

7. Anexos

Anexo 1

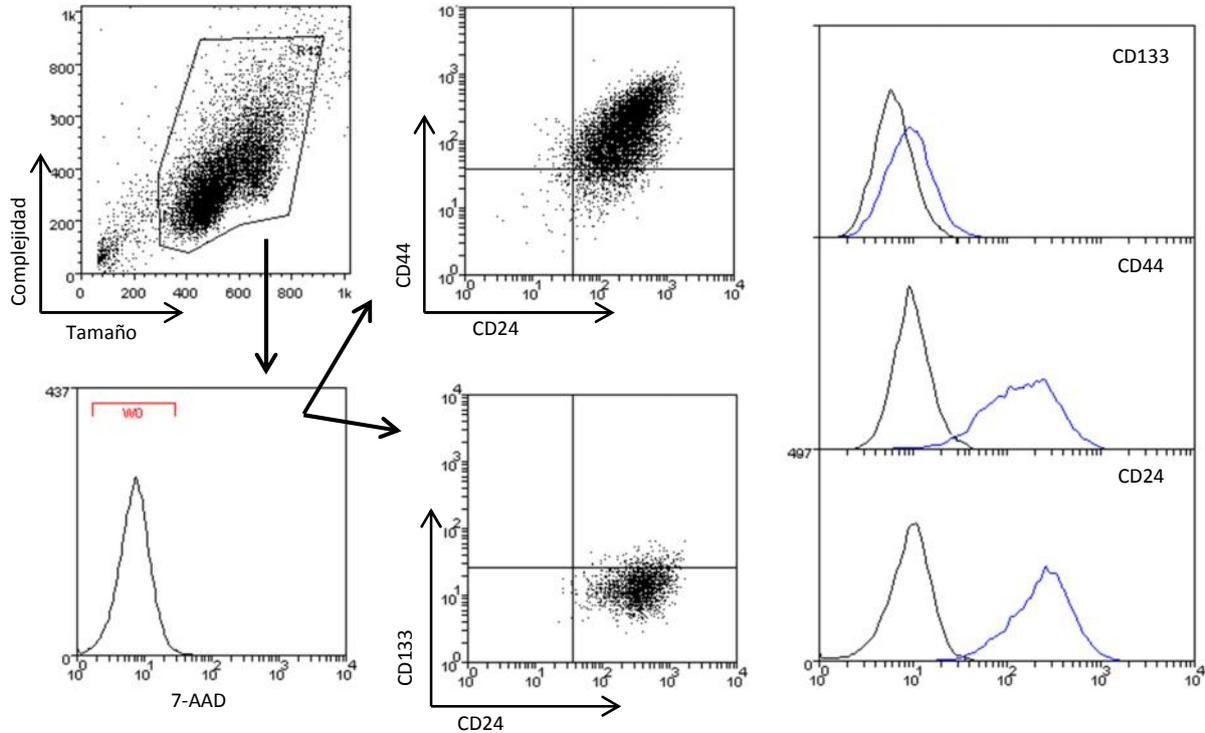


Figura A1.1. Análisis secuencial de la línea celular HT29. La población mayoritaria en tamaño (FSC) y complejidad celular (SSC) se delimita por una región sobre la cual se analiza la fluorescencia de 7-AAD. La población negativa para 7-AAD es seleccionada para analizar la expresión de los distintos CDs; el análisis se realiza en forma de diagrama de puntos y en forma de histograma.

