap anomalia.

4.5 Presència de DNA humà a moll d'os 4 mesos després de l'exèresi del tumor.

Per tal de comprovar que les CTD a moll d'os no eren cèl·lules circulants sinó que hi havien fet una nidificació específica, es va procedir a fer una extirpació quirúrgica del tumor i deixar vius els animals (n=10) durant un període de quatre mesos, passat el qual es van sacrificar. Es va extreure el DNA del moll d'os de 4 d'aquests animals i es va estudiar la presència

de seqüències específicament humanes *Alu-Sx*. La PCR va confirmar la presència de DNA humà al moll d'os d'aquests animals tal i com es mostra a la figura R10.

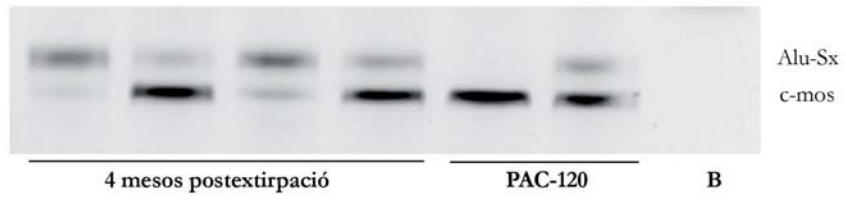


Figura R10 : Anàlisi de seqüències humanes *Alu* i el gen murí *c-mos* per PCR multiplex de DNA genòmic als molls d'ossos de 4 ratolins als quals s'havia practicat l'exèresi del tumor 4 mesos abans i amb 2 ratolins que portaven el tumor en el moment del sacrifici.

També és interessant remarcar que en quatre dels animals el tumor va tornar a créixer a la mateixa regió on s'havia implantat després d'haver-ne fet l'exèresi.

4.6 Generació del *PAC-120* fluorescent per transducció lentiviral *in vivo*

Una estratègia per tal de diferenciar les cèl·lules humanes de les murines al moll d'os dels animals va ser convertir el tumor *PAC-120* en un tumor fluorescent mitjançant la infecció amb lentivirus-GFP⁺, que tenen una major capacitat d'infectar les cèl·lules humanes que les murines. Així es van inocular els lentivirus al tumor tal i com es descriu als materials i mètodes (3.1.5) i el tumor es va anar passant a diversos ratolins. La infecció es va comprovar mitjançant immunofluorescència amb GFP en tumors de tercera generació i es va demostrar la positivitat dels mateixos (Figura R11 A). Tanmateix, no es va aconseguir detectar cèl·lules verdes al moll d'os d'aquests animals, a causa d'una elevada autofluorescència de les cèl·lules del moll d'os i una baixa resolució del sistema GFP (Figura R11 B). Malgrat això, l'anàlisi d'aquests molls d'os van permetre comprovar que, curiosament, la població menys autofluorescent pel canal del verd correspon a la població més SP (Figura R11C).

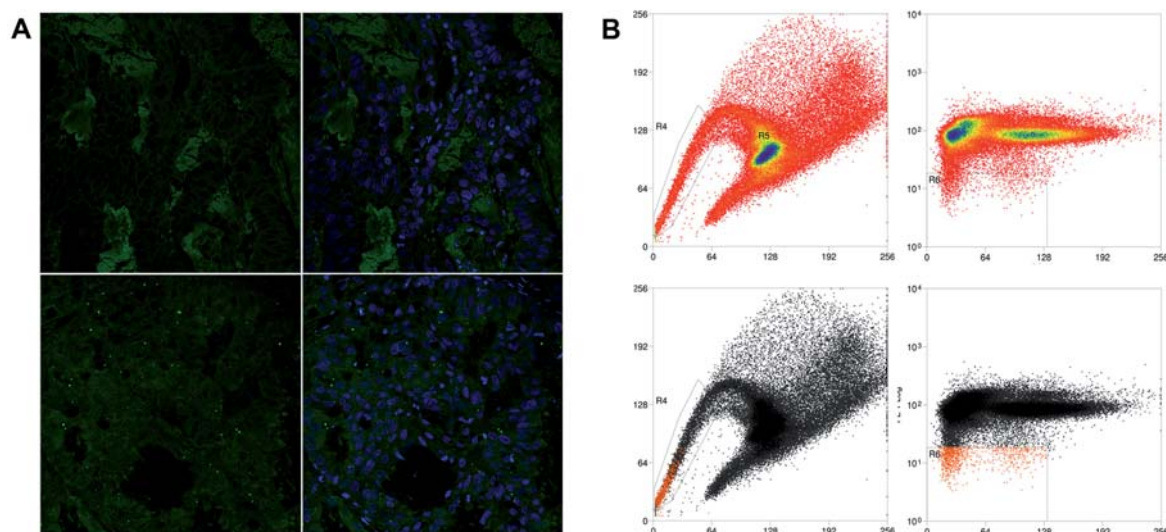


Figura R11: Caracterització del *PAC-120* verd. A la composició A es mostra la immunofluorescència per GFP sobre un tall parafinat d'un tumor verd de tercera generació. Les dues imatges superiors són el control. A la composició B es mostren les anàlisis d'SP fetes amb el moll d'os d'un animal que portava la tercera generació del tumor verd. Noti's que pràcticament és tot fluorescent a causa de l'elevada autofluorescència del teixit. A l'anàlisi inferior (en negre i taronja) pot veure's com la part menys fluorescent correspon a la població que bombeja més Ho342.

4.7 Estudi sobre l'expressió i l'estat de metilació del promotor d'*ABCG2* als tumors *PAC-120*.

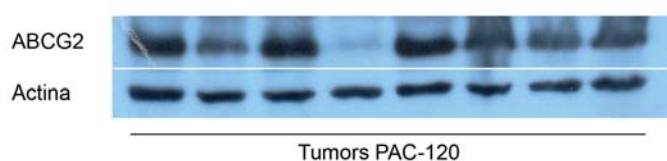


Figura R12: Transferència *western* sobre 8 mostres diferents de tumors de *PAC-120*.

Per tal de conèixer l'expressió de l'*ABCG2* als tumors *PAC-120* es van realitzar PCRs i transferències *western* que van determinar la presència tant de trànscrips com de proteïna (Figura R12). Per tal de conèixer

l'estat de metilació del promotor d'*ABCG2* es va procedir a fer PCRs de metilació i seqüenciació dels productes. Per això es van utilitzar tres tumors del *PAC-120* aleatòriament i es van pulveritzar amb nitrogen líquid i es va procedir tal i com es descriu als materials i mètodes (3.10). La seqüenciació i anàlisi de 5 clons independents (cada un dels quals representa una molècula de DNA) indiquen que el promotor d'*ABCG2* humà en el tumor del *PAC-120* està en gran mesura metilat. A la Figura R13 s'hi representa el nombre d'unitats CG metilades (en negre) i desmetilades (en blanc) al llarg de la seqüència amplificada, que comprèn 69 CGs. La mitjana d'illes desmetilades

del primer tumor és de $4,6 \pm 2,88$, el del segon tumor és de $6,4 \pm 2,19$ i el del tercer és de $4,6 \pm 1,14$. És interessant remarcar que el tractament d'un animal amb injeccions intraperitoneals de 7,5 mg/kg de 5-aza-deoxicitidina reverteix la metilació del promotor, i la mitjana d'illes desmetilades és de $16,8 \pm 18,51$ (Figura R13, PAC19 aza). També es van analitzar dues mostres de dos animals que van ser castrats químicament. Les mostres són del moment del sacrifici, en què s'havia aturat el tractament i el tumor tornava a créixer i la mitjana d'illes desmetilades és de $8 \pm 6,44$ i $5,2 \pm 1,92$ (Figura R13, PAC90HI i PAC80HI).



Figura R13: Mapes de metilació d'una regió de l'illa CpG del promotor d'ABCG2. La regió abarca 69 CGs i en negre es mostren les metilades i en blanc les desmetilades. Els tres primers panells corresponen a tres tumors de tres animals independents, el quart (PAC19 aza) correspon al tumor d'un animal que va ser tractat amb 5-aza-dC i els dos darrers corresponen a tumors recrescuts després d'un tractament de castració química. Noti's que hi ha una regió (CGs 53 i 54) que es manté desmetilada en totes les mostres.

D'altra banda, es va realitzar un estudi de l'estat de metilació global del tumor PAC-120 per immunohistoquímica amb l'anticòs contra la 5-metilcitidina. Aquest estudi es va realitzar en mostres de tumor d'animals castrats ($n=3$) i no castrats ($n=3$) que portaven el tumor. Els resultats de les tincions van indicar que hi havia marcatge al tumor i es va observar que el marcatge era més intens en les mostres dels animals castrats que en les dels no castrats. (Figura R14). Aquests resultats fan pensar que les hormones podrien estar jugant un paper en l'estat de metilació global del tumor i que la

retirada d'andrògens per castració indueix una metilació global de les cèl·lules del tumor.

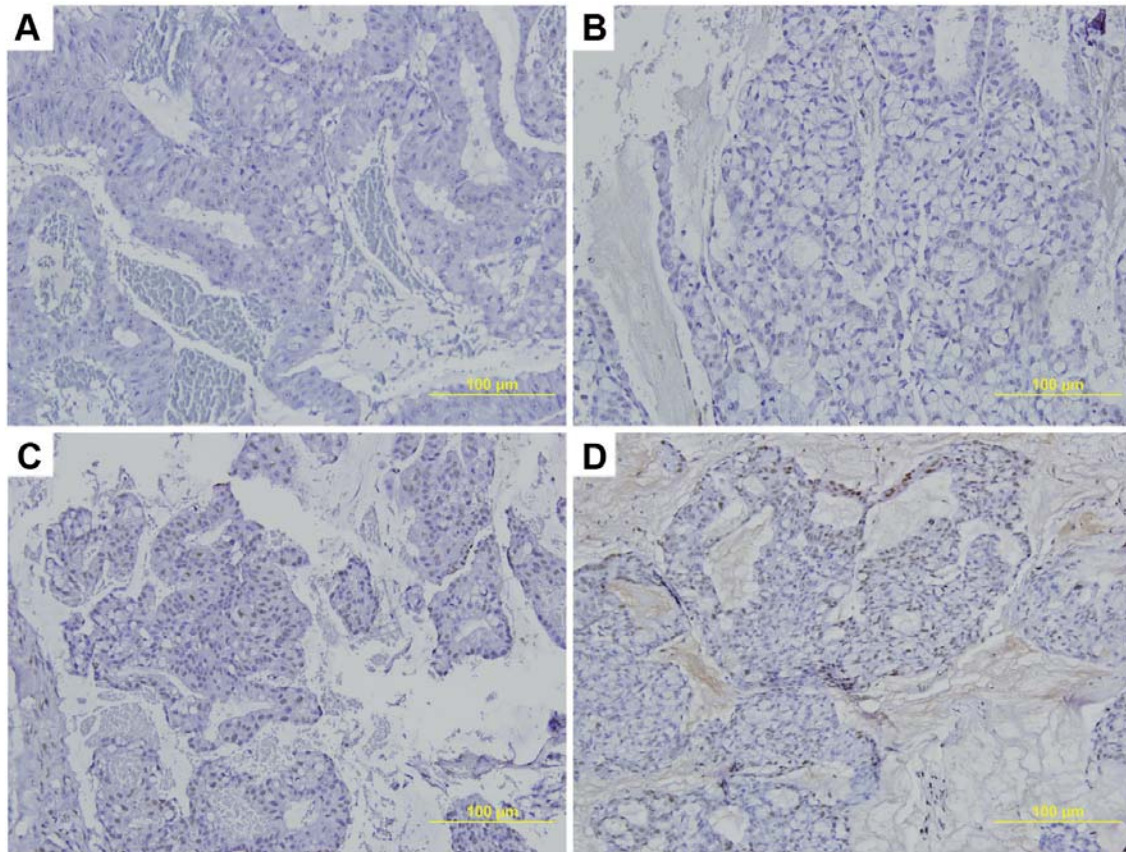


Figura R14: Immunohistoquímica sobre talls de tumor *PAC-120* d'animals no castrats (A i B) i castrats (C i D) per 5-metilcetidina. S'observa un augment general del marcatge en els tumors dels animals castrats.

4.8 Estudi de la població *SP* als tumors *PAC-120*: el tumor *PAC-120* conté cèl·lules de la *SP*.

Per estudiar la possible presència de cèl·lules de la *side population* al tumor del *PAC-120* es va procedir a disgregar aquests tumors tal i com es descriu als materials i mètodes (3.2.1.2) i a fer l'assaig de citometria de la *SP* amb les cèl·lules resultants. En tots els casos estudiats en què es va obtenir prou material per poder fer l'assaig (4/7) es va detectar una població *SP*, amb un percentatge mitjà de $0,62\% \pm 0,57\%$ (Figura R15). Tanmateix, el nombre de cèl·lules que s'obtingueren després de cada disgregació tissular era massa baix per fer una separació cel·lular.

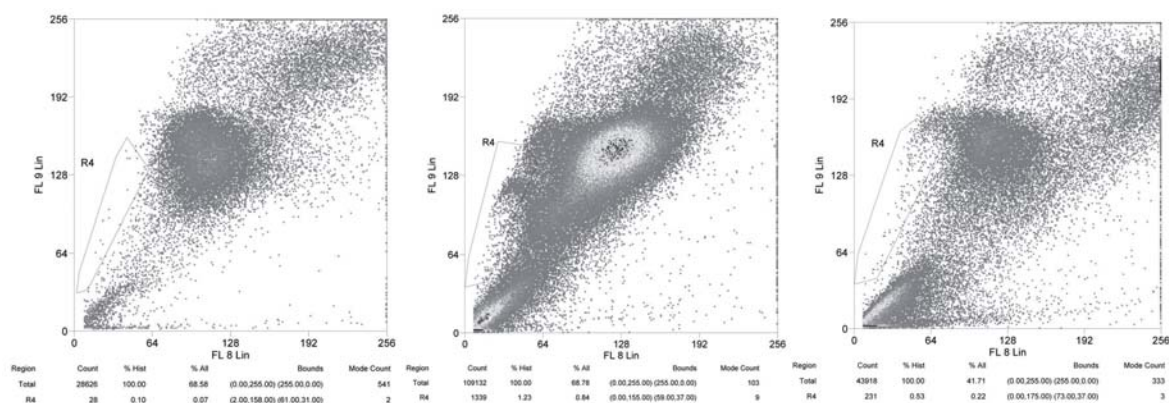


Figura 15: Anàlisi de la *side population* de tres tumors *PAC-120* independents. En els tres casos s'observa una població SP, tot i que la cel·lularitat és baixa i l'heterogeneïtat cel·lular de la mostra molt alta.

4.9 Identificació de cèl·lules de la *side population* als cultius de tumor *PAC-120*. Proves sobre llur capacitat de generar població SP i no SP.

És coneguda la contribució del moll d'os a la formació, manteniment i progressió del tumor, així com a l'establiment de nínxols premetastàtics (vegeu Introducció). El moll d'os participa del procés tumorigènic mitjançant el fenomen de l'angiogènesi i la migració de cèl·lules hematopoètiques cap al tumor per a la formació de l'estroma. Així doncs, es va plantejar un estudi a partir de les diverses observacions independents realitzades, l'estudi les cèl·lules murines del tumor. Per això es va cultivar un tumor de *PAC-120* (Figura R16 A) i es va estudiar l'existència o no d'una població SP i es va comprovar la presència de cèl·lules amb fenotip SP al cultiu (Figura R16 B1). Aquestes cèl·lules es van separar i cultivar i es va expandir el cultiu per tornar a passar-lo pel citòmetre. Aquesta segona vegada el cultiu presentava un perfil SP més accentuat (Figura 16 B2). D'una tercera anàlisi i separació es va separar la TIP (la població a la punta de la cua) i es va subcultivar (Figura R16 B3). També es van treure cèl·lules de la TIP i cèl·lules Ho^{elevat} per estudiar-les per PCR, que va confirmar l'origen murí de les cèl·lules (Figura R16 D). Les qualitats i quantitats dels RNAs d'aquestes dues poblacions es van estudiar amb el Bioanalyzer i es va comprovar que, per 50.000 esdeveniments separats en cada cas, tots dos subgrups presentaven una qualitat semblant pel que fa als seus RNAs però les cèl·lules Ho^{baix} presentaven menys de la meitat de RNA que les Ho^{elevat} (Figura R16 C). Malgrat que aquests resultats inicials podrien interpretar-se com el resultat d'una baixa activitat transcripcional d'aquestes cèl·lules, estudis posteriors no veieren recolzada estadísticament aquesta interpretació.

