

Efecte del temps d'exposició a un ambient inflamatori sobre el fenotip de cèl·lules de càncer colorectal

Treball de Fi de Grau

Noemí Garcia Serra
Grau de Biotecnologia
Universitat Rovira i Virgili

Tutor professional: Xavier Mayol
Tutor acadèmic: Javier Capilla

17 de juny de 2019, Tarragona



Institut Hospital del Mar
d'Investigacions Mèdiques



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

AGRAÏMENTS

M'agradaria donar-li les gràcies al Xavier Mayol primerament per haver-me acollit al Grup Recerca Clínica i Translacional en Neoplàsies Colorectals de l'IMIM. Per ensenyar-me a dur a terme les metodologies emprades en aquest treball i els coneixements científics que m'ha transmès durant aquests mesos. Però sobre tot pel temps que ha invertit ajudant-me en la elaboració d'aquesta memòria i resolent-me tots els dubtes que he tingut.

Als meus pares, Ubaldo i Antonia, agraeixo tot el suport i ànims que m'han donat durant el transcurs del grau. I també el fet de permetre'm posar punt i final a aquesta etapa de la meua vida realitzant les pràctiques a Barcelona.

ÍNDEX

DADES DEL CENTRE	1
RESUM	2
INTRODUCCIÓ	4
El càncer colorectal	5
Inici de la malaltia	5
Estadis del càncer colorectal	7
Tractament de la malaltia.....	8
Complicacions postoperatòries.....	9
Transició epitel·li-mesènquima	10
OBJECTIUS	13
HIPÒTESIS	13
METODOLOGIA.....	14
Cultius cel·lulars	14
THP-1.....	14
SW620	14
Assaig d'invasió i migració.....	16
Aïllament de RNA	18
RT-PCR	19
RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	22
Imatges microscòpia.....	22
Assaig d'invasió i migració.....	25
Anàlisi de l'expressió gènica	29
CONCLUSIÓ	34
PERSPECTIVES DE FUTUR.....	35
BIBLIOGRAFIA	37
WEBGRAFIA.....	39
AUTOAVALUACIÓ	40
 ANNEX 1. Protocols	I
ANNEX 2. Planificació de l'experiment central	VII
ANNEX 3. Anàlisi de l'expressió dels gens ZEB1 i SNAI2	XI
ANNEX 4. Gràfics anàlisi de l'expressió gènica no inclosos	XIII

DADES DEL CENTRE

Les diferents metodologies emprades en l'elaboració d'aquest Treball de Fi de Grau s'han dut a terme en les instal·lacions de l'Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM) situat al Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB). Lloc on he realitzat una estada de pràctiques curriculars de 6 mesos. Durant aquesta estada he format part del Grup Recerca Clínica i Translacional en Neoplàsies Colorectals dirigit pel Dr. Xavier Bessa. Dintre del grup he estat tutoritzada pel Dr. Xavier Mayol el qual m'ha guiat en la elaboració d'aquest projecte i m'ha ajudat a dur a terme els diferents experiments realitzats.

RESUM

El càncer colorectal és el tercer tipus de càncer amb més incidència a nivell mundial i el segon pel que fa a l'índex de mortalitat. Actualment, l'únic tractament amb intenció curativa, quan no hi ha evidències que el tumor s'hagi disseminat, és la cirurgia. Aquesta cirurgia pot derivar en diverses complicacions entre les quals destaca la fuga anastomòtica. Aquest fet acostuma a donar lloc a una infecció intraperitoneal i s'ha vist que els pacients que la pateixen tenen un índex de recurrència tumoral més elevat. El meu grup de recerca d'acollida ha proposat que l'ambient inflamatori causat per la infecció podria afavorir un canvi fenotípic del tipus transició epiteli-mesènquima (EMT) sobre les cèl·lules tumorals residuals, mecanisme que està relacionat amb la metàstasi. En aquest projecte s'ha volgut observar com diversos temps d'exposició a un medi inflamatori afecten el fenotip de les cèl·lules de càncer de còlon SW620, així com si els canvis fenotípics induïts pel medi inflamatori reverteixen o bé es mantenen en el temps quan es retira el tractament. L'estudi de la capacitat invasiva/migratòria *in vitro* i de l'expressió de gens característics de la EMT ha mostrat que el manteniment del fenotip mesenquimal requereix de l'estímul inflamatori continu. La capacitat invasiva assolida durant els primers dies de tractament no es veu incrementada quan l'exposició al medi inflamatori s'allarga diverses setmanes. En conjunt els resultats suggereixen que els canvis fenotípics induïts pel medi inflamatori no són deguts a un mecanisme epigenètic sinó que són dependents de l'estímul.

Paraules clau: *Ambient Inflamatori, Càncer colorectal, Infecció post-operatòria, Recurrència tumoral, Transició epiteli-mesènquima (EMT).*

ABSTRACT

Colorectal cancer is the third most common cancer worldwide and the second cause of cancer-related death. Nowadays, the only therapeutic treatment with curative intention is surgical excision, provided that there is no evidence of tumor dissemination. Surgery may lead to postoperative complications, particularly the anastomotic leakage. Subsequent intra-abdominal infection is related with higher rates of tumor recurrence. My research group has proposed that the inflammatory response caused by the infection could induce phenotypic changes of the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) on residual cancer cells, and this mechanism is related to metastasis. In this project, we studied how different exposure times to an inflammatory medium affect the phenotype of SW620 colon cancer cells. As well as whether the phenotypic changes stimulated by the inflammatory medium revert or remain in time when treatment is removed. The *in vitro* study of invasive/migratory capacity and expression of EMT genes has shown that maintenance of mesenchymal phenotype requires continuous inflammatory stimulation. The invasive capacity achieved during the first few days of treatment does not increase when the exposure to inflammatory medium lasts several weeks. Together these results suggest that phenotypic changes induced by an inflammatory medium do not involve an epigenetic mechanism but are dependent on the stimulus.

INTRODUCCIÓ

La paraula càncer engloba més de 200 malalties amb causes, evolució i tractament específics, sent el seu denominador comú la pèrdua dels mecanismes cel·lulars i fisiològics de control de la divisió cel·lular (www.aaec.es). L'any 2018 es va diagnosticar més de 18 milions de nous casos de càncer al món, i 9,5 milions de persones van morir per aquesta malaltia, sent la segona causa de mort després de les malalties cardiovasculars.

El càncer pot afectar a qualsevol òrgan, però els que tenen una major incidència són el càncer de pulmó (11.6%) i el de mama (11.6%), seguits del càncer colorectal (10.2%) i el de pròstata (7.1%). El càncer de pulmó és també el que causa una major mortalitat (18,4%) a continuació tenim el càncer colorectal (9.2%) i el càncer d'estómac (8.2%) (gco.iarc.fr).

Pel que fa al sexe, el càncer té nivells d'incidència i mortalitat molts semblants en homes i dones. La diferència principal la trobem en que el tipus de càncer més comú en les dones és el càncer de mama i en els homes el de pulmó.

Aquest treball es centra en un problema clínic: la recurrència tumoral, i sobre com factors associats a la intervenció quirúrgica la poden afectar. Concretament, la línia de recerca del Grup Recerca Clínica i Translacional en Neoplàsies Colorectals de l'IMIM està centrada en l'estudi dels mecanismes pels quals les infeccions postoperatòries afavoreixen la recurrència de pacients amb càncer colorectal. Segons l'Agència Internacional per a la Recerca del Càncer quasi 2 milions de casos nous de càncer colorectal van ser diagnosticats l'any 2018 a tot el món, uns 37 mil casos a Espanya, sent el tercer tipus de càncer amb més incidència a nivell mundial. Pel que fa a la mortalitat un 9,2% de les morts ocasionades per càncer són degudes al càncer colorectal, sent el segon tipus de càncer en causar més morts durant el 2018 (gco.iarc.fr).

El càncer colorectal és diagnosticat arreu del món, però és més comú en zones desenvolupades. Fins i tot s'ha relacionat el creixement econòmic de certs països, com ara la Xina, amb la incidència de la malaltia (Holmes, 2015). Això es deu a característiques pròpies de les societats avançades que tenen relació directa amb factors de risc que afavoreixen l'aparició de la malaltia com ara: la millora de la

qualitat de vida que fa que les persones visquin més anys, els mals hàbits alimentaris, el consum de tabac, el consum d'alcohol, la manca d'exercici físic i l'obesitat (Kuipers *et al.*, 2016).

El càncer colorectal

El càncer colorectal és el tipus de càncer en el qual la transformació de les cèl·lules s'inicia al còlon o bé al recte. El còlon i el recte formen part de l'intestí gros, òrgan encarregat d'absorbir l'aigua dels productes de la digestió i emmagatzemar la matèria fecal fins al moment de la seva expulsió.

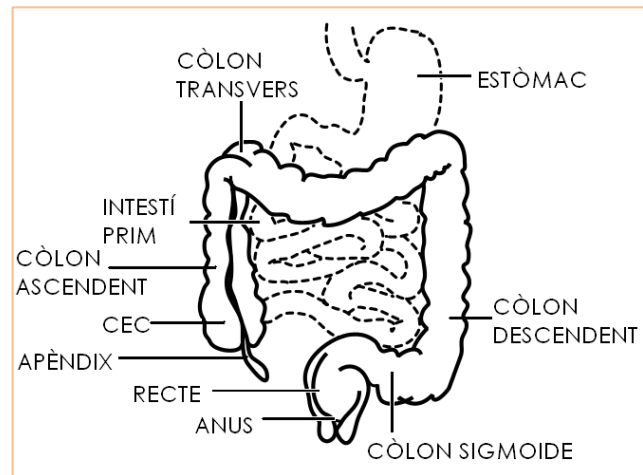


Figura 1. Regions de l'intestí gros.

La primera part de l'intestí gros és el cec, on es troba l'apèndix, tot seguit trobem el còlon ascendent, el còlon transvers i el còlon descendent. I per finalitzar el recte i l'anús (American Cancer Society, 2019).

Inici de la malaltia

En la majoria de casos el càncer colorectal s'origina a partir d'un pòlip. Els pòlips són tumoracions visibles macroscòpicament que es donen en una mucosa epitelial, en aquest cas al revestiment intern de l'intestí. En aquest sentit, el 96% de tumors de càncer colorectal són adenocarcinomes, és a dir s'han originat a partir de cèl·lules de la mucosa intestinal.

L'evolució de les cèl·lules epitelials que donen lloc al adenocarcinoma segueix una sèrie de canvis histològics, epigenètics i genètics ben definits. Les cèl·lules que formen l'epiteli de l'intestí s'organitzen donant lloc a plects formats per vellositats i criptes. S'ha observat que la pèrdua de l'estabilitat genètica i epigenètica s'inicia en cèl·lules que formen part de la cripta, lloc on resideix el compartiment de cèl·lules mare del teixit. Un cop iniciat el procés les cèl·lules epitelials donen lloc a una cripta aberrant, que es caracteritza per estar més elevada que la resta de mucosa i per estar formada per un epiteli més gruixut que deixa de ser monocapa (Alrawi *et al.*,

2006). Aquesta cripta dona lloc a un pòlip i aquest a un adenoma amb una histologia tubular. Arribat a aquest punt ja s'ha format un tumor benigne que pot progressar fins a esdevenir un tumor neoplàsic, és a dir un adenocarcinoma. Aquest procés està dirigit per una gran acumulació de mutacions i canvis epigenètics, i pot durar entre 10-15 anys. Cal dir també que només un 10% dels pòlips progressen fins a esdevenir cancerígens (Kuipers *et al.*, 2016).

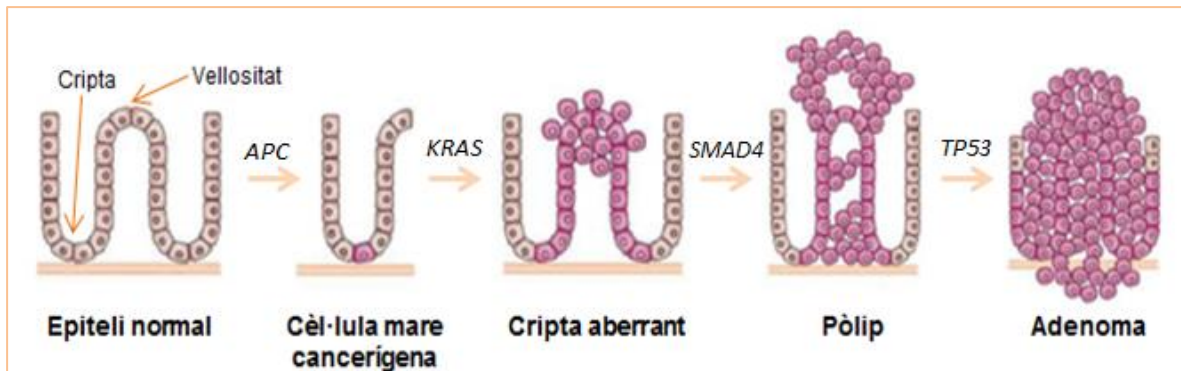


Figura 2. Evolució de les cèl·lules d'un epitel·li normal fins a la formació de l'adenoma (modificada a partir de Kuipers *et al.*, 2016).

Existeix un mecanisme generalitzat pel qual té lloc la transformació cel·lular que dona lloc a la formació de criptes aberrants. En l'epitel·li normal, APC és una proteïna que manté els nivells de β -caterina limitats induint la seva degradació. La β -caterina forma part dels complexos d'adhesió intercel·lular a l'epitel·li. Ja sigui per mutacions d'APC, que impedeixen la seva associació amb la β -caterina, o bé per mutacions en regions de la pròpia β -caterina, que impedeixen que sigui reconeguda com a proteïna a ser degradada, té lloc una acumulació de β -caterina que posa en marxa una segona funció com a factor de transcripció. Aquesta segona funció activa un programa d'expressió gènica relacionat amb la proliferació cel·lular i la inhibició de la diferenciació terminal (Oving and Clevers, 2002). Hom pensa que aquest és el primer pas en la formació de tumors colorectal.

Hi ha diferents seqüències de canvis moleculars que es poden donar fins a la formació del tumor maligne. En el càncer de còlon la causa més comú d'instabilitat genòmica es donada per la instabilitat cromosòmica. Aquesta instabilitat dona lloc a la pèrdua de gens supressors de tumors com ara APC, TP53 i SMAD4. En la Taula 1 podem veure més canvis genètics implicats en la progressió del càncer colorectal (Markowits and Bertagnolli, 2010).

Taula 1. Patrons d'inestabilitat genòmica del càncer colorectal (Markowits and Bertagnolli, 2010).

Tipus d'inestabilitat	Tipus de defecte	Gens involucrats	Fenotip
Inestabilitat cromosòmica, pèrdua de la heterozigositat en múltiples locis	Somàtic	APC, TP53, SMAD4	Característic del 80-85% dels casos esporàdics de càncer colorectal
Reparació de defectes en el DNA per mismatch, càncer de còlon hereditari	Línia germinal	MLHQ, MSH2, MSH6	Progressió del tumor accelerada i gran risc de metàstasis
Defectes en la reparació del DNA per mismatch, càncer colorectal esporàdic	Somàtic	Metilacions en MLH1	Poc agressiu i normalment situat a la part ascendent del còlon
Metilació d'illes CpG	Somàtic	Loci diana MLH1, MINT1, MINT2, MINT3	Característic del 15% dels càncer colorectals
Reparació de defectes en el DNA per escissió de bases	Línia germinal	MYH	Desenvolupament de 15 o més adenomes amb gran risc de produir càncer colorectal

Estadis del càncer colorectal

Pel que fa a la histologia de l'intestí es pot dividir en quatre capes: la mucosa, la submucosa, la capa muscular i la serosa. En el càncer colorectal es poden establir quatre estadis diferents que ajuden a determinar l'estat del tumor segons la capa de l'intestí fins a la qual les cèl·lules cancerígenes han penetrat (Chang *et al.*, 2012):

- **Estadi I.** Les cèl·lules tumorals es troben a la paret interna de l'intestí, és a dir en la capa mucosa.
- **Estadi II.** Les cèl·lules tumorals s'estenen més enllà de les parets de l'intestí envaint la submucosa fins arribar a la capa muscular.
- **Estadi III.** Les cèl·lules tumorals han penetrat al vasos limfàtics o sanguinis, i s'han disseminat als nòduls limfàtics propers.
- **Estadi IV.** Les cèl·lules tumorals estan presents als nòduls limfàtics més propers i poden estar presents en altres òrgans del cos, com ara el fetge o els pulmons.

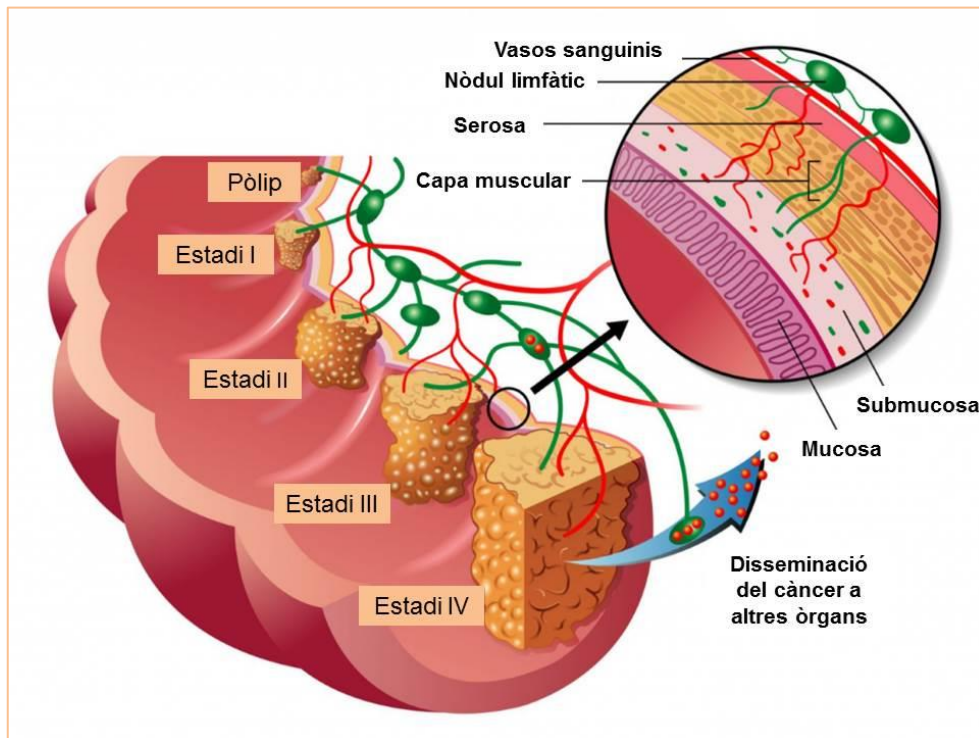


Figura 3. Capes de l'intestí gros i estadis del càncer colorectal (modificada a partir d'una imatge de www.mq.edu.au)

Establir en quin estat es troba el tumor és essencial per determinar el tractament que s'ha d'aplicar al pacient i poder fer un pronòstic de l'evolució de la malaltia (American Cancer Society, 2019).

