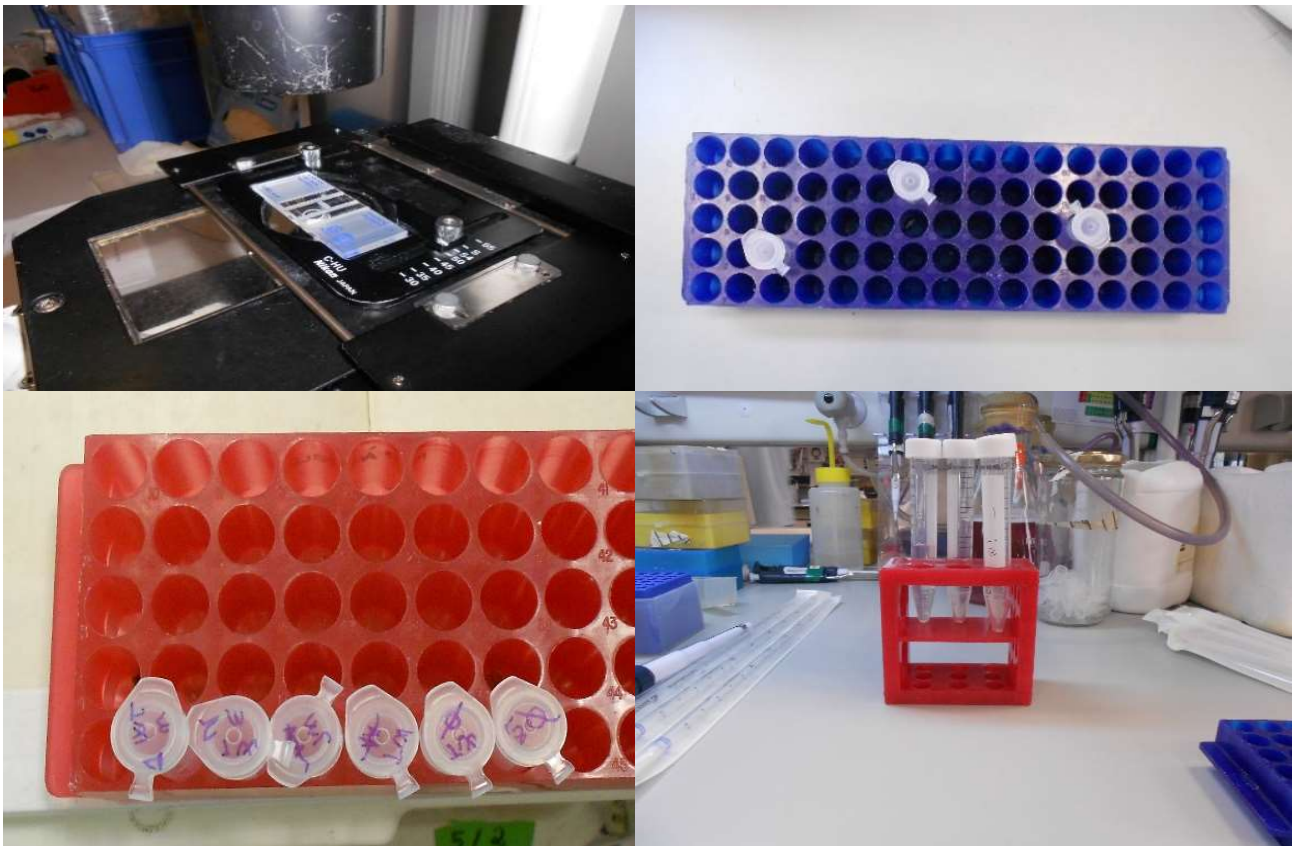


EFFECTE DE LA PROTEÏNA CD98HC EN LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR



Imatges del laboratori (© imatges pròpies)

Júlia Sánchez Martínez
2n BTX B
Gener, 2016
Tutora: Carme Julià

ÍNDIX:

1. Introducció	1
2. Proteïna CD98hc	2
3. Fonament pràctic	
3.1 Material	4
3.2 Precaucions en un laboratori	15
3.3 Experiment 1: Assaig de proliferació cel·lular i utilització del citòmetre citoflex	
3.3.1 Preguntes i hipòtesis	16
3.3.2 Objectius	16
3.3.3 Informació prèvia	17
3.3.4 Descripció de l'experiment	18
3.3.5 Resultats	24
3.4 Experiment 2: Marcatge de CD98hc en fibroblasts (KO i WT) i anàlisi per citometria de flux	
3.4.1 Pregunta i hipòtesi	33
3.4.2 Objectius	33
3.4.3 Informació prèvia	34
3.4.4 Descripció de l'experiment	35
3.4.5 Resultats	38
3.5 Conclusions	
3.5.1 Conclusions experiment 1	42
3.5.2 Conclusions experiment 2	43
4. Valoració del treball	44
5. Bibliografia	45
6. Annexos	48

1. Introducció:

El programa “Crazy about Biomedicine”, organitzat per l’IRB (Institut de Recerca Biomèdica) em va animar i em va facilitar la realització del meu Treball de Recerca. Em vaig inscriure a aquests programa gràcies a la meva tutora de primer de batxillerat, Raquel Úbeda, pensant que podria resoldre alguns dubtes que tenia sobre la biologia, però en comptes d’això me’n va generar encara més. A més vull donar-li les gràcies a la meva tutora del Treball de Recerca, la Carme Julià, per assessorar-me i ajudar-me durant el meu projecte; i al meus pares, per estar disposats a resoldre’m qualsevol dubte en qualsevol moment.

Aquest programa per joves de batxillerat té com a objectius motivar als alumnes interessats en ciència, en concret en biomedicina, i oferir-los una experiència única. Després d’unes quantes sessions dins els laboratoris del centre vaig decidir que el meu treball havia de ser allà, ja que aquests món de la investigació em va deixar fascinada. L’IRB em va oferir l’oportunitat de fer el treball en uns laboratoris molt ben equipats i em va posar en contacte amb la meva tutora d’allà, Sara Cano, sense la qual m’hagués estat impossible la realització d’aquesta petita investigació.

Ja que m’ha estat oferta aquesta oportunitat, he aprofitat el Treball de Recerca per adquirir experiència al laboratori on he estat treballant una setmana, i no només plantejar un dubte i resoldre’l. A més a més, també he pogut conèixer de primera mà com es la vida d’un científic/a avui en dia.

En aquest treball em centraré en la proteïna CD98hc, que és la subunitat pesada d’alguns transportadors d’aminoàcids de membrana plasmàtica. La meva tutora de l’IRB està realitzant una tesi doctoral en els laboratoris de Manuel Palacín, on s’investiga aquesta proteïna, i em va proposar fer una sèrie de comprovacions relacionades amb el seu treball.

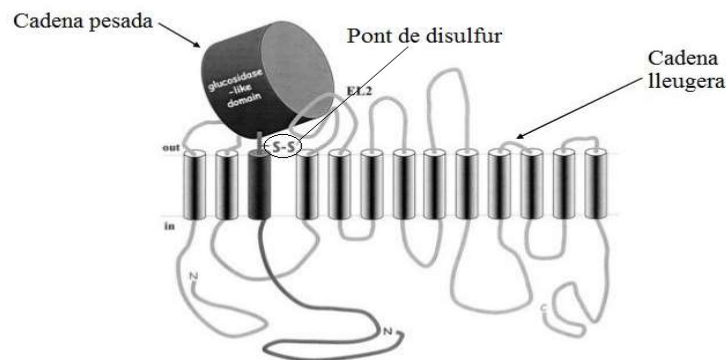
Per tal d’assolir els objectius que m’havia plantejat vam fer dos experiments diferents relacionats amb la proteïna CD98hc, anomenats:

- Assaig de proliferació cel·lular i utilització del citòmetre citoflex
- Marcatge de CD98hc en fibroblasts (KO i WT) i anàlisis per citometria de flux

2. Proteïna CD98hc:

Els Transportadors Heteromètrics d'Aminoàcids (HATs) són una de les 11 famílies de transportadors d'aminoàcids que transporten aminoàcids a través de la membrana plasmàtica en els mamífers. Aquests estan formats per dues unitats: una subunitat pesada que porta el transportador a la membrana plasmàtica, i una de lleugera que s'enganxa a la pesada a través d'un pont de disulfur i que a més és la part catalítica del transportador.

Model de transportadors heteromètrics d'aminoàcids



(© SlideShare)

Com ja he dit anteriorment, aquest treball tractarà sobre la proteïna CD98hc, que és una de les cadenes pesades descobertes fins al moment i que pot combinar-se amb 6 cadenes lleugeres diferents (LAT1, LAT2, y+LAT1, y+LAT2, Asc1 i xCT). Concretament els transportadors CD98hc-LAT1 i CD98hc-xCT estan sobreexpressats en la majoria dels tumors testats i en les línies cel·lulars canceroses, el que suggereix que són importants per a les cèl·lules proliferatives (tumoral).¹

El CD98hc, combinat amb algunes subunitats lleugeres, està involucrat en altres patologies humanes a més dels tumors. Per exemple:

- Combinat amb el xCT participa en la infecció de sarcoma, associada al herpesvirus.
- Combinat amb mutacions de la subunitat pesada y+ LAT1, causa intolerància de la proteïna lisinúria²

¹ Chillarón J et al., Am J Physiol Renal Physiol. 2001
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11704550>

² Wolf et al., 1996; Yanagida et al., 2001; Huang et al., 2005; Kaleeba et al., 2006; Veettil et al., 2008; Torrents et al., 1999.

Fins ara no s'han identificat mutacions del CD98hc, i es creu que un defecte genètic d'aquesta proteïna és letal. Al ser la subunitat pesada de molts transportadors d'aminoàcids, el CD98hc està relacionat amb moltes funcions cel·lulars, com per exemple la transformació cel·lular, la proliferació, la migració i supervivència de les cèl·lules

Les dues cadenes lleugeres dels dos transportadors sobreexpressats en tumors (CD98hc-LAT1 i CD98hc-xCT), tenen diverses funcions dins de la cèl·lula:

- **LAT 1:**

El sistema L és responsable del transport d'aminoàcids de cadena ramificada i d'aminoàcids aromàtics neutres en quasi tots els tipus de cèl·lules. ³ El mecanisme de transport és estimulat per la presència de substrats a l'altre costat de la membrana (estimulació trans). ⁴

S'ha descobert que l'activitat de transport dels aminoàcids anomenats va associada a la proteïna CD98hc. ⁵ El LAT1, o "L-type amino acid transporter 1", sol no fa funció de transportador, sinó que necessita estar unit a la proteïna CD98hc per funcionar.⁶

El CD98hc/LAT1 està dissenyat per equilibrar la concentració de diferents aminoàcids a través d'una membrana. ⁷

- **xCT**

El sistema Xc proveeix un sistema de transport per a la L-cistina i la L-glutamat. La coexpressió del CD98hc i el xCT indueix al intercanvi electroneutral extracel·lular de cistina aniònica per glutamat, que són dos tipus d'aminoàcids. Com que hi ha poc contingut de cistina dins de les cèl·lules (ja que la cistina es redueix ràpidament a cisteïna) aquest intercanvi afavoreix la entrada d'aquesta a partir de la sortida del glutamat.⁸

L'expressió del xCT en el cervell, a més, pot contribuir a equilibrar els nivells de glutatió, protegint així les cèl·lules de l'estrès oxidatiu.⁹

³ Christensen et al., 1965

⁴ Oxender et al., 1963

⁵ Bröer et al., 1995

⁶ Kanai et al., 1998; Mastroberardino et al., 1998

⁷ Meier et al., 2002; Verrey et al., 2003

⁸ Bannai et al., 1980, Bannai et al 1986; Sato et al., 1999; Bassi et al., 2001

⁹ Sato et al., 2002

3. Fonaments pràctics:

3.1 Material:

- **Plaques de 6 pouets** (35 mm de diàmetre)
- **Plaques de cultiu** (100mm de diàmetre)
- **Plaques de 96 pouets**
- **Tripsina:** es tracta d'un enzim peptidasa¹⁰. El tipus de cèl·lules KO i WT que hem usat en els experiments creixen en monocapa; això vol dir que no comencen a proliferar fins que no s'han adherit al substrat. Per això, usarem la tripsina per trencar els enllaços que s'han format entre el terra de la placa i les cèl·lules per tal de desenganxar-les.
- **PBS:** Solució amb la que rentem restes que queden a la placa.
- **Micropipetes i puntes**
- **Microscopi òptic:** aquest l'usem per a visualitzar i comptar les cèl·lules.
- **Pipetes de vidre**
- **Sistema al buit**
- **Comptador manual**
- **Tub Eppendorf**
- **Pipetus i pipetes** (5,10 i 20mL)

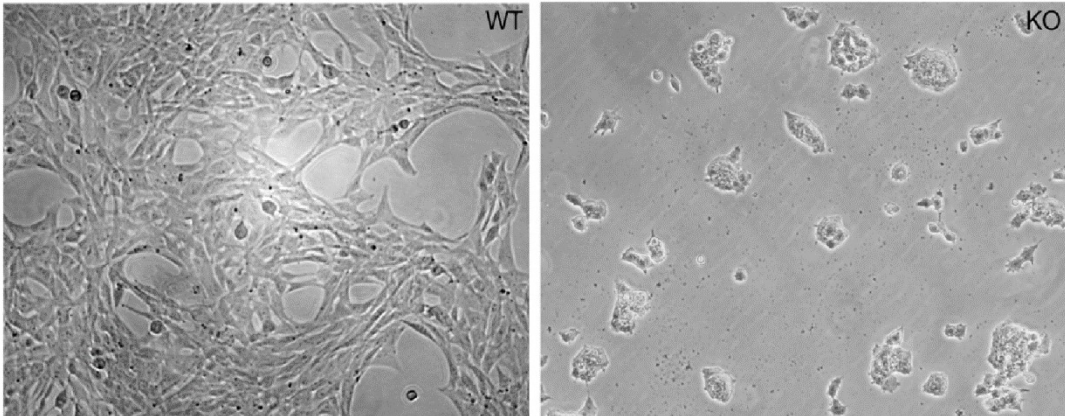


Pipetus i pipetes de diferents mides (© imatges pròpies)

- **Tubs tipus falcó** (50 mL i 15 mL)
- **Rotor de tubs**

¹⁰ Les peptidases són enzims que trenquen els enllaços peptídics de las proteïnes. Usen una molècula d'aigua per a fer-ho i por tant es classifiquen como hidrolases.
<https://nutricionpediatrica.wikispaces.com/Peptidasa>

- **Línies cel·lulars WT (wild type) i KO (knock out):** Les cèl·lules KO¹¹ són fibroblasts¹² derivats i immortalitzats de cèl·lules mare embrionàries d'un ratolí KO¹³ per al CD98hc, és a dir, a aquests ratolins se'ls va eliminar el gen que produïa la proteïna CD98hc. Les cèl·lules WT també són fibroblasts derivats de cèl·lules mare embrionàries de ratolí però sense modificar, és a dir, encara contenen la proteïna CD98hc.



