# XIV Premi PRBB al millor treball de recerca en Ciències de la Salut i de la Vida

# 2019

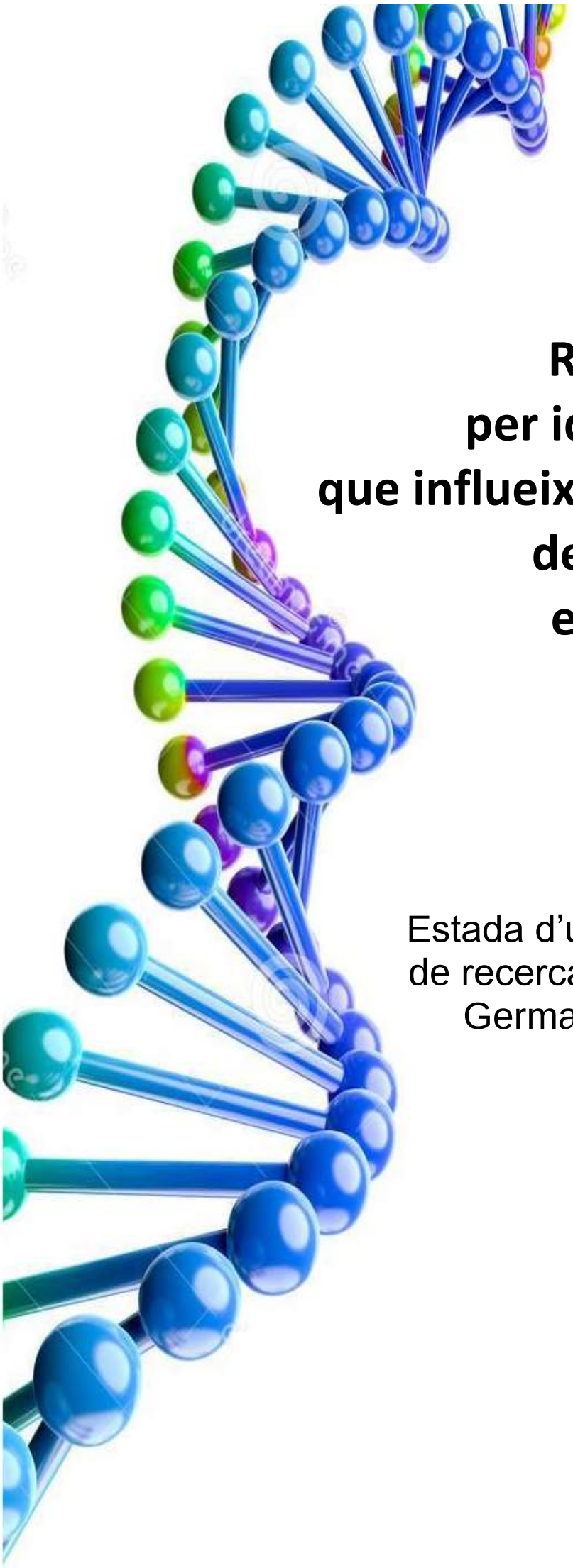
## Treball guanyador del 4rt premi

# Recerca biomèdica per identificar els gens que influeixen en l'efectivitat de la quimioteràpia en càncer de còlon

**Aran Blasco Soler**

**Tutor: Miguel Manzano Quintanilla**

**Institut Montserrat**



TREBALL DE RECERCA

# Recerca biomèdica per identificar els gens que influeixen en l'efectivitat de la quimioteràpia en càncer de còlon

Estada d'un mes en un laboratori de recerca biomèdica de l'Institut Germans Trias i Pujol (IGTP)

Autor: VALL DEL NORD

Tutor: M.M.Q.

Institut M.

Curs 2018-2019

# Agraïments

Vull agrair a l'IGTP (Institut Germans Tries i Pujol) per acceptar que jo fes les pràctiques del TR durant un mes al seu Institut de recerca. Concretament, vull expressar el meu agraïment al grup Dr. Perucho, i especialment a la S.F., la C.M. i la C.Q. per ensenyar-me gran part d'aquest treball, per acollir-me tan bé i fer-me sentir una més en el seu laboratori.

Així mateix, vull donar les gràcies a la meva tieta C.S. per introduir-me en aquest projecte.

També vull agrair al meu tutor, M.M.Q., que m'hagi encaminat i organitzat el meu TR.

Finalment, vull donar les gràcies als meus pares per ajudar-me en tot el que he necessitat.

# ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ ..... 3
Recerca biomèdica en la que he pogut participar ..... 3
Motivació per fer aquest treball de recerca ..... 4
Objectius del treball de recerca (TR) ..... 6
2. MARC TEÒRIC ..... 7
Objectiu del grup de recerca ..... 7
HIPÒTESI de la recerca ..... 7
OBJECTIUS ESPECÍFICS de la investigació que es durà a terme ..... 7
El càncer i els gens remodeladors de la cromatina ..... 8
Metodologia de la recerca que es porta a terme ..... 13
3. PRÀCTICA ..... 22
Introducció part pràctica ..... 22
Descripció del laboratori, els recursos dels quals disposa i les tècniques més importants que s'hi realitzen ..... 24
Investigació. Protocol i seqüència d'accions sobre les cèl·lules sembrades ..... 26
Primera fase: cicles de 21 dies de tractament amb drogues ..... 27
Quantes cèl·lules i quantes condicions/plaques necessitem? ..... 27
Infecció de les cèl·lules amb *shRNA*s ..... 28
Cicle de 21 dies. Planificació. Calendari ..... 30
Cicle de 21 dies. Tractament amb drogues. Organització de plaques segons droga i dilució. ..... 32
Canvi de medi ..... 33
Descans ..... 33
FACS, comptar i sembrar ..... 34
4 tractaments amb drogues per completar el cicle ..... 35
Seqüenciar després de l'últim cicle de 21 dies de tractament amb drogues ..... 36
Segona fase: Infectar amb *shRNA*s específics per bloquejar gens específics ..... 37
Resum dels resultats ..... 38
4. CONCLUSIONS ..... 39
5. ANNEX A – Pòster "RESPONSE PROJECT" ..... 42
6. ANNEX B - El càncer i el càncer de còlon ..... 43
Què és el càncer? ..... 43
El càncer, l'ADN i els gens ..... 44

El càncer de còlon ..... 45
Definició ..... 45
El còlon i recte ..... 45
El càncer de còlon i recte ..... 46
Causes ..... 47
Símptomes ..... 48
Diagnòstic ..... 49
Seguiment. Estadificació (grau d'extensió). ..... 50
Tractaments ..... 51
*Conceptes importants per la investigació que s'està duent a terme. Genètica i Epigenètica* ..... 56
Epigenètica ..... 56
7. ANNEX C - DIARI de LABORATORI ..... 58
8. ANNEX D - Resultats finals citometria → FACS ..... 87
Resum dels resultats ..... 87
9. Annex G - Bibliografia ..... 102
Llibres ..... 102
Articles ..... 102
Webs ..... 103
10. Figures ..... 105

# 1. INTRODUCCIÓ

## Recerca biomèdica en la que he pogut participar

El grup de recerca biomèdica del laboratori Dr. Perucho de l'IGTP (*Institut Trias i Pujol Research Institute*) està duent a terme una investigació per aconseguir trobar, d'entre un grup de 900 gens, **quins són els 10 que tenen més influència en fer que les cèl·lules siguin més sensibles** (es moren més) o menys sensibles (es moren menys o es fan immortals) a la quimioteràpia del càncer de còlon.

*Figura 1-1*
*http://www.germanstrias.org/*

S'ha seleccionat aquest grup de 900 gens fent un ampli estudi de les classificacions de gens.

Per aconseguir saber com actua cadascun dels 900 gens es fa un procés per **silenciar/bloquejar un gen a cada cèl·lula**. Aquest procés de bloqueig es fa sobre cultius de cèl·lules canceroses, després **s'incorpora tractament de quimioteràpia** sobre aquests cultius, concretament es fan 4 tandes de tractament amb drogues durant 21 dies, i després d'aquests dies de tractament es compara el creixement de les cèl·lules canceroses amb algun gen bloquejat i el creixement de les cèl·lules canceroses control (sense cap gen bloquejat).

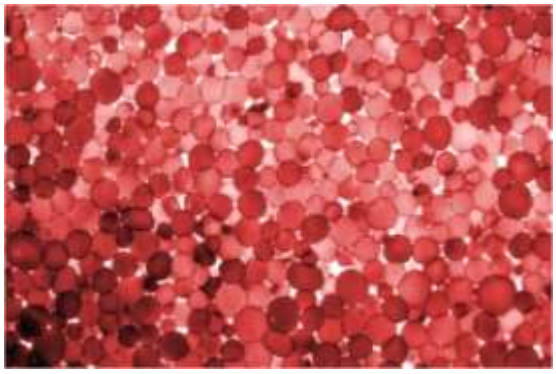


*Figura 1-2 Cèl·lules*

La investigació consta de 2 fases. La primera comença amb el bloqueig dels 900 gens (només un per cèl·lula). Després es fan cicles d'estudi que duren 21 dies. Cada cicle s'inicia amb la preparació del sembrat de cèl·lules amb els gens bloquejats, continua amb el tractament amb quimioteràpia i acaba amb l'enviament de cèl·lules canceroses a seqüenciar. A la seqüenciació d'ADN es pot identificar quin dels 900 gens tenia bloquejat cada cèl·lula i així, amb els resultats d'aquesta seqüenciació, es pot fer una cerca en negatiu per localitzar quin dels gens bloquejats no és a cap (o quasi cap) de les cèl·lules que han sobreviscut a la

quimioteràpia. Si no hi ha cèl·lules vives amb el gen x bloquejat voldrà dir que bloquejar aquell gen pot implicar que la cèl·lula cancerosa es mori i així no es faci resistent a la quimioteràpia. Cadascun d'aquests gens x que no hi són seran gens ***drug target* (gens diana)**.

A la segona fase de la investigació es bloquejaran només els 10 gens *drug target* que s'han determinat en la primera fase. En aquesta fase, cada cultiu de cèl·lules canceroses diferent tindrà només un gen específic bloquejat. Si el gen té realment influència en fer la cèl·lula menys sensible a la quimioteràpia, al bloquejar-lo, les cèl·lules del cultiu moriran molt més del normal al rebre el tractament amb drogues. Si el grup de recerca aconsegueix trobar un o més gens que siguin realment efectius (al bloquejar-los les cèl·lules canceroses moren més), hauran aconseguit **l'objectiu de la recerca: identificar gens influents en la sensibilització de les cèl·lules a la quimioteràpia i així desenvolupar un medicament per fer molt més efectiu el tractament del càncer de còlon**.

Fent aquesta quimioteràpia més efectiva es poden salvar moltes vides.

## Motivació per fer aquest treball de recerca

Vaig decidir fer aquest treball de recerca perquè vaig trobar la possibilitat de passar un mes treballant en un laboratori de recerca biomèdica, amb un grup de recerca format per investigadors i científics molt capdavanters en el camp de la biomedicina i l'estudi del càncer.

Sabia que per poder participar en una recerca d'aquest nivell, has de ser una investigador o investigadora amb molts mèrits i molt acreditat o un estudiant de pràctiques, i el treball de recerca em donava l'oportunitat de ser una estudiant de pràctiques.

No podia deixar passar l'oportunitat de ser al mig d'una investigació capdavantera sobre genètica i càncer, en un institut d'investigació amb uns recursos extraordinaris, l'IGTP, en un laboratori equipat amb els aparells més punters i amb maquinària molt avançada, i amb uns investigadors i investigadores amb molta experiència, la S.F., la C.M. i la C.Q. entre tots ells.

També sabia que els meus coneixements de biologia i genètica no eren suficients per poder entendre els conceptes i les tècniques que es feien servir a la investigació, i que em caldria aprendre molt del que em faltava saber abans de poder anar a passar un mes al laboratori. Era un repte que em suposava moltes hores de buscar informació i entendre-la.

Una altra cosa que m'agradava d'aquest treball era que bona part serien tasques pràctiques, que no era un treball tot teòric de recopilar informació i analitzar-la; podia fer un mes sencer de pràctiques en un laboratori i això m'agradava molt més que fer una feina només sobre paper.

Finalment, em vaig acabar decidint així que vaig estar estudiant la investigació que veuria al laboratori.

Va arribar el mes de juliol i vaig començar a anar cada dia a Badalona, a Can Ruti, on hi ha l'Institut Germans Tries i Pujol. Els primers dies van ser una mica durs, era difícil entendre tantes coses i saber per què servia cada pas, cada tècnica, cada càlcul. Però m'ho explicaven molt bé, i vaig començar a fer tasques: treball en els cultius cel·lulars, PCR, Maxwell, càlculs, etc. També vaig poder ajudar a recollir les dades per als càlculs, les estadístiques i l'anàlisi. Els resultats no sempre eren els esperats, de vegades indicaven que les mostres s'havien contaminat i que no servien, de vegades indicaven que potser la hipòtesi de la investigació no era demostrable, quasi sempre indicaven que s'havien de continuar fent més cicles de proves.

Durant el mes de juliol la investigació estava en la primera fase; en aquesta fase es feien uns cicles de cultius que duraven 21 dies (tot i que el cicle on jo vaig participar va acabar durant més dies com explicaré més endavant). Jo vaig poder ser des del començament fins al final d'un d'aquests cicles. Els resultats en aquest cicle van servir per determinar exactament la quantitat de drogues (quimioteràpia) que s'havia d'incorporar als cultius, en quins moments del cicle calia incorporar-la i com s'havien de deixar recuperar les cèl·lules després de cada dosi de drogues.

Vaig aprendre molt, vaig conèixer l'alta preparació i l'alta precisió que necessita cada estudi de cada cultiu, la necessitat obligatòria de la no-contaminació, la importància de

tenir aparells d'alta tecnologia i precisió ben calibrats, la tècnica de sembrar cultius de cèl·lules, la tècnica comptar cèl·lules vives, la tècnica per desenganxar cèl·lules d'una placa de cultiu, la d'incorporar droga a la placa de cultiu, la de canviar el medi, la tècnica PCR, moltes altres tècniques i metodologies, la necessitat de repetir i repetir el cicle de proves fins poder arribar a trobar les dades exactes per fer la prova final i definitiva.

## Objectius del treball de recerca (TR)

Els objectius principals del treball de recerca són:

I. Conèixer com es porta a terme una **recerca biomèdica**, i en especial una recerca per trobar quins gens influeixen en l'efectivitat de la quimioteràpia que s'utilitza pel càncer de còlon, per així poder-la millorar.
II. Col·laborar en la investigació que està realitzant un **grup de recerca** del centre de recerca de l'IGTP (*Institut Trias i Pujol Research Institute*) sobre la quimioresistència en les teràpies de càncer de còlon.
III. Treballar amb les **tècniques i la metodologia** més puntera que existeix actualment en els centres de recerca biomèdica.
IV. Aprendre la **complexitat** de treballar amb cultius cel·lulars, aplicació de tractament de les cèl·lules, comptatge de cèl·lules, esterilitat necessaria i esterilitat del sembrat.
V. Aprendre a **treballar amb la precisió i l'ordre escrupolós** necessaris per portar a terme aquest tipus d'investigacions.
VI. Aprendre com actua el **càncer a nivell genètic**.

# 2. MARC TEÒRIC

## Objectiu del grup de recerca

Actualment, en la majoria de casos, quan es detecta un càncer de còlon s'aplica la quimioteràpia perquè és eficient per bloquejar ràpidament la proliferació de la majoria de cèl·lules tumorals. Ara bé, un dels principals problemes és que les cèl·lules tumorals adquireixen resistència als medicaments/drogues que s'utilitzen en la quimioteràpia. Per millorar l'acció d'aquest medicament és important identificar quins gens ajuden, o bé s'oposen, a l'acció de les drogues utilitzades en els tractaments de quimioteràpia.

L'objectiu concret de l'estudi que fa el grup de recerca és la identificació **de gens remodeladors** de la **cromatina** que poden beneficiar el creixement dels tumors de còlon, amb l'objectiu de poder trobar medicaments que bloquegin aquests gens i així poder fer front al tumor d'una manera més eficient. Concretament, es vol identificar quins gens remodeladors de la cromatina contribueixen a fer que cèl·lules tumorals derivades de càncer de còlon siguin **resistents** (es facin immortals) a fàrmacs utilitzats en el tractament per quimioteràpia.

En l'annex A – "Pòster "RESPONSE PROJECT"" es mostra pòster que resumeix a alt nivell el projecte general del grup de recerca.

## HIPÒTESI de la recerca

La presència o absència d'alguns factors remodeladors de la cromatina pot facilitar o pot impedir l'acció de drogues quimioterapèutiques que han d'accedir a l'ADN per a la seva acció.

## OBJECTIUS ESPECÍFICS de la investigació que es durà a terme

S'estudia si les cèl·lules canceroses són més o menys resistents en absència d'un dels múltiples gens remodeladors de la cromatina. Els objectius específics són:

- Trobar els gens que deixen que les cèl·lules canceroses «superin» el fàrmac.
- Identificar els **gens diana positius** pel tumor per poder **trobar un fàrmac que els inhibeixi**.

- Identificar els **gens diana negatius** pel tumor per **trobar un fàrmac que els potenciï i puguin augmentar la seva funció**, desafavorint al tumor. Són els gens que provoquen l'augment de la sensibilitat a un medicament.

## El càncer i els gens remodeladors de la cromatina

Quan no hi ha càncer les cèl·lules creixen, es divideixen només si són sanes, envelleixen i moren. Amb el càncer aquest cicle s'altera i les cèl·lules no moren quan ho haurien de fer i es divideixen, tot i no estar sanes, enganyant els 'controls de qualitat' del procés de divisió cel·lular.

En l'annex B – "El càncer i el càncer de còlon" es descriuen nocions de càncer en general, les seves tipologies, tractaments, relació amb els ADNs i els gens i finalment s'explica la singularitat del càncer de còlon, conceptes per introduir els següents apartats.

Per combatre ell càncer de còlon s'utilitzen dues quimioteràpies bàsiques. Aquestes són les drogues que es fan servir a la investigació.

- **FUOX**. **FU** (*5-Fluoracil*) antimetabolit que penetra a la molècula de l'ADN, impedint així la seva reparació **+ OX** (oxaliplatÍ), derivat del platí, el seu mecanisme d'acció en l'ADN provoca eventualment la mort de les cèl·lules canceroses.
- **FUIRI**. **FU** (*5-Fluoracil*) antimetabolit que penetra a la molècula de l'ADN, impedint així la seva reparació **+ IRI** (irinotecà), inhibidor de la topoisomerasa que impedeix la reparació de l'ADN.

Malauradament, sovint quan ataquem un tumor amb quimioteràpia hi ha cèl·lules que s'escapen. Això vol dir que quan ataquem un tumor amb una fàrmac és possible que aquest fàrmac beneficiï el tumor, perquè només es moren les cèl·lules més sensibles o més dèbils, de manera que les cèl·lules que en dividir-se han adquirit mutacions o mecanismes per resistir-se al fàrmac, **s'escapen i superen l'acció de fàrmac**. Si no s'aconsegueix eliminar totes les cèl·lules tumorals, hi quedaran les cèl·lules més resistents i immunes al tractament.

### *Cromatina*

La **cromatina** és la matèria fonamental del **nucli cel·lular**. Està constituïda per tot els **filaments del l'ADN** en diferents graus de condensació. Hi ha tants filaments com cromosomes presenta la cèl·lula durant la divisió del nucli. Aquests filaments formen cabdells que se situen enganxats a la làmina nuclear o en contacte amb el nuclèol. Els cabdells, observats en un microscopi electrònic, es presenten com masses amorfes, atès que la seva elevada compactació no permet observar-ne l'estructura interna.

La cromatina es forma a partir dels **cromosomes** que es descondensen quan finalitza la divisió del nucli. Utilitzant colorants bàsics es poden distingir dos tipus de cromatina: l'heterocromatina, que és la cromatina que no es descondensa durant l'interfase, i l'eucromatina, que és la que sí que es descondensa durant la interfase.

### *Funcions de la cromatina*

Conté la **informació biològica de l'organisme**, és a dir, la informació sobre la seva estructura i funcionament, i és l'encarregada de duplicar-la abans d'iniciar-se la divisió cel·lular. Per fer-ho cada molècula de DNA origina dues molècules iguals, que queden unides per un punt i que s'enrotllen sobre si mateixes formant les dues cromàtides d'un cromosoma.

- Proporciona la informació genètica necessària per efectuar, per mitjà de la transcripció, la síntesi dels diferents RNA. L'RNA-polimerassa pot fer la transcripció de les regions d'eucromatina en què les fibres de DNA estan poc plegades (100Å). En canvi, a les regions d'heterocromatina, en que les fibres de DNA estan fortament condensades (300Å o més), no s'hi pot fer la transcripció.

### *Etapes de la formació d'un cromosoma*

1. Al nivell més senzill, la cromatina és una estructura helicoïdal de doble cadena de l'ADN.
2. L'ADN es complementa amb les histones (proteïnes) per formar nucleosomes.
3. Cada nucleosoma consta de vuit proteïnes d'histones al voltant de les quals l'ADN l'envolta 1,65 vegades.
4. Un cromatosoma es composa d'un nucleosoma més la histona H1.

5. Els nucleosomes es dobleguen per produir una fibra de 30 nm.
6. Aquesta fibra forma bucles o tirabuixons d'una mitjana de 300 nm.
7. Les fibres de 300 nm es comprimeixen i es dobleguen per produir una fibra de 250 nm d'amplada.
8. L'enrotllament de la fibra de 250 nm produeix una bobina que es la cromàtida d'un cromosoma.

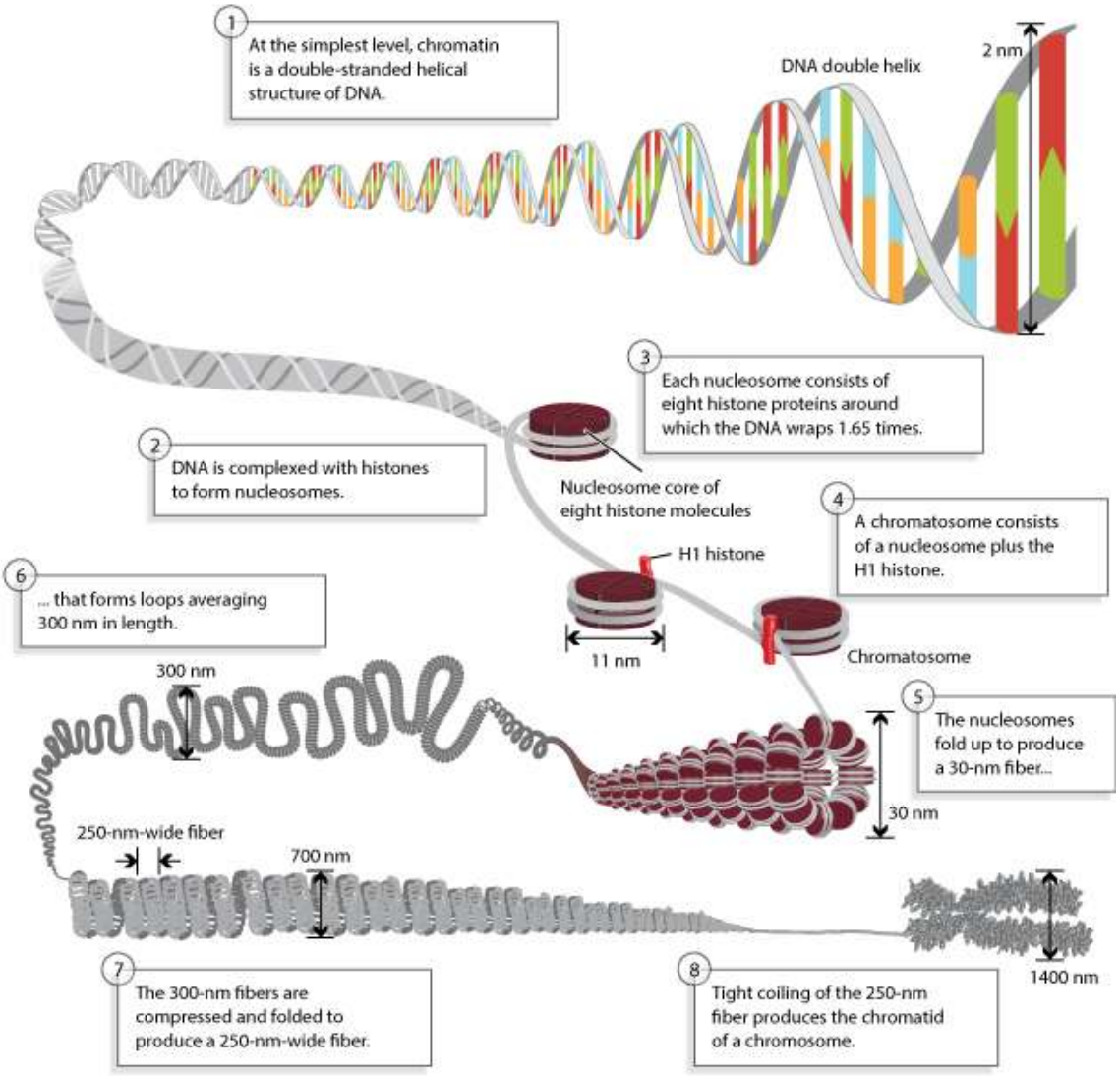



*Figura 2-1 Formació d'un cromosoma*
*((c) Chromatin remodelling during development. Nature 463)*

Per tant, es pot dir que les histones (proteïnes) contribueixen en l'estructura de la cromatina. Les modificacions de les histones contribueixen a determinar la transcripció dels gens i la dinàmica de la cromatina.

### *Gens remodeladors de la cromatina*

Els principals reguladors de l'expressió dels gens són els factors de transcripció, unes proteïnes amb les següents característiques:

- La principal funció és regular l'expressió gènica de forma coordinada.
- Regulen l'accés a l'ADN de la maquinària transcripcional i factors reguladors.
- Activen o reprimeixen l'expressió coordinada de factors de transcripció.
- Necessiten energia en forma d'ATP per remodelar els nucleosomes.
- Regulen la replicació i reparació de l'ADN.
- Regulen moltes vies que controlen la proliferació i diferenciació cel·lular, és a dir, controlen si la cèl·lula prolifera o no. Per això, tenen un paper clau en la tumorogènesi. Determinades alteracions en aquests gens poden afavorir la formació de la cèl·lula tumoral.

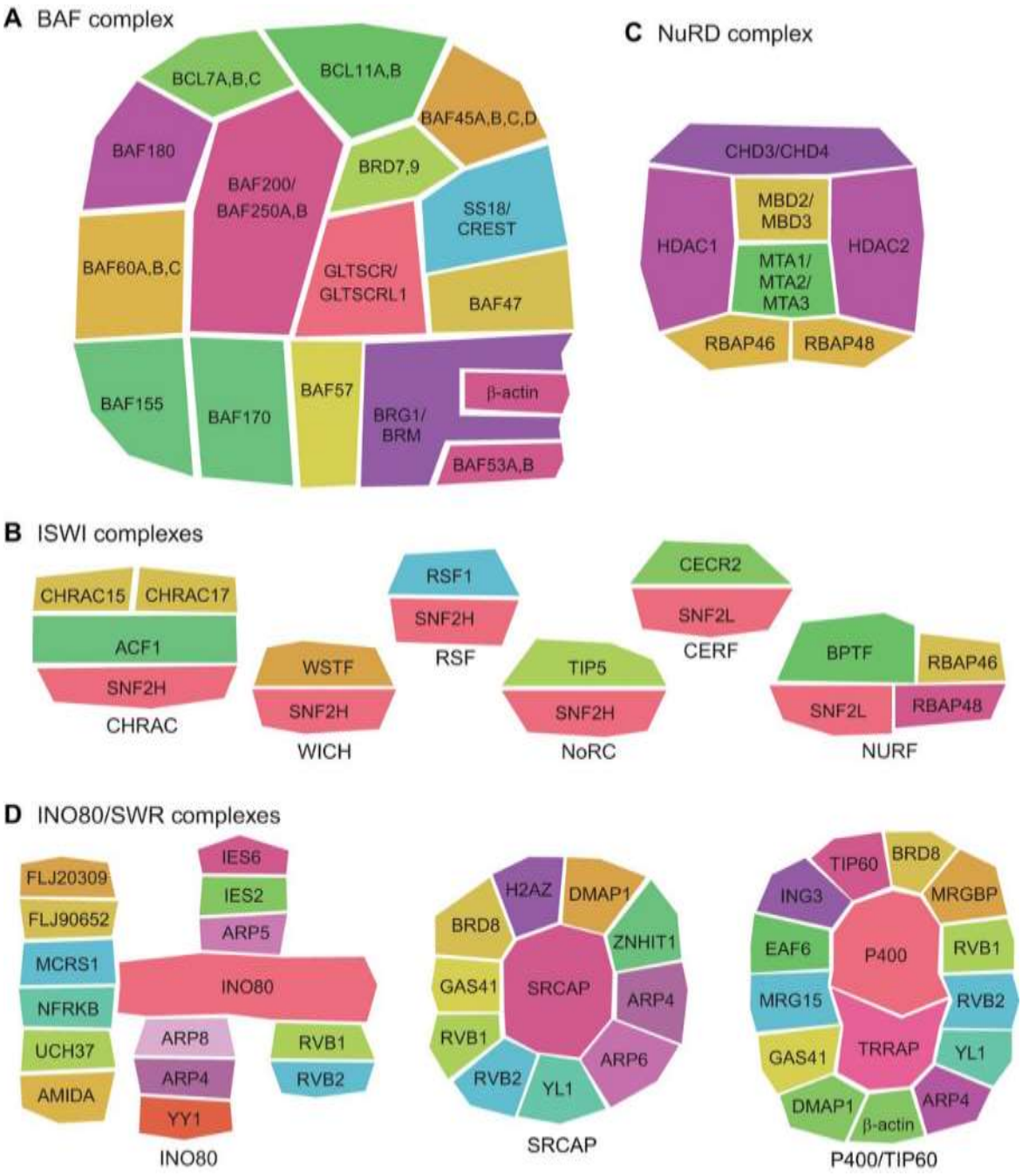



*Figura 2-2Funcions de desenvolupament de tipus SWI / SNF complexes*
*(© http://dev.biologists.org/content/143/16/2882)*

Hi ha molts gens diferents que ajuden a remodelar la cromatina. Aquests gens codifiquen per proteïnes que formen part de complexos que participen en el remodelatge de la cromatina. Individualment cada proteïna té una funció en el complex que està integrat per múltiples proteïnes.

A la figura es mostren els següents complexos que participen en el remodelatge de la cromatina:

- BAF complex
- ISWI complexos
- NuRD complex
- INO80/SWR complexos

### *Cèl·lules resistents. Clau de l'expansió del càncer.*

De vegades, tot i la quimioteràpia, algunes cèl·lules tumorals aconsegueixen, en el moment de la divisió, passar els ***checkpoints*** *(punts de control)* que la cèl·lula realitza per determinar si ha de continuar amb el procés de divisió o no. Aquesta és la clau de l'expansió del càncer, i passa quan una o més cèl·lules aconsegueixen passar o aprovar falsament aquest control de qualitat que les cèl·lules fan durant la divisió. Si la cèl·lula cancerosa passa aquest control aconseguirà dividir-se com si fos una cèl·lula sana, i no tindrem la mort cel·lular que es busca amb la quimioteràpia.

## Metodologia de la recerca que es porta a terme

Tècniques i procediments que s'utilitzen.

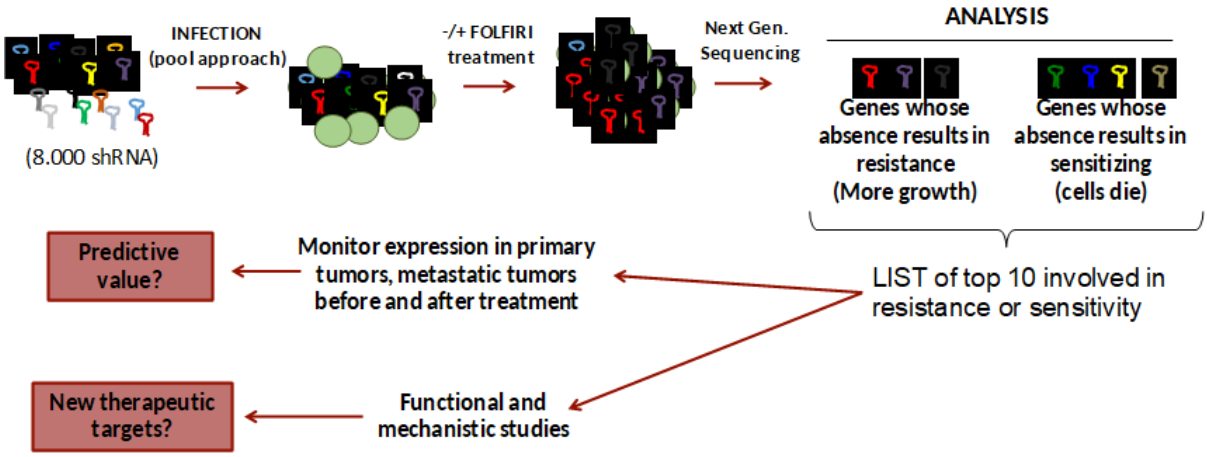



*Figura 2-3 Metodologia per bloquejar els gens cercant possibles remodeladors de la cromatina*
*(© Ruth Rodriguez-Barrueco, Netonia Marshall, and Jose M. Silva)*

Bàsicament es vol trobar un o més **gens *drug target*** per després comprovar si les cèl·lules tumorals combaten millor el fàrmac amb aquell gen o sense aquell gen. Si

les cèl·lules tumorals combaten millor el fàrmac amb aquell gen voldrà dir que cal elaborar un medicament per bloquejar-lo i per així fer més efectiva la quimioteràpia.

Per bloquejar els gens s'han de buscar possibles **remodeladors de la cromatina** i s'han d'introduir en l'ADN, tot i que és molt difícil accedir-hi.

Per introduir aquests remodeladors a l'ADN es fan servir llibreries de ***shRNA*s**. Els ***shRNA*s** són silenciadors de gens (també es diuen bloquejadors o inhibidors). Es fan servir en la biotecnologia (per a l'estudi dels transgènics) i en la recerca científica per induir la supressió de gens.

