

**CARACTERITZACIÓ DEL PAPER FUNCIONAL DE PLA2G12A
EN MODELS *IN VITRO* DE CÀNCER DE CÒLON**

TREBALL FINAL DE GRAU EN BIOTECNOLOGIA

Doble Grau en Biotecnologia i Bioquímica i Biologia Molecular

Núria Serrano i Ribes

En col·laboració amb l'Institut de Recerca Biomèdica de Lleida

Fundació Dr. Pifarré

Tutora acadèmica: Dra. Maria Teresa Blay Olivé - mteresa.blay@urv.cat

Supervisora: Dra. Eva Parisi Capdevila - eparisi@irbllleida.cat

Tarragona, Juny 2023

Jo, Núria Serrano Ribes, amb DNI 78098224E, sóc coneixedora de la guia de prevenció del plagi a la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 7 de Juny de 2023

AGRAÏMENTS

M'agradaria començar aquesta memòria donant les gràcies a totes aquelles persones que, d'alguna manera, han fet possible la realització d'aquest treball i, sobretot, a aquelles que m'han acompanyat al llarg del camí que m'ha portat fins aquí.

Primerament, agrair al Grup de Recerca de Biomarcadors en Càncer (GReBiC) per la seva confiança a l'hora de realitzar les pràctiques i el treball de final de grau, especialment a l'Iván Hidalgo, per la seva paciència i bones pràctiques, i a la Dra. Eva Parisi, que m'ha guiat al llarg de tot el procés. També a la resta del grup, que m'han fet sentir com a casa en tot moment.

Agraeixo també a la meva tutora, la Dra. M. Teresa Blay, que m'ha donat un cop de mà quan l'he necessitat.

Finalment, donar les gràcies a la meva família pel seu suport incondicional en cada pas d'aquest viatge que just acaba de començar.

Aquest treball no hagués estat possible sense cap de vosaltres. Moltes gràcies a tots.

ÍNDIX

INSTITUT DE RECERCA BIOMÈDICA DE LLEIDA	4
ABSTRACT	5
ÍNDIX D'ABREVIATURES	6
1. INTRODUCCIÓ	7
2. HIPÒTESI I OBJECTIU	13
3. METODOLOGIA	14
3.1. Cultius cel·lulars i transfecció	14
3.2. Assaig de proliferació	15
3.3. Assaig en <i>Soft Agar</i>	15
3.4. Assaig <i>Transwell</i>	15
3.5. Assaig <i>Wound Healing</i>	16
3.6. Anàlisi estadística	17
4. RESULTATS	18
4.1. Avaluació de la taxa de proliferació cel·lular	18
4.2. Avaluació de la capacitat de formació de colònies	18
4.3. Avaluació de la capacitat d'invasió	19
4.4. Avaluació de la capacitat i velocitat de migració	20
5. DISCUSSIÓ	22
6. CONCLUSIÓ	25
7. BIBLIOGRAFIA	26
ANNEX	29
Figures suplementàries	29
Taules suplementàries	29
AUTOAVALUACIÓ	30

INSTITUT DE RECERCA BIOMÈDICA DE LLEIDA

Aquest projecte s'ha desenvolupat a partir de les dades obtingudes durant l'estada de pràctiques a l'Institut de Recerca Biomèdica de Lleida Fundació Dr. Pifarré (IRBLleida) situat a l'Avinguda Alcalde Rovira Roure, 80 de Lleida, que inclou, entre altres, grups de recerca de les facultats de Medicina i Infermeria i Fisioteràpia de la Universitat de Lleida (UdL). Un centre que, fundat l'any 2004, cobreix una cadena de recerca traslacional, des de la recerca bàsica, dirigida a entendre els mecanismes fisiològics i patològics del cos humà, fins a la recerca que estudia el comportament de les malalties en grans grups de població.

Concretament, he estat sota la supervisió de la Dra. Eva Parisi (investigadora postdoctoral) i de l'Iván Hidalgo (estudiant de doctorat) que formen part del Grup de Recerca de Biomarcadors en Càncer (GReBiC), un grup de recerca traslacional, multidisciplinari i jove que se centra en tres grans línies de recerca relacionades amb el càncer: tumors digestius, càncer de mama i embassament pleural. Treballen amb enfocaments de recerca bàsica i traslacional per a respondre als grans reptes que plantegen aquestes patologies, que són: oferir marcadors per al diagnòstic, estratificar el risc de recurrència o metàstasi i predir la bona resposta terapèutica als diferents tractaments.

