

OBJECTIUS

OBJECTIUS

- 1.** Determinar si el mecanisme d'acció antitumoral en carcinoma de còlon humà dels compostos inhibidors de COX-2 és dependent o independent de la inhibició de COX-2. D'una banda, s'analitza si la capacitat inhibidora de COX-2 correlaciona amb l'activitat antitumoral dels compostos i, d'altra banda, si els nivells d'activitat de l'enzim determinen la sensibilitat de les cèl·lules als inhibidors.
- 2.** Analitzar el mecanisme d'acció in vitro del celecoxib en cèl·lules de carcinoma de còlon, determinant les principals vies de transducció de senyal implicades en la resposta al fàrmac.
- 3.** Avaluar l'efecte antitumoral in vivo del celecoxib en models de xenotransplantament en ratolins atímics, comparant la resposta al fàrmac i el mecanisme d'acció entre els models d'implantació subcutània i ortotòpica.
- 4.** Desenvolupar nous compostos antitumorals d'estructura química relacionada amb el celecoxib que siguin més efectius i tinguin el mateix mecanisme d'acció in vitro.

MATERIALS I MÈTODES

1. EXPERIMENTS IN VITRO

1.1 CULTIUS CEL·LULARS

1.1.1 Línies cel·lulars

En aquest estudi hem utilitzat les següents línies cel·lulars:

- TD20 i NC59: línies cel·lulars derivades de tumors de còlon humans. Aquestes línies es van establir en el nostre laboratori a partir de tumors de pacients de l'Hospital de Sant Pau que es varen xenotrasplantar ortotòpicament en ratolins atímics. La línia TD20 té el gen p53 mutat i la NC59 no té mutacions en aquest gen.
- HT29: línia cel·lular derivada d'un tumor de còlon humà obtinguda de la col·lecció de l'ATCC. Aquesta línia té els gens p53 i Apc mutats.
- HCA7: línia cel·lular derivada d'un tumor de còlon humà cedida per la Dra. Susan Kirkland (Royal Postgraduated Medical School, Hammersmith Hospital). Aquesta línia té el gen p53 mutat i inestabilitat de microsatèl·lits (Abdel-Rahman et al., 2001).
- PC3 : línia cel·lular derivada d'una metàstasi òssia d'un adenocarcinoma de pròstata humà. Obtinguda de la col·lecció de l'ATCC.

Totes les línies les hem cultivat en un incubador humificat a 37°C i 5% de CO₂ mantenint sempre els cultius subconfluents. Les cèl·lules TD20, NC59 i HT29 les creixíem amb medi DMEM, les HCA7 amb DMOD i les PC3 amb RPMI 1640. En tots els casos hem suplementat el medi amb 10% FBS (Sèrum Fetal Boví), 2mM Glutamina i antibiòtics (50 unitats/ml penicilina/streptomicina). Tots els reactius utilitzats en el cultiu de cèl·lules són de GIBCO BRL (Life Technologies).

1.1.2 Subcultiu de cèl·lules

Abans de que les cèl·lules arribessin a confluència les subcultivàvem. Per això, trèiem el medi del flascó i rentàvem amb PBS, a continuació afegíem tripsina-EDTA i incubàvem

uns minuts a 37°C fins que les cèl·lules es desenganxaven de la placa o flascó. Neutralitzàvem la tripsina afegint medi amb sèrum i realitzàvem la dilució adient per al subcultiu o experiment que volíem realitzar.

1.1.3 Congelació i descongelació de línies cel·lulars

Per a congelar stocks de cèl·lules, canviàvem el medi del flascó el dia anterior tenint en compte que havia d'estar aproximadament a un 80% de confluència. A continuació, tripsinitzàvem les cèl·lules i les centrifugàvem a 2.000rpm durant 5 minuts. Ressuspeníem el pellet en 2ml de FBS amb 10%DMSO i incubàvem 30 minuts en gel. Posàvem 1ml en cada criotub i congelàvem a -40°C durant 4 hores i després tota la nit a -80°C. Finalment, manteníem els stocks congelats en el tanc de nitrogen líquid.

Els vials es descongelaven en un bany estèril a 37°C, tan bon punt estaven descongelats posàvem la suspensió cel·lular en un tub amb medi de cultiu suplementat i centrifugàvem durant 5 minuts a 2.000rpm. Finalment, ressuspeníem el pellet amb 15 ml de medi de cultiu i sembràvem les cèl·lules en un flascó o placa.