Per a l'estudi que es porta a terme es disposa d'una llibreria de **8000 *shRNA*s**. Aquests 8000 *shRNA*s poden bloquejar 900 gens diferents. D'entre els més o menys 23.000 gens que tenim, per l'estudi s'han seleccionat els 900 que estan relacionats amb el remodelatge de la cromatina; són gens que per la seva funció poden condicionar l'accés i la interacció amb l'ADN de les drogues utilitzades en la quimioteràpia.

El procés d'introducció d'aquests *shRNA*s s'anomena **procés d'infecció** perquè per introduir els remodeladors al genoma de les cèl·lules s'utilitzen **virus**, un tipus de virus anomenat retrovirus. Abans en aquests retrovirus se'ls ha introduït la llibreria d'ADN dels *shRNA* d'interès. S'utilitza un lentivirus per introduir el receptor murí EcoR en la nostra línia de càncer de colon, la línia comercial anomenada **HT-29**. Una vegada es té aquest EcoR, es fan servir retrovirus que infecten les cèl·lules a través d'aquest receptor, així que només les cèl·lules que el tenen introduiran la llibreria i als científics no els pot passar mai res.

*Figura 2-4 Càncer de còlon*

El procés d'infecció, de la línia cel·lular de càncer de còlon humana HT-29, consisteix a silenciar, bloquejar, inhibir o **anul·lar un gen a cada cèl·lula** (un dels 900 que s'han seleccionat per l'estudi). Després cal veure si sense aquest gen la cèl·lula (i així el càncer) creix menys o creix més a poc a poc o es mor. Si el gen bloquejat és un

dels que ajuda a la cèl·lula a fer-se immortal passant falsament el control de qualitat (*checkpoint*) previ a la divisió de la cèl·lula, al bloquejar-lo, la cèl·lula ja no es podrà dividir tan fàcilment si no és sana i acabarà morint o almenys no esdevindrà immortal. Quan al final de l'experiment es faci la seqüenciació de l'ADN de les cèl·lules canceroses que continuen vives, no hi haurà cèl·lules amb aquest gen perquè no hauran sobreviscut les que el tenen bloquejat, o n'hi haurà molt poques comparant-les amb les cèl·lules control (sense tractament de quimioteràpia). D'aquesta manera, buscant el gen que no és a les cèl·lules canceroses que han sobreviscut, **buscant en negatiu**, és com es podrà arribar a descobrir el gen o gens *target* que s'estan buscant, els gens que ajuden a la propagació del càncer quan s'està tractant amb quimioteràpia.

Quan es fa el procés d'infecció cal assegurar que a cada cèl·lula només hi entra un *shRNA*, per tal que només es bloquegi un gen i així poder estudiar el comportament de la cèl·lula amb només un gen silenciat. Per aconseguir això el procés d'infecció es fa sobre una quantitat molt gran de sembrat de cèl·lules. Per la investigació es fan 2 tipus d'infeccions, diferenciades per la intensitat, a 2 sembrats separats. La primera té l'objectiu de que només un 1% cèl·lules s'infectin, a la segona l'objectiu és el 8%. En el procés d'infecció del 8% hi poden haver cèl·lules on hi entri més d'un *shRNA*, aquests casos resultaran en falsos positius. Per a l'estudi només interessa veure l'efecte d'un únic gen silenciat per cèl·lula.

D'entre tots els 900 gens cal anar trobant quins afecten més el creixement del tumor. Per això, en una primera fase es fa un test seqüencial que s'anomena *screening*. Vol dir que no es pretén silenciar un gen específic, sinó que se'n bloquegen molts (900) per estudiar els resultats i després estudiar específicament els gens que han tingut els millors resultats (més cèl·lules mortes) i els pitjors resultats (més cèl·lules canceroses vives).

Bona part de la investigació consisteix a analitzar i avaluar els resultats de l'***screening* (cribatge) de pèrdua de funció dels gens remodeladors de cromatina**.

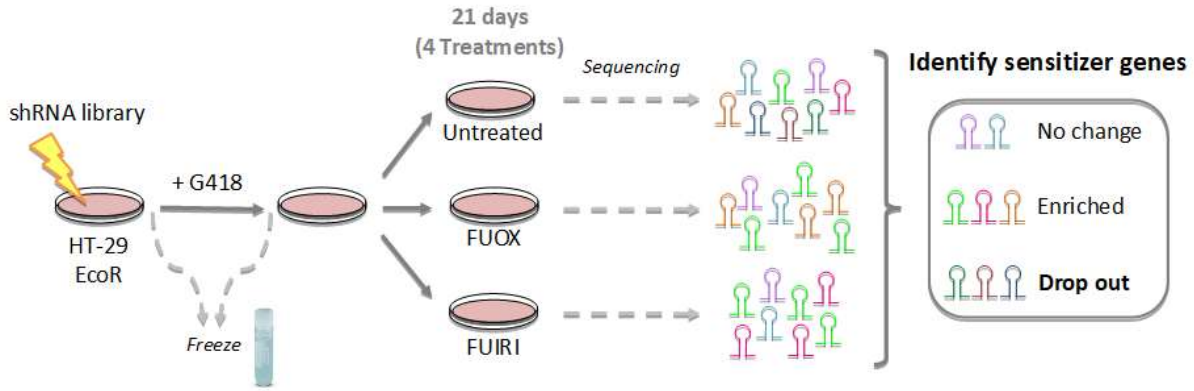



*Figura 2-5 Mètode per identificació dels gens*
*(© Ruth Rodriguez-Barrueco, Netonia Marshall, and Jose M. Silva)*

Per a l'estudi està previst fer fins a 4 cicles de tractament, de 21 dies de durada:

A. Es prepara el sembrat o **cultiu de cèl·lules canceroses en diferents plaques (35)** on hi haurà plaques de control sense infecció i sense tractament, plaques control sense infecció i amb tractament, plaques només infectades sense tractament de quimioteràpia i plaques infectades amb tractament de quimioteràpia.
B. S'i**nfecta el cultiu** de cèl·lules amb els 8000 *shRNA*s per bloquejar 900 gens diferents.
C. Es va **incorporant tractament** de quimioteràpia a les plaques de cèl·lules corresponents, durant els 21 dies es fan 4 tandes de tractament.
D. Després de cada tractament les plaques d'un grup s'envien al **FACS** (***Flourescence Activated Cell Sorting*****),** mesura de citometria per fer el **comptatge de cèl·lules vives i mortes** en els grups de plaques que continuen en el cicle per tornar-les a sembrar.
E. Al final de cicle s'envien a **seqüenciar** les plaques destinades a seqüenciació per comparar els gens que hi ha a les cèl·lules canceroses que han sobreviscut al tractament amb els gens de les cèl·lules control. Els gens bloquejats en les cèl·lules que han sobreviscut es descartaran com a gens *target*. Els gens que no es trobin *(negative selection)* a les cèl·lules supervivents a la quimioteràpia seran **gens *target***, ja que les cèl·lules sense aquell gen hauran mort per l'efecte de la quimioteràpia.

Durant el mes que jo he passat al laboratori s'ha fet un dels cicles del procés d'*screening*, utilitzant les cèl·lules infectades amb els 8000 *shRNA*s per bloquejar 900 gens diferents per després avaluar-ne els resultats. Aquest cicle es va fer servir bàsicament per ajustar la dosis de droga (quimioteràpia) que s'havia d'anar posant a les cèl·lules en cultiu per poder aconseguir al final de 21 dies una mortalitat no superior al 20%. Com que cal estudiar les cèl·lules que superen la quimioteràpia, interessa que un % important la superi, i per tant **la dosi de droga no pot ser molt alta i s'ha d'ajustar molt**.

Després dels cicles de tractament amb drogues, i amb els gens *drug target* ja identificats, es passarà a la segona fase d'estudi on es **silenciaran aquests gens específics** individualment en les cèl·lules canceroses i es comprovarà com sobreviuen a la quimioteràpia, amb l'objectiu de determinar un o més gens que, estant bloquejats o silenciats, ja no ajuden que el càncer superi la quimioteràpia i així les cèl·lules canceroses no es converteixin en immortals.

### *Descripció dels processos de cada cicle de tractament amb drogues*

#### A- Cèl·lules canceroses utilitzades per la investigació

Quan es fa una biòpsia a un pacient per veure si té càncer, la mostra s'envia al laboratori, a la part especialitzada en anatomia patològica. Allà es fa un estudi i un cultiu per determinar si hi ha càncer o no. Si la mostra és cancerosa alguns laboratoris passen una part de les cèl·lules a empreses que organitzen, congelen i comercialitzen cèl·lules per a investigació. Després, els diferents laboratoris de recerca compren aquestes cèl·lules congelades per utilitzar-les en els seus estudis.

Com a model de cèl·lules tumorals de càncer de còlon s'utilitzarà la línia cel·lular HT-29.

L'equip d'investigació sembra les cèl·lules tumorals i més tard divideix el sembrat per diferenciar les cèl·lules segons el que s'hi vagi fent. Així tindrem 9 tipus de plaques:

1. Cultiu natural (sense infecció) sense fàrmac
2. Cultiu natural (sense infecció) amb el fàrmac X (FUOX)
3. Cultiu natural (sense infecció) amb el fàrmac Y (FUIRI)

4. Cultiu infectat 1% sense fàrmac
5. Cultiu infectat 1% amb el fàrmac X (FUOX)
6. Cultiu infectat 1% amb el fàrmac Y (FUIRI)
7. Cultiu infectat 8% sense fàrmac
8. Cultiu infectat 8% amb el fàrmac X (FUOX)
9. Cultiu infectat 8% amb el fàrmac Y (FUIRI)

Les plaques amb les cèl·lules es mantenen a l'incubador, a 37 graus centígrads i 5% de $CO_2$. Cada placa conté **12.000.000 de cèl·lules**.

Per cada cicle es fan grups de 7 tipus de plaques, ja que les cultiu cel·lular sense infecció en necessitem menys rèpliques. Com s'explicarà després es necessitarà treballar en 5 grups i en total es cultivaran cèl·lules en **35 plaques**.

### B- Bloquejar l'expressió d'un gen utilitzant *shRNA*

Per determinar la funció dels diversos gens remodeladors del DNA (aproximadament 900) es bloquejarà la seva expressió a les cèl·lules utilitzant *shRNA*. Com està explicat més amunt, els *shRNA* són silenciadors o bloquejadors de gens. Bloquejar els gens amb *shRNA* es podria comparar amb desactivar aquests gens de les cèl·lules.

El *short hairpin RNA* (*shRNA*) és una molècula d'ARN artificial amb una estructura en forma de llaç que pot ser utilitzat per reprimir l'expressió d'un gen objectiu mitjançant interferència d'ARN (ARNi, de l'anglès *RNA interference*).

Amb l'objectiu de trobar, entre 900 gens diferents, quins són els que, en situació de quimioteràpia, tenen més influència per ajudar les cèl·lules canceroses a esdevenir immortals, i quins tenen més influència a ajudar que les cèl·lules canceroses no es puguin reproduir, es farà servir la tècnica de bloquejar gens i observar com es desenvolupen les cèl·lules canceroses sense aquests gens.

Es determina la funció dels gens bloquejats comparant l'estat de les cèl·lules on aquests gens no actuen. Aquest procés s'anomena ***screening* negatiu**. Més avall hi ha la figura del procés de bloqueig de gens i el posterior estudi.

Els *shRNA* bloquejadors s'anomenen **llibreria** (*shRNA Library*). N'hi ha 58.493 de diferents. Se sap que 39.458 d'aquests *shRNA*s apunten (poden bloquejar) a 18.661 gens humans, que representen prop del 75% del genoma humà.

Aquest procés de bloqueig de gens s'anomena infecció, perquè per introduir els remodeladors al genoma de les cèl·lules s'utilitza un **virus** que entra/infecta l'ADN de les cèl·lules.

La següent figura mostra els passos del bloqueig de gens (infecció) amb *shRNA*. En el nostre estudi es fa servir el '***Negative Selection***'.

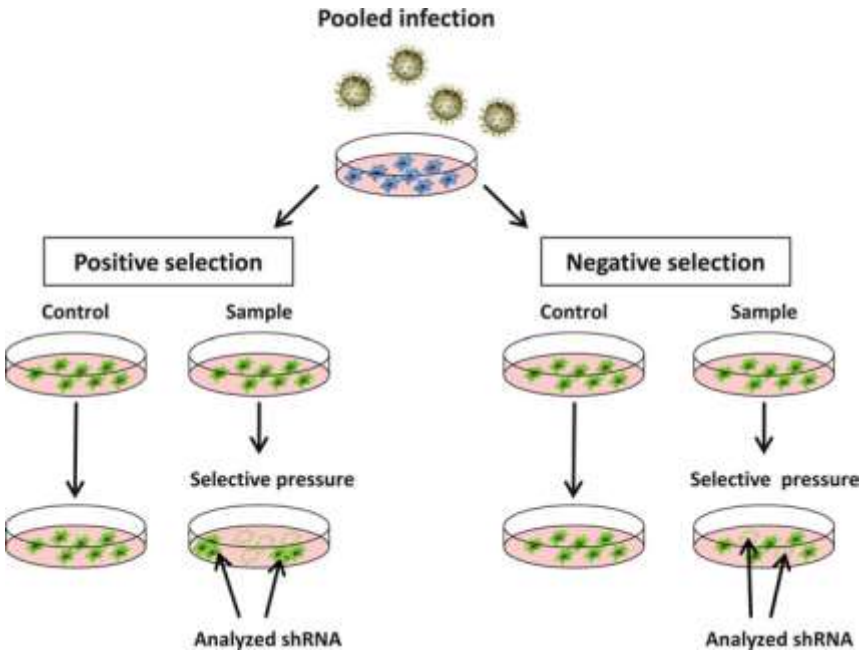



*Figura 2-6 Passos del bloqueig d'infecció de gens amb shRNA*
*(© Ruth Rodriguez-Barrueco, Netonia Marshall, and Jose M. Silva)*

## C- Incorporar tractament de quimioteràpia a les cèl·lules

Durant el cicle de 21 dies es fan 4 tandes de **tractament amb drogues**.

Les drogues que s'incorporen a les cèl·lules són els 2 medicaments per quimioteràpia de càncer de còlon:

1. **FUOX**, acrònim de la combinació dels fàrmacs:
    - **FU**: 5-Fluoracil, bloqueja la reparació de l'ADN
    - **OX**: Oxiplatí, provoca dany a l'ADN i mort cel·lular

2. **FUIRI,** acrònim de la combinació dels fàrmacs**:**
    - **FU**: 5-Fluoracil, bloqueja la reparació de l'ADN
    - **IRI**: Irinotecan, inhibidor de la topoisomerasa, impedeix la reparació del DNA

Després de posar el tractament a les cèl·lules, es tornen a l'incubador i el dia següent es canvia el medi per treure tota la droga.

### D- Comptatge de cèl·lules vives i mortes

Uns dies després d'haver incorporat les drogues, un grup dels 9 tipus de plaques s'envia al FACS, la unitat de citometria de l'IGTP, per comptar exactament les cèl·lules vives i mortes.

Les plaques que continuen a l'experiment es compten al laboratori per tornar a **re-sembrar** només 12.000.000 de cèl·lules a cada placa. Per poder fer els càlculs estadístics sempre cal tenir el mateix nombre de cèl·lules abans d'un nou tractament. Per tornar a re-sembrar cal:

1. Desenganxar les cèl·lules de les plaques amb tripsina
2. Centrifugar-les durant 5 minuts a 1.200 rpm
3. Comptar-les mitjançant la càmera de Neubauer
4. Agafar la proporció necessària
5. Tornar-les a sembrar

### E- Seqüenciació

Quan s'acaben els quatre cicles de 21 dies, s'extreu el DNA de les cèl·lules (no tractades, tractades amb FUOX i tractades amb FUIRI) i s'envien a seqüenciar, per **determinar la seqüència de gens de les cèl·lules** després de les 4 tandes de tractament.

La tècnica consisteix en aïllar el DNA, seqüenciar-lo i mirar quin gen s'ha bloquejat.

Seqüencien quins *shRNA*s s'han mantingut després de tot el tractament dels més de 8.000 totals que es tenien.

*Observació del resultats de la seqüenciació*

Amb els resultats de la seqüenciació es comparen les cèl·lules tractades i les no tractades. Es busca quins gens s'han deixat d'expressar en unes i altres, i quins estan més sobreexpressats en les tractades en relació a les no tractades.

Es busca en negatiu *(negative selection*) els gens *target*. Així, si alguns *shRNA*s desapareixen a les cèl·lules tractades que han quedat vives voldrà dir que les cèl·lules que tenien aquell *shRNA* concret han mort; això voldrà dir que el gen silenciat és un potencial ***drug target***, ja que el fet de silenciar o inhibir aquest gen en concret sensibilitza aquesta cèl·lula a la quimioteràpia.

Es busca en positiu els *shRNA*s que sí que apareixen en moltes de les cèl·lules tractades que han quedat vives. Aquests gens sobreexpressats indicaran que el gen serà un ***biomarker*** i que silenciar aquest gen afavoreix el creixement del tumor.

# 3. PRÀCTICA

## Introducció part pràctica

El meu Treball de Recerca és l'estudi de la investigació que està duent a terme un grup de **recerca biomèdica** de l'Institut Germans Tries i Pujol. El grup de científics està investigant com **millorar l'eficiència de la quimioteràpia en el càncer de còlon buscant quins gens cal potenciar i quins gens cal bloquejar per tal que les cèl·lules canceroses no es facin resistents a la quimioteràpia i no esdevinguin immortals**.

El laboratori i el grup de recerca treballa sota la direcció del Dr. Manuel Perucho. Aquest és un dels molts grups i molts laboratoris d'investigació de l'Institut de Recerca Germans Tries i Pujol (IGTP). L'IGTP és un centre de recerca públic situat a Badalona, a Can Ruti, i té programes de recerca sobre càncer, immunologia, malalties infeccioses, malalties cardiovasculars, endocrinologia, malalties hepàtiques i moltes altres àrees més de salut. L'Institut està associat, entre d'altres, amb l'Hospital Germans Tries i Pujol (Can Ruti), amb l'Institut de Recerca contra la leucèmia Josep Carreres, i amb la Universitat Autònoma de Barcelona. Forma part de #CampusCanRuti.

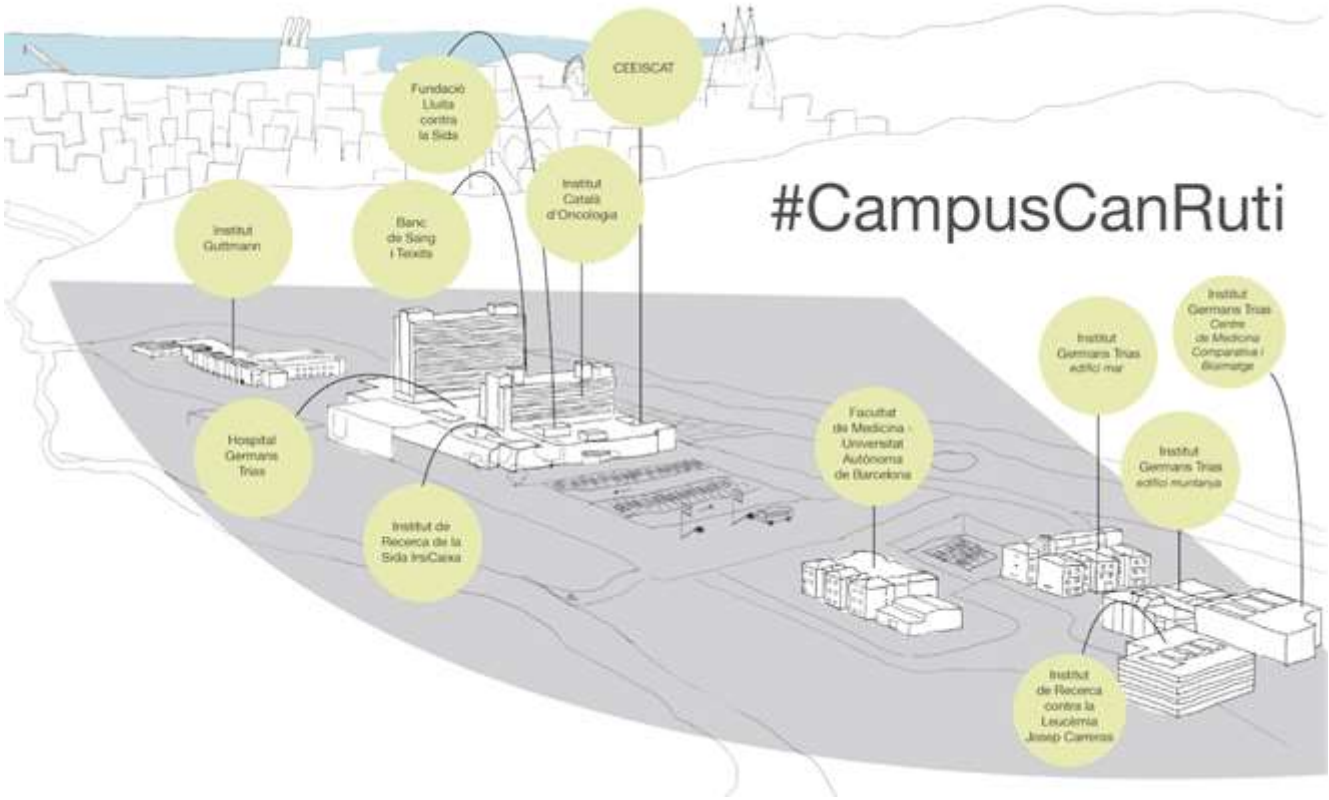



*Figura 3-1 Mapa campus Can Ruti*
*(© http://www.canruticampus.cat/)*

Actualment en el laboratori Dr. Perucho s'hi estan desenvolupant dues recerques, la que jo estudio, sobre els **gens implicats en l'efectivitat de la quimioteràpia pel càncer de còlon** i una altra recerca, també sobre **genètica i càncer**, que es **basa en la teoria que els gens correctors es queden inactius per algun motiu**, és com si el corrector ortogràfic d'un processador de text deixés de funcionar i deixés de marcar les paraules amb faltes, quan això passa es van acumulant mutacions a les cèl·lules normals que no es reparen i apareix el càncer.

El laboratori disposa de molts recursos per dur a terme aquestes dues investigacions. Incloc en el següent apartat la descripció del laboratori, la descripció d'aquests recursos i la seva utilitat.

Diferents grups de recerca d'arreu del món estan duent a terme investigacions semblants a la que està fent el grup del Dr. Manuel Perucho. Sembla que els investigadors estan fent una cursa olímpica per veure qui troba primer aquests **gens *target*** que tenen tanta influència a l'hora de fer que el **sistema immunològic** funcioni correctament i no deixi reproduir una cèl·lula cancerosa i aquests altres gens *target* que ajuden la cèl·lula cancerosa a saltar-se els controls o regles del sistema immunològic i reproduir-se tot i no ser cèl·lules sanes. Segur que entre tots els grups d'investigació aniran trobant aquests gens tan influents, s'aniran transmetent els descobriments que aconsegueixi cadascú, seran molt generosos amb les seves hores i hores de recerca i amb els seus immensos coneixements, i finalment arribaran a aconseguir l'objectiu.

Desitjo al grup d'investigadors amb qui he fet el meu treball de recerca que trobin resultats cabdals per arribar a aquest objectiu, els recompensaria tantes i tantes hores de feina, però ells saben que una recerca de vegades prova una hipòtesis i de vegades només serveix per descartar-la. Pot passar que ells hagin de descartar la seva hipòtesis, però també pot passar que la puguin demostrar, això seria magnífic.

## Descripció del laboratori, els recursos dels quals disposa i les tècniques més importants que s'hi realitzen

*Figura 3-2 Imatge del Laboratori del Dr. Perucho*

El laboratori on he treballat es diu Dr. Perucho. Consta de 3 taules amb 4 **poyates** (taula de treball) cadascuna, llocs de treball amb ordinadors, una campana química, moltes neveres i congeladors i altres màquines, entre elles PCR, Maxwell, centrifugadores…

Al costat hi ha la sala de cultius on tot és estèril, a més hi ha una avantsala amb neveres i armaris per deixar el material necessari. És una àrea dedicada exclusivament al cultiu de cèl·lules. Manté un gradient d'esterilitat des del medi interior cap a l'exterior, amb pressió positiva, de manera que existeix una pressió cap a fora per la porta i es minimitza l'entrada de l'aire de l'exterior per evitar pols i contaminació. La sala de cultius cel·lulars és un dels recursos més utilitzats en la recerca sobre el càncer de còlon. Cada dia hi anàvem a fer alguna acció. Per entrar-hi t'has de posar una bata especial perquè dins de la sala no hi pot haver cap mena de contaminació i tot el material que es fa servir és estèril. Sempre has de tenir molta precaució a netejar-ho tot amb etanol, no utilitzar el mateix material per diferents substàncies i posar-te guants sempre. Es dona màxima prioritat al treball sota condicions d'asèpsia per evitar la contaminació dels cultius amb fongs, llevats, bacteris o virus.

Per altra banda, també fèiem servir més sales de l'edifici. Hi ha una sala amb gel per mantenir les mostres fredes i congeladors de -80ºC, on es guarden algunes drogues. També hi ha un altre laboratori amb una campana química especial per fer PCR i sempre anàvem a fer-les allà per evitar contaminació. A baix de tot hi havia un gran magatzem on sempre podies agafar el que calgués, sempre que t'apuntessis a la llista del teu laboratori conforme ho havies agafat tu.

Un altre recurs imprescindible és a l'edifici de davant, on hi ha una unitat molt important per a la nostra investigació. És la unitat de **citometria**, més conegut per **FACS (Flourescence Activated Cell Sorting)**. La Unitat de Citometria és un dels recursos d'investigació més punters de l'IGTP http://citometria.germanstrias.org/cast/fundamentos.htm, perquè té un equipament excel·lent d'analitzadors amb làser per separar i comptar cèl·lules. És un laboratori exclusiu pels separadors cel·lulars i els ordinadors per a l'anàlisi de dades. A més a més dels laboratoris d'investigació de l'IGTP i de l'hospital de Can Ruti, molts altres centres d'investigació i de diagnòstic porten les seves mostres a aquesta unitat de l'IGTP per comptar cèl·lules.

Un últim recurs, molt important per la investigació, és un servei extern a l'IGTP on s'envia a seqüenciar. La **seqüenciació de l'ADN** de les cèl·lules al final dels quatre cicles de tractament de drogues ens informa de quins gens bloquejats hi ha a les cèl·lules que han mort i a les que han sobreviscut al tractament de quimioteràpia.

*A més a més, per la investigació, es fan servir els següents aparells*

### A- Incubador de 37°C

L'incubador és a dins de la sala de cultius. És com una petita nevera on hi ha 3 estanteries. Allà és on guardem les cèl·lules (sempre a 37ºC i amb un 5% de $CO_2$) perquè estiguin en el mateix estat que tindrien dins el cos humà, condició idònia per al creixement.

### B- Campana o cabina de flux laminar

És la campana que hi ha a la sala de cultius. L'aire hi està lliure de partícules contaminants, gràcies a un motor que el filtra i que genera un flux cap a l'exterior per oferir totes les garanties d'asèpsia i esterilitat. Tot el treball amb les cèl·lules es realitza en aquesta cabina. És completament estèril i quan l'utilitzes també has de portar bata i guants.

### C- Càmera Neubauer

És un instrument que s'utilitza per comptar cèl·lules en un microscopi. Està situat dins la sala de cultius. Són dos vidres entre els quals es posa una proporció de les cèl·lules

amb un líquid blau especial (TrypanBlue). Després, quan es va al microscopi, es pot veure una quadrícula. Allà cal comptar les cèl·lules d'uns requadres ja indicats i després es pot fer la proporció.

### D- Microscopi per observar cèl·lules

A la sala de cultius cel·lular hi ha dos microscopis electrònics, allà és on podem comprovar l'estat de les cèl·lules a les plaques o comptar-les.

### E- Campana química

La campana química del laboratori és on es treballa quan has de fer servir substàncies amb algun risc. És una campana amb una paret de vidre, la qual tu pots aixecar una mica per posar-hi els braços i treballar-hi a dins però sense el risc que et vagi res a la cara ni als ulls perquè tens els vidre que et protegeix. És completament estèril i quan l'utilitzes també has de portar bata i guants.

### F- Ependorff

És un tub de microcentrífuga, Ependorff és una marca que en fabrica, però ja és conegut mundialment amb aquest nom. Consisteix en un petit tub de plàstic amb una tapa, completament estèril. S'utilitzen per moltes coses com per fer centrífugues o per manteniment de mostres. Normalment tenen un sol ús.

## Investigació. Protocol i seqüència d'accions sobre les cèl·lules sembrades

Per la **primera fase** de la investigació es fan cicles de **21 dies.** Per aquesta fase els sembrats de cèl·lules canceroses s'infecten en forma d'*screening* amb els 8000 *shRNA*s per bloquejar 900 gens diferents. Durant els 21 dies del cicle es van incorporant les drogues als sembrats cada 5 dies. Al final de cada cicle s'estudien els resultats del comptatge de cèl·lules vives i mortes de cada placa i un cop acabats tot els cicle s'estudien els resultats de la seqüenciació per veure quins gens han desaparegut de les cèl·lules canceroses que queden vives i quins gens apareixen a la majoria de cèl·lules vives. Es duran a terme 4 cicles d'aquests, amb l'objectiu de trobar els gens *target*. Un d'aquests cicles es va iniciar el 2n dia de la meva estada al laboratori, el dia 26/7/18. Era el 2n cicle que es duia a terme en la investigació.

A la **segona fase** del projecte els sembrats de cèl·lules s'infectaran amb *shRNA*s que només bloquejaran gens específics individualment, els gens *target* que s'han trobat a la primera fase, també es faran cicles on s'aniran incorporant drogues als cultius, però en aquesta fase cada placa tindrà bloquejat només un dels 10 gens *target*. El protocol d'aquest cicles de la segona fase no està explicat en el TR perquè es definirà segons els resultats dels cicles de la primera fase.

## Primera fase: cicles de 21 dies de tractament amb drogues

Durant cada cicle de 21 dies s'incorpora tractament de quimioteràpia a les cèl·lules 4 vegades, l'inicial i 3 vegades més cada 5 dies.

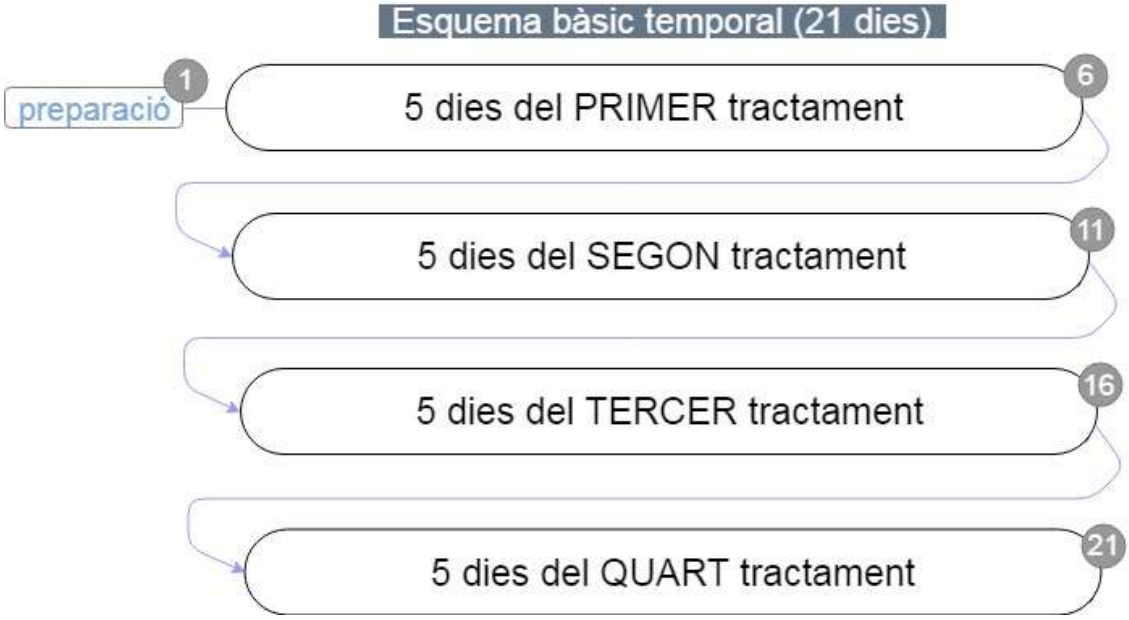



*Figura 3-3 Esquema general del cicle*

## Quantes cèl·lules i quantes condicions/plaques necessitem?

Les cèl·lules utilitzades en aquests cicles són cèl·lules amb càncer de còlon.

Primer de tot es van fer els càlculs per saber quantes plaques de cèl·lules es necessitaven i quantes cèl·lules en total es necessitava sembrar.

La primera classificació de cèl·lules canceroses s'havia de fer segons la infecció amb *shRNA*s, eren 3 grups: cèl·lules no infectades, cèl·lules infectades a l'1% i cèl·lules infectades al 8%.

Després les cèl·lules s'havien de **classificar** segons la quantitat de drogues que rebrien. Per això es necessitaven 7 grups de les 5 plaques de la següent figura. De les 5 plaques de cada grup n'hi ha 2 de la condició d'infecció al 1% i dues de la condició d'infecció al 8%. Es repeteix la mateixa condició en 2 plaques perquè després de cada tanda de tractament amb drogues una de les dues plaques del grup s'enviarà a FACS i l'altra continuarà en l'experiment per ressembrar dues plaques noves amb les seves cèl·lules:

*Figura 3-4 Càlcul de les plaques necessàries*

En total es necessitaven 35 plaques.

Si calia sembrar $12 \cdot 10^6$ cèl·lules a cadascuna de les 35 plaques, el total era:

| | |
|---|---|
| **Cèl·lules control** | → $12 \cdot 10^6$ x 8 plaques (7 + 1 placa extra) = $96 \cdot 10^6$ cèl·lules + 160ml McCoy's |
| **Cèl·lules infectades a l'1%** | → $12 \cdot 10^6$ x 15 plaques (14 + 1 placa extra) = $180 \cdot 10^6$ cèl·lules + 300ml McCoy's |
| **Cèl·lules infectades al 8%** | → $12 \cdot 10^6$ x 15 plaques (14 + 1 placa extra) = $180 \cdot 10^6$ cèl·lules + 300ml McCoy's |

## Infecció de les cèl·lules amb *shRNA*s

Després del càlculs de la quantitat de cèl·lules a utilitzar, el que es va fer amb totes les cèl·lules destinades a tots els cicles de la primera fase de la investigació va ser infectar-les amb ***shRNA*s**. Per aquest procés es van sembrar 3 grups de cèl·lules, el primer grup, de control, no es va infectar, el 2n grup es va infectar a l'1% i el 3r grup, al 8% de llibreria de *shRNA*.