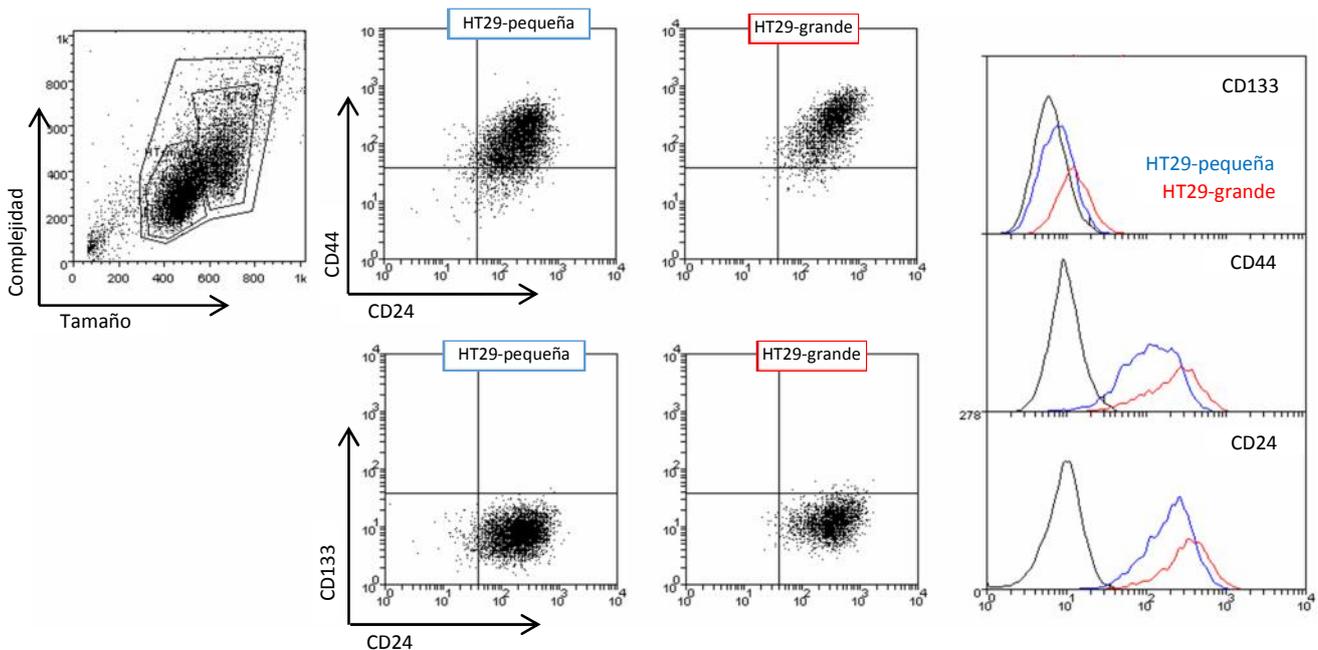


Figura A1.2. Análisis de las poblaciones de distinto tamaño encontradas para la línea celular HT29. Ambas poblaciones son delimitadas por una región en el diagrama de puntos Tamaño frente Complejidad y se analiza por separado la expresión de los distintos CDs en forma de diagrama de puntos y de histograma. Como se puede ver en el histograma, la población de mayor tamaño y rugosidad también presenta mayor expresión de CDs. Las líneas celulares HCT116 y CaCo2 presentan unos resultados similares para las poblaciones de distinto tamaño que encontramos (datos no mostrados).

Anexo 2

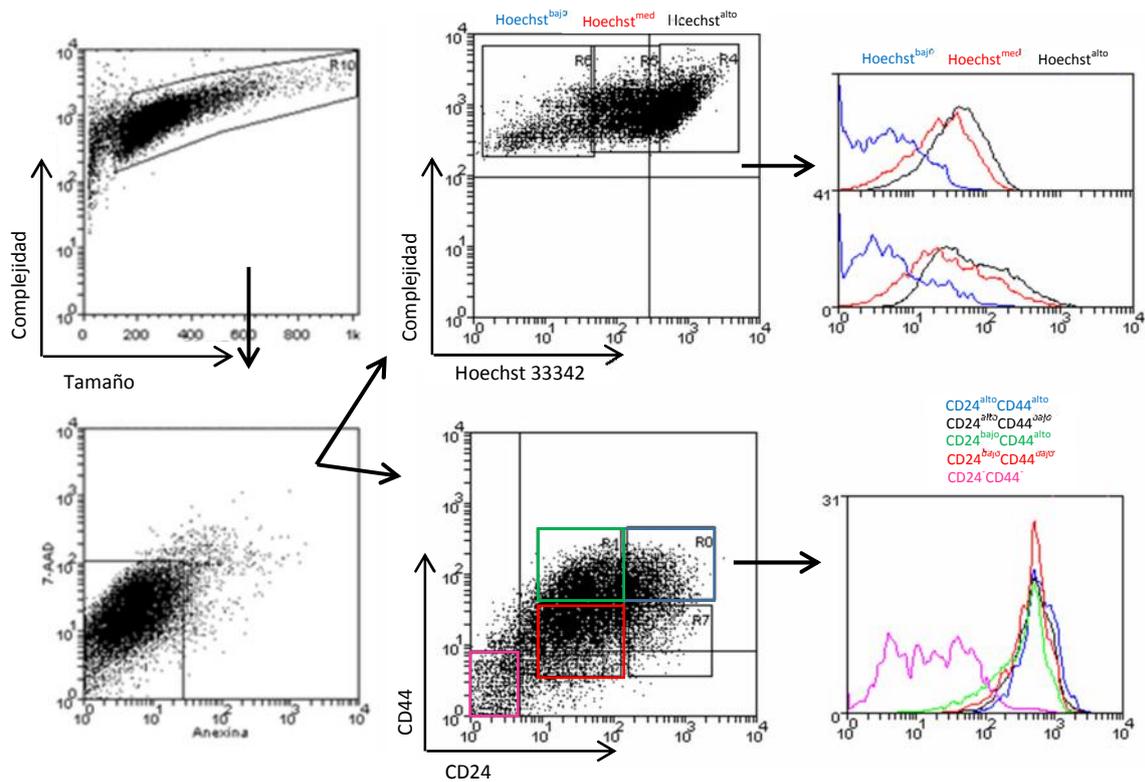


Figura A2.1. Análisis secuencial de la correlación de la expresión de CDs con la expulsión de Hoechst 33342 en la línea celular HT29. Se seleccionan las células vivas tanto por su tamaño y complejidad celular como por la presencia de 7-AAD y Anexina V, y posteriormente se analizan en forma de histograma la expresión de CD24 y CD44 con respecto a las distintas retenciones de Hoechst 33342 y viceversa, diagramas superior e inferior respectivamente. Como se puede ver en las imágenes superiores, cuanto mayor cantidad de Hoechst 33342 ha incorporado la célula, mayor es la expresión de CD24 y CD44. El análisis de la expulsión de Hoechst 33342 con respecto a la distinta expresión de CD24 y CD44 revela que dentro de la población CD24⁺CD44⁺, no aparecen diferencias en la expulsión de Hoechst y una pequeña población CD24⁺CD44⁻ es la que expresa una menor cantidad de Hoechst 33342.