1.1.4 Test de Micoplasma

Periòdicament (1 cop al mes) realitzàvem el test de micoplasma en totes les línies cel·lulars per tal de controlar que no estiguessin contaminades. En cas de que alguna de les línies donés positiu pel test descongelàvem nous vials de l'stock. Per a realitzar el test, sembràvem les cèl·lules en una placa de 60mm on havíem posat prèviament un cubreobjectes estèril. Manteníem les cèl·lules en cultiu amb medi sense cap antibiòtic durant un mínim de tres dies. Per a començar el test, trèiem el medi de cultiu de la placa i fèiem dos rentats amb PBS (1 minut). A continuació, fèiem un rentat d'1 minut amb PBS: MetanolAcètic (1:1) i un altre rentat de 10 minuts amb MetanolAcètic (3:1). Rentàvem amb H₂O destil·lada i fèiem la tinció amb colorant Hoescht diluït en PBS (50ng/ml) durant 30 minuts i a les fosques. Finalment, fèiem un darrer rentat amb H₂O i muntàvem el cubre amb medi FLUOPREP (Biomérieux). Observàvem les preparacions amb el microscopi de fluorescència amb el filtre DAPI. Si les cèl·lules no estaven contaminades només vèiem el nucli tenyit i tot el fons net. Si les cèl·lules estaven contaminades de micoplasma

observàvem, a més del nucli, uns petits punts a les vores de la membrana cel·lular o en tot el citoplasma que corresponen a l'ADN dels micoplasmes.

1.1.5 Cultiu de cèl·lules en suspensió

Per tal de créixer les cèl·lules en suspensió hem utilitzat plaques de cultiu prèviament recobertes amb poli(2-hidroxietil metacrilat) (polyHema, Sigma).

Preparàvem una solució a l'1% de polyHema en etanol al 95%. Filtràvem la solució per tal de mantenir-la estèril amb un filtre de 0,2µm. A continuació, afegíem un volum de polyHema a la placa depenent del seu tamany: 5 ml per plaques de 100mm, 2,4 ml per plaques de 60mm, 400µl/pou en plaques de 6 pous i 40µl/pou en plaques de 96 pous.

Deixàvem les plaques destapades a dins de la campana de cultius fins que l'etanol s'hagués evaporat completament i afegíem un altre volum de polyHema. Un cop es tornés a evaporar el polyHema, fèiem dos rentats amb PBS i sembràvem les cèl·lules a la densitat desitjada.

1.2 ANÀLISIS DE LA VIABILITAT CEL·LULAR (XTT)

Per analitzar l'efecte dels fàrmacs en les diferents línies cel·lulars hem utilitzat el kit de Roche "Cell Proliferation Kitt II XTT".

Aquest assaig es basa en el fet de que la sal de tetrazolium (XTT) només pot ser metabolitzada per cèl·lules viables (metabòlicament actives) i transformar-se així en un colorant de color taronja anomenat formazan. Aquest compost pot ser quantificat espectrofotomètricament amb un lector d'ELISA a una longitud d'ona entre 450-500nm. Així, una disminució en el nombre de cèl·lules viables produïda per l'efecte del fàrmac, correlaciona directament amb una disminució en la quantitat de formazan format respecte a les cèl·lules no tractades que detectàvem com menor absorvència a 450-500nm.

Protocol:

Tripsinitzàvem les cèl·lules i les centrifugàvem durant 10 minuts a 2.000rpm. Ressuspeníem el pellet amb medi filtrat i després de comptar la densitat cel·lular amb una càmera de Neubauer, preparàvem una suspensió de cèl·lules amb medi filtrat a una densitat

cel·lular determinada que depenia de la línia cel·lular amb la que treballàvem i del temps de l'assaig . Sembràvem 100µl de la suspensió en cada pou en una placa de 96 pous . En la segona fila de la placa hi posàvem medi sol que ens servia per a fer un blanc de medi i de fàrmac. Incubàvem la placa durant 24 hores a 37°C i 5%CO₂ per a deixar que les cèl·lules s'adherissin. A continuació, posàvem en cada pou la concentració de fàrmac que corresponia. Incubàvem les cèl·lules amb el fàrmac durant 60 hores , en el cas dels XTTs a temps llargs , o durant 4 hores, en el cas dels XTTs a temps curts. A continuació, preparàvem el reactiu d'XTT fent una mescla dels dos components seguint la següent proporció:

5ml XTT labelling reagent + 100µl Electron-coupling reagent

Afegíem 50 µl de la mescla per cada pou, incubàvem durant 4 hores i mesuràvem l'absorvència a 490nm en un lector d'ELISA. Finalment, calculàvem el percentatge de viabilitat cel·lular (respecte a les cèl·lules control) per a cada concentració de fàrmac i extrapolàvem la IC₅₀ de cada compost amb el programa Sigmaplot utilitzant l'equació sigmoidal de Hill (3 paràmetres).

Per a realitzar els XTTs en cèl·lules en suspensió, el protocol que hem utilitzat és el mateix però tractant prèviament les plaques de 96 pous amb polyHema (40µl/pou).

Per a realitzar els XTTs amb inhibidors específics també hem seguit el mateix protocol però abans de posar el fàrmac hem tractat les cèl·lules durant un temps determinat amb l'inhibidor i, a continuació, hem afegit el fàrmac. Els inhibidors que hem utilitzat són:

- **ZVADfmk** (Calbiochem) : Inhibidor de pan-caspases. Hem tractat les cèl·lules durant 1 hora amb 1, 5 i 10µM zVADfmk abans de posar el fàrmac.
- **PP2** (Calbiochem) : Inhibidor específic de Src. Hem tractat les cèl·lules durant ½ hora amb 10 µM i 30µM PP2.
- **WORTMANIN** (Calbiochem): Inhibidor de PI3K. Hem tractat les cèl·lules durant 1 h amb 0.1µM i 0.5µM Wortmannin.