El dia 13/4/18 es van infectar les cèl·lules al 8%, és a dir, **es va introduir la llibreria amb els 8000 *shRNA*s a dintre de les cèl·lules** perquè comencés a fer efecte.

Un mes després, el dia 11/5/18 es van infectar les cèl·lules a l'1%.

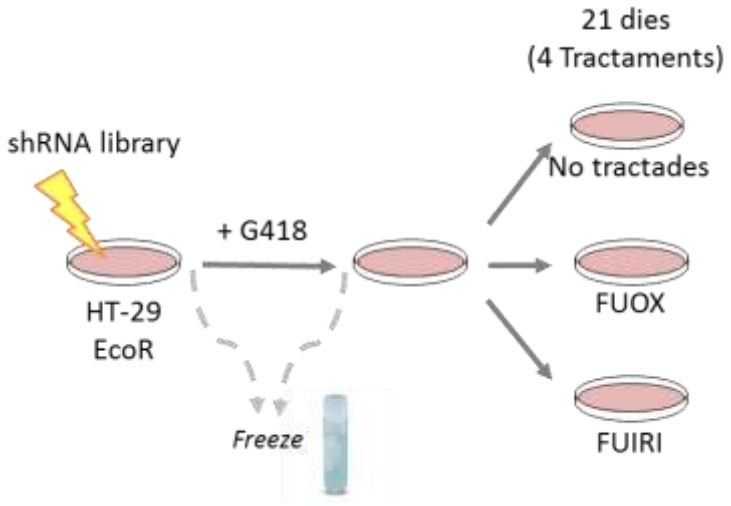



*Figura 3-5 Infecció de les plaques (© Ruth Rodriguez-Barrueco, Netonia Marshall, and Jose M. Silva)*

Després es van seleccionar amb **antibiòtic** perquè creixessin només les cèl·lules que s'havien infectat i es van congelar un munt de **criotubs**, de manera que els experiments que estan fets d'aquí en endavant són amb cèl·lules que s'anaven descongelant.

## Cicle de 21 dies. Planificació. Calendari

La planificació inicial de les accions a fer sobre les cèl·lules canceroses infectades durant cadascun dels 21 dies del cicle, per incorporar el **tractament de quimioteràpia** i aconseguir que només es mori el 20% de les cèl·lules cultivades, és la següent:

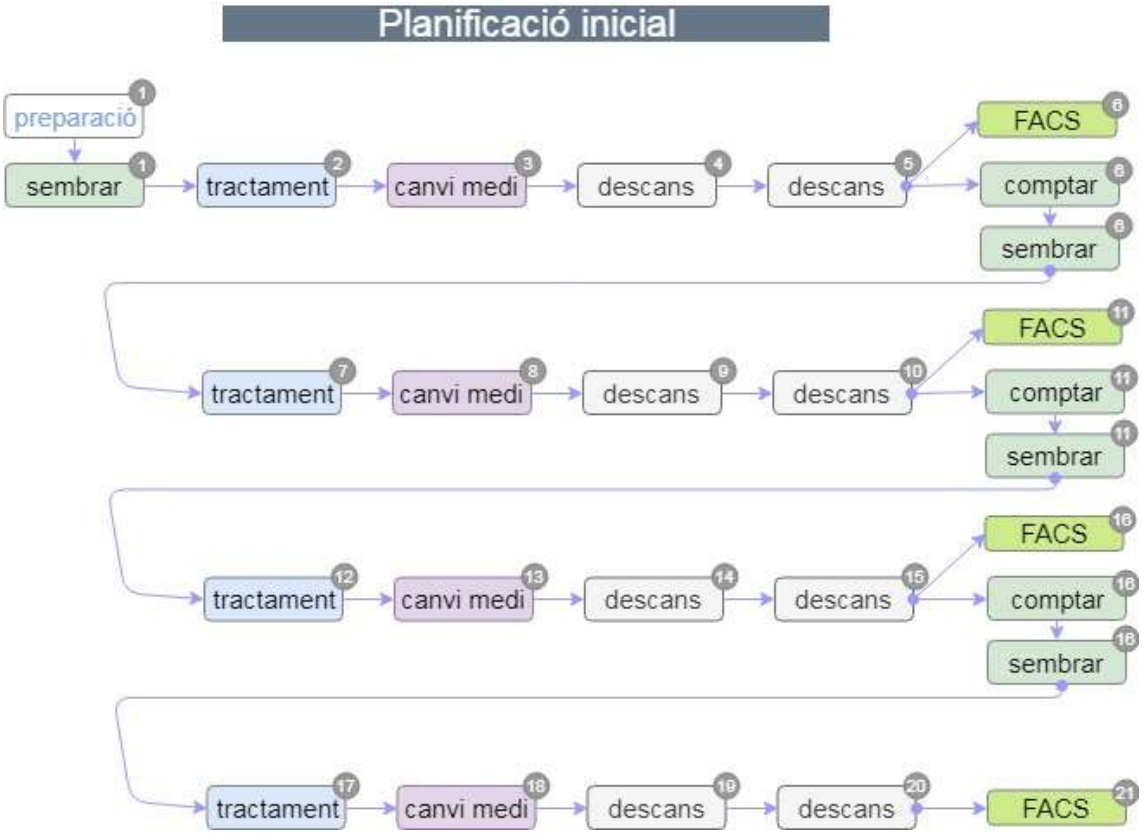



*Figura 3-6 Planificació inicial (21 dies)*

Aquest cicle de 21 dies, l'hem desenvolupat des del dia 25/06/2018 al dia 18/07/2018. He escrit el diari de les accions realitzades cada dia amb les cèl·lules sembrades. En aquest cicle vam tenir una incidència que va provocar la mort de moltes cèl·lules i arran d'això va caldre ampliar 2 dies abans dels dos últims tractaments per permetre la recuperació i el creixement de les cèl·lules que van sobreviure.

Així, l'esquema de la planificació inicial del cicle, en realitat va passar a ser aquest:

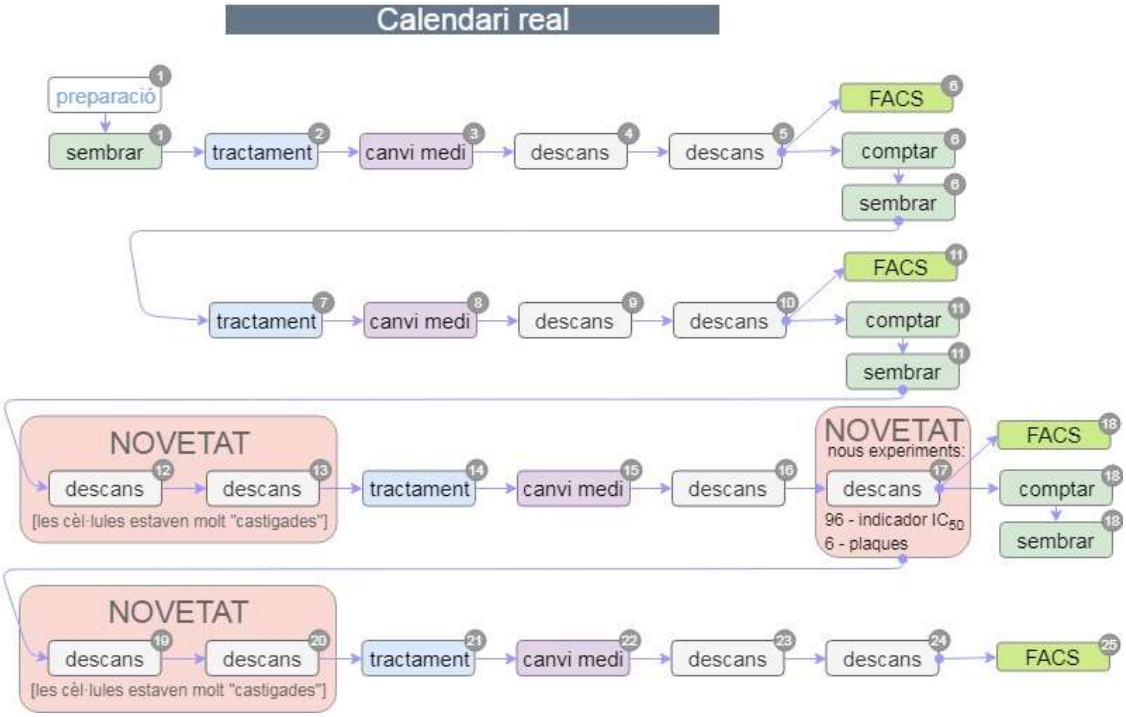



*Figura 3-7 Planificació real final (25 dies)*

Abans d'iniciar cada cicle de 21 dies es preparen les cèl·lules descongelant-les, sembrant-les a les 35 plaques i afegint-hi medi per tal que tinguin la condició idònia per créixer:

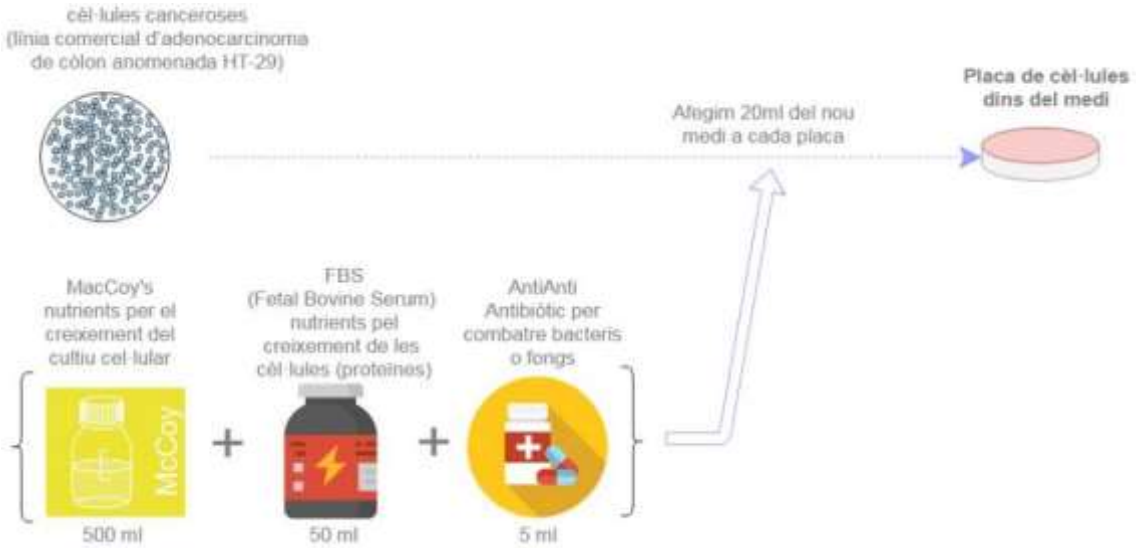



*Figura 3-8 Esquema preparació de les cèl·lules*

## Cicle de 21 dies. Tractament amb drogues. Organització de plaques segons droga i dilució.

Per cada fase de tractament amb quimioteràpia es preparen **35 plaques de cultius de cèl·lules**, per tenir 5 grups de 7 plaques cadascun. De les 7 plaques de cada grup, una es queda sense tractament, a 3 plaques s'hi incorpora FUOX (amb 3 dissolucions diferents: 1/100, 1/75 i 1/48) i a les altres 3 plaques s'hi incorpora FUIRI (amb 3 dissolucions diferents: 1/100, 1/75 i 1/48). També podem dir que són 7 grups de 5 plaques, on totes 5 es tractaran amb la mateixa dilució de droga, de les 5 plaques una és amb cèl·lules sense infecció, dues amb cèl·lules infectades a l'1% i dues infectades al 8%.

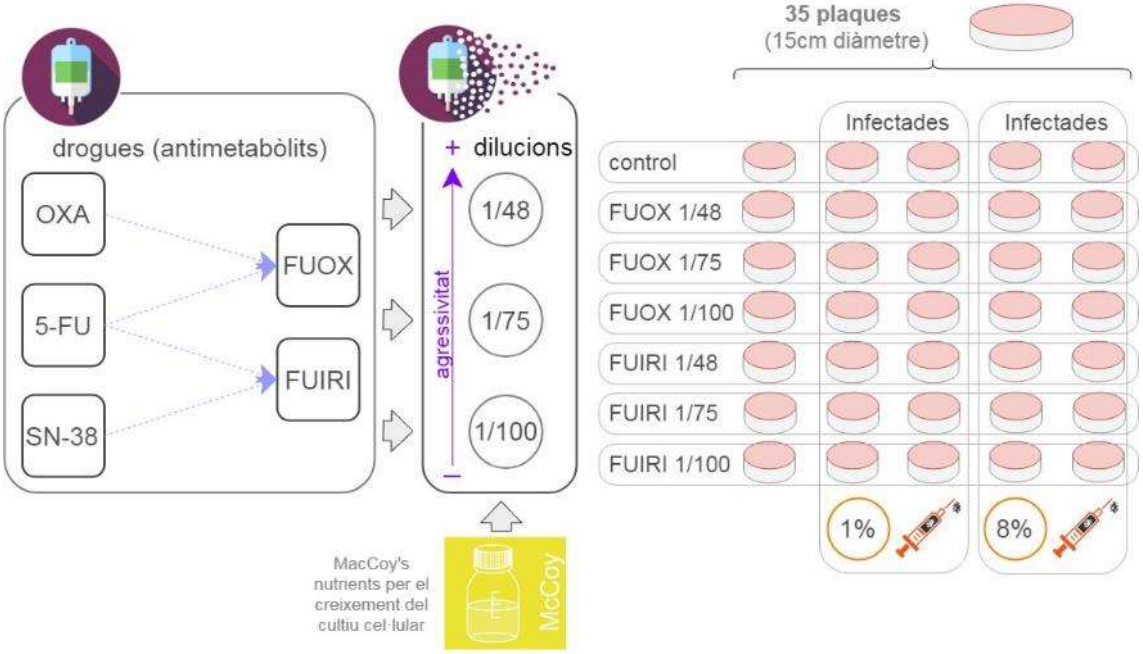



*Figura 3-9 Esquema Tractament*

| Grup 1 | Grup 2 | Grup 3 | Grup 4 | Grup 5 |
|---|---|---|---|---|
| Placa ctrl sense llibreria | Placa ctrl llibreria 1% | Placa ctrl llibreria 1% | Placa ctrl llibreria 8% | Placa ctrl llibreria 8% |
| FUOX 1/48 sense llibreria | FUOX 1/48 llibreria 1% | FUOX 1/48 llibreria 1% | FUOX 1/48 llibreria 8% | FUOX 1/48 llibreria 8% |
| FUOX 1/75 sense llibreria | FUOX 1/75 llibreria 1% | FUOX 1/75 llibreria 1% | FUOX 1/75 llibreria 8% | FUOX 1/75 llibreria 8% |
| FUOX 1/100 sense llibreria | FUOX 1/100 llibreria 1% | FUOX 1/100 llibreria 1% | FUOX 1/100 llibreria 8% | FUOX 1/100 llibreria 8% |
| FUIRI 1/48 sense llibreria | FUIRI 1/48 llibreria 1% | FUIRI 1/48 llibreria 1% | FUIRI 1/48 llibreria 8% | FUIRI 1/48 llibreria 8% |

| Grup 1 | Grup 2 | Grup 3 | Grup 4 | Grup 5 |
|---|---|---|---|---|
| FUIRI 1/75 sense llibreria | FUIRI 1/75 llibreria 1% | FUIRI 1/75 llibreria 1% | FUIRI 1/75 llibreria 8% | FUIRI 1/75 llibreria 8% |
| FUIRI 1/100 sense llibreria | FUIRI 1/100 llibreria 1% | FUIRI 1/100 llibreria 1% | FUIRI 1/100 llibreria 8% | FUIRI 1/100 llibreria 8% |

Els grups 2 i 3, i els grups 4 i 5 són grups de plaques amb les mateixes condicions. Fan falta 2 grups iguals perquè les plaques d'un grup s'enviaran a **Citometria**, al **FACS**, per mirar la viabilitat cel·lular i l'altre grup s'utilitzarà per ressembrar després dels 3 primers tractaments. Al finalitzar tots els quatre cicles s'enviarà a seqüenciar per identificar els gens bloquejats. Així es podrà relacionar el nombre de cèl·lules vives per cada tractament diferent amb els gens que hauran desaparegut (les cèl·lules sense el gen hauran mort) per cada tractament.

## Canvi de medi

El dia després d'incorporar el tractament amb quimioteràpia, cal canviar el medi de les cèl·lules per netejar-lo de drogues:

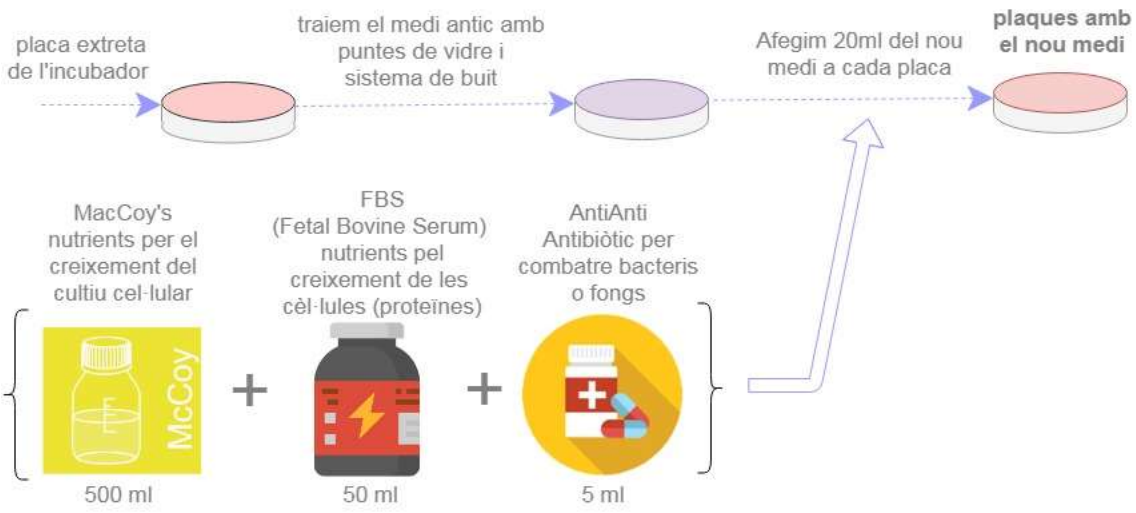



*Figura 3-10 Esquema Canvi de medi*

## Descans

Després del canvi de medi per netejar-lo de drogues, les cèl·lules es deixen en descans dos dies per tal que tinguin les condicions idònies per créixer i alimentar-se.

## FACS, comptar i sembrar

Desprès dels dos dies de descans i abans del següent dia tractament:

- Les cèl·lules d'unes plaques es preparen i s'envien a citometria (FACS).
- Les cèl·lules de les altres plaques continuen en el cicle i s'han de tornar a sembrar en noves plaques. Això implica comptar-les i redistribuir-les perquè cada nova placa tingui 12 milions de cèl·lules abans del nou tractament. Si el cultiu ha crescut molt abans del nou tractament es llencen les cèl·lules que sobren. Si en el cultiu han mort moltes cèl·lules cal canviar planificació i re-sembrar plaques amb menys de 12 milions de cèl·lules. Aquest és el procés més extens que es fa en el cicle, comporta les accions següents:

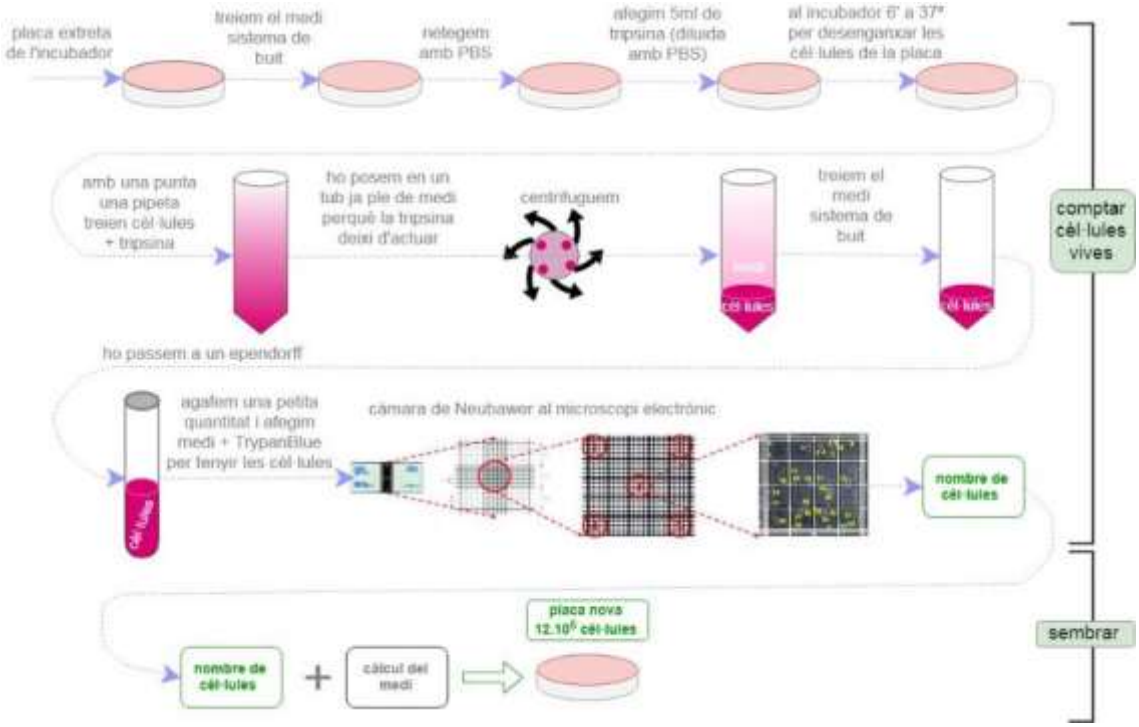



*Figura 3-11 Esquema Comptar i Sembrar*

Les plaques que s'envien al **citòmetre** també s'han de processar perquè abans d'enviar-les s'han de tenyir amb **DAPI** i **DiOC** per distingir les cèl·lules vives de les cèl·lules mortes:

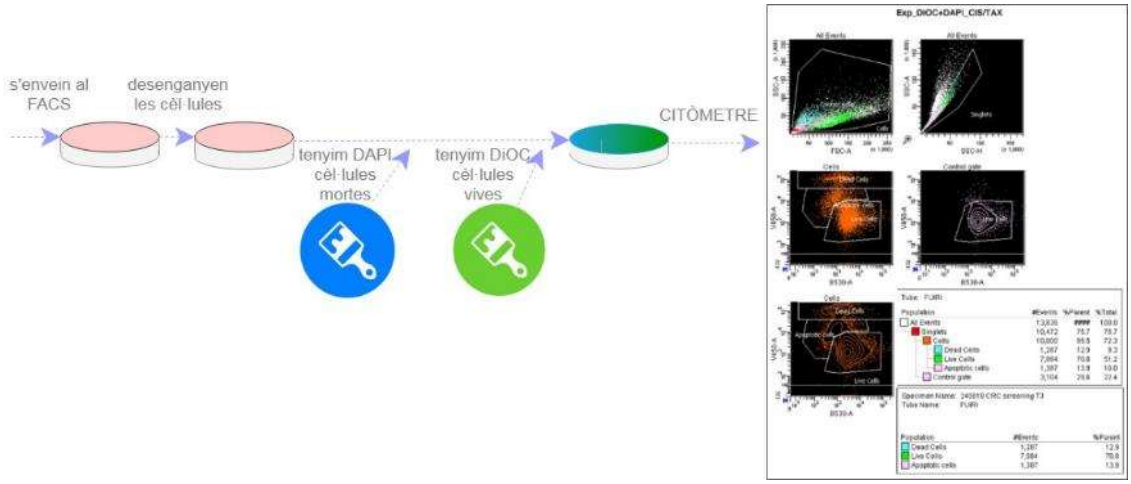



*Figura 3-12 Esquema Enviar a FACS*

## 4 tractaments amb drogues per completar el cicle

Després de la primera ronda de tractament que s'aplica a les cèl·lules sembrades, se'n farà un altra al cap de 5 dies. A la tercera ronda s'afegeixen 2 dies de descans abans del tractament per poder recuperar les cèl·lules que estan **molt castigades i perquè s'enganxin bé a la placa**. A la quarta ronda es faran 7 dies igual que a la tercera. Abans de cada nova ronda de tractament es compten i es tornen a sembrar les cèl·lules. Quan haguem completat el cicle haurem posat 4 vegades el tractament.

En el diari, a l'apartat DIARI de LABORATORI, explico amb més detall les accions i experiments de cada dia, però per no tornar a repetir la majoria d'accions de cada 5 dies de tractament, només indicarem els punts més rellevants:

i. Tal com he avançat prèviament, després del final del 2n tractament (dia 11 del cicle) i després de comptar les cèl·lules, vàrem detectar la mort de moltes cèl·lules i per això va caldre ampliar 2 dies el cicle per permetre la recuperació i el creixement de les cèl·lules que van sobreviure.

ii. Un de les causes podria ser l'agressivitat del tractament, per això la tercera ronda de tractament es va fer amb les drogues més diluïdes, i es va descartar

les dilucions 1/48 i 1/75, i la dilució 1/100 es va dividir en dues noves condicions: continuar amb 1/100 i una nova condició de 1/150.

iii. Després de comptar les cèl·lules de la 3a ronda de tractament (dia 18 del cicle) es va decidir iniciar dos experiments nous en paral·lel:

- 96 → Abans de començar l'experiment, vam calcular quin era l'indicador per mesurar l'eficàcia de les tres drogues que faríem servir (5-FU, l'OXA i el SN-38), anomenat $IC_{50}$. Farem de nou aquest càlcul per veure si aquesta $IC_{50}$ ha variat o no perquè ens hem trobat generalment amb molta mortalitat en l'experiment.
- 6 → En aquest experiment volem saber si la mida de la placa en la qual treballem amb les cèl·lules influeix en els resultats o no. Durant l'experiment general vam estar treballant amb plaques de 15cm de diàmetre, ara es volia veure com es comporten les cèl·lules amb les mateixes condicions però amb plaques de 6cm de diàmetre.

## Seqüenciar després de l'últim cicle de 21 dies de tractament amb drogues

Després dels 21 dies del cicle unes plaques s'envien a FACS per **comptabilitzar** i les altres es guarden per enviar-les a seqüenciar un cop estiguin tots els cicles acabats. La seqüenciació es fa a fora de l'IGTP.

Els resultats de les FACS es poden veure en l'annex D – "Resultats finals citometria FACS".

Després de l'últim cicle, per enviar a seqüenciar **s'extreu l'ADN** de les cèl·lules (no tractades, tractades amb FUOX i tractades amb FUIRI) i s'envia, de manera que seqüencien quins *shRNA*s s'han mantingut després de tot el tractament dels més de 8.000 totals que teníem.

Com s'ha explicat a l'apartat de seqüenciació, amb els resultats rebuts d'aquest procés, es comparen quins gens **s'han deixat d'expressar** en les cèl·lules tractades en relació a les no tractades i quins estan més **sobreexpressats** en les cèl·lules tractades en relació a les no tractades.

D'aquesta manera, si es veu, fent cerca en negatiu (*negative selection*), que alguns *shRNA*s desapareixen a les cèl·lules tractades que han quedat vives voldrà dir que les cèl·lules que el tenien han mort; això voldrà dir que el fet de silenciar aquest gen en concret sensibilitza aquesta cèl·lula a la quimioteràpia. Així doncs, aquests gens serien **potencials *drug target***, ja que el fet d'inhibir-los sensibilitza les cèl·lules a la quimioteràpia.

Si es veu que alguns *shRNA*s sí que apareixen en moltes cèl·lules tractades que han quedat vives voldrà dir que el gen serà un **biomarker** i que silenciar aquest gen afavoreix el creixement del tumor.

### Segona fase: Infectar amb *shRNA*s específics per bloquejar gens específics

A la segona fase de la investigació les cèl·lules canceroses s'organitzaran en N grups segons els N gens *target* que s'hagin trobat en la primera fase.

En aquesta fase s'infectarà cada grup de cèl·lules amb *shRNA*s diferents per bloquejar gens específics (no es farà l'*screening* de la primera fase on es bloquejaven 900 gens aleatòriament).

S'observarà el creixement de les cèl·lules amb aquests gens específics bloquejats, amb l'objectiu que el bloqueig d'algun o alguns gens faci que **totes les cèl·lules canceroses morin** amb el tractament de quimioteràpia. Si s'aconsegueix aquest objectiu després és viable desenvolupar un medicament que provoqui aquest bloqueig.

Aquesta fase es començarà al mes de novembre o desembre del 2018, i sempre que s'hagin trobat gens *target* prou definits a la primera fase.

## Resum dels resultats

En els gràfics següents es pot veure el resum dels resultats:

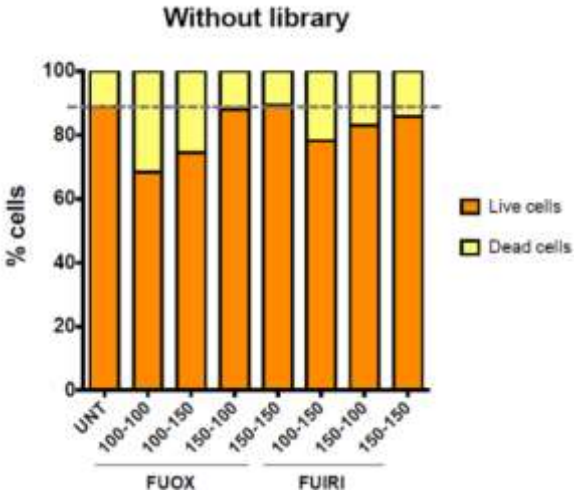



*Figura 3-13 Resultats FACS plaques sense infecció*

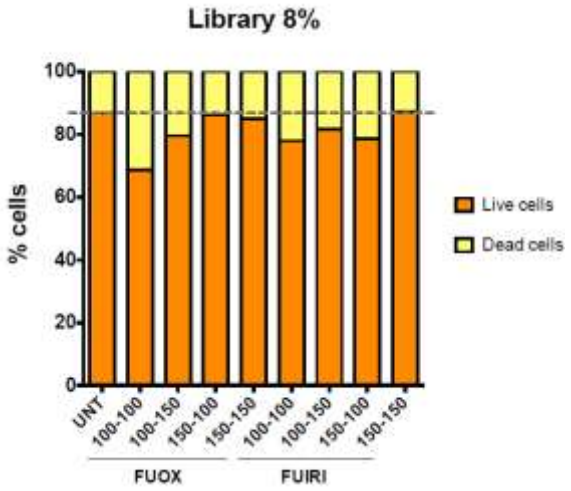



*Figura 3-14 Resultats FACS plaques infecció 8%*

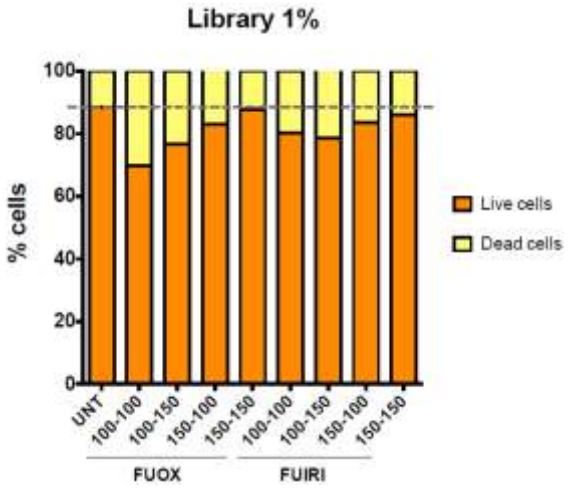



*Figura 3-15 Resultats FACS plaques infecció 1%*

# 4. CONCLUSIONS

**Conclusions extretes de la investigació realitzada pel grup de recerca en el període de la meva estada al laboratori (25/05/2018 a 24/07/2018)**

El cicle de 4 tractaments amb quimioteràpia fet sobre els sembrats de cèl·lules canceroses infectades amb *shRNA*s, realitzat des del dia 25/6/2018 al 18/7/2018 va servir per determinar quina concentració de droga calia incorporar a les plaques de cultius per tal que les cèl·lules tinguin un 20% de mortalitat en els següents cicles de la investigació.

Les plaques de les cèl·lules que van arribar al final d'aquest cicle no es van enviar a seqüenciar per trobar gens *target*, es van enviar totes al FACS per comptabilitzar les cèl·lules vives i les mortes i així poder calcular exactament quines dilucions de droga convenia fer servir en futurs cicles.

Per la investigació interessa que hi hagi un % baix de mortalitat, al voltant d'un 20%, ja que així es poden ressembrar bé les cèl·lules canceroses i es poden enviar a seqüenciar al final de l'últim cicle.

Durant el cicle ja vam veure que **les dilucions 1/48 i 1/75 eren massa agressives i provocaven la mort de massa cèl·lules**. En el mateix cicle ja vam canviar les dilucions i vam **fer servir 1/100 i 1/150**. Després d'analitzar tots els resultats del FACS el grup de recerca va decidir utilitzar aquestes dilucions de droga en els nous cicles de tractament de cultius amb quimioteràpia.

Per tant, a partir d'aquí el grup de recerca determina que els tractaments amb drogues seran a una dilució 1/100 durant els dos primers cicles de tractament, després es faran els dos cicles restants amb la dilució 1/150.

En els futurs cicles la incorporació de droga es farà amb aquestes concentracions. Al final d'aquests cicles les cèl·lules tractades i no tractades s'enviaran a seqüenciar amb l'objectiu de trobar gens *drug target*.

Aconseguir els objectius finals de la recerca encara queda lluny. En el moment que estic escrivint aquestes conclusions (finals d'octubre del 2018) el grup de recerca està acabant la primera fase, la que té com a objectiu trobar els gens *drug target*, els gens que modifiquen la sensibilitat de la cèl·lula al tractament amb quimioteràpia. Amb l'estudi dels resultats de la seqüenciació han trobat que hi ha 300 gens candidats (dels 900 inicials). Ara cal analitzar els resultats d'altres investigacions on apareix algun d'aquests 300 gens, cal revisar tota la bibliografia sobre aquests gens, cal estudiar a fons els resultats de la seqüenciació i finalment determinar els 10 gens que passaran a la segona fase de la investigació. En aquesta segona fase només es silenciarà un d'aquests 10 gens a cada placa de cultiu amb l'objectiu de que les cèl·lules canceroses morin molt més que a les plaques sense cap gen silenciat.