Tractament de la malaltia

A dia d'avui l'únic tractament amb intenció curativa disponible per al càncer colorectal és la cirurgia. És necessari realitzar una avaluació completa dels pacients abans de l'operació per tal que el cirurgià triï correctament l'abast de la resecció que haurà de practicar. Aquesta avaluació consisteix en: una colonoscòpia per tal de tenir una examinació endoluminal; una biòpsia per a realitzar un diagnòstic histològic del teixit cancerós; anàlisi de sang; test de funcionalitat hepàtica; anàlisi dels nivells d'antigen carcinoembrionic per poder monitoritzar els signes de recurrència; i una tomografia computada del pit, l'abdomen i la pelvis per comprovar si hi ha metàstasi en altres òrgans. En alguns casos en els quals el pacient té el còlon obstruït completament, i per tan no es pot completar la colonoscòpia, s'ha de realitzar un estudi radiològic per a completar l'avaluació (Chang *et al.*, 2012).

Un cop caracteritzat el tumor es decideix l'extensió que tindrà la resecció practicada al pacient tenint en compte el lloc on es troba i el nombre de ganglis limfàtics afectats. Habitualment, quan es tracta de càncer colorectal en els estadis I, II i III, es realitzen dos talls situats a més de 5 cm del tumor per cada costat d'aquest i es practica una anastomosi entre els extrems que queden lliures. Pel que fa als nòduls limfàtics és aconsellable extreure i avaluar al menys 12 d'ells. Es considera una resecció completa quan el nòdul limfàtic extret més llunyà al tumor no conté cèl·lules cancerígenes (Kuipers *et al.*, 2016).

En pacients amb càncer en un estadi III avançat o estadi IV es recomana fer un tractament neoadjuvant, ja sigui quimioteràpia o radioteràpia, amb la finalitat de reduir la mida del tumor i garantir millors resultats en la posterior cirurgia. Pel que fa als tractaments adjuvants, i tot i que no s'ha demostrat que tinguin un gran benefici per al pacient, es recomana la quimioteràpia a pacients en estadi III a partir de la detecció d'un cert nombre de ganglis afectats i, en el cas de pacients en estadi IV sempre (Kuipers *et al.*, 2016). Quan la malaltia es troba en estadi IV acostuma a ser incurable.

Complicacions postoperatòries

Tot i que el factor més important a tenir en compte per a efectuar un pronòstic sobre l'evolució de la malaltia és l'estadi en el qual es troba el tumor, també cal tenir molt presents les complicacions que es poden donar durant el postoperatori en pacients als quals se'ls hi ha practicat cirurgia amb intenció curativa. En concret existeix la possibilitat que el pacient pateixi una fuga anastomòtica, que consisteix en l'alliberament del contingut intraluminal de l'intestí a través de la unió quirúrgica, i conseqüentment una infecció intraperitoneal. Diversos estudis han associat aquesta infecció postoperatòria amb un risc més alt de recurrència tumoral (Salvans *et al.*, 2014).

En el grup de recerca on he fet l'estada de pràctiques s'han realitzat diverses investigacions per tal de conèixer millor la relació entre la infecció postoperatòria i la recurrència. Un d'aquests estudis va consistir en tractar cèl·lules de càncer de còlon amb sang o bé fluids peritoneals de pacients que havien patit una fuga anastomòtica després d'haver estat operats. Els resultats van mostrar que les mostres de pacients amb infecció postoperatòria incrementaven la capacitat invasiva de línies cel·lulars

tumorals en assajos *in vitro*. Aquesta troballa va fer pensar que factors solubles que es troben en l'ambient inflamatori causat per la infecció tenien un efecte directe sobre les cèl·lules residuals de càncer que havien pogut quedar després de la cirurgia (Salvans *et al.*, 2014). Es per això que més tard van realitzar un altre estudi en el qual es va descriure el patró d'expressió gènica dels leucòcits circulants, cèl·lules relacionades directament amb la resposta inflamatòria, de diferents pacients que també havien patit una infecció intraperitoneal després de la cirurgia. Els resultats d'aquesta investigació van revelar que algunes de les citocines alliberades durant la resposta inflamatòria estan relacionades amb processos tumorals que promouen la progressió del càncer tals com invasivitat, angiogènesis, resistència a l'apoptosi i l'immunoevasió (Alonso *et al.*, 2017).

Transició epiteli-mesènquima

Un altre fet que també s'ha descrit en publicacions anteriors del mateix grup de recerca són els canvis fenotípics que es donen en línies cel·lulars de càncer de còlon, com són SW620 i HT-29, quan es tracten amb un medi inflamatori semblant al que es produeix en resposta a una infecció bacteriana (Marcuello *et al.*, 2018). Després de diversos assajos, com ara l'assaig d'invasió o l'anàlisi de l'expressió gènica, van determinar que els canvis fenotípics observats recordaven a la transició epiteli-mesènquima (EMT).

La EMT és el procés mitjançant el qual les cèl·lules epitelials adopten el fenotip propi de les cèl·lules mesenquimals, i és un fenomen característic de certes fases que es donen durant el desenvolupament embrionari. Els trets més característics de la EMT són la interrupció de les unions intercel·lulars, la pèrdua de polaritat cel·lular, la reorganització del citoesquelet i l'augment de la motilitat cel·lular. De tal manera que les cèl·lules adquireixen capacitat migratòria, capacitat invasora i resistència a l'apoptosi. Les cèl·lules tumorals aprofiten aquest mecanisme per a adquirir capacitat invasiva i metastàsica durant la progressió tumoral.

Aquest però és un fenomen de naturalesa transitòria, el procés contrari de la EMT és la transició mesènquima-epiteli (MET). Aquest procés és important en la re-diferenciació cel·lular i la colonització que han de produir les cèl·lules en un teixit diferent al d'origen per a produir metàstasi (Liao and Yang, 2017).

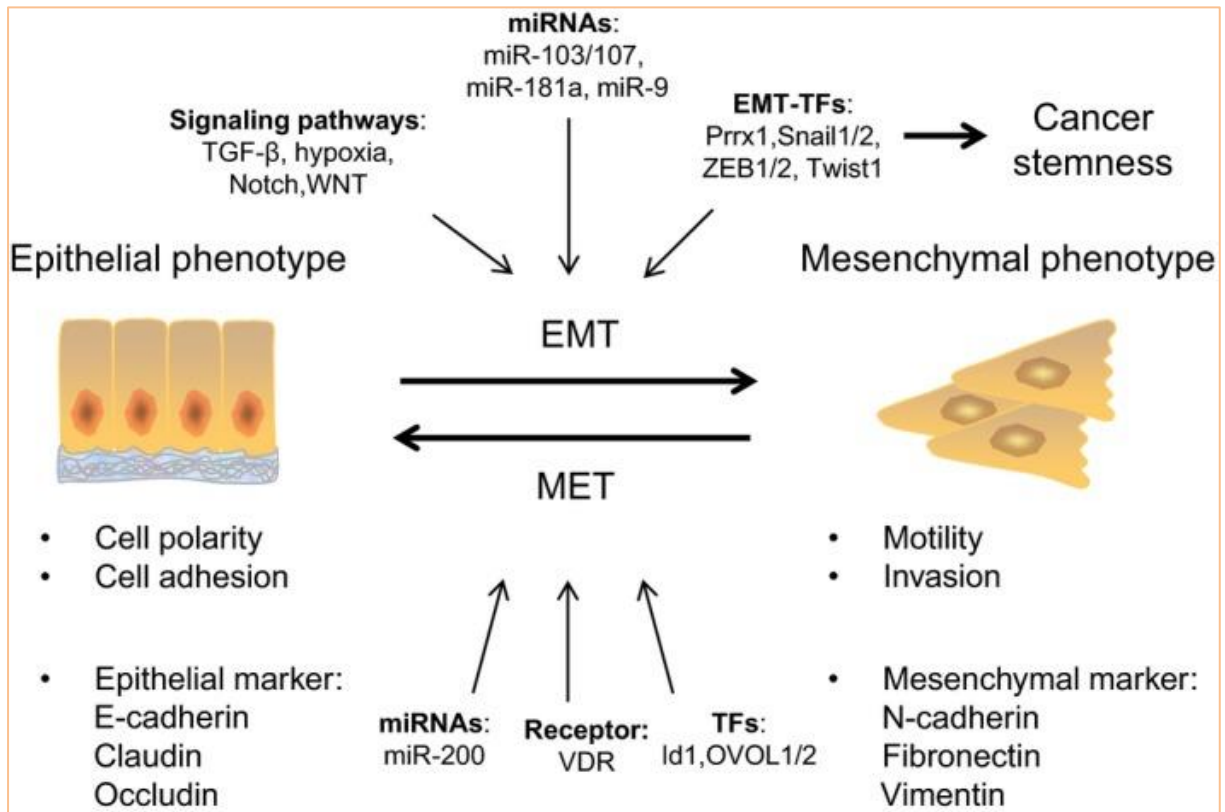


Figura 4. Canvis dinàmics que es produeixen entre el fenotip mesenquimal i epitelial en cèl·lules cancerígenes durant la metàstasi. L'activació de l'EMT proporciona a les cèl·lules capacitat de migració i invasió que faciliten la disseminació del càncer. Un cop les cèl·lules mesenquimàtiques han arribat al lloc on produeixen la metàstasi reverteixen els canvis tornant al seu fenotip epitelial gràcies a l'activació de MET, aquest pas és fonamental per a que les cèl·lules cancerígenes puguin colonitzar el nou teixit (Liao and Yang, 2017).

A més a més dels canvis morfològics que es poden observar en les cèl·lules amb el microscopi, a nivell de genoma també es produeixen una sèrie de modificacions característiques de les EMT. Un dels canvis més importants és l'activació dels factors de transcripció de la EMT (EMT-TFs), la funció d'aquests factors és reprimir la expressió de gens epitelials i activar gens mesenquimals. Entre aquests gens trobem Snail1 que incrementa la expressió de gens mesenquimals com ara la fibronectina, i ZEB1 que al igual que Snail1 s'uneix a les E-boxes i reprimeix la expressió de la E-cadherina, proteïna encarregada de mantenir les cèl·lules epitelials unides entre elles, facilitant la migració cel·lular (Liao and Yang, 2017).

En el treball esmentat anteriorment, realitzat per investigadors del grup de recerca on he realitzat les pràctiques, es descriuen una sèrie de gens que són induïts pel medi inflamatori i, a més, són característics de la EMT. Per una part es veu induïda l'expressió de gens mesenquimals com són la fibronectina (FN1) i la vimentina

(VIM); i per altra banda també s'indueixen gens relacionats amb l'activitat invasiva cel·lular, alguns dels quals són dianes del factor de transcripció β -catenina/TCF-4 com ara MMP7, CCD1 o MET, així com els EMT-FS prèviament esmentats SNAI2 i ZEB1 (Marcuello *et al.*, 2018).

OBJECTIUS

El grup d'investigació que m'ha acompanyat per a la realització d'aquest treball havia estudiat l'adquisició d'un fenotip invasiu per part de línies cel·lulars de càncer de còlon en ser tractades amb un medi inflamatori durant 1 o 2 dies (Marcuello *et al.*, 2018). No obstant, desconeixien com aquest fenotip evolucionaria si el tractament s'estengués durant més dies i/o setmanes. Per altra part, tampoc no es coneixia si el canvi fenotípic induït per aquest tractament agut era un canvi permanent en les cèl·lules, la qual cosa implicaria l'activació de mecanismes epigenètics, o bé les cèl·lules retornarien al fenotip epitelial si es retirés el tractament inflamatori.

Per tant, els objectius que es pretenen assolir en la realització d'aquest treball són els següents:

- Caracteritzar els efectes *in vitro* d'un medi inflamatori sobre cèl·lules de càncer de còlon durant un tractament continu de fins a 6 setmanes i, en paral·lel, després de la retirada d'un estímul inflamatori de 24 hores.
- Veure si el temps de tractament amb medi inflamatori influeix en el canvi fenotípic que pateixen les cèl·lules de càncer de còlon.
- Veure si els canvis fenotípics que adquireixen les cèl·lules de càncer de còlon tractades amb un medi inflamatori durant 24 hores romanen en el temps després d'haver revertit el tractament.

HIPÒTESIS

Les hipòtesis que es vol confirmar amb els diferents assajos realitzats són:

A més temps d'exposició al medi inflamatori més capacitat invasiva adquireixen les cèl·lules de càncer de còlon.

Els canvis fenotípics que es donen en resposta al tractament de cèl·lules de càncer de còlon amb un medi inflamatori romanen després de la retirada del tractament.

METODOLOGIA

En aquest apartat es recullen les diferents metodologies emprades per a assolir els objectius definits prèviament i poder afirmar o desmentir les hipòtesis plantejades.

Cultius cel·lulars

THP-1

El medi inflamatori que va ser utilitzat per a tractar les cèl·lules de càncer còlon es va produir utilitzant la línia cel·lular THP-1. Les THP-1 són monòcits procedents d'un pacient amb leucèmia monocítica aguda (www.lgcstandards-atcc.org; codi de la línia: TIB-202).

Per a que les cèl·lules THP-1 alliberin al medi els components propis d'un ambient inflamatori cal que es produeixi la diferenciació de monòcits a macròfags. Per a fer-ho es van cultivar les THP-1 amb medi *Dulbecco's Modified Eagle Medium* suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (DMEM + 10% FBS) a 37°C i un 5% de CO₂ fins que es va obtenir el volum de cultiu desitjat. Per induir la diferenciació a macròfags es van sembrar les cèl·lules a una densitat de 3x10⁵ cèl·lules/mL en un volum de 3 mL/cm² de DMEM + 10% FBS, es va afegir al medi 200 nM de forbol-12-miristat-13-acetat (PMA) i es va deixar incubar durant 4 dies. Els monòcits són cèl·lules que creixen en suspensió, mentre que els macròfags s'adhereixen a la superfície de la placa de cultiu, per tan es pot comprovar al microscopi si es produeix la diferenciació segons on es troben les cèl·lules. Un cop produïda la diferenciació es va retirar el medi i es van realitzar dos rentats amb DMEM + 10% FBS per assegurar que el PMA quedava totalment eliminat del medi. Es va afegir el mateix volum de DMEM + 10% FBS fresc i es va incubar 24 hores per a que els macròfags alliberessin les molècules pròpies de la resposta inflamatòria. Paral·lelament es van incubar DMEM + 10% FBS sense cèl·lules per a produir el medi control. Per últim es van recollir i filtrar tots dos medis i es va guardar a -20°C fins al seu ús (Satsu *et al.*, 2006; Marcuello *et al.*, 2018)

SW620

La línia de cèl·lules de càncer de còlon utilitzada per a veure l'efecte del tractament amb medi inflamatori va estar la SW620. Les SW620 són cèl·lules humanes

epitelials de càncer de còlon procedents d'un nòdul limfàtic on s'havia produït metàstasis (www.lgcstandards-atcc.org; codi de la línia: CCL-227).

Per al seu manteniment les cèl·lules van ser cultivades a una densitat de 4×10^4 cèl·lules/cm² en DMEM + 10% FBS a 37°C i una atmosfera amb 5% de CO₂ realitzant dos passatges a la setmana. A partir d'aquestes cèl·lules es van realitzar el protocol de tractament que s'indica a l'esquema que trobem en la Figura 5.

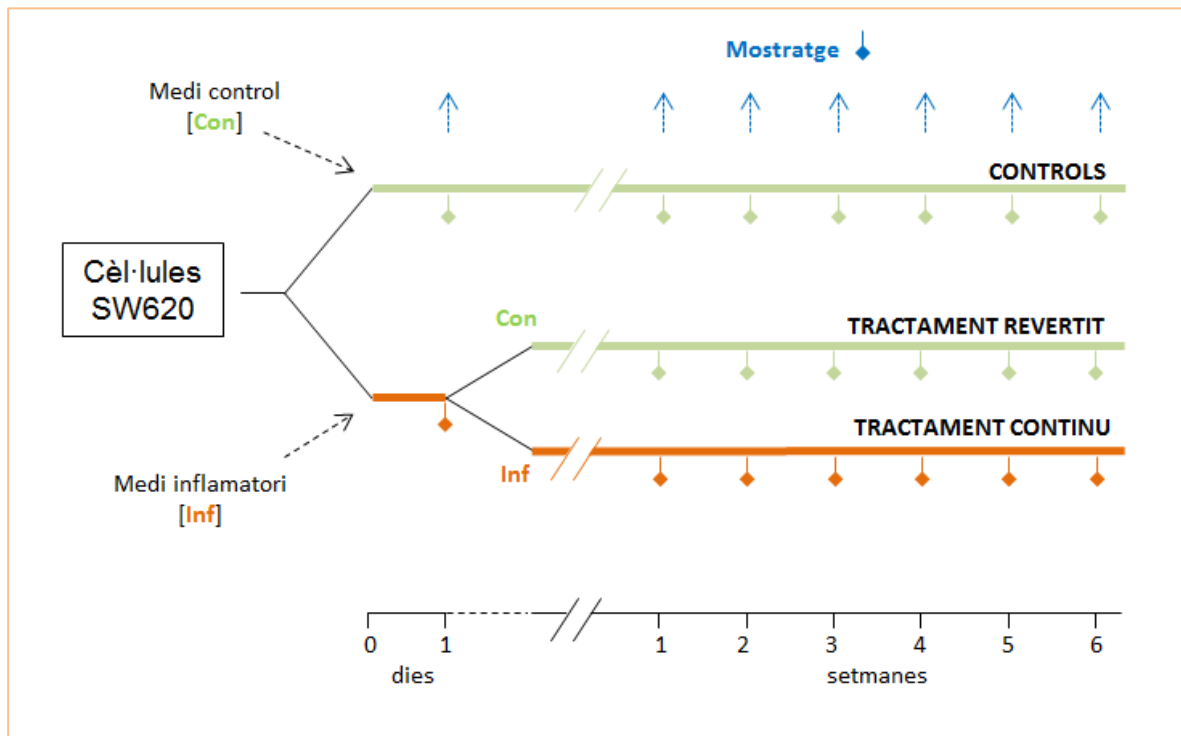


Figura 5. Esquema que mostra el protocol de tractament que s'ha realitzat sobre els cultius de les cèl·lules de càncer de còlon SW620 per a la obtenció de les diferents condicions que es volen estudiar. ACLARACIÓ: les diferents poblacions es van anar iniciant en el tractament en setmanes successives per tal de poder realitzar el mostratge el mateix dia. Per tal d'homogeneïtzar els factors de variabilitat associats a aquest mostratge molts dels quals els desconeixem i no els podem controlar.