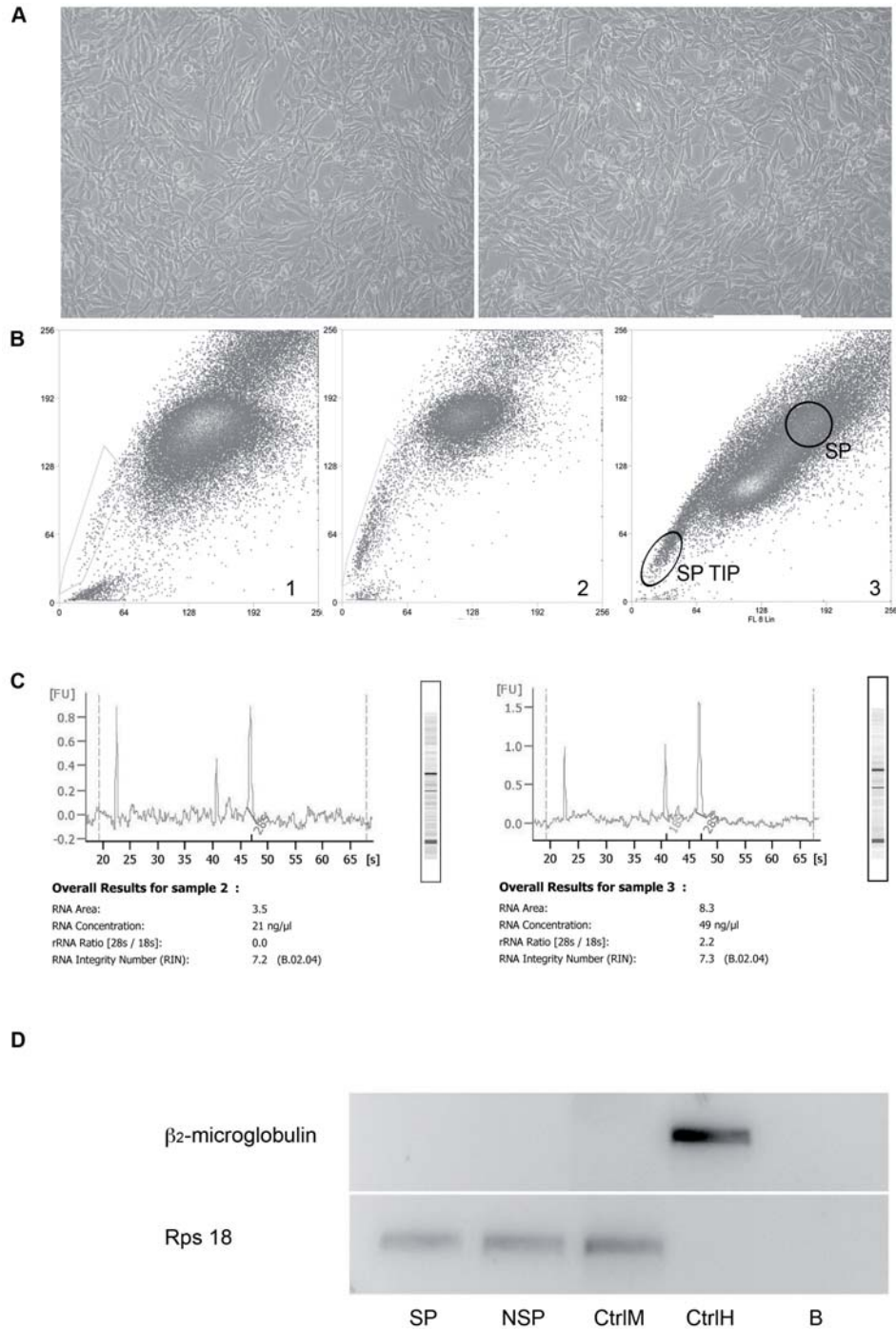


Figura R16: Procés de caracterització de les cèl·lules estromals del tumor. Al panell A, dues imatges del cultiu a partir del qual es van fer els assajos. Al panell B es mostren els tres citogrames de la SP obtinguts de les tres separacions cel·lulars consecutives de cèl·lules SP del cultiu. A B3 s'indiquen les dues poblacions que es van separar (50.000 cèl·lules en cada cas) per extreure RNA. A C es mostren els electroferogrames de RNA obtinguts amb el 2100 Bioanalyzer. El panell de l'esquerra correspon a l'RNA extret de 50.000 cèl·lules SP i el de la dreta correspon a l'RNA extret de 50.000 cèl·lules de la fracció no SP. La imatge D mostra la caracterització per PCR de les fraccions separades amb encebadors específics humans (β 2-microglobulina) i murins (rps18). S'inclouen el control murí (CtrlM) i humà (CtrlH) en cada cas.

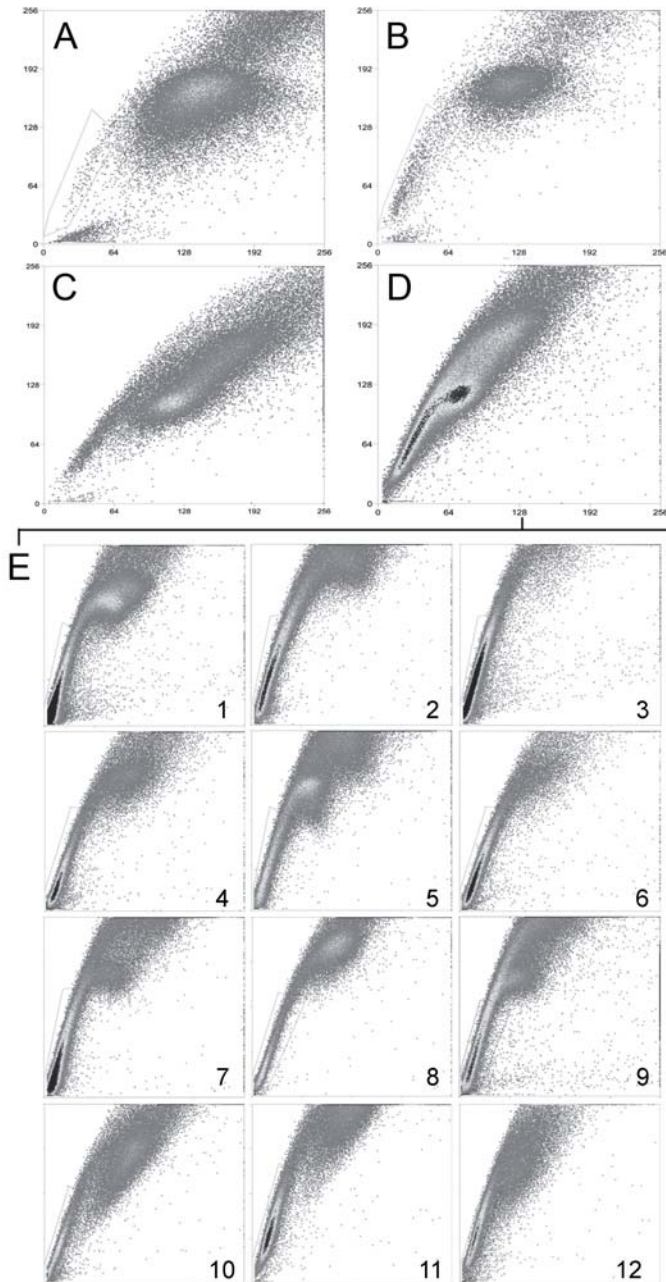


Figura R17: Anàlisi de la *side population* de 12 clons obtinguts a partir de cultius del tumor *PAC-120* i després de 3 separacions per SP consecutives. La progressió fins a la separació d'una sola cèl·lula es mostra als citogrames A-D. Al panell E es mostren els perfils dels 12 clons expandits. Cada clon presenta un perfil diferent, amb un valor percentual de SP màxim de 85,17%, i un mínim de 22,81%.

El cultiu de la segona separació de SP també es va expandir i es va tornar a analitzar per citometria per estudiar la seva població SP. En aquest cas es va comprovar com pràcticament tota la població cel·lular estudiada s'havia convertit en SP (Figura R16). Per tal, però, de purificar al màxim la població es va procedir a fer una separació de cèl·lula única en una placa de 96 pous. Quinze d'aquests clons van créixer en qüestió de dues setmanes i es van amplificar en flascons fins tenir prou cèl·lules per fer els subsegüents estudis de comprovació del fenotip SP. Aquests van demostrar que els clons presentaven diferències pel que fa al tant per cent de cèl·lules SP que presentaven, cosa que indica que la població és heterogènia quant al seu fenotip SP, i pel que fa a la capacitat de donar lloc a cèl·lules amb i sense aquest (Figura R17). L'addició de verapamil inhibeix parcialment la població (en funció del clon) i genera una població no SP més clara, cosa que indica que l'assaig ha arribat a un punt de saturació (Figura R18).

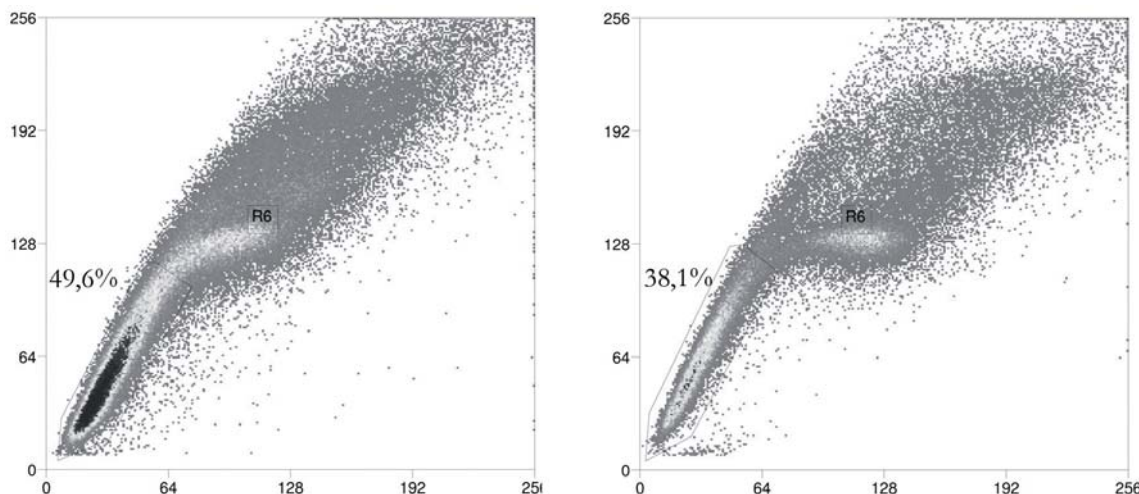


Figura R18: Efecte de l'addició de l'inhibidor verapamil a un dels clons. Al citograma de l'esquerra es mostra la tinció SP sense l'inhibidor i a la dreta amb el verapamil. Noti's que amb l'inhibidor s'aconsegueix, no només una disminució del percentatge de la SP sinó també una saturació major de l'assaig amb un augment de la població no SP.

4.10 Caracterització de les variants d'*Abcg2* en els clons SP: els clons expressen les variants 1A i 1B, però no la 1C.

Per veure quines isoformes d'*Abcg2* expressaven els clons, i per estudiar la possible relació entre la presència d'una variant i el fenotip SP es van fer estudis de PCR. Es van utilitzar els encebadors prèviament descrits pel grup de Sorrentino i col·laboradors,¹⁹⁶ i es va trobar que les cèl·lules expressaven les formes 1A i 1B però no la 1C (Figura R19). Els resultats no van permetre concloure l'existència de cap relació entre la presència d'unes determinades isoformes i el fenotip SP.

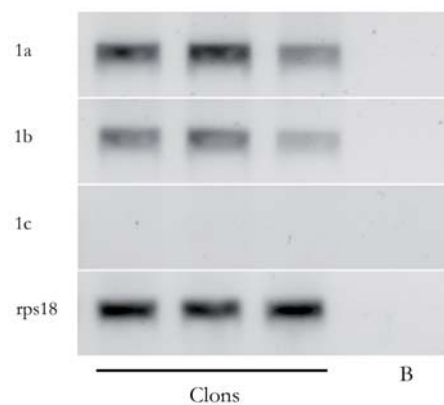


Figura R19: Anàlisi de l'expressió de mRNA de les diferents isoformes d'*Abcg2* a tres clons SP per PCR.

4.11 L'illa CpG de la putativa regió promotora de la forma 1b de l'*Abcg2* està desmetilada en els clons.

Malgrat que la regió promotora de la forma 1A no conté cap illa CpG, es va estudiar *in silico* l'existència d'altres possibles regions promotores. Els programes utilitzats donaven una predicció amb una probabilitat (*score*) elevada (Promoter 2.0= 1.1,

Proscan=84.0) en una regió que contenia una illa CpG (ObsExp= 0.93), i que estava situada adjacent a 5' del primer exó alternatiu descrit com a 1b. Amb l'objectiu d'estudiar el seu estat de metilació en les poblacions SP i no SP murines analitzades es van dissenyar uns encebadors que la comprenguessin per tal d'amplificar-la un cop feta la reacció de bisulfitació. En el cas dels clons de cèl·lules SP murines procedents del tumor *PAC-120*, les anàlisis van revelar que l'illa està totalment desmetilada tant en les cèl·lules SP com en les no SP (Figura R20).

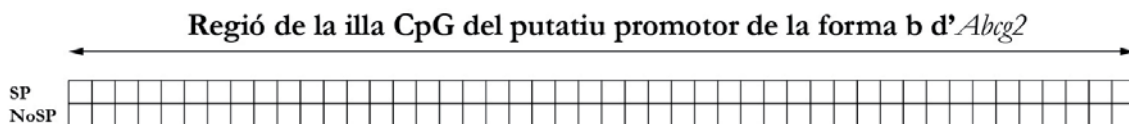


Figura R20: Mapa de metilació d'una regió de l'illa CpG de la putativa regió promotora de la forma b d'*Abcg2*. Les mostres corresponen a cèl·lules del clon 1 separades en funció del seu fenotip SP.

4.12 Anàlisi dels perfils gènics de la *side population*

Per tal d'estudiar els perfils gènics de la població SP en una població purificada a partir dels clons establerts i, d'altra banda, obtenir informació general de l'estroma del model *PAC-120*, es va procedir a fer una separació cel·lular amb el MoFlo per fer estudis de microxips de cDNA.

Es van incloure a l'estudi tres rèpliques, és a dir tres clons, per tal de comparar els perfils gènics de la població H_o^{baix} de cada clon amb la seva població no SP o H_o^{elevat} . Per això es van escollir tres clons amb percentatges d'SP similars ($53,19\% \pm 6,17\%$), i es va procedir a fer un assaig d'SP i separar uns 300.000 esdeveniments de cada població. El RNA extret es va quantificar i es va valorar la seva qualitat per tal d'assegurar la validesa dels estudis amb microxips.

Between-Subjects Factors

		N
SP	,00	6
	1,00	6
EXTRAC	1,00	6
	2,00	6

Tests of Between-Subjects Effects
Dependent Variable: CRNA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	14540,667(a)	3	4846,889	5,628	,023
Intercept	81345,333	1	81345,333	94,450	,000
SP	833,333	1	833,333	,968	,354
EXTRAC	9747,000	1	9747,000	11,317	,010
SP * EXTRAC	3960,333	1	3960,333	4,598	,064
Error	6890,000	8	861,250		
Total	102776,000	12			
Corrected Total	21430,667	11			

a R Squared = ,678 (Adjusted R Squared = ,558)

Taula R2: Anàlisi de la variància de la concentració d'RNA extret del mateix nombre de cèl·lules SP i no SP. Es valora si són o no SP (SP) i l'extracció (EXTRAC). La significació és $<0,05$ per la variable extracció, però no hi ha diferències pel que fa a la concentració.

Atès que en alguns casos durant aquest treball hom havia observat que les cèl·lules SP donaven una quantitat de RNA menor tot i haver fet la separació del mateix nombre de cèl·lules SP i no SP es va valorar si l'anàlisi estadística permetia concloure que hi havien diferències entre la quantitat d'RNA extret de les cèl·lules SP i les no SP. Per això es va analitzar 12 extraccions de RNA, totes procedents de separacions cel·lulars de 300.000 cèl·lules cada una. Sis corresponien a SP i les altres sis a no SP. Atès que les extraccions corresponien a dos experiments independents, i es van observar diferències pel que fa a la concentració d'RNA obtingut en les diferents extraccions, es van estudiar en blocs i es va fer una anàlisi de la variància mitjançant una taula d'ANOVA. Els resultats indiquen que, tot i que hi ha diferències entre les diferents extraccions, no es pot concloure que hi hagin diferències estadísticament significatives pel que fa a la quantitat del RNA a les mostres SP respecte de les no SP (Taula R2).