**Conclusions i valoració del Treball de Recerca**

Aquesta estada al laboratori, l'estudi previ per entendre què feien els investigadors, i el treball posterior per explicar bé la investigació que s'està portant a terme m'ha permès adquirir uns coneixements molt valuosos sobre investigació biomèdica, sobre cultius cel·lulars i sobre genètica.

Com a primera conclusió del TR he de dir que he pogut comprovar com n'és d'imprescindible que augmenti la investigació científica al nostre país per aconseguir avenços mèdics. També he pogut comprovar com n'és d'imprescindible investigar com millorar cada acció, cada ítem i cada pas de cada teràpia mèdica que s'utilitza actualment. Crec que és tan important descobrir millores en els tractaments o teràpies actuals com descobrir nous tractaments o noves teràpies.

No vull deixar d'explicar l'admiració que sento pel grup de científics que he conegut i amb qui he treballat. Penso que la capacitat necessària per dissenyar i planificar una recerca com la que estan duent a terme requereix d'un talent i uns coneixements extraordinaris. Igualment, portar a terme la investigació dia a dia, seguint tots els protocols predefinits i resolent els molts problemes que van sortint requereix d'una

capacitat de treball, concentració i organització admirables. Ha sigut un honor poder fer una feina tan complexa a costat de tots ells.

La tercera conclusió és que la vida al laboratori es basa en el seguiment exacte de protocols, la repetició, la no contaminació de tots els productes, l'exactitud en les mesures i resolució de problemes i errors d'una forma ràpida i eficaç. Són molt importants la planificació, la paciència, la rigorositat i la constància.

La quarta conclusió és que hi ha moltes possibilitats que el grup de recerca acabi trobant els 10 gens *target* que tant esperen trobar, uns gens que es puguin bloquejar i facin la quimioteràpia del càncer de còlon molt més efectiva. Si ho aconsegueixen acabaran sent clau per salvar moltes vides. Jo desitjo de tot cor que se'n surtin.

I per acabar vull destacar que he après que quan algú o algun grup de científics està investigant sobre algun tema, sempre hi haurà algú altre al món que estarà fent la mateixa investigació, i que no és una cursa entre dos o més grups, sinó que és una col·laboració per l'avenç científic. És molt difícil poder demostrar una hipòtesi, però encara que no sigui possible fer-ho, els resultats de la investigació es publicaran i podran ajudar a algun altre equip de recerca a demostrar la seva hipòtesi.

# 5. ANNEX A – Pòster "RESPONSE PROJECT"

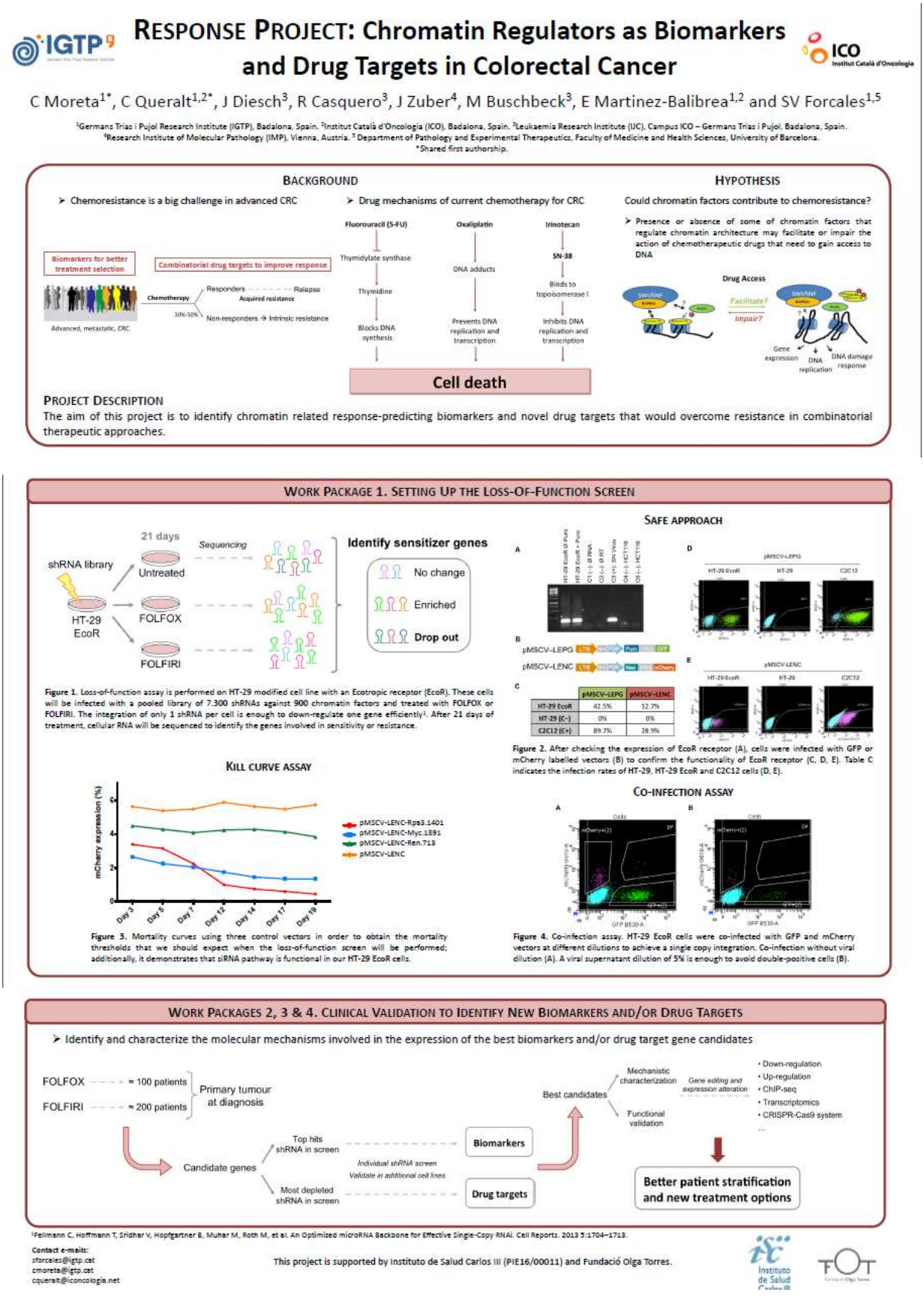



*Figura 5-1 Pòster "RESPONSE PROJECT"*

# 6. ANNEX B - El càncer i el càncer de còlon

## Què és el càncer?

El càncer és un malaltia que consisteix en la multiplicació accelerada de determinades cèl·lules alterades, que formen tumors, i que poden migrar a altres punts, a través del sistema circulatori i limfàtic, fet que s'anomena metàstasi. Si el tumor està molt localitzat i no creix indefinidament rep el nom de tumor benigne. Generalment es pot extirpar amb facilitat. En canvi, si creix envaint i destruint els altres teixits de l'organisme, rep el nom de tumor maligne.

**Les cèl·lules canceroses, les cèl·lules immortals:**

Les cèl·lules canceroses tenen unes marques molt clares, anomenades *hallmarks*. Entre totes aquestes marques, les més importants són:

- Presenten alteracions de forma
- Tenen proteïnes de membrana diferents
- Es divideixen a gran velocitat
- Tenen tendència a envair els teixits propers

Les dues últimes *hallmarks* s'especifiquen més concretament en principalment 8 característiques o propietats que permeten definir les cèl·lules tumorals i que es van adquirint durant els múltiples esdeveniments associats al desenvolupament tumoral. Aquestes capacitats permeten a la cèl·lula tumoral proliferar crònicament sense control, esdevenint **immortal** i evitant la seva destrucció. Concretament, la cèl·lula tumoral té la capacitat de:

1) Mantenir de forma sostinguda senyals proliferatius
2) Evadir-se dels mecanismes supressors de la proliferació
3) Replicar-se indefinidament
4) Resistir la mort cel·lular
5) Activar mecanismes d'evasió i metàstasi

6) Induir angiogènesis (formació de vasos sanguinis nous a partir dels preexistents, aquests nous vasos sanguinis són imprescindibles per al creixement tumoral)
7) Modificar, o reprogramar, el metabolisme cel·lular per facilitar la proliferació
8) Evadir-se del sistema immunitari, evitant així la seva eliminació/destrucció

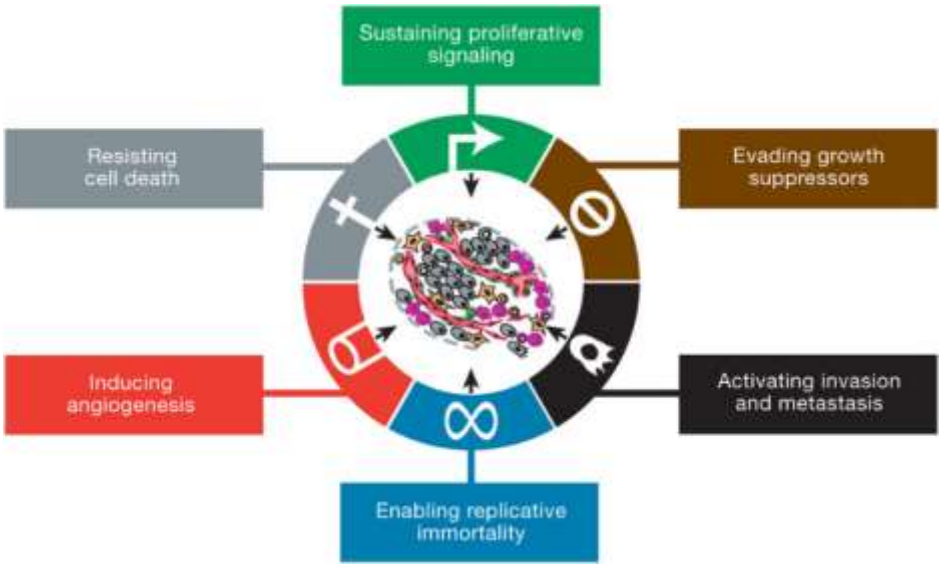



*Figura 6-1 Càncer Hallmarks*
*© https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2811%2900127-9*

El pas de cèl·lula normal a cèl·lula cancerosa s'anomena transformació cancerosa o neoplàsica. Aquesta transformació està relacionada en diferents factors ambientals que actuen alterant l'ADN.

## El càncer, l'ADN i els gens

Els gens estan localitzats dins dels cromosomes, en el nucli cel·lular. Un gen és un fragment d'ADN, i porta la unitat hereditària elemental. La funció d'un gen és codificar una proteïna, i aquest porta la informació codificada a un determinat caràcter. La posició determinada que ocupa el gen dins del cromosoma s'anomena locus.

Existeixen els **gens protooncògens** que amb una petita alteració produïda per agents canceroses passen a oncògens, i aquests provoquen la transformació cancerosa. En

humans se n'han identificat més de cent, de fet no es pot saber la xifra exacta perquè cada dia varia.

També existeixen els **gens supressors tumorals** que inhibeixen la divisió cel·lular. En humans se'n han identificat dotze, però com passa amb els oncògens, pot canviar.

Un medicament ideal per el càncer podria ser un que bloquegés els gens protooncògens i/o potenciés els gens antioncògens.

# El càncer de còlon

## Definició

El càncer colorrectal s'inicia en els teixits del còlon o del recte. Sovint, petites lesions de l'interior del budell (pòlips) poden acabar transformant-se en un tumor.

## El còlon i recte

El còlon i el recte són parts de l'aparell digestiu. Formen un tub llarg muscular anomenat budell gruixut. Del budell gruixut, els últims 15cm corresponen al recte, i aquest es connecta amb l'anus a la seva part final. Dels aliments que digerim, una part arriba al còlon passant a través de l'esòfag, l'estómac i el budell prim. El còlon és la part de l'aparell digestiu on s'absorbeix l'aigua i els nutrients minerals, i on es formen els residus o femta, la qual arriba al recte i, a traves de l'anus, és expulsada a l'exterior del cos.

El **còlon** té quatre seccions: el còlon ascendent, és la part dreta de l'abdomen; el còlon transvers, és la secció que creua per la part superior de l'abdomen de dreta a esquerra; el còlon descendent, és la part esquerra de l'abdomen i el còlon sigmoide que és la secció final, on es connecta amb el recte.

Tot el còlon està irrigat per vasos sanguinis (venes i artèries) i vasos limfàtics.

Els vasos sanguinis són els que aporten la sang a les cèl·lules. Els vasos limfàtics formen part del sistema immunitari i es connecten amb els ganglis, els encarregats de bloquejar els bacteris, les cèl·lules canceroses i d'altres substàncies perjudicials que

arriben a través de la limfa. La limfa és un líquid de color clar que circula pels vasos limfàtics. Tenim ganglis limfàtics al llarg de tot el budell gruixut.

## El càncer de còlon i recte

El càncer de còlon i recte és un dels més freqüents entre els homes i les dones de més de 50 anys.

A EEUU es calcula que l'any 2018 hi haurà 140.250 nous casos de càncer de colon i 50.630 morts per culpa d'aquest càncer. Allà és el 2n càncer més 'mortífer'.

A Catalunya el càncer de còlon i recte és el 2n més freqüent en dones i 3r més freqüent en homes.

La Generalitat de Catalunya ha iniciat un programa de detecció precoç per les persones més grans de 50 anys. És un programa que es fa coordinadament amb les farmàcies i que suposa només fer una prova de sang a la femta.

És molt important la detecció precoç del càncer còlon per la seva possible curació.

Quan no hi ha càncer, és a dir, normalment, les cèl·lules creixen i es divideixen per formar noves cèl·lules que el cos necessita; les cèl·lules envelleixen i moren, quan moren de velles són reemplaçades per les noves.

Quan aquest cicle s'altera i les cèl·lules no moren quan ho haurien de fer i alhora en van creant de noves diem que hi ha càncer: les cèl·lules es divideixen massa sovint i el cos es troba amb un excés de cèl·lules que poden formar una massa o un teixit que es denomina **tumor**.

Existeixen tumors benignes i malignes:

- **Tumors benignes**: No són càncer. Les seves cèl·lules no envaeixen altres parts del cos. Generalment es poden extirpar i no solen tornar a aparèixer.
- **Tumors malignes**: Sí que són càncer. Les cèl·lules d'aquests tumors poden envair teixits propers i disseminar-se per altres parts del cos a través del sistema sanguini o limfàtic. Aquesta disseminació s'anomena **metàstasi**.

El càncer de còlon comença a la capa més interna, a la mucosa de l'òrgan, i pot afectar a més o a totes les capes de la paret del budell. Això es té en compte per determinar el grau d'afectació del càncer.

Quan les cèl·lules canceroses migren a través dels vasos limfàtics i arriben més enllà de la mucosa on s'ha originat el càncer colorrectal es poden trobar cèl·lules malignes en els ganglis limfàtics propers. Quan les venes que recullen la sang del còlon i el recte porten les cèl·lules canceroses cap al fetge i després cap el cor, i d'aquest cap a la circulació sistèmica es produeix metàstasi en altres òrgans. El primer òrgan estació de les cèl·lules tumorals sol ser el fetge, tot i que poden ser els pulmons quan el càncer s'origina al darrer terç del recte.

Quan el càncer colorrectal arriba al fetge, el càncer que s'iniciarà en el fetge tindrà el mateix tipus de cèl·lules que el colorrectal, per tant es tractarà d'un càncer colorrectal amb metàstasi hepàtica. No serà un càncer de fetge i el tractament haurà de ser pel càncer colorrectal, no pel càncer de fetge.

## Causes

Es desconeixen quines són les causes exactes del càncer colorrectal. Algunes persones amb certs factors de risc tenen més probabilitat que d'altres de desenvolupar un càncer de còlon o recte.

Un factor de risc és qualsevol element que fa augmentar les possibilitats que una persona pugui desenvolupar càncer, però la majoria no en són una causa directa. Entre els factors de risc n'hi ha de controlables, com el tabaquisme, i de no controlables, com ara l'edat i els aspectes hereditaris.

En el cas del càncer colorrectal els factors que es consideren de risc són:

- **L'edat**: La majoria dels casos solen donar-se per sobre dels 50 anys.
- **Pòlips colorrectals**: Els pòlips són proliferacions de teixit de la paret interna del còlon o recte. La majoria dels pòlips són benignes però hi ha un tipus de pòlips, anomenats adenomes, que són una lesió precancerosa i es poden transformar en càncer.

- **Antecedents familiars de càncer colorrectal**: Si pares, germans o fills han tingut càncer colorrectal, especialment si s'ha produït en edats joves, tenen més probabilitats.
- **Alteracions genètiques**: Alguns canvis o mutacions en certs gens augmenten el risc del càncer colorrectal:
    - Càncer de còlon hereditari no polipòsic: És el tipus de càncer de còlon hereditari més freqüent.
    - Poliposis adenomatosa familiar: Es caracteritza per la presència de molts pòlips en el còlon i en el recte.
- **Antecedents personals de càncer**: Les persones que han tingut càncer colorrectal i les dones que han tingut càncer d'ovari o úter tenen més risc.
- **Colitis ulcerosa o malaltia de Crohn**: És una malaltia inflamatòria intestinal.
- **Dieta**: Una alimentació rica en greix, especialment d'origen animal, pobra en fruites i verdures, i baixa en fibra, augmenta les possibilitats de càncer colorrectal.
- **Inactivitat física i sobrepès**.
- **Tabaquisme**: Fumar augmenta risc de desenvolupar pòlips i càncer colorrectal.

## Símptomes

El símptomes del càncer colorrectal són poc específics. Els més comuns són els següents:

- Canvi en els **hàbits intestinals**
- **Diarrea**, estrenyiment o sensació que l'evacuació no és completa
- **Sang a la femta**, que pot ser molt fosca o bé vermella
- **Matèria fecal** de menor calibre o més líquida de l'habitual
- **Molèsties a l'abdomen**, com ara dolor, inflor, presència de gasos, sensació de sacietat i còlics
- **Pèrdua de pes** sense motiu aparent
- **Fatiga** o cansament persistent
- **Anèmia** (baix nivell de glòbuls vermells) per pèrdua de ferro sense causa aparent

## Diagnòstic

Per diagnosticar el càncer colorrectal es realitzen les proves següents:

- **Antecedents mèdics i exploració física**. S'elabora la història clínica sobre els antecedents mèdics propis i familiars i els símptomes actuals. També es fa un examen físic inicial.
- **Test de sang oculta en femta**. De vegades el càncer o els pòlips produeixen sagnats i es barregen amb la femta i poden passar desapercebuts. El test és una prova molt senzilla que detecta la presència de sang a la femta. Actualment, com s'ha comentat abans, a la ciutat de Barcelona s'està fent un programa de cribratge. Es proposa a tota la gent major de 50 anys portar a la farmàcia una mostra de femta i es fa el test de sang oculta.
- **Tacte rectal**. És una exploració que forma part de l'examen físic rutinari. El metge introdueix un dit, amb un guant lubrificat, a través de l'anus per identificar la presència d'estructures anormals en el canal anal i terç inferior del recte.
- **Sigmoidoscòpia**. És per visualitzar el sigma i el recte que es troben a la part inferior del budell gruixut. Consisteix en la introducció per l'anus d'un tub flexible amb llum fins a la zona que es vol explorar. Amb aquesta exploració es poden treure pòlips o teixits que posteriorment s'analitzaran.
- **Colonoscòpia**. El procediment és similar al de la sigmoidoscòpia, la prova permet visualitzar i explorar tot el còlon.
- **Ènema de doble contrast de bari**. Aquesta prova és per als pacients que no es poden fer una colonoscòpia. S'administra l'ènema o lavativa amb una solució de bari i es realitzen diverses radiografies abdominals. A les radiografies es veu el contorn del còlon i del recte.
- **Biòpsia**. Aquesta prova dona un diagnòstic definitiu. Consisteix en l'extracció d'una petita quantitat de teixit per a un anàlisi microscòpic. Això permet analitzar i conèixer el tipus de cèl·lules i les característiques del tumor. Aquestes dades són molt importants per determinar el pronòstic i decidir el tipus de tractament més adequat. La biòpsia es pot practicar durant una

colonoscòpia, en un altre teixit obtingut a través de la cirurgia o per punció d'algunes de les metàstasis.

- **Anàlisi de sang**. Es realitza un anàlisi complet de la sang, per valorar l'estat general. Es pot detectar, per exemple, un nivell baix de glòbuls vermells si s'han produït sagnats. També es realitzen altres determinacions com la detecció del marcador tumoral anomenat CEA (Antigen Carcino-Embrionari). Els marcadors tumorals són un tipus de proteïnes que solen trobar-se en nivells elevats a la sang en presència d'un tipus de càncer concret. No hi ha marcadors tumorals per tots els càncers. Pel càncer de còlon tenim el CEA.
- **Ecografia**. Aquesta prova no utilitza raigs X, es realitza mitjançant la utilització dels ultrasons. S'utilitzen ones de so d'alta freqüència, que impacten en les diferents estructures a estudiar i un ordinador en recull l'eco per produir les imatges. Permet distingir entre una massa sòlida i una de contingut líquid. S'utilitza per descartar la malaltia.
- **Tomografia Axial Computeritzada (TAC o TC)**. És prova que es fa amb raigs X. Possibilita visualitzar en forma tridimensional parts internes del cos. En ocasions s'injecta a la vena una substància anomenada *contrast* per poder visualitzar alguns detalls específics. Aquesta prova mostra si el càncer s'ha disseminat al fetge, als pulmons i com d'àmplia és la disseminació.
- **Radiografia de tòrax**. Permet veure si hi ha metàstasi als pulmons.
- **Tomografia per Emissió de Positrons (PET)**. La PET identifica l'activitat metabòlica de les cèl·lules. Consisteix en la injecció en vena d'una substància amb alt contingut en sucre, per la qual les cèl·lules tumorals tenen apetència, marcada de forma radioactiva per a que així pugui ser identificada en la màquina PET. Les cèl·lules malignes solen identificar-se en les imatges com a àrees d'alta activitat. És una prova que s'utilitza per complementar informació d'altres proves.

## Seguiment. Estadificació (grau d'extensió).

Després de confirmar el diagnòstic de càncer colorrectal és necessari conèixer el grau d'extensió per tal de planificar el tractament més adequat.

Els estadis del càncer colorrectal són:

- **Estadi 0** (carcinoma *in situ*). Les cèl·lules canceroses es troben a la capa interna (mucosa) de la paret del còlon o el recte. Si es diagnostica en aquest estadi es poden extirpar durant una colonoscòpia.
- **Estadi I.** El tumor ha crescut i ha traspassat a la següent capa (submucosa), però no s'ha produït disseminació.
- **Estadi II**. El tumor s'ha estès més profundament en la part interna de la paret del còlon o recte i afecta a capes més externes de la paret del budell. És possible que hagi afectat als teixits propers, però no s'ha produït disseminació als ganglis limfàtics.
- **Estadi III**. El tumor s'ha disseminat als ganglis limfàtics propers, però no a d'altres parts del cos.
- **Estadi IV**. El tumor s'ha disseminat a d'altres parts del cos, com pot ser al fetge, pulmons, peritoni (la membrana que cobreix la cavitat abdominal) o als ovaris.
- **Càncer recurrent**. Es produeix quan, passat un temps després d'haver tingut el càncer colorrectal, torna a aparèixer. Pot tornar al còlon, el recte o en una altra part del cos.

## Tractaments

El càncer és una malaltia molt comuna on les cèl·lules proliferen sense control. Hi ha molts tipus de càncers, una gran diversitat de causes i també bastants tractaments. Malauradament, els tractaments no sempre són eficients. Una de les maneres més comuna d'intentar tractar-lo és la **QUIMIOTERÀPIA**. A més a més, un altre mètode recent per intentar combatre el càncer, però aquest és més car i s'utilitza encara poc, és la **IMMUNOTERÀPIA**.

La **quimioteràpia** consisteix a provocar la mort cel·lular, però el problema és que mata tant les cèl·lules tumorals com les cèl·lules sanes.

El tractament amb quimioteràpia es refereix a l'ús de medicaments específics que tenen com a objectiu destruir les cèl·lules canceroses. Aquest tractament també

s'anomena *teràpia sistèmica*, perquè els medicaments es distribueixen per a tot el cos, a través de la sang. Per tant, també pot afectar a cèl·lules sanes i produir alguns efectes secundaris. Depèn del tipus de medicament, dosis, durada i les característiques individuals de cada persona. La quimioteràpia que s'utilitza en el tractament del càncer colorrectal s'administra principalment per via endovenosa (a través de les venes) i de forma ambulatòria. Generalment la quimioteràpia s'aplica després de la cirurgia per eliminar les cèl·lules canceroses restants. En els casos de càncer de recte, se sol administrar conjuntament amb radioteràpia abans de la cirurgia amb l'objectiu de disminuir la mida del tumor. També és el tractament d'elecció en càncer colorectal avançat o metastàsic.

Els efectes secundaris de la quimioteràpia: La quimioteràpia actua específicament sobre les cèl·lules que es divideixen ràpidament, tant a les cèl·lules canceroses com a les sanes. És per això que poden aparèixer efectes secundaris, els quals poden ser diferents tant en tipus com en intensitat, depenent del medicament utilitzat, la dosi i la durada. Tenint en compte la localització de les cèl·lules que es divideixen ràpidament, els efectes secundaris es relacionen amb:

- **Cèl·lules de la sang**. Quan la quimioteràpia afecta a les cèl·lules sanes de la sang pot augmentar el risc de tenir infeccions, de fer-se hematomes o sagnar amb més facilitat, i sentir més feblesa o cansament del que és habitual.
- **Cèl·lules de les arrels del cabell**. En funció del medicament utilitzat, pot haver-hi pèrdua del cabell o pot canviar de color i consistència.
- **Cèl·lules del tracte digestiu**. Són les cèl·lules que es troben a la boca, l'estómac i altres parts de *l'aparell digestiu*. En aquest sentit, es podria produir pèrdua de l'apetit, nàusees, vòmits, diarrea, dificultat per empassar o tenir algunes nafres a la boca i els llavis.

Per al càncer de còlon hi ha dues quimioteràpies bàsiques:

- **FUOX**. **FU**(5-Fluoracil) antimetabolit que penetra a la molècula de l'ADN, impedint així la seva reparació **+ OX**(oxaliplatí), derivat del platí, el seu mecanisme d'acció en l'ADN provoca eventualment la mort de les cèl·lules canceroses.

- **FUIRI**. **FU**(5-Fluoracil) antimetabolit que penetra a la mol·lècula de l'ADN, impedint així la seva reparació **+ IRI** (irinotecà), inhibidor de la topoisomerasa que impedeix la reparació de l'ADN.

Detalladament, la quimioteràpia provoca ruptures en l'ADN amb l'ajuda dels anàlegs de nucleòsids. Els nucleòsids Adenosina (A), Timidina (T), Guanosina (G) i Citosina (C) formen part de l'estructura de l'ADN. La incorporació d'anàlegs d'aquests nucleòsids modificats químicament bloqueja la replicació de l'ADN i els mecanismes de reparació, així que es formen ruptures a l'ADN i es provoca la mort cel·lular perquè la cèl·lula no es duplica. Si la cèl·lula està en una fase de divisió quan hi hagi aquest bloqueig, la cèl·lula no podrà passar de la fase de divisió cel·lular i acabarà morint.

De vegades, tot i la quimioteràpia, algunes cèl·lules tumorals aconsegueixen, en el moment de la divisió, passar els *checkpoints (punts de control*) que la cèl·lula realitza per determinar si ha de continuar amb el procés de divisió o no. Aquesta és la clau de l'expansió del càncer, i passa quan una o més cèl·lules aconsegueixen passar o aprovar aquest control de qualitat que les cèl·lules fan durant la divisió. Si la cèl·lula cancerosa passa aquest control aconseguirà dividir-se com si fos una cèl·lula sana, i no tindrem la mort cel·lular que es busca amb la quimioteràpia. Quan una o més cèl·lules passen el *checkpoint* diem que aquestes cèl·lules s'escapen, i en aquest cas el càncer continua creixent i escampant-se.

Malauradament, sovint quan ataquem un tumor amb quimioteràpia hi ha cèl·lules que s'escapen. Això vol dir que quan ataquem un tumor amb una fàrmac és possible que aquest fàrmac beneficïi el tumor, perquè només es moren les cèl·lules més sensibles o més dèbils, de manera que les cèl·lules que en dividir-se han adquirit mutacions o mecanismes per resistir-se al fàrmac, s'escapen i superen l'acció de fàrmac. Si no s'aconsegueix eliminar totes les cèl·lules tumorals, hi quedaran les cèl·lules més resistents i immunes al tractament.

La **immunoteràpia** contra el càncer consisteix a activar el sistema immunitari. Una de les funcions clau del sistema immunitari és eliminar les cèl·lules tumorals. El sistema immunitari és l'encarregat natural de l'organisme per detectar i eliminar les cèl·lules tumorals. El nostre cos contínuament detecta tumors i els elimina ja que pot detectar

les cèl·lules tumorals i fa que aquestes es morin o les destrueix. De fet, un dels mecanismes que utilitza el tumor per créixer i escampar-se (fer metàstasi) és adquirir propietats que posen frens al sistema immunitari o que el fan invisible al sistema immunitari. Es seleccionen aquelles cèl·lules tumorals que tenen capacitat de bloquejar i d'escapar-se del control del sistema immunitari.

Sense sistema immunitari hi ha més tumors al nostre cos. S'ha vist que les cèl·lules tumorals s'escapen del sistema immunitari bloquejant-lo de diferents maneres. El problema és que sobreviuen les cèl·lules canceroses que aconsegueixen burlar els mecanismes que controlen els errors que es donen en el control de la proliferació cel·lular. Les cèl·lules canceroses que aconsegueixen passar els *checkspoints* del sistema immunitari hauran aconseguit burlar el sistema immunitari i aconseguiran duplicar-se sense límits.

Un dels reptes de la immunoteràpia és que abans s'ha d'estudiar el mecanisme que fa servir el tumor per frenar i parar al sistema immunitari i després buscar el fàrmac adequat per evitar aquest bloqueig. No tots els tumors adquireixen els mateixos mecanismes de resistència i un mateix tumor en pot tenir diversos. Un dels principals mecanismes que utilitza el tumor per evadir-se del sistema immunitari és expressant la proteïna PD-L1. La interacció de PD-L1 de la cèl·lula tumoral amb el la proteïna PD1 dels limfòcits T provoca el bloqueig del sistema immunitari. Un tractament amb anticossos que bloquegin aquesta interacció provoca una activació del sistema immunitari afavorint la destrucció de les cèl·lules tumorals.

Per tant, una manera complementària de fer front al càncer, principalment els que són resistents a teràpies convencionals, és identificar els mecanismes que utilitza cada tumor per bloquejar i escapar-se del sistema immunitari i aconseguir que el sistema immunitari funcioni al 100%. Així doncs, l'objectiu de la immunoteràpia és activar el sistema immunitari, que de forma natural pot aconseguir combatre el tumor d'una forma més eficient i efectiva, i principalment sense efectes colaterals sobre cèl·lules normals. Recentment s'han produït grans avenços en la immunoteràpia, però els tractaments encara estan en fases inicials o experimentals per la majoria de tumors i són molt costosos.

Altres tractaments aplicats al càncer de còlon són els següents:

- **Cirurgia**. La cirurgia és el tractament més freqüent del càncer colorrectal per extirpar el tumor.
- **Colonoscòpia**. Mitjançant la colonoscòpia es poden extirpar els pòlips malignes al llarg del còlon i alguns tumors petits a la part baixa del recte.
- **Laparoscòpia**. En fases molt inicials i determinades situacions, el càncer de còlon es pot extirpar mitjançant la laparoscòpia. Aquesta tècnica quirúrgica consisteix en la realització de 3 o 4 petites incisions a l'abdomen, a través dels quals s'introdueixen uns instruments que permeten visualitzar l'interior i extirpar el tumor, a més d'una petita porció de teixit sa del voltant. També, si és necessari, es poden treure alguns ganglis limfàtics. Amb aquesta tècnica es poden visualitzar la resta de budells i el fetge.
- **Cirurgia oberta**. Aquesta tècnica quirúrgica consisteix en l'obertura de l'abdomen mitjançant un tall, practicat a la zona mitja i al llarg, per extirpar el tumor i part de teixit sa proper, així com alguns ganglis limfàtics. També durant la intervenció es revisen la resta de budells i el fetge.
- **Estoma**. En extirpar el tumor i un marge de teixit sa, cal preveure com es connectaran les parts sanes per mantenir la continuïtat del budell gruixut fins a l'anus. Habitualment es realitzen abocaments temporals de la porció proximal del budell a la paret intestinal, que posteriorment seran reintroduïts i connectats amb la porció distal. Es practica per deixar temps suficient per què els teixits del còlon o del recte es recuperin de la cirurgia. La porció del budell que resta a l'exterior s'anomena *estoma*. L'estoma es connecta amb una bossa que recull la femta.
- **Radioteràpia**. La radioteràpia és un tractament que utilitza raigs d'alta energia per eliminar les cèl·lules canceroses. Només afecta la zona en què s'aplica el tractament. En el càncer de recte la radioteràpia s'utilitza al mateix temps que la quimioteràpia, és a dir, de forma concomitant. Es pot administrar abans (teràpia neoadjuvant) o després de la cirurgia (teràpia adjuvant). Tenen diferents avantatges i desavantatges, però essencialment la mateixa finalitat: eliminar possibles restes de cèl·lules malignes dels marges que la cirurgia no

pot garantir. L'elecció d'una o altra opció és valorada per l'equip assistencial d'acord a la situació individual de cada persona.

- **Teràpies biològiques**. Les teràpies biològiques actuen a través del sistema immunològic (de les defenses del cos), de forma més específica contra les cèl·lules malignes i menys sobre les sanes, i per tant tenen menys efectes secundaris i, generalment, es toleren millor. Segons el mecanisme d'acció, n'hi ha de dos tipus principals: els anticossos monoclonals i les petites molècules de baix pes molecular. En el càncer colorectal s'utilitzen les primeres, per exemple *cetuximab*, *panitumumab* o *pevacizumab*. De moment s'utilitzen en casos de càncer colorectal metastàsic.

## *Conceptes importants per la investigació que s'està duent a terme. Genètica i Epigenètica*

Causes de l'aparició de cèl·lules tumorals:

Les cèl·lules poden passar a ser canceroses quan hi ha:

- Mutacions en els gens  Aquest procés és irreversible
  Una mutació es produeix per un canvi en la seqüència de l'ADN que pot donar lloc a la codificació d'un aminoàcid diferent que afecti la funció de la proteïna que codifica.
- Alteracions de l'estructura de la cromatina (epigenètica)→ Aquest procés podria ser reversible.