1.3 MESURA DE L'ACTIVITAT CICLOOXIGENASSA

1.3.1 Inhibició de l'activitat COX en sang humana total

S'ha utilitzat una modificació del protocol descrit per Brideau i col.laboradors (1996). Per a la mesura de l'activitat COX-1, s'extreia la sang i es distribuïen volums de 0,5ml en eppendorfs siliconats amb 2µl del fàrmac o vehicle. Homogeneïtzàvem invertint el tub tres vegades i incubàvem 1h a 37°C amb agitació suau. Centrifugàvem 15min a 10.500g i recollíem 100µl del sobrenedant (sèrum). Afegíem en cada tub 400µl de metanol 1% en etilacetat, agitàvem 1 min i centrifugàvem 10 min a 5.000g a 4°C. Aspiràvem 300µl del sobrenedant i s'evaporava en atmosfera de nitrogen. Finalment, ressuspeníem les mostres en el tampó subministrat en el kit "TXB₂ enzymoimmunoassay" (Cayman Chemical) i es processava segons les instruccions del fabricant per a la quantificació de TXB₂.

Per a la mesura de l'activitat COX-2, preparàvem els eppendorfs amb 2µl de fàrmac o vehicle (DMSO), 6µl d'aspirina a 1mg/ml (per inhibir l'activitat COX-1) i 9µl d'heparina sòdica 1% i afegíem 0,5 ml de sang en cadascun. Homogeneïtzàvem la sang invertint els tubs tres vegades i incubàvem 15 min a 37°C. Afegíem 10µl de PBS o 10µl de LPS 5mg/ml a una concentració final de 100 µg/ml en sang. Les mostres s'incubaven 24h a 37°C, es centrifugaven 15 min a 10.500g i recollíem 100µl de sobrenedant (sèrum). Afegíem en cada mostra 400µl de metanol, mesclàvem els tubs durant 1 min i centrifugàvem 10 min a 5.000g a 4°C. Aspiràvem 300µl del sobrenedant i s'evaporava en atmosfera de nitrogen. Finalment, ressuspeníem les mostres en el tampó subministrat amb el kit "PGE₂ enzymoimmunoassay" (Cayman Chemical) i es processaven segons les instruccions del fabricant per a quantificar la PGE₂.

1.3.2 Mesura dels productes de COX

Vam mesurar els nivells de síntesi dels productes de COX com a indicador de la seva activitat i de la inhibició causada pels diferents compostos estudiats. Cultivàvem les cèl·lules en plaques de 6 pous fins que arribessin a un 80% de confluència. Trèiem el medi de cultiu i incubàvem durant 30 minuts a 37°C amb 500µl de medi amb les diferents concentracions dels compostos o vehicle. Afegíem 25µM [14C]-àcid araquidònic i

incubàvem 10 minuts. La reacció s'aturava afegint un volum de metanol fred amb 2% d'àcid acètic. Els nivells d'eicosanoids s'analitzaven per HPLC, injectant les mostres en una columna reversa (Ultrasphere-ODS 4x250 µm, Beckman). La composició de la fase mòbil era del 100% d'eluent A (acetonitril: H₂O: àcid acètic 33:67:0,1) durant els primers 16 minuts després de la injecció. El percentatge d'eluent B (acetonitril: H₂O: àcid acètic 90:10:0,1) augmentava linealment fins arribar al 65% als 26 minuts i augmentant fins al 100% a partir del minut 41 fins al 60. El flux de la fase mòbil era d'1ml/min i la radioactivitat fou mesurada amb un detector de radioactivitat (171, Beckman).

1.4 TEST D'APOPTOSI (Tinció Hoescht)

Per tal de determinar la inducció d'apoptosi produïda per un determinat fàrmac, hem realitzat la tinció amb colorant nuclear Hoescht. Sembràvem primer les cèl·lules en una placa de 6 pous a la densitat que corresponia segons la línia cel·lular. L'endemà, afegíem el fàrmac (o vehicle) a la concentració desitjada. Incubàvem durant el temps determinat per l'experiment i fèiem el test. Primer, recollíem el medi de cultiu i centrifugàvem per tal de recuperar les cèl·lules que estaven en suspensió. Alhora, tripsinitzàvem les cèl·lules que estaven adherides i també les centrifugàvem, ajuntant-les finalment amb el pellet que havíem obtingut de les cèl·lules en suspensió. Fixàvem les cèl·lules amb 3,7% paraformaldehid (en PBS) durant 10 minuts a -20°C. Fèiem 3 rentats amb PBS i permeabilitzàvem amb 0,5% Tritó-X en PBS durant 5 minuts a temperatura ambient. Fèiem dos rentats amb PBS i, finalment, realitzàvem la tinció amb Hoescht (50ng/ml en PBS) durant 10-30 minuts a temperatura ambient i a les fosques. Rentàvem amb aigua destil·lada i ressuspeníem el pellet amb 10 µl de PBS. Posàvem tot el volum en un portaobjectes i deixàvem assecar. Posàvem el medi de muntatge Fluoprep i muntàvem el cubre. Segellàvem amb laca d'ungles, per evitar que la preparació s'assequés, i observàvem la preparació amb microscopi de fluorescència amb el filtre de DAPI.