Línies cel·lulars WT i KO (© IRB)

- **Medi de cultiu cel·lular:** El medi de cultiu cel·lular normal, és a dir, òptim per a que les cèl·lules sobrevisquin, ha de tenir unes característiques determinades i contenir una sèrie de substàncies:
 - Conté DMEM, que és un medi de cultiu format per aminoàcids, vitamines, glucosa i piruvat¹⁴. Tot i així, no conté ni factors de creixement, ni lípids ni proteïnes. És per això que li afegim un sèrum

¹¹ Les cèl·lules KO que utilitzem al laboratori van ser generades per Chloé C. Féral (Universitat de Nice - Sophia Antipolis, Nice, France)

¹² Els fibroblasts són les cèl·lules més comuns i menys especialitzades del teixit conjuntiu (que forma els tendons i els lligaments, i una part de la dermis). Aquests s'encarreguen de la síntesi i el manteniment de la matriu extracel·lular (l'espai que hi ha entre cèl·lules, ja que les cèl·lules no s'han de tocar necessàriament) i presenten una gran capacitat per diferenciar-se, originant altres tipus cel·lulars més especialitzats del teixit conjuntiu. <http://medmol.es/glosario/84/>

¹³ Un ratolí KO, és un ratolí modificat a partir d'enginyeria genètica per tal de que un o més dels seus gens estiguin inactivats o sobreexpressats i així intentar esbrinar quina funció té aquest. En aquest cas s'ha inactivat el gen que codifica la proteïna que he estudiat, el CD98hc. https://biotechspain.com/es/tecnica.cfm?iid=110624tecnica_knockout_condicional

¹⁴ El piruvat és un compost molt important per a la cèl·lula, ja que és clau per a la producció d'energia. <http://www.guiametabolica.org/ecm/deficiencia-piruvato-carboxilasa-pc/info/es-piruvato>

fetal boví (10 %), per tal de suplementar-lo. A més a més afegim alguns aminoàcids no-essencials¹⁵ que no conté el medi originàriament.

- El pH ha de ser 7.4, ja que és l'òptim per al creixement de la majoria de les cèl·lules. El medi de cultiu, a més, el tamponem amb el buffer HEPES¹⁶ per tal d'evitar els canvis bruscos de pH.

- Conté antibiòtic per tal de prevenir contaminacions de bacteris. En concret afegim el Penicilina-Streptomicina.

- La glutamina, que és un tipus d'aminoàcid, la posem en el medi cada cop que el preparem, ja que és degrada fàcilment.

- Conté B-mercaptoethanol, que és essencial per a què les cèl·lules KO puguin sobreviure, ja que actua com a reactivador d'enzims.



Compound (stock solution)	concentration
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GIBCO, #21969-035)	
D-glucose	4.500 mg/L
Sodium pyruvate	110 mg/L
FetalClone II U. S. Origin (HyClone, #S-B30066.03, lot AUE34894)	10 %
*	
*Heat inactivated 30 min at 56°C	
Penicilin-Streptomycin (100x) (GIBCO, #15140-122)	100 U/mL
L-glutamine (100x) (Invitrogen, #25030-081)	2 mM
Non essential amino acids (100x) (Invitrogen, #11140-050)	0,1 mM
Hepes (1,25 M; pH 7.4)	20 mM
β -mercaptoethanol (55 mM) (Sigma Aldrich, #M7522-100mL)	0,1 mM

Medi (© imatge pròpia)

Composició del medi (©Féral et al)

- **Medi de cultiu cel·lular deficient en aminoàcids essencials i medi sense alguns aminoàcids essencials:** El primer és un medi igual al descrit anteriorment, però amb una quantitat menor d'alguns aminoàcids essencials. El segon no conté els següents aminoàcids essencials, que són també els que es troben en poca quantitat en el medi deficient

¹⁵ Un aminoàcid essencial és aquell que no podem fabricar i per tant l'hem d'incorporar a través de la nostra dieta. En canvi els no essencials són aquelles que el nostre cos si que pot sintetitzar. <http://demedicina.com/aminocidos-esenciales-y-no-esenciales/>

¹⁶ Un buffer, és un medi format bàsicament per salts dissoltes que esmorteixen les variacions de pH del medi. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/hepes-specification.html>

d'aminoàcids: leucina, isoleucina, valina, tirosina, triptòfan i fenilalanina. Li traiem només aquests sis aminoàcids essencials perquè en les cèl·lules KO es troben en molta menys quantitat que en les WT, i així quan els traiem del medi de cèl·lules WT, fem que aquestes s'assemblin el màxim possible a la situació de les KO.

- **Centrífuga:** la centrífuga és un equip de laboratori que genera moviments de rotació i que té com a objectiu separar els components que constitueixen una substància segons la seva densitat. Durant aquesta pràctica la usarem per fer baixar al fons d'alguns tubs totes les cèl·lules d'una dissolució, formant un pellet, per tal de poder-les agafar amb la micropipeta i així poder passar les cèl·lules a un volum de medi més petit.

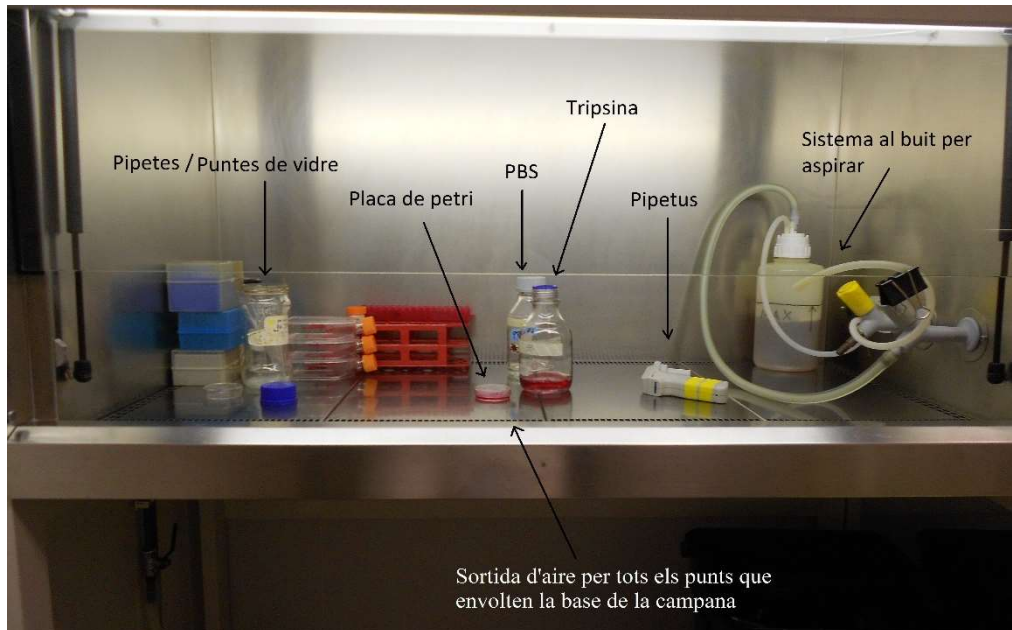


Centrífuga (© imatges pròpies)

- **Campana de flux laminar:** La campana de flux laminar, també coneguda com a cabina de flux laminar, és una espècie de capsa molt gran que permet mantenir lliure de pols l'atmosfera del volum interior que aquesta engloba. Normalment està composta per 5 làmines d'acer inoxidable col·locades formant una capsa, i en la seva part frontal acostuma a tenir una o dues portes de vidre temperat del tipus guillotina. Un flux d'aire surt constantment del voltant de la base de la campana. Aquest, procedent d'un ventilador, passa a través d'un filtre d'alta eficiència capaç de no deixar passar partícules més grans de 0,3 μm . La velocitat del ventilador està regulada de tal manera que fa que l'aire de l'interior de la campana es mogui com un fluid laminar, és a dir, de manera ordenada i suau.

En el cas que sigui necessari treballar amb productes tòxics, la campana té incorporada un segon filtre instal·lat a la sortida de l'aire, per tal d'evitar l'emissió de productes contaminants.

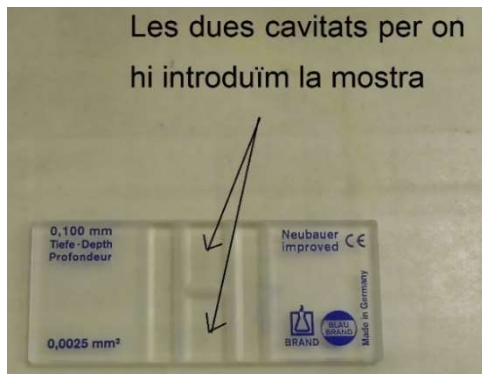
D'aquesta manera es pot treballar amb les mans dins la campana en condicions d'alta esterilitat.¹⁷



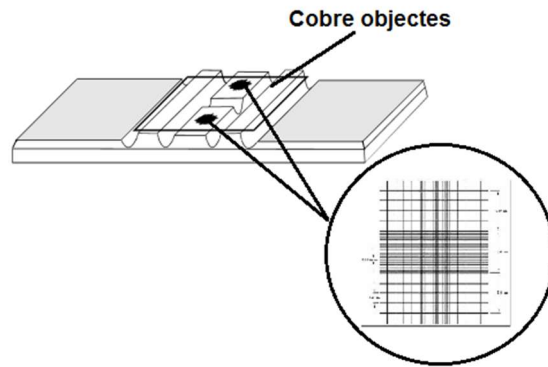
Campana de flux laminar (© imatge pròpia)

- **Càmera de Neubauer:** Aquesta càmera és un instrument molt útil a l'hora de comptar cèl·lules en un medi líquid. Es tracta d'un portaobjectes, una mica més gruixut que els normals, amb dues zones lleugerament enfonsades, les quals contenen unes quadrícules de dimensions conegudes. Per tal d'utilitzar-la, primer la cobrim amb un cobreobjectes que s'adhereix per tensió superficial. Seguidament introduïm per capil·laritat la mostra líquida amb cèl·lules (normalment prèviament diluïda) que hem escollit entre la càmera de Neubauer i el cobreobjectes. Finalment, observem la càmera a través d'un microscopi, comptem el nombre de cèl·lules que tenim, i a partir d'aquestes i del volum de líquid que hem introduït a la càmera, calculem la concentració de cèl·lules de la mostra.

¹⁷ <http://intrepido1.over-blog.es/article-como-funciona-campana-flujo-laminar-85924110.html>



(© imatge pròpia)



Imatge modificada per l'autora (© Grupo-3)

Imatge d'una de les quadrícules	Explicació
<p>(© celeromics)</p>	<p>La càmera de Neubauer conté dues quadrícules com les de la imatge.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aquestes estan dividides en 9 quadrats de 1mm² cada un (número 1 de la imatge). - A la vegada aquests 9 quadrats se subdivideixen en 16 quadrats (número 2 de la imatge). - El quadrat central se subdivideix en 25 quadrats i aquests en uns altres 16 quadrats (número 3 de la imatge).

Per tal de calcular la concentració de cèl·lules, només cal comptar les cèl·lules que hi ha dipositades sobre els quatre quadrants de les cantonades (els 1).

Aquesta es calcula multiplicant la mitjana de les cèl·lules totals comptades per quadrat, pel factor de la càmera, que és un número que val 10.000. D'aquesta operació ens en surten el nombre de cèl·lules per mL.

En un dels quadrats grans (número 1 de la imatge) hi caben $0,1\text{mm}^3 = 10^{-4}$ mL, ja que l'altura d'un d'aquests quadrats és 0,1mm, l'amplada és d'1mm i la llargada és d'1mm. Per tant : $1 \times 1 \times 0,1 = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4}$ mL. Si en un dels quadrats grans hi cap una deumil·lèsima part del que hi cap en un mL, multipliquem la mitjana de cèl·lules que hi caben en un quadrat gran per 10.0000 per saber les cèl·lules que hi ha per mil·lilitre.

Si a més hem fet una dissolució prèvia de la mostra, hem de multiplicar el valor que hem obtingut per la inversa de la dissolució que hem realitzat.¹⁸

Fórmula per calcular les cèl/mL que hi ha en cada pou

$$\text{Àrea} = 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} = 1 \text{ mm}^2 \quad \text{Volumen} = 1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 1 \times 10^{-4} \text{ ml}$$

1

$$\text{Concentració cel·lular} = \frac{\text{Total Células Contadas}}{\text{Número de Cuadrados}} \times 10.000$$

(© celeromics)

- **Anticossos:** Els anticossos¹⁹, també anomenats immunoglobulines, són glucoproteïnes del tipus gamma globulina²⁰²¹ que circulen per la sang i que són utilitzats pel sistema immunitari per tal de combatre antígens²² que causen danys a l'organisme. La seva funció bàsica és la de identificar i neutralitzar elements externs (antígens), tals com bacteris, paràsits o virus que entren al cos de l'organisme. A més a més, cada immunoglobulina és única i específica per a cada tipus d'antigen. Els anticossos, un cop produïts, romanen circulant per la sang durant mesos, el qual genera la immunitat durant llargs períodes de temps a un cert antigen. Els anticossos poden trobar-se de forma soluble a la sang o en altres fluïts corporals dels vertebrats.

¹⁸ <file:///C:/Users/Júlia/Google%20Drive/TR%20documents/2010-Marienfeld-info-camaras-de-recuento.pdf>

¹⁹ <http://www.muyinteresante.es/curiosidades/preguntas-respuestas/ique-son-los-anticuerpos>

²⁰ Globulina: Proteïna insoluble en aigua pura i soluble en solucions que contenen sals minerals. Aquestes es troben principalment a la sang, ens els ous i en la llet.
<https://es.wikipedia.org/wiki/Globulina>

²¹ La gamma globulina és un tipus de globulina denominada així perquè apareix en última posició quan se separen les proteïnes del sèrum sanguini mitjançant una electroforesi (tècnica de separació de molècules segons la seva mobilitat en un camp elèctric). El principal tipus de gamma globulina és el dels anticossos, tot i que alguns d'aquests no migren en aquesta fracció de l'electroforesi.
https://es.wikipedia.org/wiki/Gamma_globulina <http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.htm>

²² Els antígens són molècules estranyes a l'organisme que són susceptibles a ser reconegudes pel seu sistema immunitari.
<http://recursos.cnice.mec.es/biosfera/alumno/2bachillerato/inmune/contenidos5.htm>

L'anticòs típic està constituït per unitats estructurals bàsiques, cada una d'elles amb dos grans cadenes pesades i dos cadenes lleugeres de mida menor.



En investigació, els anticòssos purificats s'usen habitualment per a identificar i localitzar proteïnes intra i extracel·lulars. Aquest ús s'aplica a la citometria de flux, la qual ens permet veure si unes determinades cèl·lules han o no han expressat una determinada proteïna.

