

## **MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. ANTRACLICINAS

En este trabajo se analizan los efectos de los antitumorales Daunorubicina (Sigma), Doxorubicina (Adriamicina, Serva) y WP631 sobre las líneas celulares Jurkat T, MDA-MB-231 y MCF-7/VP. La Bisantraciclina WP631 fue sintetizada por el Dr. Waldemar Priebe, del M.D. Anderson Cancer Center (University of Texas) (Figura I21) a partir de la unión de dos moléculas de Daunorubicina mediante un grupo *p*-xililo (Chaires et al., 1997; Priebe et al., 2001).

##### 3.1.1. Preparación y determinación de la concentración de las Antraciclinas

- 1) Pesar aproximadamente 1 mg de fármaco y añadir el volumen necesario de 150 mM NaCl estéril para alcanzar la concentración teórica de 1 mM. Agitar en oscuridad por rotación entre 4-16 horas para que se disuelva bien el fármaco.
- 2) Centrifugar brevemente para comprobar que el fármaco está bien disuelto. Si hay presencia de precipitado, guardar el sobrenadante.
- 3) Determinar la concentración real de fármaco en el sobrenadante.

La concentración de los fármacos se determinó a partir de los coeficientes de extinción molar ( $\epsilon$ ) de cada molécula determinados por Leng (Leng, 1997). Se trata de un método espectrofotométrico basado en la determinación de la absorbancia de las Antraciclinas a 480 nm. Conocidos los coeficientes de extinción molar, es posible determinar la concentración de los fármacos ( $c$ ) mediante la fórmula:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Siendo,  $\epsilon_{WP631} = 13400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

$$\epsilon_{DAUNORUBICINA} = 11500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{DOXORUBICINA} = 11500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$l$  = paso de luz de la cubeta en cm (normalmente 1 cm)

$A$  = lectura espectrofotométrica a 480 nm

Los *stocks* de los fármacos se conservan a  $-20^\circ\text{C}$ .

Para realizar los diferentes experimentos se descongelaban los *stocks* y se diluían hasta llegar a las concentraciones apropiadas, usando 150 mM NaCl estéril o medio de cultivo (ver apartado 3.2.2.).

### **Soluciones**

▪ 150 mM NaCl estéril filtrado con una jeringuilla y un filtro de 0.22  $\mu$ M (Millipore) en una campana de flujo laminar.

### **Observaciones**

Las Antraciclinas, como intercaladores del DNA, son moléculas muy tóxicas. Por este motivo, es necesario trabajar siempre con guantes y desechar los residuos generados de manera apropiada (citotóxicos).

## **3.2. LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO**

### **3.2.1. Descripción de las líneas celulares**

La línea celular Jurkat T fue cedida por los Laboratorios Almirall Prodesfarma. Se trata de una leucemia aguda de linfocitos T. La línea celular MDA-MD-231 se obtuvo directamente de la ATCC (American Type Culture Collection). La línea MCF-7/VP fue cedida por el Dr. K.H. Cowan (University of Nebraska Medical Center). Las células MDA-MB-231 y MCF-7/VP corresponden a tumores de glándula mamaria. La línea celular MCF-7/VP es una línea resistente a varios antitumorales, entre ellos, la Doxorubicina. Se obtuvo seleccionando células MCF-7 que resistían a tratamientos con dosis crecientes de Etopósido, porque sobreexpresaban la proteína MRP-1, bomba transportadora que expulsa diferentes fármacos al exterior de la célula (Schneider et al., 1994). En la Tabla M1 se resumen las características de las líneas celulares utilizadas.

La línea MDA-MB-231 carece de proteína p53 funcional (D'Assoro et al., 2004). Por otro lado, las células MCF-7/VP derivan de la línea MCF-7, defectiva para la caspasa-3 (Essmann et al., 2004) y probablemente han perdido la funcionalidad de p53 (véase Resultados). Se escogieron estas líneas celulares porque, al ser células sin caspasa-3 o p53 funcionales, son refractarias a la apoptosis dependiente de p53. Esto nos permitía explorar si los fármacos analizados eran capaces de ejercer un efecto antitumoral diferente a la apoptosis clásica.

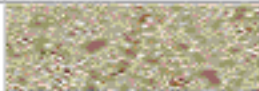
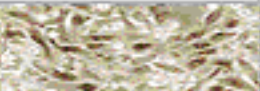

Dado que la Daunorubicina es muy eficaz en la quimioterapia de leucemias (Booser and Hortobagyi, 1994), se utilizó como control para analizar los efectos de la WP631 en las células Jurkat T. Cuando se analizaron los efectos de la WP631 en las líneas MDA-MB-231 y MCF-7/VP se utilizó como control la Doxorubicina, más eficaz en el tratamiento de tumores sólidos (Booser and Hortobagyi, 1994).

### 3.2.2. Mantenimiento de los cultivos

Las células Jurkat T se mantuvieron en medio RPMI 1640 (GibcoBRL) suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado (GibcoBRL), 2 mM glutamina (GibcoBRL) y antibióticos (100 U/ml penicilina; 100 µg/ml estreptomicina) (GibcoBRL). Para evitar cambios en el pH del medio se añadió Hepes (pH 7.2) a una concentración final de 2 mM. Las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7/VP se mantuvieron en medio RPMI 1640 (GibcoBRL) suplementado de la misma manera, más 2 mM piruvato sódico.

Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda, conteniendo un 5% de CO<sub>2</sub> en frascos de 25, 75 ó 175 cm<sup>2</sup>, según las necesidades.

**Tabla M1.** Descripción de las líneas celulares utilizadas durante el desarrollo de este trabajo. Las células MCF-7/VP fueron cedidas por el Dr. K. H. Cowan (University of Nebraska Medical Center).

LÍNEA CELULAR	JURKAT T	MDA-MB-231	MCF-7/VP
Morfología			
Tejido	Linfocitos T	Glándula mamaria	Glándula mamaria
Origen	Sanguíneo	Epitelial	Epitelial
Crecimiento	Suspensión	Adherente	Adherente
Procedencia	ATCC: TIB-152	ATCC: HTB-26	Derivada de MCF-7 por selección a Etopósido
Características	p53 funcional	p53 mutada p16 mutada	p53 mutada <sup>(a)</sup> caspasa-3 mutada sobreexpresión MRP-1

<sup>(a)</sup> Véase Resultados y Discusión

### Soluciones y Materiales

- FBS (GibcoBRL): suero fetal bovino inactivado por incubación en un baño a 56°C durante 20 minutos.
- Glutamina (GibcoBRL).
- Piruvato sódico (GibcoBRL).
- Antibióticos Penicilina y Estreptomicina (GibcoBRL): 10000 U/ml Penicilina y 10000 µg/ml Estreptomicina.
- 1M Hepes (pH 7.2): ácido N-2-hidroxiethylpiperazín-N'-2-etanosulfónico disuelto en agua miliQ equilibrado con 10N NaOH. La solución se esterilizó filtrando con una jeringuilla y un filtro de 0.22 µM (Millipore) y autoclavando.
- Frascos de cultivo (Corning Costar Corporation): frascos de 25, 75 y 175 cm<sup>2</sup>.

### Observaciones

La manipulación de los cultivos y la preparación de las soluciones se debe realizar en las máximas condiciones de esterilidad posibles, trabajando en una campana de flujo laminar.

#### 3.2.3. Congelación y descongelación de los *stocks*

Cada vez que se descongelaba un *stock*, las células se dividían en dos frascos: uno para la realización de los experimentos y otro para volver a congelar. De esta manera nos asegurábamos que todas las líneas celulares utilizadas en este trabajo permanecían disponibles en el laboratorio, para trabajos posteriores. Se congelaban, aproximadamente,  $2 \times 10^7$  células en medio de cultivo conteniendo DMSO. El DMSO es un anticongelante que impide la formación de cristales de agua en el interior de las células, manteniendo la integridad celular.

#### Procedimiento de congelación de células en suspensión

- 1) Centrifugar a 1.000 rpm durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante.
- 2) Resuspender el precipitado de células en 50% medio de cultivo, 40% suero fetal bovino (FBS) y 10% DMSO.
- 3) Dispensar en criotubos (1 ml en cada criotubo).
- 4) Guardar los criotubos a -80°C, un mínimo de 5 días.

5) Guardar los criotubos en un tanque de nitrógeno líquido hasta el momento de su descongelación.

### **Procedimiento de congelación de células adherentes**

- 1) Eliminar el medio de cultivo del frasco.
- 2) Lavar las células dos veces con PBS estéril.
- 3) Tripsinizar a 37°C, para desadherir las células del frasco. Se utilizó el volumen de solución tripsina-EDTA necesario para cubrir las células.
- 4) Inhibir la tripsina añadiendo 20 volúmenes iguales de medio de cultivo atemperado.
- 5) Pasar a un tubo y centrifugar a 1.000 rpm durante 5 minutos.
- 6) Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado dos veces con PBS estéril.
- 7) Resuspender el precipitado en medio de cultivo frío con un 10% de DMSO.
- 8) Dispensar en criotubos (1 ml por criotubo).
- 9) Guardar los criotubos a -80°C, un mínimo de 5 días.
- 10) Guardar los criotubos en un tanque de nitrógeno líquido hasta el momento de su descongelación.

### **Procedimiento de descongelación**

Durante la realización de este trabajo se utilizaron dos procedimientos de descongelación de *stocks* celulares. Los dos procedimientos tienen como objetivo eliminar el medio de congelación, que contiene DMSO, molécula que resulta tóxica para las células en crecimiento.

#### **Procedimiento I**

- 1) Descongelar el criotubo rápidamente.
- 2) Una vez descongelado, coger el volumen de células con una pipeta y pasarlo a un tubo con 5 ml de medio de cultivo frío.
- 3) Centrifugar durante 5 minutos a 1000 rpm.
- 4) Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 5 ml de medio de cultivo previamente atemperado a 37°C.
- 5) Coger el volumen de células con una pipeta y pasarlo a un frasco de 25 cm<sup>2</sup>.
- 6) Guardar el frasco dentro del incubador y controlar el crecimiento celular.

#### **Procedimiento II**

- 1) Preparar un frasco de 25 cm<sup>2</sup> con 5 ml de medio de cultivo atemperado a 37°C.

- 2) Descongelar el criotubo rápidamente.
- 3) Una vez descongelado, coger el volumen de células con una pipeta y pasarlo al frasco.
- 4) Guardar el frasco dentro del incubador un mínimo de 4 horas.
- 5) Coger el contenido del frasco con una pipeta y pasarlo a un tubo.
- 6) Centrifugar durante 5 minutos a 1000 rpm.
- 7) Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 5 ml de medio de cultivo fresco, previamente atemperado a 37°C.
- 8) Guardar el frasco dentro del incubador y controlar el crecimiento celular.

### Soluciones y Materiales

- Medio de cultivo RPMI-1640 suplementado (ver apartado 3.2.2.).
- FBS: suero fetal bovino (ver apartado 3.2.2.).
- DMSO: dimetilsulfóxido (Sigma).
- 10x PBS (pH 7.4): tampón fosfato salino (73 g NaCl, 26.9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 11.7 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en agua miliQ; pH ajustado con HCl. Solución esterilizada mediante autoclavado.
- 0.5 M EDTA pH 8.0: ácido etilendiaminotetraacético disódico disuelto en agua miliQ y equilibrado con 10N NaOH. Esterilizado por filtración y autoclavado.
- 0.5% Tripsina (Sigma) en agua miliQ filtrada una jeringuilla y un filtro de 0.22 µM en una campana de flujo laminar. Guardar alicuotada y congelada.
- TD (500 ml): 17,125 ml 4 M NaCl, 625 µl 4 M KCl, 0.087 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>• 2H<sub>2</sub>O, 10 ml Tris, en agua miliQ. Equilibrado a pH 7.4.
- Solución Tripsina-EDTA: 0.025% Tripsina, 0.5 mM EDTA pH 8.0 en TD.
- Criotubos (Corning Costar Corporation).

### Observaciones

Cada vez que se congelaba un *stock* celular se anotaba en el criotubo el número exacto de pases de la línea celular.



### 3.2.4. Subcultivos celulares

Cuando las células llegaban a condiciones de saturación (células en suspensión) o de confluencia (células adherentes), se procedía a subcultivar para asegurar el crecimiento exponencial de las células. El subcultivo celular permite controlar la densidad del inóculo inicial que nos asegure que trabajamos en condiciones de crecimiento óptimas para cada línea celular (ver apartado 3.3.3.).

#### Procedimiento para células en suspensión

- 1) Contar el número total de células del cultivo (ver apartado 3.4.2.1.).
- 2) Pipetear el volumen de cultivo que asegure un subcultivo en fase exponencial de crecimiento (ver apartado 3.3.1.).
- 3) Centrifugar durante 5 minutos a 1.000 rpm.
- 4) Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 5, 15 ó 40 ml (según el frasco de cultivo a utilizar sea de 25, 75 y 175 cm<sup>2</sup>, respectivamente) de medio de cultivo suplementado y atemperado previamente a 37°C.
- 5) Pasar el volumen a frascos de cultivo.
- 6) Guardar el frasco dentro de un incubador y controlar el crecimiento celular.

#### Procedimiento para células adherentes

- 1) Eliminar el medio de cultivo con una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío.
- 2) Lavar las células dos veces con PBS.
- 3) Tripsinizar las células añadiendo el volumen de Tripsina-EDTA necesario para cubrir las células e incubar durante 3-5 minutos a 37°C.
- 4) Inactivar la Tripsina añadiendo de 10 a 20 volúmenes de medio de cultivo suplementado y atemperado.
- 5) Contar el número total de células del cultivo (ver apartado 3.4.2.1.).
- 6) Pipetear el volumen de cultivo que asegure un subcultivo en fase exponencial de crecimiento y proceder como en el apartado anterior.

#### Soluciones

- 10x PBS estéril (ver 3.2.3).
- Tripsina-EDTA (ver 3.2.3).

## **Observaciones**

El número de pases indica cuántas veces se ha subcultivado la línea celular. Es importante trabajar con células con pocos pases porque las líneas celulares establecidas tienden a ser inestables, de manera que algunas características fisiológicas y morfológicas del cultivo pueden cambiar con el tiempo.

## **3.3. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR, TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS**

### **3.3.1. Método del MTT**

El ensayo del MTT, también llamado Test de inhibición de la Succinato Deshidrogenasa (SDI) es un ensayo colorimétrico que mide la actividad metabólica de las células en fase de proliferación activa. Está basado en la rotura del anillo de tetrazolio del MTT por diferentes deshidrogenasas mitocondriales, formándose cristales de formazán. Los cristales de formazán son insolubles en agua pero pueden solubilizarse con disolventes orgánicos, siendo la cantidad de formazán formado proporcional al número de células proliferantes (metabólicamente activas) (Mosmann, 1983). Este ensayo se utilizó para determinar las curvas de crecimiento y la capacidad de la WP631, la Daunorubicina y la Doxorubicina de inhibir el crecimiento celular en las diferentes líneas.

#### **3.3.1.1. Determinación de las curvas de crecimiento**

La determinación de las curvas de crecimiento es la etapa previa al diseño de posteriores experimentos que permite saber la densidad del inóculo inicial para cada línea celular que nos asegure que trabajamos en condiciones de crecimiento exponencial.

## **Procedimiento**

- 1) Sembrar 6 placas de microtitulación de 96 pozos una fila con 100 µl que contengan 625, 1.250, 2.500, 5.000 ó 10.000 células (por triplicado).
- 2) A intervalos de 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas de incubación, sacar una placa y tratarla de la siguiente manera:

- Añadir 10  $\mu$ l MTT (5mg/ml) e incubar 3 horas a 37°C, protegiendo la placa de la luz.
- Solubilizar los cristales de formazán producidos en la placa con 100  $\mu$ l de 0.08 M HCl en isopropanol y agitar la placa 30 minutos a temperatura ambiente, protegida de la luz.
- Cuantificar el color de las muestras a 570 nm en un lector ELISA. Se utilizó un lector Spectra MAX-250 (Molecular Devices) y el *software* SoftMax@Pro.

### 3.3.1.2. Determinación de la citotoxicidad de las Antraciclinas

Una vez determinada la densidad del inóculo inicial para cada línea celular que nos asegure que trabajamos en condiciones de crecimiento exponencial desde las 24 hasta las 120 horas, se procedió a determinar la citotoxicidad de la Antraciclinas. Los ensayos de citotoxicidad nos permiten conocer la capacidad de las Antraciclinas Daunorubicina y Doxorubicina y la Bisantraciclina WP631 para inhibir el crecimiento en las diferentes líneas celulares.

#### Procedimiento

- 1) Sembrar 3 placas de microtitulación con una densidad de células, que asegure un crecimiento exponencial de cada línea. Incubar 24 horas a 37°C en una atmósfera con un 5% CO<sub>2</sub>.
- 2) Realizar un banco de diluciones seriadas con las diferentes Antraciclinas y tratar las células con las diferentes dosis (por triplicado). Incubar a 37°C en una atmósfera con un 5% CO<sub>2</sub> durante diferentes tiempos, sacar las placas y proceder con el ensayo del MTT (ver apartado 3.3.1.1.)

#### Soluciones

- Tripsina-EDTA (ver 3.2.3.).
- 10x PBS (ver 3.2.3.).
- MTT (5mg/ml): bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (Sigma).
- 0.08 M HCl en isopropanol.