1.5 PÈRDUA D'ANCORATGE

Per a mesurar la pèrdua d'ancoratge de les cèl·lules produïda pels fàrmacs, sembràvem les cèl·lules en una placa de 6 pous. L'endemà, afegíem el fàrmac (o vehicle), a les

concentracions prèviament determinades, i incubàvem durant 15h. A continuació, recollíem, d'una banda, les cèl·lules que estaven al medi de cultiu centrifugant a 1.500rpm i, d'altra banda, les cèl·lules que estaven adherides a la placa tripsinitzant-les. En ambdós casos, ressuspeníem les cèl·lules en 2ml de medi i les comptàvem (per separat) en una càmera de Neubauer tres vegades. Cada experiment el vam realitzar un mínim de tres vegades en dies independents. Finalment, calculàvem el percentatge de cèl·lules en suspensió respecte al nombre total de cèl·lules per a cada fàrmac.

1.6 WESTERN BLOT

1.6.1 Extracció de proteïnes

Per a obtenir extractes de proteïnes, sembràvem les cèl·lules en plaques de 100mm i les incubàvem durant 24 hores per tal que s'adherissin. A continuació, afegíem el fàrmac a la concentració desitjada o el vehicle. Incubàvem les plaques durant el període de temps que l'experiment requeria i fèiem els extractes. Per això, preparàvem primer el tampó d'extracció amb els següents reactius: 1M Tris/acetat, 100mM EDTA pH 8.8, 100mM EGTA pH 8.8, 1M Sucrosa , 10% Tritó X-100 en 20mM TRIS/ Acetat- 0,27M Sucrosa, 100mM Ortovanadat, 1M Glicerofosfat, 0,5M NaF, 100mM Pirofosfat, 100mM Benzamidina 100mM PMSF, 2mg/ml leupeptina i 2 β mercaptoetanol.

Aquest tampó d'extracció conté inhibidors de quinasses i fosfatasses per tal que les proteïnes mantinguin el seu estat de fosforilació original.

Un cop preparat el tampó, recollíem el medi de la placa i el centrifugàvem per tal de recollir les cèl·lules que es trobaven en suspensió. Rentàvem la placa amb PBS i fèiem l'extracció de les cèl·lules adherides afegint tampó (100-150 μ l) a la placa i rasant amb un "scraper" fins a recollir totes les cèl·lules. El tampó que recollíem l'utilitzàvem per a ressuspendre el pellet obtingut de les cèl·lules que estaven en suspensió. A continuació, provocàvem el trencament total de les cèl·lules utilitzant un sonicador i incubàvem l'extracte en gel durant uns 20 minuts. Finalment, centrifugàvem a 14.000 rpm durant 10 minuts i recollíem el sobrenedant. Els extractes proteics els guardàvem congelats a -80°C .

1.6.2 Extracció proteica de la fracció citosòlica

Per tal de determinar l'alliberament de citocrom c de la mitocòndria ens calia separar la fracció citosòlica de la cèl·lula de la resta (nuclis, membranes i orgànuls). Per això, vam utilitzar el següent protocol. Un cop cultivades les cèl·lules en plaques de 100mm i tractades amb el fàrmac durant el temps que requerís l'experiment, les tripsinitzàvem i ajuntàvem amb les cèl·lules del sobrenedant centrifugant durant 10 minuts a 1.500rpm. Rentàvem el pellet amb el tampó d'extracció (20mM Hepes pH7.5, 10mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 250mM Sucrosa, 1mM DTT, 0,1mM PMSF, 5µg/ml pepstatin A, 10µg/ml leupeptin i 2µg/ml aprotinin) i tornàvem a centrifugar 10 minuts a 1.500rpm. Ressuspeníem el pellet amb 100-200µl de tampó i incubàvem en gel durant 30 minuts. Homogeneitzàvem amb un èmbol de vidre "pestle B" 15 vegades i centrifugàvem a 20.000g durant 30 minuts. Recollíem el sobrenedant, i tornàvem a centrifugar a 20.000g durant 30 minuts. Recollíem el sobrenedant i el guardàvem congelat a -80°C.

1.6.3 Quantificació de proteïnes

Per a quantificar els extractes proteics utilitzarem el mètode de Bradford. Aquest mètode es fonamenta en l'observació que l'absorvència màxima per a una solució acídica de blau brillant de coomassie vira de 465 a 595 nm quan s'uneix a proteïna. Així, aquest assaig es basa en que el canvi de color en resposta a diferents concentracions de proteïna té un coeficient constant dins d'un rang de concentracions. Una recta patró, obtinguda a concentracions conegudes de proteïna, permet fer una interpolació de la proteïna present en les mostres.