Nosaltres utilitzarem dos tipus d'anticòssos:

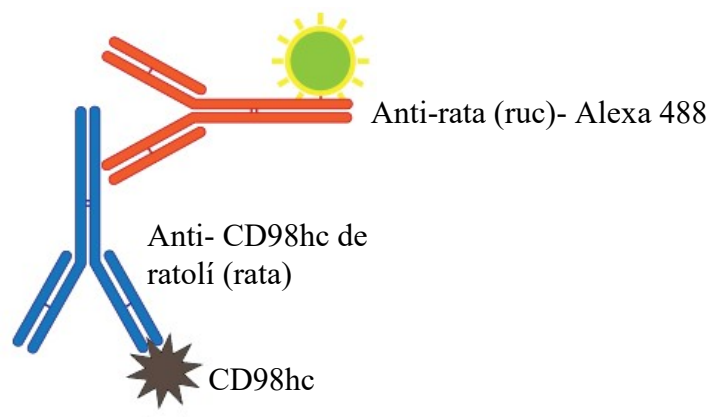
- Anticòs primari: s'uneix i marca la proteïna d'interès. En el nostre cas s'unirà específicament a la proteïna CD98hc, que és de ratolí. L'anticòs per això, va ser generat en rata.
- Anticòs secundari: determinà si l'anticòs primari s'ha unit a la proteïna d'interès. L'anticòs secundari reconeix de forma específica una regió concreta de l'anticòs primari, que a la vegada està unit a la proteïna d'interès. L'anticòs secundari emet un senyal (en el nostre cas serà fluorescent) que més tard serà reconegut per la tècnica amb què sigui analitzat (en el nostre cas la fluorescència serà reconeguda pel citòmetre). Per tant, si una certa mostra de proteïnes emet aquest senyal, voldrà dir que l'anticòs primari i secundari s'hauran adherit als seus llocs corresponents. Un anticòs secundari "anti-rata", serà aquell capaç de reconèixer quasi tots els anticòssos primaris obtinguts de rates. L'ús d'anticòssos secundaris presenta les avantatges que amplifiquen el senyal (ja que molts anticòssos secundaris s'uneixen a primaris), que són econòmics, que permeten a un mateix laboratori compartir una única font d'anticòssos secundaris i que donen resultats molt consistents.

Depenent de la tècnica de reconeixement que es vagi a utilitzar, els anticossos secundaris estaran marcats d'una forma diferent. En el nostre experiment hem usat un anticòs secundari anti-rata (generat en ruc) unit químicament a una substància fluorescent anomenada Alexa 488.

Per tant, el nostre serà un reconeixement indirecte en el que hem utilitzat dos anticossos: un anticòs primari que reconeix i s'uneix a la molècula diana (CD98hc), i un anticòs secundari, que es el que es troba marcat amb el fluoròfor²³, que reconeix al primari i s'uneix a aquest.²⁴

Els dos anticossos que hem utilitzat han estat :

- Anti CD98hc de ratolí (rata)
- Anti-rata (ruc) marcat amb Alexa 488



Imatge modificada per l'autora (© medicoblastoslatinos)

- **Citòmetre de flux:** La citometria de flux, és una tecnologia biofísica basada en la utilització de llum làser per al recompte i classificació de cèl·lules. En els citòmetres de flux, les cèl·lules suspeses en un fluid, travessen un tub molt fi i transparent sobre el qual incideix un raig làser molt primet. La llum transmesa i dispersada de quan passen les cèl·lules a través del tub, es recull per mitjà d'uns dispositius de detecció que permeten fer deduccions de la mida i de la complexitat de les cèl·lules. També permet l'anàlisi simultani d'altres característiques físiques i químiques, avaluant així de mitjana, més de 2000 partícules per segon.

²³ Molècula que produeix fluorescència

²⁴ <https://books.google.es/books?id=iW0yHGmE-JwC&pg=PA262&lpg=PA262&dq=anticuerpos+biologia+molecular&source=bl&ots=7CizARYkaD&sig>

La tècnica de classificació de cèl·lules activades per fluorescència FACS²⁵, és un tipus especialitzat de citometria de flux. Aquesta tècnica proveeix un mètode per a la classificació i selecció de cèl·lules que provenen d'una barreja de diverses poblacions, que es poden trobar en dos o més contenidors. Cada cop deixa passar una cèl·lula de cada contenidor i la classifica segons les seves característiques de dispersió i fluorescència.

És un instrument científic de gran utilitat, ja que proveeix un mètode de gravació de dades provinent de les senyals de la fluorescència de cada cèl·lula, i és a la vegada un mètode ràpid, objectiu i quantitatiu. A més ens permet separar físicament aquelles cèl·lules que pertanyen a la població en què estem interessats.

La suspensió de cèl·lules que tenim als contenidors és arrossegada cap al centre d'un corrent de líquid estret que flueix ràpidament. El flux està disposat de manera que existeixi una gran separació entre cèl·lules, en relació amb el diàmetre d'aquestes.

Un mecanisme de vibració ultrasònic provoca que aquest líquid que conté les cèl·lules, es trenqui en gotetes petites. El sistema s'ajusta de tal manera que hi ha una baixa probabilitat de què més d'una cèl·lula quedi continguda en cada gota.

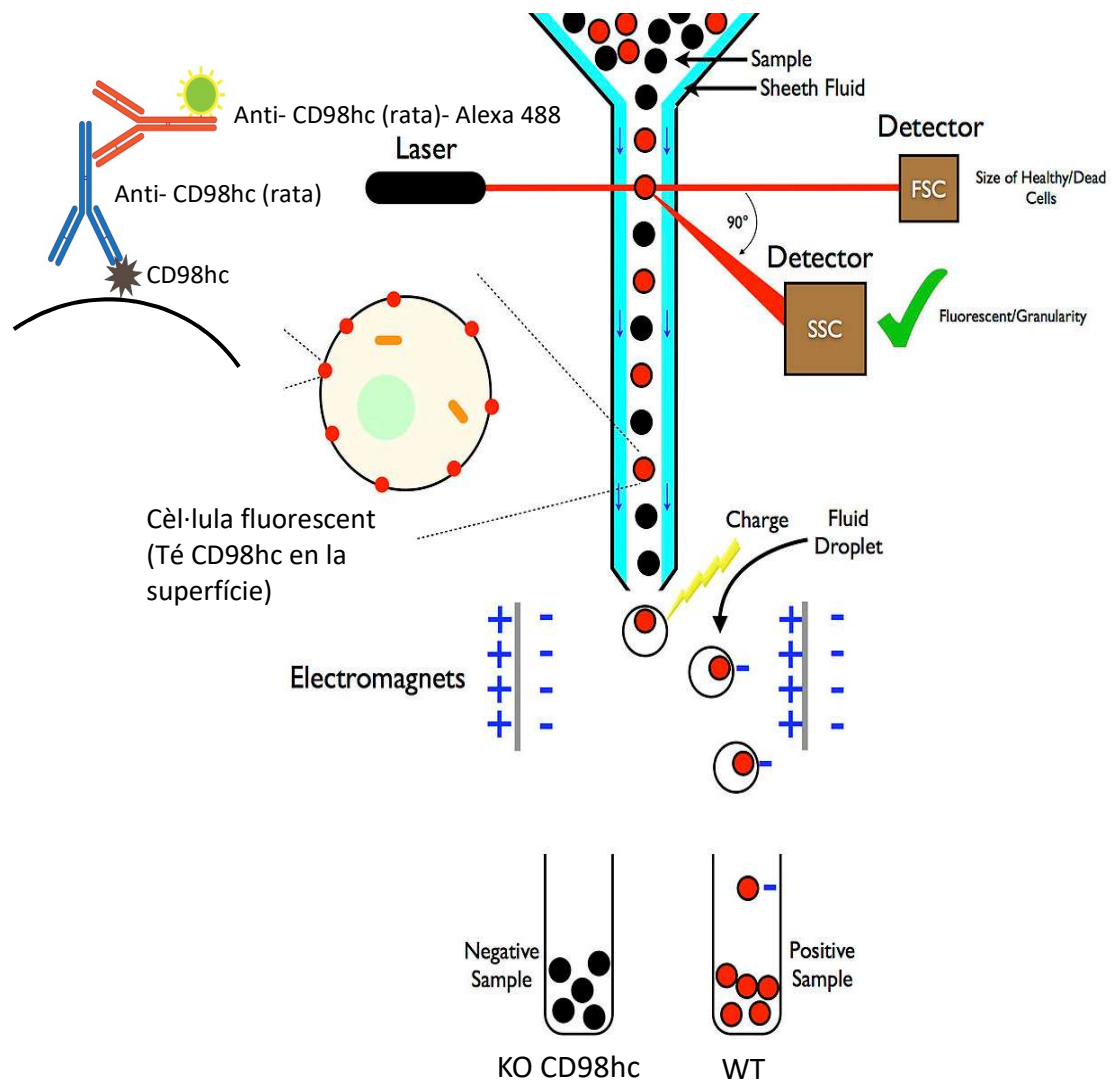
Just abans que el corrent es trenqui en gotetes, el flux passa a través d'una estació que mesura la fluorescència, on es mesura el caràcter fluorescent d'interès de cada cèl·lula. Un anell capaç d'adquirir una càrrega elèctrica, es col·loca just en el punt on el corrent es trenca en gotetes. Segons la intensitat de fluorescència recollida anteriorment de cada cèl·lules, el sistema entrega una determinada càrrega a l'anell. Com a conseqüència, les gotes es carreguen amb el signe contrari al que se li ha donat l'anell. A continuació, les gotetes carregades cauen a través d'un sistema de deflexió electrostàtica²⁶, que desvia les gotes en diversos contenidors segons la càrrega que contenen.

²⁵ Fluorescence-Activated Cell Sorting

²⁶ Desviació de la direcció de un flux

En alguns sistemes, la càrrega s'aplica directament al corrent de líquid, i per tant la gota i la càrrega aplicada, tenen una càrrega del mateix signe. Després de que la gota s'hagi després, l'anell recupera una càrrega neutra.

Quan els làsers FSC incideixen de manera horitzontal en la molècula, aquests es bifurquen, i l'angle que formen determina la mida d'aquesta. En canvi, els làsers SSC determinen la granularitat o forma de la molècula depenent de com es fragmentin en diferents llums quan incideixen sobre aquesta.²⁷



Imatge modificada per l'autora (© wikipedia)

27

<https://books.google.es/books?id=UhN9f8wiIKIC&pg=PA281&dq=citometria+de+flujo&hl=es&sa=X&ved=0ahUKewjkveKPk6TRAhXLtxQKHc4uCFQAQ6AEIOzAD#v=onepage&q=citometria%20de%20flujo&f=false>

3.2 Precaucions en un laboratori:

Quan es treballa en un laboratori s'han de prendre una sèrie de precaucions per tal de no confondre i no malmetre les mostres:

- Sempre utilitzarem bata i guants.
- Treballarem en condicions esterilitzades dins d'una campana de flux laminar.
- El material haurà d'estar esterilitzat. Cada cop que introduïm material dins de la campana de flux l'hem de netejar amb alcohol per a desinfectar-lo.
- Cada cop que utilitzem la punta d'una pipeta s'haurà de tirar per tal de que no quedin restes d'una altra mostra i no contaminar el material amb el que estem treballant.
- Quan posem alguna substància dins d'un recipient, i no vulguem fer malbé la mostra, ho farem col·locant la pipeta contra la paret del recipient i deixant anar suaument el líquid per tal de no desenganxar les cèl·lules del recipient i no fer-les malbé.
- Quan tinguem plaques semblants, s'hauran de marcar amb una ralla per tal de que la tapa i el recipient coincideixin quan es torni a tancar la placa. D'aquesta manera evitarem confondre les plaques, que sovint contenen diferents substàncies.
- Els anticossos que utilitzem durant l'experiment sempre hauran de ser mantinguts en condicions fredes, per exemple dins de gel, mentre no s'estan utilitzant.
- Quan utilitzem la centrífuga, haurem de col·locar les mostres que tenen la mateixa massa o pes de forma oposada en el rotor per tal de que no surtin disparades.



(© *Biotecnología: Historia y Seguridad en el Laboratorio*)

3.3 Experiment 1: Assaig de proliferació cel·lular i utilització del citòmetre citoflex:

3.3.1 Preguntes i hipòtesis:

- a) És veritat que el CD98hc té un paper rellevant en la proliferació cel·lular? Si realment el té, les cèl·lules que no tinguin aquest transportador, és a dir, les cèl·lules KO, creixeran menys que les normals que sí que el tenen.
- b) Cèl·lules WT (amb transportador CD98hc) però cultivades en un medi de cultiu deficient en aminoàcids essencials, també creixeran menys que les mateixes cèl·lules cultivades en un medi amb aminoàcids suficients? Si fos el cas que les cèl·lules KO creixessin menys que les cèl·lules WT degut a una deficiència en l'absorció de determinats aminoàcids essencials, ja que no tenen el CD98hc i per tant no poden obtenir aquests aminoàcids, llavors les cèl·lules WT amb medi deficient d'aminoàcids haurien de créixer menys que les que estan en un medi normal, ja que tampoc poden absorbir aquests aminoàcids perquè no els tenen en el medi.
- c) Si és veritat que les cèl·lules WT creixen més que les KO, a què és degut? Potser la població de les KO és més petita perquè les cèl·lules moren més i no sobreviuen tantes com en les cèl·lules WT, i no perquè creixin menys a causa de la deficiència d'aminoàcids.

3.3.2 Objectius:

- Estudiar i comparar la proliferació cel·lular de cèl·lules KO i WT.
- Estudiar i comparar la proliferació cel·lular de cèl·lules normals en diferents tipus de medi.
- Aprendre a realitzar un assaig de proliferació comptant cèl·lules amb la càmera de Neubauer.
- Conèixer com es treballa amb cultius cel·lulars procurant no infectar el cultiu amb bacteris.

3.3.3 Informació prèvia:

Quan vaig arribar al laboratori per primera vegada vam agafar unes mostres de cèl·lules, que la meva tutora del Treball de Recerca de l'IRB havia descongelat dos dies abans, d'un aparell que es trobava a 37°C. Aquesta temperatura és la ideal per a que les cèl·lules proliferin. La Sara havia descongelat una ampolla de cèl·lules WT (wild type) i dos ampolles de cèl·lules KO (knock out) que estaven a -80°C . De les cèl·lules KO va descongelar dues ampolles perquè al no tenir la proteïna CD98hc els costa més créixer.

Normalment quan les cèl·lules porten molt de temps dintre del medi (que és de color rosa) aquest es torna de color ataronjat i grogós , el qual ens indica que les cèl·lules han crescut bastant. El medi conté un indicador de PH anomenat vermell de fenol, i el color d'aquests canvia durant el creixement cel·lular perquè el PH canvia degut als metabòlits²⁸ lliurats per les cèl·lules. En valors baixos de PH, el vermell de fenol es torna de color groc, mentre que a valors de PH més grans es torna de color púrpura. El problema que vam tenir amb les cèl·lules KO va ser que un cop descongelades i posades en medi, al cap d'un parell de dies, el seu medi seguia de color rosa, mentre que el medi de les WT era de color taronja. Aquest fet ens va fer pensar que moltes de les cèl·lules KO s'havien mort i per tant no havien crescut, i després vam comprovar amb el microscopi que efectivament s'havien mort. Les cèl·lules mortes es reconeixen perquè són aquelles que floten pel medi, no estan enganxades a les parts de la placa i són les úniques que no brillen. Com que no teníem cèl·lules KO per a fer un estudi de creixement d'aquestes per tal de comparar-les amb el creixement de les cèl·lules WT (com ens teníem proposat als objectius) la Sara em va donar les seves dades d'antics estudis que havia fet comparant el creixement d'aquests dos tipus de cèl·lules.