### 3.3.2. Tratamientos farmacológicos y obtención de las muestras

Una vez determinados los valores de las dosis de WP631, Daunorubicina y Doxorubicina que inhibían un 50 o un 75% el crecimiento celular en las diferentes líneas, diseñamos los experimentos basándonos en las condiciones de duración de los tratamientos farmacológicos que se detallan a continuación.

#### Procedimiento

1) Subcultivar, sembrando el inóculo inicial que asegure un crecimiento exponencial para cada línea celular (ver apartado 3.3.1.1.). Incubar durante 24 horas a 37°C.

2) Tratar con las dosis de Antraciclinas equivalentes a los valores  $IC_{50}$  e  $IC_{75}$  para cada línea celular (ver apartado 3.3.1.2.). Incubar durante el tiempo necesario.

Se realizaron tratamientos continuos de 72 ó 96 horas, momento en que se determinaron las dosis  $IC_{50}$  e  $IC_{75}$ , según la línea celular (véase Resultados). Después se cambiaba el medio de cultivo y se incubaban las células con medio libre de fármaco. De esta manera nos asegurábamos que los efectos de los fármacos sobre el crecimiento celular tenían lugar de forma rápida y se mantenían en el tiempo.

3) Sacar los frascos a diferentes tiempos de tratamiento y obtener las células para la realización de los diferentes experimentos.

Cada vez que se obtenían muestras se realizaba un recuento de células y de viabilidad con azul de tripano (ver apartado 3.4.2.1).

### 3.4. ANÁLISIS DE LOS EFECTOS ANTITUMORALES DE LAS ANTRACICLINAS: EFECTOS CITOSTÁTICOS Y CITOTÓXICOS

Utilizamos en ensayo del MTT para determinar la capacidad de los diferentes fármacos analizados de inhibir el crecimiento celular (ver apartado 3.3.1.2.). Sin embargo, este tipo de ensayo no permite diferenciar si la inhibición de la proliferación se debe a que los antitumorales inhiben la proliferación celular (efecto citostático), o bien, inducen la muerte de las células (efecto citotóxico). Para poder discernir entre estos efectos, se realizaron los experimentos que se detallan a continuación.

### 3.4.1. Ensayos para analizar los efectos citostáticos de los antitumorales

#### 3.4.1.1. Tinción con yoduro de propidio

La tinción con yoduro de propidio proporciona información sobre el contenido de DNA, permitiendo distinguir y cuantificar, mediante la utilización de un citómetro de flujo, la distribución de las células a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular (proporción de células en G<sub>0/1</sub>, S, G<sub>2</sub>+M, subG<sub>0/1</sub> –células muertas- y poliploides). Realizamos tinciones con yoduro de propidio de células tratadas con las dosis IC<sub>50</sub> e IC<sub>75</sub> para los diferentes fármacos, para determinar si los tratamientos inducían la parada del ciclo celular en fases concretas del ciclo. Al mismo tiempo, el análisis de la fracción subG<sub>0/1</sub> nos permitió detectar si los tratamientos inducían, también, la muerte celular (efecto citotóxico).

#### Procedimiento

Se siguió el método de Doyle (Doyle et al., 1995), con ligeras modificaciones:

1) Obtener las células a diferentes tiempos de tratamiento y sus controles (ver 3.3.2.) y fijarlas:

- Centrifugar a 800 xg durante 5 minutos.
- Lavar el precipitado con PBS estéril.
- Resuspender el precipitado en 0.5 ml de PBS estéril.
- Añadir 4.5 ml de etanol frío al 70%, mientras se agita la muestra con un

vórtex.

2) Después de la fijación, se acumulan las muestras correspondientes a los diferentes tiempos de incubación a 4°C y se tiñen antes de analizarlas por citometría de flujo:

- Agitar las células en etanol al 70% con un vórtex.
- Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos.
- Lavar el precipitado con 5 ml de PBS.
- Eliminar el sobrenadante y añadir 1ml de 0.5 mg/ml RNasa A y 20

µg/ml de yoduro de propidio (en PBS)

- Incubar a 37°C durante 30 minutos.
- Mantener las muestras a 4°C protegidas de la luz hasta su análisis.

3) Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo Coulter Epics-XL (Serveis Científico-Tècnics, Universitat de Barcelona), usando un láser de argón azul (488 nm, 15 mW) y detectando la fluorescencia a 665-685 nm.

### Soluciones

- PBS (ver apartado 3.2.3.).
- 70% etanol.
- RNasa A (10 mg/ml) (Boehringer Mannheim).
- Yoduro de propidio (5mg/ml) (Sigma).

#### 3.4.1.2. Ensayos para determinar la presencia de senescencia celular

##### • Tinción SA- $\beta$ -galactosidasa lisosomal a pH 6.0

La tinción SA- $\beta$ -gal (*Senescence Associated  $\beta$ -galactosidase*) es un ensayo citoquímico utilizado para la detección de células senescentes *in vivo* (Dimri et al., 1995). Está basado en la mediada de la actividad del enzima  $\beta$ -galactosidasa lisosomal a pH 6.0 de las células. El enzima  $\beta$ -galactosidasa ácido, se localiza en los lisosomas de las células eucariotas y es activo a pH 4.0. La  $\beta$ -galactosidasa lisosomal es capaz de procesar el sustrato X-gal a pH 4.0, formándose precipitados azules en el interior de las células (Dimri et al., 1995). Las células senescentes sufren un incremento, tanto en la masa lisosomal como en la cantidad de enzima  $\beta$ -galactosidasa lisosomal, de modo que son capaces de procesar el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indoil  $\beta$ -D-galactopiranosido (X-Gal) al pH subóptimo de 6.0 (Kurz et al., 2000). La tinción SA- $\beta$ -gal permite discriminar células senescentes (positivas para la tinción SA- $\beta$ -gal a pH 4.0 y 6.0) del resto de células (únicamente positivas para la tinción a pH 4.0) (Dimri et al., 1995).

### Procedimiento

1) Obtener las células a diferentes tiempos de tratamiento y sus controles (ver 3.3.2.).

Las células Jurkat T se obtuvieron en forma de precipitado, centrifugándolas a 1000 rpm durante 5 minutos. Las células MDA-MB-231 y MCF-7/VP se sembraron en SlideFlasks (Nunc, Brand), para poder realizar las tinciones directamente en portaobjetos.

2) Lavar las células con PBS estéril.

- 3) Fijar las células con solución de fijación, durante 3 minutos a temperatura ambiente
- 4) Lavar con PBS estéril.
- 5) Añadir el volumen de la solución de tinción SA- $\beta$ -gal en tampón citrato/fosfato (pH 6.0) que cubra las células. Incubar durante 16 horas a 37°C.
- 6) Montar la preparación sobre un portaobjetos y observar en un microscopio de contraste de fases.

### **Soluciones**

- 10x PBS estéril (ver 3.2.3).
- Tripsina-EDTA (ver 3.2.3).
- Solución de fijación: 3% formaldehído en agua miliQ.
- Solución de tinción SA- $\beta$ -gal: 1 mg de sustrato X-Gal (Promega) por cada ml, 5mM ferrocianida potásica (Merck), 5 mM ferricianida potásica (Merck) y 150 mM NaCl, 2 mM Mg<sub>2</sub>Cl en 40 mM tampón fosfato/citrato (equilibrado a pH 4.0 ó 6.0 con ácido cítrico o fosfato sódico).

### **Observaciones**

Debido a la inestabilidad del sustrato X-Gal, y de las soluciones de ferrocianida potásica y ferricianida potásica, la solución de tinción SA- $\beta$ -gal se debe preparar fresca cada vez que se utiliza.

### **• Determinación de la síntesis de DNA**

La 5'-bromo-2'-deoxi-uridina (BrdU) es un análogo de la timidina, que se incorpora en el DNA durante el proceso de síntesis. Basándonos en este principio, determinamos si tras tratar las células con Antraciclinas, estas eran capaces de sintetizar DNA. Hidrolizamos parcialmente el DNA de las células para dejar accesible el BrdU incorporado al anticuerpo monoclonal anti-BrdU-POD. Utilizamos algunos de los componentes del *kit* Cellular DNA Fragmentation ELISA (Roche) para determinar la presencia de los inmunocomplejos formados, mediante una reacción colorimétrica, añadiendo un sustrato (Figura M1).

## Procedimiento

- 1) Tratar de los cultivos con Daunorubicina o WP631, teniendo en cuenta que densidad de cultivo en el momento de añadir el BrdU tiene que ser de  $4 \times 10^5$  células por ml.
- 2) Incubar 4, 24 ó 72 horas, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
- 3) Cambiar el medio de cultivo por medio fresco, conteniendo BrdU a una concentración final de 10 µM.
- 4) Incubar a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, durante 24 horas.
- 5) Contar el número de células, centrifugar a 250 xg durante 5 minutos y resuspender el precipitado con el volumen de medio de cultivo necesario para tener  $8 \times 10^4$  células en 100 µl.
- 6) Fijar con 3% formaldehído durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 7) Lavar las células tres veces con PBS.
- 8) Hidrolizar el DNA con 4M HCl, durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- 9) Incubar las células durante 10 minutos con 0.5% BSA en PBS-Tween para permeabilizarlas y bloquear las uniones inespecíficas.
- 10) Incubar con anticuerpo AntiBdrU-POD, durante 90 minutos a temperatura ambiente (o durante toda la noche a 4°C).
- 11) Lavar las células tres veces con PBS.
- 12) Añadir 300 µl de sustrato y pasar las muestras a tubos de microcentrífuga. Incubar durante 2-30 minutos (hasta que aparezca color) a temperatura ambiente, en agitación y protegiendo las muestras de la luz.
- 13) Parar la reacción, añadiendo 75 µl de la solución *Stop* a cada muestra. Incubar 1 minuto, en agitación.
- 14) Leer la DO a 450 nm ( $\lambda$  de referencia de 690 nm) durante los 5 minutos siguientes a la adición de la solución *Stop*.

## Soluciones y Materiales

### **Componentes del kit Cellular DNA Fragmentation ELISA (Roche)**

- BdrU *Labelling Reagent* (x1000): se preparó una solución de trabajo 1 mM a partir de 0.9 ml BdrU *Labelling Reagent* x 1000 y 8.1 ml PBS estéril o medio de cultivo.
- Anticuerpo Anti-BdrU-POD: anticuerpo monoclonal de ratón (clon BMG 6H8) conjugado con peroxidasa, disuelto en 1 ml de agua miliQ.
- Sustrato TMB, listo para usar.



### **Componentes adicionales**

- 10x PBS estéril (ver 3.2.3).
- Solución de fijación: 3% formaldehído en agua miliQ.
- 0.5% Tween-20 (Sigma) en PBS.
- 20 mg/ml BSA albúmina sérica bovina (Roche).
- Solución *Stop*: 0.05% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en agua miliQ.

### **3.4.2. Ensayos para determinar los efectos citotóxicos de los antitumorales**

#### **3.4.2.1. Ensayos de viabilidad: azul de tripano**

El azul de tripano es un colorante vital que permite diferenciar las células viables (no teñidas) de las no viables (teñidas). La tinción con azul de tripano y la utilización de una cámara de Neubauer (Brand) permitió hacer medidas de proliferación y viabilidad celular. Se utilizó esta tinción para determinar la densidad (nº células/ml) de los cultivos celulares y asegurar que el cultivo había alcanzado su nivel óptimo de crecimiento antes de congelar o realizar cualquier experimento. También se utilizó este método de conteo para determinar el número de células viables tras los tratamientos con antitumorales.

#### **Procedimiento**

- 1) Pipetear 10 µl del cultivo y añadir 5 µl de azul de tripano.
- 2) Montar sobre la cámara de Neubauer y observar al microscopio óptico (la cámara de Neubauer consta de cinco campos ópticos: campo visual superior izquierdo y derecho, campo visual inferior izquierdo y derecho y campo visual central).
- 3) Contar el número de células presentes en cada campo visual (número total de células, número de células viables y número de células inviables) y obtener la media de células por campo visual.

El número de células por ml se obtiene multiplicando la media de células por campo visual por 1.5 (factor de dilución con el cultivo y el azul de tripano) y por  $1 \times 10^4$ . El resultado obtenido corresponde al número de células viables/ml o al número de células inviables/ml (según se hayan contado las células no teñidas o teñidas con el colorante). Para la determinación de la viabilidad y la mortalidad celular hay que tener en cuenta el recuento total de células (no teñidas y teñidas):

- % Viabilidad celular =  $(n^{\circ} \text{ de células viables} / n^{\circ} \text{ total de células}) \times 100$
- % Mortalidad celular =  $(n^{\circ} \text{ total de células} - n^{\circ} \text{ de células viables} / n^{\circ} \text{ total de células}) \times 100$

### Soluciones y Materiales

- 10x PBS estéril (ver 3.2.3).
- 1% azul de tripano (Sigma) en PBS.
- Tripsina-EDTA (ver 3.2.3).
- Cámara de Neubauer (Brand)

### Observaciones

El recuento de viabilidad en el caso de las células adherentes se realizó tanto sobre el las células en suspensión (sobrenadante) como sobre el cultivo tripsinizado (células adheridas).

#### 3.4.2.2. Determinación de la fragmentación del DNA

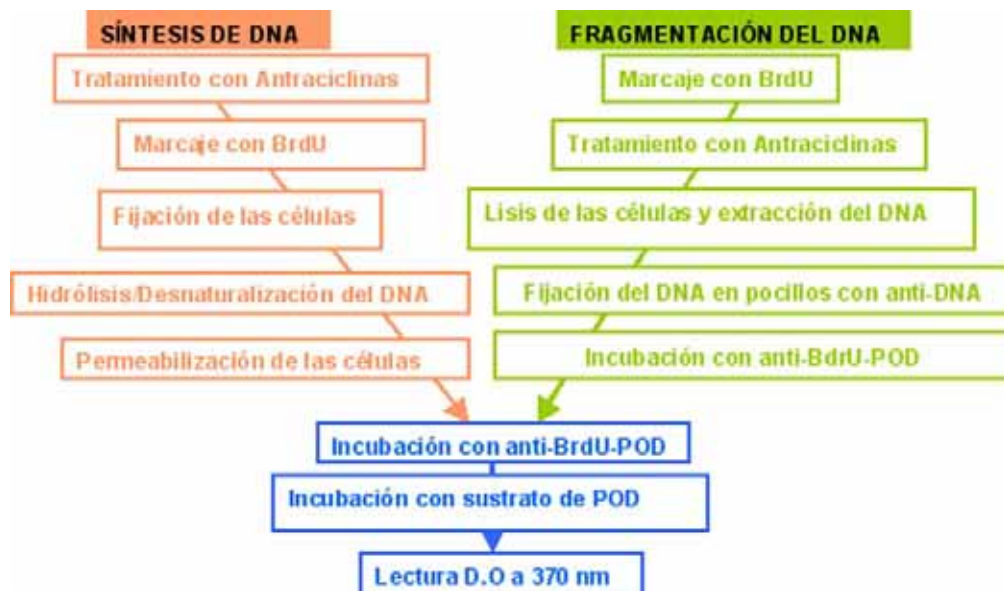
Utilizamos el *kit* Cellular DNA Fragmentation (Roche) para determinar si los diferentes tratamientos inducían la fragmentación del DNA como consecuencia, por ejemplo, de la interferencia con los complejos topoisomerasa II- DNA o de la formación de radicales libres. Se trata de un ensayo colorimétrico basado que, igual que los experimentos de determinación de la síntesis de DNA, en la detección de la incorporación de BrdU. Tal y como muestra la Figura M1, la diferencia entre los dos ensayos es que, cuando se quería determinar si los tratamientos inhibían la síntesis de DNA, primero se incubaban las células con Antraciclinas y después con BrdU, mientras que para determinar si los tratamientos inducían la fragmentación del DNA, se marcaban las células con BrdU y después se trataban con Antraciclinas.

### Procedimiento

1) Marcaje de las células con BdrU y obtención del DNA:

- Subcultivar las células a la densidad óptima que asegure un crecimiento exponencial. Añadir a cada frasco solución BrdU, a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ . Incubar 24 horas.

- Eliminar el medio de cultivo y resuspender las células en el volumen necesario de medio libre de BrdU para que los cultivos queden a una concentración de  $2 \times 10^5$  células por cada ml.
- Pipetear (por duplicado) 100  $\mu$ l de los cultivos marcados con BrdU en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos.
- Añadir a cada pocillo 100  $\mu$ l adicionales de medio de cultivo que contenga la concentración correspondiente al valor  $IC_{50}$  o  $IC_{75}$  determinado en cada caso. Incubar 4 ó 10 horas.



**Figura M1.** La medida de la incorporación de BrdU se ha utilizado para determinar la capacidad de las células tratadas con Antraciclinas de sintetizar DNA y para determinar si los diferentes tratamientos inducen lesiones en el DNA. El principio de los ensayos se basa en la determinación de las moléculas de BrdU incorporadas, utilizando un anticuerpo específico anti-BrdU, acompañado a peroxidasa. La detección de los inmunocomplejos se basa en una reacción colorimétrica que tiene lugar en presencia del sustrato de la peroxidasa TMB.