Realitzàvem la quantificació en una placa de 96 pous en la que hi posàvem el blanc (aigua), la recta patró (amb BSA) i les mostres a quantificar diluïdes en H₂O en un volum total de 10µl. Afegíem 190µl de reactiu de Bradford (BIORAD) diluït 1:5, incubàvem 5 minuts i mesuràvem l'absorvència a 595 nm en un lector d'Elisa. A partir dels valors obtinguts en la recta patró i, tenint en compte la dilució utilitzada en les mostres, calculàvem la concentració de proteïna dels extractes.

1.6.4 Electroforesi i transferència

Per l'electroforesi, utilitzàvem gels de poliacrilamida de dos fases. Un cop muntats els vidres afegíem la part inferior del gel que estava formada per: 15% acrilamida, 0,003% bis-acrilamida, 0,375M Tris-HCl pH 8.8, 0,1% SDS, 0,1% APS i 0,07% TEMED. A continuació, afegíem una mescla de metanol i H₂O (50%) i deixàvem polimeritzar durant uns 20 minuts. Un cop s'havia polimeritzat la part inferior, trèiem el metanol, rentàvem amb H₂O i afegíem la fase superior del gel que estava formada per: 2,7% acrilamida, 0,06% bis-acrilamida, 0,08M Tris-HCl pH 6.8, 0,1% SDS, 0,1% APS i 0,07% TEMED. Els gels els deixàvem polimeritzar un mínim de 2 hores.

Les mostres de proteïna les diluíem amb 3X de tampó de càrrega (150mM Tris-HCl pH 6,8, 6% SDS, 0,15% bromophenol blue, 30% glicerol, 300mM dithiothreitol) i les desnaturalitzàvem a 100°C durant 3 minuts. La quantitat de proteïna que carregàvem depenia de les proteïnes que volguéssim detectar (entre 35 i 50µg), al costat de les mostres carregàvem també 10µl del marcador de pes molecular (Biorad). Un cop carregat el gel el corríem a 50mA en tampó Laemmli (25mM Tris, 250mM glicina pH 8.3, 0.1% SDS) aproximadament durant 4 hores. Aleshores, muntàvem la transferència en membranes de nitrocel.lulosa (Protran, Schelicher & Schuell) i paper Watman i transferíem durant tota la nit a 200mA en tampó de transferència (39mM glicina, 48mM Tris base, 0,037% SDS i 20% metanol).

1.6.5 Hibridació de les membranes

Un cop finalitzada la transferència, teníem la membrana amb 0.2% PonceauS (Sigma) en una solució al 3% d'àcid acètic durant 5 minuts i rentàvem amb aigua. Aquesta tinció ens permetia observar si la proteïna s'havia transferit correctament a la membrana i si la càrrega de les diferents mostres estava igualada. A continuació, bloquejàvem la membrana amb llet descremada en pols al 5% en TBS-T (132mM NaCl, 20mM Tris pH 7.5, 0.1% Tween20) durant dues hores. Després, fèiem tres rentats amb TBS-T (un de 15 min i dos de 5 min) i tallàvem les membranes segons les proteïnes que volíem analitzar. Incubàvem cada membrana amb l'anticòs primari corresponent, diluït en TBS-T amb 0.1% BSA, durant 1 hora a temperatura ambient o tota la nit a 4°C. Fèiem tres rentats de TBS-T i incubàvem amb l'anticòs secundari que corresponia durant 1 hora a temperatura ambient.

Finalment, fèiem tres rentats més de TBS-T i revelàvem les membranes amb el kit Supersignal (Pierce) que dóna un senyal de quimioluminiscència que revelàvem en plaques d'autoradiografia. Per algunes proteïnes que tenien baixos nivells d'expressió hem utilitzat el kit West-pico (Pierce) que és més sensible que el que utilitzàvem de rutina.

Els anticossos primaris i les dilucions utilitzades foren les següents:

- Pharmingen (BD Biosciences): rabbit anti-Caspasa 3(1:3000), mouse anti-Capassa 7 (1:5000), rabbit anti-Caspasa 8 (1:5000), mouse anti-FAK (1:4000), mouse anti-FAK(Tyr397) (1:4000), mouse anti-p130cas (1:4000), mouse anti-Bax (1:500), mouse anti-Bcl-2 (1:500), mouse anti-Bad (1:1000), mouse anti-citocrom c (1:1000), mouse anti-Akt (1:2000), mouse anti- β catenina (1:1500), mouse anti-Ecadherina (1:4000), mouse anti-ciclina D3 (1:2500), mouse anti-ciclina A (1:2000), mouse anti-ciclina E (1:2000), mouse anti-ILK (1:4000), mouse anti-PCNA (1:6000), mouse anti-Rac1 (1:2000)
- Santa Cruz Biotechnologies: goat anti- β actina (1:20000), goat anti-p21 (1:6000), rabbit anti-ciclina B1 (1:1000)
- Cell Signalling: rabbit anti-Caspasa 9 (1:5000), rabbit anti-p130cas(Tyr410) (1:1000), rabbit anti-Akt(Thr308) (1:2000)
- Biosource: rabbit anti-panSrc (1:2000), rabbit anti-src(Tyr418) (1:1000)
- Cayman Chemicals: rabbit anti-COX-2 (1:8000)
- Boehringer Manhein: rabbit anti-PARP (1:10000)
- Promega: rabbit anti-activeMAPK (1:10000)

Els anticossos secundaris (1:10000) eren de Jackson Immunoresearch.