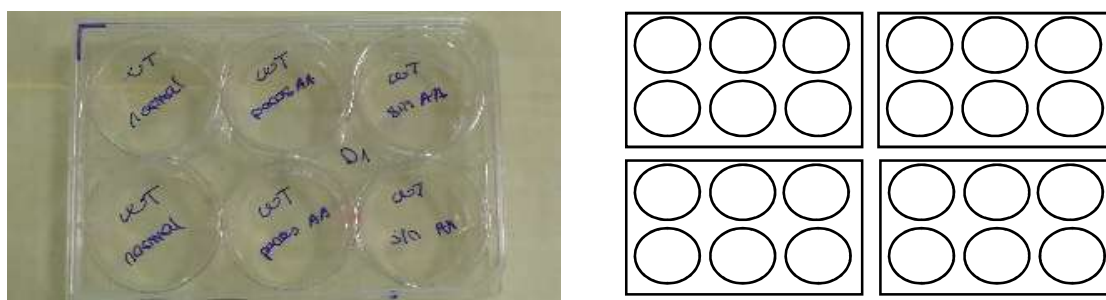
²⁸ Qualsevol substància produïda durant el metabolisme

3.3.4 Descripció de l'experiment

Dia 1:

El primer dia vam preparar unes mostres de cèl·lules WT en un medi normal, unes altres cèl·lules en un medi deficient en alguns aminoàcids essencials i unes altres en un medi sense alguns aminoàcids essencials, per tal de veure el seu creixement. Aquestes mostres les vam posar en quatre plaques amb sis pous cada placa:

El protocol²⁹ que vam seguir va ser el següent:



Placa amb WT en tres medis diferents (© imatge pròpia) Les 4 plaques amb 6 pous cada una (© imatge pròpia)

1. Primer vam netejar tot el material que necessitàvem amb alcohol i el vam col·locar dins la campana de flux per treballar en condicions d'esterilitat. Després vam agafar cèl·lules WT de les ampolles descongelades i vam absorbir el medi que contenia l'ampolla amb una pipeta de vidre enganxada a un sistema de buit.
2. Després vam posar 10 mL de PBS a l'ampolla per acabar de netejar les restes de medi que poguessin quedar. El PBS és important perquè el sèrum boví del medi inactiva l'efecte de la tripsina (que fa que les cèl·lules es desenganxin de la placa), i si en quedessin restes de medi, quan posteriorment afegíssim la tripsina, aquesta no faria efecte. Havent esperat uns segons, vam aspirar el PBS.
3. A continuació vam afegir 1 mL de tripsina, vam esperar 5 minuts a que es desenganxessin totes les cèl·lules de la paret de l'ampolla, i ho vam passar tot a una placa de 150 mm de diàmetre. Vam afegir 10 mL de medi de cultiu a la placa i ho vam barrejar tot amb la pipeta perquè quedés una mescla homogènia.

²⁹ Tots els protocols de treball experimental me'ls van facilitar al laboratori de Manuel Palacín

4. Per tal de poder comptar les cèl·lules còmodament a la càmera de Neubauer, vam fer una dissolució de 1:10 amb una part de les cèl·lules, ja que si hi ha masses és difícil comptar. Per això vam agafar 900 µL de medi i els vam barrejar amb 100 µL del medi amb cèl·lules WT que teníem a la placa, i ho vam posar tot dins d'un Eppendorf.
5. Seguidament vam agafar 10 µL d'aquesta dissolució diluïda de l'Eppendorf i amb una micropipeta la vam introduir entre el cobreobjectes i la càmera pels dos costats que aquesta té. Un cop tot preparat ens vam disposar a comptar les cèl·lules que veiem a través del microscopi. Només comptàvem les cèl·lules de les graelles de 16 quadrats de les cantonades³⁰. Per agilitzar el recompte vam usar un comptador manual. A l'hora de fer el comptatge havíem de vigilar de comptar només cèl·lules que estiguessin vives, és a dir, aquelles que eren rodones, blanques i brillants, i havíem de descartar les mortes que estaven deformades i no brillaven. Les cèl·lules que vam comptar van ser les següents:

Taula 1							
Cèl·lules al costat 1 de la càmera				Cèl·lules al costat 2 de la càmera			
37	36	36	33	45	50	55	39

6. Per tal de preparar les mostres de cèl·lules WT en els diferents medis vam fer els següents càlculs:
 - Seguint la fórmula de la càmera de Neubauer vam calcular la concentració de cèl·lules que teníem en un costat de la càmera: $37+36+36+33/4 \times 10.000 \times 10 = 3550000 \text{ cel/ml}$ (vam multiplicar per 10 perquè teníem la dissolució dissolta a 1:10)
 - Seguint la fórmula de la càmera de Neubauer vam calcular la concentració de cèl·lules que teníem a l'altre costat de la càmera: $45+50+55+39 / 4 \times 10.000 \times 10 = 4475000 \text{ cel /ml}$ (vam multiplicar per 10 perquè teníem la dissolució dissolta a 1:10)

³⁰ Mirar imatge més amunt. Són les graelles numerades amb el número 1

- Vam fer la mitjana d'aquests dos valors: $3550000 + 4475000 / 2 = 3912500$ cel/mL. Aquest valor vol dir que a la dissolució sense diluir que teníem hi havia aproximadament 3912500 cèl·lules per cada mL de medi.
- Vam calcular el nombre de pouets que necessitàvem per fer l'assaig: com que volíem mirar el creixement de les cèl·lules durant 4 dies, vam agafar 4 plaques, una per cada dia. Per placa hi havia 6 pouets, dels quals dos contindrien cèl·lules WT amb medi normal, dos més WT amb pocs aminoàcids essencials al medi i dos pouets tindrien cèl·lules WT amb medi sense alguns aminoàcids essencials (utilitzem 6 pouets per placa en comptes de 3, és a dir fem duplicats, per tal de que els resultats siguin més fiables i disminuir l'error). A l'hora de comptar els pouets totals que teníem, en vam comptar 7 per placa en comptes de 6, que és el nombre que realment teníem, ja que al llarg de l'experiment es van perden cèl·lules i medi. És a dir, vam comptar el volum que necessitàvem com si tinguéssim 7 pous per placa, quan en realitat teníem 6, ja que tot el líquid que es va perden a mesura que es fa l'experiment ve representat per aquest pouet de més que comptem per placa. Per tant: $7\text{pouets/placa} \times 4\text{ plaques} = 28\text{ pouets}$ teníem en total.
- Vam calcular el volum total de medi que necessitàvem per preparar les nostres mostres: si teníem 28 pouets i a cada pouet volíem posar 2mL, necessitaríem $2 \times 28 = 56\text{ mL}$.
- Vam calcular el nombre total de cèl·lules que necessitaríem: tenint en compte que volíem plaquejar 10.000 cèl·lules per pou vam fer $10.000\text{ cèl/pou} \times 28\text{ pous} = 280000\text{ cèl·lules}$.
- Usant factors de conversió vam calcular el volum de cèl·lules que necessitàvem a partir del resultats obtinguts dels càlculs anteriors:

$$280000\text{ cèl} \times 1\text{ mL} / 3912500\text{ cel} = 0,071\text{ mL} = 71\text{ }\mu\text{L}$$
- 7. A continuació vam agafar 71 μL de cèl·lules de la nostra dissolució i els vam afegir a un falcó junt amb 56 mL de medi normal. Vam preparar dos falcons més seguint el mateix procediment, però a un afegint-li medi deficient d'aminoàcids, i a l'altre medi sense aminoàcids.
- 8. Vam omplir els pouets de les quatre plaques amb 2mL de les solucions que teníem preparades en els tres falcons. A cada placa vam omplir dos

pous de cada tipus de medi amb cèl·lules. Vam marcar sobre la tapa amb un retolador el tipus de medi que contenia cada pouet per no confondre'ns

9. Finalment vam deixar reposar les plaques a 37°C durant 24h.

Dia 2:

Aquest dia no vam comptar cèl·lules, ja que no havien tingut temps de créixer el suficient i hi havia molt poques. El que vam fer va ser aspirar amb cura el medi dels 24 pouets amb la pipeta de vidre enganxada al sistema al buit, i tornar a posar 2 mL de medi nou a cada pou. A cada pouet hi vam afegir el tipus de medi que li convenia segons com ho havíem retolat el dia anterior.

Dia 3:

El tercer dia vam preparar la mostra perquè pogués ser comptada, i vam comptar el nombre de cèl·lules que hi havia de cada mostra:

1. Primer vam agafar la placa del dia u de comptatge, la vam observar al microscopi, i vam aspirar el medi amb compte de no arrencar les cèl·lules que estaven enganxades a la placa.
2. Vam posar 500 μ L de PBS per pouet per netejar les restes de medi i esperats un segons el vam aspirar. El PBS s'havia de posar amb molta cura i sense tocar les cèl·lules, només tocant la paret del pouet, per tal que caigués més suaument i no arrencar cèl·lules del terra del pouet sense voler.
3. A continuació vam posar 150 μ L de tripsina per pou i vam esperar 5 minuts a que es desenganxessin les cèl·lules de la placa.
4. Vam afegir 150 μ L de medi a cada pouet i després vam posar les 6 mostres de cada pouet en 6 tubets marcats amb un retolador per tal de no confondre-les.
Seguidament vam agafar 10 μ L de cada tubet, i un per un, els vam introduir a la càmera de Neubauer i vam comptar de cada mostra les cèl·lules que hi havia.
5. Finalment vam canviar el medi a les altres tres plaques que teníem. És a dir, els vam aspirar els medis antics i els vam introduir de nou. A cada pouet hi vam introduir el medi adient segons com estiguessin retolats.

Dia 4:

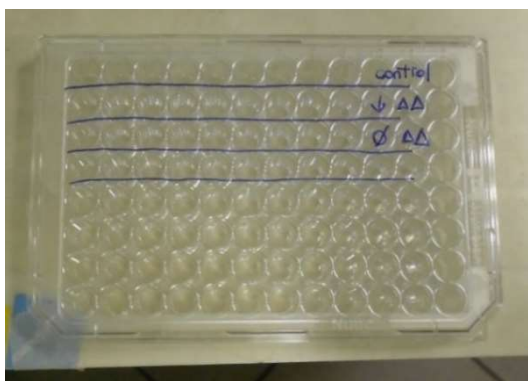
Aquest dia vam fer pràcticament el mateix que el dia anterior, és a dir, preparar les plaques i comptar les cèl·lules:

1. Vam mirar la placa al microscopi.
2. Vam agafar la placa del dia dos de comptatge i vam netejar els pouets amb PBS.
3. Vam posar tripsina per desenganxar les cèl·lules i vam comptar de cada mostra les cèl·lules que hi havia. L'única diferència amb el dia tres va ser que vam posar 400 μL de medi en comptes de 150 μL perquè les cèl·lules estiguessin més diluïdes. Ho vam fer perquè poguéssim comptar les cèl·lules amb més comoditat a la càmera de Neubauer, ja que després de 4 dies d'estar als pouets, les cèl·lules havien crescut bastant.

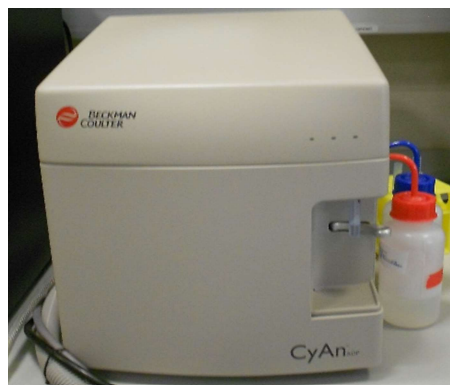
El volum dels medis els hem anat variant al llarg dels dies per tal de que quan introduïm la mostra a la càmera no tinguem ni massa cèl·lules, ni massa poques. En volums molt diluïts podria passar que agaféssim una quantitat de líquid amb cap cèl·lula i diguéssim que no hi ha cap cèl·lula a la mostra, cosa que podria ser falsa, ja que podria contenir-ne algunes.

Dia 5:

Aquest dia vam fer la preparació de les mostres de manera semblant als dos dies anteriors i vam comptar les cèl·lules que hi havia per mostra. A més també vam introduir una part de les nostres mostres a una placa de 96 pouets i ho vam portar a analitzar a un citòmetre especial perquè ens comptés les cèl·lules mortes que hi havia per cada tipus de mostra.



Placa 96 pous (© imatge pròpia)



Citòmetre (© imatge pròpia)

El protocol que vam seguir va ser el següent:

1. Primer vam mirar els pouets al microscopi i després, en comptes d'absorbir el medi dels pouets com vam fer el dia anterior, vam extreure'l i el vam posar en 6 tubs de 15 mL de volum.
2. Després vam posar PBS als pouets i aquest també el vam introduir dins dels tubs de 15 mL.
3. A continuació vam afegir tripsina als pouets, vam esperar 3 min i vam afegir medi als pouets. Aquest cop vam ficar 600 μ L de tripsina i 400 μ L de medi a les cèl·lules WT amb un medi normal i a les WT amb un medi amb pocs aminoàcids essencials. A les cèl·lules amb medi sense alguns aminoàcids essencials, per contra, els vam posar 50 μ L de medi i 150 μ L de tripsina. Com que en 5 dies havien crescut bastant les cèl·lules WT amb medi normal i amb pocs aminoàcids, els vam posar més quantitat de tripsina i de medi per tal de diluir-les més i poder contar-les a la càmera amb més facilitat. A les cèl·lules amb medi sense alguns aminoàcids essencials, no els vam posat tant, ja que quan vam mirar al microscopi vam veure que hi havia menys cèl·lules que en els altres pouets.
4. Seguidament vam introduir les dissolucions que teníem als forats de la càmera de Neubauer per tal de comptar les cèl·lules al microscopi.
5. Un cop fet el recompte, vam afegir amb una pipeta la mescla que teníem als pouets als tubs de 15 mL de volum.
6. Vam posar els tubs a centrifugar durant 1,5 minuts a màxima velocitat. Un cop acabada la centrifugació vam afegir 1mL de medi a cada tub.
7. Després, a cada un dels tubs, els vam afegir 2 μ L d'IP (iodur de propidi). El iodur de propidi és un marcador fluorescent per a cèl·lules mortes. Quan la cèl·lules està viva, la membrana cel·lular d'aquesta és impermeable i impedeix que hi entri l'IP. Per contra, quan la cèl·lula mor, la membrana es fragmenta i l'IP té via lliure per penetrar la membrana pels porus i intercalar-se amb l'ADN, és a dir, introduir-se en l'espai entre dos parells de bases de l'ADN.
8. Havent esperat 5 minuts, vam agafar les mostres que teníem a cada tub i les vam introduir en una placa amb pous més petits dels que teníem en les anteriors plaques. Vam omplir 12 pous amb 100 μ L de substància cada pou. 4 pous contenien les cèl·lules amb medi normal, 4 pous les cèl·lules

amb medi deficient en aminoàcids essencials i 4 pous les cèl·lules amb medi sense alguns aminoàcids essencials.

9. Finalment vam portar la placa a una sala amb un citòmetre citoflex, perquè un servei que hi ha a l'IRB ens l'analitzés. Aquest citòmetre mesura el nombre de cèl·lules mortes que hi ha en una mostra, ja que detecta la fluorescència del IP que li vam posar.