Les cèl·lules SW620 van ser sembrades en plaques de petri i, al dia següent, una part va ser tractada amb medi inflamatori (taronja) i la resta amb medi estàndard (verd). Després de 24 hores es va renovar el medi tot dividint les cèl·lules que havien estat tractades amb medi inflamatori en dues parts: una part va seguir el tractament (tractament continu), mentre que a l'altra se li va retirar el tractament i es van seguir cultivant amb medi estàndard (tractament revertit). Es van prendre mostres per a l'anàlisi del RNA i per a iniciar assajos d'invasió després de les primeres 24 hores de tractament, i després durant cada setmana fins a les 6 setmanes d'haver iniciat l'experiment.

Aquests cultius es van ressemar un cop per setmana a una densitat de 1×10^5 cèl·lules/cm² i es va canviar el medi dos cops entre cada ressebra.

Assaig d'invasió i migració

Per poder comparar el grau d'invasió i migració que adquireixen les cèl·lules amb els diferents tractaments realitzats es va dur a terme un assaig d'invasió i migració utilitzant un dispositiu transwell. Els transwells són suports que s'introdueixen dintre dels pous de cultiu i que contenen una membrana porosa a través de la qual les cèl·lules poden migrar d'un compartiment superior a un d'inferior. En aquest cas es van utilitzar de 96 pous amb porus de 8 µm. Per a l'assaig d'invasió el transwell va ser cobert amb 30 µL de Cultrex® Basement Membrane Extract (BME) en cada pou el dia abans de la sembra (Marcuello *et al.*, 2018). Creant així una membrana basal de matriu extracel·lular que les cèl·lules han de degradar per tal de poder envair el pou receptor.

El dia abans de sembrar les cèl·lules sobre el dispositiu transwell es va canviar el medi en el que es trobaven pel medi Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) suplementat amb insulina, transferrina i solució de seleni. Aquest medi no conte FBS amb la finalitat de facilitar la migració de les cèl·lules, de tal manera que el FBS s'afegirà només el dia de l'assaig al compartiment inferior que és cap a on migraran les cèl·lules. El dia de la sembra es va utilitzar Accutase per a trencar els contactes d'adhesió de les cèl·lules a les plaques de cultiu, ja que actua d'una manera més suau que la tripsina.

Degut a que el nombre de cultius que es volia sotmetre a l'assaig era molt elevat per a realitzar el comptatge de cèl·lules amb cambra Neubauer, es va utilitzar l'assaig d'hexosaminidasa. Per a fer-ho es va realitzar el comptatge amb cambra Neubauer d'una de les condicions, a partir de la qual es va realitzar un banc de dilucions. En una placa de 96 pous es van sembrar 50 µL de les dilucions i de les suspensions cel·lulars obtingudes de cada cultiu i es va afegir 50 µL del substrat per a realitzar l'assaig. Es va deixar incubar durant 30 minuts i es van afegir 160 µL de revelador. Un cop mesurada l'absorbància amb l'aparell *Infinite M200* de TECAN es va realitzar una recta patró amb el resultat del banc de dilucions a partir de la qual es va extrapolar el nombre de cèl·lules que hi havia en la suspensió de cada condició.

Amb el nombre de cèl·lules es van fer els càlculs necessaris per a realitzar una dilució de cada suspensió la qual contingues 100.000 cèl·lules per cada 100 µL, que és el que es va sembrar en cada pou del transwell. En el pou de la placa receptora es van afegir 100 µL de medi control o bé medi inflamatori, segons condició, i es va deixar a l'incubador fins al dia següent per a determinar a cada població sotmesa a tractament previ quina era la seva susceptibilitat a ser estimulada en la migració i/o invasió

a		b		a		b		a		b		a		b		a		b	
ASSAIG MIGRACIÓ NO BME												exp NG-1A MIG							
TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	
43d	43d	R-43d	R-43d	22d	22d	R-22d	R-22d	8d	8d	R-8d	R-8d	TP	TP	TP	TP	TP	TP		
TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP		
43d	43d	R-43d	R-43d	22d	22d	R-22d	R-22d	8d	8d	R-8d	R-8d	TP	TP	TP	TP	TP	TP		
TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP		
43d	43d	R-43d	R-43d	22d	22d	R-22d	R-22d	8d	8d	R-8d	R-8d	TP	TP	TP	TP	TP	TP		
TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP		
43d	43d	R-43d	R-43d	22d	22d	R-22d	R-22d	8d	8d	R-8d	R-8d	TP	TP	TP	TP	TP	TP		
TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP		
29d	29d	R-29d	R-29d	15d	15d	R-15d	R-15d	1d	1d	TP	TP	SW620	SW620	200.000	200.000	TP	TP		
TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP		
29d	29d	R-29d	R-29d	15d	15d	R-15d	R-15d	1d	1d	TP	TP	TP	TP	100.000	100.000	TP	TP		
TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP		
29d	29d	R-29d	R-29d	15d	15d	R-15d	R-15d	1d	1d	TP	TP	TP	TP	50.000	50.000	TP	TP		
TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP		
29d	29d	R-29d	R-29d	15d	15d	R-15d	R-15d	1d	1d	TP	TP	TP	TP	0.0	0.0	TP	TP		

pous amb medi_ø pous amb medi TP

a		b		a		b		a		b		a		b		a		b	
ASSAIG INVASIÓ SÍ BME												exp NG-1A INV							
TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	
43d	43d	R-43d	R-43d	22d	22d	R-22d	R-22d	8d	8d	R-8d	R-8d	TP	TP	TP	TP	TP	TP		
TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP		
43d	43d	R-43d	R-43d	22d	22d	R-22d	R-22d	8d	8d	R-8d	R-8d	TP	TP	TP	TP	TP	TP		
TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP		
43d	43d	R-43d	R-43d	22d	22d	R-22d	R-22d	8d	8d	R-8d	R-8d	TP	TP	TP	TP	TP	TP		
TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP		
43d	43d	R-43d	R-43d	22d	22d	R-22d	R-22d	8d	8d	R-8d	R-8d	TP	TP	TP	TP	TP	TP		
TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP		
29d	29d	R-29d	R-29d	15d	15d	R-15d	R-15d	1d	1d	TP	TP	SW620	SW620	200.000	200.000	TP	TP		
TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP		
29d	29d	R-29d	R-29d	15d	15d	R-15d	R-15d	1d	1d	TP	TP	TP	TP	100.000	100.000	TP	TP		
TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP		
29d	29d	R-29d	R-29d	15d	15d	R-15d	R-15d	1d	1d	TP	TP	TP	TP	50.000	50.000	TP	TP		
TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP		
29d	29d	R-29d	R-29d	15d	15d	R-15d	R-15d	1d	1d	TP	TP	TP	TP	0.0	0.0	TP	TP		

pous amb medi_ø pous amb medi TP

Figura 6. Disseny de les plaques per a l'assaig d'invasió i migració.. De cada una de les condicions estudiades hi ha 2 rèpliques. nd fa referència als dies que la mostra ha estat en tractament, i en el cas R-nd als dies que fa des de la reversió del tractament. Les caselles encerclades amb vermell fan referència als pous de la placa receptora als quals se'ls hi posa medi inflamatori per estudiar com responen les cèl·lules a una segona exposició al tractament.

En paral·lel es van diluir 10 vegades les dilucions emprades per a sembrar als transwells, i amb aquestes es van sembrar 100 μ L en una placa de 96 pous per tal de poder fer una normalització dels resultats obtinguts en les plaques per a l'assaig d'invasió i migració i poder corregir així possibles diferències sobre la proliferació cel·lular provocades pels medis control versus inflamatori.

El dia següent a la sembra es va realitzar l'assaig d'hexosaminidasa per a determinar l'activitat cel·lular en cada condició. Aquest assaig consisteix en afegir a les cèl·lules el substrat p-nitrofenol-N-acetil-/3-glucosaminida que es degrada per l'enzim lisosomal hexosaminidasa. El producte de la reacció dona una coloració groga que pot ser mesurada amb un espectrofotòmetre i és indicadora de l'activitat cel·lular, i per tant de la quantitat de cèl·lules. Abans però, en les plaques amb el dispositiu transwell, va ser necessari dissociar les cèl·lules que havien travessat la membrana per a assegurar que es trobessin al pou i poder ser detectades amb l'assaig d'hexosaminidasa. A continuació, es van afegir 100 μ L del substrat de l'hexosaminidasa 2x. Passat el temps d'incubació indicat es van afegir 160 μ L del revelador 2x que parerà la reacció hexosaminidasa i provocarà el canvi a color groc i, per acabar, es va mesurar l'absorbància. En el cas de la placa normalitzadora, tant el substrat com el revelador, es van diluir per a obtenir una concentració 1x, ja que s'afegien sobre cultius de cèl·lules ja adherides als substrats. Per últim es va mesurar l'absorbància a 460 nm utilitzant l'aparell *Infinite M200* de TECAN.

Aïllament de RNA

Dels cultius prèviament esmentats, a més de l'assaig d'invasió i migració, també es va extreure el RNA per tal d'estudiar l'expressió de certs gens relacionats amb la EMT.

Per tal de comprovar l'efecte en les cèl·lules de càncer de còlon d'una segona exposició al medi inflamatori, els cultius que havien estat tractats 24 hores i després s'havia revertit el tractament van tornar a ser tractats amb medi inflamatori 24 hores abans d'aïllar el RNA.

Per a aïllar el RNA dels cultius es va utilitzar el *GenElute™ Mammalian Total RNA Kit* de Sigma-Aldrich tot seguint les instruccions del propi kit. Per a eliminar les restes de DNA genòmic que poguessin romandre a la preparació final de RNA total es va utilitzar el *DNA-free™ Kit* de Ambion. Un cop purificat el RNA de cada mostra es va

mesurar la seva quantitat amb l'aparell NanoDrop. Amb aquesta dada es van realitzar els càlculs per a conèixer quin volum de l'extracte de RNA contenia 2 µg d'aquest. Es va prendre el volum calculat de cada mostra i es va portar fins a 20 µL amb H₂O MiliQ que servien de substrat per tal de produir el seu cDNA utilitzant el kit *TaqMan® Reverse Transcription Reagents* de Applied Biosystems. Un cop realitzada la mescla de cada mostra amb els diferents reactius del kit es van posar els tubs al termociclador *T1 thermocycler* de Biometra, especialment útil per a incubacions de petit volum i realitzar així la síntesi del cDNA.

Taula 2. Volum de cada reactiu per a un volum de reacció de producció de cDNA de 25 µL.

REACTIU	µL
1x TaqMan buffer	2,50
25mM MgCl	5,50
deoxiNTPs	5,00
Random primers	1,13
Inhibidor RNAsa	0,50
MultiScribe RT	1,56
Mostra	8.8
TOTAL	25

Taula 3. Temperatura i temps dels cicle de transcripció reversa.

	Incubació de l'hexàmer	Transcripció reversa	Inactivació de la transcripció reversa
Temperatura	25 °C	37 °C	95 °C
Temps	10 min	60 min	5 min

RT-PCR

Per mesurar l'expressió relativa dels gens FN1, VIM, MMP7, S100A4, MET, SNAI2 i ZEB 1 es va realitzar una PCR quantitativa, també coneguda com PCR a temps real (RT-PCR). Es va utilitzar el *Power SYBR Green PCR Master Mix* de Applied biosystems mescla que conté la DNA-Taq polimerasa, el reporter fluorescent SYBR green, un tampó amb magnesi i dNTPs necessaris per a que es pugui amplificar el DNA.

Taula 4. Seqüències dels primers utilitzats en les RT-PCR.

Gen	Primer forward (5'→3')	Primer reverse (5'→3')
18S	CGGCGGCTTTGGTGACTCT	ATGGTAGGCACGGCGACTA
FN1	ACCAATGCCAGGATTCAGAGA	TGATAAATACTTCGACAGGACCACT
VIM	CCAGGCAAAGCAGGAGTC	GTTCAACGGCAAAGTTCTCTTC
MMP7	CATGAGTGAGCTACAGTGGAAC	GCATCTCCTTGAGTTTGGCTTC
S100A4	GGCAAAGAGGGTGACAAGTTC	GATGCAGGACAGGAAGACAC
MET	TGTCTAGCCAGAGTTTCACCGTA	CAATCACTTCTGGAGACACTGGAT
SANI2	TCAAGGACACATTAGAACTCACAC	ACAGCAGCCAGATTCTCTCA
ZEB1	GACATCACATAAATCAGGAAGAGATCA	TCGCCCATTACAGGTATCA

En cada pou de la placa per a RT-PCR, que compta amb 384 pous, és va afegir 5,5 µL d'una mescla formada per la Master Mix més el primer d'un dels gens i 4,5 µL de cDNA de la mostra corresponent. Un cop preparada tota la placa per a dur a terme les reaccions d'amplificació es va fer ús dels aparells 7900HT Fast Real-Time PCR System i QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System que es troben als serveis científicotècnics de la unitat de genòmica de la UPF. A la Figura 7 trobem la temperatura i temps de durada que es van utilitzar en cada cicle de la RT-PCR.

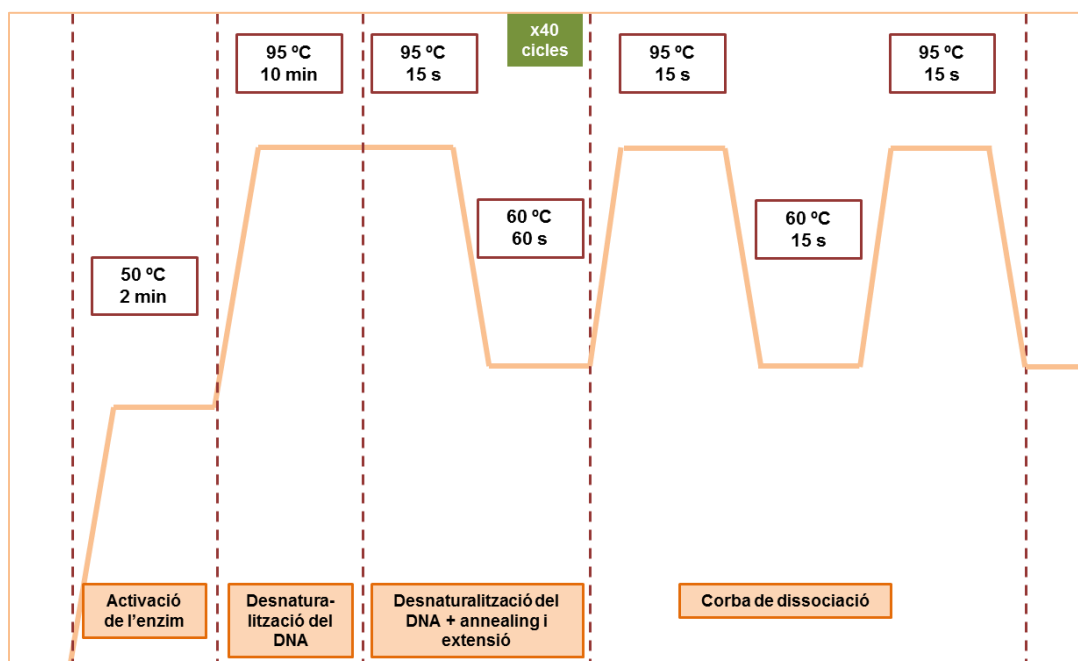


Figura 7. Gràfic que mostra la temperatura i el temps de durada de cada fase de la RT-PCR així com els diferents cicles que es duen a terme.

Els resultats obtinguts amb la RT-PCR es van normalitzar amb el RNA ribosomal 18s com a gen *housekeeping* i es van expressar com a quantificació relativa utilitzant el mètode $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Imatges microscòpia

En aquest apartat es mostren diferents imatges d'alguns dels cultius realitzats amb la línia cel·lular SW620 de cèl·lules de càncer de còlon. Aquestes imatges permeten observar de forma clara el canvi fenotípic que experimenten aquestes cèl·lules en ser tractades amb medi inflamatori.