4.13 Anàlisi dels *microarrays*: comparació dels perfils d'expressió gènica de les cèl·lules Ho^{low} amb els de les cèl·lules de la Ho^{high}

El preprocessament de les dades per tal de normalitzar els valors obtinguts de l'escaneig dels xips d'Affymetrix va generar els gràfics que es mostren a la figura R21. Un cop feta l'anàlisi estadística dels resultats dels xips es va obtenir la comparació dels perfils d'expressió gènica de les cèl·lules Ho^{baix} (SP) i les Ho^{elevat} (No SP), que en llenguatge matemàtic va anomenar-se anàlisi de No SP *vs* SP. Els resultats que es van obtenir van donar un llistat de 1874 gens, l'expressió dels quals variava entre els dos grups comparats. El valor màxim de *Fold change* va ser de 0,90558867 i el p-valor ajustat màxim és 0,00828343. A la taula R3 es mostra un llistat amb el nombre de gens regulats

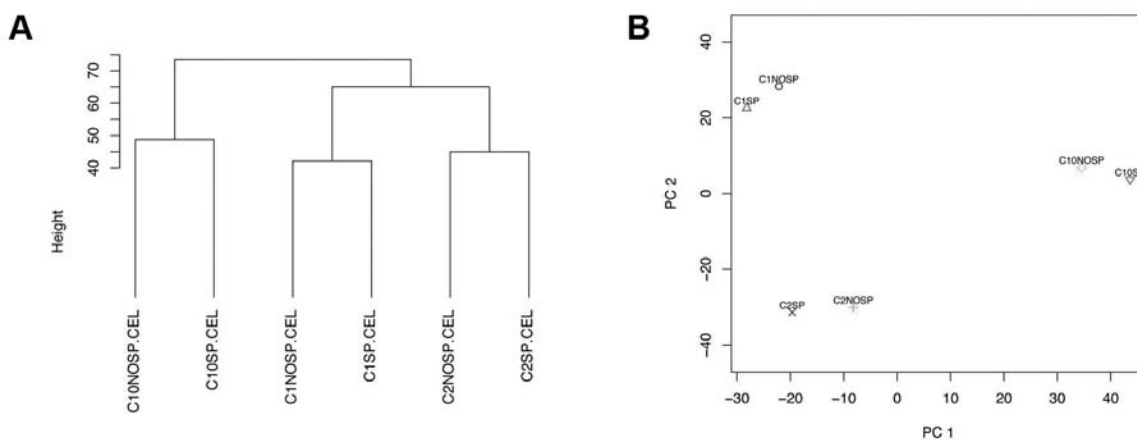


Figura R21: Anàlisi de preprocessament estadístic de les dades dels microxips. Es mostra l'agrupament jeràrquic de les mostres dels xips amb les dades normalitzades (A) i el gràfic de components principals a partir dels valors crus que mostra de quina manera s'agrupen les dades (B).

Anàlisi	Nº de gens (No SP vs SP)
Regulats a l'alça B>0	42
Regulats a la baixa B>0	0
Regulats a l'alça p-valor ajustat <0,01	43
Regulats a la baixa p-valor ajustat <0,01	0
Regulats a l'alça p-valor ajustat <0,25	83
Regulats a la baixa p-valor ajustat <0,25	30
Regulats a l'alça p-valor <0,01	79
Regulats a la baixa <0,01	26
Regulats a l'alça p-valor <0,05	132
Regulats a la baixa p-valor <0,05	192

Taula R3: Nombre de gens que es poden anomenar-se gens expressats diferencialment seguint els criteris descrits a la columna esquerra.

a l'alça i a la baixa depenent de l'anàlisi feta i el punt de tall. A la taula R4 es mostren els primers 47 gens, que tenen un p-valor ajustat igual o inferior a 0,05. Com pot observar-se al llistat, tots els gens corresponen a gens dels grups d'histones 1 i 2 i tots estan sobreexpressats a les cèl·lules Ho^{baix} respecte de

les Ho^{elevat} (la infraexpressió s'indica amb valors de *fold change* negatius)

Taula R4: Llistat de gens amb valors d'expressió significativament diferents entre SP i no SP segons l'anàlisi estadística. S'hi indica el símbol del gen, la identificació (ID), el logaritme del *fold change* (logFC), la t de l'estadístic, el p-valor i el p-valor ajustat, la B i el *fold change* (FC). Noti's que tots els gens de la llista estan sobreexpressats a la població SP respecte de la no SP.

Símbols	ID	logFC	t	P-valor	P-v ajustat	B	FC
Hist2h4	10500333	0,90558867	8,89627832	1,82E-05	0,00828343	3,47035874	0,90558867
Hist1h2bp	10408210	0,83869667	8,39077733	2,81E-05	0,00828343	3,07169907	0,83869667
Hist1h2bp	10403978	0,84846667	7,96362227	4,13E-05	0,00828343	2,71385557	0,84846667
Hist1h2bp	10408070	0,85875067	7,80029832	4,80E-05	0,00828343	2,57166666	0,85875067
Hist1h2ao	10408072	0,71813333	7,74172711	5,07E-05	0,00828343	2,51992767	0,71813333
Hist1h2ao	10404045	0,71973333	7,68612644	5,34E-05	0,00828343	2,47044261	0,71973333
Hist1h2ao	10408094	0,69295	7,67198837	5,41E-05	0,00828343	2,45780176	0,69295
Hist1h2an	10408085	0,720425	7,64379567	5,56E-05	0,00828343	2,43252428	0,720425
Hist1h2ao	10408111	0,71582333	7,63456146	5,61E-05	0,00828343	2,42422449	0,71582333
Hist1h2ao	10408118	0,715621	7,63249675	5,62E-05	0,00828343	2,42236733	0,715621
Hist1h2ao	10403955	0,71164667	7,62353343	5,67E-05	0,00828343	2,41429915	0,71164667
Hist1h2ao	10403938	0,71456667	7,6214309	5,68E-05	0,00828343	2,41240522	0,71456667
Hist1h2bp	10403980	0,84195167	7,6086408	5,75E-05	0,00828343	2,40087273	0,84195167
Hist1h2af	10404026	0,69504667	7,48732292	6,45E-05	0,00833781	2,29051057	0,69504667
Hist1h2ak	10408077	0,708462	7,45229179	6,67E-05	0,00833781	2,25831263	0,708462
Hist2h3b	10494405	0,63485667	7,25372753	8,10E-05	0,00913091	2,07296052	0,63485667
Hist1h2bp	10403948	0,80627433	7,14562068	9,01E-05	0,00913091	1,9699777	0,80627433
Hist1h3e	10408202	0,64210667	7,14015959	9,06E-05	0,00913091	1,96473615	0,64210667
Hist2h2aa1	10494395	0,65144333	7,06005574	9,82E-05	0,00913091	1,88741423	0,65144333
Hist2h2aa1	10500329	0,72191333	7,0056758	0,00010374	0,00913091	1,83445198	0,72191333
Hist2h3b	10404049	0,62408333	6,99711307	0,00010465	0,00913091	1,82607754	0,62408333
Hist2h2ac	10500324	0,66192333	6,95130568	0,00010962	0,00913091	1,78111515	0,66192333
Hist2h2aa1	10494390	0,70562667	6,90305204	0,00011515	0,00913091	1,73345445	0,70562667
Hist2h3b	10404065	0,60587333	6,86128471	0,00012019	0,00913091	1,69195259	0,60587333
Hist1h3c	10408239	0,6089	6,81230863	0,00012641	0,00913091	1,64299305	0,6089
Hist2h3b	10494402	0,58966667	6,71727916	0,00013951	0,00913091	1,54708022	0,58966667
Hist1h2bm	10403943	0,75770067	6,71206557	0,00014027	0,00913091	1,54178297	0,75770067
Hist1h3i // Hi	10408083	0,61093333	6,69296804	0,00014309	0,00913091	1,52234754	0,61093333
Hist1h3g	10404028	0,58936	6,66308063	0,00014765	0,00913091	1,49183192	0,58936
Hist2h2aa2	10409220	0,67701667	6,65371855	0,0001491	0,00913091	1,48224805	0,67701667
Hist1h3h	10403941	0,59645667	6,64141061	0,00015104	0,00913091	1,46963034	0,59645667
Hist1h3i	10408246	0,58255667	6,53558241	0,00016894	0,00989333	1,36028078	0,58255667
Hist1h4b	10404067	0,66400833	6,4672075	0,00018173	0,01022675	1,28880674	0,66400833
Hist1h2an	10494386	0,639232	6,44786844	0,00018554	0,01022675	1,26847279	0,639232
RP23-38E20.	10403959	0,73766367	6,35444144	0,00020524	0,01059185	1,16949874	0,73766367
RP23-38E20.	10408087	0,73766367	6,35444144	0,00020524	0,01059185	1,16949874	0,73766367
Hist1h4b	10408243	0,666631	6,33717383	0,00020912	0,01059185	1,15107076	0,666631
Hist1h4m	10403957	0,64766167	6,1800753	0,00024845	0,01193845	0,98145716	0,64766167
Hist1h4m	10408092	0,64766167	6,1800753	0,00024845	0,01193845	0,98145716	0,64766167
Hist1h1b	10408081	0,875599	5,78173893	0,00038994	0,01790598	0,53521059	0,875599
Hist1h4k	10408074	0,598579	5,77727051	0,00039175	0,01790598	0,53058816	0,598579
Gprc5a	10542335	0,60914833	5,2613237	0,00072505	0,03235097	-0,08407757	0,60914833
Tnfaip3	10368144	0,610773	4,91722886	0,00111538	0,0486097	-0,51686236	0,610773
Rel	10384725	0,472007	4,88473299	0,0011627	0,04918496	-0,55870615	0,472007
Dusp1	10449284	0,493635	4,87250291	0,00118107	0,04918496	-0,57449793	0,493635
Hist1h2bh	10408197	0,562916	4,76310688	0,00136018	0,05541244	-0,71681164	0,562916

4.14 Anàlisi dels *microarrays* 2: identificació de gens de les cèl·lules Ho^{baix} amb valors elevats

Independentment de les anàlisis estadístiques de comparació de l'expressió entre les cèl·lules Ho^{baix} i les Ho^{elevat}, i atès que les variacions entre els valors de les cèl·lules SP i les no SP eren baixos, es van valorar els resultats dels arrays a partir de les dades crues dels valors normalitzats obtinguts de l'escaneig dels xips de les mostres Ho^{low}. Aquesta anàlisi va permetre evidenciar gens amb valors elevats relacionats amb cèl·lules mare de tipus estromal i amb la seva capacitat d'invasió amb valors elevats. A la taula R5 se'n fa una relació, mostrant-hi la mitjana dels valors de les tres mostres Ho^{baix} i el coeficient de variació ($\sigma/\bar{x} \cdot 100$). A la taula R4 també es mostren els valors d'alguns gens relacionats amb la via del TGF β i alguns transportadors ABC, els més expressats dels quals als clons analitzats són *Abce1* i *Abcf2*.

Aquests llistats de valors crus normalitzats també van sotmetre's a l'anàlisi del programa *Ingenuity Pathways* per tal de trobar quines vies estaven més representades en aquests xips. Es van triar dos punts de tall diferents per realitzar l'anàlisi. La figura R22 mostra la representació de les diferents vies en el conjunt de les mostres i la seva variació en funció del punt de tall.

Gen	Expressió SP	Coef Variació
Cèl·lules multipotents estromals		
Itgb1	10,862	1,022
Thy-1	11,372	4,792
Cd81	10,679	2,837
Sca-1	11,782	1,239
Vim	12,345	2,187
Cd44	8,797	2,683
Vcam1	9,503	4,819
Alcam	8,444	7,198
Transportadors ABC		
Abcc1	8,956	6,554
Abce1	10,341	0,812
Abcf1	8,696	0,966
Abcf2	10,41	1,326
Abcg2	7,362	1,073
Invasió		
Mmp-2	10,549	10,45
Mmp-14	10,264	1,494
Timp-1	11,099	8,997
Timp-2	10,14	3,075
Via del TGFβ		
TGF β 1	9,365	9,514
Ctgf	10,111	13,26
SerpinF1	11,504	3,421
Serpinb6	10,194	0,942
Col1a1	11,978	3,314
Col1a2	12,259	2,08
Tgif1	9,584	2,039
Smurf1	9,074	1,673
Raf1	9,12	0,966
Jun	9,226	7,602
MapK1	9,729	1,05
Map2K2	9,66	1,196
Smad1	8,085	4,786
Smad2	7,571	1,576
Smad3	8,873	1,516
Smad4	9,51	1,606
Smad5	7,888	2,211
Smad7	9,081	3,421

Taula R5: Valors de grups de gens relacionats amb cèl·lules multipotents estromals i la seva capacitat d'invasió, transportadors ABC, i gens relacionats amb la via del TGF β . El valor central indica la mitjana dels valors SP dels tres clons analitzats i a la dreta s'hi indica el coeficient de variació ($\sigma/\bar{x} \cdot 100$).

Es va estudiar per citometria la presència de marcatge per CD45, marcadors de cèl·lules hematopoètiques, Sca-1 i CD81/TAPA-1, marcadors de cèl·lules progenitores, en diferents clons (n=3), els dos primers conjuntament amb l'assaig d'*SP*. Els resultats, que es mostren a la figura R23A, indiquen que les cèl·lules són Cd45⁻ Sca-1⁺ Cd81⁺. Observi's que, tot i que hi ha una població *SP* i una població no *SP*, el marcatge amb els diferents anticossos és homogeni, és a dir que marca totes les cèl·lules analitzades, siguin Ho^{baix} o Ho^{elevat}.

Per immunofluorescència es va estudiar la presència de les proteïnes Sca-1, α SMA i p-Smad2 en dos clons diferents (Figura R23B).

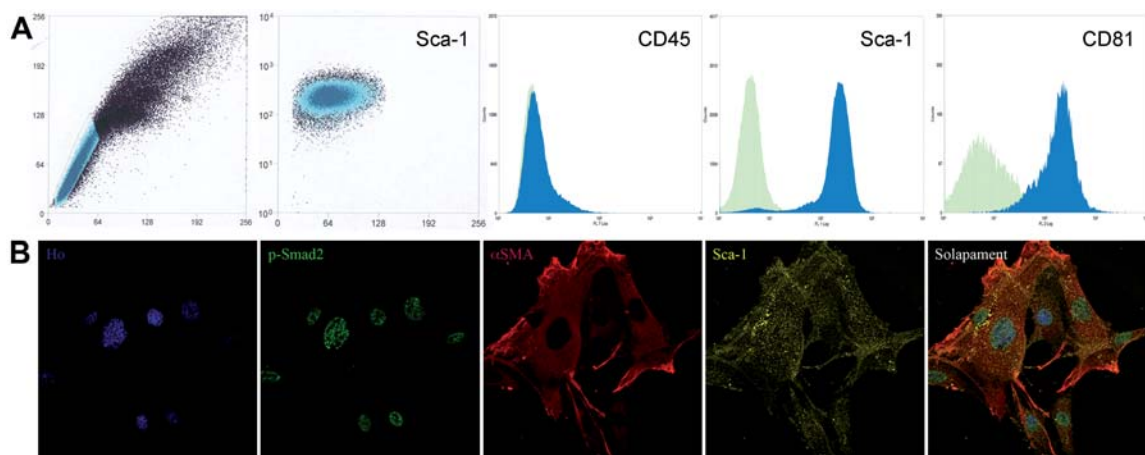


Figura R23: Fenotipiació dels clons SP mitjançant citometria de flux i immunofluorescència. Al panell A es poden observar els marcatges per citometria de flux, CD45⁻ Sca-1⁺ Cd81⁺. Noti's que tota la població cel·lular és positiva o negativa pels marcadors usats independentment que sigui Ho^{baix} o Ho^{elevat}. La immunofluorescència mostra la positivitat per p-Smad2, α SMA i Sca-1 (B).

Per transferència *western* es van estudiar les proteïnes relacionades amb invasió com MMP-14, que és responsable de l'activació de MMP-2, també. (Figura R24A). Així mateix, es va voler comprovar, per transferència *western*, la presència als tumors *PAC-120* d'algunes proteïnes dels gens trobats als clons, com Sca-1 (Figura R24B).