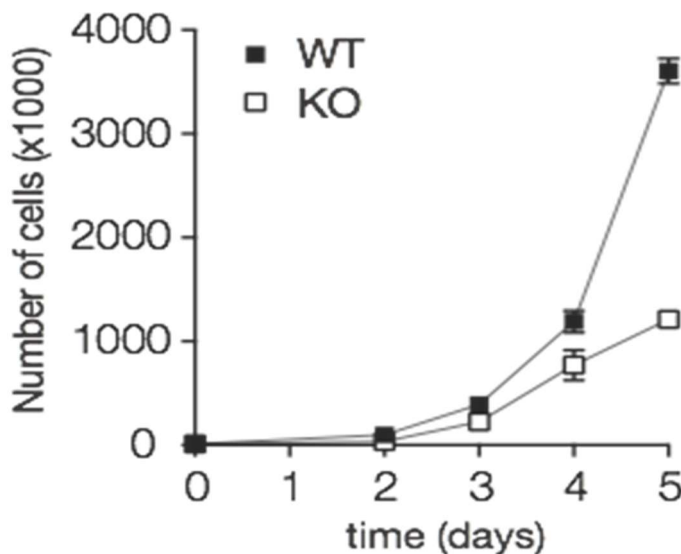
Treballant amb les plaques (© imatges pròpies)

3.3.5 Resultats:

a) **Resultats hipòtesi "a": comparació del creixement de les KO i WT:**

Les dades que em va facilitar la meva tutora del Treball de Recerca, la Sara Cano, van ser les següents:

Gràfica 1



En aquesta gràfica es compara el creixement d'una línia cel·lular WT que ha viscut en un medi normal, amb el creixement d'una línia cel·lular KO que també ha viscut en un medi normal.

(© IRB)

b) Resultats hipòtesi “b”: estudi de creixement de cèl·lules WT en tres medis diferents:

El primer dia de comptatge vam obtenir els següents resultats:

Taula 2								
	Pouet 1 (nombre de cèl·lules comptades)				Pouet 2 (nombre de cèl·lules comptades)			
Control	16	8	18	15	15	16	15	18
Pocs AA essencials	11	4	6	10	9	6	9	8
Sense AA essencials	6	2	1	4	2	2	5	4

El segon dia de comptatge vam obtenir els següents resultats:

Taula 3																
	Pouet 1 (nombre de cèl·lules comptades)								Pouet 2 (nombre de cèl·lules comptades)							
Control	16	27	42	27	15	25	18	23	18	18	36	22				
Pocs AA essencials	20	16	23	19	34	63	22	26	8	9	3	9	16	8	9	7
Sense AA essencials	4	2	3	3	3	2	2	3	5	2	2	3	4	3	4	3

El tercer dia de comptatge vam obtenir els següents resultats:

Taula 4														
	Pouet 1 (nombre de cèl·lules comptades)								Pouet 2 (nombre de cèl·lules comptades)					
Control	83	74	83	78	101	99	88	107	166	150	157	139		
Pocs AA essencials	34	24	38	55	34	44	38	29						
Sense AA essencials	161	166	104	73	98	99	60	70						

Quan vam fer els comptatges, en algunes mostres, ens van sortir diferències molt grans en el nombre de cèl·lules que hi havia en cada quadrant de la càmera de Neubauer. Per això, a partir del segon dia de comptatge, vam duplicar el nombre de recomptes d'aquestes mostres per tal que els resultats fossin més exactes.

Els resultats obtinguts el quart dia de comptatge me'ls va facilitar la meva tutora de l'IRB, ja que només havíem fet la paperassa perquè hem poguéu quedar 5 dies fent el treball i no m'estava permès quedar-me un dia més.

Un cop fets tots els comptatges, em vaig dedicar a fer una taula amb els valors que havíem obtingut, i vaig fer una gràfica per tal d'extreure conclusions de manera més clara.

- Primer vaig fer la mitjana de les cèl·lules que havíem comptat de cada quadrant de cada mostra. D'aquesta manera vaig obtenir la mitjana de cèl·lules que hi havia per pou. Tots aquests càlculs els vaig realitzar amb el programa excel, per tal d'agilitzar el procés.

El primer dia de comptatge ens va sortir que hi havia 9.000 cèl·lules en un dels pouets de medi sense els aminoàcids essencials, cosa que no pot ser veritat ja que en teoria el primer dia de l'experiment vam posar 10.000 cèl·lules a cada pouet, i aquests nombre hauria hagut d'augmentar amb el temps. Possiblement va ser degut a que quan vam introduir les 10.000 cèl·lules als pous, moltes estiguessin mortes, i a l'absorbir el medi, segurament també vam absorbir les cèl·lules mortes. Per això a la taula he posat que el primer dia només vam introduir 5.000 cèl·lules per pou. D'aquesta manera suposem que de les 10.000 cèl·lules que vam introduir el primer dia, només la meitat estaven vives i es van enganxar a les parets dels pouets. El segon dia, com que les cèl·lules no havien crescut el suficient, no vam fer comptatge.

- Després vaig calcular les cèl·lules que hi havia per mL per cada tipus de mostra. Per calcular això vaig multiplicar la mitjana que havia fet abans per 10000, que és el factor de la càmera de Neubauer.³¹

³¹ Fórmula explicada en l'apartat de l'ús de la càmera de Neubauer

- A continuació vaig fer la mitjana de les cèl·lules per mil·lilitre que teníem de cada tipus de pou.
- Per tal de saber el nombre de cèl·lules totals que teníem de cada tipus de medi, primer vaig haver de calcular el volum en que es trobaven aquestes. Per això vaig sumar la quantitat de tripsina i de medi que havíem introduït en cada pou. El volum total de la mostra d'un dia en concret no sempre és igual per a tots els tipus de medi, ja que per exemple, en el dia 6 les cèl·lules en un medi normal havien crescut molt més que les que es trobaven en un medi sense alguns aminoàcids essencials, i per això les primeres vam haver de diluir-les en més líquid. Els volums que vam afegir van ser els següents:

Taula 5					
Dies de comptatge	Tipus de medi de les cèl·lules	Quantitat de tripsina (µL)	Quantitat de medi (µL)	Volum total de la mostra (µL)	Volum total de la mostra (mL)
Dia 3	Control	150	150	300	0,3
	Pocs AA es.	150	150	300	0,3
	Sense AA es.	150	150	300	0,3
Dia 4	Control	150	400	550	0,55
	Pocs AA es.	150	400	550	0,55
	Sense AA es.	150	400	550	0,55
Dia 5	Control	400	600	1000	1
	Pocs AA es.	400	600	1000	1
	Sense AA es.	50	150	200	0,2
Dia 6	Control	500	2500	3000	3
	Pocs AA es.	500	500	1000	1
	Sense AA es.	100	400	500	0,5

- Un cop vaig esbrinar tots els volums, vaig multiplicar aquests per el valor de cèl·lules/mL corresponent per tal de calcular el nombre de cèl·lules totals de cada mostra.
- Finalment vaig calcular el SEM (error estàndard de la mitja) amb una fórmula que s'aplica directament amb el programa excel. Aquest es important ja que ens indica com de representativa és la mitjana que hem fet . L'error estàndard de la mitjana indica en quin nombre la mitjana de la mostra, s'acosta a la mitjana real de la població d'on s'han extret el conjunt de dades.

La fórmula per calcular el SEM és: $\frac{\text{desviació estàndard } (\sigma)}{\sqrt{\text{número de mostres } (n)}}$ en que desviació

estàndard= $\sigma = \sqrt{\frac{\sum((X-\mu)^2)}{(n-1)}}$, i x= valor real de la mostra i μ =la mitjana de totes les x. ³²

Així, per exemple, per calcular el SEM del control del dia 3 faríem els següents passos:

Taula 6			
DIA 3	Valors mostres	Mitjana dels valors mostres	SEM
Control	142500	151250	8749
	160000		

Primer calculem la desviació estàndard= $\sigma = \sqrt{\frac{\sum((X-\mu)^2)}{(n-1)}} =$
 $\sqrt{\frac{(142500-151250)^2 + (160000-151250)^2}{(2-1)}} = 12374,4$

Després calculem el SEM= $\frac{\sigma}{\sqrt{n}} = \frac{12374,4}{\sqrt{2}} = 8749$

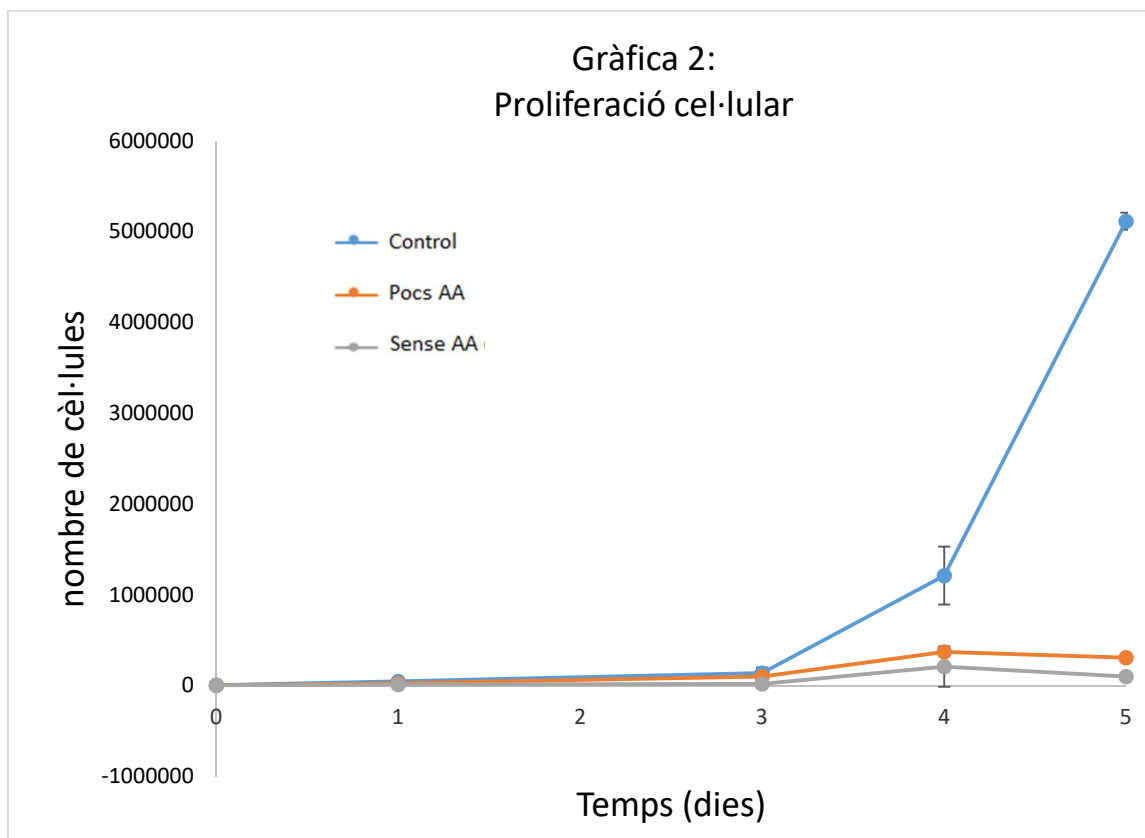
La taula que vaig fer amb tot els meus càlculs és la següent:

³² <http://es.wikihow.com/calcular-el-promedio,-la-desviaci%C3%B3n-est%C3%A1ndar-y-el-error-est%C3%A1ndar>

Taula 7

Dies de comptatge	Cèl·lules en cada quadrant								Mitjana de cèl/pou	Cèl/mL (mitjana de cèl/pou x 10000)	Mitjana dels pous (cèl/mL)	Volum afegit (mL)	Cèl·lules totals (mitjana de cèl/mL x volum afegit)	SEM: error estàndard de la mitjana (fórmula)
DIA 1	5000 cèl/pou													
DIA 2	no comptem													
DIA 3														
CONTROL	16	8	18	15					14,25	142500	151250	0,3	45375	8749
	15	16	15	18					16	160000				
POCS AA essencials	11	4	6	10					7,75	77500	78750	0,3	23625	1249
	9	6	9	8					8	80000				
SENSE AA essencials	6	2	1	4					3,25	32500	32500	0,3	9750	0
	2	2	5	4					3,25	32500				
DIA 4														
CONTROL	16	27	42	27					28	280000	249375	0,55	137156,25	30624
	15	25	18	23	18	18	36	22	21,875	218750				
POCS AA essencials	20	16	23	19	34	63	22	26	27,875	278750	182500	0,55	100375	96249
	8	9	3	9	16	8	9	7	8,625	86250				
SENSE AA essencials	4	2	3	3	3	2	2	3	2,75	27500	30000	0,55	16500	2499
	5	2	2	3	4	3	4	3	3,25	32500				
DIA 5														
CONTROL	83	74	83	78	101	99	88	107	89,125	891250	1210625	1	1210625	319374
	166	150	157	139					153	1530000				
POCS AA essencials	34	24	38	55					37,75	377500	370000	1	370000	7499
	34	44	38	29					36,25	362500				
SENSE AA essencials	161	166	104	73					126	1260000	1038750	0,2	207750	221249
	98	99	60	70					81,75	817500				
DIA 6														
CONTROL	199	205	136	180					180	1800000	1705000	3	5115000	94999
	148	163	170	163					161	1610000				
POCS AA essencials	36	31	36	22					31,25	312500	307500	1	307500	4999
	29	25	36	31					30,25	302500				
SENSE AA essencials	20	17	21	23					20,25	202500	196250	0,5	98125	6249
	23	18	23	12					19	190000				

Un cop vaig haver calculat totes les dades necessàries vaig fer la següent gràfica, on l'eix vertical indica el nombre de cèl·lules que tinc i l'horitzontal el dia del comptatge:



(© elaboració pròpia)

En la gràfica, la línia de color blau representa les cèl·lules control, que són les que contenen un medi normal, la de color taronja representa les cèl·lules en un medi amb pocs aminoàcids essencials, i la línia de color gris representa les cèl·lules que es troben en un medi sense alguns aminoàcids essencials.

Els punts que es veuen en cada línia representen el nombre de cèl·lules, i les barres negres verticals que sobresurten dels punts representa l'error estàndard de la mitjana. D'aquesta manera ens fem una idea com de gran és l'error que vam cometre a l'hora de fer els nostres càlculs.

c) **Resultats hipòtesi "c": citòmetre que compta les cèl·lules mortes:**

De les mostres que vam portar al citòmetre citoflex, aquell que compta el nombre de les cèl·lules mortes d'una mostra, vaig obtenir diversos arxius.