ABSTRACT

Being the second leading cause of death among neoplasms, primarily due to metastasis, colon cancer has been extensively described during the past decades. However, refinement of evaluation methods for tumour recurrence risk through identification of novel biomarkers is still essential. After an early screening in an *in vivo* colorectal cancer model in *Drosophila melanogaster*, followed by a validation in two independent human cohorts, the phospholipase A2 group XIIA, PLA2G12A, has arisen as a new hope in this regard despite its poor characterisation. In this study, the *PLA2G12A* gene has been overexpressed in three human colon cell lines (HCT116, HT29 and SW480) to perform several assays in order to assess its role in proliferation, colony formation, invasion and migration. Regardless of higher *PLA2G12A* levels, HCT116 cells yet show higher proliferation rates, probably attributable to its genetic background. Otherwise, both HCT116 and HT29 lines display a lightly reduced invasiveness, which is significant in SW480 cells (p-value = 0.0423). In conclusion, as a tumour suppressor, PLA2G12A is involved in tumoral progression, predominantly preventing cell dissemination. Consequently, PLA2G12A can be considered a promising prognostic biomarker in early-stage colon cancer.

Key words: Colon cancer, biomarker, tumour recurrence, PLA2G12A.

ÍNDEX D'ABREVIATURES

ADN	Àcid desoxiribonucleic	MEK	<i>Mitogen-Activated Erk-Regulating Kinase</i>
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>	MLH1	<i>Mutl Homolog 1</i>
ARN	Àcid ribonucleic	MMR	Reparació de Malaparellaments
BAX	<i>Bcl2 Associated X</i>	MSH2	<i>Muts Homolog 2</i>
CDC4	<i>Cell Division Control Protein 4</i>	MSI	Inestabilitat de Microsatèl·lits
CIMP	Fenotip de Metilació de les Illes CpG	OS	<i>Overall Survival</i>
CIN	Inestabilitat Cromosòmica	PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	P/E	Penicil·lina/Estreptomicina
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>	PFS	<i>Progression-Free Survival</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>	PLA₂	<i>Phospholipase A2</i>
FAP	Poliposis Adenomatosa Familiar	PLA2G12A	<i>Phospholipase A2 Group XIIA</i>
FBS	Sèrum Fetal Boví	RTK	Receptor Tirosina Quinasa
GF	Factor de Creixement	SMAD4	<i>Smad Family Member 4</i>
HDI	Índex de Desenvolupament Humà	sPLA₂	<i>Secreted Phospholipase A2</i>
HNPCC	Càncer de Còlon Hereditari No Polipós	TGFBR2	<i>Transforming Growth Factor Beta Receptor 2</i>
IGF2R	<i>Insulin Like Growth Factor 2 Receptor</i>	TF	Factor de Transcripció
LOH	Pèrdua De l'Heterozigosi	TP53	<i>Tumor Protein P53</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase 1</i>		

1. INTRODUCCIÓ

El càncer és la segona causa de mort a nivell mundial, sumant fins a un 18% de les defuncions l'any 2019. Dins dels més freqüents, el càncer colorectal és el tercer més diagnosticat i s'estima que, el 2020, va ser la causa de mort de fins a 935,000 persones (Figura 1).

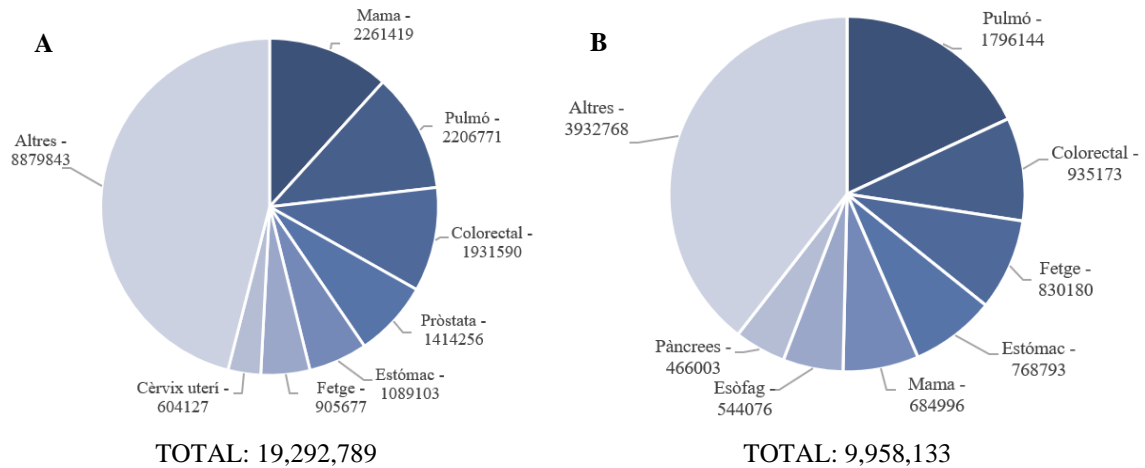


Figura 1. Nombre estimat (A) de nous casos i (B) de morts a nivell mundial, tenint en compte totes les edats i sexes l'any 2020 (Cancer Today, n.d.).