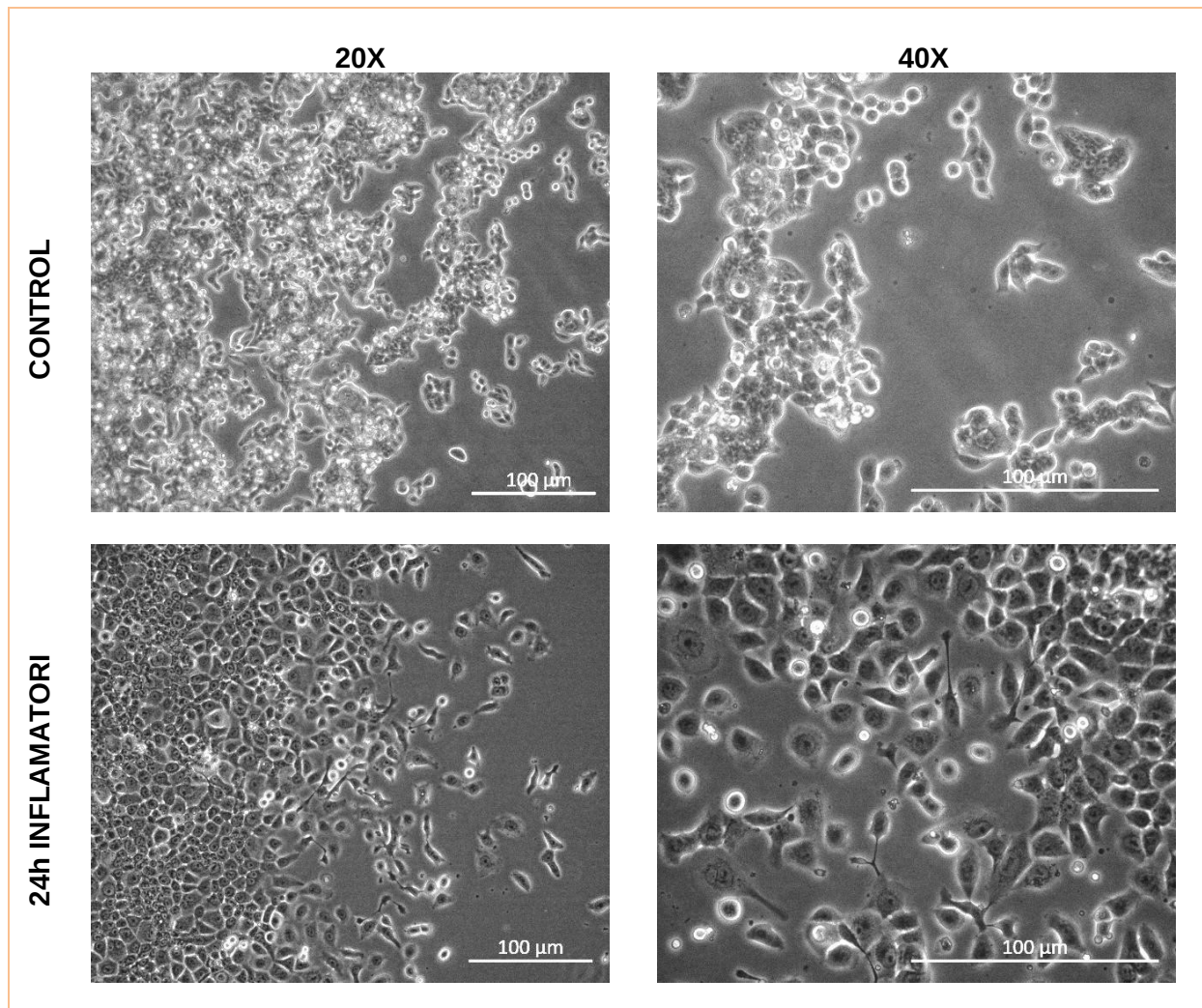


Figura 8. Imatges preses amb el microscopi òptic de contrast de fases de la línia cel·lular SW620 cultivada amb medi control i després de 24 hores amb medi inflamatori.

Les cèl·lules epitelials es caracteritzen per mostrar polaritat apical-basal, ser adherents i comunicar-se entre elles a través d'unions intercel·lulars especialitzades (Samy *et al.*, 2014). En canvi les cèl·lules mesenquimals presenten una morfologia més allargada i aplanada i no formen unions entre ells. El tractament durant 24 hores amb medi inflamatori de les cèl·lules de càncer de còlon SW620 permet observar un canvi fenotípic que recorda la transició epiteli-mesènquima (EMT). Com es pot observar en la Figura 8 després de ser tractades amb medi inflamatori les cèl·lules SW620 es veuen més aplanades, estirades i menys unides entre elles.

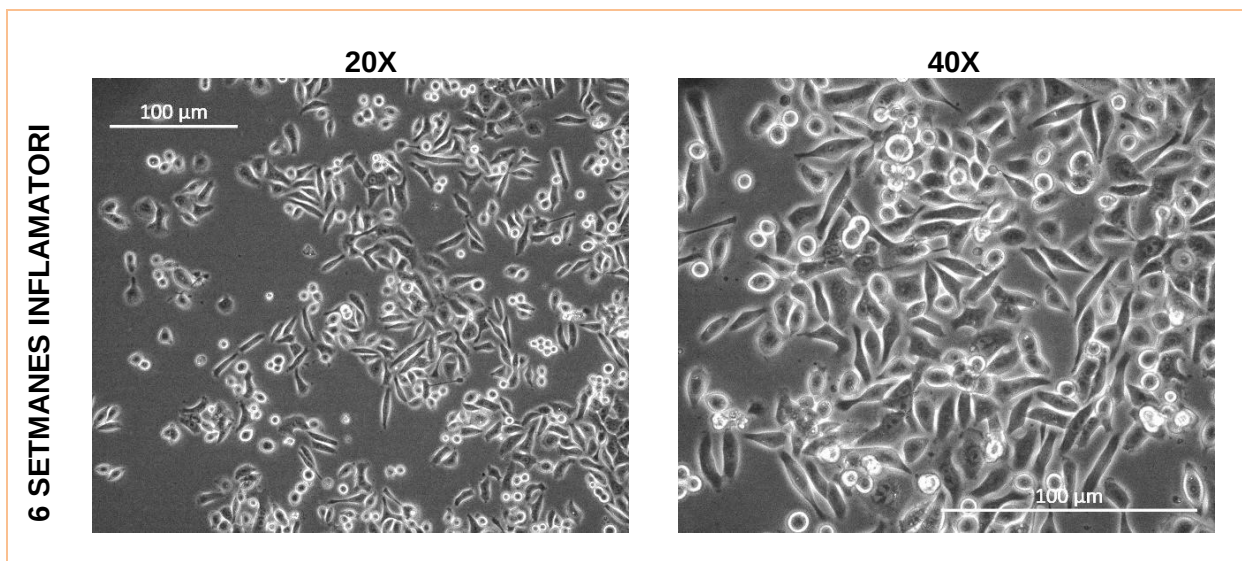


Figura 9. Imatges preses amb el microscopi òptic de contrast de fases de la línia cel·lular SW620 tractades 6 setmanes amb medi inflamatori.

Després de pocs dies de començar el tractament les SW620 ja han perdut completament la seva morfologia i la seva capacitat d'estar unides entre elles. Presenten una forma totalment allargada, es disposen en l'espai sense cap tipus d'ordre i podem observar que hi ha separació entre elles (Figura 9). Aquesta morfologia es conservarà fins al final de l'experiment, 6 setmanes després de començar el tractament.

Una de les característiques de la EMT és que és reversible per tal d'afavorir el procés de metàstasis i que les cèl·lules cancerígenes es puguin establir en un altre òrgan. En revertir el tractament amb medi inflamatori podem observar que les cèl·lules epitelials tornen progressivament al seu fenotip inicial després de 2 setmanes de tractament, i així romanen fins al final de l'experiment (Figura 10). Formen de nou unions intercel·lulars que els permeten formar agregats.

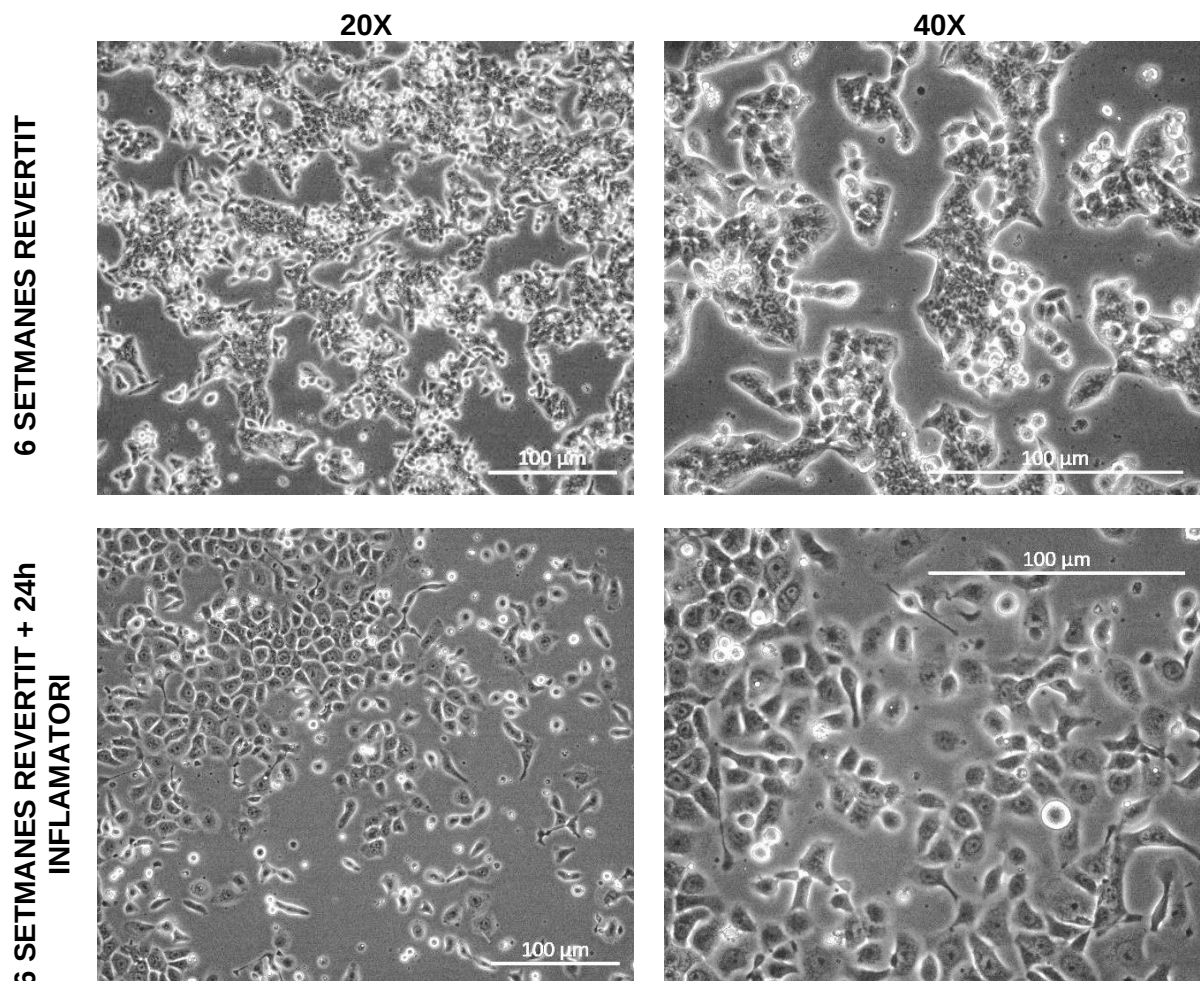


Figura 10. Imatges preses amb el microscopi òptic de contrast de la línia cel·lular SW620 tractades durant 24 hores amb medi inflamatori, reversió del tractament durant 6 setmanes i tornades a tractar amb medi inflamatori 24 hores.

En resum, hem pogut observar que el tractament continu de cultius SW620 condueixen a l'adquisició d'una morfologia mesenquimal durant les dues primeres setmanes de tractament, i aquest fenotip es manté invariable fins a les 6 setmanes en que va acabar l'experiment. La reversió del tractament després d'una exposició aguda de 24 hores al medi inflamatori porta a una recuperació progressiva del fenotip epitelial, havent recuperat les cèl·lules la seva capacitat de compactació i creixement en forma de colònies en dues setmanes aproximadament.

Assaig d'invasió i migració

Els valors que es van obtenir de la mesura de l'absorbància després de realitzar l'assaig d'hexosaminidasa a les plaques de l'assaig de migració i invasió s'han analitzat amb el programa Excel i s'han elaborat els gràfics que es mostren a continuació.

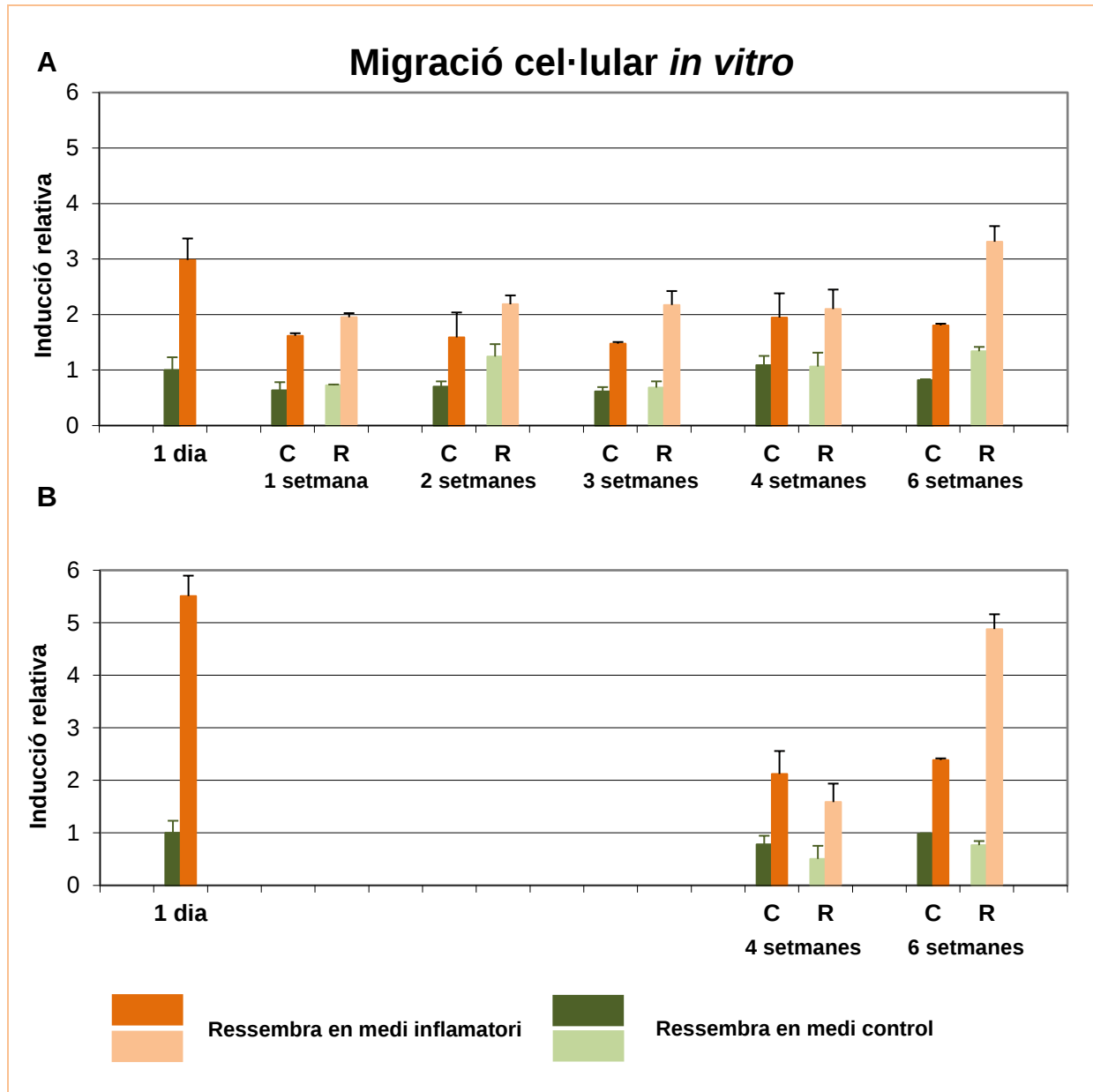


Figura 10. Migració cel·lular *in vitro*. L'assaig d'invasió es va realitzar amb els tots els cultius amb diferents temps de tractament amb medi inflamatori, i diferent temps de reversió del tractament (A). Donat que es va veure interès en els efectes sobre les cèl·lules en la variable de tractament en 6 setmanes, es va decidir repetir certes condicions (B). Les cèl·lules van ser sembrades sobre el dispositiu transwell amb el medi indicat per colors a la llegenda. Les diferents tonalitats fan referència a si el tractament a estat continu (C) o bé revertit (R). Els resultats mostrats són la mitjana de dos cultius amb les mateixes condicions dut a terme en paral·lel $\pm$ la desviació promig.

Els resultats obtinguts amb les dades de l'assaig de migració posen de manifest que el medi inflamatori augmenta la capacitat migratòria de les cèl·lules entre 5 i 6 vegades durant les primeres 24 hores de tractament. Esperàvem que el fet de prolongar el tractament en el temps donaria un augment progressiu de la capacitat migratòria, però no ha estat així. Després de 1 setmana de tractament continu, l'activació de la migració per efecte del medi inflamatori ha baixat al voltat o per sota de les 2 vegades, i es manté en aquests nivells més o menys constant al llarg de l'experiment. En els cultius en els quals es va revertir el tractament, es pot observar com la segona exposició al medi inflamatori (exposició de just 24 hores durant l'assaig de migració) dona un increment de la migració semblant a l'obtingut al llarg del tractament continu (Figura 10). Notablement, en els dos experiments independents en que els cultius revertits van ser cultivats fins a les 6 setmanes té lloc una activació per efecte de la segona exposició que recorda l'increment obtingut després del tractament inicial de 24 hores.