Mutacions als gens que modifiquen la cromatina poden afectar el control de l'expressió gènica i conseqüentment a la proliferació i diferenciació de la cèl·lula.

En molts càncers es troben mutats alguns dels gens del complex SWI/SNF (BAF). Moltes d'aquestes mutacions afecten el funcionament del complex i poden contribuir al creixement tumoral.

## Epigenètica

- L'Epigenètica és un pas més del que et dóna la genètica. Un sol òvul fertilitzat (el **zigot**) canvia a molts tipus de cèl·lules, incloent-hi neurones, sang, etc., a

mesura que continua la seva divisió per mitosi. Això ho fa activant alguns gens mentre n'inhibeix d'altres i és el procés de diferenciació cel·lular. Aquest procés és la base de l'estudi de l'epigenètica.

- Les cèl·lules mare són les produïdes per fusió d'un òvul i un espermatozoide així com les produïdes en les primeres divisions del zigot. Aquestes cèl·lules poden esdevenir qualsevol tipus cel·lular sense excepció. Són les cèl·lules primordials no diferenciades i creen cèl·lules diferenciades, és a dir, tenen l'habilitat de diferenciar-se en altres tipus cel·lulars. Aquesta habilitat els permet d'actuar com a un sistema reparador per al cos, substituint altres cèl·lules.
- L'epigenètica contribueix a saber quins altres mecanismes hi ha per expressar la diferenciació d'un gen.

# 7. ANNEX C - DIARI de LABORATORI

## 25 de juny (Preparem les cèl·lules)

Avui ha sigut el primer dia que he anat al laboratori.

Primer m'han ensenyat tot l'edifici i on estava cada sala on podria necessitar anar, la sala de cultius cel·lulars, el magatzem, la campana de PCR... M'han donat el material imprescindible com les bates i els guants.

Com he dit anteriorment, per aquesta recerca els tractaments es fan en cicles de 21 dies. Per aquests cicles es fa un cultiu a partir de cèl·lules canceroses que provenen d'una línia comercial d'adenocarcinoma de còlon anomenada HT-29.

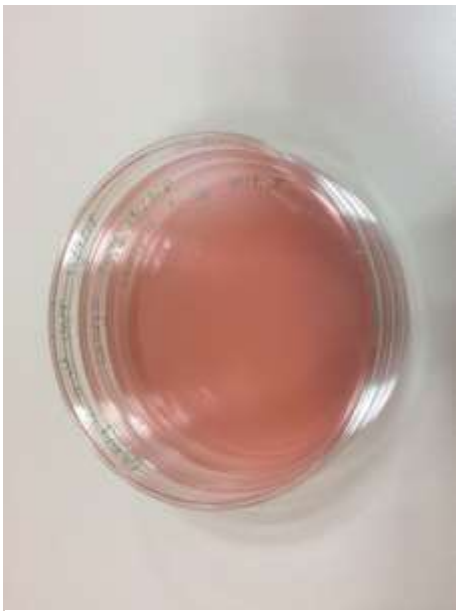


*Figura 7-1 Plaques de petri de 15cm de diàmetre. Amb cèl·lules i medi*

Cada un del cicles consisteix en la preparació de 4 tractaments per després deixar-les reproduir i poder observar i analitzar els resultats al final del cicle.

Just avui ha començat un cicle de 21 dies de cultiu de cèl·lules canceroses.

Començarem amb 35 plaques i a cada placa hi hauran 12 milions de cèl·lules. Utilitzem plaques de petri de 15cm de diàmetre i, a part de les cèl·lules, hi posem 20ml de medi.

Primer hem anat a la sala de cultius cel·lulars, abans d'entrar-hi ens hem posat la bata especial i els guants. Com que les plaques de petri de 15 centímetres amb les cèl·lules ja s'havien posat anteriorment a l'incubador de 37°C, avui només hem de **canviar el**

*Figura 7-2 Campana de la sala de cultius*

**medi de cada placa de cèl·lules** ja enganxades. Agafem la placa de cèl·lules de l'incubador i la posem a dins de la campana de la sala de cultius. A dins obrim poc la placa per evitar contaminació i amb una punta de vidre (pipetes Pasteur) i el sistema de vuit traiem el medi. Després llencem aquest punta i agafem una pipeta i amb l'ajuda del pipet (o pi-pumb) li afegim 20ml del medi nou.

El medi que li posem es diu McCoy's, ens ve en un pot de 500ml. I a més a més sempre li afegim 50ml de FBS i 5ml de AntiAnti.

L'FBS és Fetal Bovine Serum, és a dir, conté tots els nutrients que necessiten les nostres cèl·lules per créixer, ja que està ple de proteïnes. L'Anti-Anti és antibiòtic (penicil·lina i estreptomicina) i antimicòtic, i l'únic que fa és que preveu l'aparició i contaminació de les nostres cèl·lules per bactèries i/o fongs.

## 26 de juny (dia 1 del cicle)

Avui comencem el cicle, el que hem de fer avui és posar 12 milions de cèl·lules a cada placa, amb tots els tipus de plaques que tindrem. Les diferents plaques amb les drogues (quimioteràpia) FUOX i FUIRI i amb dilucions de 1/48, 1/75 i 1/100. (la primera és més agressiva que la segona i aquesta més que la tercera)

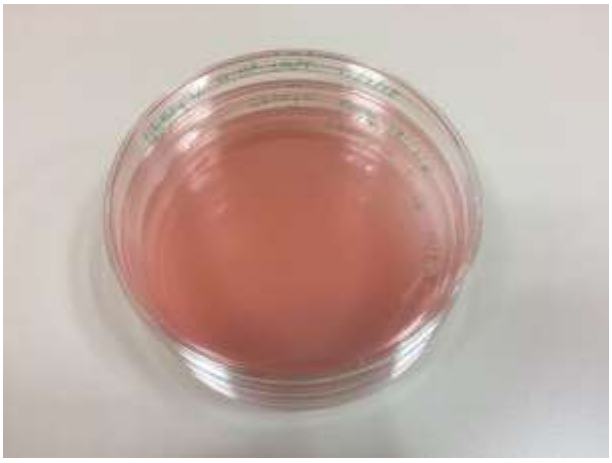


*Figura 7-3 Plaques de petri de 15cm. Amb cèl·lules i medi a dins*

Ho farem amb 3 tipus de cèl·lules:

- Cèl·lules no infectades (cèl·lules control→ ø)
- Cèl·lules infectades a l'1%
- Cèl·lules infectades al 8%

Parlem de cèl·lules infectades perquè estan infectades amb la llibreria de *shRNA*s. Dintre de les cèl·lules infectades hi han les no tractades amb quimioteràpia, les tractades amb FUOX i les tractades amb FUIRI. A part, tenim les cèl·lules no infectades

amb la llibreria, de les quals també tindrem aquestes 3 condicions (no tractades, tractades amb FUOX i tractades amb FUIRI.

Primer de tot hem de fer alguns càlculs per saber quantes plaques de cèl·lules necessitem.

Si volem sembrar $12 \cdot 10^6$ cèl·lules a cada placa necessitarem:

*Figura 7-4 Esquema del total de plaques que necessitem*

La següent qüestió que hem de resoldre és quantes cèl·lules necessitem en total:

- Cèl·lules control → $12 \cdot 10^6$ x 8 plaques (més una placa extra) = $96 \cdot 10^6$ cèl·lules + 160 ml McCoy's
- Cèl·lules a l'1% i 8% → $12 \cdot 10^6$ x 15 plaques (més una placa extra) = $180 \cdot 10^6$ cèl·lules + 300 ml McCoy's

A la sala de cultius primer de tot hem agafat les mateixes plaques que ahir i hem tret el medi de les cèl·lules amb les puntes de vidre i el sistema de buit. A continuació, a cada placa hi hem posat PBS (*Phosphate Buffered Saline* – Tampó Fosfat Salí), substància que retira tot el medi que pugui haver quedat. El posem amb una pipeta de 25ml, el deixem uns segons i el traiem amb una punta de vidre i el sistema de buit.

*Figura 7-5 Dins de la campana. Treient el medi amb el sistema de buit*

Després hi hem posat tripsina diluïda anteriorment amb PBS amb una pipeta i l'hem deixat incubant cinc minuts a 37ºC perquè així les cèl·lules es desenganxin de la placa.

La tripsina l'utilitzem perquè és un enzim que trenca els enllaços amb les proteïnes mitjançant hidròlisi. En els cultius cel·lulars ens serveix per desenganxar les cèl·lules de la placa, que és on creixen, i tenir-les en suspensió per poder-les treure.

*Figura 7-6 Incubador de 37 graus a la sala de cultius*

Després hem agafat les cèl·lules ja desenganxades amb tripsina. Ho agafem amb una punta i una pipeta. Les hem posat en els tubs de medi, preparats anteriorment, per inactivar la tripsina.

Necessitem inactivar la tripsina perquè si les cèl·lules estan amb tripsina molta estona s'acaben fent malbé.

Ho hem distribuït amb una pipeta en diferents tubs i els hem centrifugat a 1200rpm durant 5 minuts perquè totes les cèl·lules quedin concentrades al fons del tub en forma de ***pellet***.

A continuació hem tret el sobrenedat (medi) del tub, amb una punta de vidre i els sistema de buit, i ens hem quedat amb el pellet (cèl·lules).

Tot aquest procés ho fem amb cada placa, és a dir, necessitarem 35 tubs.

Ara posem 10µL de medi amb el pellet i hi afegim 10µL de TrypanBlue.

El TrypanBlue és una substància que tenyeix les cèl·lules i així es poden comptar al laboratori. S'ha de vigilar

*Figura 7-7 Microscopis electrònics de la sala de cultius*

molt perquè és tòxic.

Després hem observat les cèl·lules al microscopi electrònic de la sala de cultius i hem contat les cèl·lules amb la càmera Neubauer.

La càmera de Neubauer és un instrument que es tracta de dos vidres, on entre aquest dos es posa una quantitat de mostra de cèl·lules amb TrypanBlue. Si es porta al microscopi, podem comptar les cèl·lules gràcies a una quadrícula.

*Figura 7-8 Incubador de 37 graus de la sala de cultius*

Quan ja les hem comptat, podem fer la proporció:

nº cèl·lules → cèl·lules que comptes · $V_{resuspès}$ · 2 · $10^4$

A continuació hem fet càlculs per saber quanta quantitat necessitarem de cèl·lules i de medi, i hem tornat a distribuir la barreja en diferents plaques. Necessitem 12 milions de cèl·lules per placa. De cada tub que teníem, hem posat el medi que feia falta i hem distribuït 20 ml a cada placa nova amb una pipeta i el pi-pumb. Totes les plaques estaven empaquetades i eren estèrils. Cada cop que fèiem una placa, la retolàvem, per després saber quina era, i la posàvem a l'incubador de 37ºC, dins de la mateixa sala de cultius.

Finalment posem totes les plaques a incubar 24 hores a 37ºC i deixem que les cèl·lules es tornin a enganxar a la base de la placa i que s'alimentin amb el medi.

## 27 de juny (dia 2 del cicle)

Avui és el dia de tractar amb les drogues les cèl·lules. Primer hem de preparar el FUOX i el FUIRI. Hem fet els càlculs per saber quina quantitat de medi nou necessitem.

| | |
|---|---|
| 1/48 ⟶ 110 ml/48 = 2,292ml «stock» + 107,708ml McCoy's | |
| Vf = 20ml x 5 plaques = 100ml ⟶ 110ml | |
| 1/75 ⟶ 110 ml/75 = 1,467ml «stock» + 108,533ml McCoy's | **330 ml** |
| Vf = 20ml x 5 plaques = 100ml ⟶ 110ml | |
| 1/100 ⟶ 110 ml/100 = 1,1ml «stock» + 108,9ml McCoy's | |
| Vf = 20ml x 5 plaques = 100ml ⟶ 110ml | |

En total necessitarem 330ml de medi nou.Després hem fet els càlculs per saber quina quantitat de droga hem de posar en el medi nou.

Stock solutions mare → Vf: 5,3ml

| | | |
|---|---|---|
| 5-FU | 38,4µM · Vi = 10µM · 5,3ml | → Vi = 1,379ml |
| OXA | 12,6µM · Vi = 2µM · 5,3ml | → Vi = 841ml |
| SN-38 | 50nM · Vi = 5,5µM · 5,3ml | → Vi = 583ml |

Aquest càlculs ens indiquen quants ml necessitem de cada droga per fer el tractament.

**Dilució de droga**

| | |
|---|---|
| **5-FU** | $V_f = 3ml$ |
| $384{,}4mM \xrightarrow[1\mu L+9\mu LH_2O]{1/10} 38{,}44mM \xrightarrow[5\mu L+45\mu LH_2O]{1/10} \ldots$ <br> $\ldots \rightarrow 38{,}84mM \xrightarrow[40\mu L+360\mu LH_2O]{1/10} 384{,}4\mu M \xrightarrow[300\mu L+2{,}7\mu LMcCoy's]{1/10} \mathbf{38{,}44\mu M}$ | |
| **OXA** | $V_f = 1ml$ |
| $12{,}6mM \xrightarrow[2\mu L+18\mu LH_2O]{1/10} 1{,}26mM \xrightarrow[15\mu L+135\mu LH_2O]{1/10} \ldots$ <br> $\ldots \rightarrow 126\mu M \xrightarrow[100\mu L+900\mu LMcCoy's]{1/10} \mathbf{12{,}6\mu M}$ | |
| **SN-38** | $V_f = 800\mu l$ |
| $5mM \xrightarrow[1\mu L+9\mu LH_2O]{1/10} 500\mu M \xrightarrow[1\mu L+9\mu LH_2O]{1/10} 50\mu M \xrightarrow[2\mu L+18\mu LH_2O]{1/10} \cdots$ <br> $\ldots \rightarrow 5\mu M \xrightarrow[10\mu L+90\mu LH_2O]{1/10} 500nM \xrightarrow[80\mu L+720\mu LMcCoy's]{1/10} \mathbf{50nM}$ | |

Hem fet totes les dilucions a dins de la campana de la sala de cultius fins a arribar a la proporció desitjada. Ho hem fet tota l'estona amb diferents pipetes per posar exactament el que necessitàvem, cada cop que canviem de droga o toquem alguna cosa que no sigui el líquid amb la punta, hem de canviar la punta.

*Figura 7-9 Material de dins la campana. Plaques, tubs, PBS, medi, puntes, pipeta, kitasato...*

Quan ja hem tingut les drogues amb la quantitat que havíem calculat, hi afegim el medi que necessitem. Després traiem el medi que hi ha actualment a les plaques amb les puntes de vidre i el sistema de buit i finalment posem 20ml de medi amb la droga a cada placa.

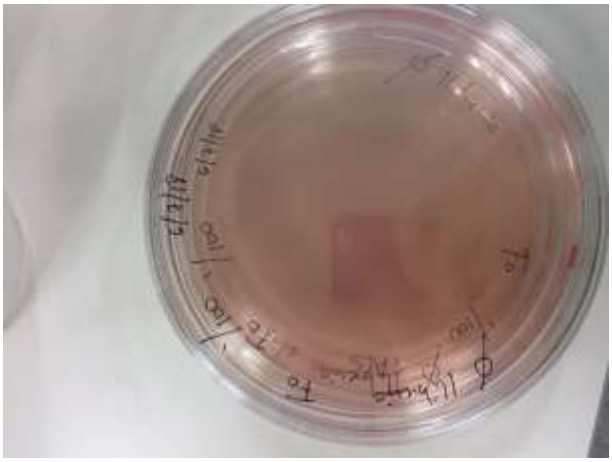


*Figura 7-10 Plaques de petri de 15cm*

Un cop acabat aquest procés d'incorporació de drogues hem obtingut:

- 5 plaques control
- 5 plaques de FUOX 1/48
- 5 plaques de FUOX 1/75
- 5 plaques de FUOX 1/100
- 5 plaques de FUIRI 1/48
- 5 plaques de FUIRI 1/75
- 5 plaques de FUIRI 1/100

A cada conjunt de 5 plaques tenim:

- 1 placa sense llibreria
- 2 plaques amb llibreria a l'1%
- 2 plaques amb llibreria al 8%

Per acabar, hem posat totes aquestes plaques a l'incubador de la sala de cultius. Ho deixem tota la nit perquè les drogues vagin actuant sobre les cèl·lules.

*Figura 7-11 Pot d'1L de medi McCoy's*

## 28 de juny (dia 3 del cicle)

Avui toca canviar el medi de les 35 plaques que tenim. El medi en el que estan té les drogues i cal canviar-lo perquè el tractament ha de ser només d'un dia.

Primer preparem el nou medi, McCoy's, afegint-li un 1% d'AntiAnti i un 10% de FBS i després agafem cada placa i li traiem el medi que hi ha amb les puntes de vidre i el sistema de buit. A continuació li posem 20ml del nou medi amb una pipeta i el pi-pumb.

Finalment deixem les plaques incubant a 37°C durant 72 hores, així deixem que es recuperin del tractament amb drogues i que s'alimentin del medi nou.

## 29 de juny (dia 4 del cicle)

Aquest dia l'anomenem de descans perquè no es farà cap acció sobre les cèl·lules per deixar-les que s'alimentin i creixin en el nou medi.

## 30 de juny (dia 5 del cicle)

2n dia de descans.

## 1 de juliol (dia 6 del cicle)

Avui realitzem l'acció més extensa o el procés més llarg dins dels dies que es fan al cicle.

El que hem de fer és comptar les cèl·lules d'una placa de cada condició, per veure la mortalitat i calcular quina proporció de cèl·lules necessitem agafar, de cada tipus de placa, per sembrar-ne una de nova amb 12.000.000 de cèl·lules i continuar amb l'experiment. A més a més hem de reservar una placa de cada tipus per tenyir-les amb DiOC i DAPI i portar-les a FACS, on faran un estudi de viabilitat amb exactitud i generaran un informe.

El DiOC és un colorant que tenyeix les cèl·lules vives i el DAPI tenyeix les cèl·lules mortes.

Hem de tenir em compte que tenim plaques amb condicions repetides i per aquestes només cal fer el càlcul d'una de les plaques. De cada 7 grups de 5 plaques tenim:

- 1 placa sense llibreria
- 2 plaques amb llibreria a l'1%
- 2 plaques amb llibreria al 8%

  per tant, de les 35 plaques en tenim 14 amb condicions repetides i només cal que comptem les cèl·lules de 21 plaques.

Agafem una placa de cada tipus i comptem quantes cèl·lules hi ha en una mostra amb la càmera Neubauer. Els resultats de comptar les cèl·lules a les 21 plaques amb condicions diferents:

| Tractament | Dilució (library) | cèl·lules (càmera NewBauer) | cèl·lules TOTALS (x7,5mlx2,$10^4$) |
|---|---|---|---|
| Sense tractament | 0% | 421 | 63,15x$10^6$ |
| | 1% | 332 | 49,80x$10^6$ |
| | 8% | 419 | 63,15x$10^6$ |
| FUOX 1/48 | 0% | 222 | 33,30x$10^6$ |
| | 1% | 148 | 22,20x$10^6$ |
| | 8% | 200 | 30,00x$10^6$ |
| FUOX 1/75 | 0% | 274 | 41,10x$10^6$ |
| | 1% | 259 | 38,85x$10^6$ |
| | 8% | 264 | 39,60x$10^6$ |
| FUOX 1/100 | 0% | 330 | 49,50x$10^6$ |
| | 1% | 340 | 51,00x$10^6$ |
| | 8% | 312 | 46,80x$10^6$ |
| FUIRI 1/48 | 0% | 261 | 39,15x$10^6$ |
| | 1% | 213 | 22,20x$10^6$ |
| | 8% | 178 | 26,70x$10^6$ |
| FUIRI 1/75 | 0% | 312 | 46,80x$10^6$ |
| | 1% | 252 | 37,80x$10^6$ |
| | 8% | 268 | 40,20x$10^6$ |
| FUIRI 1/100 | 0% | 393 | 58,95x$10^6$ |
| | 1% | 311 | 46,65x$10^6$ |
| | 8% | 293 | 43,95x$10^6$ |

Amb aquests càlculs podem saber la mortalitat de cada condició:

| Dilució | Tractament | Infecció | Mortalitat (%) |
|---|---|---|---|
| 1/48 | FUOX | Sense infectar | 76 |
| | | 1% infectat | 86 |
| | | 8% infectat | 77 |
| | FUIRI | Sense infectar | 81 |
| | | 1% infectat | 90 |
| | | 8% infectat | 86 |
| 1/75 | FUOX | Sense infectar | 60 |
| | | 1% infectat | 77 |
| | | 8% infectat | 69 |
| | FUIRI | Sense infectar | 67 |
| | | 1% infectat | 72 |
| | | 8% infectat | 55 |
| 1/100 | FUOX | Sense infectar | 34 |
| | | 1% infectat | 55 |
| | | 8% infectat | 37 |
| | FUIRI | Sense infectar | 33 |
| | | 1% infectat | 44 |
| | | 8% infectat | 42 |

A continuació, com que sabem el total de cèl·lules que hi ha a cada placa, podem calcular quina proporció i quina quantitat n'hem d'agafar per deixar-ne només 12.000.000, el nombre de cèl·lules que hem de sembrar de cada placa:

| Tractament | Dilució (library) | Cèl·lules + medi |
|---|---|---|
| Sense tractament | 0% | 1,425mL + 18,575mLMcCoy's |
| | 1% | 3,614mL + 36,398mLMcCoy's |
| | 8% | 2,864mL + 37,136mLMcCoy's |
| FUOX 1/48 | 0% | 2,703mL + 17,297mLMcCoy's |
| | 1% | 7,5mL + 32,5mLMcCoy's |
| | 8% | 6mL + 34mLMcCoy's |
| FUOX 1/75 | 0% | 2,19mL + 17,81mLMcCoy's |
| | 1% | 4,633mL + 35,367mLMcCoy's |
| | 8% | 4,545mL + 35,455mLMcCoy's |
| FUOX 1/100 | 0% | 1,818mL + 18,182mLMcCoy's |
| | 1% | 3,259mL + 36,471mLMcCoy's |
| | 8% | 3,846mL + 36,154mLMcCoy's |
| FUIRI 1/48 | 0% | 2,229mL + 17,701mLMcCoy's |
| | 1% | 5,634mL + 34,366mLMcCoy's |
| | 8% | 6,742mL + 33,258mLMcCoy's |
| FUIRI 1/75 | 0% | 1,923mL + 18,077mLMcCoy's |
| | 1% | 4,762mL + 35,238mLMcCoy's |
| | 8% | 4,478mL + 35,522mLMcCoy's |
| FUIRI 1/100 | 0% | 1,527mL + 18,473mLMcCoy's |
| | 1% | 3,859mL + 36,141mLMcCoy's |
| | 8% | 4,096mL + 35,904mLMcCoy's |

Agafem el volum de cèl·lules calculat de cada placa i les sembrem a les noves plaques ja estèrils. Posem 20ml de medi amb 12 milions de cèl·lules a cada placa nova. Cada placa la retolem per saber quina és. Finalment per cada grup de FUOX i FUIRI de 1/48, 1/75 i 1/100 ens queda:

- De la placa control:
  - 1 placa amb $12 \cdot 10^6$ en 20ml
- De la placa de l'1%:
  - 2 plaques amb 24 · 106 en 40ml i posem 20ml a cada placa (repetim les plaques amb la mateixa condició per portar les repetides al FACS després del proper tractament)
- De la placa del 8%:
  - 2 plaques amb 24 · 106 en 40ml i posem 20ml a cada placa (repetim les plaques amb la mateixa condició per portar les repetides al FACS després del proper tractament)

Per altra banda, les plaques repetides, les altres dues plaques que ens queden de l'1% i el 8%, les portem a FACS (Unitat de Citometria). Les portem a FACS per saber quina proporció de cèl·lules estan vives, quines mortes i quines estan en procés de morir-se. Així sabrem si la droga està actuant com volem o no. Aquests cultius de les plaques que s'envien a FACS deixen de formar part de l'experiment ja que les cèl·lules es malmeten, el que passa és que al FACS hem d'obrir els tubs per passar les mostres en un ambient no estèril, així que les cèl·lules es poden contaminar i no les podem tornar a entrar en un ambient estèril com la sala de cultius.

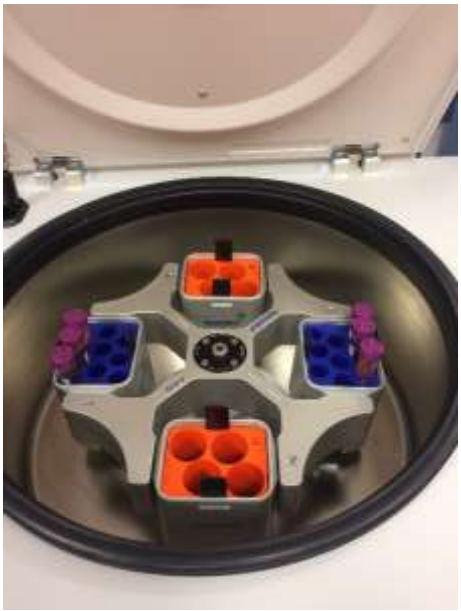


*Figura 7-12 Centrífuga de la sala de cultius*

Passos que fem a cada placa que enviem al FACS:

1. Traiem el medi de la placa. Aquest medi que hi havia a la placa es guarda perquè hi han les cèl·lules mortes.
2. Posem tripsina a la placa de cèl·lules, la deixem incubant 5 minuts, extraiem les cèl·lules amb una pipeta i una punta, les posen en un tub on prèviament hi hem posat més medi fresc perquè així es desactivi la tripsina i ho centrifuguem.

3. En el tub centrifugat queda separat el pellet de cèl·lules (vives i mortes) i el medi. Traiem el medi amb el sistema de buit. Resuspenem el pellet (les cèl·lules) en 1ml de PBS.
4. Afegim 5µL (concentrat a 10µM) de DiOC (substància que tenyeix les cèl·lules vives) i les incubem durant 30 minuts a 37°C
5. Ho tornem a centrifugar i ho rentem en 1ml de PBS
6. Ho centrifuguem un cop més, ho resuspenem en 1ml de PBS + DAPI (3µM) (substància que tenyeix les cèl·lules mortes) i ho incubem 15 minuts a RT (room temperature) a les fosques, perquè el DAPI és sensible a la llum.
7. Ho portem al citòmetre per tal de calcular el percentatge de cèl·lules vives, cèl·lules mortes i cèl·lules en procés.

## 2 de juliol (dia 7 del cicle)

A partir d'ara repetirem 3 vegades més el mateix que hem fet els últims 5 dies.

Avui hem fet el mateix que el 2n dia del cicle (27/7/2018). **Hem d'incorporar drogues als cultius per segona vegada.** Primer hem preparat 2 pots de medi amb AntiAnti i FBS. Després hem agafat els càlculs del dia 27/6/2018 i hem tornat a fer les dissolucions per aconseguir la quantitat que volem.

Hem anat a la sala de cultius i hem fet dilucions fins que hem tingut la proporció de droga que necessitàvem i l'hem posat el medi nou.

| | |
|---|---|
| **5-FU** | $V_f = 3ml = 3000\mu l$ |
| $384{,}4mM \xrightarrow[1\mu L+9\mu LH_2O]{1/10} 38{,}44mM \xrightarrow[5\mu L+45\mu LH_2O]{1/10} \ldots$ <br> $\ldots \rightarrow 38{,}84mM \xrightarrow[40\mu L+360\mu LH_2O]{1/10} 384{,}4\mu M \xrightarrow[300\mu L+2{,}7\mu LMcCoy's]{1/10} \mathbf{38{,}44\mu M}$ | |
| **OXA** | $V_f = 1ml$ |
| $12{,}6mM \xrightarrow[2\mu L+18\mu LH_2O]{1/10} 1{,}26mM \xrightarrow[15\mu L+135\mu LH_2O]{1/10} \ldots$ <br> $\ldots \rightarrow 126\mu M \xrightarrow[100\mu L+900\mu LMcCoy's]{1/10} \mathbf{12{,}6\mu M}$ | |
| **SN-38** | $V_f = 800\mu l$ |
| $5mM \xrightarrow[1\mu L+9\mu LH_2O]{1/10} 500\mu M \xrightarrow[1\mu L+9\mu LH_2O]{1/10} 50\mu M \xrightarrow[2\mu L+18\mu LH_2O]{1/10} \cdots$ <br> $\ldots \rightarrow 5\mu M \xrightarrow[10\mu L+90\mu LH_2O]{1/10} 500nM \xrightarrow[80\mu L+720\mu LMcCoy's]{1/10} \mathbf{50nM}$ | |

Quan tenim totes les proporcions correctes en els "flasks" de 75ml repartim cada una a la seva placa, de 1/48, 1/75 i 1/100. Hem tret el medi antic que hi havia de cada placa amb les puntes de vidre i el sistema de buit. A continuació hem posat 20ml de medi amb la droga, cadascuna a la seva placa corresponent amb la pipeta i l'ajuda del pipet.

*Figura 7-13 A la campana de cultius. Posant el medi a les plaques amb l'ajuda d'una pipeta.*

Fem el mateix pel FUOX i pel FUIRI.

| **5-FU** | $V_f = 8ml$ |
|---|---|
| $384{,}4mM \xrightarrow[1{,}5\mu L+13{,}5\mu LH_2O]{1/10} 38{,}44mM \xrightarrow[11\mu L+99\mu LH_2O]{1/10} \ldots$ <br> $\ldots \rightarrow 3{,}84mM \xrightarrow[90\mu L+810\mu LH_2O]{1/10} 384{,}4\mu M \xrightarrow[800\mu L+7{,}2\mu LMcCoy's]{1/10} \mathbf{38{,}44\mu M}$ | |
| **OXA** | $V_f = 2{,}6ml$ |
| $12{,}6mM \xrightarrow[4\mu L+36\mu LH_2O]{1/10} 1{,}26mM \xrightarrow[30\mu L+270\mu LH_2O]{1/10} \ldots$ <br> $\ldots \rightarrow 126\mu M \xrightarrow[260\mu L+2{,}34\mu LMcCoy's]{1/10} \mathbf{12{,}6\mu M}$ | |
| **SN-38** | $V_f = 1{,}9ml$ |
| $5mM \xrightarrow[1\mu L+9\mu LH_2O]{1/10} 500\mu M \xrightarrow[1\mu L+9\mu LH_2O]{1/10} 50\mu M \xrightarrow[3\mu L+27\mu LH_2O]{1/10} \cdots$ <br> $\ldots \rightarrow 5\mu M \xrightarrow[22\mu L+198\mu LH_2O]{1/10} 500nM \xrightarrow[190\mu L+1{,}71mLMcCoy's]{1/10} \mathbf{50nM}$ | |

Finalment deixem les 35 plaques tractades a l'incubador a 37°C durant 24 hores.

## 3 de juliol (dia 8 del cicle)

Avui hem de canviar el medi a totes les plaques per eliminar totes les drogues, tal i com ho vam fer el dia 3 del cicle. Fem el mateix procés que sempre, traiem el medi antic amb les puntes de vidre i el sistema de buit. Li posem el medi nou amb AntiAnti i FBS utilitzant la pipeta.

Finalment deixem que les cèl·lules es recuperin i s'alimentin del medi nou durant 72h a l'incubador a 37°C.

*Figura 7-14 Pot d'1L de McCoy's*

## 4 de juliol (dia 9 del cicle)

Tornem a fer dia de descans on no es farà cap acció sobre les cèl·lules per deixar-les que s'alimentin i creixin en el nou medi.

## 5 de juliol (dia 10 del cicle)

2n dia de descans del 2n tractament.

## 6 de juliol (dia 11 del cicle)

Avui havíem de fer el mateix procés que el dia 1 de juliol (dia 6 del cicle) És el procés de re-sembrar les 35 plaques amb 12.000.000 de cèl·lules cadascuna i enviar les plaques amb condicions repetides al FACS.

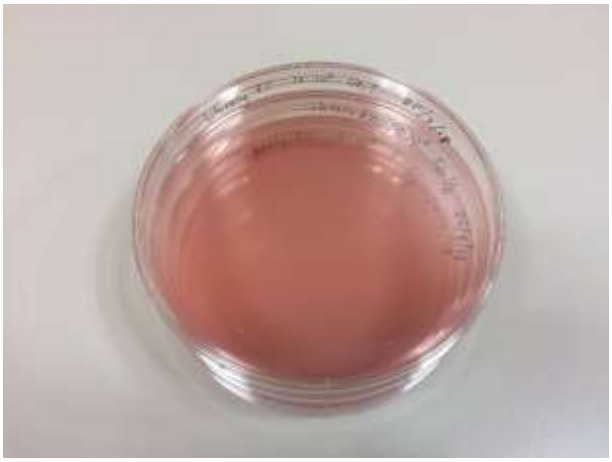


*Figura 7-15 Plaques de petri de 15cm amb cèl·lules i medi*

Hem anat a la sala de cultius. El que hem de fer és comptar les cèl·lules vives d'una placa de cada condició (21 de diferents), amb la càmera de Neubauer i el TrypanBlue, per saber la mortalitat i poder calcular quantes cèl·lules necessitem agafar per sembrar la quantitat correcte i poder continuar l'experiment.

Per altra banda, les plaques repetides es tenyiran amb DiOC i DAPI per després portar-les a FACS.

Després de comptar tenim la següent taula mortalitat del tractament 2:

| Dilució | Tractament | Infecció | Mortalitat (%) |
|---|---|---|---|
| 1/48 | FUOX | Sense infectar | 47 |
| | | 1.5% infectat | 55 |
| | | 8% infectat | 52 |
| | FUIRI | Sense infectar | 38 |
| | | 1% infectat | 36 |
| | | 8% infectat | 57 |
| 1/75 | FUOX | Sense infectar | 35 |
| | | 1% infectat | 22 |
| | | 8% infectat | 37 |
| | FUIRI | Sense infectar | 26 |
| | | 1% infectat | 24 |
| | | 8% infectat | 36 |
| 1/100 | FUOX | Sense infectar | 22 |
| | | 1% infectat | 0 |
| | | 8% infectat | 26 |
| | FUIRI | Sense infectar | 7 |
| | | 1% infectat | 6 |
| | | 8% infectat | 30 |

**Hem vist que havien mort molta quantitat de cèl·lules.**

Malauradament, a les plaques de 1/48 i 1/75 tant de FUOX com FUIRI, hi havia una proporció de cèl·lules mortes massa gran. Per aquesta raó, les hem hagut de llençar i retirar de l'experiment perquè la setmana que ve haurien mort totes i aquest no és l'objectiu d'aquest experiment, sinó aconseguir una mortalitat final de només el 20% de cèl·lules.