- Eliminar el sobrenadante e incubar las células con 200  $\mu$ l de tampón de lisis por pocillo, durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar las muestras durante 10 minutos a 250  $xg$  y recoger 100  $\mu$ l de cada muestra para determinar la fragmentación del DNA.

## 2) Determinación de la fragmentación del DNA:

- Preparar una placa de microtitulación de 96 pocillos de la siguiente manera:
  - Añadir 100  $\mu$ l de solución con anticuerpo anti-DNA a cada pocillo. Incubar a 37 °C durante 1 hora. Eliminar la solución de los pocillos.
  - Bloquear las uniones inespecíficas añadiendo 200  $\mu$ l de solución de incubación. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Eliminar la solución de incubación.
  - Lavar los pocillos tres veces con 250  $\mu$ l de solución de lavado durante 2-3 minutos. Eliminar la solución del último lavado.
  - Pipetar 100  $\mu$ l de los lisados celulares en los pocillos de la placa de microtitulación conteniendo anticuerpo anti-DNA bloqueado. Incubar durante 90 minutos a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4 °C. Eliminar el sobrenadante.
  - Lavar los pocillos tres veces con 250  $\mu$ l de solución de lavado durante 2-3 minutos. Dejar la solución del último lavado.
  - Fijar y desnaturalizar el DNA:
    - Calentar la placa destapada en un microondas durante 5 minutos a potencia media.
    - Incubar la placa durante 10 minutos a -20 °C y eliminar la solución del último lavado.
    - Añadir 100  $\mu$ l de solución anti-BrdU-POD a cada pocillo. Incubar durante 90 minutos a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4 °C. Eliminar el sobrenadante.
    - Lavar los pocillos tres veces con 250  $\mu$ l de solución de lavado durante 2-3 minutos. Eliminar la solución del último lavado.
    - Añadir 100  $\mu$ l de la solución sustrato a cada pocillo. Incubar, protegiendo las muestras de la luz, hasta que aparezca color y realizar la lectura de la densidad óptica a 370 nm ( $\lambda$  de referencia de 492 nm) cada 30 segundos.

## Soluciones y Materiales

### **Componentes del kit Cellular DNA Fragmentation ELISA (Roche)**

- BdrU *Labelling Reagent* (x1000): se preparó una solución de trabajo 1 mM a partir de 0.9 ml BdrU *labelling reagent* x 1000 y 8.1 ml PBS estéril o medio de cultivo.
- Anticuerpo anti-DNA: anticuerpo monoclonal de ratón (clon MCA-33), disuelto en 1 ml de agua miliQ.
- 10x *Coating Buffer*.
- 10 x Tampón de lavado (contiene BSA y Tween-20).
- 2x Tampón de incubación (contiene BSA y Tween-20).
- Anticuerpo Anti-BdrU-POD: anticuerpo monoclonal de ratón (clon BMG 6H8) conjugado con peroxidasa, disuelto en 1 ml de agua miliQ.
- Sustrato TMB, listo para usar.

### **3.4.2.3. Doble tinción con yoduro de propidio y anexina: análisis de la muerte celular por apoptosis y necrosis**

La tinción con yoduro de propidio y Anexina-V-fluoresceína permite diferenciar las células apoptóticas, necróticas y viables, utilizando un microscopio de fluorescencia, y cuantificarlas mediante citometría de flujo.

Durante las fases iniciales de la apoptosis se producen cambios en la superficie celular. Uno de éstos es la alteración de la membrana plasmática, donde se produce una translocación de la fosfatidilserina de la cara interna a la cara externa de la membrana. La Anexina-V es una proteína dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  que une fosfolípidos cargados negativamente, con alta afinidad a la fosfatidilserina (Vermes et al., 1995). La fosfatidilserina también se encuentra en la cara externa de la membrana de las células necróticas. La Anexina-V se utiliza para diferenciar las células apoptóticas (durante las fases iniciales del proceso) y necróticas, de las células viables donde la fosfatidilserina se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática.

La integridad de la membrana plasmática se ve comprometida en las células necróticas, de manera que al teñirlas con yoduro de propidio, este puede acceder al núcleo celular y unirse al DNA. La tinción simultánea con yoduro de propidio y Anexina-V permite discriminar las células apoptóticas de las necróticas, y de las células viables (Vermes et al., 1995) (Tabla M2). Las células viables no presentan translocación de la fosfatidilserina ni rotura de la membrana plasmática y son dobles negativas para

tinción. Las células en fases iniciales de la apoptosis son positivas para la Anexina-V y negativas para el yoduro de propidio, ya que tienen translocada la fosfatidilserina pero mantienen la membrana íntegra. Las células necróticas presentan translocación de la fosfatidilserina y rotura de la membrana y, por lo tanto, son doble positivas para la tinción.

**Tabla M2.** Patrón de tinción de las células viables, apoptóticas y necróticas, teñidas con yoduro de propidio y anexina-V.

	VIABLES	APOPTÓTICAS	NECRÓTICAS
Tinción con Anexina-V	-	+	+
Tinción con yoduro de propidio	-	-	+

Se utilizó el *kit* Anexina-V-FLUOS Staining (Boehringer Mannheim) para analizar cuantitativamente las células viables, apoptóticas y necróticas, mediante citometría de flujo, y para determinar las morfologías celulares, usando microscopía de fluorescencia tras el tratamiento con antitumorales.

### Procedimiento

- 1) Sacar las muestras a diferentes tiempos de tratamiento y sus controles y lavar  $1 \times 10^6$  células con 5 ml de PBS.
- 2) Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado con 100  $\mu$ l de solución de tinción (20  $\mu$ l de solución de Anexina-V-Fluoresceína y 20  $\mu$ l de solución de yoduro de propidio por cada ml de tampón Hepes utilizado).
- 3) Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente y añadir 0.5 ml de tampón Hepes.
- 4) Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo Coulter Epics-XL (Serveis Científico-Tècnics, Universitat de Barcelona). Se utilizó una longitud de onda de 488 nm y un filtro de 515 nm para la detección de la fluoresceína y un filtro de más de 600 nm para la detección del yoduro de propidio.

También realizamos preparaciones para observar las células teñidas con un microscopio de fluorescencia. Se utilizó un microscopio de fluorescencia Axiophot (Carl Zeiss). Para observar los núcleos de las células teñidas, se lavaban con PBS y se

resuspendían los precipitados en una solución 100 mg/ml naranja de acridina (Sigma) en PBS pH 7.4.

### **Soluciones y Materiales**

#### **Componentes del kit Anexina-V-FLUOS**

- Solución Anexina-V-Fluoresceína.
- Solución yoduro de propidio.
- Tampón Hepes (*Binding Buffer*).

#### **Componentes adicionales**

- 10x PBS (ver 3.2.3).

### **Observaciones**

Las muestras se tienen que analizar inmediatamente después de realizar la tinción debido a que las células no están fijadas.

#### **3.4.2.4. Análisis de la muerte por catástrofe mitótica**

##### **• Detección de células poliploides**

Se utilizó la tinción con yoduro de propidio para comparar los cambios en la distribución del ciclo celular inducido por fármacos, analizándolos cuantitativamente en un citómetro de flujo convencional (ver apartado 3.4.1.1.). Además, utilizamos un LSC (*laser scanning cytometer*) para obtener imágenes de las perturbaciones del ciclo inducidos por Antraciclinas. El LSC permite obtener los mismos datos que un citómetro de flujo convencional, pero pudiendo trabajar con volúmenes pequeños de muestra, colocada en un portaobjetos. El LSC ofrece la ventaja de poder relocalizar, visualizar y fotografiar las células de interés, en nuestro caso, células poliploides. El LSC recoge la señal emitida de las células teñidas con yoduro de propidio, que será mayor o menor según el contenido de DNA (ploidía). Las señales recogidas se digitalizan y se crean imágenes basadas en píxeles. Se configuró el LSC para que reconociera *clusters* de píxeles con un umbral mínimo como células con ploidía 2n. De esta manera, los clusters con un valor múltiplo respecto al umbral se identificaron como células 4n, 8n, etc.

## **Procedimiento**

Las muestras se tiñeron con yoduro de propidio tal y como se ha descrito en el apartado 3.4.1.1., se colocaron en un portaobjetos y se analizaron en un LSC. La observación morfológica de células poliploides multinucleadas se realizó mediante un LSC CompuCyte (Serveis Científico-Tècnics, Universitat de Barcelona), usando una longitud de onda de 665-685 para la detección de la fluorescencia del yoduro de propidio. Para la localización y la obtención de imágenes correspondientes a células poliploides, se utilizó el *software* WinCyte 3.4 (CompuCyte).

### **• Detección de mitosis aberrantes**

La tinción de cromosomas permite diferenciar células en interfase de células en proceso de división, así como la detección de las diferentes fases mitóticas. Se utilizó esta tinción para detectar aberraciones mitóticas en las células tratadas con antitumorales.

### **Procedimiento para células en suspensión**

- 1) Sacar las muestras a diferentes tiempos de tratamiento y sus controles.
- 2) Centrifugar los cultivos a 1.000 rpm durante 5 minutos.
- 3) Añadir gota a gota un volumen equivalente a la cantidad de cultivo inicial de suero hipotónico con 4 gotas de solución de Carnoy, agitando el tubo en el vórtex.
- 4) Centrifugar los tubos a 1.000 rpm durante 5 minutos y eliminar el sobrenadante.
- 5) Fijar con 5 ml de solución de Carnoy.
- 6) Centrifugar (queda un sedimento blanco) y eliminar el sobrenadante.
- 7) Repetir la fijación.
- 8) Resuspender el sedimento blanco en 15 gotas de solución de Carnoy.
- 9) Preparar la extensión en portaobjetos previamente desengrasados con etanol y secos. Tirar una gota de la solución desde la máxima altura posible. Dejar secar a 37°C.
- 10) Teñir con solución de Leishman durante 6 minutos y lavar con agua.
- 11) Observar al microscopio óptico.

### **Procedimiento para células adherentes**

- 1) Sacar las muestras a diferentes tiempos de tratamiento y sus controles. Las células se subcultivaron en Slideflasks (Nunc, Brand) para obtener el crecimiento celular directamente sobre un portaobjetos.



- 2) Eliminar el medio de cultivo e incubar con solución hipotónica durante 30 minutos a 37°C.
- 3) Eliminar la solución hipotónica y fijar la muestra con solución de Carnoy: solución hipotónica (1:1) durante 5 minutos.
- 4) Desmontar el frasco para obtener el portaobjetos y añadir solución de Carnoy, gota a gota, desde la máxima altura posible. Dejar secar a 37°C.
- 5) Proceder a la tinción con solución de Leishman, tal y como se ha descrito en el apartado anterior.

### Soluciones

- Solución hipotónica: 75 mM KCl en agua bidestilada.
- Solución de Carnoy: ácido acético:metanol (1:3).
- Solución de Gurr-Leishman en metanol (BDH).

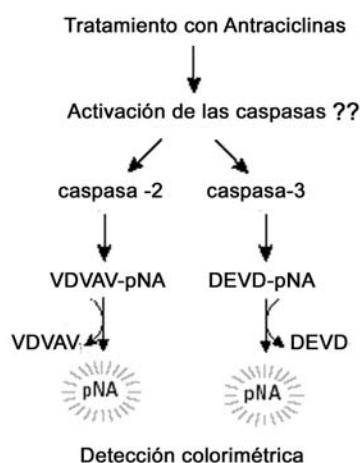
#### 3.4.2.5. Análisis de la activación de las caspasas -2 y -3

Utilizamos los *kits* Caspase-2/Ich-1 Colorimetric Assay (MBL) y ApoAlert™ Caspase-3 Colorimetric Assay (BD Biosciences) para determinar si los diferentes tratamientos con Antraciclinas inducían la activación de las caspasas -2 y -3. Cuando estas proteasas se activan reconocen las secuencias aminoacídicas VDVAV y DEVD de sus sustratos, respectivamente. Los ensayos realizados se basan en la detección espectrofotométrica del cromóforo *p*-nitroanilina (*p*NA), que se libera cuando las caspasas -2 y -3 se activan y procesan los sustratos marcados VDVAV-*p*NA y DEVD- *p*NA (Figura M3).

### Procedimiento

- 1) Resuspender  $2-5 \times 10^6$  células tratadas con Antraciclinas o sin tratar en 50 µl de tampón de lisis. Incubar las células en hielo durante 10 minutos.
- 2) Centrifugar a 10.000 xg durante 1 minuto.
- 3) Transferir el sobrenadante a tubos de microcentrífuga nuevos y determinar la concentración de proteínas, mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) y apartado 3.7.4.2 de esta memoria.
- 4) Diluir los extractos con tampón de lisis para obtener 100-250 µg de proteínas en 50 µl de tampón y disponer las muestras en una placa de microtitulación de 96 pocillos.
- 5) Añadir a cada muestra 50 µl de tampón de reacción 2X, conteniendo 10 mM DTT.

- 6) Añadir a cada muestra 5  $\mu$ l de los sustratos VDVAV-*p*NA (caspasa-2) ó DEVD-*p*NA (caspasa-3). Incubar durante 1-3 horas.
- 7) Leer la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro. El *p*NA libre se cuantificó a 405 nm, utilizando un lector de placas de microtitulación Spectra MAX-250 (Molecular Devices) y el programa SoftMax@Pro.



**Figura M3.** Principio de los ensayos colorimétricos para la detección de la activación de las caspasas – 2 y –3. Las proteasas activadas reconocen y procesan los sustratos VDVAV y DEVD marcados con el cromóforo *p*NA, que se libera. La actividad caspasa es proporcional a la cantidad de *p*NA libre, que se puede cuantificar espectrofotométricamente a 405 nm.

## Soluciones y Materiales

### Componentes de los kits

- Tampón de lisis.
- Tampón de reacción 2X.
- Sustratos de las caspasas 2 y 3: VDVAD-*p*NA (caspasa-2) y DEVD- *p*NA (caspasa-3), a 4 mM.
- 1M DTT.

### 3.5. ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTITUMORALES EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7/VP

#### 3.5.1. Ensayos para determinar la proliferación celular

En este trabajo, hemos realizado dos tipos de ensayo para determinar si las células MCF-7/VP eran resistentes a ciertos tratamientos. Están basados en la determinación de la capacidad proliferativa de las células tratadas, con respecto a las células sin tratar (control).

##### 3.5.1.1. Ensayo clonogénico

El ensayo clonogénico se basa en el subcultivo diluido de las células, de modo que se pueden detectar células individuales. La capacidad proliferativa viene determinada por la capacidad de las células individuales de dividirse y formar colonias. Consideramos que las células eran capaces de dividirse cuando el número de colonias con más de 50 células respecto al número total de colonias era comparable en las células tratadas y control (Brown and Wouters, 1999). El ensayo clonogénico siempre se realizó en paralelo al recuento de células, de viabilidad y de porcentaje de confluencia de los cultivos.

#### Procedimiento

- 1) Diluir las células tratadas con Antraciclinas y sin tratar (ver 3.3.2.) y subcultivarlas a una densidad de  $1 \times 10^4$  células por cada 6 cm de placa de cultivo. Incubar 24 horas a 37°C, en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>.
- 2) Observar las placas en un microscopio invertido para asegurarnos que tenemos células individuales.
- 3) Incubar varios días (los necesarios como para que, asumiendo que las células sin tratar se dividen con normalidad cada 24 horas, lleguen a formar colonias de por lo menos 50 células). Realizar los cambios de medio de cultivo cada vez que lo requieran las células (rutinariamente cada 2-3 días).
- 4) Eliminar el medio de cultivo y añadir el volumen necesario de azul de tripano diluido 1/3 en PBS como para que se cubra la placa.
- 5) Contar el número de colonias, el número de células por colonia y la viabilidad en diferentes campos, utilizando un microscopio óptico.

### Soluciones y Materiales

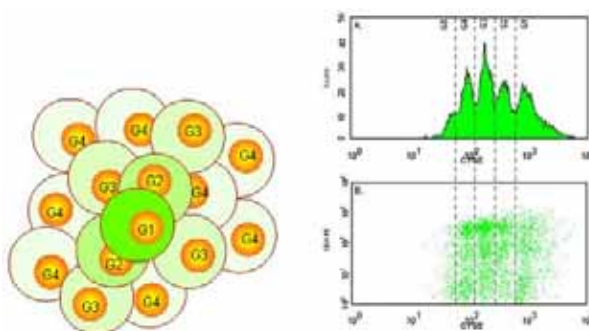
- 10x PBS estéril (ver 3.2.3).
- 1% azul de tripano (Sigma) en PBS.

#### 3.5.1.2. Tinción con CFSE

La tinción con CFSE permite hacer un seguimiento de la proliferación celular (Parish, 1999). El CFDASE (carboxifluoresceindiacetato succinimidil éster) es una molécula no fluorescente que atraviesa la membrana plasmática por transporte pasivo y se acumula en el citoplasma. Las esterasas citoplasmáticas presentes en las células procesan los grupos carboxilo del CFDASE, convirtiéndolo en CFSE (carboxifluoresceinsuccinimidil éster). El CFSE es una molécula fluorescente que no puede atravesar la membrana plasmática, quedando retenida en el interior de la célula. Tal y como se esquematiza en la Figura M4, cuando una célula que ha incorporado CFSE se divide, el colorante se reparte uniformemente a las células hijas. La intensidad de la fluorescencia emitida por el CFSE intracelular se reduce a la mitad tras cada división celular, pudiéndose monitorizar mediante citometría de flujo.