Pel que fa a l'assaig d'invasió s'han obtingut uns resultats prou semblants als de la migració, però en aquest cas la inducció de la capacitat invasora de les cèl·lules produïda pel medi inflamatori és fins a 6 vegades més elevada. D'igual manera observem que el temps de tractament no implica un augment en la capacitat invasora. Al contrari, podem observar una tendència descendent clara des de les 24 hores de tractament fins a les 6 setmanes on cada cop la capacitat d'invasió és inferior quan les cèl·lules es troben exposades al medi inflamatori de manera constant. Per altra banda, quan les cèl·lules han estat tractades 24 hores i posteriorment s'ha revertit el tractament veiem una tendència ascendent donada per un augment de la capacitat invasora (Figura 11). Aquest últim efecte és molt semblant a l'observat en els assajos de migració, i també es repeteix en els dos experiments independents realitzats.

En tots dos assajos podem observar com les cèl·lules ressemerades amb medi control a partir de les diverses setmanes de tractament continu i revertit mostren una activitat migratòria/invasora semblant a la de les cèl·lules del cultiu de SW620 al qual no se li ha realitzat cap (aquestes últimes indicades com a *1 dia* a les figures). Fins i tot les cèl·lules tractades durant un període de temps més llarg perden la capacitat invasiva i migratòria només 24 hores després d'haver estat sense el medi inflamatori. Per tant, el canvi fenotípic induït pel medi inflamatori és dependent de la presència

d'aquest medi, de tal manera que només per retirar l'estímul ja es recupera el fenotip epitelial.

Considero molt rellevant aquest darrer resultat, i crec que podria interpretar-se al menys de dues maneres possibles. Per una part, la EMT implica la inducció de certs factors de transcripció (com ara les famílies ZEB, SNAI i TWIST), els quals s'han descrit a la introducció, que posen en marxa un programa d'expressió gènica mesenquimal de tipus epigenètic, és a dir permanent en el temps. En canvi, els meus experiments mostren que el fenotip que té lloc per tractament amb el medi inflamatori depèn de la presència de l'estímul, suggerint que no es posa en marxa cap programa epigenètic. A més a més, dins l'anàlisi d'expressió gènica que es descriu al següent apartat, també vaig analitzar l'expressió d'alguns d'aquest factors de transcripció i els resultats van mostrar que no existia cap inducció clara i que es mantenen els nivells relativament baixos durant el tractament (es poden veure els gràfics en l'Annex 3). Això em porta a proposar que el canvi fenotípic observat als meus experiments consisteix en una EMT alternativa a la via clàssica. De fet, s'han descrit diversos models experimental en què la EMT està mediada per vies de regulació independents de les vies clàssiques (Nieto, 2016). En estudis futurs, aquesta possibilitat podria ser confirmada analitzant si aquestes vies alternatives són induïdes pel medi inflamatori. Per altra part, té sentit que les cèl·lules epitelials tornin al seu fenotip inicial amb facilitat ja que, precisament, una de les característiques principals de la EMT és que és un procés reversible que, en els casos de les cèl·lules tumorals que formen metàstasis, comporta l'adquisició novament d'un fenotip epitelial mitjançant la MET. Per tant en presència del medi inflamatori les cèl·lules epitelials de càncer de còlon SW620 realitzen el procés de EMT adquirint un fenotip mesenquimal mitjançant el qual augmenten la seva capacitat migratòria i invasora. I en retirar el medi inflamatori les cèl·lules cancerígenes recuperen el fenotip epitelial inicial possiblement mitjançant el procés de MET.

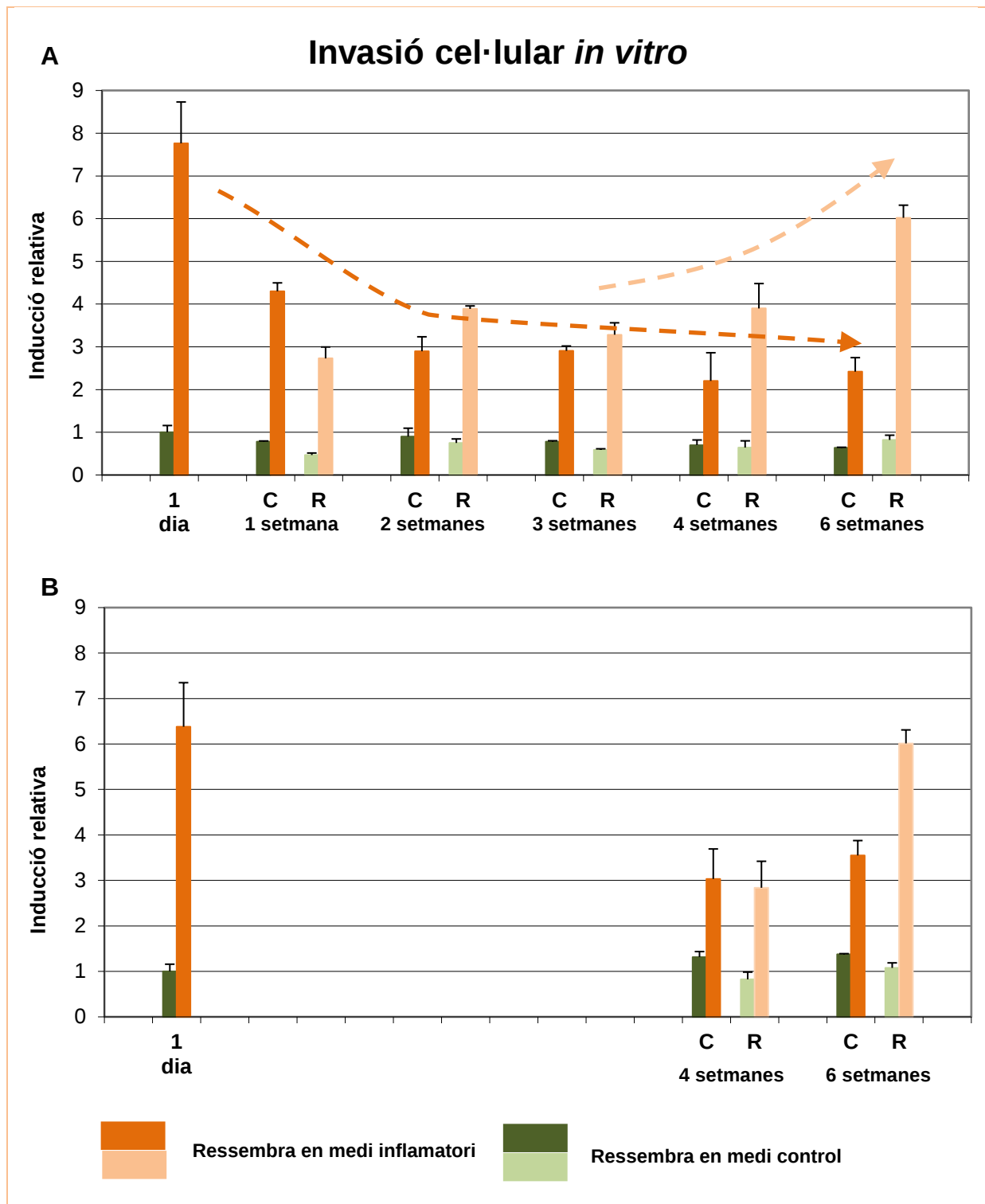
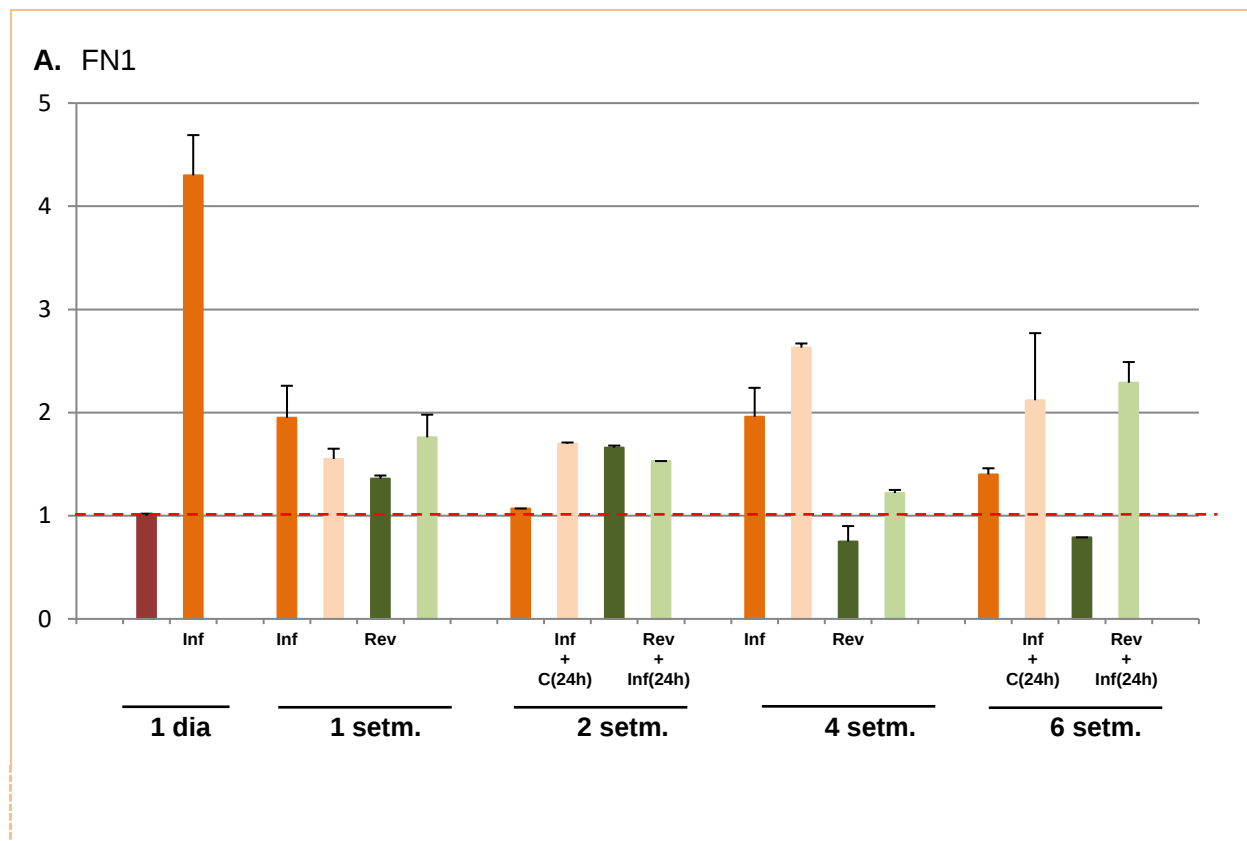


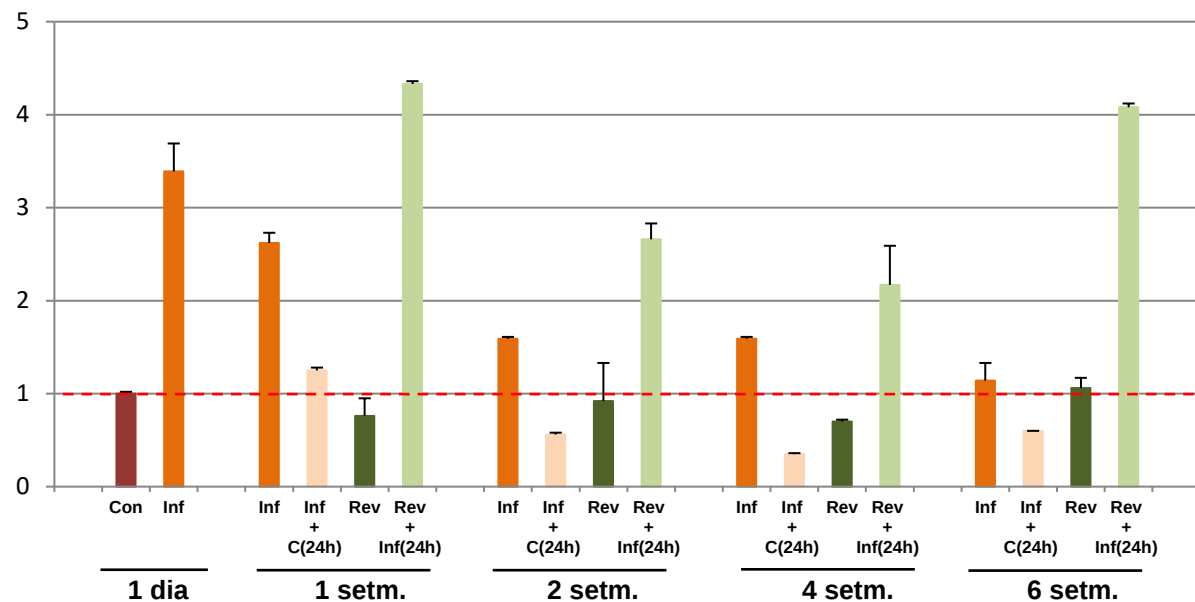
Figura 11. Invasió cel·lular *in vitro*. L'assaig de invasió es va realitzar amb els tots els cultius amb diferents temps de tractament amb medi inflamatori, i diferent temps de reversió del tractament (A). Donat que es va veure interès en els efectes sobre les cèl·lules en la variable de tractament en 6 setmanes, es va decidir repetir certes condicions (B). Les cèl·lules van ser sembrades sobre el dispositiu transwell cobert amb BME amb el medi indicat per colors a la llegenda. Les diferents tonalitats fan referència a si el tractament a estat continu (C) o bé revertit (R). Els resultats mostrats són la mitjana de dos cultius amb les mateixes condicions dut a terme en paral·lel $\pm$ la desviació promig. Les fletxes en el gràfic A indiquen la tendència en la inducció de la invasió.

Anàlisi de l'expressió gènica

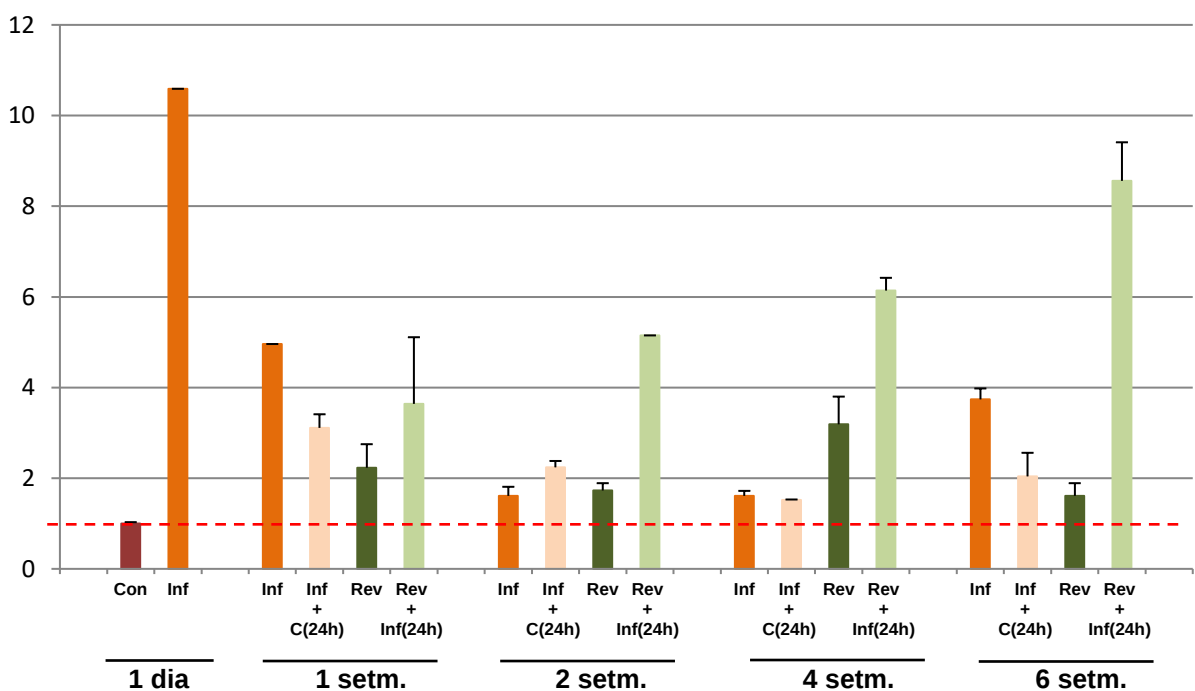
Les cèl·lules restants dels cultius a partir dels quals es va realitzar l'assaig d'invasió van ser ressemmbrades i es van lissar passades 24 hores per tal d'aïllar els seu RNA. A partir del RNA és va produir el cDNA de cada mostra i, mitjançant anàlisi per RT-PCR, es va mesurar l'expressió relativa dels següents gens: marcadors de cèl·lules mesenquimals (FN1, VIM), factors de transcripció EMT (SNAI2, ZEB1) i alguns gens implicats en la invasivitat del càncer de còlon (MMP7, CCD1, MET). Els resultats dels gens SNAI2 i ZEB1 no es mostren en la Figura 12 ja que no mostraven cap patró d'expressió clar, fet que fa pensar que: 1. no participen en el procés esmentat, 2. la seva regulació és diferent a la resta de gens i implica altres vies.