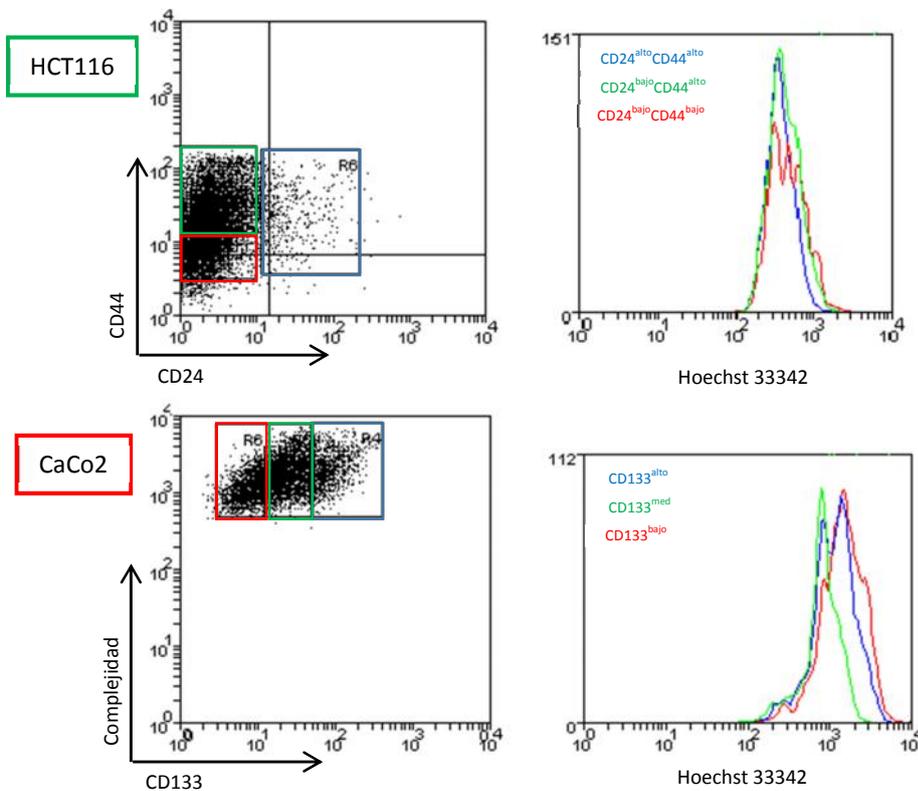


Figura A2.2. Análisis de la correlación de la expresión de CD24 y/o CD44 con la expulsión de Hoechst 33342 en las líneas celulares HCT116 y CaCo2. Se realiza el análisis al igual que se indica en la figura anterior. Se puede ver que los resultados obtenidos son similares a los mostrados en la Figura 7. La mayor o menor expresión de CDs no modifica la retención del Hoechst 33342 en estas líneas celulares.