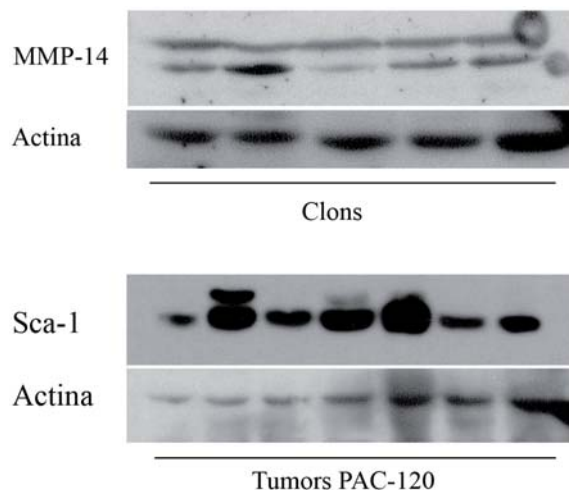


Figura R24: A la part superior de la figura s'hi mostra la transferència *western* per MMP-14 sobre 5 clons diferents. L'anticòs reconeix la forma inactiva (banda superior) i l'activa (banda inferior) de la proteïna. A la part inferior de la figura s'hi mostra la transferència *western* per Sca-1 sobre 7 tumors diferents de *PAC-120*.

4.16 Anàlisi de l'activació de la via del TGFβ en els clons SP. Els clons secreten TGFβ de manera autocrina.

L'anàlisi detallada del conjunt total de gens més expressats dels xips de cDNA va revelar la presència de diversos gens de la via del TGFβ. Aquest fet suggeria que la via podia estar activada de manera autocrina per les pròpies cèl·lules, atès que els clons provenien d'una sola cèl·lula. Per valorar la possible activació de la via es va fer un experiment d'activació de la via mitjançant l'addició de TGFβ al medi de les cèl·lules en cultiu amb i sense la presència d'un inhibidor del TGFβ (SB 431542). Com a control es va utilitzar la línia de pròstata DU145, que respon a TGFβ. La transferència *western* per la proteïna Smad 2 fosforilada, indicativa de l'estat de la via del TGFβ, va revelar l'activació de la via tant en la línia control com en el clon analitzat (Figura R25A). Així mateix, es va comprovar la reducció de l'activitat amb l'addició de l'inhibidor. Per acabar d'assegurar aquest resultat, es va utilitzar un anticòs de bloqueig contra TGFβ,

tal i com es descriu als materials i mètodes (3.3.6), i es va analitzar l'expressió de p-Smad2 per transferència *western*. Tal i com pot observar-se a la figura R25B, el bloqueig amb l'anticòs també féu disminuir els nivells de p-Smad2.

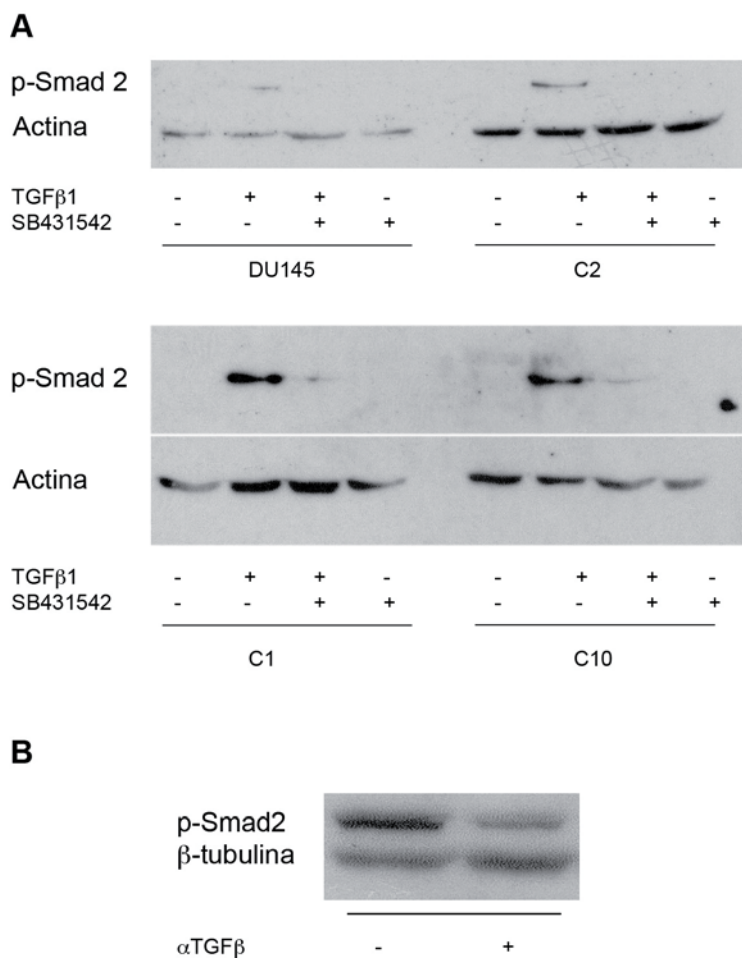


Figura R25: Transferència *western* per p-Smad2 en els clons. Al panell A es mostra l'activació de la via del TGFβ a través dels nivells de p-Smad2. Al panell B es mostra l'efecte de l'ús d'un anticòs de bloqueig contra TGFβ en un dels clons.

4.17 Valoració de la secreció autocrina de TGF β 1 dels clons mitjançant *ELISA*.

Per tal de valorar la secreció de TGF β al medi per part dels clons es van cultivar tres clons (1, 6 i 14) en DMEM + 10% FBS i es van deixar créixer durant 48 hores. Es van recollir els medis i es van analitzar mitjançant un *ELISA* juntament amb mostra de medi sol. La figura R26 mostra els picograms de TGF β secretats per litre de medi després de fer la substracció del valor obtingut en el medi sol.

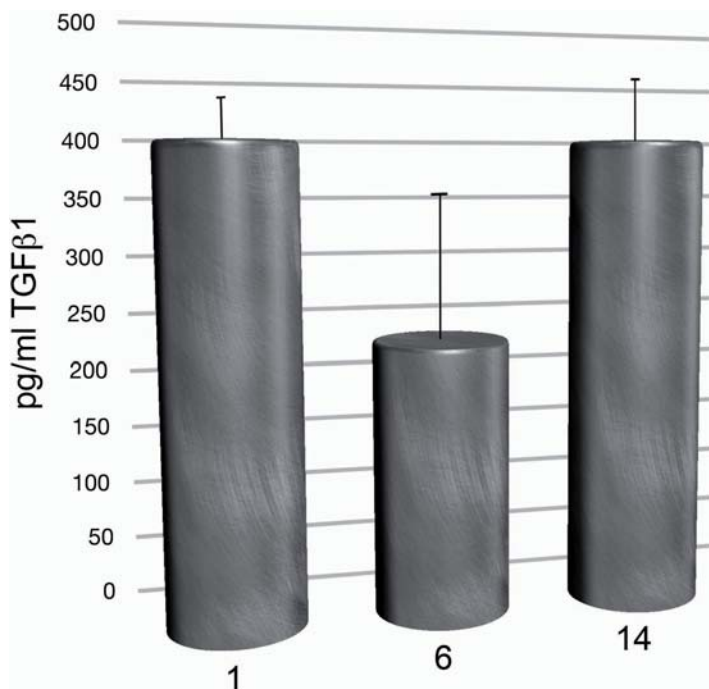


Figura R26: Secreció de TGF β 1 per tres clons determinat per *ELISA*. La gràfica mostra els valors del TGF β 1 en pg/ml de medi i les barres d'error mostren la desviació estàndard corresponent a dues rèpliques per mostra. Noti's que el clon 14 presenta una secreció més elevada que els altres i el clon 6 és el que presenta una secreció notablement inferior.

4.18 Estudis de diferenciació: els clons *SP* obtinguts són cèl·lules multipotents estromals (MSC). La inhibició del TGF β n'accelera la diferenciació.

Per tal d'estudiar si aquestes cèl·lules *SP* obtingudes a partir dels cultius del tumor tenien una plasticitat que els permetia diferenciar-se a altres tipus cel·lulars, es va procedir a fer experiments de diferenciació cel·lular a llinatges osteogènics i adipogènics tal i com s'especifica als materials i mètodes. Es va obtenir la diferenciació de 9 dels 10 clons que es van portar a diferenciar. Per tal com està descrit que el TGF β juga un paper en la inhibició de la diferenciació osteogènica i adipogènica en cèl·lules mare mesenquimals i altres tipus cel·lulars, en paral·lel als experiments de diferenciació es van incloure condicions de diferenciació cap als dos llinatges afegint-hi l'inhibidor del TGF β , l'SB431542. L'addició de l'inhibidor va accelerar la diferenciació de les cèl·lules tal i com s'observa a la figura R27.

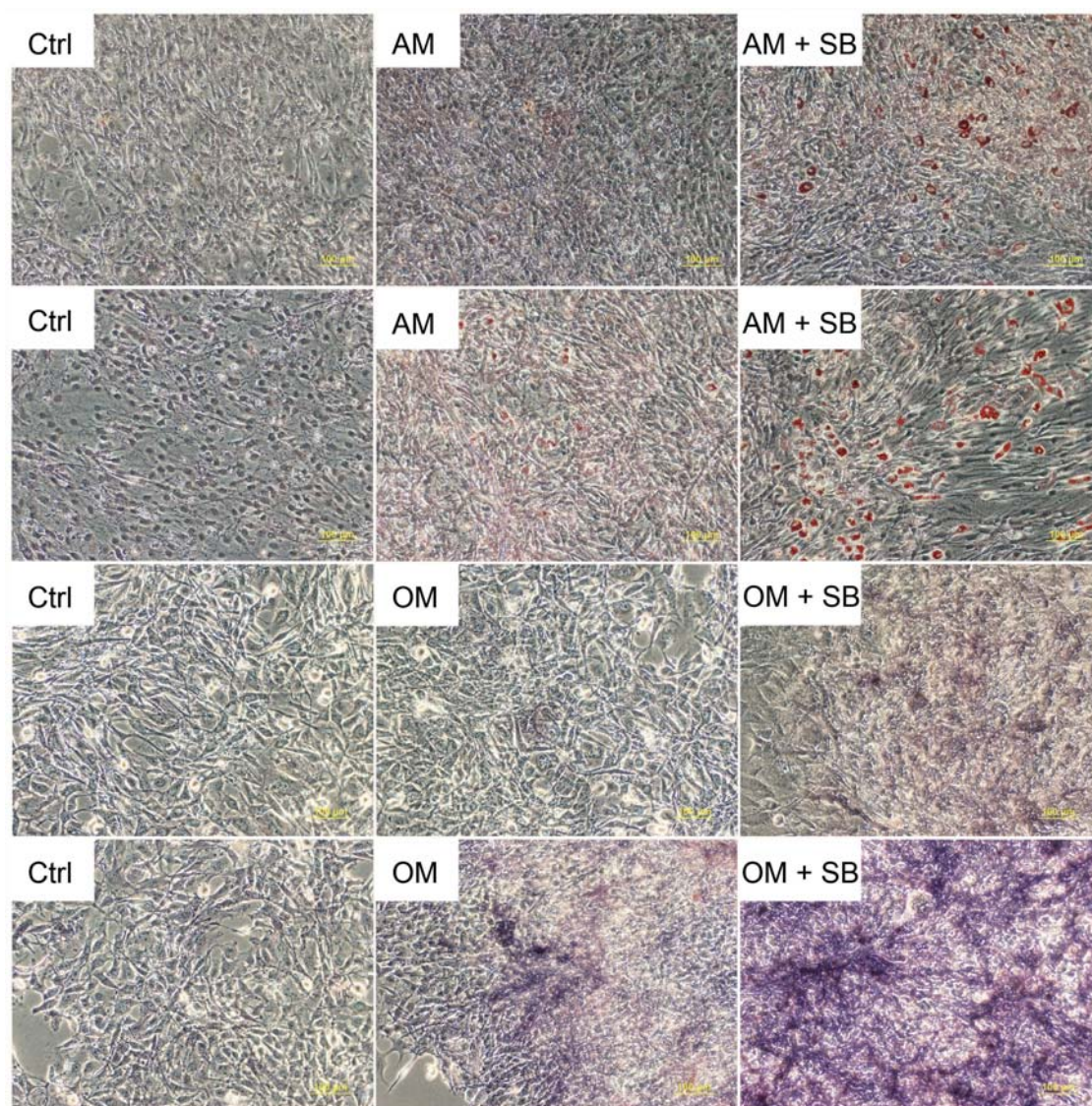


Figura R27: Diferenciació dels clons SP. A l'esquerra es mostren els controls, al centre les diferenciacions cap a llinatge adipogènic (AM) i cap a llinatge osteogènic (OM). A la dreta es mostra l'efecte de l'ús dels medis de diferenciació respectius (AM i OM) més 2 μM de l'inhibidor del TGF β SB431542 10 dies després. Com pot observar-se, a les imatges, aturats al mateix temps, hi ha més adipòcits i més tinció amb fosfatasa alcalina als cultius on s'havia afegit l'inhibidor. Escala: 100 μm

Durant els cultius es van observar diferenciacions espontànies (fàcilment detectables en el cas dels adipòcits) i en un dels clons, durant una diferenciació osteogènica amb l'inhibidor del TGF β , es van observar cèl·lules amb morfologia de cèl·lula nerviosa (Figura R28A). Per demostrar la presència d'aquestes cèl·lules es van realitzar tincions immunofluorescents amb marcadors de sistema nerviós o4 per oligodendròcits, s100b (*s100 calcium binding protein B*) per astròcits, TUJ1 (*neuron-specific class III beta-tubulin*) per neurones (cedits amablement pel Dr Seoane), NeuN (*Neuronal Nuclei*) per cèl·lules nervioses en general i GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*). Es van trobar unes poques cèl·lules amb marcatge per TUJ1 (Figura R28B). El marcatge

obtingut per NeuN es va considerar inespecífic (per presentar ubiqüitat quant a la seva distribució i una localització nuclear).

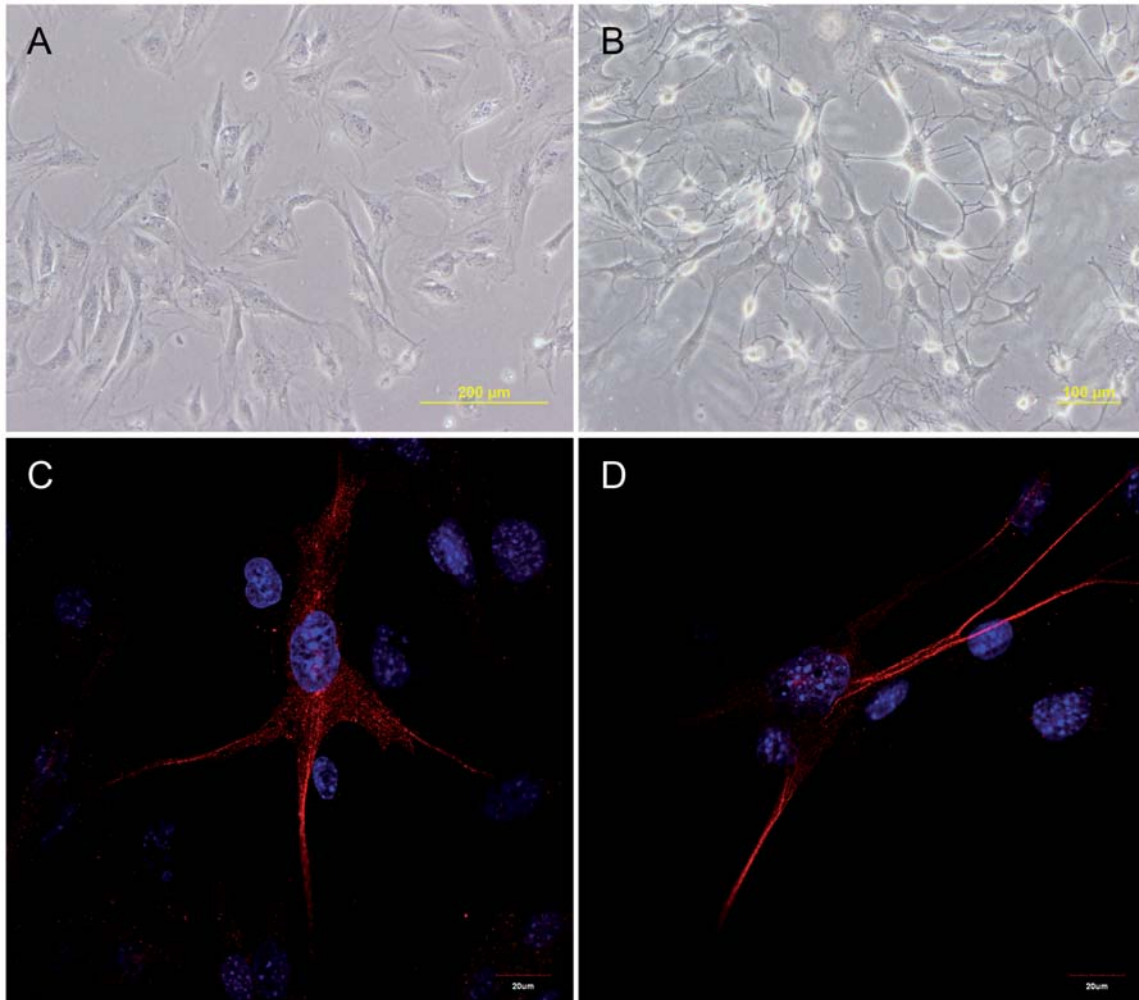


Figura R28: Diferenciacions neurogèniques. A la imatge A es mostra el cultiu no diferenciat; a la imatge B es mostren les cèl·lules de morfologia nerviosa després d'una setmana de diferenciació osteogènica amb l'inhibidor del TGF β . A sota dues cèl·lules del cultiu marcades per TUJ1.