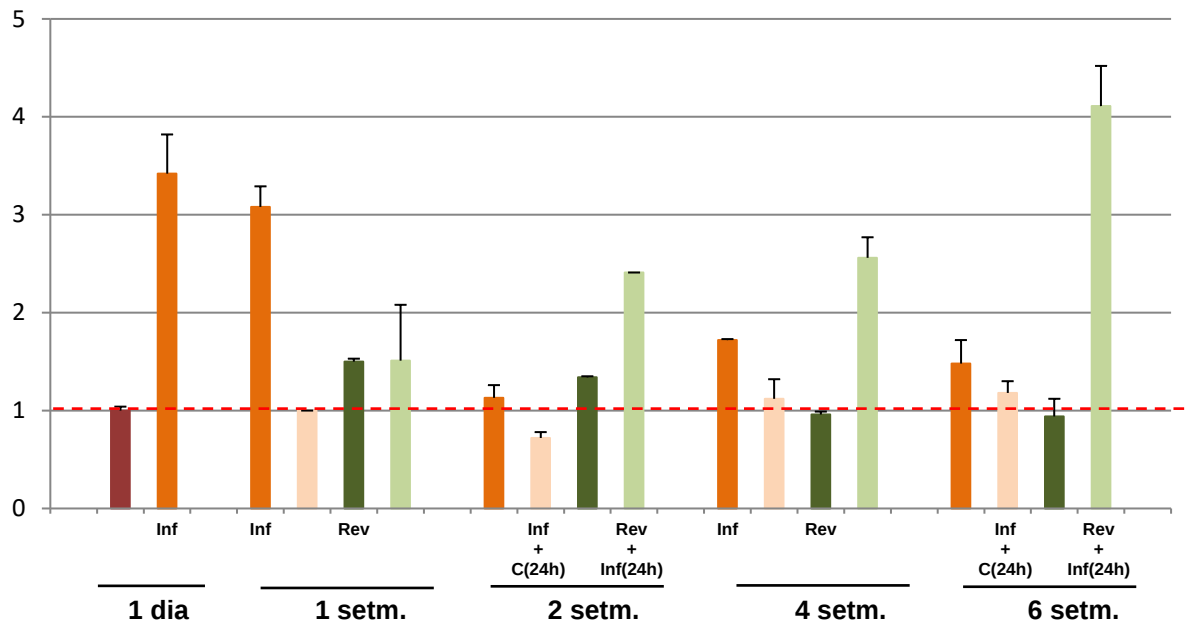
B. VIM



C. CCD1



D. MET



E. MMP7

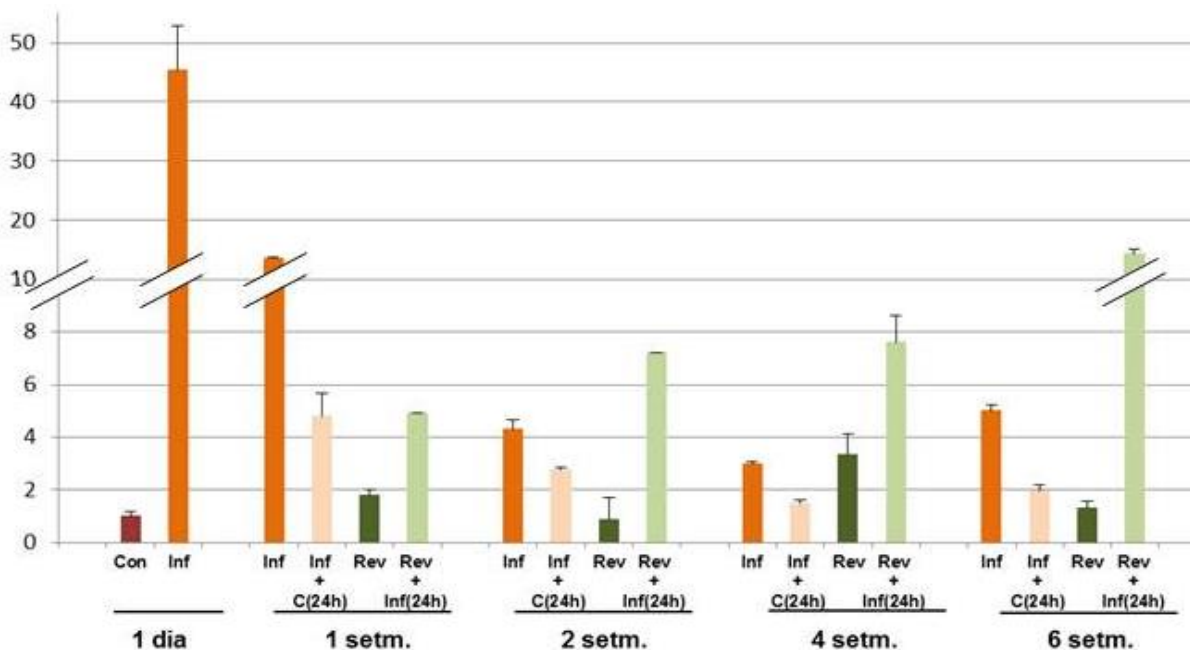


Figura 12. Anàlisi de l'expressió gènica. L'RNA analitzat va ser aïllat dels cultius a partir dels quals es va sembrar les plaques de l'assaig d'invasió i migració, per tan després de les diferents setmanes de tractament les cèl·lules van ser ressemmbrades en els següents medis: medi control (Con, Inf + C(24h) i Rev) o bé medi inflamatori (Inf i Rev + (24h)), i passades 24 hores es va extreure el RNA. L'eix d'ordenades mostra la inducció relativa de cada mRNA respecte al mRNA de les cèl·lules SW620 cultivades amb medi control (Con). Els resultats mostrats són la mitjana de dos cultius amb les mateixes condicions dut a terme en paral·lel $\pm$ la desviació promig.

De la mateixa manera que en els resultats dels assajos d'invasió i migració mostraven un fort augment en les capacitats invasores i migratòries de les cèl·lules després de 24 hores de tractament amb medi inflamatori, en la Figura 12 podem veure com en el mateix temps de tractament s'indueix l'expressió dels 5 gens estudiats. La inducció més forta la veiem en el gen MMP7 que s'indueix 40 vegades. Aquest gen codifica una proteïna de la família de les metalopeptidases de matriu extracel·lular les quals, entre altres funcions, són típicament emprades per cèl·lules tumorals epitelials per a envair els teixits durant el procés de la metàstasi (Liao *et al.*, 2018). Si ens fixem en el gràfic A de la Figura 11, que mostra la capacitat d'invasió de les cèl·lules dels diferents cultius, i el gràfic E de la Figura 12, que mostra l'expressió del gen MMP7 veiem que la tendència és la mateixa. Durant les primeres hores de tractament la inducció de la expressió del gen MMP7 és molt forta i va descendint al llarg de les setmanes de tractament continu, de la mateixa manera que ho fa la capacitat d'invasió. En canvi, en els cultius cel·lulars que es van tractar durant 24 hores i després es van revertir el tractament veiem que en tornar a aplicar el tractament amb medi inflamatori la resposta és més elevada com més temps fa des del primer tractament, donant una tendència ascendent. Per tan podem relacionar directament la capacitat invasora de les cèl·lules SW620 de càncer de còlon amb la expressió del gen MMP7.

Com podem observar en les diferents gens la seva expressió tendeix a disminuir en el temps quan el tractament amb medi inflamatori és continu. Aquest fet ens fa pensar que les cèl·lules de càncer de còlon són molt sensibles als efectes del tractament durant les primeres hores. No obstant, a mesura que el tractament avança es van adaptant a l'ambient inflamatori i alguns gens canvien el seu mecanisme de regulació, ja sigui perquè la inducció de la seva expressió reverteix, o bé perquè la seva regulació passa a tenir lloc a través d'un mecanisme diferent del mRNA (com ara la estabilització de la proteïna).

Tal com ja s'havia avançat amb els resultats prèviament mostrats, les cèl·lules realitzen el procés de EMT amb la presència de medi inflamatori però tenen gran facilitat per tornar a les seves característiques inicials quan retirem el tractament. Les cèl·lules de la variable Inf + C(24h) van estar en tractament amb medi inflamatori el temps indicat i les 24 hores prèvies a l'aïllament del RNA amb medi control. Podem veure com en la majoria de condicions l'expressió dels gens es inferior respecte al

tractament continu en medi inflamatori. En el cas de la condició d'una setmana aquesta diferència és més gran. En les posteriors setmanes aquesta diferència disminueix degut a que el nivell d'expressió dels gens en tractament continua amb medi inflamatori té tendència a disminuir com s'ha comentat anteriorment. En els gens VIM, CCD1, MET i MMP7 podem observar clarament aquesta tendència. Per tant, altra vegada l'anàlisi de l'expressió gènica és compatible amb l'activitat migratòria/invasora de les cèl·lules en tractament.

Per últim en la variable en la qual es va revertir el tractament amb medi inflamatori passades 24 hores veiem que la expressió dels gens característics de la EMT disminueix a nivells similars als que té la variable control. En el cas del gen MET és pot observar com un cop retirat el tractament el gen recupera la seva expressió basal i es manté en el temps. Tanmateix, quan aquests cultius tornen a ser estimulats durant les darreres 24 hores de tractament amb medi inflamatori, observem que tots els gens tornen a ser induïts, igual que passava amb l'activitat migratòria/invasora. De manera molt interessant, la major inducció de la migració/invasió que observàvem en els cultius re-estimulats a la 6a setmana també la observem en les nivells de mRNA d'aquests gens.

CONCLUSIÓ

Les diferents conclusions extretes dels resultats obtinguts de les diferents metodologies emprades en aquest projecte són:

- Durant les primeres hores de tractament amb medi inflamatori les cèl·lules de càncer de còlon mostren una forta inducció de característiques fenotípiques pròpies de la EMT, però aquestes no augmenten a mesura que allarguem el tractament, sinó que fins i tot disminueixen suggerint un fenomen d'adaptació.
- Els canvis fenotípics adquirits per les cèl·lules de càncer de còlon tractades 24 hores amb medi inflamatori no romanen després de la retirada del tractament.
- En realitzar un segon tractament amb medi inflamatori sobre cèl·lules de càncer de còlon tractades prèviament durant 24 hores, observem una inducció més forta com més temps ha passat des del primer tractament.
- Independentment del temps de tractament amb medi inflamatori, incloent el màxim de 6 setmanes assolit en aquests experiments, una simple retirada del tractament de 24 hores és suficient per revertir la capacitat migratòria/invasora induïda, així com l'expressió induïda de la majoria de gens del fenotip invasiu, fins a uns nivells semblants als observats amb cèl·lules no tractades. Per tan els canvis fenotípics induïts pel medi inflamatori no són de tipus epigenètic sinó que requereixen la presència de l'estímul inflamatori.

PERSPECTIVES DE FUTUR

Els resultats que apareixen en aquest treball utilitzant diferents metodologies, assajos cel·lulars i anàlisi de l'expressió gènica, mostren les mateixes tendències la qual cosa m'ha permès extreure les conclusions esmentades en l'apartat anterior. Tot i això, degut a la durada de l'experiment (6 setmanes) i a que per raons alienes a la meua activitat vaig perdre tots els cultius el segon cop que estava realitzant l'experiment quan aquest ja portava 4 setmanes en marxa (els cultius es van assecar degut a que l'incubador s'havia quedat sense aigua), només s'han pogut realitzar dos rèpliques. Per tant el primer pas a realitzar com a mínim dos rèpliques més de cada un dels experiments per tal de poder fer un anàlisi estadística i poder validar les conclusions extretes. Proposo el test Wilcoxon signed-rang que permet comparar els resultat mitjà d'un nombre petit de repeticions quan no es pot suposar una distribució normal entre elles, i per tan no podria utilitzar el test *t* de Student. En absència d'aquest anàlisi estadística, només he pres com a certs aquells efectes del tractament que són clarament aparents (com per exemple les 6-8 vegades que la activitat invasora és induïda durant les primeres 24 hores de tractament, Figura 11). En canvi, aquelles diferències menys aparents les he identificat com una possible tendència que hauria de ser confirmada amb experiments addicionals a partir dels quals si que es podria fer un anàlisi estadística correcta (com per exemple les línies de tendència de les activitats invasores al llarg del tractament, les quals tot i ser especulatives valdria la pena validar, Figura 11).

Com s'ha dit en l'apartat de resultats i discussió cap la possibilitat que el medi inflamatori indueixi la EMT per una via alternativa a la via clàssica mediada per SNAI, ZEB o TWIST. Per tant seria interessant estudiar possibles vies alternatives i analitzar la expressió dels gens que regulen per tal de confirmar com el medi inflamatori activa aquesta transició.

D'altra banda, sabent que les cèl·lules tornen al seu fenotip inicial un cop retirat el tractament i que el MET no es produeix de manera espontània sinó que també s'indueix per factors extracel·lulars, caldria analitzar la expressió de gens relacionats amb aquest procés per a comprovar que realment les cèl·lules retornen al fenotip epitelial degut a la MET. Proposo estudiar l'expressió dels factors de transcripció Id1

i OVOL1/2 que regulen la diferenciació de les cèl·lules mesenquimals al fenotip epitelial (Liao and Yang, 2017).

Per últim, tenint en compte el caràcter translacional del grup de recerca del qual he format part proposaria la elaboració d'un projecte més gran per poder establir quins gens de la EMT serien bons biomarcadors a partir dels quals fer un pronòstic de la evolució de la malaltia després que el pacient fos sotmès a cirurgia. Per a fer-ho caldria establir un model experimental per a saber amb certesa quins gens de la EMT són induïts pel medi inflamatori produït per monòcits als quals se'ls hi ha induït la diferenciació a macròfags. A continuació fer un mostratge de sang i líquid peritoneal abans i després de la cirurgia a pacients amb càncer còlon i un seguiment de la seva evolució. Amb aquests fluids es tractarien cèl·lules de càncer de còlon per estudiar la expressió dels gens prèviament establerts i després es contrastaria amb el postoperatori i la evolució que ha tingut el pacient. Aquests dos estudis permetrien identificar els gens induïts per l'ambient inflamatori produït per una infecció intraperitoneal relacionats amb la recurrència tumoral els quals podrien ser utilitzats com a biomarcadors per a preveure la evolució en futurs pacients.

BIBLIOGRAFIA

- Alonso S., Mayol X., Nonell L., Salvans S., Pascual M. and Pera M. (2017) 'Peripheral blood leucocytes show differential expression of tumour progression-related genes in colorectal cancer patients who have a postoperative intra-abdominal infection: a prospective matched cohort study', *Colorectal Disease*, 19(5), pp. O115–O125. doi: 10.1111/codi.13635.
- Alrawi S. J., Schiff M., Carroll R. E., Dayton M., Gibbs J. F., Kulvat M. *et al.* (2006) 'Aberrant crypt foci', *Anticancer Research*, 26(1 A), pp. 107–119.
- American Cancer Society. (2019) 'Colorectal Cancer Facts & Figures 2017-2019', 1–40. Disponible a: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/colorectal-cancer-facts-and-figures/colorectal-cancer-facts-and-figures-2017-2019.pdf>.
- Chang G. J., Kaiser A. M., Mills S., Rafferty J. F. and Buie W. D. (2012) 'Practice parameters for the management of colon cancer', *Diseases of the Colon and Rectum*, 55(8), pp. 831–843. doi: 10.1097/DCR.0b013e3182567e13.
- Holmes D. (2015) 'Colorectal Cancer a Disease of Growth', *Nature Outlook* 521(S 2). Disponible a: <https://www.nature.com/articles/521S2a>.
- Kuipers E. J., Grady W. M., Lieberman D., Seufferlein T., Sung J. J., Boelens P. G. *et al.* (2016) 'Colorectal cancer', *Nature Reviews Disease Primers*, 1, pp. 1–51. doi: 10.1038/nrdp.2015.65.
- Lamouille S., Xu J. and Derynck R. (2014) 'Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition', *Nature Reviews Disease Primers*, 15(3), pp. 178–196. doi: 10.1038/nrm3758.
- Liao C.H., Chang W.S., Tsai C.W., Hu P.S., Wu H.C., Hsu S.W. *et al.* (2018) 'Association of Matrix Metalloproteinase-7 Genotype with the Risk of Bladder Cancer', *In vivo*, 32(5), pp. 1045-1050. doi: 10.21873/in vivo.11345.
- Liao T. T. and Yang M. H. (2017) 'Revisiting epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: the connection between epithelial plasticity and stemness', *Molecular Oncology*, 11(7), pp. 792–804. doi: 10.1002/1878-0261.12096.

- Marcuello M., Mayol X., Felipe-Fumero E., Costa J., López-Hierro L., Salvans S. *et al.* (2018) 'Modulation of the colon cancer cell phenotype by pro-inflammatory macrophages: A preclinical model of surgery-associated inflammation and tumor recurrence', *PLoS ONE*, 13(2), pp. 1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0192958.
- Markowitz S. D. and Bertagnolli M. M. (2009) 'Molecular basis of colorectal cancer.', *The New England journal of medicine*, 362(13), pp. 2449-2460. doi: 10.1056/NEJMr0804588
- Nieto M. A., Huang R. Y., Jackson R. A., and Thiery J. P. (2016) 'EMT: 2016', *Cell*, 166(1), pp. 21-45. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.028.
- Oving I. M. and Clevers H. C. (2002) 'Molecular causes of colorectal cancer', *European Journal of Clinical Investigation*, 32, pp. 448-457
- Salvans S., Mayol X., Alonso S., Messeguer R., Pascual M., Mojal S. *et al.* (2014) 'Postoperative Peritoneal Infection Enhances Migration and Invasion Capacities of Tumor Cells In Vitro: An Insight Into the Association Between Anastomotic Leak and Recurrence After Surgery for Colorectal Cancer'. *Annals of Surgery*, 260(5), pp. 939-943. doi: 10.1097/SLA.0000000000000958.
- Satsu H., Ishimoto Y., Nakano T., Mochizuki T., Iwanaga T. and Shimizu M. (2006) 'Induction by activated macrophage-like THP-1 cells of apoptotic and necrotic cell death in intestinal epithelial Caco-2 monolayers via tumor necrosis factor-alpha', *Experimental Cell Research*, 312(19), pp. 3909–3919. doi: 10.1016/j.yexcr.2006.08.018.

WEBGRAFIA

Asociación Española Contra el Cáncer. Tipos de cáncer. [Consulta: Maig de 2019]
Disponible a: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer>

ATTC. Cell lines. [Consulta: Maig de 2019] Disponible a: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines.aspx

International Agency for Research on Cancer. Cancer today. Cancer Fact Sheets.
[Consulta: Març de 2019] Disponible a: <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>

Macquarie University. Biomarker discovery offers clearer prognosis for bowel and rectal cancer patients [Consulta: Març de 2019] Disponible a: <https://www.mq.edu.au/newsroom/2015/02/19/biomarker-discovery-offers-clearer-prognosis-for-bowel-and-rectal-cancer-patients/>

AUTOAVALUACIÓ

La elaboració d'aquest Treball de Fi de Grau m'ha permès desenvolupar les meves habilitats tècniques, en el treball dut a terme al laboratori; habilitats de recerca, durant la obtenció i comprensió de resultats; i habilitats literàries, en el moment de plasmar tota la informació obtinguda en el treball escrit. Per això penso que ha estat una gran oportunitat per posar en pràctica, i a l'hora demostrar, tots els coneixements adquirits durant el Grau de Biotecnologia.