#### Procedimiento

- 1) Recoger  $1 \times 10^5$ - $10^6$  células tratadas con Antraciclinas (ver 3.3.2.) y resuspender en 2 ml de PBS estéril.
- 2) Añadir 2  $\mu$ l de 5 mM CFSE por cada ml de PBS (concentración final de 10  $\mu$ M).
- 3) Incubar durante 10 minutos a 37°C para que actúen las esterasas intracelulares, moviendo los frascos cada 2-3 minutos para uniformizar la tinción.
- 4) Añadir 5 volúmenes de medio completo frío.
- 5) Incubar durante 5 minutos en hielo.
- 6) Lavar tres veces con medio de cultivo o PBS.
- 7) Subcultivar las células con medio de cultivo atemperado e incubar a 37°C durante 3 días.
- 8) Tripsinizar y resuspender las células en 0.5 ml de PBS.
- 9) Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo Coulter Epics-XL (Serveis Científico-Tècnics, Universitat de Barcelona), usando una longitud de onda de 488 nm y un filtro de 525 nm.



**Figura M4.** Principio de la tinción con CFSE. El CFSE se acumula en el interior de las células y se convierte en un compuesto fluorescente por la acción de las esterasas intracelulares. Cuando las células teñidas con CFSE se dividen, el colorante se reparte de manera equitativa entre las células hijas. Como consecuencia de la proliferación celular, la intensidad de la fluorescencia se reduce a la mitad en cada generación, pudiéndose analizar mediante un citómetro de flujo.

### Soluciones y Materiales

- 10x PBS estéril (ver 3.2.3).
- 5mM CFSE (Molecular Probes).

### 3.5.2. Análisis de la expresión de proteínas asociadas a resistencia

Analizamos el efecto de los antitumorales WP631 y Doxorubicina sobre la expresión de las proteínas asociadas a resistencia MDR-1 y MRP-1. El análisis se realizó a dos niveles: análisis transcripcional, que se detallará más adelante en otro apartado de este trabajo, y análisis de la actividad de las proteínas MDR-1 y MRP-1, detallado a continuación.

#### 3.5.2.1. Determinación de la actividad de las proteínas asociadas a resistencia a antitumorales

Se utilizó el *kit* MultiDrugQuant<sup>TM</sup> (Chemicon International) para determinar la actividad de las proteínas MDR-1 y MRP-1 en células MCF-7/VP tratadas con Antraciclinas. El ensayo está basado en la incubación de las células con el colorante calceína AM (calceína acetoximetil éster) en presencia y en ausencia de inhibidores selectivos de MDR-1 y MRP-1, y en la determinación posterior, utilizando un citómetro de flujo, de las intensidades de fluorescencia.

La calceína AM es un compuesto fluorógeno hidrofóbico que atraviesa la membrana plasmática de las células de forma pasiva. Una vez en el citoplasma, las esterasas intracelulares hidrolizan la calceína AM, dando lugar a un derivado

fluorescente (calceína libre). Al ser hidrofílico, el derivado no puede atravesar libremente la membrana plasmática y queda atrapado en el interior de las células. Como la calceína AM es un buen sustrato de las proteínas transportadoras MDR-1 y MRP-1, la acumulación intracelular de la calceína AM se reduce cuando las células sobreexpresan estas proteínas.

### Procedimiento

- 1) Contar las células y preparar una suspensión que contenga  $2-5 \times 10^6$  células en 8 ml de tampón de reacción.
- 2) Preparar 9 reacciones para cada muestra de la siguiente manera:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Inhibidor 1</i>	+	+	+						
<i>Inhibidor 2</i>				+	+	+			
Sin inhibidores							+	+	+

- Para cada reacción, añadir 800  $\mu$ l de la suspensión celular en tubos de microcentrífuga.
  - Añadir 5  $\mu$ l del *Inhibidor 1* en los tubos 1-3, 5  $\mu$ l de *Inhibidor 2* en los tubos 4-6, mezclar bien e incubar los nueve tubos a 37°C durante 5 minutos.
  - Añadir 200  $\mu$ l de la solución de calceína AM a cada tubo, mezclar bien e incubar a 37°C durante, exactamente, 10 minutos.
  - Detener la reacción centrifugando las muestras a 2000 xg durante 1 minuto.
  - Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 0.5 ml de solución de yoduro de propidio.
- 3) Determinar la intensidad de la fluorescencia de la calceína intracelular en las muestras en un citómetro de flujo y calcular la actividad MDR-1 y MRP-1 de las muestras.

Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo Coulter Epics-XL (Serveis Científico-Tècnics, Universitat de Barcelona) usando un láser de argón azul (488 nm, 15 mW) y detectando la fluorescencia del yoduro de propidio a 665-685 nm. La medida de la calceína intracelular se realizó sobre la población de células vivas (yoduro de propidio negativas), detectando la fluorescencia a 488 nm.

Los valores de fluorescencia media obtenidos en cada caso, nos permitieron calcular la actividad las proteínas MDR-1 y MRP-1, utilizando las siguientes ecuaciones:

1.  $MAF_T = 100 \times (F_{max} - F_o) / F_{max}$ , para determinar la actividad total.
2.  $MAF_{MRP} = 100 \times (F_{MRP} - F_o) / F_{max}$ , para determinar la actividad de MRP-1.
3.  $MAF_{MDR} = MAF_T - MAF_{MRP}$ , para determinar la actividad de MDR-1.

Siendo,  $F_{max}$  la fluorescencia media de los tubos 1-3,  $F_{MRP}$  la fluorescencia media de los tubos 4-6 y  $F_o$  la fluorescencia media de los tubos 7-9.

## Soluciones y Materiales

### Componentes del *kit MultiDrugQuant*<sup>TM</sup> (Chemicon International)

- Calceína-AM liofilizada (se reconstituye con DMSO).
- *Inhibidor 1* (inhibidor de las proteínas MDR-1 y MRP-1).
- *Inhibidor 2* (inhibidor de la proteína MRP-1).
- Yoduro de propidio (se disuelve en agua miliQ).
- DMSO.
- *10x Reaction Buffer*.
- $NaHCO_3$ .

## 3.6. MEDIDA DE LA ACUMULACIÓN INTRACELULAR DE ANTRACICLINAS

Los cromóforos emiten fluorescencia cuando se excitan a determinada longitud de onda. Utilizamos esta propiedad para determinar, utilizando un espectrofluorímetro, las cinéticas de incorporación de los fármacos en el interior de las células. La acumulación intracelular de Daunorubicina, Doxorubicina y WP631 a diferentes tiempos de tratamiento se determinó siguiendo el método descrito por Horowitz (Horowitz et al., 1992), con modificaciones.

### Procedimiento

- 1) Sacar las muestras a diferentes tiempos de tratamiento y sus controles.
- 2) Después de 4 horas de tratamiento con el fármaco sacar un frasco junto con su control (células sin tratar). Lo mismo a las 48, 72 y 96 horas de incubación.

3) Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos y eliminar el sobrenadante (células en suspensión) o lavar tres veces el precipitado con medio de cultivo RPMI frío para eliminar el fármaco no incorporado (células adherentes).

4) Lavar dos veces el precipitado con medio de cultivo RPMI frío para eliminar el fármaco no incorporado (células en suspensión) o desenganchar las células del frasco con ayuda de un rascador (células adherentes).

5) Resuspender las células en 5 ml de medio de cultivo frío (células en suspensión y adherentes) y guardar 100 µl del cultivo para hacer el recuento de viabilidad (ver apartado 3.4.2.1.). Con el resto, proseguir con el procedimiento:

- Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante
- Resuspender los precipitados en 2.5 ml de 0.08 M HCl en isopropanol
- Lisar las células en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos para liberar el fármaco intracelular
- Mantener las células a 4°C protegidas de la luz hasta el día siguiente
- Centrifugar a 10.000 xg durante 20 minutos a 4°C

En el sobrenadante queda el fármaco intracelular y en el precipitado, los restos de la lisis celular, y el fármaco unido a membrana

- Determinar la fluorescencia emitida por el fármaco intracelular (proporcional a la cantidad de fármaco incorporado) con un espectrofluorímetro. Se utilizó un espectrofluorímetro Shimadzu RF1505, a unas longitudes de onda de excitación y emisión de 480 y 555 nm respectivamente.

- Corregir los valores de fluorescencia emitidos para cada tratamiento por la fluorescencia emitida por las células control (blanco).

- Cuantificar la cantidad acumulada de fármaco intracelular a partir de la construcción de rectas patrón correspondientes a la Daunorubicina, la Doxorubicina y la WP631.

6) Una vez determinados los valores de viabilidad y de acumulación intracelular de la Antraciclinas, representar las cantidades de fármaco incorporadas en ng equivalentes (el fármaco y sus metabolitos) por cada  $10^7$  células viables.

### **Soluciones y Materiales**

- Medio de cultivo RPMI-1640 suplementado (ver 3.2.3).



- 0.08M isopropanol en HCl.
- 1% azul de tripano en PBS.
- Cámara de Neubauer (Brand).

### 3.7. MÉTODOS GENERALES PARA LA EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y PROTEÍNAS

#### 3.7.1. Obtención de DNA plasmídico

##### 3.7.1.1. Transformación

Las transformaciones de los plásmidos se realizaron utilizando la cepa de *E.coli* DH-5 $\alpha$  competente. La preparación de células competentes se realizó previamente mediante el método del cloruro de rubidio (Hanahan, 1983).

#### Procedimiento

- 1) Añadir 100  $\mu$ l de células competentes a un tubo de microcentrífuga conteniendo el DNA plasmídico.
- 2) Incubar durante 15 minutos en hielo.
- 3) Incubar las células a 37°C durante 15 minutos para provocar un choque térmico que permita que las células incorporen el DNA.
- 4) Incubar durante 2 minutos en hielo.
- 5) Añadir 800  $\mu$ l de SOC.
- 6) Incubar a 37°C durante 30 minutos.
- 7) Sembrar en placas con medio selectivo (LB agar con antibiótico).

#### Soluciones y Materiales

- LB-agar medio selectivo: Medio Luria Bertani (1% bactotripton, 0.5% extracto de levadura, 1% cloruro sódico, 2% agar; autoclavar y añadir 50  $\mu$ g/ml de ampicilina).
- SOC: 2% tripton, 0.5% extracto de levadura; autoclavar y añadir 25% 1M KCl, 1% 1M MgCl<sub>2</sub>, 1% 1M MgSO<sub>4</sub>, 0.2% 5 M NaCl.

### 3.7.1.2. Minicultivos

Las placas obtenidas se utilizaron para picar colonias aisladas e inocularlas en minicultivos. A partir de los minicultivos era posible obtener glicerizados para conservar *stocks* de células transformadas con los plásmidos de interés o para obtener los plásmidos a pequeña o gran escala.

#### Procedimiento

- 1) Picar una colonia aislada de cada placa e inocular en tubos de LB-ampicilina.
- 2) Incubar a 37°C durante 16 horas, en agitación constante.
- 3) Utilizar los minicultivos para hacer glicerizados o para obtener los plásmidos a pequeña o gran escala.

#### Soluciones y Materiales

- LB selectivo: Medio Luria Bertani (1% bactotriptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl; autoclavar y añadir 50 µg/ml de ampicilina).

### 3.7.1.3. Glicerizados

#### Procedimiento

- 1) Pipetear 980 µl de cada minicultivo en un criotubo estéril y añadir 980 µl de solución de glicerizado.
- 2) Guardar a -80°C hasta el momento de su utilización.

#### Soluciones y Materiales

- Solución de glicerizado: 65% glicerol, 0.1 M MgSO<sub>4</sub>, 25 mM Tris·HCl (pH 8.0).

### 3.7.1.4. Obtención de plásmidos a pequeña escala: Minipreps

La obtención de DNA plasmídico a pequeña escala se realizó siguiendo el método de lisis por ebullición (Holmes, 1981). Consiste en abrir la pared bacteriana utilizando un tratamiento conjunto con lisozima, un detergente no aniónico y calor. El cromosoma bacteriano queda unido a la pared, mientras que el DNA plasmídico se libera al medio.

### Procedimiento

- 1) Picar una colonia de la placa e inocular en un tubo con 2-5 ml de LB conteniendo el antibiótico selectivo apropiado (minicultivo). Incubar a 37°C durante 16 horas en continua agitación.
- 2) Transferir el minicultivo a un tubo de microcentrífuga.
- 3) Centrifugar a 14.000 rpm durante 20 segundos en una microcentrífuga. Eliminar el sobrenadante.
- 4) Resuspender el sedimento en 0.7 ml de STET. Colocar en hielo.
- 5) Añadir 25 µl de una disolución de lisozima. Incubar en hielo durante 5 minutos.
- 6) Llevar a ebullición durante 2 minutos.
- 7) Obtener el sobrenadante (DNA plasmídico) y precipitar con 0.7 ml de isopropanol durante 20 minutos a -20°C.
- 8) Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos en una microcentrífuga.
- 9) Lavar el sedimento con 70% etanol.
- 10) Dejar secar el sedimento a temperatura ambiente y resuspender en 100 µl de TE.

### Soluciones y Materiales

- LB selectivo: Medio Luria Bertani (ver 3.7.1.2.).
- STET: 8% sacarosa, 5% Triton X-100, 17 g/l EDTA, 6g/l Tris·HCl (pH 8.0).
- Isopropanol
- 1x TE: 10mM Tris·HCl, 1mM EDTA (pH 8.0).

#### 3.7.1.5. Obtención de plásmidos a gran escala: Maxipreps

La obtención de DNA plasmídico a gran escala se realizó utilizando el *kit* Nucleobond Nucleic Acid Purification Tools (BD Clontech), basado un método de lisis alcalina, donde se abre la pared bacteriana utilizando cambios de pH.

### Procedimiento

- 1) Picar una colonia de la placa (ó 10 µl del glicerinado) e inocular en un tubo con 2-5 ml LB, conteniendo el antibiótico selectivo apropiado (cultivo *starter* –minicultivo-). Incubar 6-8 horas a 37°C en agitación.

- 2) Diluir el minicultivo en 500 ml de LB, conteniendo el antibiótico selectivo apropiado (maxicultivo). Incubar durante 16 horas a 37°C en agitación.
- 3) Centrifugar el cultivo a 6000 xg, 15 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante.
- 4) Resuspender el precipitado en 24 ml de tampón S1 (con RNasa A), pipeteando o vorteando para asegurar una lisis eficiente.
- 5) Añadir 24 ml de tampón S2, mezclar por inversión 6-8 veces. Incubar a RT 2-3 minutos (5 minutos como máximo).
- 6) Añadir 24 ml de tampón S3, mezclar por inversión 6-8 veces. Incubar en hielo 15 minutos.
- 7) Decantar el lisado sobre un embudo colocado en un erlenmeyer, que contiene un filtro del *kit*. Mientras tiene lugar la filtración (unos 5 minutos), proceder al paso 8).
- 8) Equilibrar la columna con 12 ml del tampón N2 (una vez añadido el tampón la columna puede quedar desatendida porque no se seca la resina).
- 9) Pasar el lisado filtrado por la columna equilibrada.
- 10) Lavar tres veces la columna con 16 ml de tampón N3.
- 11) Eluir el plásmido con 15 ml de tampón N5 y recogerlo en tubos de polipropileno.
- 12) Precipitar los plásmidos con 11 ml de isopropanol a RT. Mezclar y centrifugar inmediatamente a 15000g durante 30 minutos a 4 °C. Descartar el sobrenadante.
- 13) Lavar el precipitado con 5 ml de 70% etanol frío. Centrifugar a 15000g durante 10 minutos a 4°C. Descartar el sobrenadante.
- 14) Secar el precipitado a RT (5-10 minutos) y disolverlo en 400 µl de TE, pH 8,0.

## **Soluciones y Materiales**

### **Componentes del kit Nucleobond Nucleic Acid Purification Tools**

- Tampón S1 (tampón de resuspensión): 50 mM Tris·HCl, 10 mM EDTA, 100 mg/ml RNasa A.
- Tampón S2 (tampón de lisis): 200 mM NaOH, 1% SDS.
- Tampón S3 (tampón de neutralización): 2.8 M KAc (pH 5.1).
- Tampón N2 (tampón de equilibrado de la columna): 100 mM Tris·HCl, 15 % etanol, 900 mM KCl, 0.15 % Triton X-100 (pH ajustado a 6.3 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>).
- Tampón N3 (tampón de lavado de la columna): 100 mM Tris·HCl, 15 % etanol, 1.15 M KCl (pH ajustado a 6.3 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>).

- Tampón N5 (tampón de elución): 100 mM Tris·HCl, 15 % etanol, 1.15 M KCl (pH ajustado a 8.5 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>).
- Columnas de polipropileno, conteniendo la resina AX-silica.
- Filtros.

### **Componentes adicionales**

- LB selectivo: Medio Luria Bertani (ver 3.7.1.2.).
- 70% etanol.
- 1x TE (ver 3.7.1.4.).

## **3.7.2. Obtención de RNA total**

### **3.7.2.1. Extracción de RNA**

La obtención y purificación de RNA total se realizó con el reactivo UltraSpecRNA (Biotecx). El RNA total se utilizó para determinar los efectos sobre la transcripción de las Antraciclinas Daunorubicina y Doxorubicina y la Bisantraciclina WP631 en las diferentes líneas celulares.