Per comprovar que a hi havien MSC als estadis inicials dels cultius del tumor i no eren fruit d'una adaptació del cultiu, es va sembrar un tumor de *PAC-120* (sense passar pel citòmetre ni manipular-lo de cap manera) i al cap de set dies, quan s'havien enganxat unes quantes cèl·lules es va començar a fer diferenciacions adipogèniques i osteogèniques. La figura R29 mostra imatges representatives del cultiu amb les tincions per oli vermell O i fosfatasa alcalina després de 10 dies de diferenciar-los.

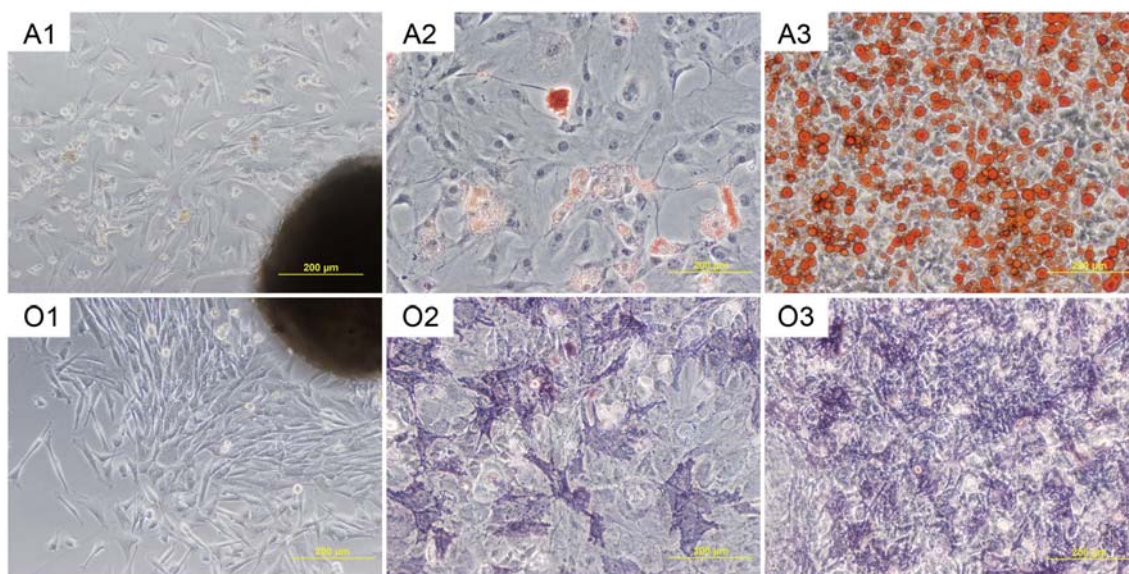
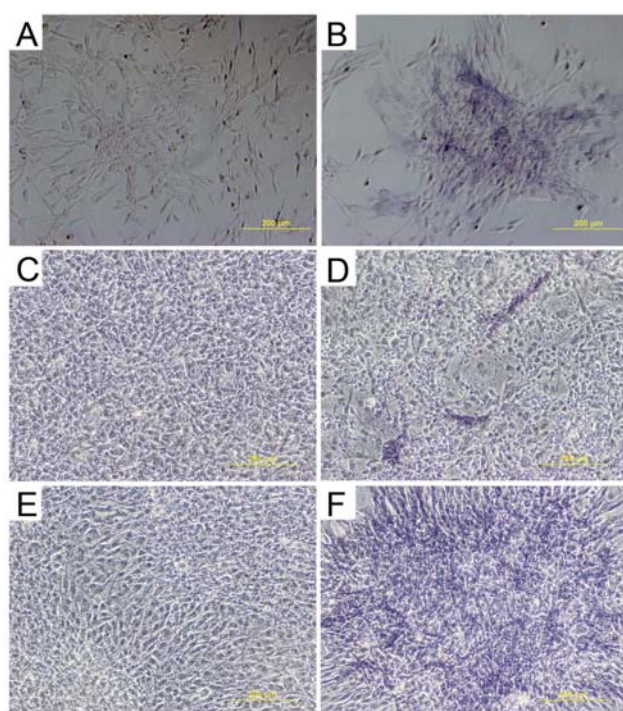


Figura R29: Diferenciacions adipogènica i osteogènica en cultius de *PAC-120* iniciades 7 dies després de posar el tumor fresc (acabat d'extirpar d'un animal) en cultiu. La diferenciació es va fer durant 10 dies. Les imatges A1 i O1 mostren l'aspecte del cultiu 7 dies després de sembrar el tumor i abans de començar les diferenciacions adipogènica i osteogènica, respectivament. Les imatges A2, A3, O2 i O3 mostren quatre imatges representatives de diferents zones del cultiu després de les tincions amb oli vermell O i fosfatasa alcalina en les respectives diferenciacions adipogènica i osteogènica. Escala: 200 μm

4.19 La inhibició del $\text{TGF}\beta$ autocrí secretat per les cèl·lules multipotents estromals clonals activa la diferenciació osteogènica.



Per tal d'estudiar l'efecte de la inhibició del $\text{TGF}\beta$ secretat pels clons sobre la seva diferenciació es van realitzar tractaments només amb l'inhibidor SB431542 (sense afegir els components de diferenciació al medi) en tres clons

Figura R30: Efecte de la inhibició del $\text{TGF}\beta$ sobre els clons. A les imatges A, C i E s'hi mostren els clons 1, 6 i 14 respectivament sense tractar i a B, D i F hi ha les seves corresponents parelles tractades amb 2 μM de SB431542. Després de 9 dies tots es van teyir amb fosfatasa alcalina. Escala: 200 μm

diferents (1, 6 i 14). Els resultats indiquen que la inhibició del TGF β facilita la diferenciació osteogènica dels clons tal i com s'observa a la figura R30. El clon 14 és el que es va veure més afectat pel tractament, mentre que el clon 6 va ser el que menys, i ja el control no tractat d'aquest clon presentava un cert marcatge per la fosfatasa alcalina (figura R30).

4.20 El TGF β autocrí secretat per les cèl·lules multipotents estromals clonals té també un paper proproliferatiu.

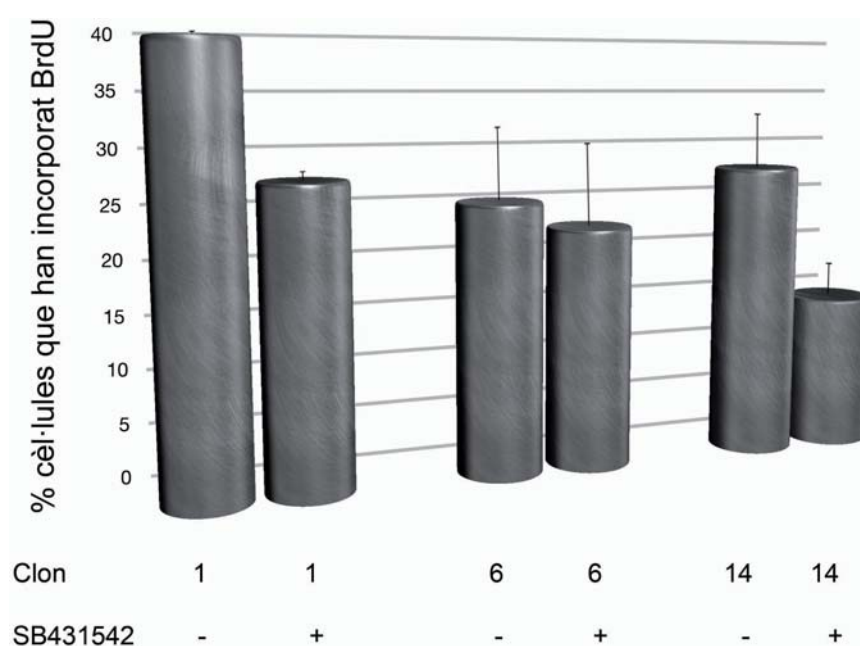


Figura R31: Incorporació de BrdU en tres clons diferents (1, 6 i 14) amb i sense tractament amb l'inhibidor del TGF β . El tractament amb 2 μ M de SB431542 durant 24 hores fa disminuir la incorporació de BrdU de manera significativa. Noti's tanmateix que el clon 6 és el que es veu menys afectat pel tractament.

Per tal de valorar l'efecte del TGF β secretat pels clons de MSC sobre la proliferació cel·lular es van realitzar assajos d'incorporació de BrdU amb els clons tractats i no tractats amb l'inhibidor de TGF β SB 431542 durant 24 hores. Els resultats es mostren a la figura R31 i indiquen que l'addició de l'inhibidor va fer disminuir la incorporació del BrdU en els clons

analitzats amb una significació estadística (aplicant el test de Wilcoxon s'obté una $S=0,028$). També és destacable que hi ha una variació interclonal elevada quant a l'efecte de l'inhibidor i que aquesta està relacionada amb els nivells de TGF β secretats pels clons observats per ELISA, és a dir que els clons que presentaven més secreció de TGF β (1 i 14) també són aquells que van veure més afectada la seva proliferació quan s'inhibia la via, mentre que el clon 6, que presentava uns nivells més baixos de TGF β també es va veure menys afectat per l'efecte de l'inhibidor.

4.21 La població SP dels clons disminueix a mesura que es diferencien

Per tal de determinar si el fenotip *SP* és una mesura de l'estat de diferenciació de les cèl·lules, tres clons es van sotmetre a una diferenciació de 7 dies cap a llinatge osteogènic amb l'addició de l'inhibidor del TGF β . Un cop passat aquests dies es van analitzar les seves respectives poblacions SP. Dels tres casos analitzats, dos van mostrar una disminució de la SP (Figura R32).

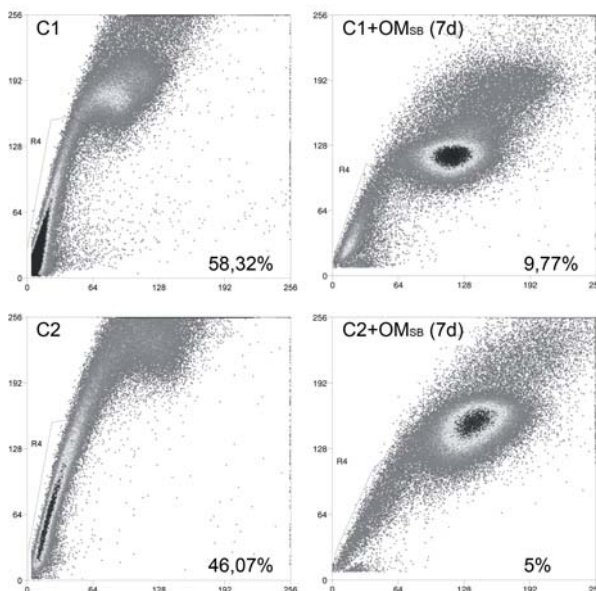


Figura R32: Pèrdua de la SP en els clons després de 7 dies en medi osteogènic + SB431542. A l'esquerra els cultius inicials.

En el cas del clon 10, però, es va observar que la població no havia perdut població SP sinó que ans al contrari, semblava haver-ne guanyat i totes les cèl·lules es desplaçaven cap a la cua tal i com s'observa a la Figura R33. A més, l'addició del verapamil inhibia totalment aquesta població.

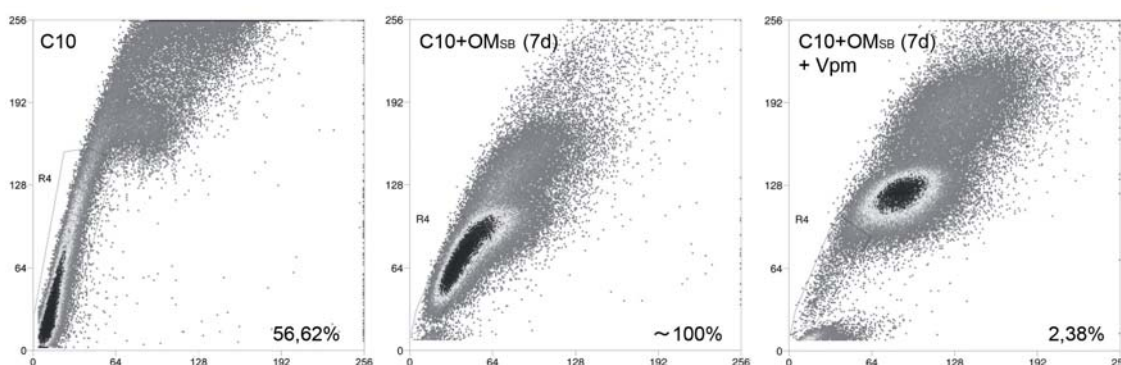


Figura R33: Perfil SP del clon 10 després de 7 dies de tractament amb medi osteogènic (OM) amb l'inhibidor SB431542. Com pot veure's al citograma central, tot el cultiu ha passat a bombejar el Hoechst. El citograma de la dreta mostra com el verapamil inhibeix pràcticament de manera completa el fenotip SP.

4.22 Estudi sobre la funció de les cèl·lules multipotents estromals en la progressió tumoral del càncer de pròstata.

Per tal de comprovar la funció de les cèl·lules multipotents estromals del tumor (CMET) al càncer de pròstata i la seva influència sobre les cèl·lules tumorals epitelials, es van realitzar assajos de creixement de xenotrasplantaments de *LNCaP* a ratolins nusos. Es van injectar subcutàniament $3,5 \cdot 10^6$ cèl·lules *LNCaP* a tres ratolins i una barreja del mateix nombre de *LNCaP* amb $10,5 \cdot 10^6$ cèl·lules CMET del clon 1 (proporció 1:3 *LNCaP*:CMET). A les 48 hores de la injecció, els ratolins que portaven la combinació *LNCaP*-CMET presentaven tumoracions de $0,4 \times 0,4-0,5 \text{ cm}^3$ tots tres. A les quatre setmanes els animals presentaven tumors de $0,8 \cdot 0,8 \text{ cm}^3$ mentre que els tres punxats només amb *LNCaP* no presentaven cap signe de creixement del tumor (Figura R34 A i B). Es va sacrificar un animal i es va comprovar que el tumor presentava una vascularització molt abundant (Figura R34C).