Davant d'aquesta incidència inesperada, es decideix canviar la dilució de la droga i així aconseguir menys mortalitat. Les decisions són:

1) Continuar l'experiment només amb les dilucions de drogues menys agressives, d'1/100 i d'una nova dilució, 1/150.
2) Ressembrar les plaques amb dissolució 1/100 en 3 plaques diferents. Una anirà a FACS, una altra es tractarà amb dilució 1/100 un altre cop i l'altra es tractarà amb dilució 1/150 perquè així serà menys agressiu i ens moriran menys cèl·lules.

Aleshores hem repartit totes les cèl·lules en diferents plaques de 15cm de diàmetre i ens hem quedat amb:

- 5 plaques 1/100 FUOX → 15 plaques amb 10-12 milions de cèl·lules
- 5 plaques 1/100 FUIRI → 15 plaques amb 10-12 milions de cèl·lules
- 5 plaques sense tractament → 5 plaques amb 10-12 milions de cèl·lules

Si seguim el calendari marcat, demà els hi tocaria tractament de FUOX i FUIRI, però com que s'han mort tantes cèl·lules. A partir d'ara les deixarem 2 dies més per a que es recuperin alimentant-se bé del medi i per a que s'enganxin bé a la placa.

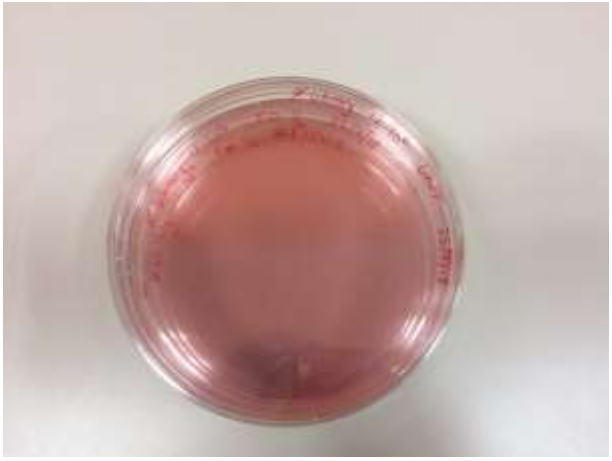


*Figura 7-16 Plaques de petri de 15cm amb cèl·lules i medi*

Això vol dir que amb aquesta modificació l'experiment s'allargarà de 21 a 25 dies.

Per altra banda, hem separat les plaques de cèl·lules que s'havien de portar al citòmetre. Els hi hem tret el medi amb el sistema de buit i puntes de vidre, les hem netejat amb PBS. A continuació els hi hem posat 5mL de tripsina i les hem deixat 6 minuts a l'incubador. Després les hem tret i amb la pipeta i una punta, hem posat totes les cèl·lules amb la tripsina a un tub Falcon de 50mL. Hem centrifugat els tubs i hem posat cada pellet de cèl·lules en un ependorff diferent. Finalment les hem tenyit amb DiOC i amb DAPI.

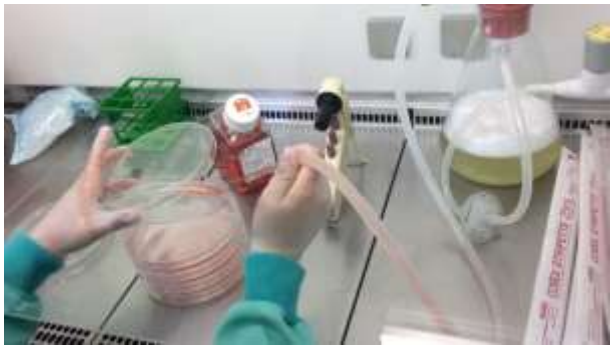


*Figura 7-17 A la campana de cultius. Utilitzant el sistema de buit per treure el medi de les plaques*

Les hem portat al citòmetre.

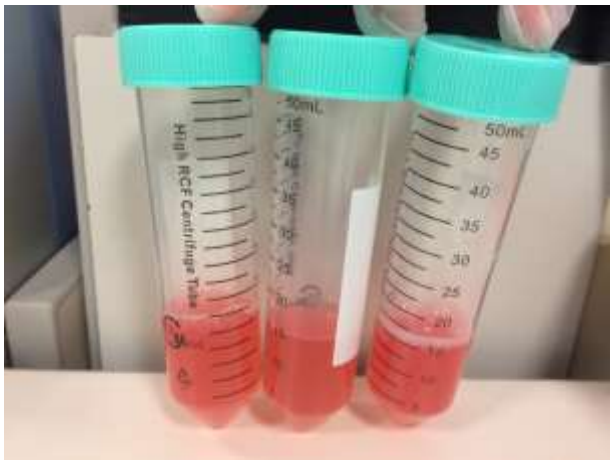



*Figura 7-18 Tubs de 50mL amb cèl·lules i medi.*

Després d'això ens hem trobat amb un nou problema: havíem posat més quantitat de DAPI perquè el dia anterior en vam posar poc, però el resultat és que avui ens hem passat. Les cèl·lules han quedat massa tenyides. Això ha provocat que al citòmetre no es poguessin veure les proporcions de cèl·lules vives i mortes.

## 7 de juliol (dia 12 del cicle)

Incorporem un parell de dies de descans on no es farà cap acció sobre les cèl·lules per permetre la recuperació, l'adhesió i el creixement de les cèl·lules que van sobreviure.

## 8 de juliol (dia 13 del cicle)

Segon dia de descans que hem incorporat per la recuperació de les cèl·lules.

## 9 de juliol (dia 14 del cicle)

Avui toca el tractament de drogues número tres, però tal i com vam decidir el divendres passat, aquest tractament serà menys agressiu, perquè s'estaven morint moltes cèl·lules. Així doncs farem una dilució a 1/100 i a 1/150.

*Figura 7-19 A la campana de cultius. Posant el medi a les plaques amb l'ajuda de la pipeta i el pipet*

Per fer aquest tractament farem el mateix procediment que en els altres dos cops. Aquí hi ha els càlculs:

| | |
|---|---|
| 1/100 ⟶ 130 ml/100 = 13ml «stock» + 117ml McCoy's | |
| Vf = 20ml x 6 plaques = 120ml ⟶ 130ml | |
| 1/150 ⟶ 70 ml/150 = 467µl «stock» + 69,533ml McCoy's | |
| Vf = 20ml x 3 plaques = 60ml ⟶ 70ml | |

**200ml**

Solucions mare:

| | | |
|---|---|---|
| 5-FU | 38,44µM · Vi = 10µM · 14,5 | ➔ Vi = 3,772ml |
| OXA | 12,6µM · Vi = 2µM · 14,5 | ➔ Vi = 2,302ml |
| SN-38 | 50nM · Vi = 5,5µM · 14,5 | ➔ Vi = 1,595ml |

**FUOX:** 3,772ml 5-FU + 2,302ml OXA + 8,426ml McCoy's

**FUIRI:** 3,772ml 5-FU + 1,595ml SN-38 + 9,133ml McCoy's

Càlcul drogues:

| **5-FU** | $V_f = 8ml$ |
|---|---|
| $384{,}4mM \xrightarrow[1{,}5\mu L+13{,}5\mu L H_2O]{1/10} 38{,}44mM \xrightarrow[11\mu L+99\mu L H_2O]{1/10} \ldots$ <br> $\ldots \rightarrow 3{,}84mM \xrightarrow[90\mu L+810\mu L H_2O]{1/10} 384{,}4\mu M \xrightarrow[800\mu L+7{,}2\mu L McCoy's]{1/10} \mathbf{38{,}44\mu M}$ | |
| **OXA** | $V_f = 2{,}6ml$ |
| $12{,}6mM \xrightarrow[4\mu L+36\mu L H_2O]{1/10} 1{,}26mM \xrightarrow[30\mu L+270\mu L H_2O]{1/10} \ldots$ <br> $\ldots \rightarrow 126\mu M \xrightarrow[260\mu L+2{,}34\mu L McCoy's]{1/10} \mathbf{12{,}6\mu M}$ | |
| **SN-38** | $V_f = 1{,}9ml$ |
| $5mM \xrightarrow[1\mu L+9\mu L H_2O]{1/10} 500\mu M \xrightarrow[1\mu L+9\mu L H_2O]{1/10} 50\mu M \xrightarrow[3\mu L+27\mu L H_2O]{1/10} \cdots$ <br> $\ldots \rightarrow 5\mu M \xrightarrow[22\mu L+198\mu L H_2O]{1/10} 500nM \xrightarrow[190\mu L+1{,}71mL McCoy's]{1/10} \mathbf{50nM}$ | |

Primer hem fet totes les dilucions a la sala de cultius. Quan hem arribat a la dilució desitjada l'hem incorporada a cada placa corresponent.

*Figura 7-20 Pot d'1L de McCoy's*

Finalment hem deixat totes les plaques a l'incubador de 37ºC durant 24 hores per tal que les drogues actuïn.

## 10 de juliol (dia 15 del cicle)

Avui toca el canvi de medi de totes les plaques per acabar de treure la droga. Utilitzem el sistema de buit i les puntes de vidre per treure el medi antic i posem el medi nou amb FBS i AntiAnti amb l'ajuda de la proveta.

Deixem que les cèl·lules es recuperin a l'incubador de 37°C durant 72 hores.

## 11 de juliol (dia 16 del cicle)

Tornem a fer dia de descans de després de l'inici del 3r tractament on no es farà cap acció sobre les cèl·lules per deixar-les que s'alimentin i creixin en el nou medi.

## 12 de juliol (dia 17 del cicle)

2n dia de descans del 3r tractament.

## 13 de juliol (dia 18 del cicle)

Avui hem de comptar les cèl·lules d'una placa de cada condició, amb la càmera de Neubauer i el TrypanBlue, per veure la viabilitat i calcular quina proporció de cèl·lules hem de sembrar per continuar l'experiment. Les altres plaques, una de cada condició, les haurem de tenyir amb DiOC i DAPI per després portar-les al citòmetre.

Càlculs de comptar les cèl·lules:

| Tractament | Dilució (library) | cèl·lules (càmera NewBauer) | cèl·lules TOTALS (x7,5mlx2,$10^4$) |
|---|---|---|---|
| Sense tractament | 0% | 314 | 47,10x$10^6$ |
| | 1% | 238 | 35,70x$10^6$ |
| | 8% | 275 | 41,25x$10^6$ |
| FUOX 1/100 | 0% | 154 | 23,00x$10^6$ |
| | 1% | 81 | 12,15x$10^6$ |
| | 8% | 125 | 18,75x$10^6$ |
| FUOX 1/150 | 0% | 318 | 47,70x$10^6$ |
| | 1% | 254 | 38,10x$10^6$ |
| | 8% | 279 | 41,85x$10^6$ |
| FUIRI 1/100 | 0% | 83 | 1,66x$10^6$ |
| | 1% | 111 | 16,65x$10^6$ |
| | 8% | 101 | 15,15x$10^6$ |
| FUIRI 1/150 | 0% | 474 | 71,10x$10^6$ |
| | 1% | 330 | 49,50x$10^6$ |
| | 8% | 377 | 56,55x$10^6$ |

En teoria, només hauríem de sembrar una placa de cada condició amb 12 milions de cèl·lules a cada una perquè la setmana que ve ja és l'últim tractament. Però igualment sembrarem 2 plaques de cada condició per si volem provar una concentració diferent de droga. Ho farem així per totes les plaques menys a la condició FUIRI 1/100 sense tractament, hem tingut un petit accident i hem perdut part de la mostra, només ens queden cèl·lules per poder sembrar una placa.

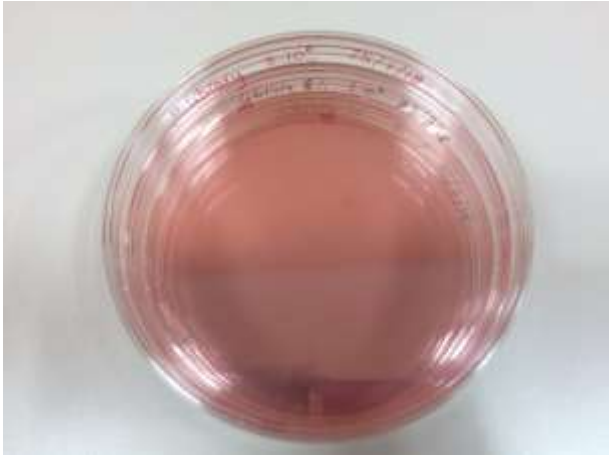


*Figura 7-21 Plaques de petri de 15cm amb cèl·lules i medi*

A més a més, sembrarem una placa de manteniment per cada condició amb 1,5 milions de cèl·lules per fer un altre petit experiment la setmana que ve.

Càlculs de quantes cèl·lules hem de sembrar:

| Tractament | Dilució (library) | Cèl·lules + medi |
|---|---|---|
| Sense tractament | 0% | 3,82mL + 36,18mLMcCoy's |
| | 1% | 5,04mL + 34,958mLMcCoy's |
| | 8% | 4,36mL + 35,64mLMcCoy's |
| FUOX 1/100 | 0% | sembrem totes les cèl·lules |
| | 1% | |
| | 8% | |
| FUOX 1/150 | 0% | 3,77mL + 36,23mLMcCoy's |
| | 1% | 4,72mL + 35,28mLMcCoy's |
| | 8% | 4,3mL + 35,7mLMcCoy's |
| FUIRI 1/100 | 0% | sembrem totes les cèl·lules |
| | 1% | |
| | 8% | |
| FUIRI 1/150 | 0% | 2,532mL + 37,468mLMcCoy's |
| | 1% | 3,636mL + 36,364mLMcCoy's |
| | 8% | 3,183mL + 36,817mLMcCoy's |

Percentatges de mortalitat:

| Dilució | Tractament | Infecció | Mortalitat (%) |
|---|---|---|---|
| 1/100 | FUOX | Sense infectar | 49 |
| | | 1% infectat | 34 |
| | | 8% infectat | 45 |
| | FUIRI | Sense infectar | --- |
| | | 1% infectat | 47 |
| | | 8% infectat | 37 |
| 1/150 | FUOX | Sense infectar | 100 |
| | | 1% infectat | |
| | | 8% infectat | |

| Dilució | Tractament | Infecció | Mortalitat (%) |
|---|---|---|---|
| | FUIRI | Sense infectar | |
| | | 1% infectat | |
| | | 8% infectat | |

Les plaques sembrades de nou les deixarem amb medi nou a l'incubador de 37ºC durant 72 hores perquè s'enganxin bé a la placa.

Per altra banda, les plaques que han d'anar a FACS, els hi hem posat 5mL de tripsina a cada placa amb una pipeta i hem deixat les plaques a l'incubador 6 minuts perquè la tripsina faci la seva funció.

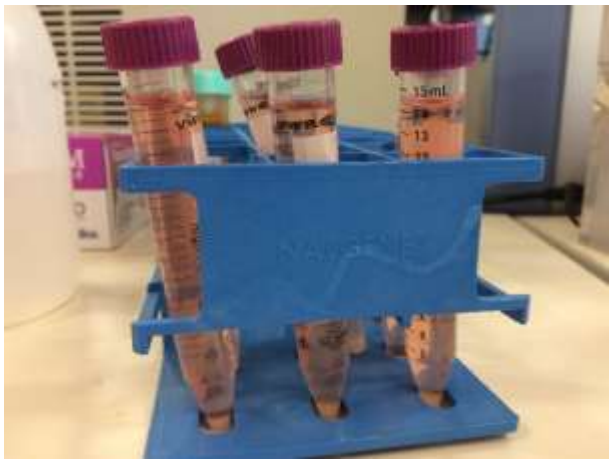


*Figura 7-22 Tubs de 15mL amb cèl·lules i medi*

Quan les cèl·lules ja estan desenganxades de la placa, podem agafar-les amb la pipeta i una punta i les posem amb tubs Falcon de 50mL. Hi posem medi a cada tub i els centrifuguem perquè totes les cèl·lules quedin concentrades a baix. Després amb una punta i el sistema de buit, agafem tot el medi i ens quedem només amb el pellet, on trobem les cèl·lules vives i mortes.

Seguidament amb una punta i una pipeta passem tot aquest pellet a un ependorff i allà els tenyim amb DiOC i DAPI.

Finalment ho portem al citòmetre i haurem d'esperar als resultats.

## 14 de juliol (dia 19 del cicle)

Tornem a incorporar un parell de dies de descans on no es farà cap acció sobre les cèl·lules per permetre la recuperació, l'adhesió i el creixement de les cèl·lules que van sobreviure.

## 15 de juliol (dia 20 del cicle)

2n dia de descans que hem incorporat per la recuperació de les cèl·lules.

## 16 de juliol (dia 21 del cicle)

Avui toca tractar les cèl·lules amb les drogues. És el 4t i últim tractament amb drogues. Primer hem fet els càlculs i després hem anat a cultius cel·lulars.

Aquí hem fet les dissolucions de les drogues:

Per fer el tractament farem el mateix procediment que en els altres dos cops. Aquí hi ha els càlculs:

| | |
|---|---|
| 1/100 ⟶ 125 ml/100 = 1,25ml «stock» + 123,75ml McCoy's | |
| Vf = 20ml x 6 plaques = 120ml ⟶ 125ml | |
| 1/150 ⟶ 125 ml/150 = 833µl «stock» + 124,16ml McCoy's | |
| Vf = 20ml x 6 plaques = 120ml ⟶ 125ml | |

**250ml**

Solucions mare → Vf: 2,5ml

| | | |
|---|---|---|
| 5-FU | 38,44µM · Vi = 10µM · 2,5 | → Vi = 650µl |
| OXA | 12,6µM · Vi = 2µM · 2,5 | → Vi = 397µl |
| SN-38 | 50nM · Vi = 5,5µM · 2,5 | → Vi = 275µl |

**FUOX:** 650µl 5-FU + 397µl OXA + 1,453ml McCoy's

**FUIRI:** 650µl 5-FU + 275µl SN-38 + 1,575ml McCoy's

Això ens servirà per saber quin volum final necessitarem. En el cas del 5-FU en necessitem el doble.

Sempre posem una mica més del volum final per si hi hagués algun error de pipeteig.

A continuació calculem la dilució de les drogues i ho fem a la sala de cultius:

| | |
|---|---|
| **5-FU** | $V_f = 1{,}5ml$ |
| $384{,}4mM \xrightarrow[1\mu L+9\mu L H_2O]{1/10} 38{,}44mM \xrightarrow[3\mu L+27\mu L H_2O]{1/10} \dots$ <br> $\dots \rightarrow 3{,}84mM \xrightarrow[20\mu L+180\mu L H_2O]{1/10} 384{,}4\mu M \xrightarrow[150\mu L+1{,}35\mu L McCoy's]{1/10} \mathbf{38,44\mu M}$ | |
| **OXA** | $V_f = 600\mu l$ |
| $12{,}6mM \xrightarrow[1\mu L+9\mu L H_2O]{1/10} 1{,}26mM \xrightarrow[8\mu L+72\mu L H_2O]{1/10} \dots$ <br> $\dots \rightarrow 126\mu M \xrightarrow[60\mu L+540\mu L McCoy's]{1/10} \mathbf{12,6\mu M}$ | |
| **SN-38** | $V_f = 500\mu l$ |
| $5mM \xrightarrow[1\mu L+9\mu L H_2O]{1/10} 500\mu M \xrightarrow[1\mu L+9\mu L H_2O]{1/10} 50\mu M \xrightarrow[1{,}5\mu L+13{,}5\mu L H_2O]{1/10} \cdots$ <br> $\dots \rightarrow 5\mu M \xrightarrow[7\mu L+63\mu L H_2O]{1/10} 500nM \xrightarrow[50\mu L+450mL McCoy's]{1/10} \mathbf{50nM}$ | |

A cada placa li traiem el medi que tenia amb el sistema de buit i hi posem el medi nou amb la droga.

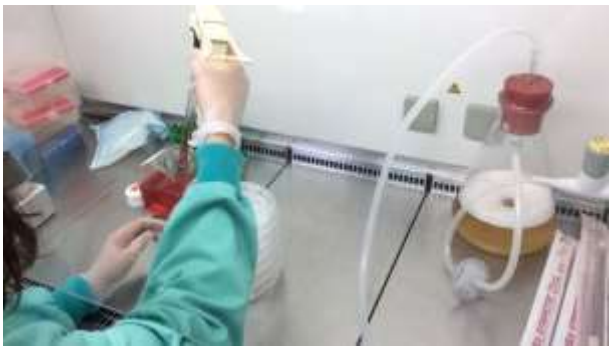


*Figura 7-23 Treballant a la campana de la sala de cultius*

Això ho fem a cada placa menys les que són sense llibreria.

Finalment deixem les plaques incubant a 37°C durant 24 hores.

## 17 de juliol (dia 22 del cicle)

Avui toca fer canvi de medi.

Agafem les plaques diferents que tenim i el que hem de fer és treure'ls-hi el medi que hi ha amb el sistema de buit i posar-hi medi nou preparat amb AntiAnti i FBS. A cada placa li posem 20mL.

Ho deixem incubant a 37°C durant 24 hores.

## 18 de juliol (dia 23 del cicle)

Tornem a fer dia de descans de després del inici del 4t tractament on no es farà cap acció sobre les cèl·lules per deixar-les que s'alimentin i creixin en el nou medi.

Com vam decidir el dia 13/7/2018, avui començarem l'altre petit experiment, l'anomenarem **XTT**.

En farem dos:

- **96** → Abans de començar l'experiment, vam calcular quin era l'indicador per mesurar l'eficàcia de les tres drogues que faríem servir (5-FU, l'OXA i el SN-38), anomenat IC50. Farem aquest experiment per veure si aquesta IC50 ha variat o no perquè ens hem trobat generalment amb molta mortalitat en l'experiment.

- **6** → En aquest experiment volem saber si la mida de la placa en la que treballem amb les cèl·lules influeix en els resultats o no. Durant l'experiment general vam estar treballant amb plaques de 15cm de diàmetre, ara volem veure com es comporten les cèl·lules amb les mateixes condicions però amb plaques de 6cm de diàmetre. Ho farem durant una setmana.

*Figura 7-24 3 plaques sense infectar + 3 plaques infectades a l'1%*

(Aquest experiment es va començar a fer en el període que vaig estar al laboratori, però es finalitzava molt més tard i no disposo de resultats)

*Figura 7-25 3 plaques infectades al 8%*

Avui comencem l'experiment 96. Farem servir unes plaques petites que tenen 96 pous. Agafarem 3 plaques i posarem, a la primera, cèl·lules no infectades amb llibreria *shRNA*, a la segona cèl·lules infectades amb llibreria a l'1% i a la tercera cèl·lules infectades al 8%. Una condició per cada placa.

Anem a la sala de cultius i agafem de l'incubador 3 plaques sembrades de manteniment sense tractar, una sense llibreria (Ø), una de l'1% i una del 8%.

Els hem tret el medi, ho hem netejat amb PBS, els hem posat tripsina i les hem deixat 6 minuts incubant. Després hem aixecat les cèl·lules de la placa amb la pipeta i les hem posat a un medi nou en un Falcon de 15ml. Al posar-les en el medi, la tripsina deixa d'actuar.

A continuació hem repartit 1500 cèl·lules/pou en 3 plaques de 96 pous (nosaltres en farem servir 64).

A cada pou hi posem 100µL.

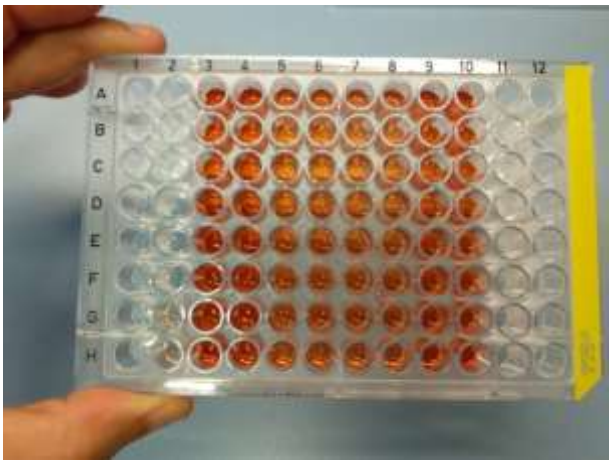


*Figura 7-26 Placa del tractament de 96*

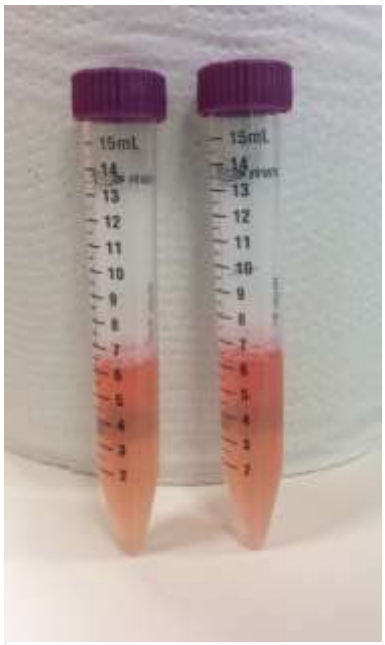


*Figura 7-27 Tub de 15mL amb cèl·lules i medi*

La placa de 96 (figura superior) la modelem en el següent esquema:

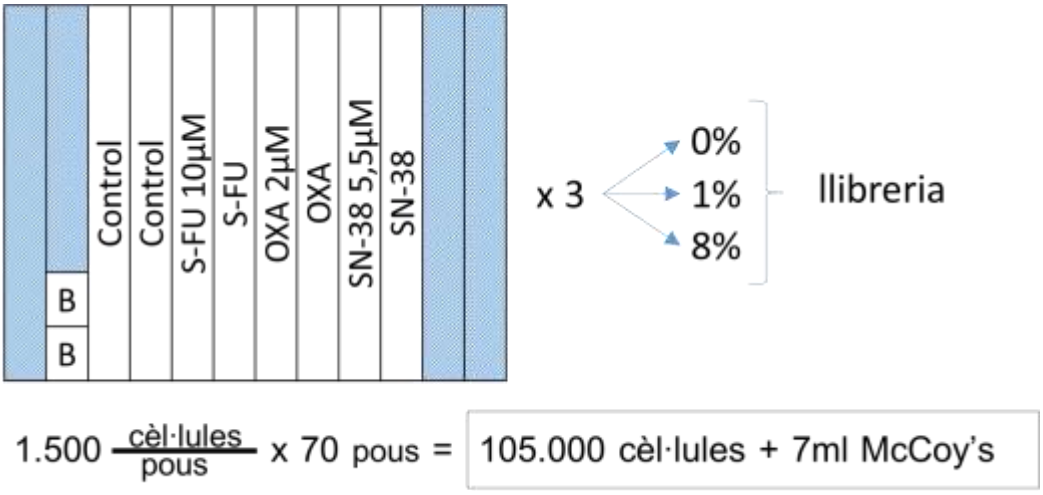



*Figura 7-28 Esquema de la la placa de tractament 96*

| | | | |
|---|---|---|---|
| 0% | 266 cèl·lules x 8ml x $2.10^4$ = $42,5.10^6$ cèl·lules | → | 20µl |
| 1% | 180 cèl·lules x 8ml x $2.10^4$ = $28,8.10^6$ cèl·lules | → | 29µl |
| 8% | 205 cèl·lules x 8ml x $2.10^4$ = $32,8.10^6$ cèl·lules | → | 26µl |

Per cada condició, sembrem dues plaques de 15cm de manteniment extra amb $3{\cdot}10^6$ cèl·lules a cadascuna.

Posem cada condició al pou indicat amb la pipeta i una punta de 100µL i marquem totes les plaques.

Finalment deixem les noves plaques incubant a 37ºC.

## 19 de juliol (dia 24 del cicle)

2n dia de descans del 4t tractament del cicle.

Avui hem de continuar amb l'experiment XTT de 96. Primer hem anat a cultius per fer el tractament de les 3 plaques. Hem seguit el mateix procediment que sempre. Primer fem les dissolucions de la droga en el medi i després posem la quantitat correcte a cada placa.

| | | |
|---|---|---|
| 5-FU | 38,4µM · Vi = 10µM · 5,2ml | → Vi = 1,353ml + 3,847ml McCoy's |
| OXA | 12,6µM · Vi = 2µM · 5,2ml | → Vi = 825ml + 4,375ml McCoy's |
| SN-38 | 50nM · Vi = 5,5µM · 5,2ml | → Vi = 572ml + 4,628ml McCoy's |

Aquest càlculs ens indiquen quants ml necessitem de cada droga per fer el tractament.

| **5-FU** | $V_f = 1{,}6ml$ |
|---|---|
| $384{,}4mM \xrightarrow[1\mu L+9\mu LH_2O]{1/10} 38{,}44mM \xrightarrow[3\mu L+27\mu LH_2O]{1/10} \ldots$ <br> $\ldots \rightarrow 3{,}84mM \xrightarrow[20\mu L+180\mu LH_2O]{1/10} 384{,}4\mu M \xrightarrow[160\mu L+1{,}44\mu LMcCoy's]{1/10} \mathbf{38{,}44\mu M}$ | |
| **OXA** | $V_f = 1ml$ |
| $12{,}6mM \xrightarrow[2\mu L+18\mu LH_2O]{1/10} 1{,}26mM \xrightarrow[15\mu L+135\mu LH_2O]{1/10} \ldots$ <br> $\ldots \rightarrow 126\mu M \xrightarrow[100\mu L+900\mu LMcCoy's]{1/10} \mathbf{12{,}6\mu M}$ | |
| **SN-38** | $V_f = 700\mu l$ |
| $5mM \xrightarrow[1\mu L+9\mu LH_2O]{1/10} 500\mu M \xrightarrow[1\mu L+9\mu LH_2O]{1/10} 50\mu M \xrightarrow[2\mu L+18\mu LH_2O]{1/10} \cdots$ <br> $\ldots \rightarrow 5\mu M \xrightarrow[10\mu L+90\mu LH_2O]{1/10} 500nM \xrightarrow[70\mu L+630mLMcCoy's]{1/10} \mathbf{50nM}$ | |

## 20 de juliol (dia 25 del cicle)

Avui és l'últim dia del cicle.

Anem a cultius i treballem amb totes les plaques per preparar-les i portar-les a FACS. A continuació hi posem 5ml de tripsina, amb una pipeta de 5ml, i les deixem incubant 6 minuts.

Un cop estan desenganxades de la placa, amb una pipeta i una punta de d'1mL les anem desenganxant.

*Figura 7-29 Tubs de 15mL amb cèl·lules i medi*

Posem les cèl·lules amb tripsina en un tub on anteriorment hi hem posat més medi nou. Al posar-ho amb el medi, la tripsina deixa d'actuar.

Això ho fem amb cada placa.

Agafem els tubs i els centrifuguem, com que tenim el pellet de cèl·lules a baix amb el sistema de buit i una punta de vidre traiem el medi i ens quedem només amb el pellet de cèl·lules. Amb la pipeta i una punta de 1mL agafem totes les cèl·lules i les posem en un

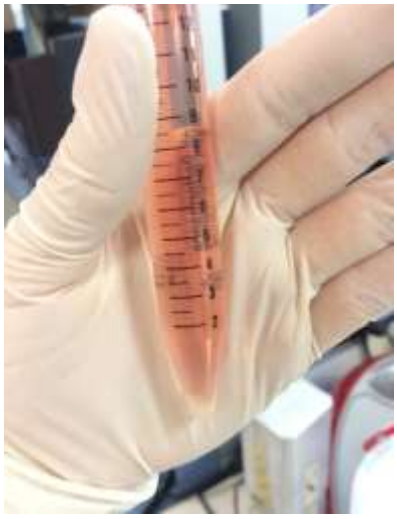


*Figura 7-30 Tub de 15mL amb cèl·lules i medi. Es pot veure que un cop centrifugat, el pellet de cèl·lules queda a baix del tub*

ependorff. Allà les tenyim amb DiOC i DAPI i les portem al citòmetre.

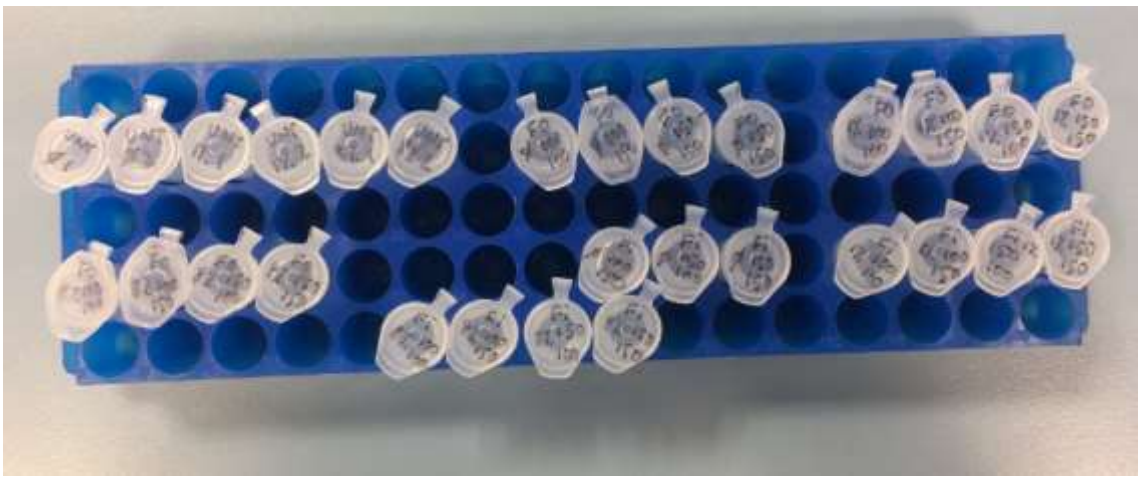


*Figura 7-31 Mostres de cèl·lules que aniran a FACS. Tenyides per DIOC i DAPI*

Ara haurem d'esperar uns dies als resultats.

Avui en l'experiment XTT 96 hem de canviar el medi de les 3 plaques. Ho farem com sempre, però en aquest cas serà més complicat perquè tenim 64 pous per cada placa.

Primer hem de treure el medi de cada pou. Vigilant no tocar cap altre cosa que no sigui el medi perquè sinó haurem de canviar de punta de vidre, i cada cop que canviem de condició també haurem de canviar la punta.

Després posem el medi nou a cada pou amb la pipeta i una punta de 100µL.

*Figura 7-32 Canviant el medi de les plaques de 96*

## 23 de juliol

Avui tenim els resultats de l'experiment XTT 96. Totes haurien de donar pel voltant de 50% de viabilitat.