## **Procedimiento**

1) Homogenización:

### Células en suspensión

- Centrifugar a 1.000 rpm durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante.
- Lisar las células con el reactivo UltraspecRNA (1 ml/5-10 x 10<sup>6</sup> células) y la ayuda de una pipeta, primero, y una jeringuilla con una aguja de 20 G, después.

### Células adherentes

- Eliminar el sobrenadante.
- Lisar las células directamente con el reactivo UltraspecRNA (1 ml/3.5 cm frasco de cultivo) y la ayuda de una pipeta, primero, y una jeringuilla con una aguja de 20 G, después.

2) Extracción de RNA total:

- Mantener el homogenado durante 5 minutos en hielo para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos.
- Añadir cloroformo-álcohol isoamílico (24:1) al homogenado (0.2 ml de cloroformo/ 1 ml de reactivo UltraSpecRNA), agitar vigorosamente durante 15 segundos y mantener en hielo durante 5 minutos.

- Centrifugar a 14.000 rpm a 4°C, durante 15 minutos en una microcentrífuga.

Después de la adición del cloroformo y de la centrifugación el homogenado forma dos fases: la fase inferior (orgánica) y la fase superior (acuosa). Las proteínas y el DNA se encuentran en la fase orgánica y en la interfase, mientras que el RNA está en la fase acuosa.

### 3) Precipitación del RNA:

- Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo, añadir 1 volumen igual de isopropanol y pipetear repetidamente. Mantener en hielo durante 10 minutos.

- Centrifugar a 14.000 rpm a 4°C, durante 10 minutos en una microcentrífuga.
- Eliminar el sobrenadante. El RNA precipita formando un precipitado después de centrifugar.

### 4) Lavado del RNA:

- Lavar el precipitado 2 veces con 75% etanol (1 ml de etanol/ ml de reactivo utilizado).
- Centrifugar a 14.000 rpm a 4°C, durante 5 minutos en una microcentrífuga.
- Eliminar el etanol lo máximo posible sin llegar a secar el precipitado completamente, ya que disminuye su solubilidad a la hora de resuspenderlo.
- Resuspender el precipitado en un pequeño volumen de H<sub>2</sub>O libre de RNasas (H<sub>2</sub>O DEPC) y proceder a la cuantificación de la concentración de RNA (ver apartado 3.10.2).

## Soluciones

- Reactivo UltraspecRNA (Biotecx).
- Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1).
- Isopropanol.
- 75% etanol.
- H<sub>2</sub>O DEPC: agua libre de RNasas: realizar una dilución 1/500-1/100 de DEPC (dietilpirocarbonato, Sigma) en agua miliQ, en una campana de flujo laminar, agitar de 4 a 16 horas con un agitador magnético y autoclavar dos veces para inactivar los restos de DEPC.

## Observaciones

- Trabajar en condiciones *RNase-free* (trabajar con guantes, autoclavar el material y preparar las soluciones necesarias con H<sub>2</sub>O DEPC) para evitar la degradación del RNA.

- Para reducir la posibilidad de una degradación del RNA, no lavar las células antes de añadir el reactivo UltraSpecRNA.
- El reactivo UltraSpecRNA contiene productos tóxicos (fenol) e irritantes (sales de guanidinio). Es necesario trabajar con guantes y en una campana de flujo.
- El DEPC se considera un agente carcinógeno. Por este motivo es necesario utilizar guantes y trabajar en una campana de flujo.

### 3.7.2.2. Tratamiento con DNasa I

Para eliminar posibles contaminaciones con DNA genómico, que pudieran interferir a la hora de analizar los cambios en los perfiles de expresión génica inducidos por Antraciclinas, se trataron las muestras de RNA total con DNasa I libre de RNasas.

#### Procedimiento

##### 1) Digestión con DNasa I:

- Preparar en tubos de microcentrífuga la siguiente reacción para cada muestra:

	<u>Por reacción</u>
RNA total	100 µl
10x tampón DNasaI	1 µl
1U/µl DNasaI	10 µl
H <sub>2</sub> O DEPC	0.5 µl

- Incubar las reacciones a 37°C durante 30 minutos.
- Añadir 100 µl de 10x *Mix* de Terminación a cada muestra y mezclar bien, pipeteando repetidamente.

##### 2) Eliminación de la DNasa I:

- Añadir 1 volumen igual de fenol ácido y agitar vigorosamente con un vórtex.
- Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.
- Transferir la fase acuosa (fase superior) a tubos de microcentrífuga nuevos.

- Añadir 1 volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y vortear vigorosamente.
- Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.
- Transferir la fase acuosa (fase superior) a tubos de microcentrífuga nuevos.

3) Precipitación con isopropanol (ver apartado 3.7.2.1.).

4) Lavados y resuspensión del precipitado (ver apartado 3.7.2.1.).

### Soluciones

- 1U/ $\mu$ l DNasa I libre de RNasas (BD Clontech).
- 10x tampón para DNasa I: 400 mM Tris·HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 60 mM MgCl<sub>2</sub>.
- 10x *mix* de terminación: 0.1 M EDTA (pH 8.0), 1mg/ml glicógeno.
- Fenol ácido: fenol a pH 4.3  $\pm$ 0.2 saturado con 0.1 M tampón citrato (Sigma). Se añadió 1 mg 8-hidroxiquinoleina (Fluka) por ml y 0.5 ml  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma) por litro.
- Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1).
- Isopropanol.
- 75% etanol, en H<sub>2</sub>O DEPC (ver 3.7.2.1.).

### 3.7.3. Análisis de la calidad y la concentración de los ácidos nucleicos

#### 3.7.3.1. Electroforesis en gel de agarosa

##### • Geles de agarosa para el análisis de DNA

La electroforesis en gel de agarosa se utilizó como método general para el análisis de DNA plasmídico, y para separar, identificar y purificar fragmentos de DNA. El porcentaje de agarosa en los geles variaba del 1 al 4%, en función del tamaño de los fragmentos a separar.

El análisis del DNA plasmídico en un gel de agarosa no desnaturizante, pone de manifiesto las tres formas básicas en que se encuentran los plásmidos tras su extracción, según el estado de enrollamiento del DNA: superenrollado (plásmido intacto), *nickado*



(plásmido con un *nick* en una de sus cadenas) y lineal (plásmido con las dos cadenas rotas). Cuando se separa el DNA plasmídico en un gel de agarosa, las tres formas corren a diferente velocidad, ya que el estado de enrollamiento determina que pasen a través de los poros de agarosa con mayor o menor dificultad. Cuando se tiñen los geles con bromuro de etidio, la banda correspondiente al DNA superenrollado es la más abundante en muestras de calidad.

### Procedimiento

- 1) Cargar unos 2  $\mu\text{g}$  de DNA en un gel del 1% agarosa con TBE y separar las muestras.
- 2) Teñir el gel durante 10 minutos con 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bromuro de etidio en TBE o agua, desteñir durante 15 minutos con agua y analizar.

### Soluciones y Materiales

- Agarosa (Boehringer Mannheim).
- 10x TBE: 0.89 M Tris-borato, 0.02M EDTA (pH 8.0), en agua miliQ.
- Bromuro de etidio (10 mg/ml).

### • Geles de agarosa para el análisis de RNA

Cuando se analiza una población de RNA total mediante la electroforesis en un gel desnaturante de formaldehído/agarosa, el mRNA produce un *smear* de 0.5 a 12 kb, mientras que el rRNA forma dos bandas claras de 4.5 y 1.9 kb, que corresponden a los rRNAs de 28S y 18S, respectivamente. La relación de intensidades de estas bandas, cuando se tiñen los geles con bromuro de etidio, es de 1.5-2.5:1 en una muestra de RNA sin degradación.

### Procedimiento

- 1) Tratar los peines y la cubeta de electroforesis con 10N NaOH durante toda la noche para eliminar las RNAsas.
- 2) Preparar un gel de agarosa desnaturante (1,2 % agarosa, 2M formaldehído y el volumen necesario de tampón 10x MOPS para que quede a una concentración final de 1x, en  $\text{H}_2\text{O}_2$  DEPC).
- 3) Desnaturalizar las muestras de RNA:

- Pipetear las muestras de RNA (1-2  $\mu\text{g}$ ) en tubos de microcentrífuga autoclavados, y llevarlos con  $\text{H}_2\text{O}_2$  DEPC a un volumen final de 6  $\mu\text{l}$ , si es necesario,. Añadir a cada muestra: 10  $\mu\text{l}$  de formamida desionizada, 4  $\mu\text{l}$  de 37% formaldehído, 2  $\mu\text{l}$  de 10x MOPS y 1  $\mu\text{l}$  de tampón de carga de RNA.

- Calentar las muestras a 65°C durante 10 minutos y colocar en hielo.

4) Cargar las muestras en los pocillos del gel y separar por electroforesis en MOPS.

5) Teñir el gel durante 10 minutos con 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bromuro de etidio en  $\text{H}_2\text{O}_2$  DEPC, desteñir durante 15 minutos con agua y analizar.

### Soluciones y Materiales

- 10N NaOH
- Agarosa (Boehringer Mannheim).
- 37% formaldehído.
- Formamida desionizada.
- 10x MOPS (pH 7.0): 200 mM MOPS (pH 7.0), 80 mM acetato sódico, 10 mM EDTA; ajustado con 10N NaOH y disuelto en agua miliQ. Esterilizado por autoclavado.
- Tampón de carga de RNA: 0,2% azul de bromofenol, 10 mM EDTA (pH 8.0) y 50% glicerol, en  $\text{H}_2\text{O}_2$  DEPC.
- $\text{H}_2\text{O}$  DEPC (ver 3.7.2.1.).
- Bromuro de etidio (10 mg/ml).

### Observaciones

Debido a la toxicidad de los vapores del formaldehído, es recomendable preparar el gel y correr la electroforesis en una campana.

#### 3.7.3.2. Determinación de la concentración y pureza de los ácidos nucleicos

La concentración y pureza los ácidos nucleicos se determinó mediante la lectura espectrofotométrica a 260 y 280 nm. Se puede determinar la concentración de los ácidos nucleicos, considerando que 1 unidad de absorción a 260 nm equivalente 50  $\mu\text{g}$  de DNA de doble cadena por ml y a 40  $\mu\text{g}$  de RNA por ml, mediante las siguientes fórmulas:

$$[\text{DNA}] = A_{260\text{nm}} \times [(50 \mu\text{g RNA/ml}) / A_{260\text{nm}}] \times l \times D$$

$$[\text{RNA}] = A_{260\text{nm}} \times [(40 \mu\text{g RNA/ml}) / A_{260\text{nm}}] \times l \times D$$

Siendo,  $l$  = paso de luz de la cubeta en cm (normalmente 1 cm)

D=factor de dilución

$A_{260\text{nm}}$ = absorbancia a 260 nm

La relación entre  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  permite determinar la calidad (pureza) de los ácidos nucleicos. Se considera que el DNA puro tiene una relación de 1.8, aunque el rango de relaciones comprendidas entre 1.6 y 1.8 se considera un buen grado de pureza de las muestras. De la misma manera, el RNA puro tiene una relación de 2, y consideramos un buen grado de pureza el rango de relaciones comprendidas entre 1.8 y 2 (Sambrook et al., 1989).

### **Procedimiento**

- 1) Coger entre 2 y 4  $\mu\text{l}$  de la solución de DNA o RNA y diluir con 198-196  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada (1:200, v/v).
- 2) Determinar la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro, utilizando cubetas de cuarzo.
- 3) Ajustar la concentración las muestras de RNA a 2.5  $\mu\text{g RNA}/\mu\text{l}$  con  $\text{H}_2\text{O DEPC}$ .

### **3.7.4. Extracción de proteína total**

#### **3.7.4.1. Obtención de extractos proteicos**

##### **Procedimiento**

- 1) Sacar las muestras a diferentes tiempos de tratamiento y sus controles, y obtener las células en forma de precipitado.
- 2) Lavar 2 veces con PBS estéril.
- 3) Resuspender el precipitado en 0.5 ml de tampón de lisis.
- 4) Mantener 30 minutos en hielo.
- 5) Centrifugar a 12.000 g a 4°C durante 10 minutos.
- 6) Guardar el sobrenadante a -80°C.

##### **Soluciones**

- 10x PBS (ver 3.2.3.).
- Tampón de lisis: 50 mM Tris·HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% Nonidet NP-40, 0.1 mM PMSF, 2  $\mu\text{g/ml}$  aprotinina, 1  $\mu\text{g/ml}$  leupeptina, en agua miliQ.

### 3.7.4.2. Determinación de la concentración de proteínas en los extractos

Se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976). Se trata de un método basado en la utilización del reactivo azul de Comassie brillante en condiciones ácidas, que forma complejos con las proteínas y cambia su pico de absorción de 465 a 595 nm.

#### Procedimiento

- 1) Diluir 1/5 el volumen necesario del reactivo para Bradford.
- 2) Preparar las muestras para la recta patrón con cantidades conocidas de BSA: 0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 12 y 14 µg, y las diluciones adecuadas del extracto proteico a valorar.
- 3) Añadir 1 ml de reactivo de Biorad diluido a cada muestra. Incubar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos para que se produzca la reacción.
- 4) Medir la densidad óptica a 595 nm de las muestras en un espectrofotómetro.
- 5) Construir una recta patrón a partir de los resultados obtenidos e intrapolar la concentración de proteínas de los extractos.

#### Soluciones y Materiales

- BSA albúmina sérica bovina (20 mg/ml) (Roche).
- Reactivo para Bradford Biorad Protein Assay (Biorad).

### 3.8. RT-PCR SEMICUANTITATIVA

Se utilizó el *kit* One Step RT-PCR (Qiagen) para estimar de forma semicuantitativa la abundancia relativa de los transcritos de diferentes genes de interés, en referencia a un control interno. La retrotranscripción y la amplificación por PCR se realizaron en una única reacción, utilizando cebadores específicos de gen. En cada reacción se coamplificaban los mRNAs correspondientes al gen constitutivo *GAPDH* (control interno) y al gen de interés, pudiéndose normalizar las señales obtenidas en cada caso. Por este motivo, se diseñaron cebadores que tuvieran una temperatura de *annealing* similar (50°C).

El diseño de los cebadores se realizó con el software Windows 32 PrimerSelect 4.0 (DNASar Inc.), utilizando como molde las secuencias de DNA correspondientes a los genes *GAPDH*, *p53*, *c-Myc* y *p21<sup>WAF1</sup>*, accesibles en la dirección <http://www.ensembl.org>. Se diseñaron los cebadores de manera que se hibridaran en exones diferentes (Figura M5). Así era posible discernir los productos de interés

(cDNA, sin intrones) de los restos de DNA genómico (con intrones) que pudieran quedar en las muestras. Se utilizaron los cebadores que amplifican las regiones correspondientes a los genes *mdr-1* y *mrp-1* diseñados por Miracco *et al.* (Miracco *et al.*, 2003). Los cebadores directo y reverso se resuspendían en agua miliQ para que tuvieran una concentración final de 20  $\mu\text{M}$  cada uno. Los cebadores directo y reverso correspondientes a cada gen se mezclaban a partes iguales para obtener las mezclas que denominamos *Primer Mix A* y *Primer Mix B* (que contienen los cebadores directo y reverso del gen *GAPDH* y de los genes de interés, respectivamente).

### Procedimiento

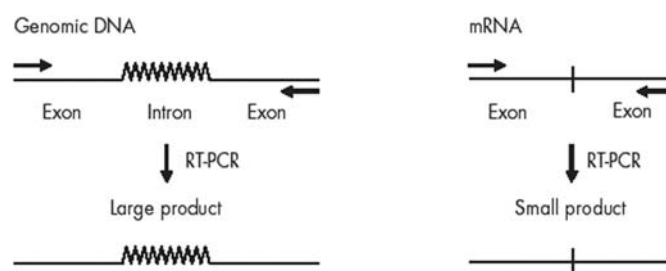
- 1) Preparar una *Master Mix* que contenga todo los componentes necesarios para la reacción, a excepción de los RNAs moldes. Se preparaba una *Master Mix* para  $n+1$  reacciones, siendo  $n$  el número de muestras a analizar de la siguiente manera
- 2) Pipetear 50 ng de cada RNA molde en tubos de PCR y dispensar la *Master Mix* a cada tubo, de manera que las reacciones tengan lugar en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$ . Mezclar bien y mantener en hielo hasta el momento de introducir las muestras en el termociclador. Cada reacción constaba de los siguientes componentes:

	<u>Volumen</u>	<u>Concentración final</u>
Agua libre de RNAsas	variable	-
5X Qiagen One-Step RT-PCR <i>Buffer</i>	5 $\mu\text{l}$	1x
dNTP <i>Mix</i> (10 mM cada uno)	1 $\mu\text{l}$	400 $\mu\text{M}$ cada dNTP
<i>Primer Mix A</i>	variable	0.6 $\mu\text{M}$ cada cebador
<i>Primer Mix B</i>	variable	0.6 $\mu\text{M}$ cada cebador
Qiagen One-Step RT-PCR <i>Enzyme Mix</i>	1 $\mu\text{l}$	-
RNA molde	variable	50 ng

- 3) Introducir las muestras en el termociclador y proceder a la reacción de RT-PCR, utilizando el siguiente programa:

- Transcripción reversa: 30 minutos a 50°C.
- Inactivación de la transcriptasa reversa y activación de las DNA polimerasas: 15 minutos a 95°C.
- Reacción de PCR:
  - Desnaturalización: 1 minuto a 94°C.