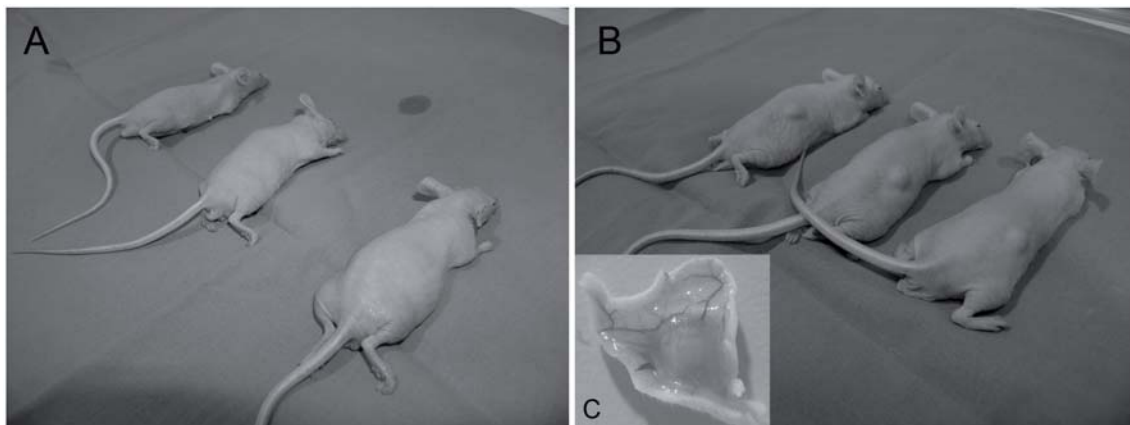


Figura R34: Creixement dels tumors *LNCaP* i *LNCaP*+Clon1 després de 4 setmanes. La imatge A mostra els tres animals als quals es van injectar subcutàniament $3,5 \cdot 10^6$ cèl·lules *LNCaP* soles. A la imatge B es mostren els tres ratolins als quals es va punxar el mateix nombre de *LNCaP* i $10,5 \cdot 10^6$ cèl·lules del clon 1. La imatge C mostra un detall de la vascularització del tumor.

L'anàlisi histològica va revelar l'absència de cèl·lules positives per citoqueratina, receptor d'andrògens, e-cadherina o PSA. Per valorar una possible transició epitelio-mesènquima es van realitzar tincions immunohistoquímiques per fibronectina, vimentina i β -catenina, i per valorar una possible diferenciació neuroendocrina es va fer el mateix amb la cromogranina A (Figura R35). Cap d'aquests marcadors no va definir una d'aquestes possibilitats. Mitjançant PCR es va determinar l'absència de transcrits humans al tumor (β_2 -microglobulina i *L19*). L'anàlisi histològica del tumor va permetre distingir que es tractava d'un sarcoma, possiblement un fibrosarcoma, o un leiomioma. També es va poder observar diferenciació *in vivo* a teixit adipós (Figura R35).

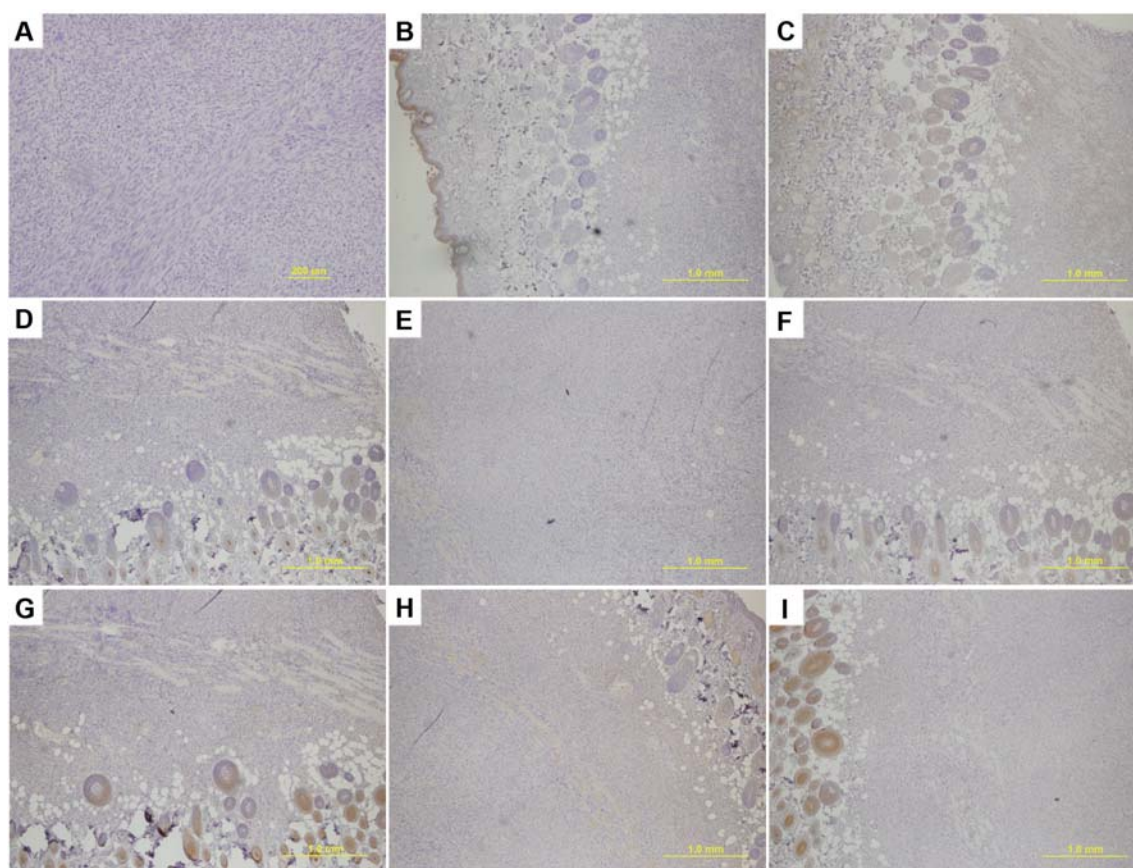


Figura R35: Tincions del tumor C1:*LNCaP*. A dalt es mostra una tinció d'hematoxilina-eosina on pot apreciar-se les cèl·lules transformades en forma de sarcoma. També és visible la diferenciació adiposa de moltes cel·lules. En una bateria de tincions immunohistoquímiques fetes es va poder descriure l'absència de citoqueratines (B), receptor d'andrògens (D), PSA (E), cromogranina A (F) i E-cadherina (G), i la presència de vimentina (C) i fibronectina (H). La β -catenina (I) no es va detectar al tumor, possiblement degut a la seva ràpida degradació. Com a control positiu intern (menys en el cas del PSA) es va utilitzar la pell sota la qual s'havia implantat el tumor, amb l'epiteli, les glàndules sudorípares i els fol·licles pilosos. Escales: 200 μ m i 1 mm

4.23 Anàlisi del contingut de DNA dels clons per FACS

Per tal de comprovar la possible presència d'aneuploidies als clons que poguessin haver propiciat l'aparició dels sarcomes es van fer anàlisis de contingut de DNA utilitzant sang d'un ratolí control com a control de ploïdia. Els resultats indiquen que alguns dels clons analitzats presenten poblacions aneuploides (1-4, 6, 9, 10, 14), tant amb pèrdua com amb guany de DNA, mentre que d'altres es mantenen diploides (12 i 5) (Figura R36). Algunes de les dades observades quant a la incorporació de iodur de propidi també podrien ser fruit de diferències de proliferació de cada clon, que també foren advertides als cultius.

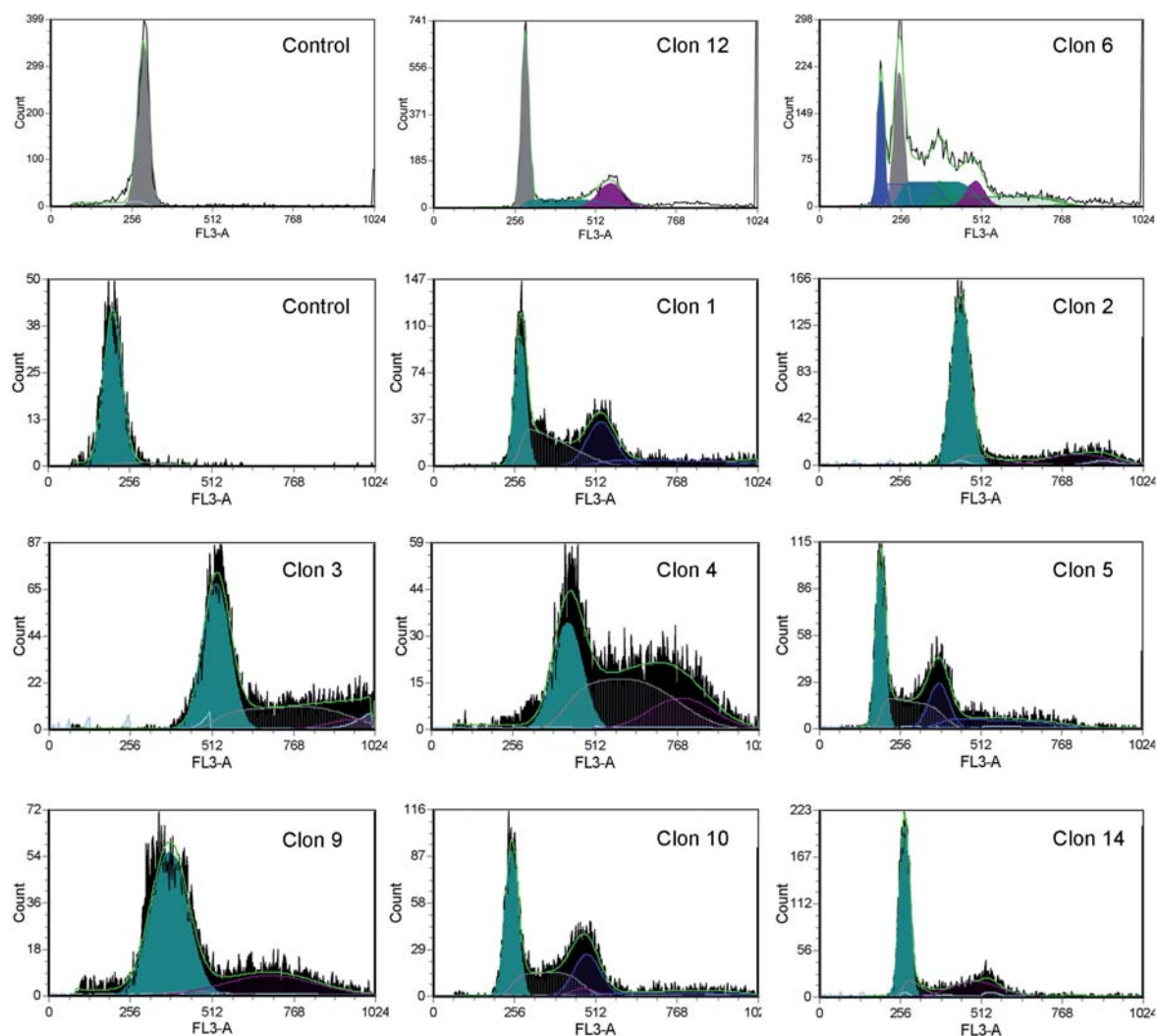


Figura R36: Anàlisi del contingut en DNA de diferents clons *SP*. L'anàlisi mostra que alguns dels clons podrien presentar aneuploidies importants (clons 2 i 3). D'altres semblen presentar un contingut de DNA diploide (clons 5 i 12), i d'altres presenten barreges (clon 6).

4.24 Estudi de la via del $TGF\beta$ als tumors *PAC-120*

Per tal com s'havia vist anteriorment que la via del $TGF\beta$ està activa als clons obtinguts a partir dels cultius dels tumors, es va comprovar l'estat de la via als tumors *PAC-120* per transferència *western* i per immunofluorescència. La transferència *western* de p-Smad 2 va mostrar l'activació de la via del $TGF\beta$ en tots els tumors analitzats ($n=7$), i la tinció immunofluorescent i les immunohistoquímiques van revelar la presència de marcatge per p-Smad2 a les cèl·lules dels talls, tant epitelials humanes com estromals murines (Figura R37A i C). A més, l'estudi comparatiu de la via del $TGF\beta$ per immunohistoquímica a 3 tumors d'animals castrats quirúrgicament vers 3 d'animals no castrats va demostrar un augment molt notable de la intensitat del marcatge per p-Smad2 a les cèl·lules epitelials dels primers respecte dels segons (Figura R37D).

Atès que s'havia observat que la via del TGF β estava activa al *PAC-120*, es va plantejar de tractar un tumor *in vivo* amb l'inhibidor del TGF β , SB 431542. Per això es va utilitzar un animal portador d'un tumor de volum 0,5 cm³, i es va punxar intratumoralment amb SB431542 a una concentració de 0,1 mM tres cops per setmana durant 16 dies, temps després del qual l'animal es va sacrificar. La transferència *western* per p-Smad2 indica una lleu disminució dels nivells de la proteïna (Figura R37B).

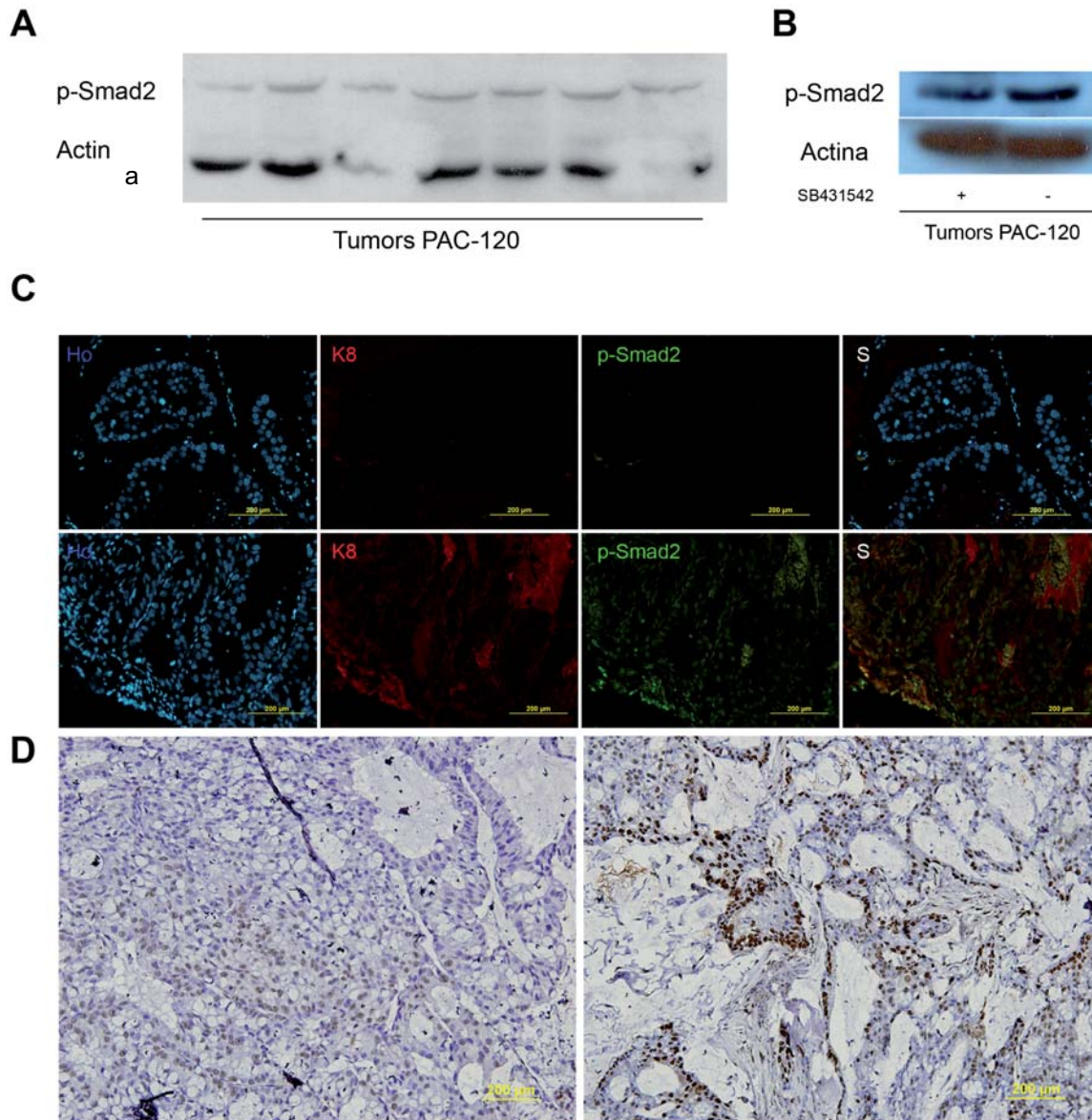


Figura R37: Estudi de l'activació de la via del TGF β al *PAC-120*. La transferència *western* sobre tumors del PAC-120 va demostrar la presència de Smad-2 fosforilat en tots ells (A). El tractament d'un dels animals amb l'inhibidor SB431542 fa disminuir lleument els nivells de p-Smad2 (B). La immunohistofluorescència va determinar que p-Smad2 es troba tant a les cèl·lules epitelials humanes com a les estromals murines (C). Les imatges superiors corresponen al control de secundaris. Les immunohistoquímiques demostren que el marcatge per p-Smad2 és molt més intens en animals castrats (D, imatge de la dreta) que en els no castrats (D, imatge de l'esquerra). S: solapament.