1.7 IMMUNOFLUORESCÈNCIA

La tècnica d'immunofluorescència permet determinar la localització de proteïnes en les cèl·lules en cultiu marcant-les amb anticossos fluorescents. Per a fer aquesta tècnica, sembràvem les cèl·lules en "chamber slides" de 8 pous, que són portaobjectes amb un suport de plàstic adherit formant una sèrie de pous on s'hi poden cultivar les cèl·lules. Després de cultivar les cèl·lules durant un mínim de 24 hores i de tractat amb el fàrmac o vehicle començàvem la immunofluorescència. Trèiem el medi de cultiu dels pous i fèiem 3 rentats de PBS de 5 minuts en agitació. A continuació, fixàvem les cèl·lules amb metanol

fred durant 1 minut a -20°C . Un cop fixades les cèl·lules separàvem el suport de plàstic del portaobjectes. Fèiem 3 rentats més de 5 minuts amb PBS en agitació i bloquejàvem amb PBS 1% BSA durant 1 hora a temperatura ambient. Fèiem 3 rentats de PBS i incubàvem amb l'anticòs primari (mouse anti-p130Cas 1:100) diluït en PBS 1% BSA durant 1 hora. A continuació, es feien 3 rentats més amb PBS i s'incubava amb l'anticòs secundari (Jackson Immunoresearch) marcat amb fluorescència (TRITC) diluït 1:100 en PBS en 1% BSA durant 45 minuts a temperatura ambient i a les fosques. Per tenyir alhora els nuclis de les cèl·lules afegíem Hoescht (50ng/ml) en la solució de l'anticòs secundari. Finalment, rentàvem 3 vegades en PBS i muntàvem el cubre amb medi FLUOPREP. Les preparacions les observàvem en el microscopi de fluorescència amb filtre TRITC per a visualitzar p130Cas i amb el filtre DAPI pels nuclis. El fet de fer alhora aquesta tinció ens permetia distingir més clarament si la proteïna es trobava al nucli.

Per a fer la immunofluorescència de les cèl·lules que estaven en suspensió després del tractament amb el fàrmac, recollíem el medi del pou i el centrifugàvem utilitzant un Citospin, una centrífuga que permet recollir totes les cèl·lules del medi en un portaobjectes. A partir d'aquí, continuàvem el mateix protocol que en les cèl·lules adherides.

Els anticossos secundaris utilitzats eren de Jackson Immunoresearch.

1.8 TRANSFECCIÓ DE CÈL·LULES EN CULTIU

1.8.1 Plàsmids

En aquest estudi hem treballat amb diversos plàsmids que han estat cedits per diferents investigadors:

- **Src-531:** Conté el cDNA de Src insertat en el plàsmid pcDNA3. El gen conté una mutació que confereix activació constitutiva de la proteïna. Aquest plàsmid el vam obtenir de la Dra. Rosalyn Irby (Florida, USA).
- **Fak-myr:** Conté el cDNA de Fak insertat en el plàsmid pCEFL. En el cDNA de Fak s'ha afegit una seqüència que codifica per un senyal de miristilació (del gen Src) que localitza Fak a membrana mantenint-lo constitutivament actiu. S'ha obtingut del Dr. Silvio Gutkind (Bethesda, USA)

- **CAS-FL**: Conté el cDNA de p130cas en el plàsmid pRK5. El gen codifica per la proteïna silvestre, per tant no és activa constitutivament. S'ha obtingut de la Dra. Mary Rose Burnham (Kildare, Irlanda).
- **pEGFP** : Conté el cDNA de la Green Fluorescent Protein (Clontech, BD Biosciences). Aquest plàsmid s'ha utilitzat per a comprovar que les cèl·lules es transfectaven correctament.

En totes les transfeccions hem utilitzat com a plàsmid control el pcDNA3 (Invitrogen) .

1.8.2 Transformació de bacteris competents

Per tal d'obtenir majors quantitats dels plàsmids que ens han estat cedits hem transformat cèl·lules competents per a realitzar posteriorment maxipreps. En un criotub posàvem 1µg de plàsmid i 50µl de bacteris competents DH5α (Invitrogen) i deixàvem en gel durant 30 minuts. Fèiem un xoc tèrmic durant 45 segons en un bany a 42°C i deixàvem 2 minuts en gel. Afegíem 500µl de medi S.O.C. (2% triptona, 0,5% yeast extract, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl, 10mM MgSO i 20mM glucosa) al criotub i deixàvem durant una hora en un bany a 37°C en agitació. Sembràvem dues plaques d'LB agar per a cada plàsmid amb 50 i 100µl de bacteris i deixàvem créixer tota la nit en una estufa a 37°C. L'endemà, escollíem la placa on hi havia colònies ben aïllades i en picàvem una a un tub amb 50 ml de medi LB (L.Broth). Deixàvem créixer tot el dia en un bany a 37°C en agitació. Aleshores, repartíem el volum del tub en dos flascons de 75cm² i deixàvem créixer tota la nit en agitació a 37°C. L'endemà purificàvem els plàsmids amb el kit de maxipreps de Qiagen seguint les instruccions del fabricant.