Anexo 3

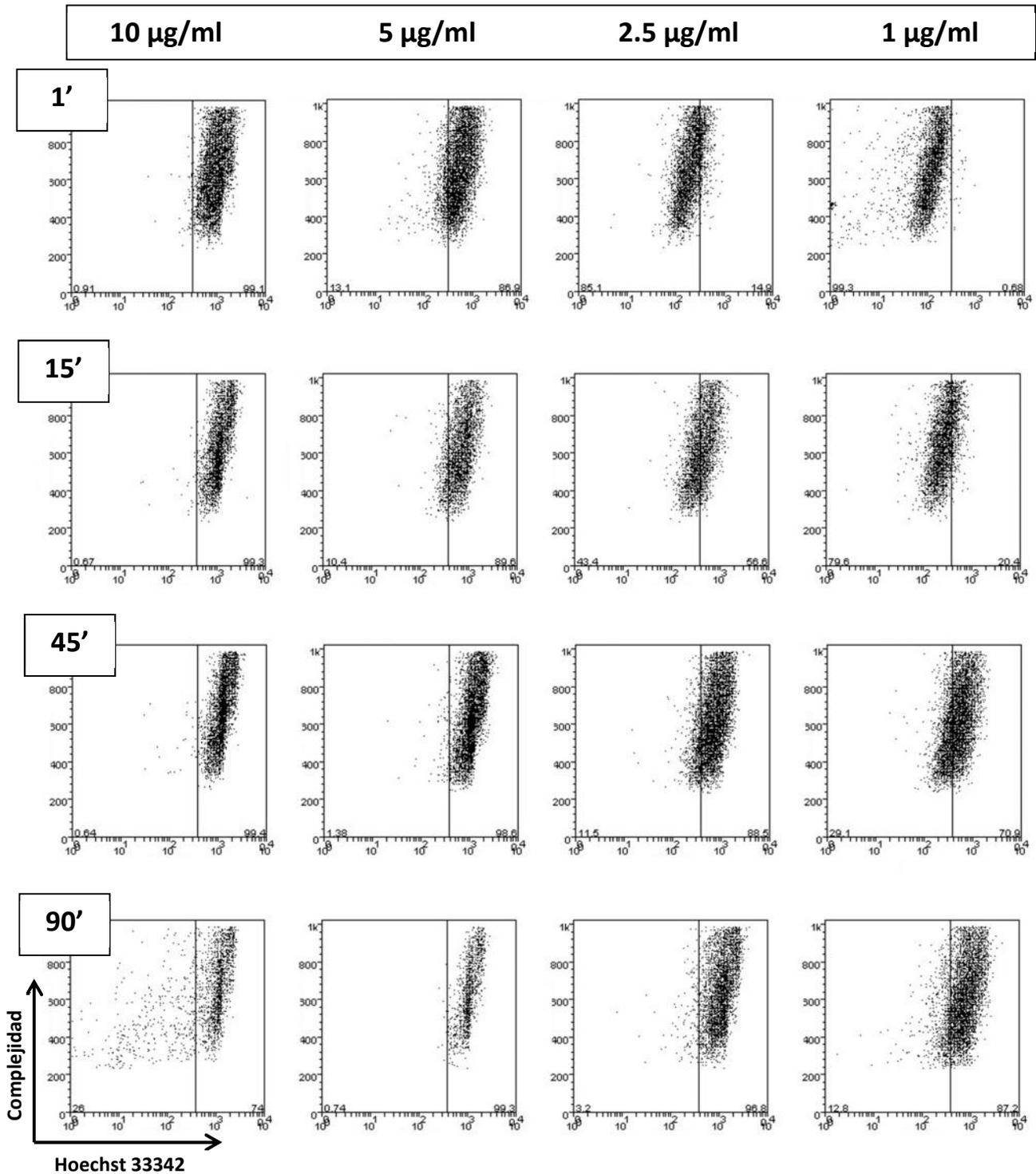


Figura A3.1. Optimización del tiempo de incubación y la concentración de Hoechst 33342 en el ensayo de expulsión de Hoechst 33342 para la línea celular HT29. Las muestras han sido incubadas a concentraciones de 10, 5, 2.5 o 1 µg/ml de Hoechst 33342 durante 1, 15, 45 o 90 minutos. Tras la incubación, se lava el exceso de colorante y se deja expulsar durante 30', tras lo cual se analiza por citometría de flujo. Los datos son mostrados en diagramas de puntos en los que se representa la emisión de Hoechst 33342 frente a la complejidad celular. Se puede ver cómo la retención de Hoechst 33342 es dependiente del tiempo y de la concentración de colorante utilizada pero en ninguno de los casos podemos ver claramente una población lateral.

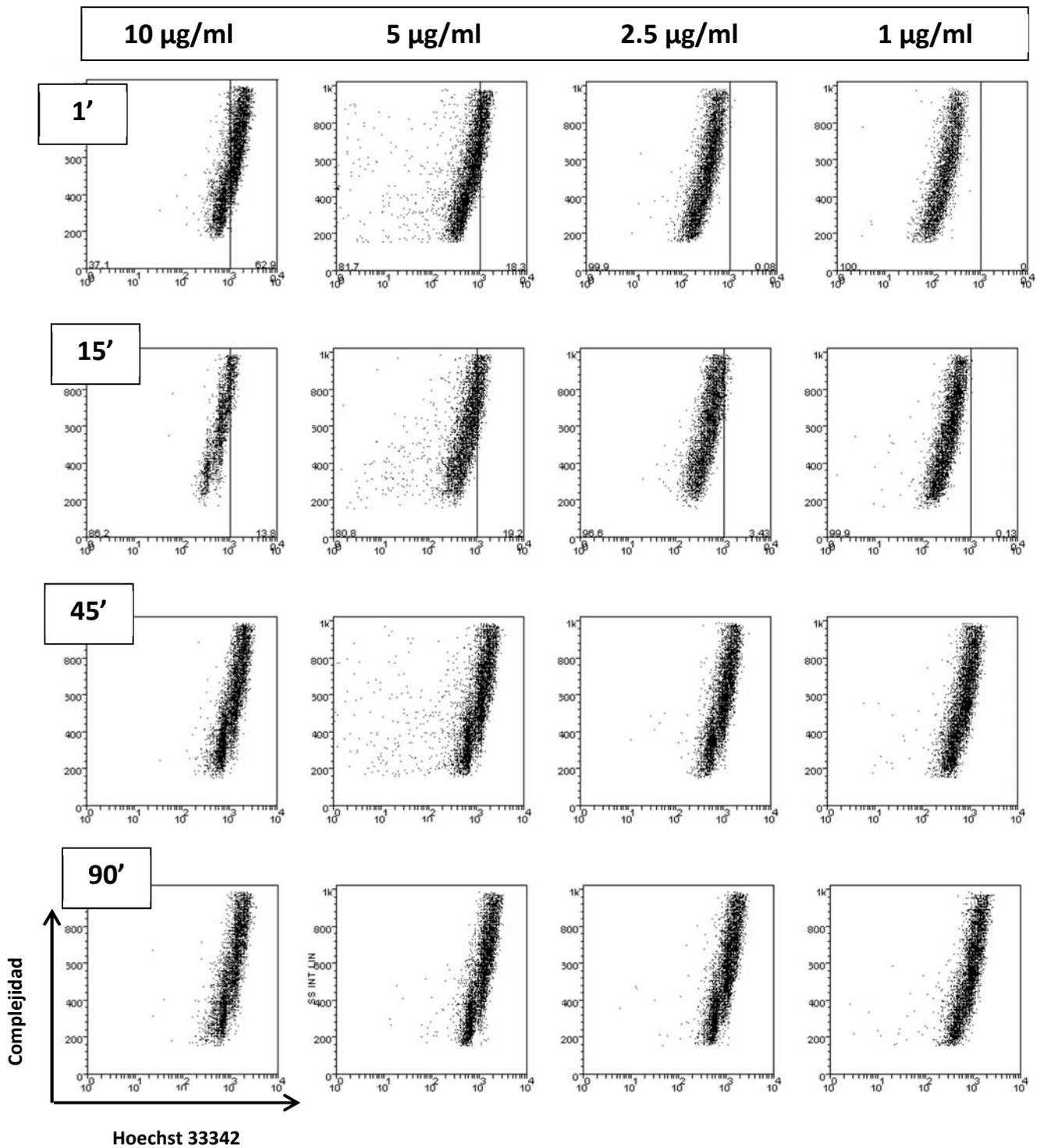


Figura A3.2. Optimización del tiempo de incubación y la concentración de Hoechst 33342 en el ensayo de expulsión de Hoechst 33342 para la línea HCT116. Las muestras han sido incubadas a concentraciones de 10, 5, 2.5 o 1 $\mu\text{g/ml}$ de Hoechst 33342 durante 1, 15, 45 o 90 minutos. Tras la incubación, se lava el exceso de colorante y se deja expulsar durante 30', tras lo cual se analiza por citometría de flujo. Los datos son mostrados en diagramas de puntos en los que se representa la emisión de Hoechst 33342 frente a la complejidad celular.