Escala: 200 μ m

4.25 Estudis de la *side population* a les línies cel·lulars *LNCaP* i *PC-3*

Les línies cel·lulars es van cultivar i tractar tal i com s'indica als materials i mètodes i es va analitzar la seva *side population*. Les anàlisis van demostrar la presència d'una població SP que oscil·lava entre el 0 % i el 14% a la línia *LNCaP* i de 0,01% a indetectable a *PC-3* (Figura R38)

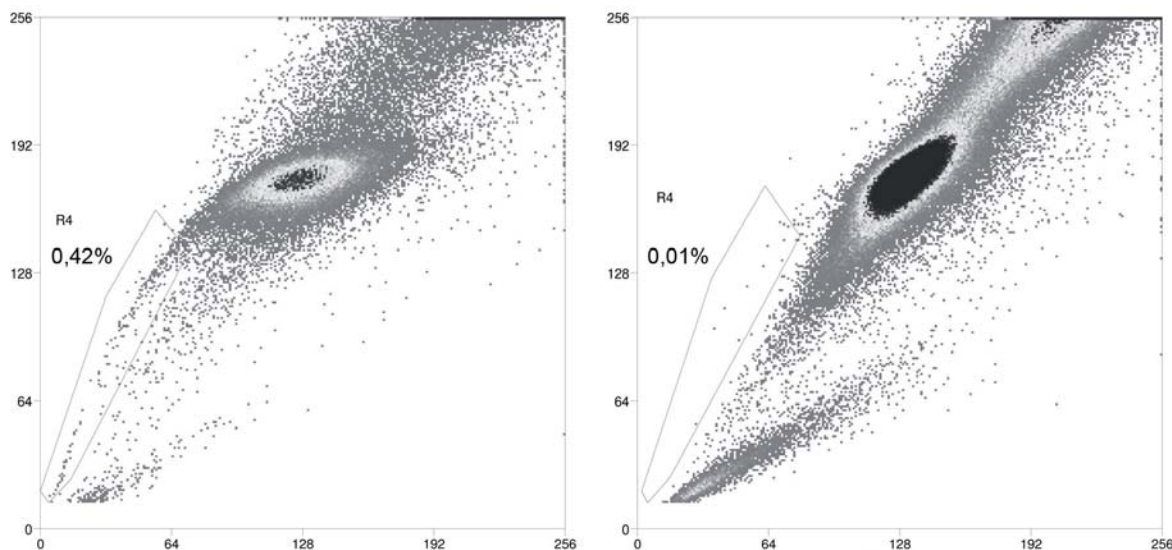


Figura R38: Anàlisi de *side population* de la línia *LNCaP* (citograma de l'esquerra) i *PC-3* (citograma de la dreta).

Per tal de comprovar la seva capacitat de generar població SP i no SP, es van separar cèl·lules *LNCaP* de la SP i es van cultivar i expandir en RPMI+10% FBS. Durant aquesta expansió i prèviament a l'anàlisi, les cèl·lules es van cultivar 6 dies en RPMI+10% FBS, DMEM+ 20% FBS i RPMI+5% de FBS tractat amb carbó activat. En aquest darrer cas, es va observar una transició neuroendocrina quant a la morfologia de les cèl·lules. Quan aquests cultius van ser passats pel citòmetre per analitzar la seva població SP es va observar que les cèl·lules *LNCaP* de la *side population* havien donat lloc a cèl·lules SP i no SP un altre cop (Figura R39). També es va comprovar que el cultiu amb DMEM+20% FBS presentava moltes més cèl·lules de la SP, tal i com havia passat amb el cultiu del qual es va fer la separació, i que en canvi, el cultiu el medi del qual havia estat tractat amb carbó activat en presentava moltes menys (Figura R39). Atès que aquests resultats indicaven que el sèrum estava jugant un paper en la *side population*, es van realitzar diversos experiments en què s'utilitzaren aquests dos medis amb les dues concentracions diferents de sèrum, 10% i 20%. Els assajos van demostrar que

l'increment de sèrum feia augmentar la *side population*, amb una mitjana de l'increment de $4,61 \pm 2,75$ vegades.

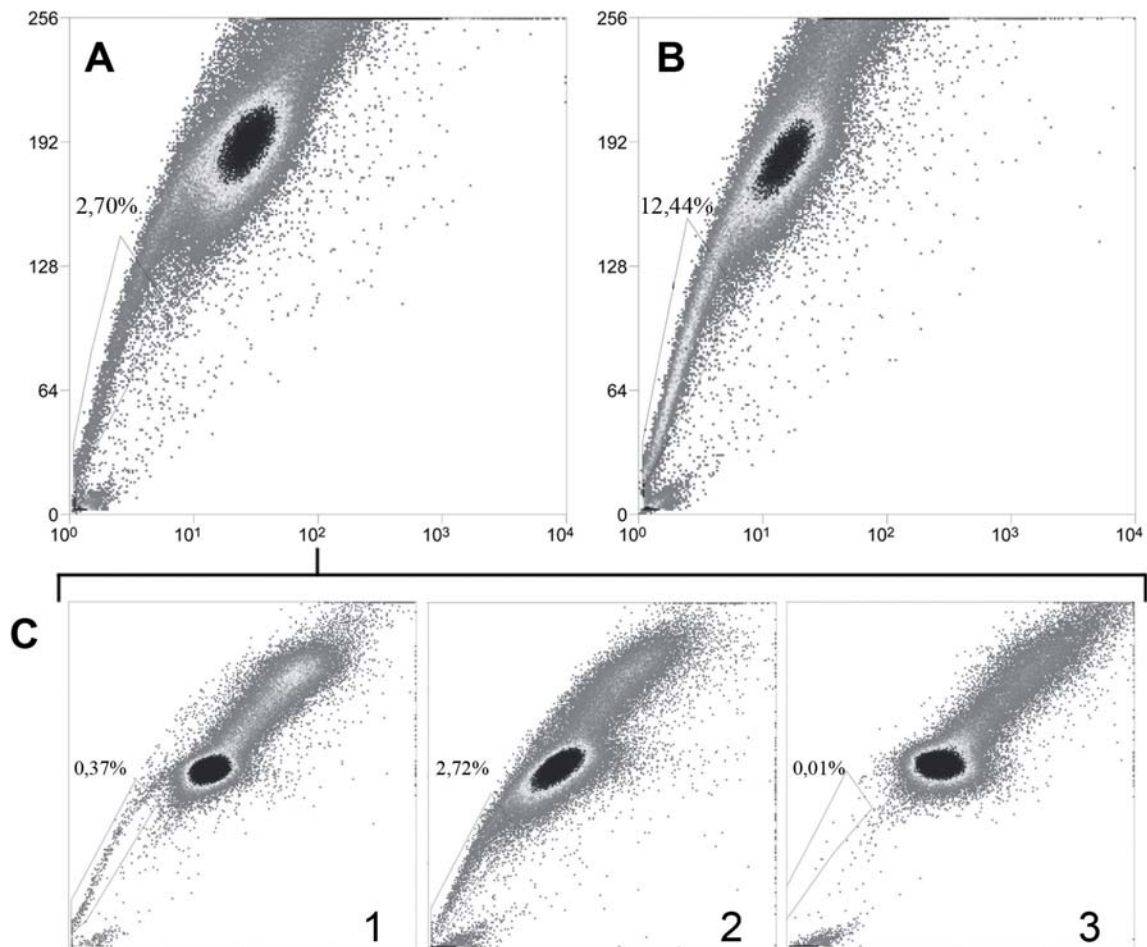


Figura R39: Anàlisi de la *side population* a la línia *LNCaP*. El citograma A mostra una anàlisi de la línia cultivada en RPMI + 10% FBS. El citograma B correspon a les mateixes cèl·lules que les del citograma A, però cultivades en DMEM+20% FBS. Es va fer una separació de la *side population* del citograma A i les cèl·lules es van tornar a analitzar després de cultivar-les en RPMI+10% FBS (C1), DMEM+20% FBS (C2) i RPMI+5% FBS tractat amb carbó activat (C3).

4.26 L'estradiol regula a l'alça l'*ABCG2* a la línia *LNCaP*

Atès que s'havia observat que la població *SP* de la línia *LNCaP* es veia afectada per les diferents concentracions de sèrum i per tal com hom ha descrit que el promotor d'*ABCG2* presenta un element de resposta a estrògens (*ERE*), es va plantejar l'anàlisi de l'efecte de l'addició d'estradiol sobre l'expressió d'*ABCG2* a la línia *LNCaP*. Com que es volien avaluar els efectes a baixes dosis d'estradiol, es va rebaixar la concentració de sèrum al medi fins al 2% i les cèl·lules es van tractar amb 3 nM d'estradiol durant 48

hores. Les PCR per *ABCG2* van demostrar que l'addició d'estradiol al medi fa augmentar l'expressió d'*ABCG2* a la línia *LNCaP* (Figura R40). Així mateix, els resultats van demostrar que la reducció del percentatge de sèrum feia disminuir els nivells d'expressió d'*ABCG2*, cosa que concorda amb el que s'havia observat respecte de l'augment de sèrum lligat a un augment de la *side population*. A més, l'addició d' $1\mu\text{M}$ del compost ICI 182780 anul·lava l'efecte de l'estradiol (Figura R40), cosa que suggereix que l'efecte de l'estradiol és a través del receptor d'estrògens beta. Tanmateix, l'addició d'aquestes concentracions baixes d'estradiol no afectava la *side population*.

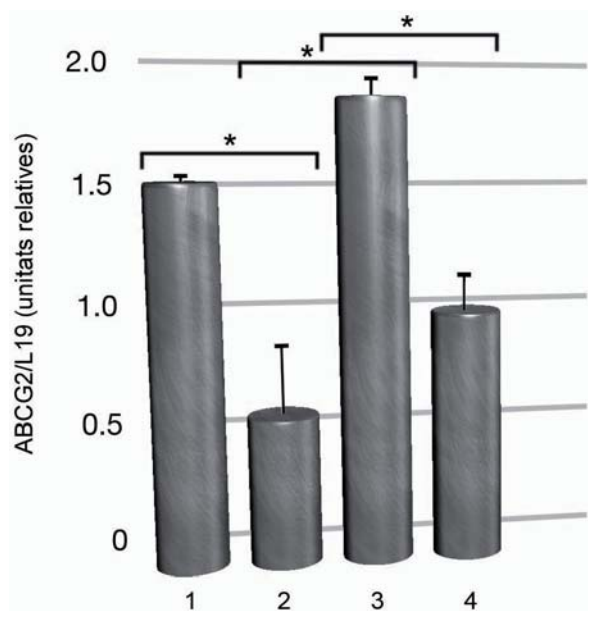


Figura R40: Nivells d'*ABCG2* presentats en unitats relatives mitjançant la raó densitomètrica entre *ABCG2* i *L19* a la línia *LNCaP* cultivada en RPMI+10% FBS (1), en RPMI+2% FBS (2), en RPMI+2% FBS + 3 nM d'estradiol (3), i en RPMI+2% FBS + 3 nM estradiol + 1 μM d'ICI 182780 (4). La barra indica la desviació estàndard corresponent a tres experiments independents. S'hi indica també la significació, obtinguda a partir del t-test per dades aparellades.

4.27 Estudi de l'estat de metilació del promotor d'*ABCG2* a les línies *LNCaP* i *PC-3* amb i sense tractament amb 5-aza-deoxicitidina. Efecte del tractament sobre el gen, la proteïna i la *side population*.

Els resultats de les anàlisis de metilació del promotor d'*ABCG2* a les línies cel·lulars indiquen que la línia cel·lular *PC-3* té la regió estudiada del promotor d'*ABCG2* pràcticament metilada en la seva totalitat, mentre que en el cas de la línia *LNCaP*, la regió estudiada està en gran mesura desmetilada, tot i que s'observa una variabilitat interclonal elevada (Figura R41). Això indica que el cultiu és heterogeni pel que fa a aquesta característica i que per tant no totes les cèl·lules tenen el promotor d'*ABCG2* en el mateix estat de metilació. De fet, a la línia *LNCaP*, el percentatge de desmetilació observat és del $50,36\% \pm 23,97\%$, mentre que per *PC-3* el percentatge és del $5,07\% \pm 2,99\%$. A més a més, l'ús de la 5-aza-deoxicitidina als cultius durant 72 hores desmetila parcialment els promotor (Figura R41), i d'aquesta manera, els percentatges de desmetilació passen a ser del $65,04\% \pm 15,33\%$ per les *LNCaP* tractades, i del $9,4\% \pm 15,06\%$ en el cas de les *PC-3* tractades.

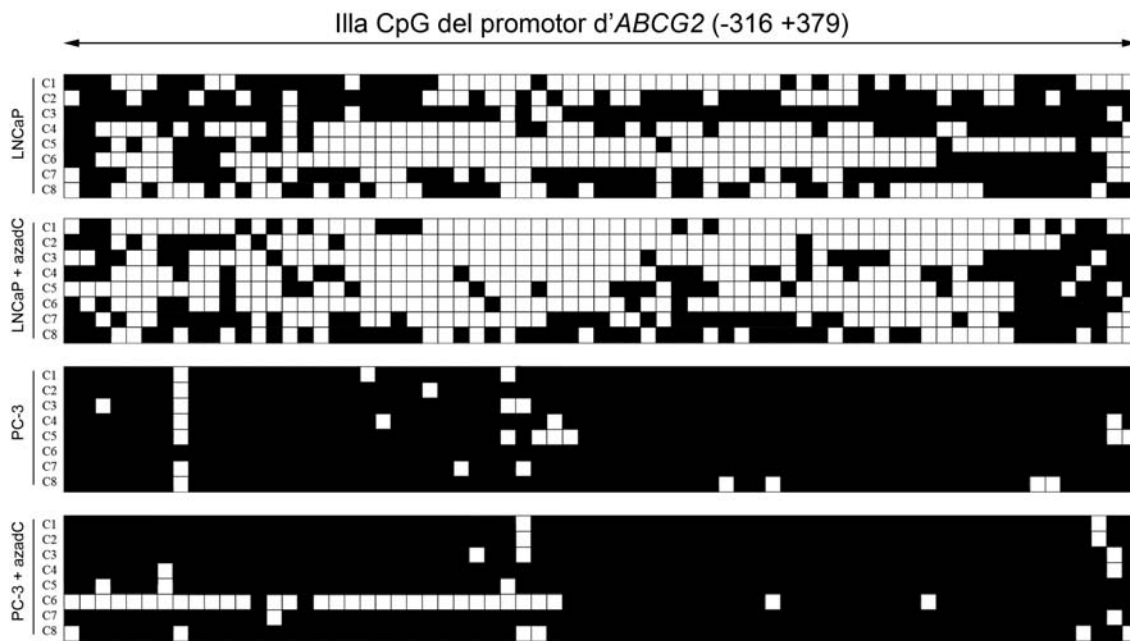


Figura R41: Mapes de metilació de la regió de la illa CpG del promotor d'*ABCG2* amplificada per PCR. Es mostren els resultats per la línia *LNCaP* sense tractar, la línia *LNCaP* tractada durant 72 hores amb azadeoxicitidina, per *PC-3* sense tractar i per *PC-3* tractada també durant 72 hores amb azadeoxicitidina. Es mostren els resultats de la seqüenciació de 8 clons per cada condició.