El medi LB està compost per : 3% Bacto triptona, 1.5% Yeast extract, 3% NaCl , ajustant el pH a 7.2.

Per a preparar l'LB agar, afegíem 1.5% d'agar al medi LB, autoclavàvem i quan es refredava, però encara no començava a solidificar, afegíem uns 5ml en les plaques de petri i deixàvem solidificar.

1.8.3 Transfecció amb Lipofectamine-Plus Reagent

Per a realitzar les transfeccions transitòries, sembràvem les cèl·lules TD20 el dia anterior en una placa de 100mm a una densitat aproximada de $4 \cdot 10^5$ cèl·lules/ml. Abans de fer la

transfecció canviàvem el medi de la placa i hi afegíem 5ml de medi amb glutamina (sense FBS i antibiòtics). A continuació, preparàvem el plàsmid. En un eppendorf posàvem 750µl de medi (amb glutamina) i hi afegíem 20µl de PLUS REAGENT (Invitrogen), 15µg del plàsmid i 3µg de plàsmid GFP que utilitzàrem com a control de transfecció. Incubàvem durant 15minuts a temperatura ambient. En un altre eppendorf mesclàvem 750µl de medi (amb glutamina) i 30µl de LIPOFECTAMINE (Invitrogen). Després, mesclàvem el contingut dels dos eppendorfs i incubàvem 15 minuts a temperatura ambient. Finalment, afegíem la mescla a les cèl·lules i les deixàvem en l'incubador. A les 3h afegíem 5ml de medi amb glutamina i FBS i incubàvem fins l'endemà. Per a controlar que la transfecció havia anat bé, observàvem al microscopi de fluorescència si hi havia cèl·lules que haguessin incorporat el plàsmid GFP. A continuació, sembràvem una placa per a realitzar els assajos de citotoxicitat i una altra per a fer extracció de proteïna.

2. EXPERIMENTS IN VIVO EN RATOLINS ATÍMICS

2.1 ANIMALS

En els experiments in vivo realitzats en aquest treball, vàrem utilitzar ratolins atímics swiss nu/nu mascles de 4/5 setmanes de 18-22g de pes (IFFA Credo). Els animals els vàrem mantenir en condicions estèrils, estabulats en gàbies autoclavades, amb aigua estèril i dieta irradiada dins d'armaris amb ventilació de flux en una cambra amb llum ultraviolada. Els ratolins foren manipulats dins una campana de flux amb tot el material estèril.

2.2 TUMORS

Els experiments in vivo es van realitzar implantant el tumor TD20 en els animals. Aquest tumor prové d'un pacient intervingut en l'Hospital de Sant Pau i fou perpetuat com a xenograft ortotòpic (implantat en el cec) i conservat mitjançant criopreservació.

Per tal d'obtenir suficient teixit tumoral per a realitzar els experiments in vivo, creixíem primer el tumor ortotòpicament en un mínim de 4 animals. D'aquesta manera els tumors en els que estudiàvem l'efecte dels fàrmacs provenien tots del mateix passe. Quan els tumors assolien un volum de 0,5 a 1 cm³ sacrificàvem els animals i dividíem els tumors en fragments de 10mg. Aquests fragments els implantàvem a continuació en el grup d'animals en els que realitzaríem l'experiment en la localització subcutània o ortotòpica.

2.3 TÈCNIQUES QUIRÚRGIQUES

En l'estudi in vivo es van realitzar dos tipus d'implantacions de fragments tumorals : implantació ortotòpica i subcutània.

Per a realitzar la implantació subcutània del tumor es feia una incisió al costat dret superior del llom del ratolí i amb la punta d'unes estisores quirúrgiques s'obria un espai

sota la pell del ratolí on es dipositava el fragment de tumor. A continuació, es tancava la incisió amb una grapa quirúrgica.

La implantació ortotòpica es realitza en l'òrgan d'origen del tumor, en el nostre cas el còlon. Per això, calia fer una laparotomia mitja i exterioritzar el cec del còlon on s'implantava el fragment tumoral fent un punt de prolene 6-0 en el cec. Finalment, es tancava la laparotomia amb una grapa quirúrgica.

Un cop realitzades les implantacions es controlava el creixement tumoral dues vegades per setmana. En el cas de la implantació subcutània es mesura el volum tumoral amb un peu de rei i en la implantació en el còlon s'avaluava si creixia el tumor per palpació.

2.4 TRACTAMENT AMB EL FÀRMAC

Un cop implantats els tumors en els ratolins els deixàvem créixer aproximadament de 2 a 3 setmanes fins que assolien un tamany de 200mm^3 , en el cas de la implantació subcutània, o fins que es poguessin palpar, en el cas de la implantació ortotòpica. Abans de començar el tractament amb el fàrmac descartàvem aquells animals en els que el tumor no havia crescut o bé es desviava molt de la mitjana dels tumors. A continuació, dividíem els animals en dos grups, control i tractat, aleatòriament incloent un total de 10 animals per grup.