Els resultats tabulats són els següents:

Taula 8								
Resultats extrets dels arxius de viabilitat cel·lular								
SENSE AA								
vives	6573	5823	5497	5120	6289	5878	4946	3700
mortes	2985	3576	3924	4251	2750	3080	3174	2807
total	9558	9399	9421	9371	9039	8958	8120	6507
POCS AA								
vives	7985	7919	7713	7139	7021	6767	5793	5326
mortes	990	993	1111	1264	1726	1842	1594	1397
total	8975	8912	8824	8403	8747	8609	7387	6723
CONTROL								
vives	7327	6307	6130	4938	5331	4907	4939	3427
mortes	1291	1093	1029	1035	486	430	399	313
total	8618	7400	7159	5973	5817	5337	5338	3740

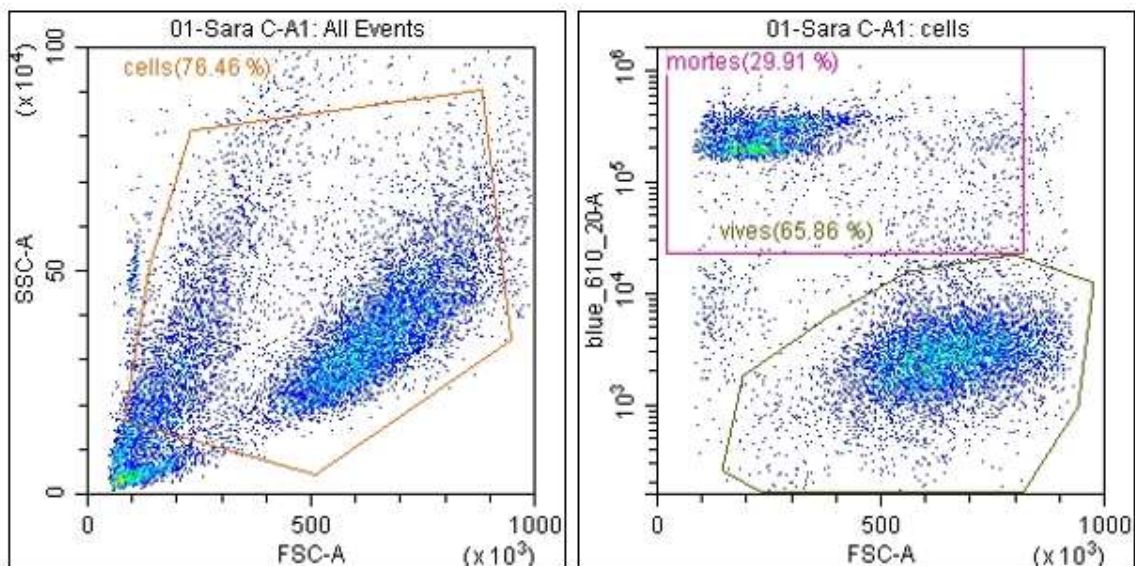
A continuació vaig calcular del nombre de cèl·lules vives i mortes el percentatge que representaven del total, és a dir, vaig fer la següents operació:

$$x = \frac{\text{nombre de cèl·lules vives o mortes} \times 100}{\text{nombre total de cèl·lules de la mostra}}$$

Finalment vaig fer les mitjanes d'aquests percentatges per totes les mostres i vaig calcular el SEM de les meves mitjanes per veure quin havia estat el meu error. Si ens fixem en les dades anteriors veiem que dins d'una mateixa mostra els valors varien bastant, per això apliquem el SEM. La taula que vaig fer va ser la següent:

Taula 9										
Percentatge de cèl·lules vives i mortes respecte el total										
									MITJANA	SEM
SENSE AA										
vives	68,76962	61,9534	58,34837	54,63664	69,57628	65,61733	60,91133	56,86184	62,08435	2,077073
mortes	31,23038	38,0466	41,65163	45,36336	30,42372	34,38267	39,08867	43,13816	37,91565	2,077073
total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0
POCS AA										
vives	88,96936	88,85772	87,40934	84,95775	80,26752	78,60379	78,42155	79,22059	83,33845	1,77479
mortes	11,03064	11,14228	12,59066	15,04225	19,73248	21,39621	21,57845	20,77941	16,66155	1,77479
total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0
CONTROL										
vives	85,01973	85,22973	85,62648	82,67202	91,64518	91,94304	92,52529	91,63102	88,28656	1,514675
mortes	14,98027	14,77027	14,37352	17,32798	8,354822	8,056961	7,47471	8,368984	11,71344	1,514675
total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0

En la primera imatge dels arxius de viabilitat cel·lular que vam obtenir com a resultats d'aquesta prova i que es poden trobar en els arxius digitals adjuntats a aquests treball, es veu una gràfica amb punts (anomenats "all events") on nosaltres hem dibuixat un requadre que considerem que engloba només les cèl·lules íntegres. La segona imatge, a la dreta, correspon només a les cèl·lules que apareixien dins del requadre que havíem considerat cèl·lules, i no restes, de la gràfica anterior. Aquests nou gràfic, considerant la quantitat de iodur de propidi (que només entra dins les cèl·lules mortes), separa les cèl·lules en vives i mortes. Hem dibuixat dos requadres més en aquesta gràfica. Un més amunt que simbolitza les cèl·lules mortes, ja que l'eix Y es correspon a la quantitat de fluorescència i per tant com més amunt més iodur de propidi tenen, i un més avall que representa la zona on es troben les cèl·lules vives. Com que els requadres no són exactes i hi ha cèl·lules que no es troben dins de cap dels dos, ja que no estem segurs d'on corresponen, la suma de la quantitat de cèl·lules mortes i vives no coincideix amb el total de cèl·lules íntegres. Aquest fet no té cap importància, ja que no afecta a les conclusions del treball.



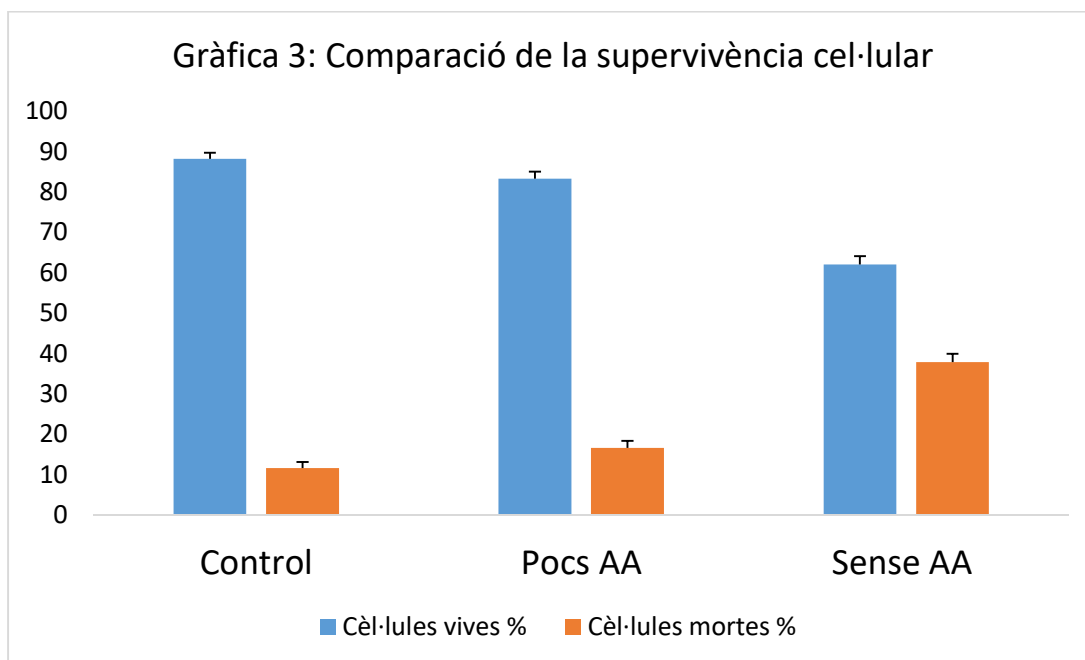
Tube Name: 01-Sara C-A1

Sample ID: 12651

Population	Events	% Total	% Parent	Events/ μ L(V)
● All Events	13054	100.00 %	100.00 %	567.18
● cells	9981	76.46 %	76.46 %	433.66
● vives	6573	50.35 %	65.86 %	285.59
● mortes	2985	22.87 %	29.91 %	129.69

Exemple de resultats del protocol de viabilitat cel·lular(© elaboració pròpia)

Finalment la gràfica que vaig elaborar amb els resultats va ser la següent:



(© elaboració pròpia)

3.4 Experiment 2: Marcatge de CD98hc en fibroblasts (KO i WT) i anàlisi per citometria de flux:

3.4.1 Pregunta i hipòtesi:

- Les cèl·lules KO que estem utilitzant en el nostre experiment, realment no tenen la proteïna de membrana CD98h?

Si realment aquestes cèl·lules no tenen la proteïna, no emetran fluorescència en l'anàlisi per citometria de flux després d'haver estat marcades amb els anticossos primari anti-CD98hc (rata) i secundari anti-rata-Alexa 488.

3.4.2 Objectius:

- Comprovar que les cèl·lules KO que estem usant i que provenen d'un altre laboratori realment no tenen aquesta proteïna a la membrana cel·lular.
- Aprendre a fer un marcatge indirecte amb anticossos.
- Conèixer com es treballa amb cultius cel·lulars, procurant no infectar el cultiu amb bacteris.

3.4.3 Informació prèvia:

Inicialment volíem, a banda de fer l'assaig de proliferació de les cèl·lules WT en els diferents tipus de medi, fer un assaig de proliferació de cèl·lules KO i comparar el seu creixement amb el de les cèl·lules WT. Per això hagués estat necessari, al treballar amb cèl·lules deficientes en una proteïna concreta, comprovar que realment aquestes no la tenen per poder fiar-nos dels resultats. Tot i que no vam poder realitzar l'assaig, perquè com he mencionat anteriorment, se'ns van morir moltes cèl·lules quan van ser descongelades, vam fer la comprovació de totes maneres. D'aquesta manera volíem comprovar que les cèl·lules KO que tenien als laboratoris de l'IRB no contenien la proteïna CD98hc, i que per tant, els resultats que la Sara em va passar d'anteriors assajos seus eren fiables.

Hi ha diverses metodologies que ens permeten saber si una cèl·lula té o no una proteïna concreta. En el nostre cas, vam utilitzar una metodologia basada en anticossos i en la citometria de flux.

Per aquest experiment vam haver de realitzar un control negatiu. En ciència experimental els controls negatius i positius³³ són necessaris per a que les conclusions que s'extreguin dels resultats siguin fiables.

En el nostre experiment podria passar que l'anticòs secundari unit a una partícula de fluorescència fos inespecífic i que s'unís a altres proteïnes a més de a l'anticòs primari (que esta unit al CD98hc). En aquests cas els resultats emetrien fluorescència que ens estaria donant un resultat fals, ja que interpretariem que les cèl·lules tenen el CD98hc en la seva membrana, i potser no és així. Per això vam fer el control negatiu, en què vam realitzar el mateix protocol que amb les altres cèl·lules, amb les nostres cèl·lules "control", però sense afegir-los l'anticòs primari. D'aquesta manera vam saber la fluorescència inespecífica que emetia l'anticòs secundari. Quan vam anar a mesurar la senyal al citòmetre, primer vam haver de mesurar la mostra del control negatiu i vam agafar el valor de fluorescència que emetia, com a valor 0. És a dir, vam programar el citòmetre

³³ Un control positiu és aquell que sabem que donarà el resultat esperat. En el nostre cas, les cèl·lules WT a les qual els apliquem anticòs primari i secundari faran d'aquest. Un control negatiu serà aquell que sabem que no donarà el resultat esperat. Per això, en el nostre experiment, faran de control negatiu unes cèl·lules WT a les que no haurem aplicat l'anticòs primari i per tant no emetran fluorescència, però que si que tindran el CD98hc.

perquè comptés aquella fluorescència residual com a “0” i fes que aquelles cèl·lules no es comptessin com a fluorescents. D’aquesta manera les cèl·lules que tenien més fluorescència que aquest valor 0, van ser considerades com a positives i per tant la seva fluorescència sí que es devia a la presència del CD98hc.

3.4.4 Descripció de l’experiment:

Dia 1:

Primer vam descongelar més cèl·lules KO, ja que se’ns havien mort la majoria. Vam sembrar cèl·lules WT i KO en plaques de 150 mm de diàmetre amb medi de cultiu. Vam preparar una placa de cèl·lules KO i dues de WT, ja que una placa de cèl·lules WT és la que faria de control negatiu de l’experiment.

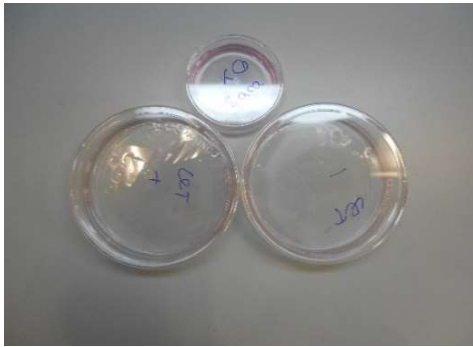
Dia 2:

El segon dia vam introduir anticòs primari a una placa de cèl·lules WT i a la placa de cèl·lules KO, i vam introduir anticòs secundari a les tres plaques. Per tant, una placa de cèl·lules WT només contenia l’anticòs secundari, ja que seria el control negatiu. D’aquesta manera vam obtenir les nostres plaques preparades per portar-les al citòmetre de flux i comprovar si les cèl·lules KO contenen o no la proteïna CD98hc.

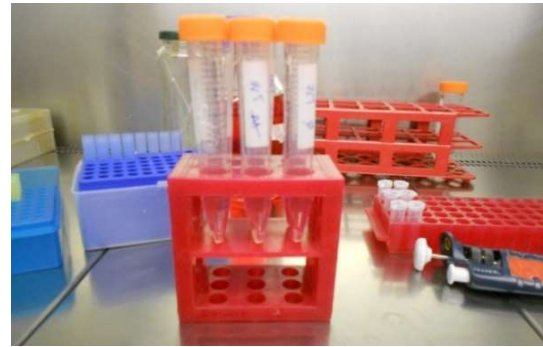
El protocol que vam seguir va ser el següent:

1. Primer vam mirar les plaques al microscopi per veure en quin estat es trobaven les cèl·lules, és a dir, per veure a primer cop d’ull si hi havia moltes de mortes.
2. Vam netejar tot el material, el vam col·locar tot dins la campana i vam aspirar el medi de les tres plaques amb la pipeta de vidre i el sistema de buit.
3. Vam netejar les plaques introduint-hi 5mL de PBS que després vam aspirar.
4. Vam afegir 1 mL de tripsina a cada placa i vam esperar 5 min perquè es desenganxessin totes les cèl·lules.

5. Vam introduir novament 5 mL de medi a cada placa i el vam resuspendre³⁴ amb la pipeta diversos cops per tal d'aixecar totes les cèl·lules de les plaques i per a separar els agregats cel·lulars.
6. Vam passar el medi amb les cèl·lules a falcons de 15 mL, de tal manera que vam obtenir 3 falcons, dos dels quals contenien cèl·lules WT i un cèl·lules KO.



Tres plaques amb mostres: una amb les cèl·lules KO, una altra amb les WT amb anticòs primari i l'altre amb el control negatiu (© imatge pròpia)



Falcons als quals traslladem les nostres mostres (© imatge pròpia)

7. Vam portar els falcons a centrifugar per tal de que les cèl·lules que aquests contenien baixessin al final del tub i formessin un pellet. Com que teníem 3 tubs (WT control -, WT control + i KO), vam col·locar un quart tub d'aigua a la centrifuga per tal d'igualar els pesos i que res sortís disparat. Vam centrifugar les mostres a 800g-force³⁵ durant 3 minuts.
8. Seguidament vam aspirar el medi dels falcons i a cada un hi vam tornar a posar 100 μ L de medi.
9. Vam transportar l'anticòs primari fins a on estàvem del laboratori dins de gel perquè no es fes malbé, i amb una micropipeta vam afegir 2 μ L d'anticòs primari anti-CD98hc de ratolí (rata³⁶) a un dels tubs que contenia cèl·lules WT i 2 μ L més al tub que contenia les cèl·lules KO. A una de les mostres amb cèl·lules WT no li vam posar l'anticòs primari, ja que era la que faria de control negatiu.

³⁴ Acció d'absorbir un líquid amb la pipeta i tornar-lo a deixar anar.