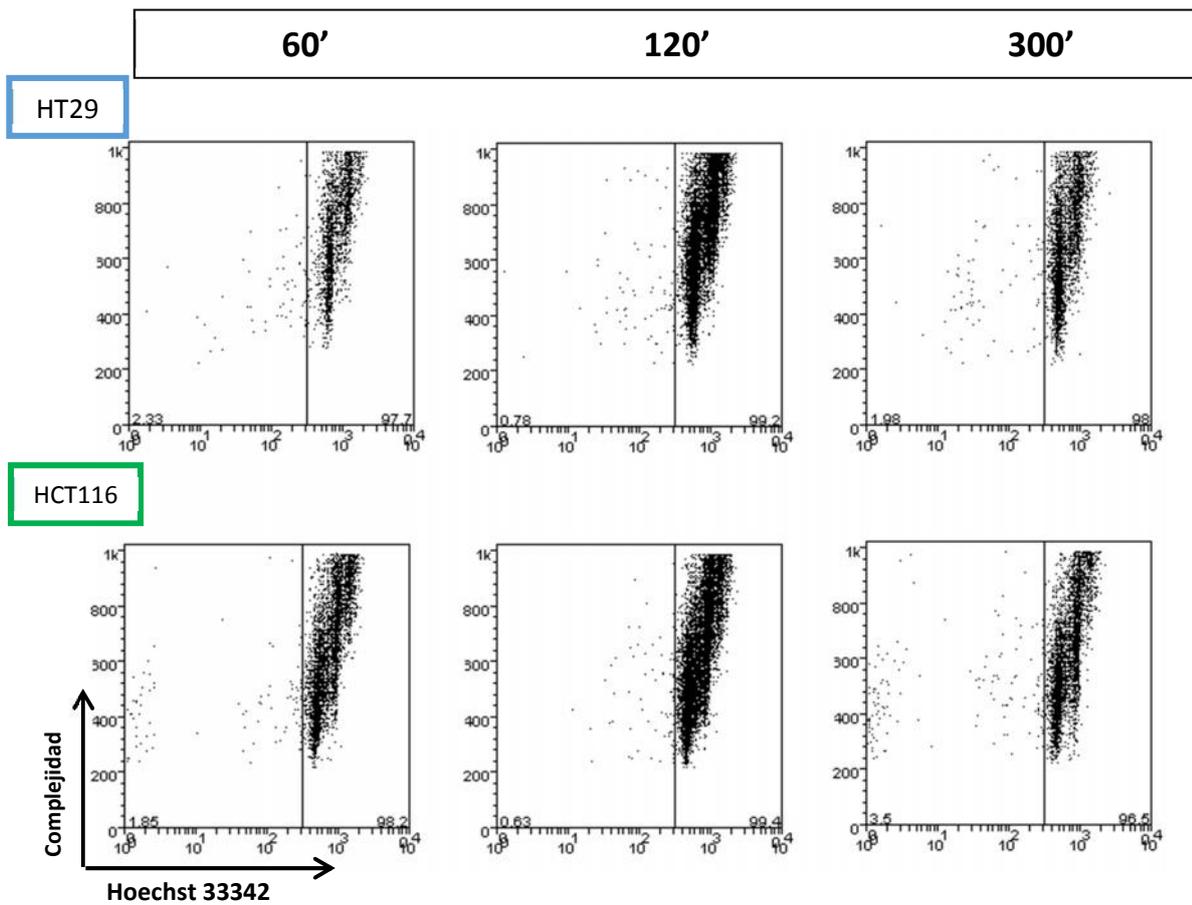


Figura A3.3. Optimización del tiempo de expulsión para las líneas HT29 y HCT116. Se incubaron las células con Hoechst 3334 en medio DMEM completo a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 45', tras lo cual se sustituyó el medio por medio sin colorante y se incubó durante 60, 120 y 300'. Las muestras se analizaron por citometría de flujo y los resultados se muestran en diagramas de puntos en los que se puede ver la emisión de Hoechst 33342 frente a la complejidad celular.

Anexo 4

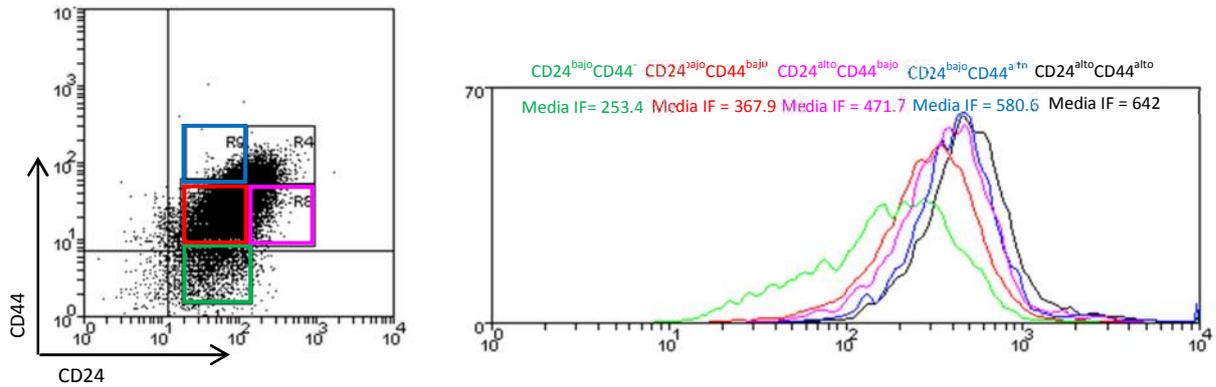


Figura A4. Análisis de la expresión de ALDH para las distintas poblaciones seleccionadas según su expresión de CD24 y CD44 en el diagrama de puntos de la izquierda. Con este diagrama se pretende buscar qué marcador de superficie correlaciona mejor con la actividad ALDH. Como se puede apreciar en los datos de Media IF, la población CD24^{bajo}CD44^{alto} expresa mayor cantidad de ALDH que la población CD24^{alto}CD44^{bajo} lo cual indica que CD44 está mejor correlacionado con la expresión de ALDH que CD24.