- Annealing: 1 minuto a 50°C.
  - Extensión: 1 minuto a 72°C.
  - Número de ciclos: 25-30
- 4) Separar los fragmentos amplificados en un gel de agarosa al 2% y teñir con bromuro de etidio (ver 3.7.2.1.).
- 5) La intensidad de las bandas se cuantificó usando el programa GeneTools Analysis (SinGene).



**Figura M5.** Diseño de los cebadores para RT-PCR semicuantitativa. Los cebadores se diseñaron de manera que reconocieran regiones de exones diferentes. La longitud de los productos de amplificación obtenidos a partir de RNA será menor que la de los productos que resultan de la amplificación del DNA genómico, pudiéndose detectar la presencia de DNA contaminante.

## Soluciones y Materiales

### Componentes del *kit* One Step RT-PCR (Qiagen)

- Agua libre de RNasas.
- 5X Qiagen One-Step RT-PCR *Buffer*.
- dNTP *Mix* (10 mM cada dNTP).
- Qiagen One-Step RT-PCR *Enzyme Mix*.

### Componentes adicionales

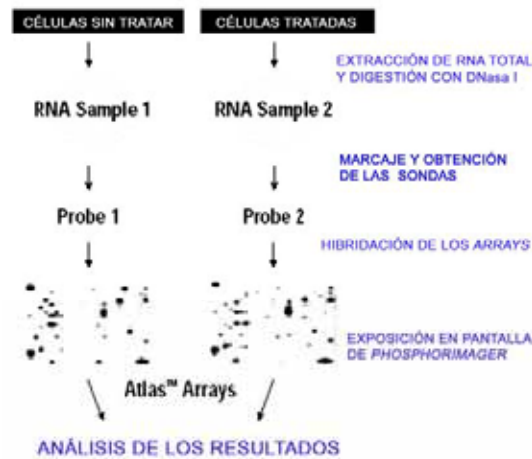
- Cebadores:

GEN	SECUENCIA DE LOS CEBADORES	LONGITUD DEL cDNA (pb)
GAPDH	5'-TCA GCC GCA TCT TCT TTT G-3' 5'-TGA TGG CAT GGA CTG TGG T-3'	600
c-myc	5'-AAA AAG CCA CAG CAT ACA TCC-3' 5'-TCT CAA GAC TCA GCC AAG GTT-3'	244
p53	5'-TCA GCA TCT TAT CCG AGT GG-3' 5'-CCT GGG CAT CCT TGA GTT C-3'	491
p21 <sup>WAF1</sup>	5'-CAG GGG ACA GCA GAG GAA GAC-3' 5'-CCG GCG TTT GGA GTG GTA G-3'	144
MDR-1	5'-CCC ATC ATT GCA ATA GCA GC-3' 5'- GTT CAA ACT TCT GCT CCT GA-3'	157
MRP-1	5'-ACG GTC GGG GAG ATT GTC AAC-3' 5'-GCC CAG ATT CAG CCA CAG GAG-3'	135

- Agarosa (Boehringer Mannheim).
- 10x TBE (ver 3.7.3.1.).
- 10 mg/ml Bromuro de etidio.

### 3.9. ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN PRESENCIA DE ANTRACICLINAS: *MACROARRAYS* DE cDNA

Utilizamos *macroarrays* de cDNA humano para detectar los patrones de expresión diferencial, consecuencia del tratamiento de células Jurkat T con WP631 y Daunorubicina. Escogimos las membranas Atlas Oncogene and Tumor Suppressor Arrays (BD Clontech), porque contienen cDNAs correspondientes a genes implicados en el control del ciclo celular y nos permitía relacionar los perfiles de expresión génica con los efectos celulares inducidos por los diferentes tratamientos. Las membranas se hibridaron con cDNAs obtenidos de células tratadas con antitumorales o sin tratar (control) y se cuantificaron las señales correspondientes a cada gen, así como la relación de señales entre las membranas correspondientes a células tratadas y control (Figura M6). La relación de estas señales nos indica qué genes se activan o inhiben en presencia de WP631 o Daunorubicina.



**Figura M6.** Diseño de los experimentos con *arrays* de cDNA. Se utilizaron *arrays* de cDNA para determinar los perfiles de expresión génica de células Jurkat tratadas con diferentes dosis de Daunorubicina y WP631. Los *arrays* se hibridaron con sondas de cDNA marcadas, obtenidas a partir del RNA extraído de las células.

Para facilitar la comprensión y la interpretación de los datos, seguimos las pautas recomendadas por la MGED (*Microarray Gene Expression Society*) (Tabla M3). La MGED ha creado un formato estándar para la presentación de la información derivada del uso de *arrays*, conocida como MIAME (*Minimum Information About a Microarray Experiment*), accesible en la página web <http://www.mged.org/miame>. Se trata de una “guía” que facilita la interpretación de los datos sobre *arrays*, generados por los diferentes laboratorios, y depositados en las bases de datos. De esta manera, aunque los detalles de cada experimento concreto sean diferentes, se define la información que es común en la mayoría de experimentos.

### 3.9.1. Obtención de sondas marcadas radiactivamente

El RNA extraído de células sometidas a diferentes tratamientos se utilizó como molde para la obtención de sondas de cDNA. La síntesis de sondas marcadas radiactivamente se realizó utilizando la transcriptasa reversa MMLV (BD Clontech), una mezcla de cebadores específicos (*CDS Primer Mix*, BD Clontech) para las membranas Atlas Oncogene and Tumor Suppressor Arrays (BD Clontech).



## Procedimiento

### 1) Marcaje de las sondas:

- Preparar una *Master Mix* para cada muestra, más una reacción extra para asegurar un volumen suficiente, y mantener a temperatura ambiente:

	<u>Por reacción</u>
5x <i>Reaction Buffer</i>	2 $\mu$ l
10x dNTP <i>Mix</i>	1 $\mu$ l
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dATP	3.5 $\mu$ l
100 mM DTT	0.5 $\mu$ l

- Preparar en tubos de microcentrífuga la siguiente reacción para cada muestra y mezclar bien:

	<u>Por reacción</u>
2.5 $\mu$ g RNA total	2 $\mu$ l
<i>CDS Primer Mix</i>	1 $\mu$ l
40 U/ $\mu$ l RNasin (Promega)	0.5 $\mu$ l

- Incubar la reacción a 70°C durante 2 minutos.
- Incubar la reacción a 50°C durante 2 minutos.
- Añadir 1  $\mu$ l de transcriptasa reversa MMLV por reacción a la *Master Mix* durante el paso anterior. Mezclar bien y mantener a temperatura ambiente.
- Después de la incubación a 50°C, añadir 8  $\mu$ l de la *Master Mix* a cada reacción y mezclar bien.
- Incubar a 50°C durante 25 minutos.
- Parar la reacción añadiendo 1  $\mu$ l de 10x *Termination Mix*.

### 2) Purificación de las sondas

Para eliminar los nucleótidos no incorporados durante el marcaje, así como fragmentos cortos de cDNA (<0.1 kb), se purificaron las sondas usando el Atlas NucleoSpin<sup>®</sup>

Extraction kit (BD Clontech). La calidad del marcaje se consideró correcta si se obtenían  $5\text{-}20 \times 10^6$  cpm.

- Llevar la reacción de marcaje de las sondas a un volumen final de 200  $\mu\text{l}$  con tampón NT2 y mezclar pipeteando repetidamente la muestra.

- Colocar una columna NucleoSpin en un tubo colector de 2 ml e introducir la muestra en la columna. Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto. Descartar el tubo colector y el volumen de exclusión en un contenedor para residuos radiactivos.

- Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml y añadir 400  $\mu\text{l}$  de tampón NT3 en la columna. Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto. Descartar el tubo colector. Repetir dos veces más.

- Transferir la columna a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Añadir 100  $\mu\text{l}$  de tampón NE y dejar equilibrar la resina durante 2 minutos.

- Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto para eluir la sonda purificada.

- Monitorizar la radiactividad para comprobar la calidad del marcaje.

## **Soluciones y Materiales**

### **Componentes de los kits Atlas Arrays (BD Clontech)**

- *5x Reaction Buffer*: 250 mM Tris·HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>.
- Transcriptasa Reversa MMLV.
- 10x dNTPs (dCTP, dGTP y dTTP, 5 mM cada uno).
- 100 mM DTT.
- *10x Termination Mix*: 0.1 M EDTA (pH 8.0), 1mg/ml glicógeno.
- *CDS Primer Mix*: mezcla de cebadores específicos de los cDNAs presentes en la membrana Atlas Oncogene and Tumor Supressor Array (BD Clontech).
- Atlas Nucleospin Extraction Kit.

### **Componentes adicionales**

- [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ) (Amersham).

- 40 U/ $\mu$ l RNasin (Promega).

### 3.9.2. Hibridación de las sondas sobre las membranas Atlas Arrays

Las membranas de *nylon* Atlas Oncogene and Tumor Suppressor Arrays (BD Clontech), que contienen cDNAs de diferentes genes humanos, se hibridaron con las sondas marcadas radiactivamente. Estas membranas contienen cDNAs correspondientes a 199 genes: 9 genes constitutivos y 190 oncogenes y genes supresores de tumores. La lista de genes y su disposición en las membranas se muestra en el Anexo I.

#### Procedimiento

1) Llenar un tubo de hibridización con agua destilada. Humedecer una membrana de *nylon* Atlas Arrays (BD Clontech) colocándola en un recipiente con agua destilada e introducirla en el tubo de hibridización, evitando que se seque la membrana. La membrana tiene que quedar adherida a las paredes del tubo sin formar burbujas de aire.

2) Prehibridación:

- Vaciar el agua destilada del hibridizador.
- Añadir 5 ml de solución de prehibridación
- Prehibridar a 68°C durante 30 minutos, en continua agitación.

3) Hibridación:

- Preparar la sonda de la siguiente manera:
  - Añadir 3  $\mu$ l de C<sub>0</sub>t-1 DNA ó 0.5  $\mu$ l de 10 mg/ml de DNA de esperma de salmón a las sondas marcadas.
  - Incubar la sonda a 100°C durante exactamente 2 minutos.
  - Incubar la sonda en hielo durante exactamente 2 minutos.
  - Añadir la sonda desnaturalizada en la solución de prehibridación, evitando que la sonda concentrada entre directamente en contacto con la membrana.
  - Hibridar a 68°C durante 16 horas, en continua agitación

4) Lavados:

- Eliminar la solución de hibridación y depositar en el contenedor apropiado.
- Añadir 200 ml de solución de lavado 1, previamente precalentada a 68°C y lavar a 68°C durante 30 minutos, en continua agitación. Repetir este lavado dos veces más.
- Añadir 200 ml de solución de lavado 2, previamente precalentada a 68°C y lavar a 68°C durante 30 minutos, en continua agitación.
- Lavar con 200 ml de 2x SSC a temperatura ambiente y durante 5 minutos.

#### 5) Exposición:

- Sacar la membrana del hibridizador y eliminar el exceso de solución de lavado, evitando que se seque.
- Envolver la membrana en plástico.
- Exponer la membrana en una pantalla de *phosphorimager* a temperatura durante diferentes tiempos.

### Soluciones y Materiales

#### Componentes de los kits Atlas Arrays (BD Clontech)

- Membranas de *nylon* Atlas Oncogene and Tumor Suppressor Arrays (BD Clontech).
- Solución de prehibridación ExpressHyb™ Hybridization Solution.
- 1 mg/ml C<sub>0</sub>t-1 DNA.

#### Componentes adicionales

- 20x SSC: solución salina citrato (3 M NaCl, 300 mM citrato trisódico [pH 7.0]).
- 20% SDS: dodecilsulfato sódico ajustado a pH 7.2.
- DNA de esperma de salmón (10 mg/ml) (Sigma) sonicado y desnaturalizado (5 minutos a 95°C más 5 minutos en hielo).
- Soluciones de lavado, preparadas a partir de las soluciones *stock*:
  - Solución de lavado 1: 2x SSC, 1% SDS.
  - Solución de lavado 2: 0.1X SSC, 0.5 % SDS.

**Tabla M3.** Información sobre los experimentos con *macroarrays* de cDNA presentados en este trabajo, siguiendo el formato de MIAME (<http://www.mged.org/miame>) .

<b>DISEÑO DE LOS ARRAYS</b>	
Diseño general de los <i>arrays</i>	Membranas de <i>nylon</i> conteniendo <i>spots</i> de 199 cDNAs por duplicado, Atlas Oncogene and Tumor Suppressor Array (BD Clontech): número de catálogo 7745-1
Localización e ID de cada <i>spot</i>	Accesible en la <i>web</i> <a href="http://www.bdbiosciences.com">http://www.bdbiosciences.com</a> y en el Anexo I de este trabajo
Características de los <i>spots</i>	cDNAs de 200-600 pb generados por RT-PCR
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	
Tipo de experimento	Comparación de los perfiles de expresión génica diferencial de células tratadas con Antraciclinas
Condiciones del experimento	Tratamientos con las dosis IC <sub>50</sub> ó IC <sub>75</sub> para la WP631 y la Daunorubicina durante 4horas
Hibridaciones por experimento	2-3 hibridaciones por experimento
Diseño de la hibridación	Normalización respecto a un conjunto de controles internos presentes en los <i>arrays</i>
Controles de calidad	Comparación entre las señales de las réplicas de los <i>spots</i>
<b>MUESTRAS</b>	
Origen de las muestras	Línea celular establecida de origen humano Jurkat T, (ver descripción apartado 3.2.)
Manipulación de las muestras	Condiciones de crecimiento y tratamientos descritos en los apartados 3.2. y 3.3.
Protocolo de extracción del RNA	Ver apartado 3.7.2.
Protocolo de marcaje	Ver apartado 3.9.1.
<b>HIBRIDACIÓN</b>	
Protocolo y condiciones	Ver apartado 3.9.2.
<b>CUANTIFICACIÓN</b>	
Obtención de imágenes	Exposición en una pantalla de <i>phosphorimager</i> Imager Screen-K (Biorad)
Parámetros de la cuantificación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Obtención de imágenes con un densitómetro Molecular Imager FX (Biorad)</li> <li>• Cuantificación de las señales con el programa QuantityOne 4.1.1 (Biorad)</li> <li>• Condiciones de cuantificación, normalización y comparación descritas en el apartado 3.9.4.</li> </ul>
Datos generados	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Imágenes de los <i>arrays</i> (ver Figura R23A)</li> <li>• Datos normalizados (ver Anexo I)</li> </ul>

- Pantalla de *phosphorimager* Imaging Screen-K (Biorad).

### Observaciones

- Las membranas Atlas Arrays se pueden reutilizar hasta 4 veces, eliminando las sondas después de cada experimento (*stripping*, ver apartado 3.8.3.). Es muy importante evitar que las membranas se sequen durante su manipulación porque, en tal caso, se dificulta la eliminación de las sondas durante el *stripping*.
- La solución de hibridación ExpressHyb™ Hybridization Solution no contiene formamida, por lo que las hibridaciones tienen lugar a 68°C y no a 50°C.

### 3.9.3. *Stripping* de las membranas

#### Procedimiento

- 1) Colocar las membranas en un recipiente y enjuagar con 2x SSC a temperatura ambiente.
- 2) Lavar a 65°C durante 20-30 minutos con la solución de lavado 1.
- 3) Lavar dos veces a 65°C durante 20-30 minutos con una solución 1x SSC, 0.5% SDS.
- 4) Enjuagar con 2x SSC a temperatura ambiente y proteger la membrana envolviéndola con papel de celofán.
- 5) Exponer la membrana en una pantalla de *phosphorimager* durante toda una noche, para asegurarnos que las sondas se han eliminado completamente.

### 3.9.4. Cuantificación de los niveles de expresión génica

Las membranas se analizaron con un densitómetro Molecular Imager FX (Biorad). La intensidad de las señales se cuantificó utilizando el programa Quantity One 4.1.1 (Biorad). Para cada membrana se cuantificó la intensidad de la señal obtenida para cada *spot* y el valor promedio correspondiente al ruido de fondo de cada *array*.

Para analizar los patrones de expresión génica en presencia o en ausencia de diferentes Antraciclinas y dosis, se sustrajo el valor de la señal obtenida del ruido de fondo promedio de cada membrana de los valores de intensidad obtenidos para cada

*spot*. Cuando la intensidad del ruido de fondo era superior a la intensidad de los *spots*, a éstos se les asignaba un valor arbitrario de 1.0. Se normalizaron las señales de cada membrana corrigiendo por el valor de la intensidad de la señal correspondiente al control interno *GAPDH* (gen constitutivo del que, por experimentos previos realizados en nuestro laboratorio, sabíamos que era un buen control interno), y comprobamos que las señales de los ocho controles internos restantes, presentes en las membranas, eran similares (con un 5% de error). Se calculó la relación de señales entre las membranas hibridadas a partir de cDNAs de células tratadas y las membranas hibridadas con cDNAs de células control (sin tratar). Se consideró la existencia de diferencias significativas en la expresión génica cuando esta relación era mayor o menor de 2.5 (cambios de 2.5 veces).