³⁵ g-force o força g és una mesura de velocitat

³⁶ És anticòs de ratolí, però fet dins d'una rata



Micropipeta amb la que posem l'anticòs (© imatge pròpia)



Anticòs mantingut en fred (© imatge pròpia)

10. Vam posar els tres tubs dins d'una màquina d'incubació en rotació durant 30 minuts, que es trobava a 4°C, per tal que els anticòssos s'adherissin a la proteïna CD98hc, ja que aquesta es troba a la superfície de la membrana plasmàtica de les cèl·lules.



Rotor de tubs (© imatge pròpia)

11. Un cop van passar els 30 minuts vam centrifugar les mostres a màxima velocitat durant 1,5 minuts per aconseguir un pellet (massa de cèl·lules amb l'anticòs primari) al final dels tubs. Finalment vam aspirar el medi dels falcons amb cura de no aspirar el pellet.
12. Vam tornar a posar 100 µL de medi a cada tub.
13. Amb una micropipeta vam introduir 2 µL d'anticòs secundari anti-rata-Alexa 488 a cada tub i ho vam barrejar bastant per tal de que l'anticòs arribés bé a les cèl·lules.
14. Vam tornar a ficar els tres tubs en incubació en rotació durant 30 minuts a 4°C.
15. Un cop acabada la incubació vam tornar a centrifugar les mostres durant 1,5 minuts a màxima velocitat i vam aspirar el medi.

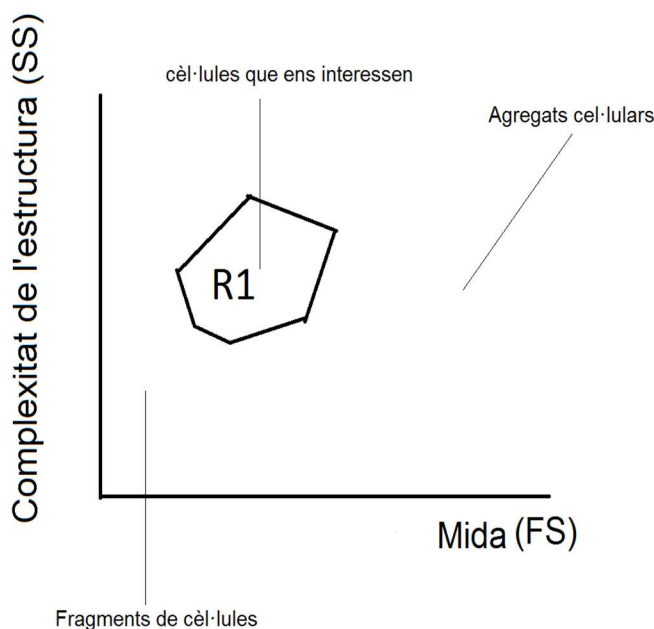
16. Vam netejar el pellet amb 1 mL de PBS.
17. Vam tornar a centrifugar durant 1,5 minuts a màxima velocitat i vam absorbir les restes que sobrenedaven. També vam introduir 1 mL de medi i vam barrejar-ho tot amb una pipeta perquè quedés una mescla homogènia.
18. Finalment vam pujar les mostres a una sala amb un servei a que ens les analitzaria amb el citòmetre.

Dia 3:

Al tercer dia d'aquesta pràctica només vam analitzar les dades que vam rebre del citòmetre de flux i les vam contrastar amb la hipòtesi que havíem fet.

3.4.5 Resultats:

Les dades que vaig rebre de l'anàlisi del citòmetre de flux se'm van donar en forma de dos tipus de gràfiques diferents. Per tal de poder entendre les gràfiques, he fet un esquema de com funcionen aquestes:

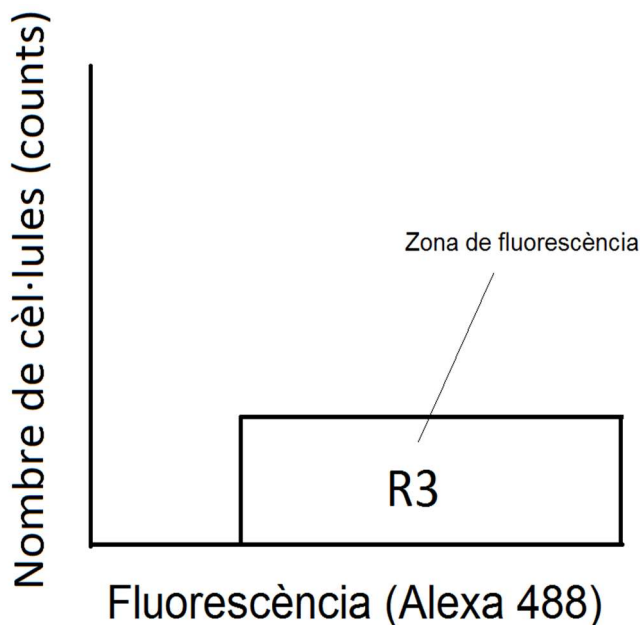


- Una de les gràfiques presenta uns punts majoritàriament de color vermell. El color dels punts indica la quantitat de població de cada zona. El vermell indica població poc densa, mentre que el groc i el verd indiquen població més densa. El seu eix vertical indica la complexitat de l'estructura de la mostra (SSLog) i l'horitzontal indica la mida d'aquesta (FS Àrea).

(© elaboració pròpia)

La màquina escull la zona on hi ha més probabilitat de trobar les cèl·lules que ens interessin, és a dir, cèl·lules íntegres, que coincideix amb la zona de més població (aquesta zona s'anomena R1). Si mirem cap a l'esquerra de la gràfica les molècules són massa petites per ser cèl·lules, i per tant segurament són fragments de cèl·lules que s'han trencat. En canvi a la dreta del tot de la gràfica les molècules són massa grans per ser una cèl·lula, i per tant segurament són agregats de cèl·lules.

Si mirem al dibuix del citòmetre mencionat anteriorment, veiem que els rajos làser que s'usen en aquest són FSC i SSC, igual que els valors dels eixos d'aquest tipus de gràfica.



(© elaboració pròpia)

- L'altre gràfica presenta una superfície de color blava, que representa les cèl·lules escollides de la zona R1 de la gràfica anterior. El seu eix vertical indica el nombre de cèl·lules (counts), i l'eix horitzontal indica la quantitat de fluorescència d'un determinat fluorescent. En aquest cas aquesta ve indicada per A488 Log, ja que hem fet servir el fluorescent ALEXA 488 per marcar les nostres cèl·lules.

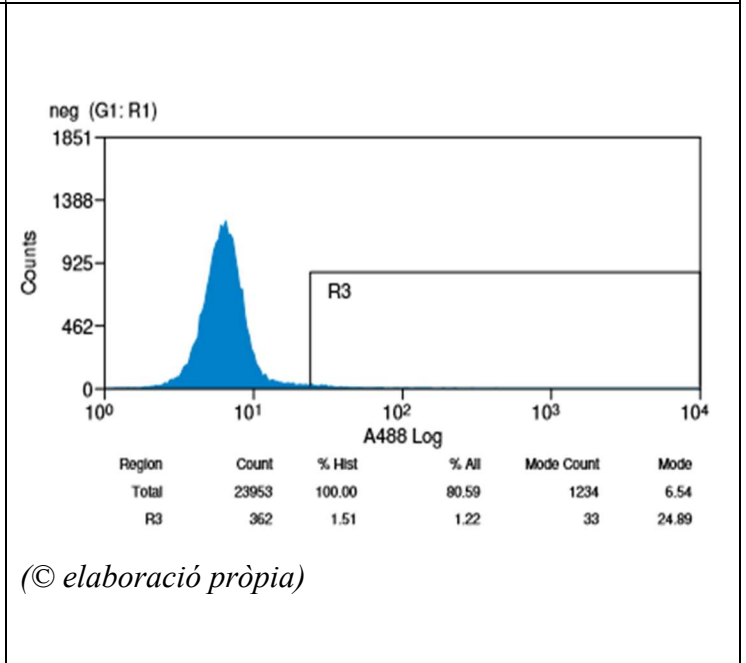
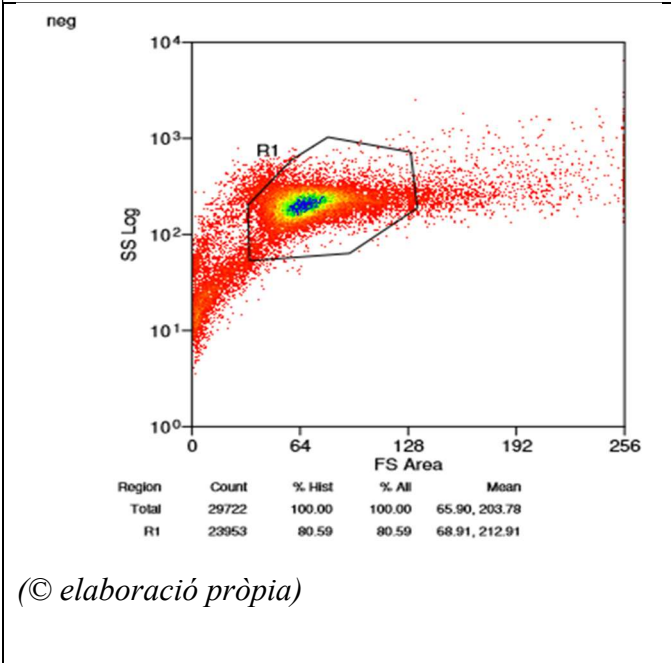
En la gràfica destaca una zona anomenada R3, que és la zona de fluorescència, és a dir, fluorescència menor a la d'aquesta zona és tant petita que no es compta perquè es considera fluorescència residual. La zona R3 defineix les cèl·lules que són fluorescentes, i la seva fluorescència és deguda a que tenen adherides a la seva superfície l'anticòs primari anti-CD98hc i l'anticòs secundari fluorescent que reconeix al primari. Les cèl·lules que se situïn en la zona R3 seran positives, ja que la seva fluorescència serà més gran que la del control negatiu, mentre que les que estiguin fora d'aquesta zona es consideraran negatives, ja que tindran la mateixa fluorescència que el control negatiu (com per exemple les cèl·lules KO).

Les gràfiques que vam obtenir van ser els següents:

Gràfiques control negatiu:

Gràfica 4

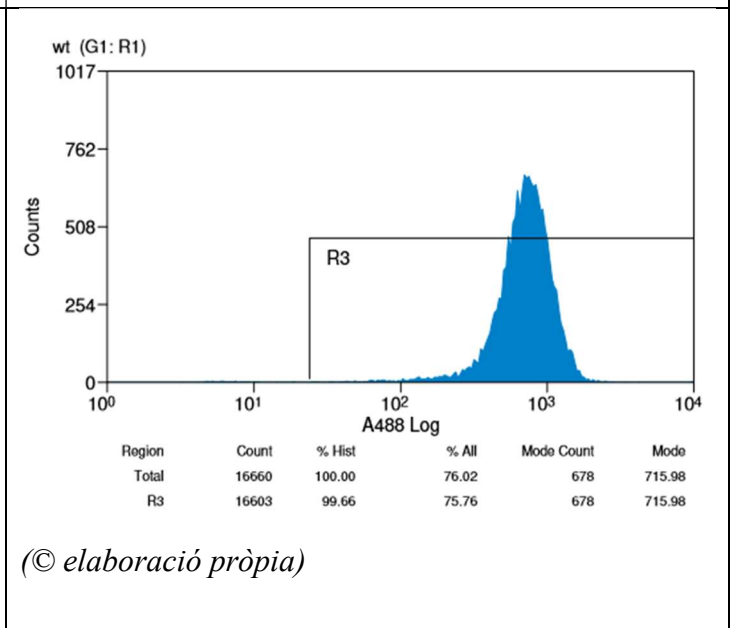
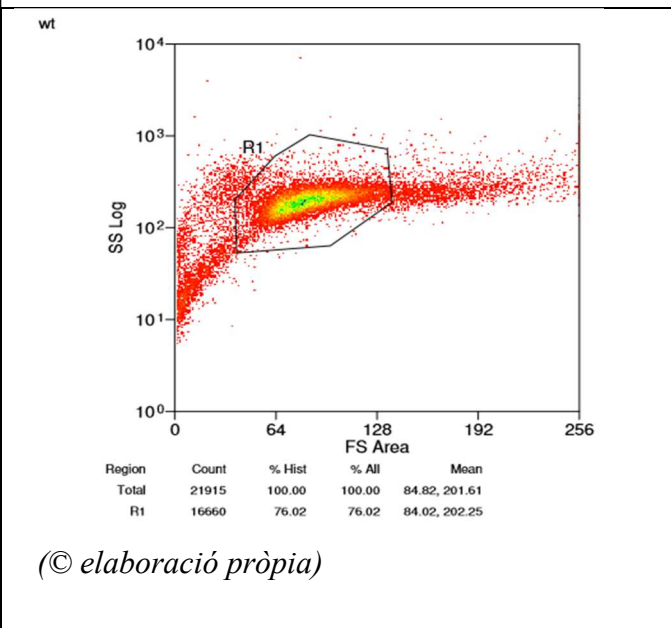
Gràfica 5



Gràfiques cèl·lules WT:

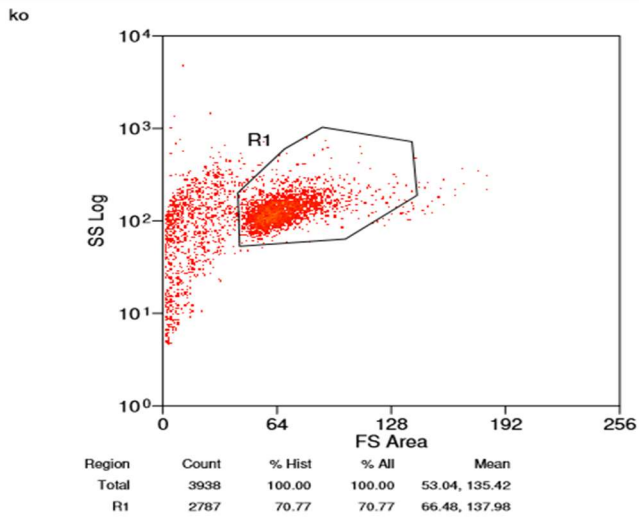
Gràfica 6

Gràfica 7



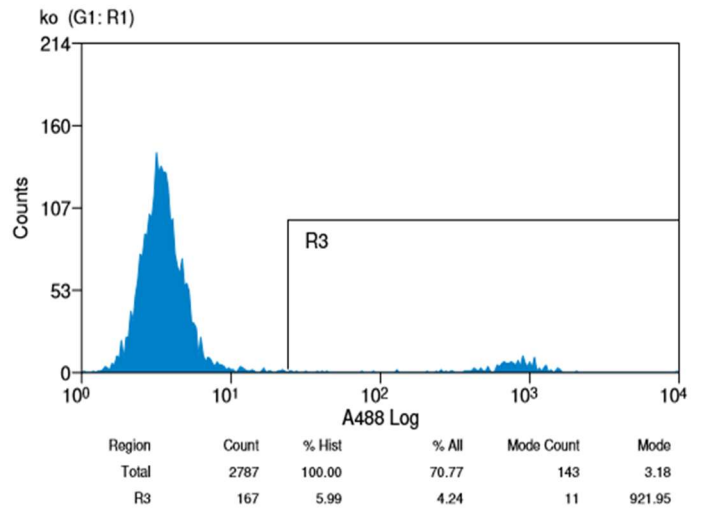
Gràfiques cèl·lules KO: d'aquesta mostra tenim quatre gràfiques, ja que la vam analitzar dos cops pel citòmetre per tal de confirmar resultats