Anexo 5

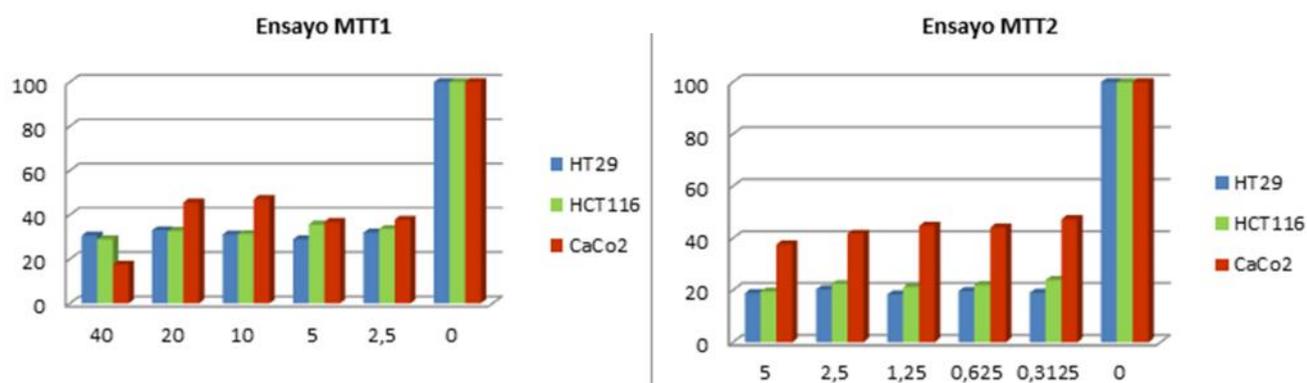


Figura A5.1. Análisis de la viabilidad celular frente al fármaco PTX en las líneas HT29, HCT116 y CaCO2 mediante ensayos MTT. Se trataron las 3 líneas celulares con concentraciones de PTX de 40, 20, 10, 5 y 2.5 μM durante 48 h y se analizó su viabilidad con el ensayo MTT. Para realizar el ensayo tras el tratamiento, se añade el compuesto MTT; las células viables son capaces de metabolizar dicho compuesto formando cristales de azul de formazán, compuestos coloreados e insolubles, que precipitan y se acumulan en las células. Tras una incubación con DMSO para disolver esos cristales, se puede analizar la cantidad de compuesto coloreado en las células indicando la cantidad de células que han conseguido proliferar.

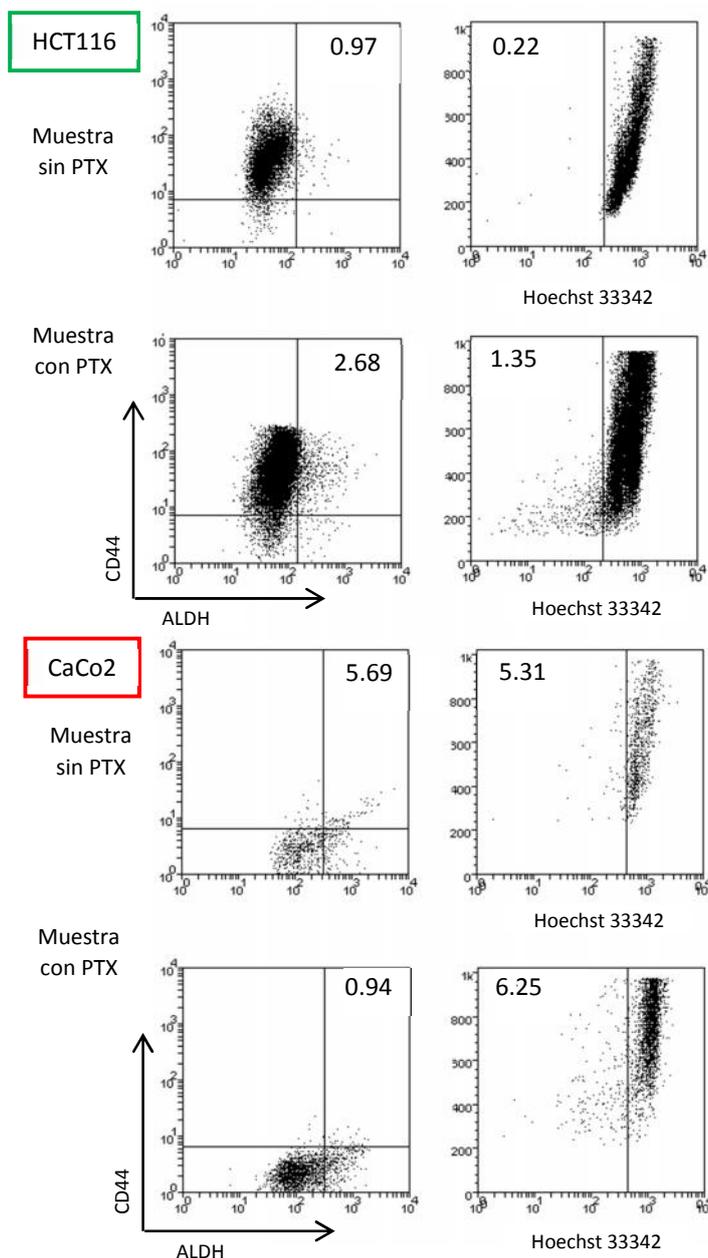


Figura A5.2. Análisis de la influencia del fármaco PTX en el marcaje para CSCs diseñado en las líneas HCT116 y CaCo2. Las líneas celulares son tratadas durante 48 h con el fármaco PTX tras lo cual se realiza el análisis de la expresión de CD44, la retención de Hoechst 33342 y la actividad ALDH según los procedimientos explicados en el apartado de *Materiales y Métodos* 3.6. Los resultados se analizan en diagrama de puntos en los que se indican los porcentajes del cuadrante $\text{CD44}^+\text{ALDH}^+$ y Hoechst 33342⁻ donde corresponde.