El fet de realitzar el treball a partir dels resultats extrets en les pràctiques curriculars m'ha fet sentir com una investigadora més. Ja que, tot i que el projecte me'l va proposar el Xavier Mayol, durant els primers dies vaig estar llegint articles anteriors del grup de recerca d'acollida per poder entendre quina era la seva línia de treball. Mentre vaig començar a obtenir els primers resultats, hem vaig qüestionar a que es devien i vaig buscar articles que hem poguessin ajudar a comprendre'ls. També hem van sortir dubtes que vaig poder debatre amb el Xavier i proposar noves estratègies per dur a terme el projecte. I finalment l'anàlisi i redacció dels resultats obtinguts semblants a la tasca que faria un investigador a l'hora d'elaborar un article científic. A més estic molt contenta de poder dir que els resultats obtinguts responen directament les preguntes plantejades a l'inici i no m'ha calgut fer modificacions per ajustar els objectius inicials als resultats finals.

També m'agradaria destacar el fet d'haver formant part d'un centre de recerca com és l'IMIM que compta amb més de set-cents professionals i a més es troba ubicat a les dependències del PRBB. A nivell de les dues institucions s'organitzen diversos seminaris, cursos de formació i activitats totes les setmanes per facilitar el flux dels nous coneixements científics. Aquest fet m'ha fet adonar de la importància de comunicar i compartir amb altres professionals la feina que un realitza.

Per acabar, dir que tan l'estada de pràctiques com la redacció del Treball de Fi de Grau m'han fet enriquir els meus valors personals. La recerca és un àmbit que requereix de molt d'esforç i sacrifici ja que molts cops els resultats o els experiments no surten segons l'esperat i pot ser degut a factors que no poden ser controlats per un mateix. S'ha de tenir constància i sobre tot no tirar la tovallola quan un experiment no surt bé. Acabo aquest treball amb la frase de l'escriptor Baltasar Gracián *"Tingueu paciència i tindreu ciència"*.

ANNEX 1. Protocols

PRODUCCIÓ DE MEDI INFLAMATORI A PARTIR DE THP-1

Basat en el mètode descrit per Satsu *et al.* (2016). Per a la producció de medi inflamatori es necessària una gran quantitat de cèl·lules, en aquest cas THP-1. És per això que s'ha d'expandir prèviament el cultiu fins a aconseguir el volum desitjat. Les cèl·lules THP-1 seran cultivades en suspensió en el medi Dulbecco's modified Eagle medium suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (DMEM+FBS) a 37°C en un 5% de CO₂ i es realitzaran dos passatges a la setmana. En aquest passatges es sembrarà una densitat de 3x10⁵ cèl·lules/mL cada cop en un volum major fins a assolir la quantitat de cèl·lules per a produir el volum desitjat de medi inflamatori.

DIA 1

1. Recollir tot el medi amb les cèl·lules THP-1 prèviament cultivat i repartir en els tubs que sigui necessari.
2. Centrifugar els tubs 10 minuts a 1200 rpm, retirar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 10 mL de DMEM+FBS (ajuntant les cèl·lules de tots els tubs de forma que només quedi una suspensió).
3. Comptar les cèl·lules a la cambra Neubauer i realitzar els càlculs necessaris per a saber en quin volum de suspensió tenim les cèl·lules desitjades (3x10⁵ cèl·lules/mL) i quants mL de medi inflamatori podem produir.
4. Sembrar el volum de suspensió calculat en 3 mL/cm² de DEMEM+FBS amb 200 nM de forbol-12-miristat-13-acetat (PMA) i incubar durant 4 dies.

NOTA: Durant aquests 4 dies, la línia cel·lular es diferenciarà a macròfags que s'adheriran a la superfície de cultiu.

DIA 5

5. Retirar el medi que conte el PMA i netejar les cèl·lules amb DMEM+FBS dos cops.
6. Afegir el mateix volum de DMEM+FBS fresc i incubar 1 dia per a obtenir el medi inflamatori. En paral·lel incubar el mateix volum de DMEM+FBS sense cèl·lules per obtenir el medi control.

DIA 6

7. Recollir el medi inflamatori, filtrar-lo i guardar a -20°C fins al moment d'ús. Fer el mateix amb el medi control.

ASSAIG D'INVASIÓ CEL·LULAR

DIA 1 Recobriment del “transwell” amb extracte de membrana basal Cultrex® (BME). *Volums per a recobrir tots els pous d'una placa de 96 pous.*

1. Diluir una alíquota de 250 µL de 10x *Coating Buffer* (CB) amb 2.35 mL d'H₂O MiliQ-UV per obtenir una solució 1x CB, i mantenir en gel.
2. Diluir una alíquota de 50 µL de 5x BME en la solució CB prèviament preparada, i mantenir en gel.
3. Recobrir els “transwells” afegint 30 µL de la solució de BME preparada en cada pou.
4. Incubar la placa durant una nit en un incubador de cultius cel·lulars.

DIA 2 Sembra de les cèl·lules

Volums per a realitzar la sembra a partir de cèl·lules cultivades en una placa de 6 pous, les quals hauran estat cultivades en medi Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) sense FBS les 24 hores prèvies.

5. Retirar el medi de cultiu de les cèl·lules a les quals es vol fer l'assaig d'invasió i fer un rentat amb PBS.
6. Afegir 500 µL d'Acutasa a cada pou i posar 5 minuts a l'incubador per a que les cèl·lules es desenganxin de la superfície del pou.
7. Afegir 500 µL de medi Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) sense FBS per frenar la digestió de l'Acutasa i passar les suspensions cel·lular a tubs eppendorfs de 1'5 mL.
8. Centrifugar els tubs durant 5 minuts a 1200 rpm, retirar el sobrenedant i resuspendre el pellet amb 1mL de IMDM.
9. Comptar les cèl·lules de cada suspensió utilitzant la cambra Neubauer. Per comptar fer una mescla amb 10 µL de la suspensió cel·lular i 10 µL de blau tripa, per duplicat.
10. Les cèl·lules es sembraran en el transwell a una densitat de 1×10^5 cèl·lules/pou en un volum de 100 µL, fer els càlculs necessaris per a obtenir 10 mL de suspensió cel·lular amb una densitat de 1×10^6 cèl·lules/mL.
11. Sembrar 100 µL de la suspensió corresponent en cada pou del “transwell” segons els disseny de la placa. La sembra es realitza de la mateixa manera en pous amb BME i sense.
12. Emplenar els pous de la placa receptora amb 100 µL de DMEM control o bé medi inflamatori segons el disseny de la placa.
13. Introduir el “transwell” en la placa receptora, en compte de que no quedi cap bombolla, i incubar durant 24 hores en un incubador a 37°C i 5% de CO₂.

DIA 3 Detecció cel·lular amb assaig d'hexosaminidasa (HEXasa)

Volums per a realitzar l'assaig d'HEXasa en tots els pous d'una placa de 96 pous.

14. Diluir una alíquota d'1 mL de Solució de Dissociació Cel·lular (CDS) 10x amb 9 mL d'H₂O MiliQ-UV, per obtenir la solució de treball 1x CDS.
15. Retirar el "transwell" de la placa sembrada el dia anterior, abocar el medi que quedi dintre dels pous del "transwell" sobre paper absorbent i guardar el "transwell" en una nova placa receptora.
16. Retirar el medi de la placa receptora i netejar amb 200 µL de PBS.
17. Emplenar cada pou amb 100 µL de la solució 1x CDS, introduir novament el "transwell" i deixar incubar durant 30 minuts a l'incubador de cultius cel·lulars.
18. Picar suaument pels costats de la placa i tornar a incubar durant 30 minuts més.
19. Retirar el "transwell", afegir 100 µL de substrat HEXasa 2x en cada pou i incubar durant 4 hores en l'incubador de cultius cel·lulars.
20. Per acabar, afegir 160 µL de revelador HEXasa 2x a cada pou i mesurar l'absorbància a 410 nm.

AÏLLAMENT I QUANTIFICACIÓ DE L'RNA D'UN CULTIU CEL·LULAR

Per a lisar les cèl·lules i aïllar l'RNA s'utilitzarà el kit GenElute™ Mammalian Total RNA Kit de Sigma-Aldrich.

Per a eliminar el DNA contaminant s'utilitzarà el kit DNA-free™ Kit d'Ambion.

A Lisat cel·lular

1. Per a preparar la solució de lisi afegir 10 µL de 2-mercaptoethanol per cada mil·lilitre de Solució de Lisi del kit, preparar la quantitat necessària segons els cultius que volem lisar.
2. Retirar el medi de cultiu de les cèl·lules i netejar un cop amb PBS.
3. Afegir la solució de lisi a les cèl·lules i deixar reposar uns minuts a temperatura ambient.
4. Pipetejar el lisat cel·lular (consistència viscosa) fins que tingui una consistència més líquida i posar en un tub eppendorf.

En aquest punt els lisats es poden guardar a -20°C o a -80°C en cas que en vulgui continuar un altre dia.

B Aïllament de l'RNA

5. Afegir el lisat en una columna *GenElute Filtration Column* (tub de 2 mL amb un insert de color blau) i centrifugar a màxima velocitat 2 minuts.

Descartar la columna de filtrat i quedar-se amb el tub.

6. Afegir un volum igual al de lisat prèviament filtrat d'etanol 70% al tub i pipetejar fins que quedi completament mesclat.
7. Agafar amb la pipeta 700 µL de la mescla feta en l'apartat 6, posar-lo en la columna *GenElute Binding Column* (tub de 2 mL amb un insert transparent que té un anell vermell) i centrifugar a màxima velocitat 15 segons.

Descartar el líquid filtrat i quedar-se amb el tub i la columna.

8. Afegir 500 µL de la solució de rentat 1 (*Wash Solution 1*) a la columna i centrifugar a màxima velocitat 15 segons.

Descartat el tub amb el líquid filtrat i quedar-se amb la columna.

9. Posar la columna en un tub nou de 2 mL, afegir 500 µL de la solució de rentat 2 (*Wash Solution 2*) i centrifugar a màxima velocitat 15 segons.

Descartar el líquid filtrat i quedar-se amb el tub i la columna.

10. Afegir 500 µL de solució de rentat 2 a la columna i centrifugar 2 minuts.

Descartar el tub amb el líquid filtrat i quedar-se amb la columna.

11. Posar la columna en un tub nou de 2 mL, afegir 50 µL de solució d'elució (*Elution Solution*) i centrifugar a màxima velocitat 1 minut.

En aquest punt l'RNA es pot guardar a -20°C o a -80°C en cas que en vulgui continuar un altre dia.

C Eliminació de DNA contaminant

12. Afegir un volum 1:9 del Buffer DNase I 10x i 1 μ L de rDNase I a la preparació de RNA, i pipetejar per a que es mescli bé.
13. Incubar a 37°C durant 20-30 minuts.
14. Afegir 2 μ L de DNase Inactivation Reagent i pipetejar per a que es mescli bé.
15. Incubar 2 minuts a temperatura ambient.
16. Centrifugar a màxima velocitat durant 1 minut i mig.
17. Transferir el sobrenedant (que conté el RNA) en un tub nou.

D Quantificació RNA

Per a mesurar la quantitat de RNA obtingut de cada mostra utilitzar l'aparell Nanodrop.

ANNEX 2. Planificació de l'experiment central

Tal com s'ha explicat en la Figura 5 del treball, per tal d'homogeneïtzar els resultats les diferents poblacions estudiades es van anar sembrant en setmanes consecutives. Per tan cada setmana s'afegia un cultiu a la col·lecció fins al dia final de l'experiment que comptàvem amb 7 plaques de 6 pous les quals tenien 2 pous amb cèl·lules en tractament continu amb medi inflamatori i 2 pous amb tractament de 24 hores posteriorment revertit. La finalitat d'aquest annex és ajudar a entendre el disseny de l'experiment central d'aquest projecte.

Taula I. *Diari de l'experiment central NG1.*

14/01/19	Sembra cèl·lules per observar a dia 29 de tractament. PLACA NG1-29d
15/01/19	Tractament de les cèl·lules de la placa NG1-29d amb medi inflamatori.
16/01/19	Reversió del tractament en els pous TPRa i TPRb de la placa NG1-29d.
18/01/19	Canvi de medi (corresponent) de tots els pous de la placa NG1-29d.
21/01/19	Semrar cèl·lules per observar a dia 22 de tractament. PLACA NG1-22d Ressembra de la placa NG1-29d a una densitat de $1 \cdot 10^5 \text{ cel/cm}^2$ amb el medi corresponent per a cada variable.
22/01/19	Tractament de les cèl·lules de la placa NG1-22d amb medi inflamatori.
23/01/19	Canvi de medi (corresponent) de tots els pous de la placa NG1-29d. Reversió del tractament en els pous TPRa i TPRb de la placa NG1-22d.
25/01/19	Canvi del medi corresponent a la variable a tots els pous de les plaques NG1-29d i NG1-22d
28/01/19	Sembra cèl·lules per observar a dia 15 de tractament. PLACA NG1-15d Ressembra de la placa NG1-22d a una densitat de $1 \cdot 10^5 \text{ cel/cm}^2$ amb el medi corresponent per a cada variable.
29/01/19	Resembra de la placa NG1-29d a una densitat de $1 \cdot 10^5 \text{ cel/cm}^2$ amb el medi corresponent per a cada variable. Tractament de les cèl·lules de la placa NG1-15d amb medi inflamatori.
30/01/19	Canvi de medi (corresponent) a tots els pous de la placa NG1-22d. Reversió del tractament en els pous TPRa i TPRb de la placa NG1-15d.
01/02/19	Canvi de medi corresponent a la variable a tots els pous de les plaques NG1-29d, NG1-22d i NG1-15d.
04/02/19	Sembra cèl·lules per observar a dia 8 de tractament. PLACA NG1-8d Resembra de la placa NG1-22d i NG1-15d a una densitat de $1 \cdot 10^5 \text{ cel/cm}^2$ amb el medi corresponent per a cada variable.
05/02/19	Resembra de la placa NG1-29d a una densitat de $1 \cdot 10^5 \text{ cel/cm}^2$ amb el medi corresponent per a cada variable. Tractament de les cèl·lules de la placa NG1-8d amb medi inflamatori.
06/02/19	Reversió del tractament en els pous TPRa i TPRb de la placa NG1-8d. Canvi del medi corresponent a la variable a tots els pous de les plaques NG1-22d i NG1-15d.
08/02/19	Canvi del medi corresponent a la variable a tots els pous de les plaques NG1-29d, NG1-22d, NG1-15d i NG1-8d.
11/02/19	Sembra cèl·lules per observar a dia 1 de tractament. PLACA NG1-1d Ressembra de les plaques NG1-22d i NG1-15d a una densitat de $1 \cdot 10^5 \text{ cel/cm}^2$ amb el medi corresponent per a cada variable.
12/02/19	Ressembra de les plaques NG1-29d i NG1-8d a una densitat de $1 \cdot 10^5 \text{ cel/cm}^2$ amb el medi corresponent per a cada variable. Tractament de les cèl·lules de la placa NG1-1d amb medi inflamatori.
13/02/19	Canvi del medi corresponent a la variable a tots els pous de les plaques NG1-22d i NG1-15d. Reversió del tractament en els pous TPRa i TPRb de la placa NG1-1d.
15/02/19	Canvi del medi corresponent a la variable a tots els pous de les plaques NG1-29d, NG1-22d, NG1-15d, NG1-8d i NG1-1d.
18/02/19	Canvi de nom de les plaques degut a que l'experiment s'allargarà dues setmanes més.
14/01/19	NG1-29d NG1-43d
21/01/19	NG1-22d NG1-36d
28/01/19	NG1-15d NG1-29d
04/02/19	NG1-8d NG1-22d
11/02/19	NG1-1d NG1-15d
18/02/19	NG1-8d
25/02/19	NG1-1d

	Sembra cèl·lules per observar a dia 8 de tractament. PLACA NG1-8d Ressembra de les plaques NG1-15d i NG1-22d.
19/02/19	Ressembra de les plaques NG1-29d, NG1-36d i NG1-43d. Tractament de les cèl·lules de la placa NG1-8d amb medi inflamatori.
20/02/19	Reversió del tractament en els pous TPRa i TPRb de la placa NG1-8d. Canvi del medi corresponent a la variable a tots els pous de les plaques NG1-15d i NG1-22d.
22/02/19	Canvi del medi corresponent a la variable a tots els pous de les plaques NG1-43d, NG1-36d, NG1-29d, NG1-22d, NG1-15d i NG1-8d.
25/02/19	Canvi del medi corresponent a la variable a tots els pous de les plaques NG1-43d, NG1-36d, NG1-29d, NG1-22d, NG1-15d i NG1-8d.
26/02/19	FINAL EXPERIMENT Sembra de plaques per a assaig d'invasió, assaig de proliferació i assaig d'ARN.