Gràfica 8



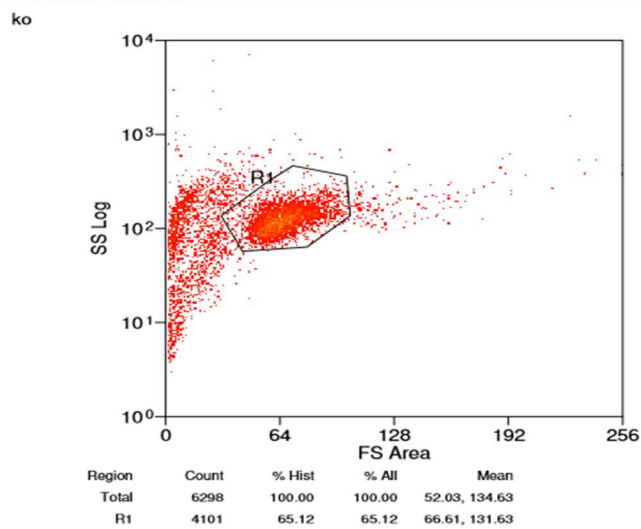
(© elaboració pròpia)

Gràfica 9



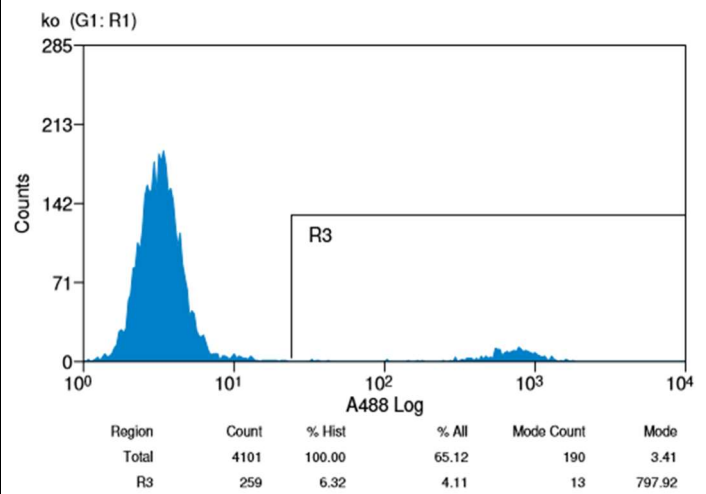
(© elaboració pròpia)

Gràfica 10



(© elaboració pròpia)

Gràfica 11



(© elaboració pròpia)

3.5 Conclusions:

3.5.1 Conclusions experiment 1

D'aquests experiment podem treure conclusions dels tres resultats que hem obtingut:

- a) De la gràfica 1 podem concloure que les cèl·lules KO en general creixen menys que les cèl·lules WT. En la gràfica podem veure clarament com al dia 0 ambdues mostres contenen el mateix nombre de cèl·lules, que és bastant petit, i a mesura que van passant els dies el nombre de cèl·lules WT augmenta de manera més ràpida que el nombre de cèl·lules KO.

- b) Un cop demostrat que les cèl·lules KO creixen menys que les cèl·lules WT, demostrem també que és a causa de la falta d'alguns aminoàcids essencials. A la gràfica 2 veiem que cèl·lules WT amb cap tipus de deficiència, si es troben en un medi sense alguns aminoàcids essencials o amb pocs aminoàcids essencials, creixen considerablement menys que les cèl·lules WT que es troben en un medi amb aminoàcids essencials suficients. Per tant, deduïm que tant les cèl·lules KO com les cèl·lules WT en un medi amb pocs o sense aminoàcids essencials, creixen menys que cèl·lules WT en un medi normal, perquè no incorporen els aminoàcids essencials, tant si es per la falta del CD98hc com si és per la falta d'aminoàcids al medi.

- c) Abans de veure els resultats ja vam veure pel microscopi que moltes de les cèl·lules que teníem a la mostra eren mortes. Segurament va ser degut a que abans de portar-la a analitzar vam estar treballant gairebé dues hores amb la mostra i per això havien mort moltes cèl·lules que al matí d'aquell mateix dia devien estar vives.
Veient la gràfica 3 podem veure que de les cèl·lules WT que es trobaven en un medi sense alguns aminoàcids essencials, es van morir moltes més que de les que es trobaven en un medi normal. Que aquestes morin més que les WT està afectant a la proliferació i està fent que aquesta sigui defectuosa.

Només amb aquests experiment, no podem afirmar que la baixa població de les cèl·lules WT cultivades en un medi sense alguns aminoàcids essencials i de les cèl·lules KO sigui deguda a l'alta mortalitat d'aquestes, ja que el marge d'error de les mitjanes és alt (es veu en la gràfica 3). Per comprovar això hauríem de fer molts altres experiments.

No obstant podem suposar que l'alta mortalitat de les cèl·lules influeix en la disminució de la població, tot i que segurament també és degut a altres factors, com per exemple que aquestes creixin menys.

3.5.2 Conclusions experiment 2:

- **Gràfiques control negatiu:** D'aquestes gràfiques podem concloure que les cèl·lules de la zona R1 de la gràfica 4, on trobem les cèl·lules íntegres, la gran majoria no han emès fluorescència. El nombre de cèl·lules que trobem a la R3 de la gràfica 5 és ínfim. Com que aquesta mostra és el control negatiu, la fluorescència en forma de campana de Gauss³⁷ que trobem fora de la zona R3 (zona on trobem la fluorescència que nosaltres hem determinat com la "real") li donem valor 0, ja que es tracta de la fluorescència inespecífica que emet el nostre anticòs secundari que no s'ha rentat.
- **Gràfiques cèl·lules WT:** En aquestes gràfiques veiem que totes les cèl·lules de la R1 de la gràfica 6 formen una corba com una campana de Gauss a l'alçada de la R3 de la gràfica 7. Que sobresurti la punta de la zona R3 no té cap valor, aquesta podria tenir un alçada major o menor, ja que l'eix vertical indica el nombre de cèl·lules i aquest el podem variar. La zona R3 es col·loca només en funció de l'eix horitzontal per tal de tenir només en compte les cèl·lules positives, és a dir, les que tenen el CD98hc.
Això ens demostra que les cèl·lules d'aquesta mostra contenen fluorescència, com era d'esperar, ja que es tracta d'una mostra de cèl·lules WT que conté la proteïna CD98hc a la qual se li han adherit l'anticòs primari i secundari.

³⁷ És una representació gràfica de la distribució normal d'un grup de dades.
<http://definicion.de/campana-de-gauss/>

- **Gràfiques cèl·lules KO:** Les gràfiques 8 i 10 constaten la conclusió “a” de l'experiment anterior, ja que podem veure que la densitat de la R1 d'aquestes dues gràfiques és molt menor que la densitat de les zones R1 de les gràfiques 4 i 6. Per tant, podem afirmar que les cèl·lules KO creixen menys que les cèl·lules WT cultivades en un medi normal.

A les gràfiques 9 i 11 veiem com a la zona R3 gairebé no hi ha cap cèl·lula amb fluorescència. La fluorescència que hi pugui quedar segurament és anticòs secundari que no s'ha netejat al absorbir el medi, o algunes cèl·lules WT que al manipular les mostres haguem pogut introduir. Per tant podem concloure que les cèl·lules KO que tenen al laboratori de Manuel Palacín no contenen la proteïna CD98hc, i que per tant les meves conclusions anteriors són fiables.

4. Valoració del treball:

Aquest treball, segons el meu parer, ha estat un treball complicat. He hagut d'utilitzar tècniques i fer experiments que es fan servir en molts laboratoris d'investigació i que sobrepassaven els meus coneixements. Però aquest fet no ha estat pas un aspecte negatiu, ja que gràcies a aquestes dificultats he tingut l'oportunitat d'aprendre moltes coses que mai abans m'havia imaginat que poguessin existir.

Tot i així hi ha hagut algunes complicacions en el treball. Per exemple, un experiment que teníem pensat fer no el vam poder realitzar perquè se'ns van morir moltes cèl·lules KO, i per això vaig haver de fer ús d'unes dades que em va passar la meva tutora del Treball de Recerca de l'IRB.

Un altre petit aspecte negatiu del treball va ser que teníem les dates molt marcades per a poder-lo realitzar, i per això, no vaig poder assistir a l'últim dia de comptatge de les cèl·lules.

En resum, m'ha agradat molt fer aquest treball, però encara m'ha agradat més l'experiència que he pogut viure gràcies a aquest de treballar en un laboratori. Recomano a tots els alumnes de primer de batxillerat que s'inscriguin al programa de “Crazy about Biomedicine” perquè puguin veure la biologia amb els ulls que ara ho faig jo!

5. Bibliografia:

ARNAIZ-VILLENA A., REGUEIRO J. R. I LÓPEZ-LARREA C. 1995.
“Inmunología”. Pàgines 281-282.

(<https://books.google.es/books?id=UhN9f8wilKIC&pg=PA281&dq=citometria+de+flujo&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjvkeKPk6TRAhXLtxQKHc4uCFAQ6AEIOzAD#v=onepage&q=citometria%20de%20flujo&f=false>)

Bannai et al., 1980, Bannai et al 1986; Sato et al., 1999; Bassi et al., 2001*

Bertran et al., 1992b; Wells et al., 1992*

Bikandi, Joseba i Millan, Rosario San. “ Cuantificación de levaduras en càmera de recuento Neubauer *improved* o Thoma”. Departament de Immunologia, Microbiologia i Parasitologia de la Universitat del País Basc. Recuperat de http://insilico.ehu.eus/camara_recuento/*

Biomodel. “Electroforesis de proteínas y de ácidos nucleicos”. Recuperat de <http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.htm>*

Bröer et al., 1995*

CCM. (Gener de 2017). “Hepes – Definición”. Recuperat de <http://salud.ccm.net/faq/20478-hepes-definicion>*

CHILLARÓN J, ROCA R, VALENCIA A, ZORZANO A, PALACÍN M. 28 de desembre de 2001. “Heterometric amino acid transporters: biochemistry, genètics, and physiology”. *American Journal of Physiology*, 281: 995-1018

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11704550>)*

Christensen et al., 1965*

Deficiencia de piruvirato carboxilasa (PC). (7 d’octubre de 2014). “Qué es el piruvirato?”. Recuperat de <http://www.guiametabolica.org/ecm/deficiencia-piruvato-carboxilasa-pc/info/es-piruvato>*

FÉRAL, C.CHLOÉ et al. Université de Nice - Sophia Antipolis, Nice, France. 2005. "CD98hc (SLC3A2) regulation of skin homeostasis wanes with age".*

FIABO: Medicina molecular. (14 de gener de 2008). "Fibroblasto". Recuperat de <http://medmol.es/glosario/84/>*

Flores, Javier . (29 d'agost de 20015). "¿Qué son los anticuerpos?". Recuperat de <http://www.muyinteresante.es/curiosidades/preguntas-respuestas/ique-son-los-anticuerpos>*

FREIFELDER, DAVID. 1981. "Técnicas de bioquímica y biología molecular".
Pàgina 262 (https://books.google.es/books?id=iW0yHGmE-JwC&pg=PA262&lpg=PA262&dq=anticuerpos+biologia+molecular&source=bl&ots=7CizARYkaD&sig=I9DxP3zB9MIPLNp4hUBqObGg74&hl=es&sa=X&sqi=2&ved=0ahUKEwi_4P3Ak6TRAhUDWxQKHTT1A44Q6AEINjAE#v=onepage&q=anticuerpos%20biologia%20molecular&f=false)*

Intrepido. (24 de juliol de 2011). "¿Cómo funciona una campana de flujo laminar?". Recuperat de <http://intrepido1.over-blog.es/article-como-funciona-campana-flujo-laminar-85924110.html>*

Kanai et al., 1998; Mastroberardino et al., 1998*

Leucocitos. "Linfocitos B". Recuperat de <http://leucocitos.org/linfocitos/celulas-b/>*

Martínez, Vicente Díaz. (24 de juny de 2011). "Knockouts condicionales".
Recuperat de https://biotechspain.com/es/tecnica.cfm?iid=110624tecnica_knockout_condicional*

Meier et al., 2002; Verrey et al., 2003*

MÜLLER-ESTERL, WERNER. 2008. "Bioquímica: fundamentos para medicina y ciencias de la vida". Pàgina 252
(https://books.google.es/books?id=X2YVG6Fzp1UC&pg=PA252&lpg=PA252&dq=peptidasa&source=bl&ots=o4gSlzHmVo&sig=rMDX_XeR7Ca2Xb0SDXa6VZ

ruA5o&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiW3ob1lq3RAhXJJcAKHfywAU4Q6AEIWzAK#v=onepage&q=peptidasa&f=false)*

Oxender et al., 1963*

Pérez, Porto Julián. (2016). “Definición de campana de Gauss”. Recuperat de <http://definicion.de/campana-de-gauss/>*

Recursos. “Concepto de antígeno”. Inmunología-2º bachillerato, Ministerio de Educación, Gobierno de España. Recuperat de <http://recursos.cnice.mec.es/biosfera/alumno/2bachillerato/inmune/contenidos5.htm>*

Sato et al., 2002*

Tenezias, Ángeles. (25 d'octubre de 2015). “Aminoácidos esenciales i no esenciales”. Recuperat de <http://demedicina.com/aminocidos-esenciales-y-no-esenciales/>*

WikiHow. “Cómo calcular el promedio, la desviación estándar y el error estándar”. Recuperat de <http://es.wikihow.com/calcular-el-promedio,-la-desviaci%C3%B3n-est%C3%A1ndar-y-el-error-est%C3%A1ndar>*

Wikipedia. (6 de desembre de 2016). “Globulina”. Recuperat de <https://es.wikipedia.org/wiki/Globulina>*

Wikipedia. (12 de novembre de 2016). “Gamma globulina”. Recuperat de https://es.wikipedia.org/wiki/Gamma_globulina*

Wolf et al., 1996; Yanagida et al., 2001; Huang et al., 2005; Kaleeba et al., 2006; Veettil et al., 2008; Torrents et al., 1999*

* Totes les pàgines webs usades en aquests treball eren vigents el dia 9 de gener de 2017.

6. Annexos:

Taula 10			
Taula feta per fer la gràfica 2			
Dies (eix x)		Eix Y (nombre de cèl·lules)	SEM
0	control	5000	0
	pocs AA es.	5000	0
	sense AA es.	5000	0
2	control	45375	8749
	pocs AA es.	23625	1249
	sense AA es.	9750	0
3	control	137156,3	30624
	pocs AA es.	100375	96249
	sense AA es.	16500	2499
4	control	1210625	319374
	pocs AA es.	370000	7499
	Sense AA es.	207750	221249
5	control	5115000	94999
	pocs AA es.	307500	4999
	Sense AA es.	98125	6249

Taula 11		
Taula amb les dades amb que he construït el gràfic número 3		
	Cèl·lules vives %	Cèl·lules mortes %
Control	88,28656	11,71344
Pocs AA es.	83,33845	16,66155
Sense AA es.	62,08435	37,91565

*Per veure la resta d'annexos mirar en els arxius digitals.