Anexo 6

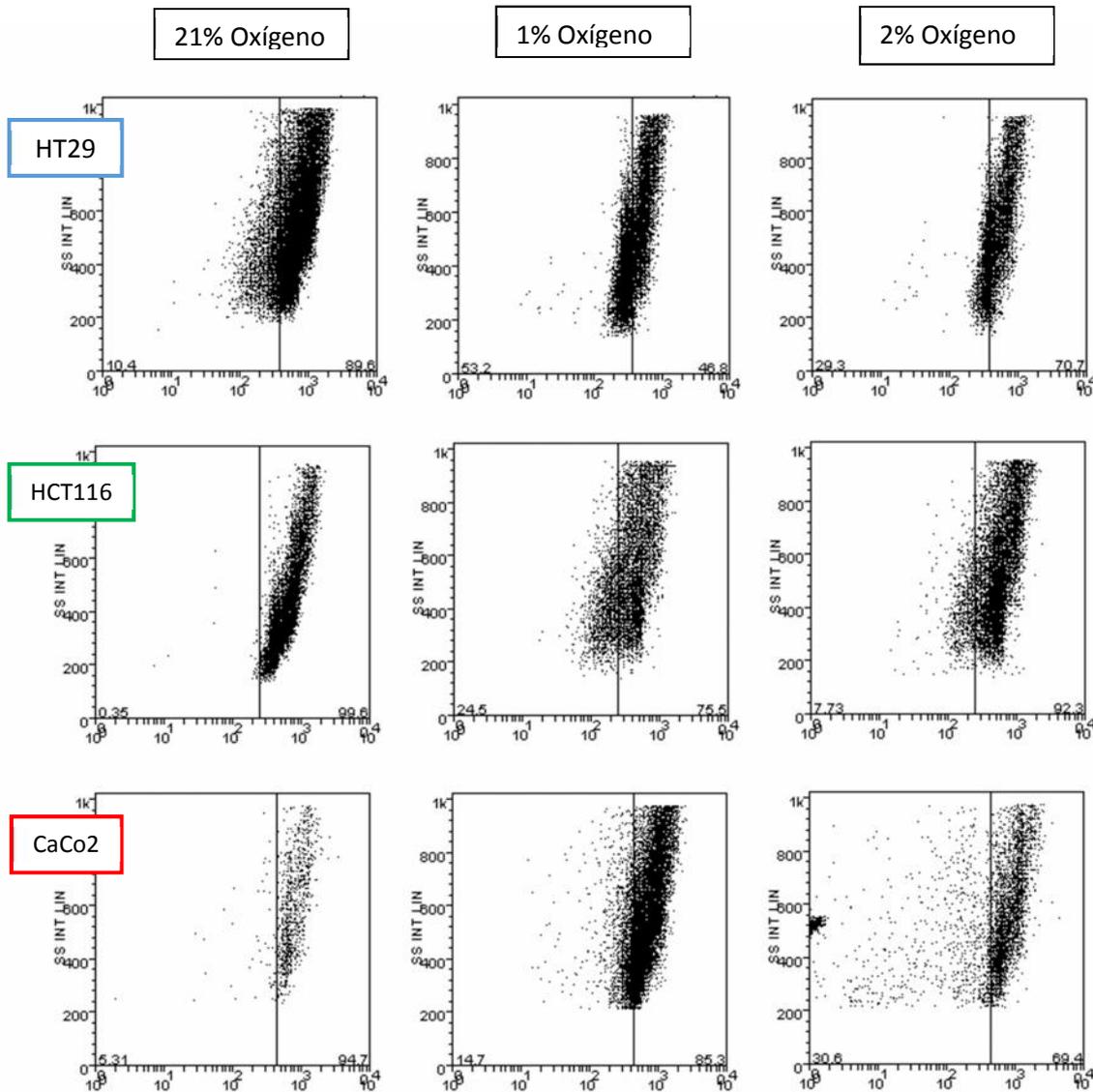


Figura A6. Análisis de la influencia de las condiciones de hipoxia en la retención de Hoechst 33342 en las líneas HT29, HCT116 y CaCo2. Tras la incubación de las células y concentraciones de oxígeno de 1% y 2%, se analizó la retención de Hoechst 33342; se utilizó como control un cultivo incubado a 21% de oxígeno (normoxia). Tras la incubación, las muestras son incubadas con el colorante Hoechst 33342 durante 45' a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$, tras lo cual se retira el colorante y se deja incubar durante 30'. Después de la espera, se analiza por citometría de flujo añadiendo 7-AAD y Anexina V como en los experimentos anteriores para seleccionar la población de células vivas en el análisis. Los datos son mostrados en diagrama de puntos, en los cuales se aprecia el porcentaje de cada cuadrante.

Se puede ver cómo las condiciones de hipoxia no provoca la aparición de una población lateral bien definida si bien el porcentaje aumenta en algunas ocasiones por ejemplo en la línea HCT116. En algunos casos la población se ensancha en cierta manera pero en ningún caso aparece una nueva población que haya expulsado el colorante.