2.4.1 Preparació i administració del fàrmac

Per a preparar el celecoxib per administrar als ratolins primer pesàvem el fàrmac en vials que esterilitzàvem a 80°C durant 4h i abans d'administrar-lo el dissolíem amb goma aràbiga (5% p/v). La dosi administrada fou de 150mg/Kg i l'administració es va fer diàriament per via oral (gàlibo) durant un total de 16 dies.

2.4.2 Avaluació de l'activitat antitumoral

Per avaluar l'activitat antitumoral del celecoxib en els tumors subcutanis, vàrem mesurar el volum del tumor cada tres dies mitjançant un peu de rei. Es va considerar el volum del

tumor el de l'elipsoide generada a partir de la mesura del diàmetre major (A) i menor (E) de cada tumor aplicant la següent fórmula : $V = (E^2 \times A) / 2$.

En ambdós experiments, ortotòpic i subcutani, vàrem pesar els animals cada tres dies com a mesura indirecta de la toxicitat comprovant alhora si hi havia algun signe extern que indiqués que el fàrmac produïa toxicitat als animals (urticàries, caquècsia...).

2.5 PROCESSAMENT DELS TUMORS

Un cop finalitzat el tractament es sacrificaren tots els animals i es van extreure el tumors. Vàrem mesurar el volum, el pes total final dels tumors i el pes sec (pes del tumor després de descartar la necrosi tumoral macroscòpica). Part del teixit tumoral obtingut el fixàvem amb formol al 4% i posteriorment s'incloïa en un bloc de parafina per tal de realitzar els talls histològics. L'altre fragment de tumor el congelàvem directament en nitrogen líquid per tal de realitzar l'extracció de proteïna.

2.5.1 Anàlisi histopatològic

A partir dels blocs de parafina obtinguts dels fragments tumorals fixats en formol, es feien talls de 5 micres amb un micròtom i, a continuació, es realitzava una tinció d'hematoxilina-eosina segons el protocol estàndard. Aquesta tinció permetia valorar la necrosi del teixit tumoral a nivell microscòpic i determinar el grau de diferenciació tumoral.

2.5.2 Test d'apoptosi

Per tal de comprovar i caracteritzar el tipus de mort cel·lular del tumor es realitzava una tinció amb el colorant nuclear Hoescht. Per això, es partia de talls de 5 micres dels blocs de parafina. Primer, els desparafinàvem i deshidratàvem seguint el següent protocol: submergíem 3 vegades els portes en xilol durant 5 minuts, dues vegades en etanol absolut durant 3 minuts, 3 minuts en etanol al 96%, 3 minuts en etanol al 70% i fèiem dos rentats amb PBS durant 5 minuts. A continuació, es permeabilitzava el teixit amb 10% Tritó X-100 en PBS durant 10 minuts i es feien dos rentats de 5 minuts en PBS. Finalment, es realitzava

la tinció amb Hoescht incubant amb una dilució 1:5.000 en PBS (50ng/ml) durant 1 hora a les fosques. Finalment, muntàvem els portaobjectes amb el medi de muntatge FLUOPREP (Biomérieux) i observàvem les preparacions en el microscopi de fluorescència amb filtre DAPI.

2.5.3 Extracció de proteïna dels tumors

Per a realitzar l'extracció de proteïna del tumor hem utilitzat el mateix tampó d'extracció que per l'extracció proteica de cèl·lules in vitro. Partíem d'un fragment tumoral congelat en nitrogen líquid i conservat a -80°C . Posàvem directament el fragment del tumor en un eppendorf en gel i hi afegíem un volum de tampó d'extracció (depenent del tamany del tumor). A continuació, es realitzava una disrupció mecànica amb un èmbol de plàstic fins que el tumor estava ben desfet, es fragmentaven les cèl·lules en un sonicador i s'incubaven en gel durant 20 minuts. Finalment es centrifugava durant 10 minuts a 14000 rpm i es guardava el sobrenedant a -80°C .

3. PROCESSAMENT DE LES DADES I ANÀLISI ESTADÍSTIC

En tots els anàlisis estadístics realitzats en aquest treball hem utilitzat el test no paramètric U de Mann-Whitney. Hem elegit aquest test perquè el nombre mostres dels diferents grups que hem comparat era molt baix ($n < 10$) i per a poder utilitzar el test t-student calia que les mostres complissin els criteris de normalitat i igualtat de la variàncies. En els casos en el que el nombre de casos (n) era molt baix no es podia determinar el criteri de normalitat i algunes de les mostres no complien el criteri de la igualtat de les variàncies (test de Levene). Per aquest motiu, hem utilitzat un test no paramètric doncs malgrat que és més restrictiu ens asseguràvem que les diferències observades fossin certes. En tots els anàlisis vam establir la significació estadística per valors de $p < 0,05$.

En el test de comparacions múltiples hem aplicat el test no paramètric d'anàlisi de la variància de Krukall-Wallis.

Per a realitzar els tests estadístics hem utilitzat el programa informàtic SPSS 11.5.2.