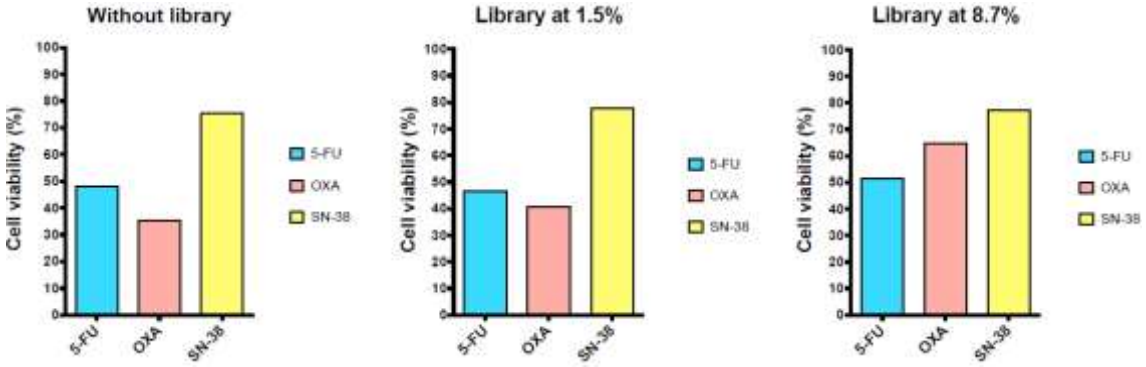



*Figura 7-33 Resultats del XTT 96*

Anàlisi de resultats:

**Ø →** El 5-FU dona molt bé, però l'OXA dona una mica per baix i el SN-38 una mica alt.

Això vol dir que el que s'ajusta més a la $IC_{50}$ prèviament determinada és el 5-FU. En canvi, l'OXA mata a més cèl·lules i el SN-38 en mata a menys.

**1% →** Surt més o menys igual. L'OXA s'acosta al 40% i el SN-38 al 80%.

**8% →** En aquest cas hi ha diferència entre l'OXA, ara dóna aproximadament 65% de viabilitat. El 5-FU dóna 50% i el SN-38 aproximadament el 75% de viabilitat.

Conclusions:

No varia gaire del que es va calcular prèviament en el laboratori i les diferències que hi ha no expliquen la gran quantitat de mortalitat que ens vam trobar a les dilucions 1/48 1/75.

# 8. ANNEX D - Resultats finals citometria → FACS

## Resum dels resultats

Els resultats que han arribat de la unitat de Citometria (FACS) són els següents:

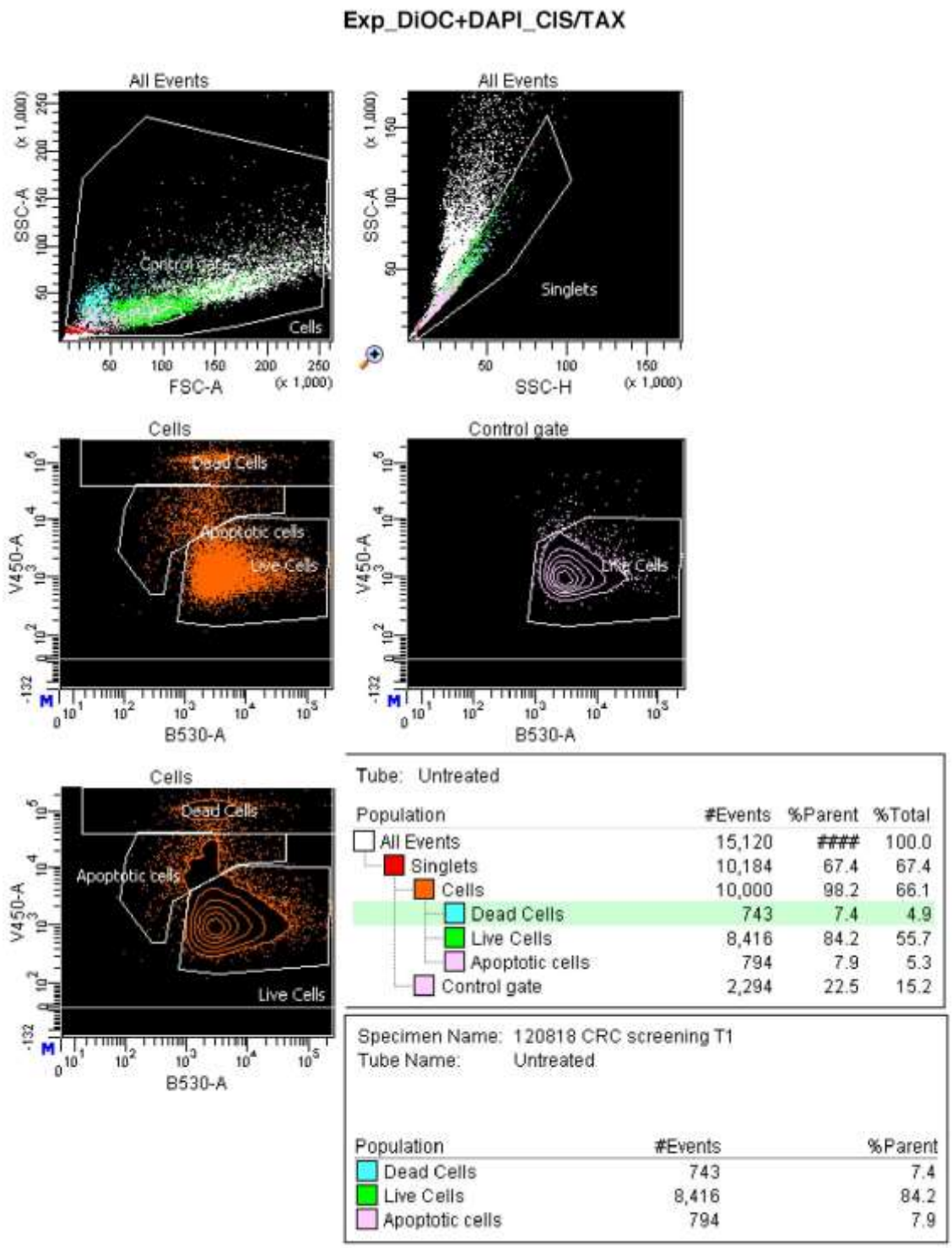



*Figura 8-1 Resultat FACS Sense tractament (T1)*

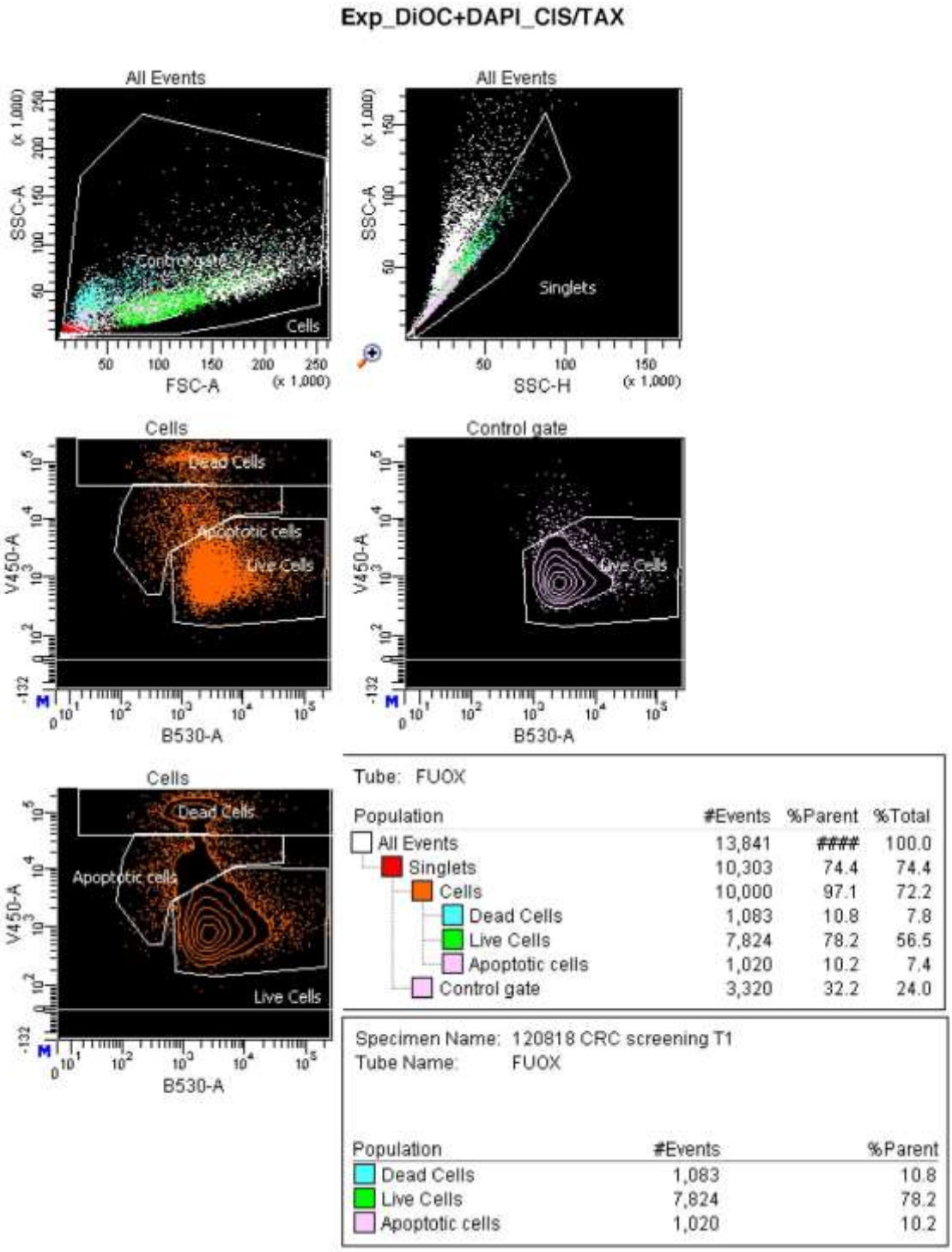



*Figura 8-2 Resultat FACS tractament FUOX (T1)*

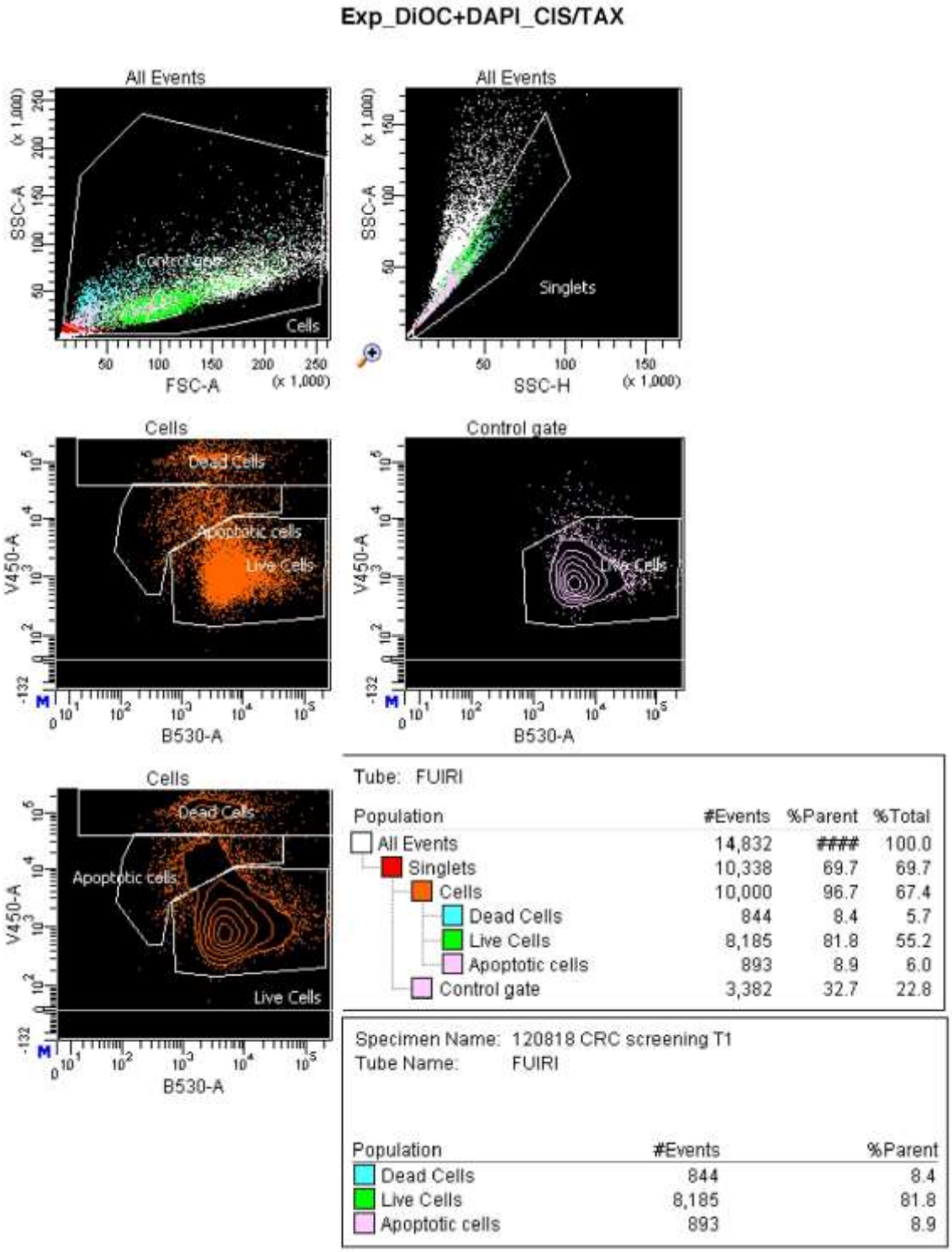



*Figura 8-3 Resultat FACS Tractament FUIRI (T1)*

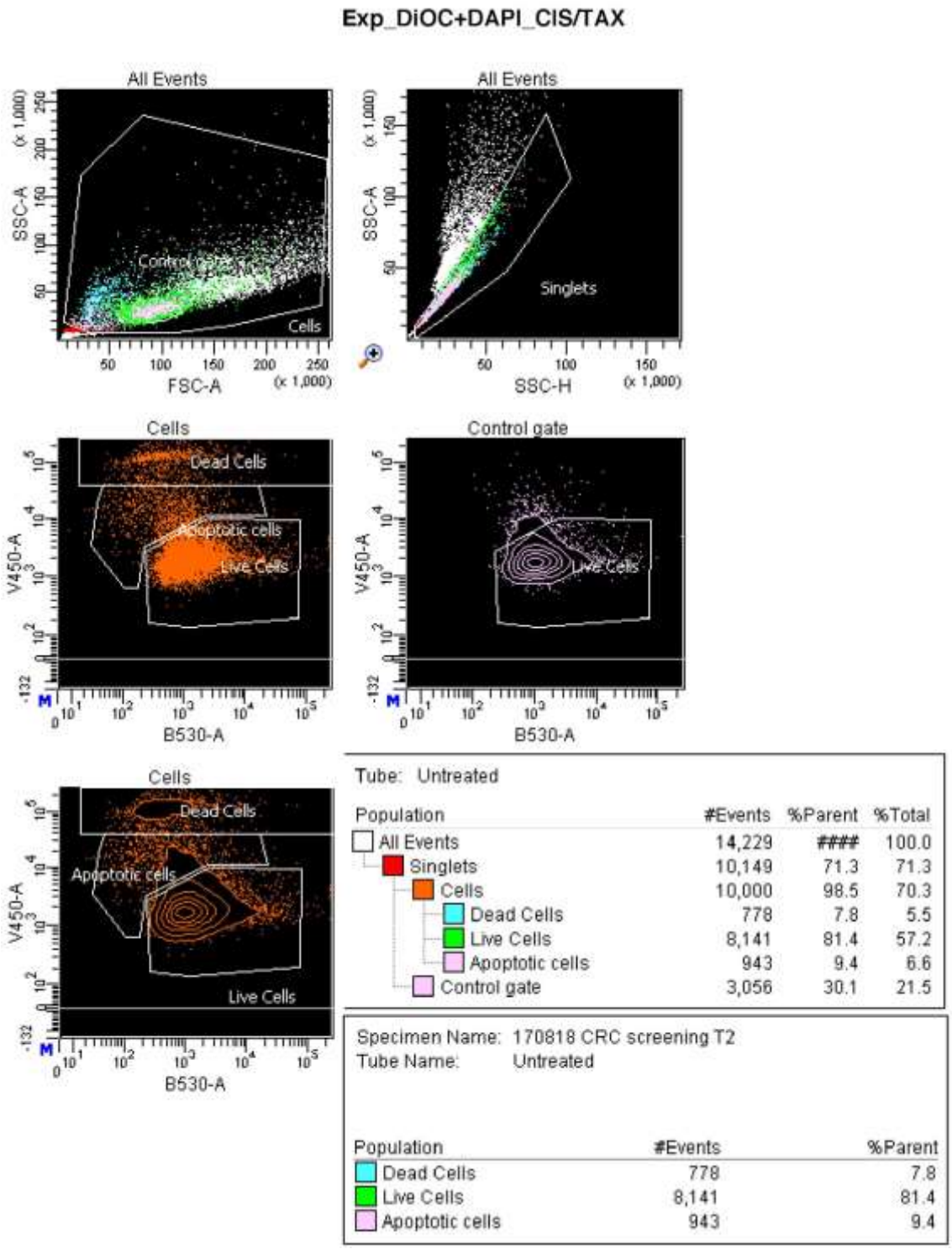



*Figura 8-4 Resultat FACS Sense tractament (T2)*

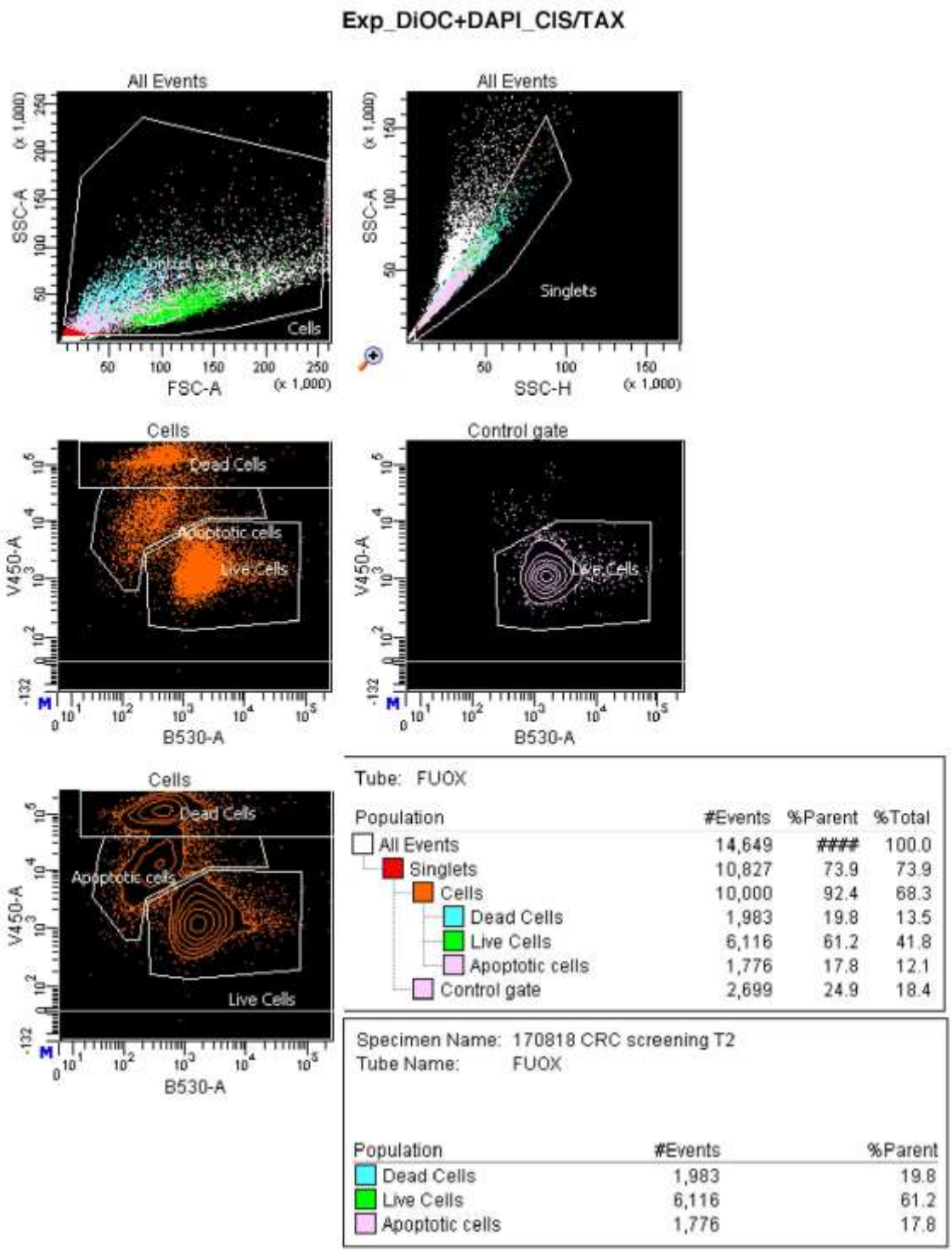



*Figura 8-5 Resultat FACS Tractament FUOX (T2)*

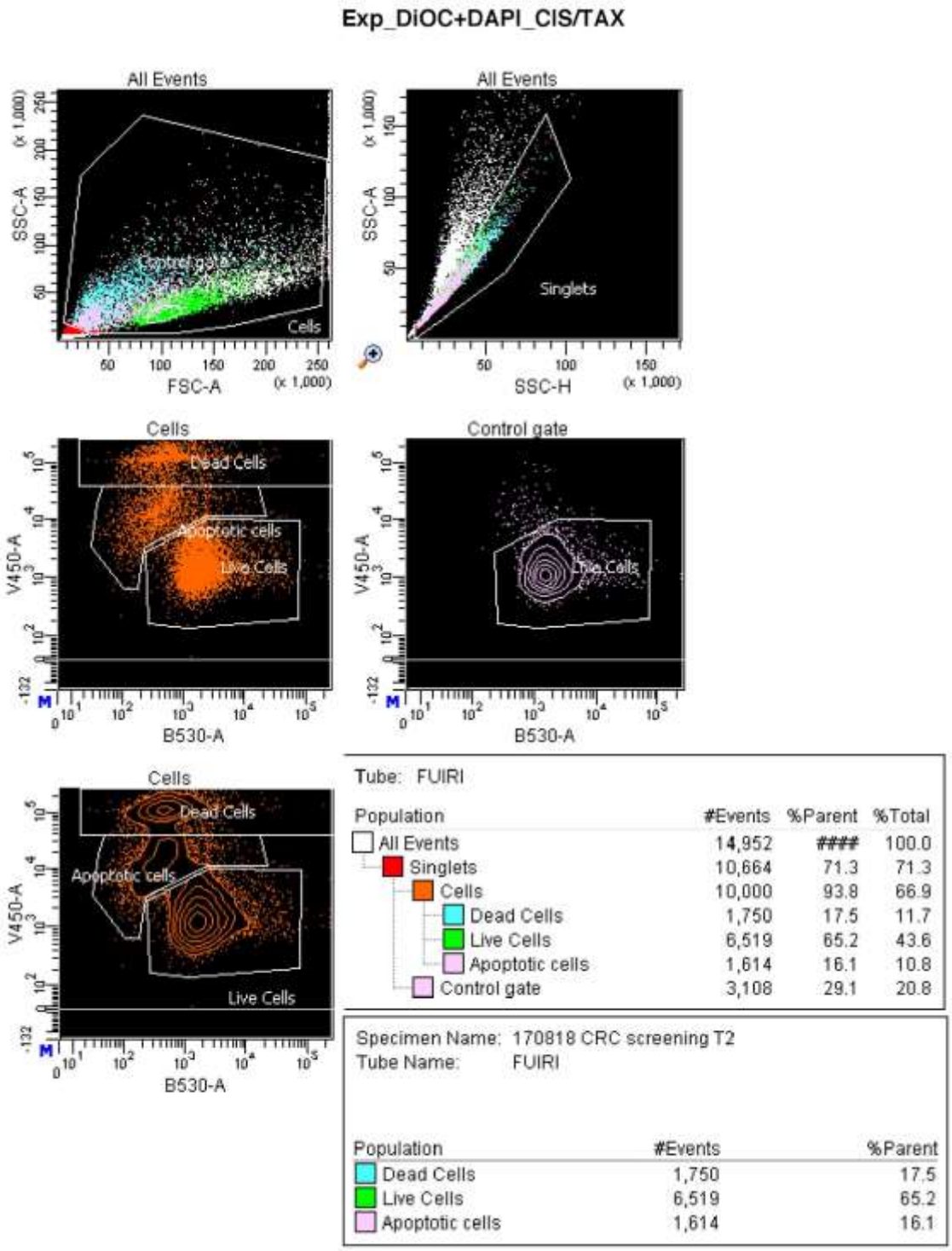



*Figura 8-6 Resultat FACS Tractament FUIRI (T2)*

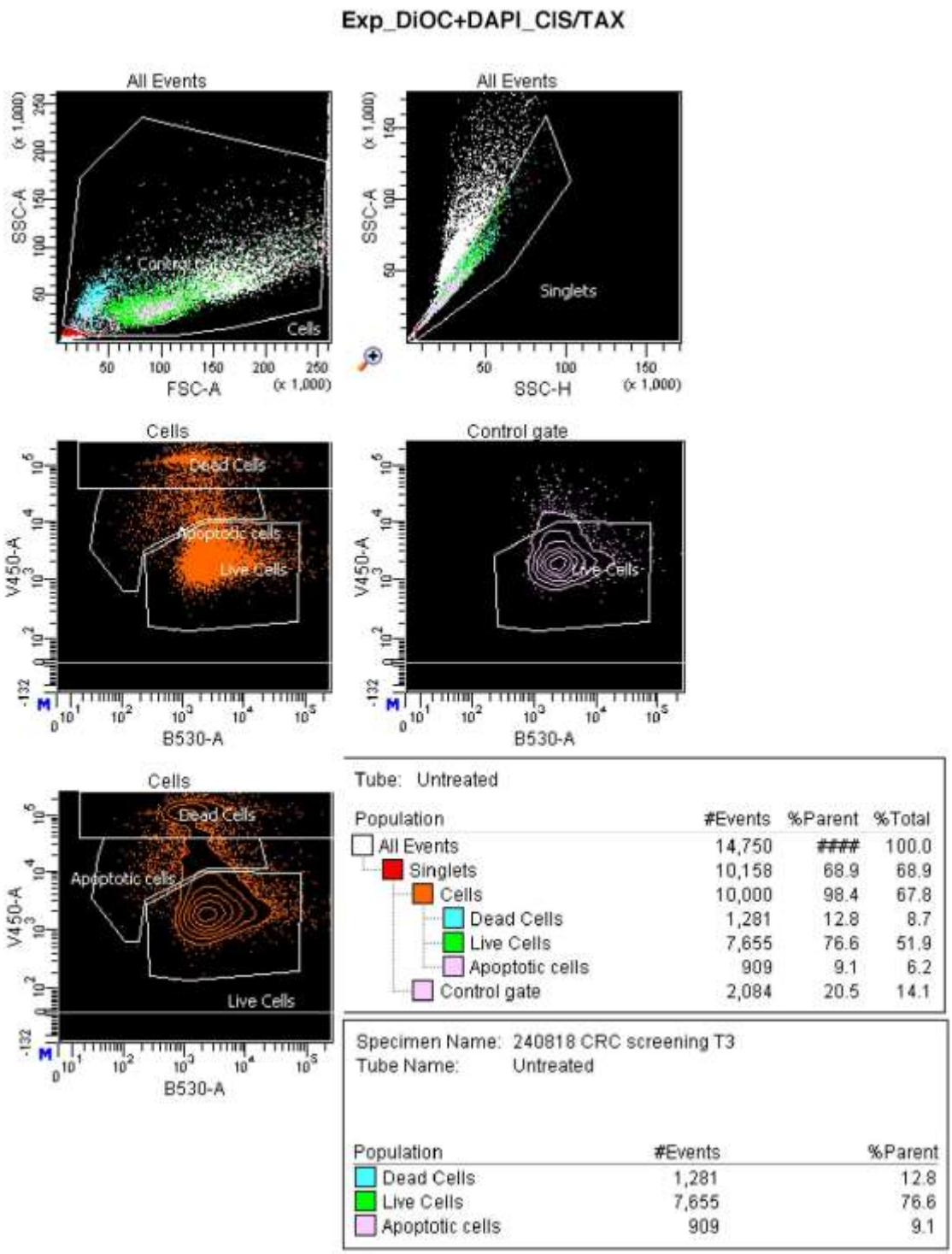



*Figura 8-7 Resultat FACS Sense tractament (T3)*

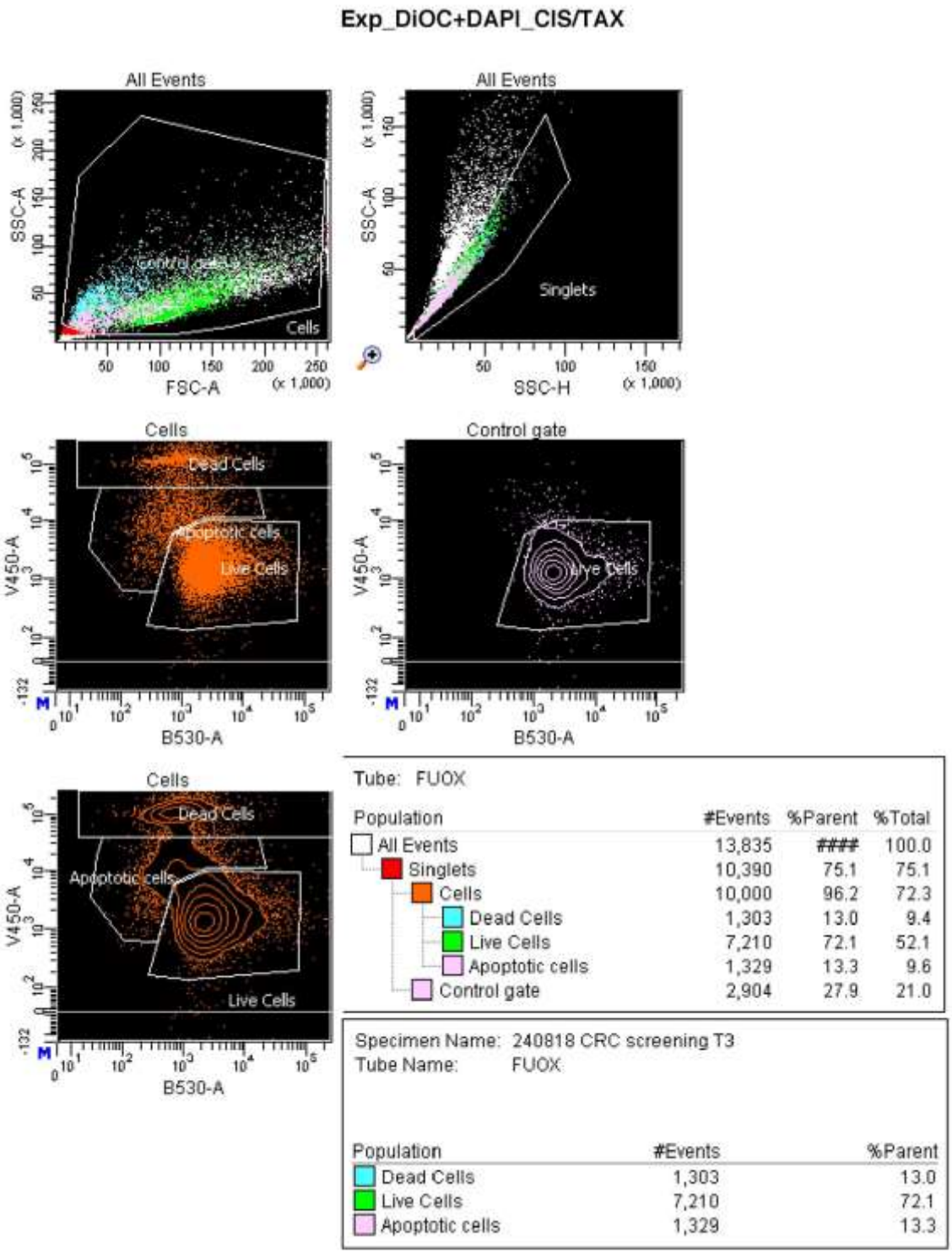



*Figura 8-8 Resultat FACS Tractament FUOX (T3)*

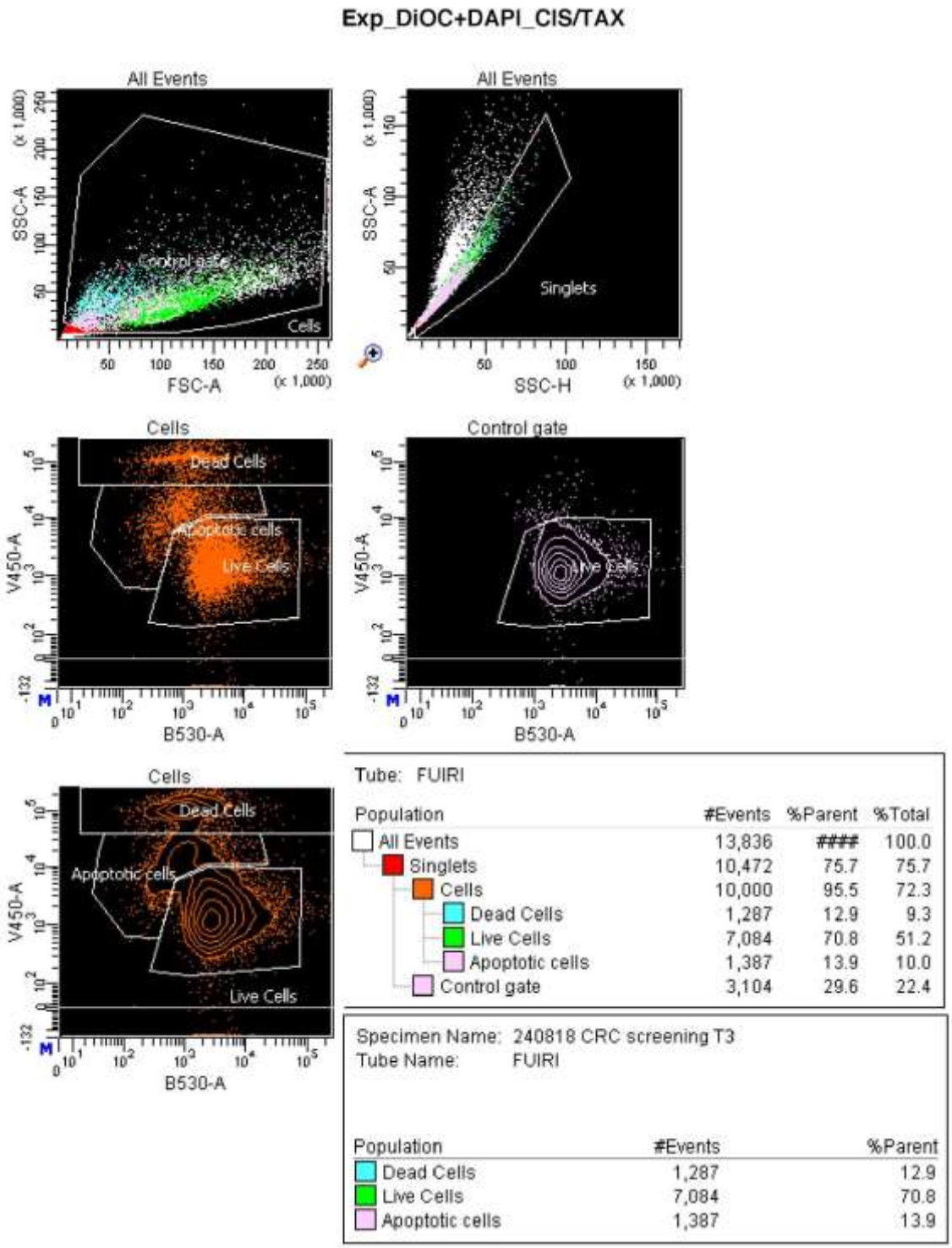



*Figura 8-9 Resultat FACS Tractament FUIRI (T3)*

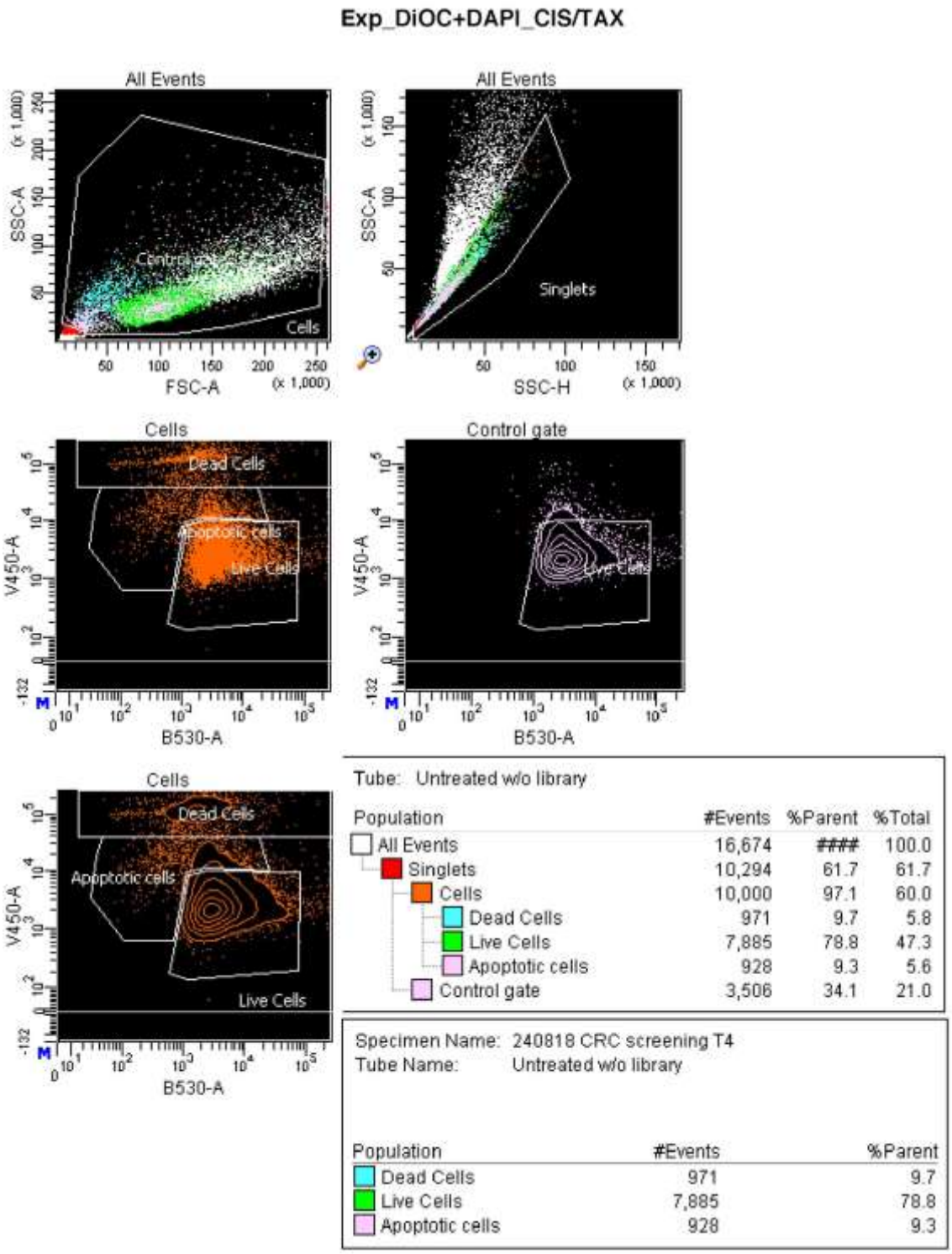



*Figura 8-10 Resultat FACS Sense tractament + sense infecció*

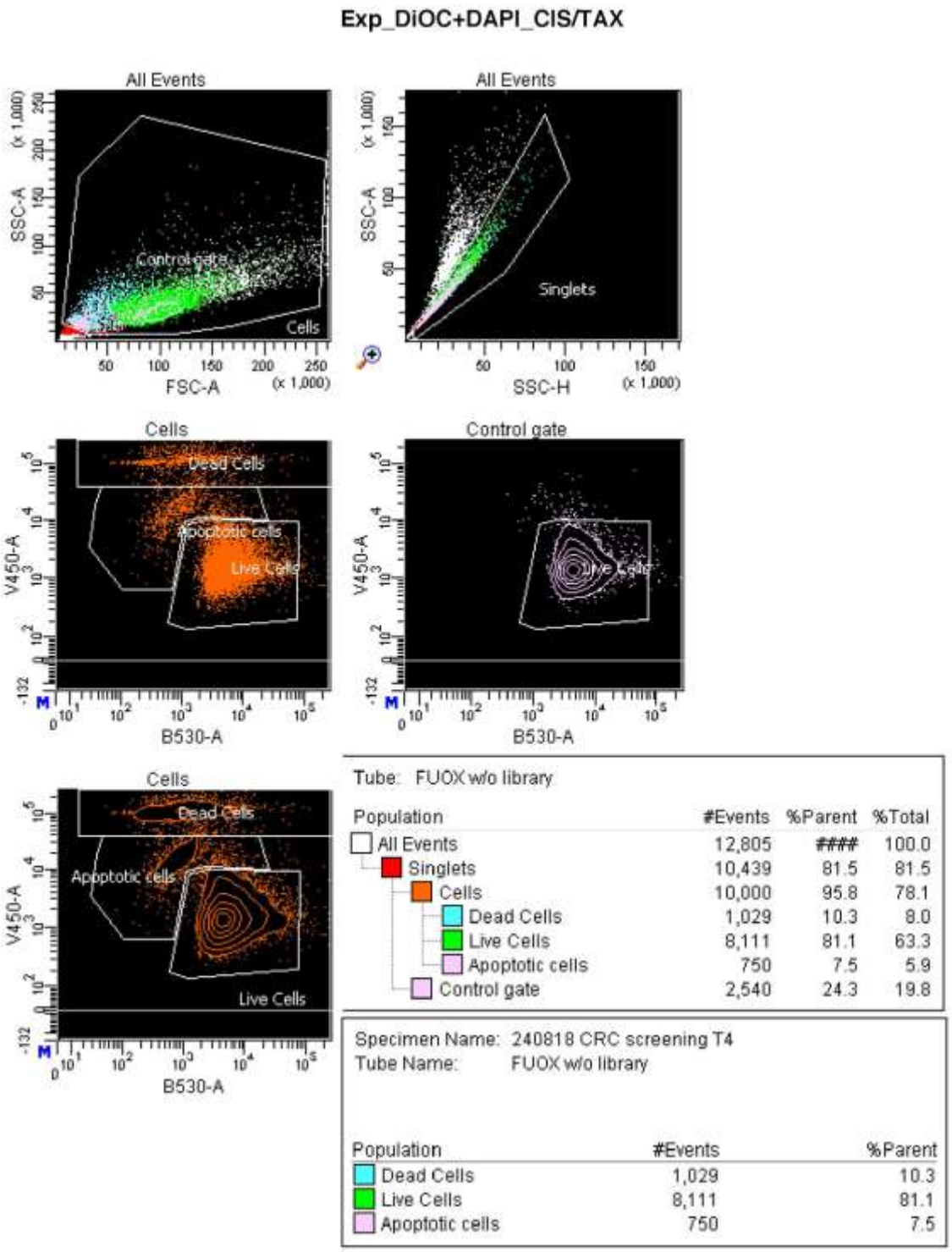



*Figura 8-11 Resultat FACS Tractament FUOX+ sense infecció*

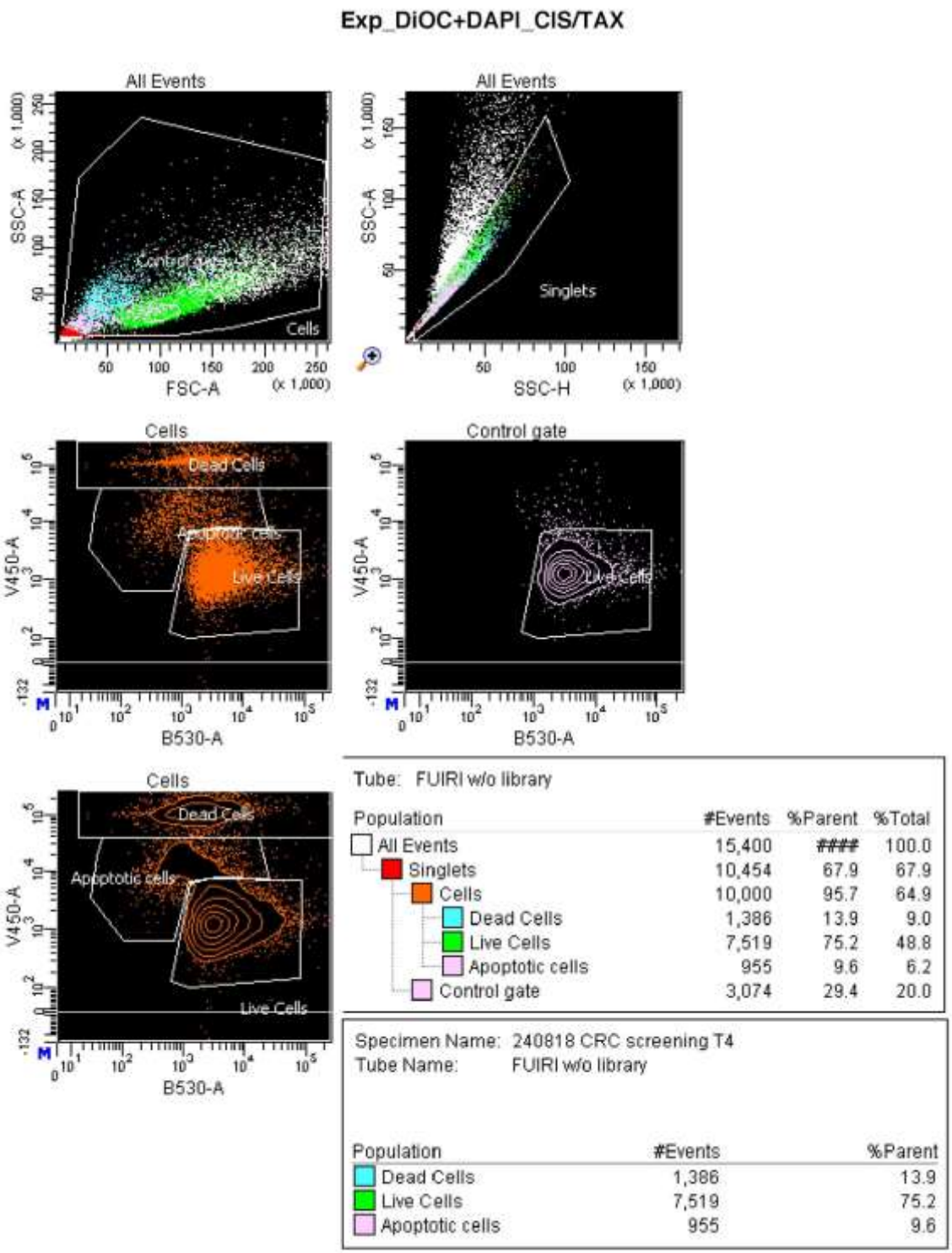



*Figura 8-12 Resultat FACS Tractament FUIRI+ sense infecció*

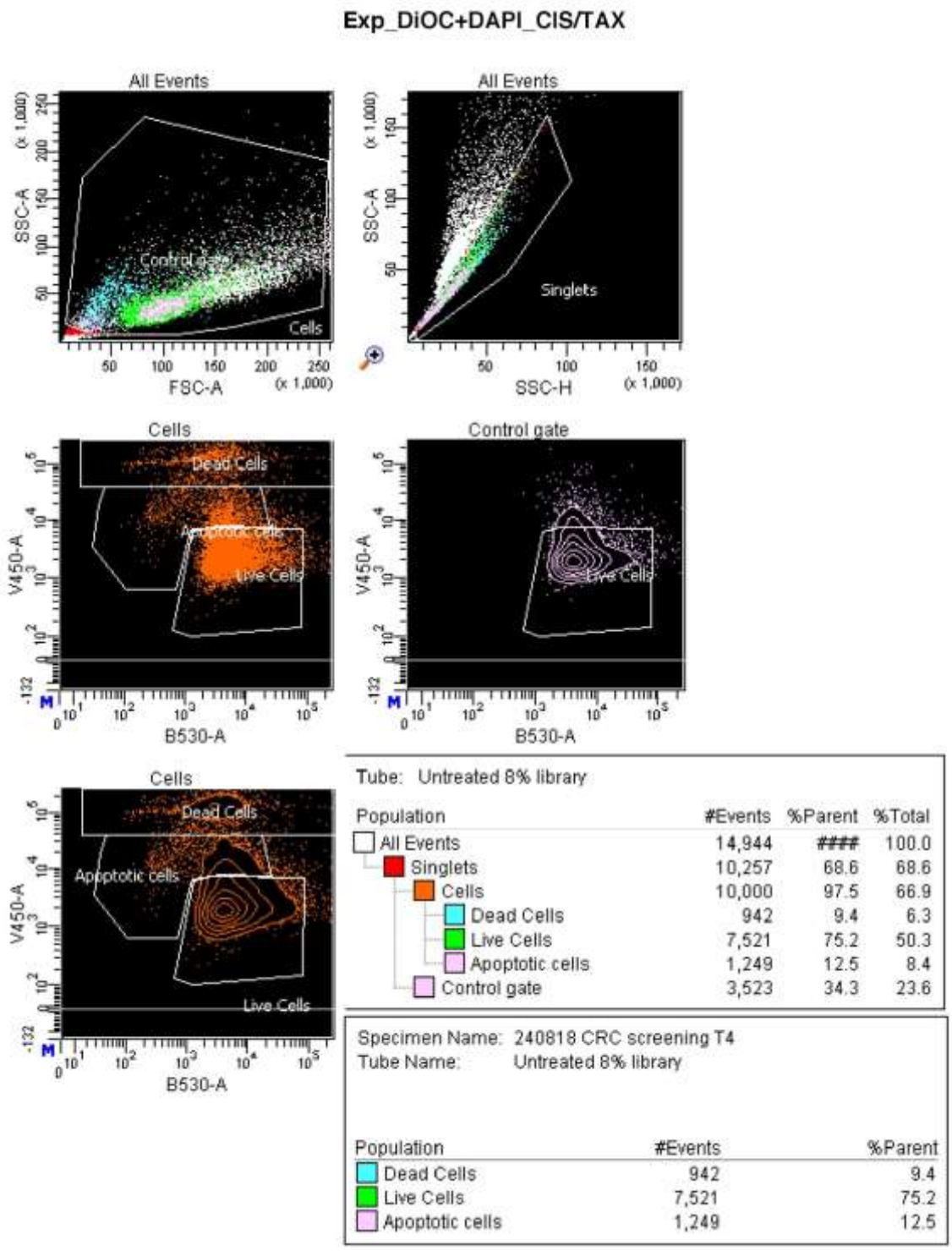



*Figura 8-13 Resultat FACS Sense tractament + infecció 8%*

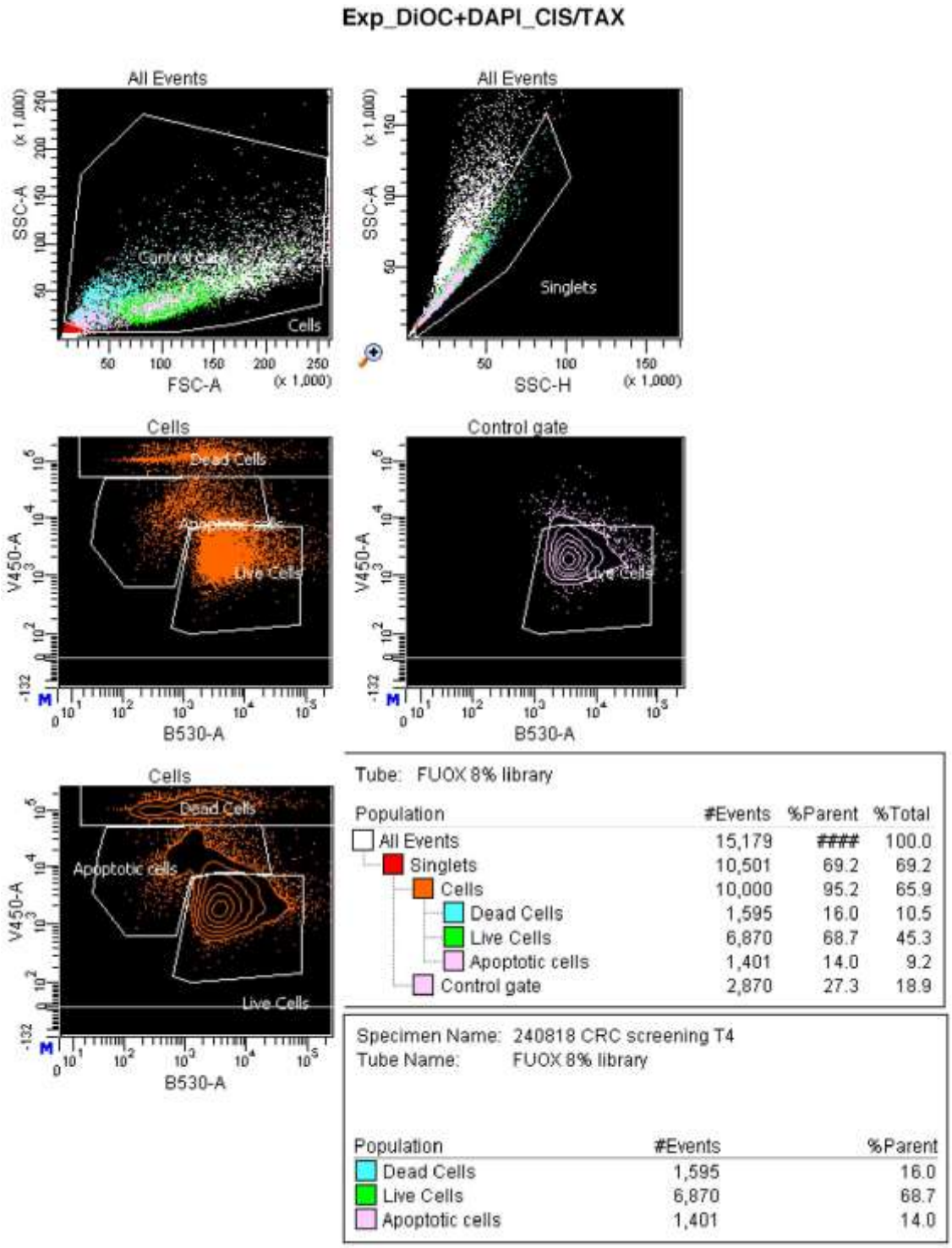



*Figura 8-14 Resultat FACS Tractament FUOX + infecció 8%*

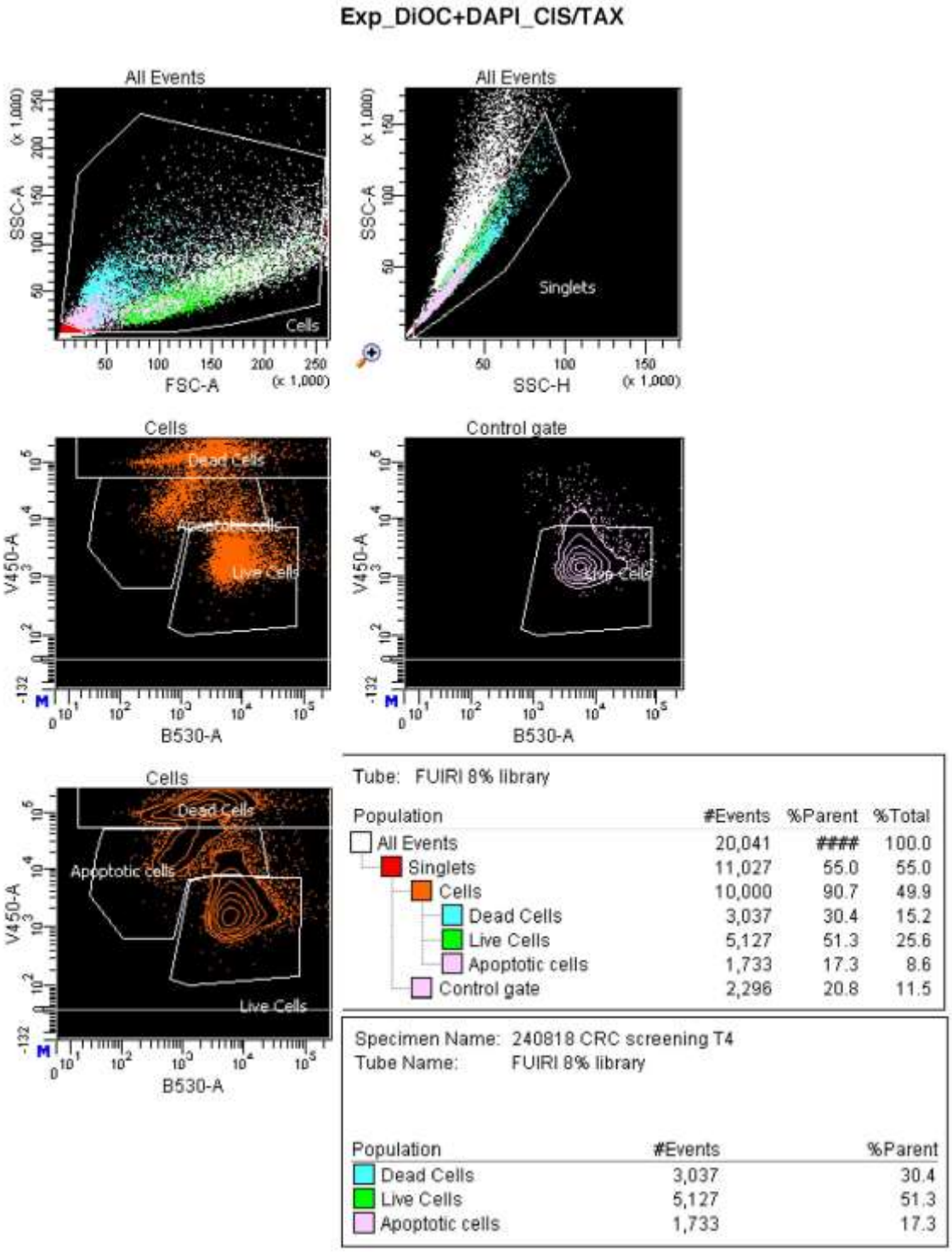



*Figura 8-15 Resultat FACS Tractament FUIRI + infecció 8%*

# 9. Annex G - Bibliografia

## Llibres


- Jimeno y L. Ugedo. (2015). Biologia 1r Batxillerat. Barcelona: Grup Promotor Santillana.


## Articles


- Rodriguez-Barrueco R1, Marshall N & Silva JM. (2013). Pooled *shRNA* Screenings: Experimental Approach (Chapter 21: Gloria H. Su (ed.), Pancreatic Cancer: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 980, DOI 10.1007/978-1-62703-287-2_21, © Springer Science+Business Media, LLC 2013). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23359166>

- Yu J, Putcha P, Califano A & Silva JM. (2013). Pooled *shRNA* Screenings: Computational Analysis (Chapter 22: Gloria H. Su (ed.), Pancreatic Cancer: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 980, DOI 10.1007/978-1-62703-287-2_22, © Springer Science+Business Media, LLC 2013). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23359167>

- Queralt C, Moreta C, Diesch J, Casquero R, Zuber J, Buschbeck M, Forcales SV & Martinez-Balibrea E. (2013). PO-381 Response project: chromatin regulators as biomarkers and *drug targets* in colorectal càncer. <https://esmoopen.bmj.com/content/3/Suppl_2/A171.2>

- Ho L, Crabtree GR. (2010). Chromatin remodelling during development. Nature 463, 474-484. < https://www.nature.com/articles/nature08911>

- Entrevista a Manel Esteller, director del Programa de Epigenética y Biología del Cáncer del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge y profesor de la Universidad de Barcelona. (2015). Epigenética. Revista 3. Sense ciència (Revista de la Universitat de Barcelona sobre salut i benestar). <http://www.ub.edu/senesciencia/noticia/epigenetica>

## Webs


- Identificar una diana terapéutica (Desarrollo de Medicamentos III). (05/08/2018). Indacea. <http://indacea.org/diana-terapeutica-desarrollo-de-medicamentos-iii/>

- Generalitat de Catalunya. Càncer de còlon i recte. (18/08/2028) <http://cancer.gencat.cat/ca/ciutadans/el_cancer/cancer_de_colon_i_recte/>

- Wikipedia. Miniprep. (10/09/2028) <https://es.wikipedia.org/wiki/Miniprep>

- Yahoo respuestas. Que es el Ic50?. (14/10/2018) <https://es.answers.yahoo.com/question/index?qid=20080215205346AA90ExX>

- Google imatges. Càncer de colon. (17/09/2018) <https://www.google.es/search?q=CANCER+DE+COLON&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjo9IrS-6zeAhWkxYUKHZNNCOcQ_AUIDigB&biw=1366&bih=626>

- Naturalsom - Un bloc de ciències naturals per la secundària. Genètica. (15/10/2018) <http://blocs.xtec.cat/naturalsom/3r-eso/7-genetica/>

- Cuidem Salut. L'anus. (15/10/2018) <http://blocs.xtec.cat/cuinemsalut/2015/02/01/anus/>

- Khan Academy. Electroforesis en gel. (18/09/2018) <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/gel-electrophoresis>

- BIO-RAD. Molecular Imager® Gel Doc™ XR System. (18/09/2018) <http://www.bio-rad.com/es-es/product/molecular-imager-gel-doc-xr-system?ID=f19ddce4-cfdb-4852-8ae0-e6dde3a275b6>

- The Company of Biologyst. Development – For advances in developmental biology and stem of cells. Developmental roles of SWI/SNF-like complexes. (20/09/2018) <http://dev.biologists.org/content/143/16/2882>

- Acadèmia de Ciències Mèdiques i de la Salut de Catalunya i de Balears. El malalt amb càncer. Els tractaments oncològics i pal·liatius, les teràpies sense evidència científica i les pseudociències. (5/10/2018) <http://webs.academia.cat/revistes_elect/view_document.php?tpd=2&i=10958>

- ITEMAS ISCII - Plataforma de Innovación en Tecnologías Médicas y Sanitarias (ITEMAS), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Fundació Institut d´Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol. (07/10/2018) < http://www.itemas.org/quienes-somos/hospitales-y-centros-sanitarios/itcs/fundacio-institut-dinvestigacio-en-ciencies-de-la-salut-germans-trias-i-pujol/c/show/>

# 10. Figures

*Figura 1-1 http://www.germanstrias.org/* 3
*Figura 1-2 Cèl·lules* 3
*Figura 2-1 Formació d'un cromosoma* 10
*Figura 2-2Funcions de desenvolupament de tipus SWI / SNF complexes* 12
*Figura 2-3 Metodologia per bloquejar els gens cercant possibles remodeladors de la cromatina* 13
*Figura 2-4 Càncer de còlon* 14
*Figura 2-5 Mètode per identificació dels gens* 16
*Figura 2-6 Passos del bloqueig d'infecció de gens amb shRNA* 19
*Figura 3-1 Mapa campus Can Ruti* 22
*Figura 3-2 Imatge del Laboratori del Dr. Perucho* 24
*Figura 3-3 Esquema general del cicle* 27
*Figura 3-4 Càlcul de les plaques necessàries* 28
*Figura 3-5 Infecció de les plaques* 29
*Figura 3-6 Planificació inicial (21 dies)* 30
*Figura 3-7 Planificació real final (25 dies)* 31
*Figura 3-8 Esquema preparació de les cèl·lules* 31
*Figura 3-9 Esquema Tractament* 32
*Figura 3-10 Esquema Canvi de medi* 33
*Figura 3-11 Esquema Comptar i Sembrar* 34
*Figura 3-12 Esquema Enviar a FACS* 35
*Figura 3-13 Resultats FACS plaques sense infecció* 38
*Figura 3-14 Resultats FACS plaques infecció 8%* 38
*Figura 3-15 Resultats FACS plaques infecció 1%* 38
*Figura 5-1 Pòster "RESPONSE PROJECT"* 42
*Figura 6-1 Càncer Hallmarks* 44
*Figura 7-1 Plaques de petri de 15cm de diàmetre. Amb cèl·lules i medi* 58
*Figura 7-2 Campana de la sala de cultius* 58
*Figura 7-3 Plaques de petri de 15cm.* 59
*Figura 7-4 Esquema del total de plaques que necessitem* 60
*Figura 7-5 Dins de la campana. Treient el medi amb el sistema de buit* 60
*Figura 7-6 Incubador de 37 graus a la sala de cultius* 61
*Figura 7-7 Microscopis electrònics de la sala de cultius* 61
*Figura 7-8 Incubador de 37 graus de la sala de cultius* 62
*Figura 7-9 Material de dins la campana. Plaques, tubs, PBS, medi, puntes, pipeta, kitasato...* 64
*Figura 7-10 Plaques de petri de 15cm* 64
*Figura 7-11 Pot d'1L de medi McCoy's* 65
*Figura 7-12 Centrífuga de la sala de cultius* 68
*Figura 7-13 A la campana de cultius. Posant el medi a les plaques amb l'ajuda d'una pipeta.* 70
*Figura 7-14 Pot d'1L de McCoy's* 71
*Figura 7-15 Plaques de petri de 15cm amb cèl·lules i medi* 71
*Figura 7-16 Plaques de petri de 15cm amb cèl·lules i medi* 73
*Figura 7-17 A la campana de cultius. Utilitzant el sistema de buit per treure el medi de les plaques* 73
*Figura 7-18 Tubs de 50mL amb cèl·lules i medi.* 74
*Figura 7-19 A la campana de cultius. Posant el medi a les plaques amb l'ajuda de la pipeta i el pipet* 74
*Figura 7-20 Pot d'1L de McCoy's* 75
*Figura 7-21 Plaques de petri de 15cm amb cèl·lules i medi* 77
*Figura 7-22 Tubs de 15mL amb cèl·lules i medi* 78
*Figura 7-23 Treballant a la campana de la sala de cultius* 80
*Figura 7-24 3 plaques sense infectar + 3 plaques infectades a l'1%* 81
*Figura 7-25 3 plaques infectades al 8%* 81
*Figura 7-26 Placa del tractament de 96* 82
*Figura 7-27 Tub de 15mL amb cèl·lules i medi* 82
*Figura 7-28 Esquema de la la placa de tractament 96* 82

*Figura 7-29 Tubs de 15mL amb cèl·lules i medi* ____ *84*
*Figura 7-30 Tub de 15mL amb cèl·lules i medi. Es pot veure que un cop centrifugat, el pellet de cèl·lules queda a baix del tub* ____ *84*
*Figura 7-31 Mostres de cèl·lules que aniran a FACS. Tenyides per DIOC i DAPI* ____ *85*
*Figura 7-32 Canviant el medi de les plaques de 96* ____ *85*
*Figura 7-33 Resultats del XTT 96* ____ *86*
*Figura 8-1 Resultat FACS Sense tractament (T1)* ____ *87*
*Figura 8-2 Resultat FACS tractament FUOX (T1)* ____ *88*
*Figura 8-3 Resultat FACS Tractament FUIRI (T1)* ____ *89*
*Figura 8-4 Resultat FACS Sense tractament (T2)* ____ *90*
*Figura 8-5 Resultat FACS Tractament FUOX (T2)* ____ *91*
*Figura 8-6 Resultat FACS Tractament FUIRI (T2)* ____ *92*
*Figura 8-7 Resultat FACS Sense tractament (T3)* ____ *93*
*Figura 8-8 Resultat FACS Tractament FUOX (T3)* ____ *94*
*Figura 8-9 Resultat FACS Tractament FUIRI (T3)* ____ *95*
*Figura 8-10 Resultat FACS Sense tractament + sense infecció* ____ *96*
*Figura 8-11 Resultat FACS Tractament FUOX+ sense infecció* ____ *97*
*Figura 8-12 Resultat FACS Tractament FUIRI+ sense infecció* ____ *98*
*Figura 8-13 Resultat FACS Sense tractament + infecció 8%* ____ *99*
*Figura 8-14 Resultat FACS Tractament FUOX + infecció 8%* ____ *100*
*Figura 8-15 Resultat FACS Tractament FUIRI + infecció 8%* ____ *101*