Anexo 7

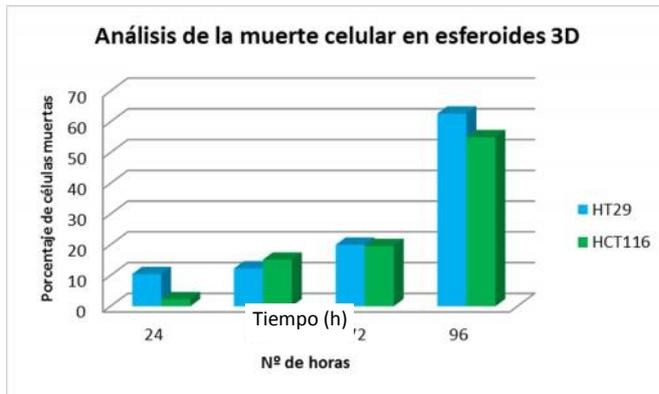


Figura A7. Análisis de la muerte celular en esferoides 3D de las líneas HT29 y HCT116 durante 96 h. los esferoides se forman siguiendo los métodos descritos en *Materiales y métodos 3.8* y disgregados según 3.9. La muerte celular se determina por la cantidad de células 7-AAD⁺ y/o Anexina V⁺ que aparecen tras disgregar el esferoides según se indica en el apartado de *Métodos 3.2.9*.

Anexo 8

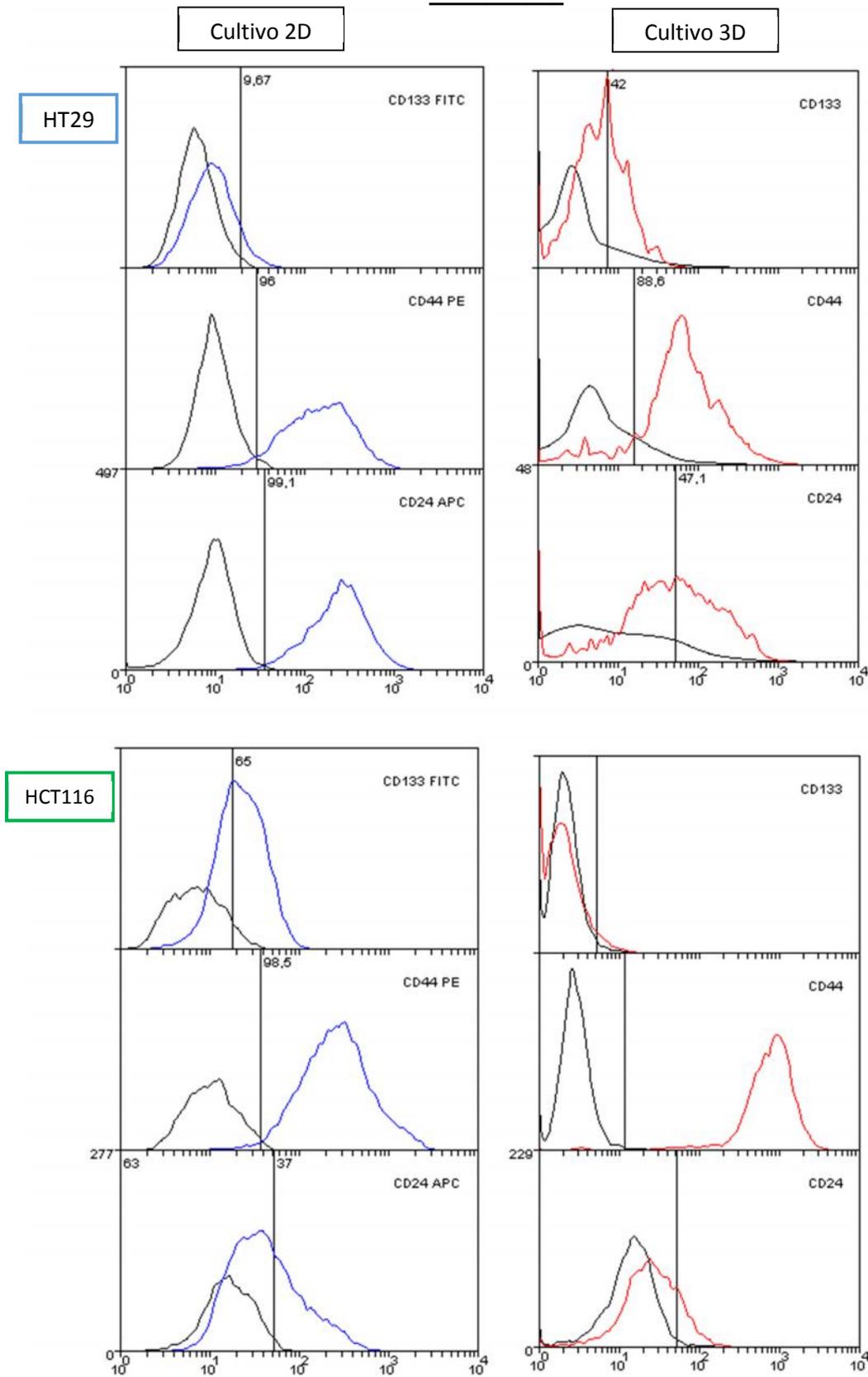


Figura A8. Análisis de los marcadores de superficie CD24, CD44 y CD133 en el cultivo en 3D en las líneas celulares HT29 y HCT116. Tras la formación de cultivos en 3D como se indica en el apartado de *Materiales y Métodos* 3.7, se analiza la expresión de CD24, CD44 y CD133 según se indica en el apartado *Materiales y Métodos* 3.8. Primero es necesario disgregar el esferoide formado utilizando Tripsina-EDTA y una vez obtenemos las células individuales, se realiza el marcaje de CDs tal y como se describe en *Materiales y Métodos* 3.1.

El marcaje para la línea HT29 no se ve afectado por el cultivo en 3D apareciendo los mismos picos; sin embargo, parece que la línea HCT116 sí que se ve afectada por el cultivo en 3D, perdiendo parte de la expresión de CD133 y aumentando la de CD44.