### 3.10. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS

#### 3.10.1. Electroforesis en SDS-PAGE

Para separar las proteínas en función de su tamaño, se realizó una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (Laemmli, 1970). El detergente SDS desnaturaliza las proteínas y les confiere carga negativa, permitiendo su separación en una matriz de poliacrilamida cuando se aplica un campo eléctrico.

Los geles de SDS-poliacrilamida constan de dos partes: un gel concentrador (*stacking*) de bajo porcentaje de acrilamida (5%), que alinea las proteínas de las muestras antes de su separación, y un gel separador (*running*) con un mayor porcentaje de acrilamida (10-15%), que separa las proteínas en función de su peso molecular.

Se utilizó el sistema de electroforesis Miniprotean (Biorad), que nos permite trabajar con pequeños volúmenes de muestra y manipular con mayor facilidad los geles a la hora de realizar la transferencia a las membranas.

#### Procedimiento

1) Preparar el gel para SDS-PAGE, con el porcentaje de acrilamida necesario para separar la proteína de interés en el gel separador. Debido al tamaño de las proteínas analizadas en este trabajo, los geles separadores contenían un 12% de acrilamida.

2) Desnaturalizar las muestras:

- Coger el volumen necesario de extracto que contenga la concentración adecuada de proteínas.

- Añadir el volumen necesario de tampón de carga 2X, para obtener la concentración requerida (1X).
  - Hervir las muestras durante 5 minutos.
  - Dejar las muestras a temperatura ambiente durante 5 minutos.
  - Cargar las muestras en el gel, junto con un marcador de peso molecular preteñido, que permita monitorizar la electroforesis y la transferencia a la membrana.
- 3) Separar las muestras aplicando un campo eléctrico de 25 mA, en tampón de Laemmli.

### Soluciones y Materiales

- 29:1 Acrilamida: Bisacrilamida Mix (40%) (AppliChem).
- Tampón de gel concentrador: 1.5 M Tris·HCl pH 6.8, 0.1 % SDS %.
- Tampón de gel separador: 1.5 M Tris·HCl pH 8.8, 0.1% SDS.
- 10% persulfato amónico.
- TEMED (Roche).
- 5x tampón de carga: 250 mM Tris·HCl (pH 8.0), 50% glicerol, 10 % SDS, 0.05 azul de bromofenol, 2 % DTT, 1 mM β-mercaptoetanol (Sigma).
- Marcador de peso molecular preteñido SeeBlue (Invitrogen).
- 10x tampón de Laemmli: 25 mM Tris·HCl, 192 mM glicina, 0.1% SDS, en agua MiliQ.

### 3.10.2. Transferencia de las proteínas e inmunodetección (*Western blot*)

La técnica de *Western-blot* permite detectar las proteínas separadas por SDS-PAGE, utilizando anticuerpos específicos. Está basada en la transferencia de las proteínas separadas en un gel de SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa, donde quedan inmovilizadas. La detección de las proteínas con los anticuerpos específicos se realiza directamente sobre la membrana.

### Procedimiento

- 1) Montar del *sándwich*, teniendo en cuenta que las proteínas correrán del polo negativo al positivo:
  - Colocar una o dos esponjas mojadas en tampón de transferencia.
  - Encima, dos papeles Whatman mojados en tampón de transferencia.



- Encima, una pieza de membrana de nitrocelulosa mojados en tampón de transferencia.
- Encima se coloca el gel de proteínas, mojado también en tampón de transferencia.
- Encima, dos papeles Whatman mojados en tampón de transferencia.
- Encima, una o dos esponjas mojadas en tampón de transferencia.

El orden de los componentes del *sándwich* se muestra, esquemáticamente en la Figura M7.



**Figura M7.** Componentes y orden de colocación durante el montaje del *sándwich* para la transferencia de las proteínas separadas en un gel de SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa.

- Colocar el *sándwich* en la cubeta de transferencia y cubrir bien con tampón de transferencia. Transferir a 80 V durante 2-3 horas (en función al tamaño de la proteína que se quiere detectar) a 4°C, utilizando un agitador magnético.

2) Desmontar el *sándwich* y teñir la membrana y el gel, para asegurar que la transferencia ha sido correcta:

- Tinción del gel: incubar con solución de tinción durante 15-30 minutos y desteñir con la solución de destinción, haciendo varios cambios para acelerar el proceso.
- Tinción de la membrana: incubar con la solución de tinción de membranas y desteñir con agua destilada.

3) Inmunodetección:

- Incubar la membrana con solución de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C, en agitación.
- Eliminar la solución de bloqueo e incubar con el anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C, en agitación.
- Realizar tres lavados de 10 minutos cada uno.

- Incubar con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación.
- Realizar tres lavados de 10 minutos cada uno.
- Eliminar el exceso de tampón de lavado de la membrana e incubar durante 1 minuto con la solución Luminol/*Enhancer* (el *Enhancer* se diluye 1:10000 en Luminol).
- Realizar exposiciones a diferentes tiempos en una película de autorradiografía y revelar.

### Soluciones y Materiales

- Tampón de transferencia (pH 8.3): 25 mM Tris-base, 40 mM glicina, 0.05 % SDS, metanol al 20%.
- Solución de tinción de geles de proteínas: 10% ácido acético, 40% etanol, 0.05% Comassie brilliant-blue (Sigma).
- Solución de destinción de geles de proteínas: 30% metanol, 10% ácido acético.
- Solución de tinción de la membrana: 0.02% Ponceau.
- PBS (ver 3.2.3.).
- Solución de bloqueo: 5% leche desnatada Sveltesse (Nestlé) en PBS.
- Solución de lavado: 0.05% Tween-20 (Sigma) en PBS.
- Soluciones de anticuerpos primario y secundario: preparadas en solución de bloqueo diluida 1/5 en PBS, utilizando las concentraciones de anticuerpo recomendadas por el proveedor:

#### Anticuerpos primarios:

- Anticuerpo monoclonal anti-p53 Pab240 (Santa Cruz Technologies); desarrollado en ratón y utilizado a una concentración de 2 µg/ ml.
- Anticuerpo monoclonal anti-c-Myc Ab-2 (Oncogene); desarrollado en ratón y utilizado a una concentración de 1 µg/ ml.
- Anticuerpo monoclonal anti-p21<sup>WAF1</sup> Ab-1 (Oncogene); desarrollado en ratón y utilizado a una concentración de 1 µg/ ml.
- Anticuerpo monoclonal anti-tubulina (Chemicon); desarrollado en ratón y utilizado a una dilución 1/10000.
- Anticuerpo policlonal anti-Sp1 H-225 (Santa Cruz Technologies); desarrollado en conejo y utilizado a una concentración de 2 µg/ ml.

• Anticuerpo policlonal anti-Sp3 H-225 (Santa Cruz Technologies); desarrollado en conejo y utilizado a una concentración de 2 µg/ ml.

Anticuerpos secundarios:

• Anticuerpo *anti-rabbit Ig horse radish peroxidase* (Amersham); utilizado a una dilución 1/10000.

• Anticuerpo *anti-mouse Ig G horse radish peroxidase* (Sigma); utilizado a una dilución 1/5000.

▪ Luminol: 50 mg Luminol sódico (Sigma) y 62 µl de 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fluka) disueltos en 200 ml de 0.1 M Tris•HCl pH 8.6. Se guarda protegido de la luz y a 4 °C.

▪ *Enhancer*: 11 mg ácido p-cumárico disuelto en 10 ml de DMSO (Sigma).

▪ Membranas de nitrocelulosa Optitran BA-S85 (Schleicher & Schuell).

▪ Películas de autorradiografía Curix RP-2 Plus (AGFA).

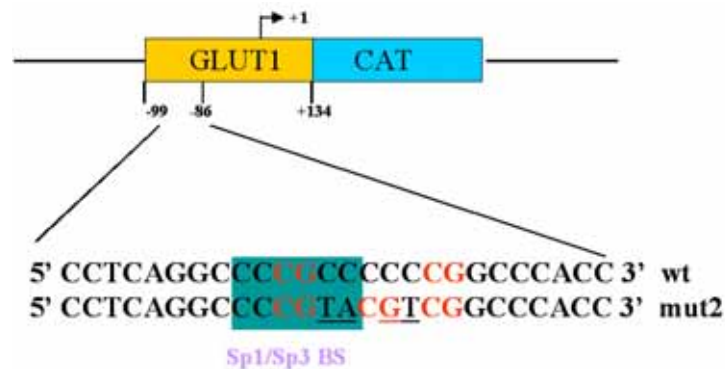
### **3.11. ANÁLISIS *IN VIVO* DE LA COMPETICIÓN ENTRE LA WP631 Y EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Sp1 POR LA UNIÓN AL DNA**

Analizamos *in vivo* los efectos de la Bisantraciclina WP631 sobre la transcripción dirigida por los factores de transcripción Sp1 y Sp3 en células Jurkat T. Transfectamos células con vectores de expresión de los factores Sp1 y Sp3 humanos y con los vectores pGLUT1-CATwt y pGLUT1-CATmut2 y las incubamos con la dosis IC75 para la WP631. Los últimos son vectores que contienen el gen reportero CAT (cloranfenicol acetil transferasa) bajo el control transcripcional del promotor del transportador de glucosa 1 salvaje (GLUT1wt) o mutado (GLUT1mut2). El promotor GLUT1wt está regulado por el factor activador de la transcripción Sp1 y el factor represor Sp3, mientras que el promotor GLUT1mut2 conserva la capacidad de responder, únicamente al factor de transcripción Sp1 (Fandos et al., 1999). Las regiones de unión de Sp1 y/o Sp3 contienen, en los dos promotores, secuencias CpG donde la WP631 podría intercalarse, con diferente afinidad, y competir con estos factores, resultando en diferentes actividades CAT. Las secuencias de los promotores, así como el lugar de unión de Sp1 y/o Sp3 y los tramos CpG se indican en la Figura M8.

### 3.11.1. Descripción de los plásmidos

#### • Vectores *reporter*

Los vectores pGLUT1-CATwt y pGLUT1-CATmut2 fueron cedidos por el Dr. A. Zorzano (Universitat de Barcelona). El gen *reporter* de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT) se encuentra bajo el control transcripcional de una región promotora de GLUT1 (Fandos et al., 1999).



**Figura M8.** Mapa de la región proximal de los promotores GLUT1wt y GLUT1mut2. La región que va desde el nucleótido -93 al -85 contiene el lugar de unión de Sp1, Sp3 y la WP631. El gen *reporter* CAT se encuentra bajo control transcripcional de estos promotores.

- **pGLUT1-CATwt (-99/+134):** generado por digestión, con el enzima *AocI*, del fragmento -1.672/+134 del promotor de GLUT1 clonado en el vector pCAT-basic (Fandos et al., 1999).
- **pGLUT1-CATmut2 (-99/+134):** vector derivado del anterior, mutante de la caja CG en la posición -91/-86 y obtenido a partir de la construcción silvestre por mutagénesis dirigida (Fandos et al., 1999).

#### • Vectores de expresión

Los vectores de expresión pCMV-Sp1 y pCMV-Sp3fl generan los factores de transcripción Sp1 y Sp3 humanos, que se encargan de regular la actividad transcripcional del promotor de GLUT1:

- **pCMV-Sp1:** vector de expresión del factor de transcripción Sp1 humano, cedido por el Dr. R. Tjian (University of California at Berkeley)

- **pCMV-Sp3fl**: vector de expresión del factor de transcripción Sp3 humano, cedido por el Dr. J.M. Horowitz (Duke University Medical Center). Este vector da lugar a las tres isoformas de la proteína Sp3 (110 kDa , 80 kDa y 74 kDa) (Fandos et al., 1999).

• **Otros vectores utilizados en las transfecciones**

- **pCMV-β-gal**: vector de expresión del gen *reporter* de la β-galactosidasa, utilizado como control de la eficiencia de la transfección.

- **pCMV-Script** (Stratagene): vector utilizado como *carrier* en las transfecciones.

### 3.11.2. Transfección por electroporación

Los plásmidos se transfectaron en células Jurkat T. En nuestro grupo de trabajo se había comprobado que el método de transfección con fosfato cálcico, utilizado comúnmente, no resulta eficaz con esta línea celular. Por este motivo se pusieron a punto las condiciones necesarias para transfectar los plásmidos por electroporación.

#### Procedimiento

- 1) Centrifugar a 800 xg durante 5 minutos el volumen de cultivo necesario. Eliminar el medio de cultivo.
- 2) Resuspender el sedimento en medio incompleto (sin suplementar).
- 3) Centrifugar a 800 xg durante 5 minutos. Eliminar el medio de cultivo.
- 4) Resuspender el sedimento en el volumen de medio incompleto necesario para tener  $15-20 \times 10^6$  células/0.5 ml por transfección.
- 5) Introducir 1-2 μg DNA plasmídico por  $10^6$  células en la cubeta de electroporación. El volumen de DNA no puede ser superior al 10% del volumen de células.

Se transfectaban 5 μg de los vectores de expresión, 2.5 μg de los vectores *reporter* (CAT y β-gal) y la cantidad necesaria del vector *carrier* para que todas las transfecciones se realizaran con un total de 20 μg de DNA plasmídico. Las combinaciones realizadas fueron las siguientes:

	CONTROLES								EXPERIMENTOS													
	Basal				Sobreexpresión Sp1/Sp3				Basal				Sobreexpresión Sp1/Sp3									
pGLUT1-CATwt	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
pGLUT1-CATmut2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
pCMV-Sp1	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
pCMV-Sp3fl	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+
pCMV-β-gal	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pCMV-Script	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

6) Introducir 15-20x10<sup>6</sup> células por 0.5 ml en cada cubeta y electroporar a 250 V y 975 μF. Mezclar bien las células y el DNA justo antes de electroporar.

7) Recoger las células vivas (las células muertas aparecen en forma de sobrenadante blanco) y lavarlas con 5 ml de medio incompleto. Centrifugar a 800 xg durante 5 minutos y eliminar el medio de cultivo.

8) Resuspender en el volumen de medio completo necesario para tener 10<sup>6</sup> células/ml (de la cantidad de células iniciales, aproximadamente muere la mitad al transfectar). Incubar a 37% con 5% CO<sub>2</sub> durante 48 horas.

9) Tratar los cultivos con diferentes dosis de WP631 (60 nM, 600 nM y 1 μM) durante 4 ó 24 horas.

### Soluciones y Materiales

- Medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco), sin suplementar: medio incompleto.
- Medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco), suplementado (ver 3.2.2.): medio completo.
- Cubetas de electroporación (Biorad).
- Electroporador Gene Pulser II (Biorad).

### 3.11.3. Obtención de los extractos proteicos y *Western-blot*

Los extractos proteicos de las células transfectadas se obtuvieron y cuantificaron siguiendo los métodos previamente descritos (ver apartados 3.7.4.1. y 3.7.4.2.). Se utilizaron 50 μg de extracto proteico para comprobar mediante *Western-blot* (ver apartados 3.10.1 y 3.10.2.) los cambios en los niveles de las proteínas Sp1 y Sp3 tras las transfecciones.

### 3.11.4. Determinación de la actividad CAT

La actividad del gen *reporter* CAT se determinó mediante un ensayo ELISA utilizando el *kit* CAT-ELISA (Roche). Se incubaron 50 µg de cada extracto proteico en una placa de microtitulación con anticuerpo Anti-CAT preunido en los pocillos. El ensayo CAT-ELISA se basa en un método de detección colorimétrico. Se utilizó un lector de placas Spectra MAX-250 (Molecular Devices) y el programa SoftMax@Pro.

#### Procedimiento

- 1) Pipetear 200 µl de extracto proteico (por triplicado) en los pocillos de la placa de microtitulación de 96 pocillos. Incubar la placa durante 2 horas a 37°C, tapando la placa con un papel adhesivo para evitar la evaporación de la muestra.
- 2) Eliminar la solución de los pocillos y lavar 5 veces durante 30 segundos con 250 µl de tampón de lavado (solución 6).
- 3) Pipetear 200 µl de solución Anti-CAT-DIG (solución 2a) por pocillo. Incubar la placa, tapada con papel adhesivo, durante 1 hora a 37°C.
- 4) Eliminar la solución de los pocillos y 5 repetir los lavados.
- 5) Pipetear 200 µl de solución Anti-DIG-POD (solución 3a) por pocillo. Incubar la placa, tapada con papel adhesivo, durante 1 hora a 37°C.
- 6) Eliminar la solución de los pocillos y repetir los lavados.
- 7) Pipetear 200 µl de solución sustrato de POD (solución 4) por pocillo. Mantener a temperatura ambiente hasta que aparezca color.
- 8) Medir la absorbancia de las muestras a 405 nm (longitud de referencia=490 nm).

#### Soluciones y Materiales

##### Componentes del *kit* CAT-ELISA (Roche)

- Solución 1: solución *stock* de enzima CAT liofilizado (botella 1) disuelto en 0.5 ml de agua miliQ.
- Solución 2: solución *stock* de anticuerpo Anti-CAT-DIG liofilizado (botella 2) disuelto en 0.5 ml de agua miliQ (0.2 mg/ml, concentración final).
- Solución 2a: 100 µl de solución 2 en 9.9 ml de solución 7 (2 µg de Solución 2 por cada ml de Solución 7).
- Solución 3: solución *stock* de anticuerpo Anti-DIG-POD liofilizado (botella 3) disuelto en 0.5 ml de agua miliQ (20 U/ml, concentración final).