Aquests resultats es van veure acompanyats per un augment de l'mRNA d'*ABCG2* quan les línies eren tractades amb 5-azadeoxicitidina, un augment que era més evident en el cas de la línia *PC-3* (Figura R42). Les immunofluorescències d'*ABCG2* amb l'anticòs contra *ABCG2* d'*eBioscience* en la línia *LNCaP* van donar uns resultats poc satisfactoris, amb un marcatge nuclear en alguns dels casos (de fet, dels 5 anticossos contra *ABCG2* provats per immunomarcatge per microscòpia no en va

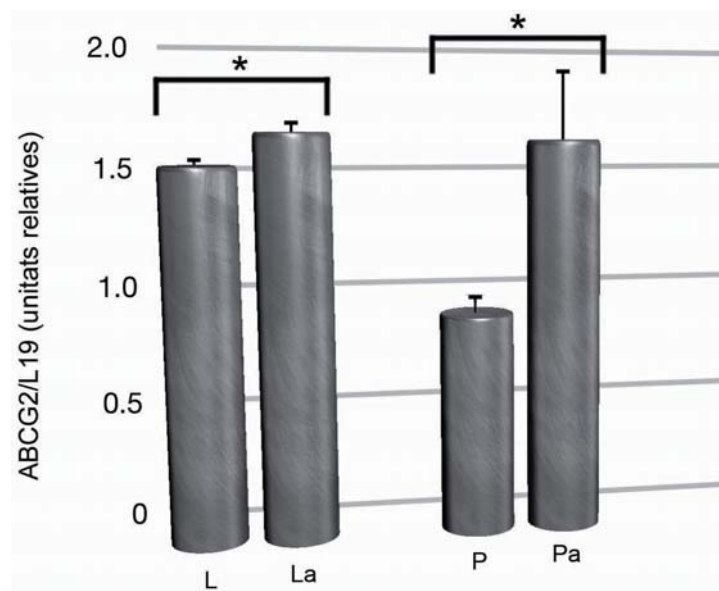


Figura R42: Nivells d'*ABCG2* presentats en unitats relatives expressades com el quocient dels valors densitomètrics d'*ABCG2* i *L19* a les línies *LNCaP* (L) i *PC-3* (P) amb i sense tractament de 48 hores amb 5-azadeoxicitidina a 1 μ M (La i Pa). La barra indica la desviació estàndard corresponent a tres experiments independents. S'hi indica també la significació, obtinguda a partir del t-test per dades aparellades. L'augment percentual es del 8,6% a la línia *LNCaP* i del 77,7% a la línia *PC-3*.

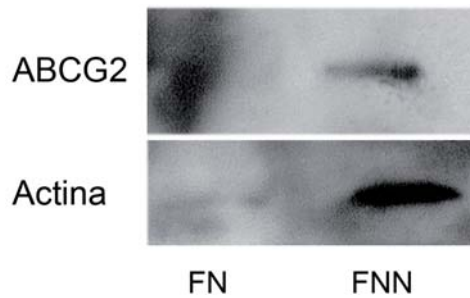


Figura R43: Transferència *western* per *ABCG2* i actina sobre un fraccionament cel·lular de la línia *LNCaP*. Al carril de la dreta hi ha la fracció nuclear (FN), on s'observa l'absència d'*ABCG2* i un lleu senyal per actina (l'actina nuclear). Al carril de l'esquerra hi ha la fracció no nuclear (FNN), on es troba l'*ABCG2*.

funcionar cap). Per tal de comprovar un possible canvi de localització d'*ABCG2* en aquesta línia, es va fer un fraccionament cel·lular i una subsegüent transferència *western* de la fracció nuclear i la no nuclear per comprovar la localització de la proteïna (Figura R43). Els resultats van indicar que es trobava exclusivament a la fracció no nuclear, de tal manera que el més probable és que el marcatge de l'anticòs susdit observat per immuno-fluorescència fos artefactual. Així mateix, la transferència *western* d'*ABCG2* va revelar la presència de la proteïna tant en *LNCaP* com en *PC-3*, resultats que es van confirmar amb unes

anàlisis per citometria de flux realitzades per triplicat a cada línia. L'ús d'un anticòs contra *ABCG2* conjugat a ficoeritrina va permetre discriminar dues poblacions amb un grau de positivitat diferent a la línia *LNCaP*. A *PC-3* totes les cèl·lules eren positives per *ABCG2* però també amb una positivitat baixa (Figura R44).

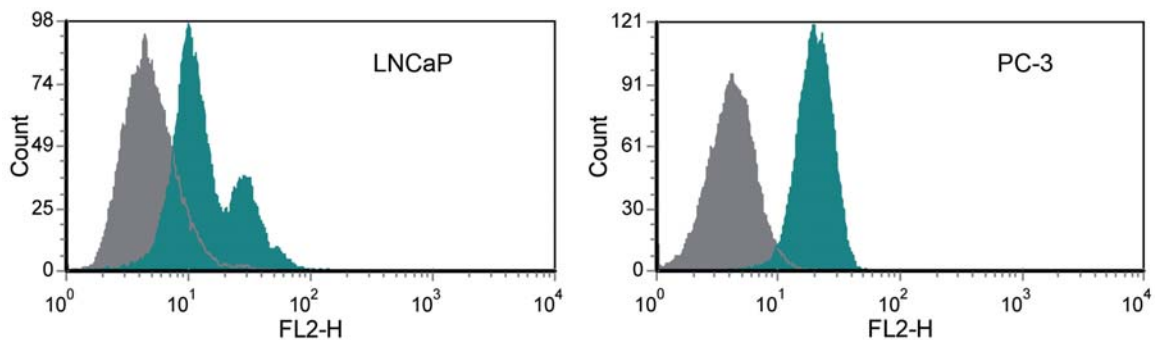


Figura R44: Detecció d'*ABCG2* per citometria de flux a les línies *LNCaP* i *PC-3*. En ambdós casos hi ha un marcatge (verd), tot i que en el cas de *PC-3* aquest és homogeni i de baixa intensitat i en cas de *LNCaP* hi ha una petita subpoblació més positiva.

L'anàlisi de la *side population* a les línies tractades amb 5-azadeoxicitidina durant 48 hores va demostrar també un augment de la SP de les línies tractades (Figura R45).

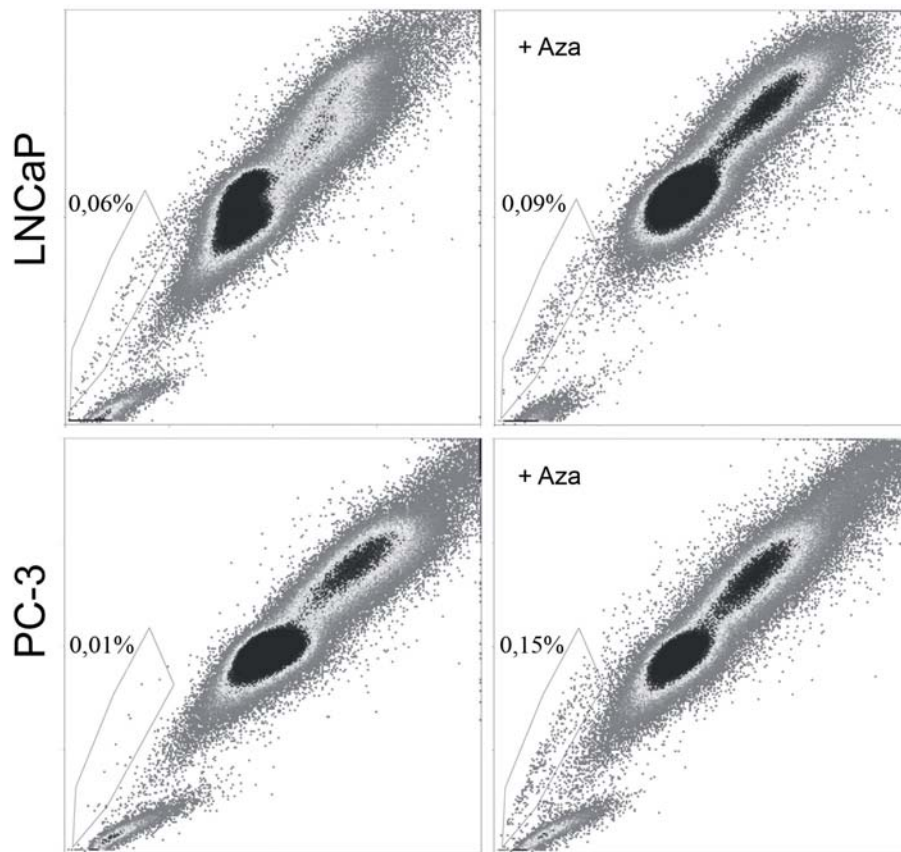
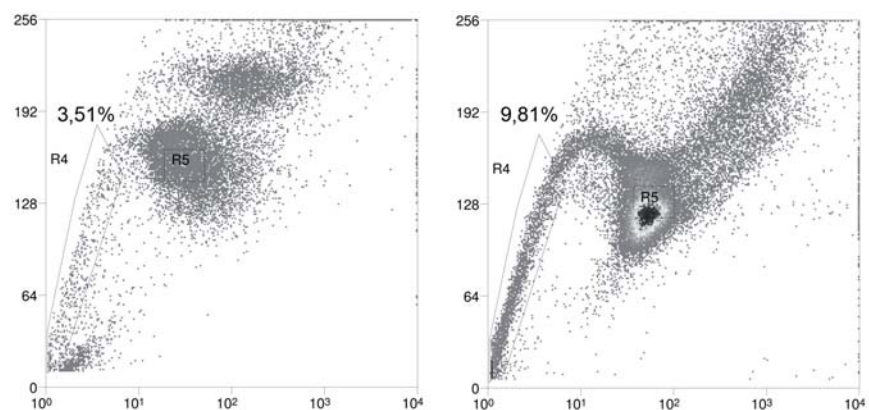


Figura R45: Anàlisi de la *side population* a la línia *LNCaP* i *PC-3* tractades o no amb l'agent bloquejador de la metilació 5-aza-deoxicitidina. S'observa un augment de la SP a les cèl·lules tractades.

4.28 Estudi de la població SP als tumors generats a partir de cèl·lules *LNCaP*, *PC-3* i *DU145*: els xenotrasplantaments contenen cèl·lules de la SP.

Per tal de poder donar més força als resultats obtinguts amb el *PAC-120*, es van generar tres xenotrasplantaments més (*LNCaP*, *PC-3* i *DU145*) tal i com es descriu als materials i mètodes (3.1). Aquests animals es van sacrificar i el tumor es va disgregar i estudiar la seva població SP així com la dels molls d'ossos. Es va detectar una *side population* en tots els casos. La figura R46 mostra la població SP d'un tumor *DU145* i la del moll d'os de l'animal.

Figura R46: Anàlisi de la *side population* d'un tumor *DU145* (citograma de l'esquerra) i del moll d'os de l'animal que el duia (citograma de la dreta).



4.29 Estudi de la població SP i ABCG2 en pròstates humanes adultes

Es van utilitzar mostres humanes de pròstata procedents de cistoprostatectomies i prostatectomies radicals obtingudes de pacients intervinguts de càncer de bufeta i pròstata respectivament per realitzar transferències *western* d'ABCG2. Els resultats van indicar la presència de la proteïna en totes les mostres analitzades (Figura R47A).

Es va poder disposar de dues mostres fresques pertanyents a dues hiperplàsies de pròstata humanes que es van tractar com s'ha descrit anteriorment per a l'anàlisi de la SP. Tot i que la mostra va patir una mortalitat cel·lular molt elevada deguda a la logística del procés experimental, es va poder detectar la presència d'una *side population* (Figura R47B, en què es mostra una anàlisi).

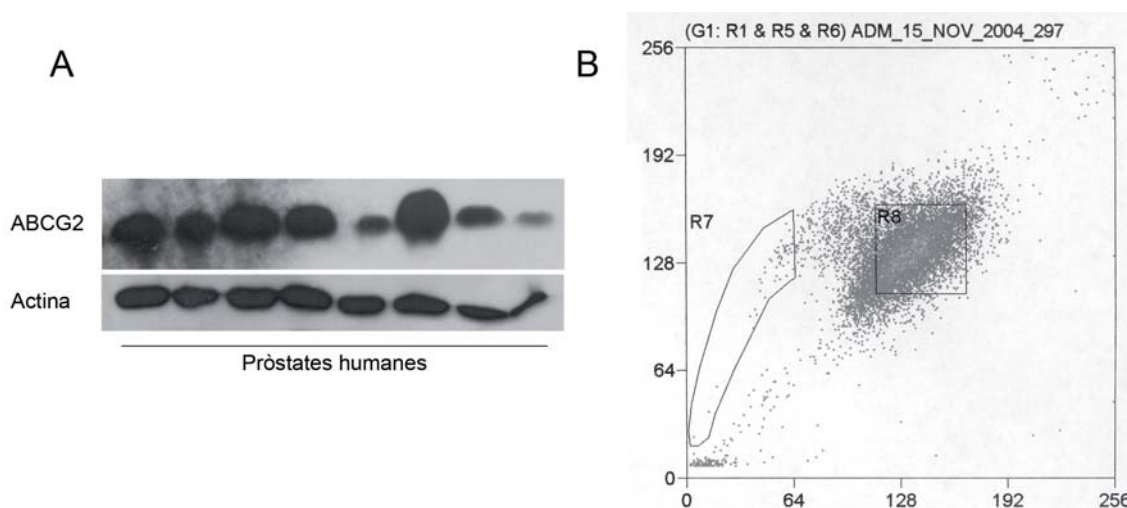


Figura R47: Anàlisi d'ABCG2 i la *side population* de mostres de pròstata humana. La transferència *western* indica la presència de la proteïna en les 8 mostres analitzades (A). El panell B mostra l'anàlisi de la SP en una mostra de pròstata.

4.30 Estudi de la població SP en pròstates fetals humanes

Es van fer estudis de *side population* amb 5 pròstates fetals humanes. Els resultats obtinguts es mostren a la figura R48. En els cinc casos es va poder detectar una població SP. Tanmateix, es va descartar l'aïllament d'aquestes cèl·lules per fer-ne estudis genètics comparatius per tal com les patologies genètiques que presentaven els fetus feien inviable una interpretació clara dels resultats.

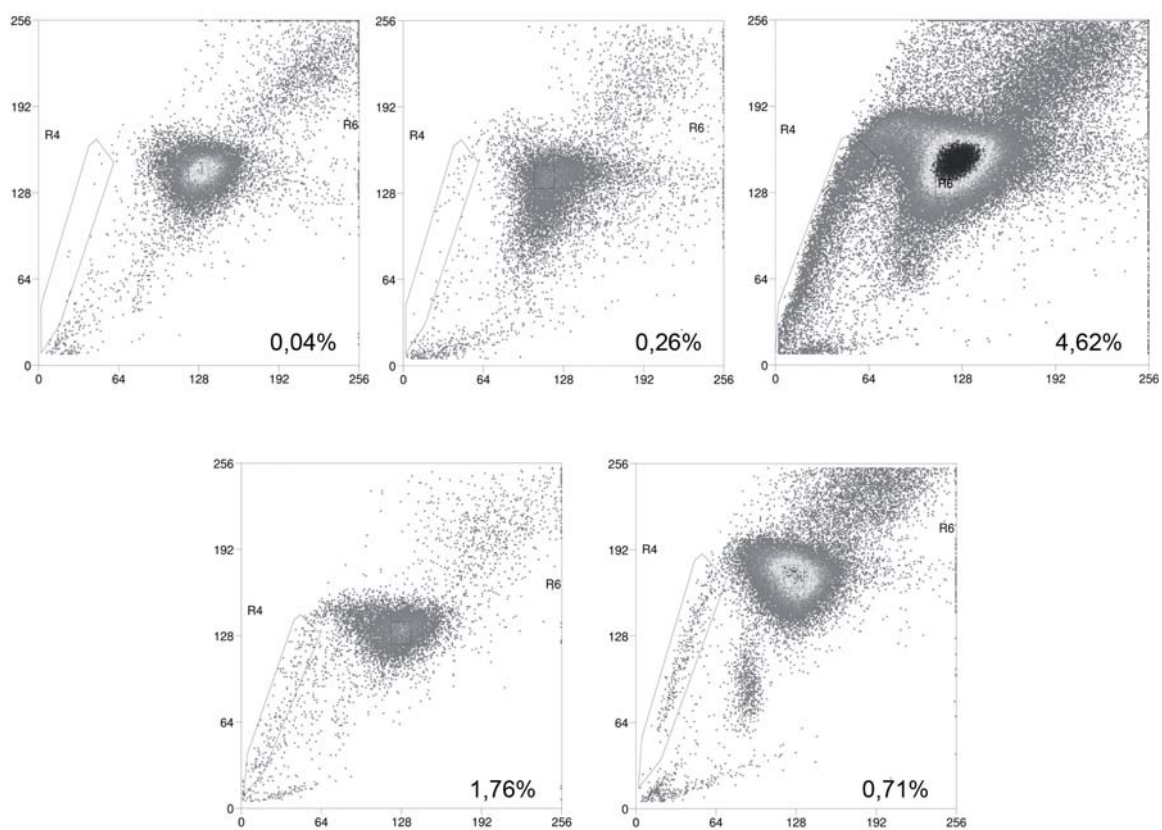


Figura R47: Anàlisi de la *side population* de 5 mostres de pròstata fetal. La SP va resultar ser variable entre les mostres.