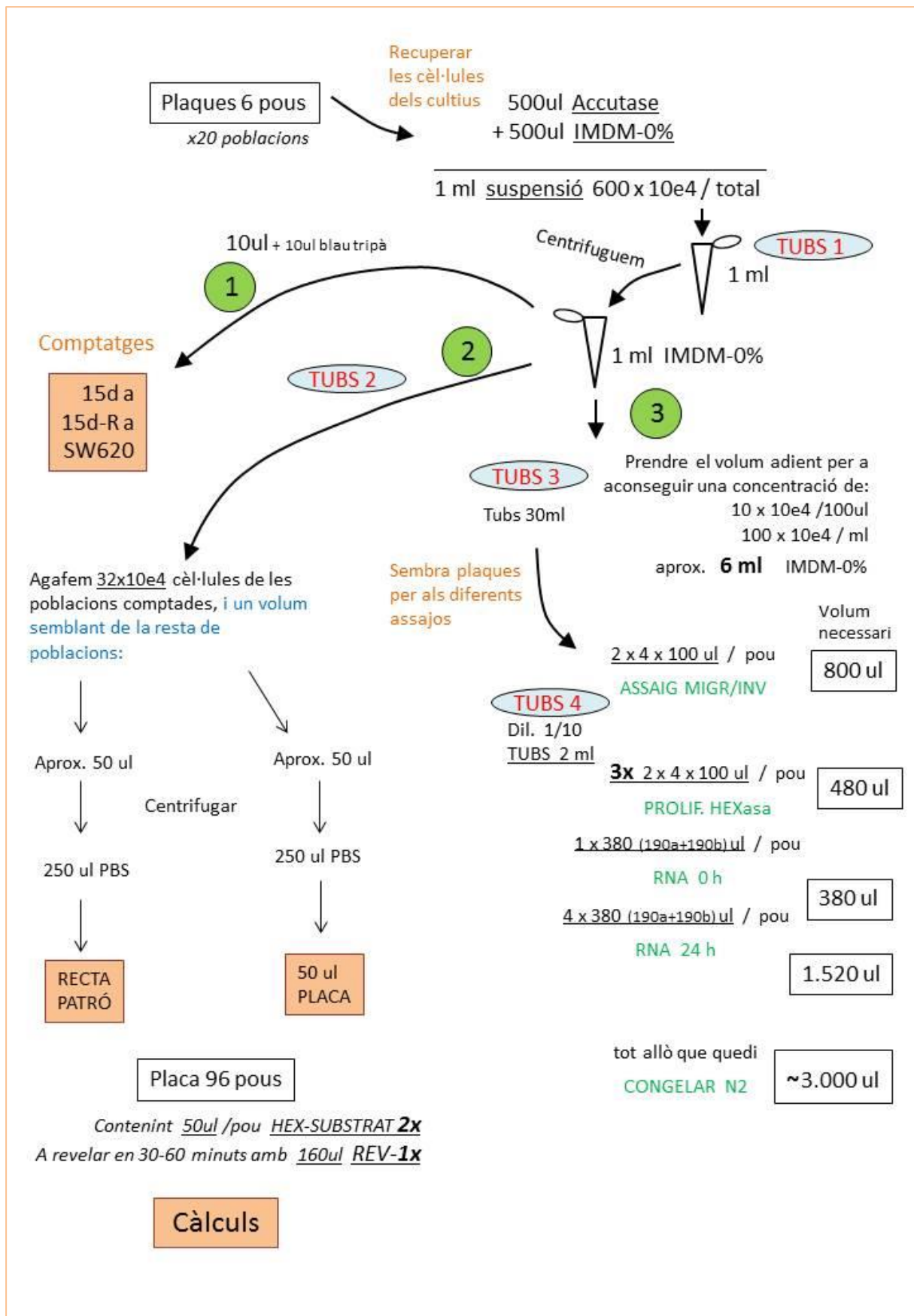
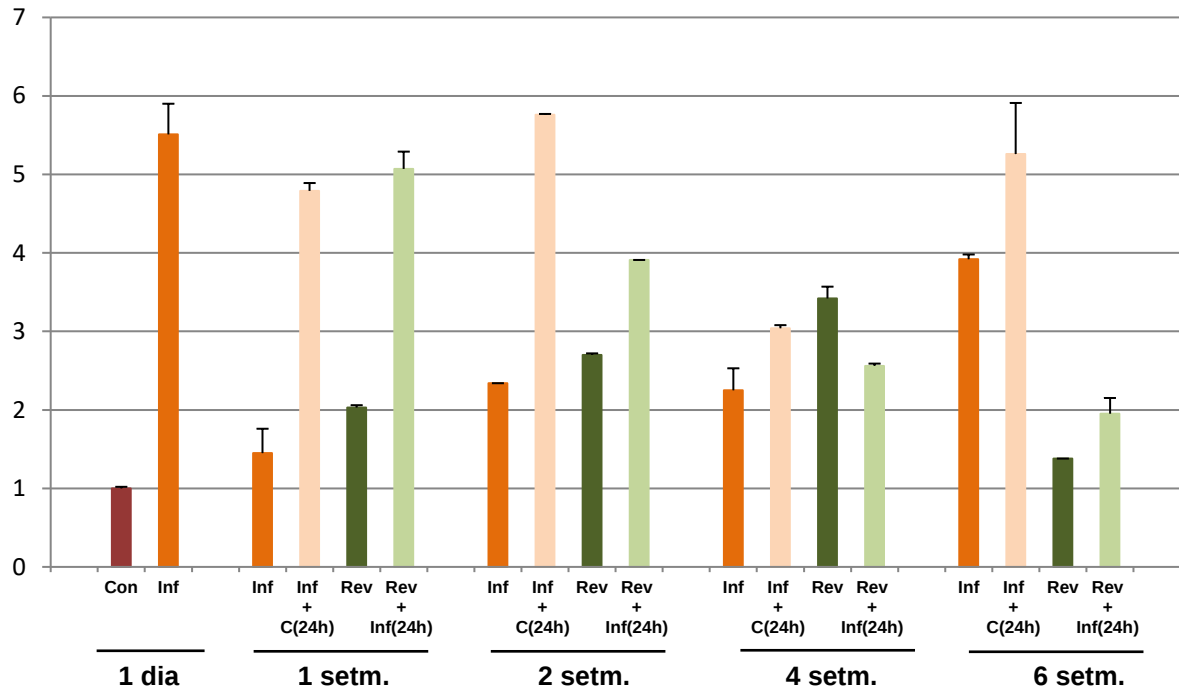


Figura I. Esquema del protocol seguit el dia que finalitzaven els cultius per tal de realitzar el mostratge.

ANNEX 3. Anàlisi de l'expressió dels gens ZEB1 i SNAI2

A. SNAI2



B. ZEB1

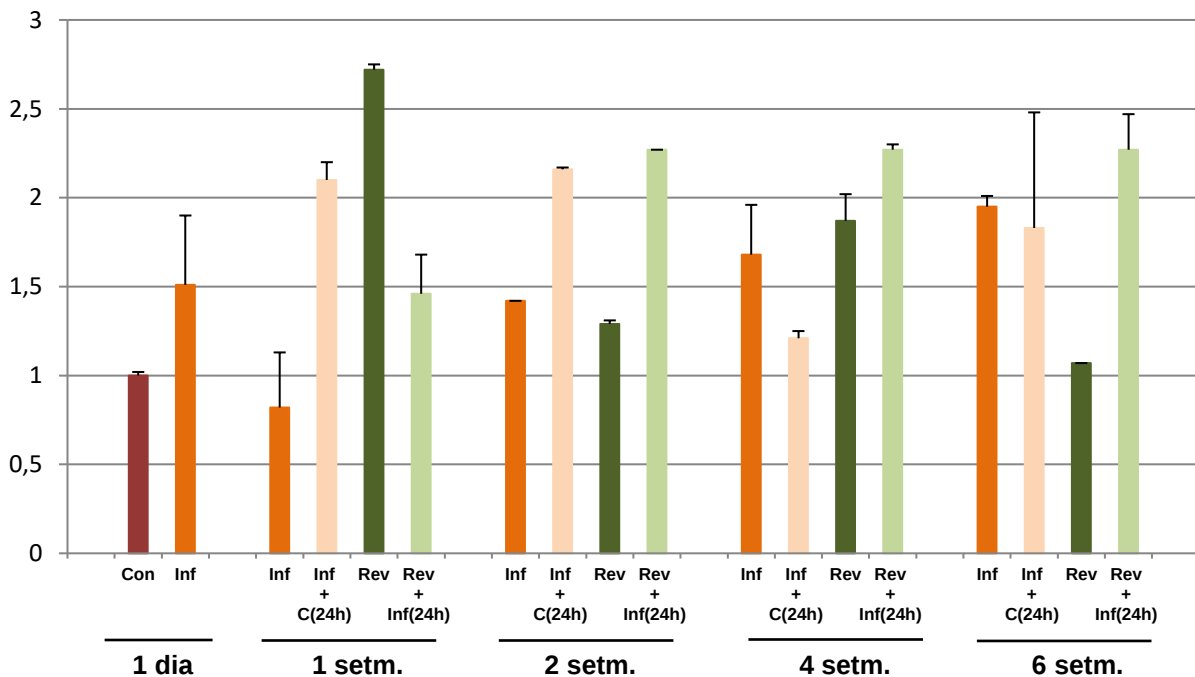
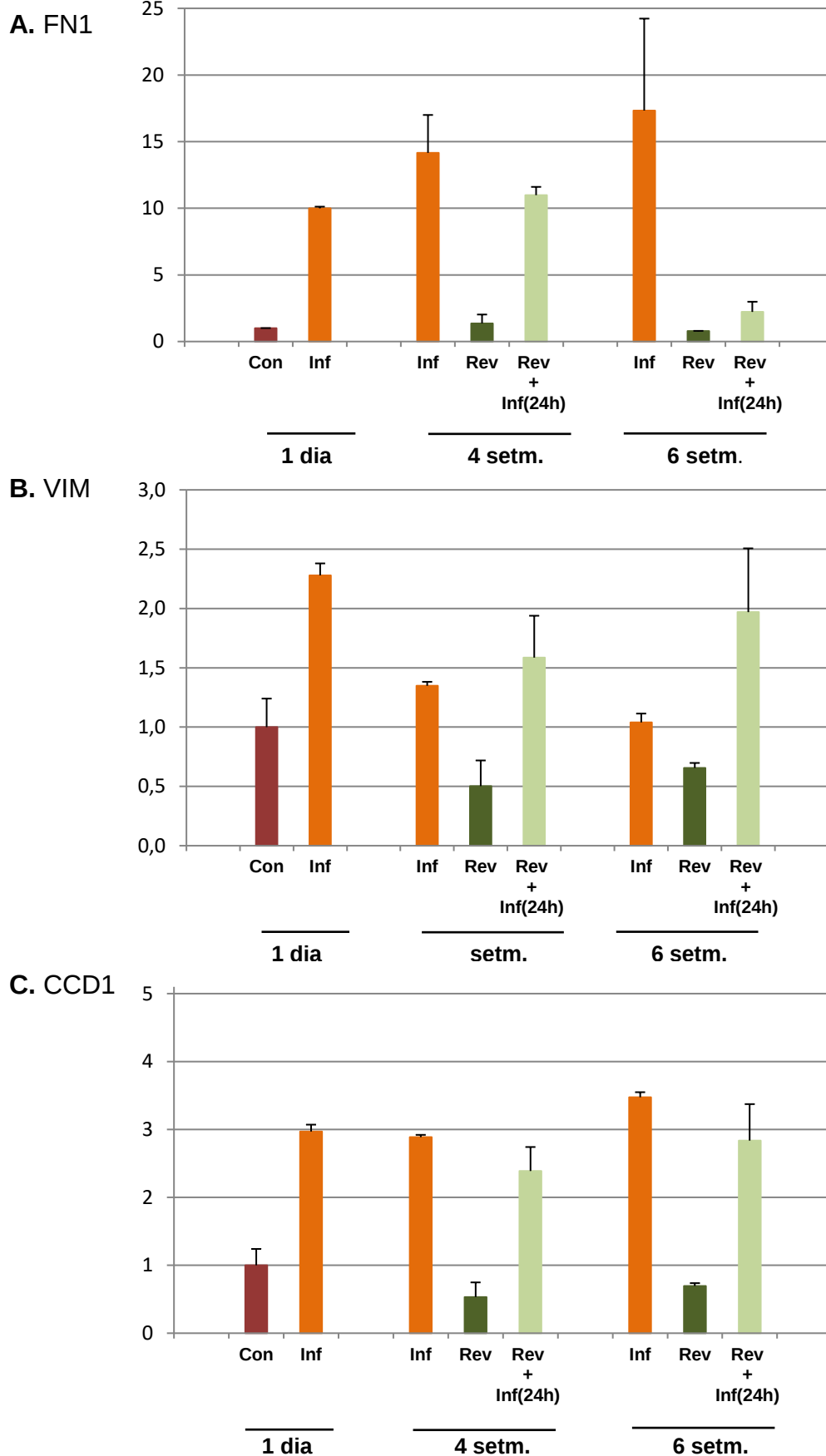


Figura II. Anàlisi de l'expressió gènica. L'RNA analitzat va ser aïllat dels cultius a partir dels quals es va sembrar les plaques de l'assaig d'invasió i migració, per tan després de les diferents setmanes de tractament les cèl·lules van ser ressemmbrades en els següents medis: medi control (Con, Inf + C(24h) i Rev) o bé medi inflamatori (Inf i Rev + (24h),) i passades 24 hores es va extreure el RNA. L'eix d'ordenades mostra la inducció relativa de cada mRNA respecte al mRNA de les cèl·lules SW620 cultivades amb medi control (Con). Els resultats mostrats són la mitjana de dos cultius amb les mateixes condicions dut a terme en paral·lel $\pm$ la desviació promig.

ANNEX 4. Gràfics anàlisi de l'expressió gènica no inclosos

Els gràfics que és mostren a continuació estan elaborats amb els resultats de l'anàlisi de RNA de mostres extretes durant la segona repetició de l'experiment. No s'han inclòs en el treball ja que alguns dels gens no mostren la tendència que observem en els gràfics obtinguts a partir de l'experiment central d'una forma tan clara.



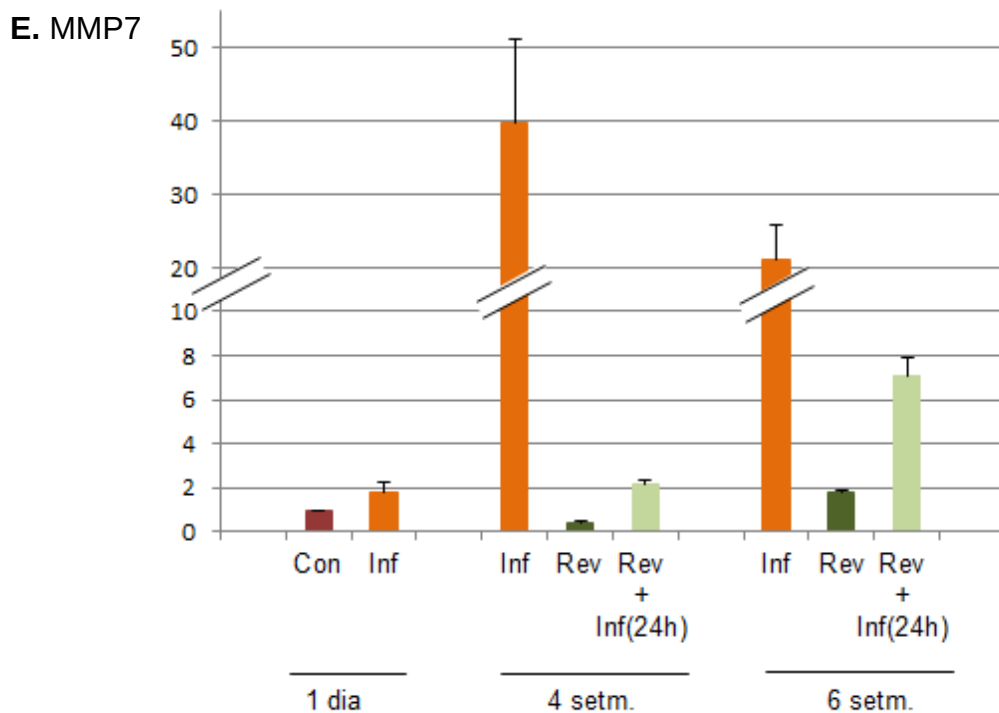
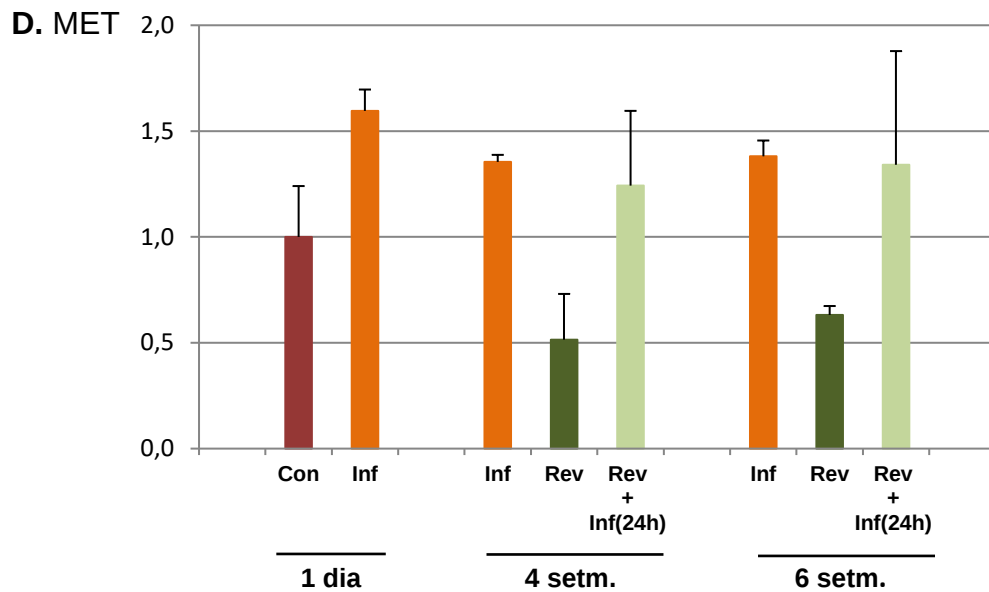


Figura III. Anàlisi de l'expressió gènica. L'RNA analitzat va ser aïllat dels cultius a partir dels quals es va sembrar les plaques de l'assaig d'invasió i migració, per tan després de les diferents setmanes de tractament les cèl·lules van ser ressemerades en els següents medis: medi control (**Con**, **Rev**) o bé medi inflamatori (**Inf** i **Rev + (24h)**), i passades 24 hores es va extreure el RNA. L'eix d'ordenades mostra la inducció relativa de cada mRNA respecte al mRNA de les cèl·lules SW620 cultivades amb medi control (**Con**). Els resultats mostrats són la mitjana de dos cultius amb les mateixes condicions dut a terme en paral·lel $\pm$ la desviació promig.