- Solución 3b: 75 ml de solución 3 en 9.9925 ml de Solución 7 (150 mU/ml, concentración final).
- Solución 4: sustrato para POD, ABTS (botella 4), listo para usar.
- Solución 5: 1 mg *enhancer* (botella 5) por cada ml de Solución 4.
- Solución 6: dilución 1/10 del tampón de lavado 10x (botella 6) con agua miliQ.
- Solución 7: *sample buffer* (botella 7), listo para usar.
- Solución 7: dilución 1/5 del tampón de lisis 5x (botella 8) con agua miliQ (se necesita 1 ml de solución 7 por cada 6 cm de la placa o frasco de cultivo).
- Placas de microtitulación de 96 pocillos: placas ELISA *precoated* con un anticuerpo policlonal contra CAT y bloqueadas.

### Observaciones

Una vez obtenidos los extractos celulares, se pueden congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar el ensayo CAT ELISA. Se recomienda que antes de almacenar a  $-80^{\circ}\text{C}$ , los extractos se congelen con hielo y etanol para evitar la degradación del enzima CAT.

### 3.11.5. Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa

La actividad del gen *reporter*  $\beta$ -Galactosidasa se determinó utilizando un sistema de detección quimioluminiscente  $\beta$ -Gal Reporter Gene Assay (Roche) y un luminómetro Sirius (Berthold Detection Systems). La actividad  $\beta$ -galactosidasa se determinó como control de eficiencia de transfección y los valores obtenidos fueron constantes en todos los casos.

### Procedimiento

- 1) Añadir 10-50  $\mu\text{l}$  de extracto proteico a las cubetas de luminómetro.
- 2) Añadir, a intervalos constantes (por ejemplo, cada 30 seg), 100  $\mu\text{l}$  de solución 1 (reactivo sustrato). Mezclar bien.
- 3) Incubar a temperatura ambiente entre 15 minutos y 2 horas, protegiendo as muestras de la luz.
- 4) Añadir a cada cubeta, a intervalos constantes y manteniendo el orden del paso 2), 50  $\mu\text{l}$  de solución 2 (reactivo iniciador). Mezclar por agitación.
- 5) Medir la actividad  $\beta$ -gal en un luminómetro, respetando los intervalos y orden establecidos.



## Soluciones

### Componentes del *kit* $\beta$ -Gal Reporter Gene Assay (Roche)

- 1000x sustrato  $\beta$ -gal.
- *Assay Buffer*.

La solución 1 (reactivo sustrato) se prepara diluyendo 1:99 el sustrato  $\beta$ -gal en tampón *Buffer Assay*.

- *Enhancer*.
- Solución iniciadora.

La solución 2 (reactivo iniciador) se prepara diluyendo 1:5 el *enhancer* con la solución iniciadora.

### **3.11.6. Cuantificación de la actividad CAT relativa**

Los valores de actividad CAT se normalizaron utilizando las actividades  $\beta$ -gal obtenidas en cada caso, para corregir posibles diferencias en cuanto a la eficiencia de transfección. De esta manera, los resultados se expresaron como actividad CAT relativa.

## **3.12. ANÁLISIS *IN VITRO* DE LA COMPETICIÓN ENTRE LA WP631 Y EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Sp1 POR LA UNIÓN AL DNA**

Realizamos un ensayo de retardamiento en gel (*Band-Shift*) para confirmar *in vitro* la unión del factor de transcripción Sp1 y la WP631 en las regiones promotoras GLUT1wt y GLUT1mut2, así como la capacidad de la WP631 para competir por el lugar de unión en el DNA de Sp1 y Sp3.

### **3.12.1. Digestión de los plásmidos GLUT1-CAT**

Para obtener la región -99/-86 del promotor GLUT1wt y GLUT1mut2 se digirieron 20  $\mu$ g de los plásmidos pGLUT1-CAT (wt y mut2) con los enzimas de restricción *HindIII* y *AvaII*. El fragmento obtenido de 62 pb contiene la región de unión de los factores de transcripción Sp1 y Sp3, así como para la Bisantraciclina WP631.

## **Procedimiento**

- 1) Preparar la siguiente mezcla de reacción:

	<u>Por reacción</u>
pGLUT1-CAT (wt o mut2)	volumen que contenga 20 µg
10x tampón R	5 µl
10U/ µl <i>HindIII</i>	2.5 µl
10U/ µl <i>AvaII</i>	2.5 µl
H <sub>2</sub> O miliQ	volumen necesario hasta 50 µl

2) Incubar 2 horas a 37°C.

3) Separar los fragmentos de DNA obtenidos tras la digestión en un gel 4% agarosa, en tampón TBE.

4) Recortar la banda de 62 pb correspondiente a la región 99/-86 del promotor GLUT1wt o GLUT1mut2 y purificar el DNA. Para la purificación se utilizó el *kit* de purificación de PCR y bandas GFX (Amersham), siguiendo las instrucciones indicadas en el producto.

### Soluciones y Materiales

- Enzimas de restricción *HindIII* y *AvaII* (10U/ µl cada una) (Fermentas).
- 10x tampón R (Fermentas).
- Agarosa (Boehringer Mannheim).
- Bromuro de etidio (10mg/ml).
- 10x TBE (ver 3.7.3.1.).
- *kit* de purificación de PCR y bandas GFX (Amersham).

### 3.12.2. Marcaje de los fragmentos de DNA

El marcaje de las sondas de DNA se realizó utilizando el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I de *E.coli*. Este enzima utiliza la cadena de DNA sencillo presente en los extremos protuberantes, obtenidos tras la doble digestión con *HindIII* y *AvaII*, como molde para sintetizar DNA.

### Procedimiento

1) Para cada muestra:

Fragmento -99/-86 del promotor GLUT1wt o GLUT1mut2	25 µl
10 X <i>Klenow buffer</i>	5 µl

---

100 mM DTT	2 $\mu$ l
10 mM dATP	4 $\mu$ l
10 mM dTTP	4 $\mu$ l
10 mM dGTP	4 $\mu$ l
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dCTP (10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Fragmento <i>Klenow</i>	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O miliQ	volumen necesario hasta 50 $\mu$ l

2) Incubar durante 1 hora a 37°C.

3) Purificar los fragmentos marcados. Para la purificación de los fragmentos marcados se utilizaron las columnas Microspin<sup>TM</sup> S-300 HR (Pharmacia Biotech).

4) Resuspender los fragmentos marcados en el volumen necesario de TE para tener aproximadamente 25 cps por cada  $\mu$ l.

### Soluciones

- 10 X *Klenow buffer*: 0.1 M Tris-HCl pH 7.6, 0.1 M MgCl<sub>2</sub>, 0.5 M NaCl, 10 mM DTT, en agua miliQ.
- Fragmento *Klenow* (Roche).
- dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, 10 mM cada uno).
- [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) (Amersham).
- Columnas Microspin<sup>TM</sup> S-300 HR (Pharmacia Biotech).
- 1x TE (ver 3.7.1.4.).

### 3.12.3. Ensayo de retardamiento en gel (*Band-Shift*)

El ensayo de retardamiento en gel se basa en la diferencia de movilidad entre los fragmentos de DNA libre y los complejos DNA-proteína. Utilizamos el fragmento que comprende la región de -99/-86 de GLUT1wt o GLUT1mut2 marcado radiactivamente, para cuantificar la formación de complejos GLUT1wt-Sp1 y GLUT1mut2-Sp1 y la capacidad de la WP631 para desplazar al factor Sp1 en cada uno de los complejos formados. Para suprimir uniones inespecíficas utilizamos el competidor poly[d(I-C)].

### Procedimiento

1) Preparar una *mix* que contenga el máximo de componentes de la reacción:

- 2 pmol de DNA de la región -99/-86 pGLUT1-CAT (wt o mut2) (~1500-3000 cpm)

- 0.5 µg/µl poly[d(I-C)] (Roche)
- 10 mg/ml BSA
- Tampón de incubación

Las reacciones se prepararon por triplicado, de manera que tuvieran lugar en presencia 20 ng del factor Sp1 recombinante sin WP631, de Sp1 con diferentes concentraciones de WP631, y sin Sp1 ni fármaco.

2) Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos.

3) Añadir a cada muestra 4 µl de tampón de carga.

4) Cargar las muestras en un gel 4.5% poliacrilamida no desnaturalizante, precorrido durante 5 minutos a 20 mA.

5) Correr el gel a 12 V/cm.

6) Secar el gel a 80°C en un sistema conectado al vacío y exponerlo durante 16 horas sobre una película de autorradiografía.

7) Cuantificar las señales obtenidas con un densitómetro Molecular Dynamics.

### **Soluciones y Materiales**

- 29:1 acrilamida:bisacrilamida (40% ) (AppliChem).
- Tampón para geles de poliacrilamida no desnaturalizantes: 0.02% Nonidet NP-40 en 0.5x TBE.
- 10% persulfato amónico.
- TEMED (Roche).
- Proteína Sp1 recombinante (50 ng/µl) (Promega).
- poly[d(I-C)] (Roche).
- BSA: albúmina sérica bovina (20 mg/ml) (Roche).
- Tampón de incubación: 10mM Tris·HCl (pH 7.4), 50 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 µM ZnCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 0,5 mM DTT , 30 µg/ml BSA, 25% glicerol.
- Tampón de carga: 50% glicerol, 10 mM Tris·HCl (pH 8.0), 0.02% xylen cianol, en agua miliQ.
- 10x TBE (ver 3.7.3.1.).
- Películas de autorradiografía Curix RP-2 (AGFA).

### 3.13. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE SECUENCIAS RICAS EN CITOSINA- GUANINA EN PROMOTORES HUMANOS

La elección de las secuencias promotoras se realizó en base a dos criterios. Primero, se escogieron promotores correspondientes a genes con relevancia en el control del ciclo celular (implicados, por lo tanto, en el desarrollo de diferentes tumores cuando se encuentran alterados). Segundo, muchos de estos genes se encuentran presentes en las membranas Human Oncogene and Tumor Suppressor Atlas Arrays (BD Clontech) (véase Anexo I), incluyendo el gen constitutivo *gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa* (*GAPDH*), utilizado comúnmente como control interno en estudios de expresión génica *in vitro* e *in vivo* (Tabla M4). Además, se incluyeron dos secuencias que actúan como controles de robustez estadística para el análisis de los datos: una secuencia de DNA satélite rica en AT (Barceló et al., 1997) y una secuencia de 1.000 pb generada al azar, mediante el programa GeneJockey (Biosoft) para Macintosh.

#### Procedimiento

##### 1) Búsqueda de secuencias promotoras.

Las secuencias promotoras analizadas en este trabajo son accesibles en las siguientes direcciones de Internet: <http://www.epd.isb-sib-ch> (Eukaryotic Promoter Database), <http://www.ncbi.nih.gov> (GeneBank) y <http://www.ensembl.org> (Project Ensembl, The Sanger Center), de donde fueron descargadas para su análisis. Los números de acceso para cada promotor están indicados en la Tabla M4. Las longitudes de las regiones promotoras estudiadas son diferentes, atendiendo a su accesibilidad en los bancos de datos y a la correcta indicación del lugar de inicio de transcripción, aspectos no siempre fácilmente delimitados (Guigo, 1997). Para el análisis posterior de los promotores, todas las secuencias obtenidas se salvaron bajo formato de texto con el programa Microsoft Word 98 para Macintosh.

##### 2) Análisis de las frecuencias de los tramos ricos en CpG y lugares Sp1 en los promotores.

- Análisis de las frecuencias observadas

Las frecuencias observadas se calcularon por contaje directo de los diferentes tramos ricos en CpG a lo largo de los promotores. La búsqueda en los promotores de secuencias de diferentes longitudes conteniendo pasos CpG (5'CG'3), lugares potenciales de intercalación de las Antraciclinas se realizó con el programa DNAStrider

(CEA, Francia) para Macintosh. Se analizó la riqueza en CG de los diferentes promotores, su contenido en CpG y la presencia de secuencias 5'CGNNCG'3 (donde N=A=T=C=G) y 5'CGGGGCG'3. El programa de predicción TESS (Transcription Element Search Software), accesible en la página <http://www.cbil.upenn.edu/tess>, se utilizó para la detección de sitios potenciales de unión del factor de transcripción Sp1 en las regiones promotoras analizadas.

- Análisis de las frecuencias esperadas

Mientras que en el genoma de *E.coli*, las cuatro bases se encuentran igualmente representadas en el DNA (A=T=C=G=0.25) (Beato, 1990), el genoma de los organismos eucariotas es más rico en A·T que en C·G. La probabilidad de encontrar al azar una A o una T en el genoma de un organismo eucariota es de 0.3, mientras que esta probabilidad es de 0.2 para la C y la G (Beato, 1990). Sin embargo, cuando nos planteamos este trabajo, nos encontramos con el problema de que estas proporciones no eran aplicables a las regiones promotoras, más ricas en C·G que el resto de regiones del genoma. Ante la falta de una estimación de las frecuencias esperadas para cada base en las regiones promotoras, decidimos analizar la frecuencia de cada una de ellas en los promotores que habíamos seleccionado (Tablas M4 y R8). Observamos que en promedio, la probabilidad de encontrar al azar cualquiera de las cuatro bases posibles era muy parecida (A+T= 0.47, C+G=0.53). Por este motivo consideramos que, cuando se analizan las regiones promotoras, de manera independiente al resto del genoma, las cuatro bases se encuentran igualmente representadas, ajustándose más al modelo de distribución de bases de *E.coli*.

El cálculo de las frecuencias esperadas para cada secuencia se realizó asumiendo que los cuatro tipos de bases posibles en el DNA (A, T, C, G) están igualmente representados a lo largo de una secuencia promotora eucariota y que su distribución es al azar (Beato, 1990). De este modo, la probabilidad ( $P_t$ ) de que determinada base ( $P_n$ ) se encuentre representada en una secuencia de longitud N será:

$$P_t = P_n \times N$$

Así, la probabilidad de encontrar al azar un tramo 5'CGNNCG'3 (donde N=A=T=C=G=1) en una secuencia determinada será:

$$P_t = P_n \times N = (0.25)^4 \times N$$

(para N=501 pb  $P_t$  será  $\sim 2$  y para N=968pb,  $\sim 4$ )

**Tabla M4.** Descripción de los promotores humanos analizados y números de acceso correspondientes para las diferentes bases de datos (descritas en el texto). La secuencia de DNA satélite rica en A+T del coleóptero *Pimelia sparsa sparsa* se ha utilizado como control de robustez estadística.

	<b>PROMOTOR /SECUENCIA</b>	<b>Nº DE ACCESO</b>
<b>c-myc P1</b>	v-myc avian myelocytomatosis 29 viral oncogene homologue P1	EP11146
<b>c-myc P2</b>	v-myc avian myelocytomatosis 29 viral oncogene homologue P2	EP11148
<b>abl-1</b>	v-Abelson murine leukemia viral oncogene homologue 1	ENSG00000097077
<b>BRCA2</b>	breast cancer 2, early onset	ENSG00000073926
<b>erb-b3</b>	v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homologue 3	ENSG00000065361
<b>jun</b>	v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homologue	ENSG00000116621
<b>p53</b>	p53 cellular tumor antigen	EP11223
<b>Rb1</b>	retinoblastoma 1	ENSG00000023527
<b>bcl-2 P2</b>	B-cell leukemia / lymphoma-2 P2	EP27007
<b>bax</b>	bcl-2 associated X protein	ENSG00000087088
<b>bik</b>	bcl-2 inteacting killer	ENSG00000100290
<b>bcl-x</b>	bcl-2 like 1	ENSG00000125984
<b>CPP32</b>	caspase 3	ENSG00000129176
<b>ciclina D1</b>	cyclin D1	EP60011
<b>ciclina G1</b>	cyclin G1	ENSG00000113328
<b>ciclina A</b>	cyclin A	X68303
<b>CDK10</b>	cyclin-dependent kinase 10	ENSG00000103164
<b>cdc25A</b>	cell division cycle 25A	ENSG00000114239
<b>CDKN3</b>	cyclin-dependent kinase inhibitor 3	ENSG00000100526
<b>MAPK4</b>	mitogen-activated protein kinase 4	ENSG00000101715
<b>MAPK8</b>	mitogen-activated protein kinase 8	ENSG00000107643
<b>JAK1</b>	janus tyrosine-protein kinase 1	ENSG00000116666
<b>TCGF</b>	T-cell growth factor	EP07114
<b>GM-CSF</b>	granulocyte-macrophage colony stimulating factor	EP11137
<b>DHFR</b>	dihydrofolate reductase	EP07056
<b>GAPDH</b>	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	J04038
<b><i>P. sparsa sp</i></b>	<i>Pimelia sparsa sp.</i> satellite DNA	X97702

---

Si se definen las bases centrales del hexanucleótido, por ejemplo en un tramo 5'CGCGCG'3, el cálculo será:

$$P_t = P_n \times N = (0.25)^6 \times N$$

(para N=501 pb  $P_t$  será  $\sim 0.1$  y para N=968pb,  $\sim 0.2$ )

De esta manera, para que una secuencia fuera única en el genoma, esta tendría que tener una longitud mínima de 15-16 pb:

$$P_t = P_n \times N = (0.25)^{16} \times 3 \times 10^9 \sim 1$$