Un dels fets més preocupants però, és el ràpid increment en la seva incidència i mortalitat, donat que s'espera un augment del 60-70% en ambdós paràmetres per al 2040 (Cancer Today, n.d.). Ara bé, ha estat demostrat que el càncer de còlon mostra una ampla variació a nivell global, observant-se el major nombre de nous casos diagnosticats en aquells països amb un índex de desenvolupament humà o HDI, per les seves sigles en anglès, mitjà-alt (Sawicki et al., 2021) (Figura 2).

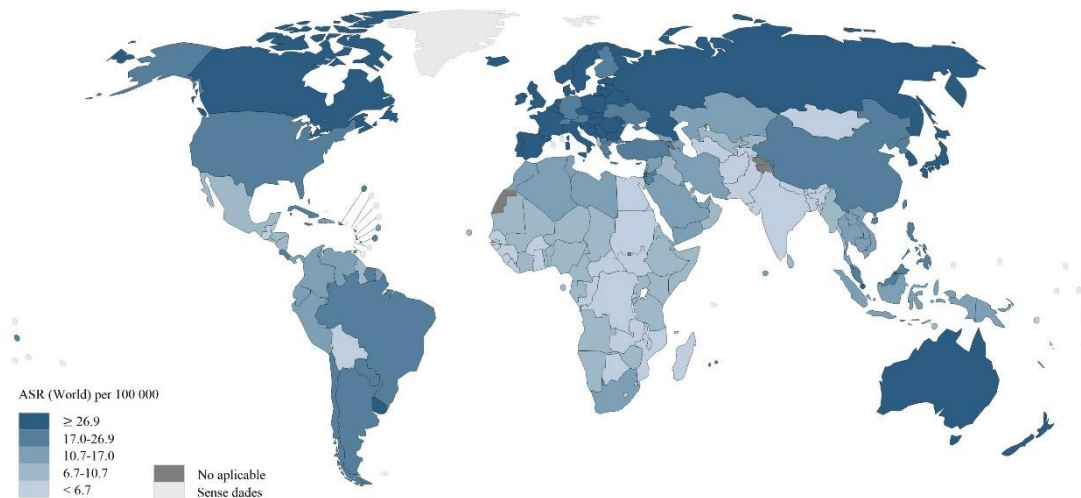


Figura 2. Índex d'incidència global estimat per càncer de còlon, tenint en compte totes les edats i sexes l'any 2020 (Cancer Today, n.d.).

La característica que comparteixen tots aquests països, a més de l'augment de l'esperança de vida, és l'adopció de l'anomenat estil de vida occidental que concentra molts d'aquells hàbits assenyalats com a factors de risc quant al desenvolupament de càncer de còlon: sedentarisme, sobrepès i obesitat, consum d'alcohol i tabac, a més de patrons alimentaris inapropiats (dietes baixes en fibra, fruita, verdura i productes làctics i alta en carn roja i processada) (Murphy et al., 2019; Sawicki et al., 2021).

D'altra banda, cal tenir en compte altres malalties que també augmenten el seu risc d'incidència, com malalties intestinals inflamatòries o diabetis miellitus, així com la història familiar de cada individu i la seva predisposició genètica, atribuint-se un 2-8% dels casos a síndromes hereditàries (Sawicki et al., 2021). D'entre aquests els dos més comuns, ambdós d'herència autosòmica dominant, són el càncer de còlon hereditari no polipós (HNPCC), també conegut com a síndrome de Lynch, i la poliposis adenomatosa familiar (FAP). El primer es caracteritza per mutacions en gens encarregats de la reparació de malaparellaments o *mismatches* (MMR) en el ADN, en la majoria dels casos *MLH1* i *MSH2*. En el segon, en canvi, els individus presenten defectes en el gen *APC* (*adenomatous polyposis coli*), un supressor de tumors que codifica per una proteïna amb una funció rellevant en la replicació del ADN, la divisió cel·lular o l'apoptosi, entre altres (Valle et al., 2019). De fet, en més d'un 80% dels casos, és una mutació en aquest gen *APC* la que dona inici a la formació del càncer colorectal, és a dir, que propicia la transformació de l'epiteli normal a un adenoma benigne que, atès a una acumulació de diverses aberracions genètiques i epigenètiques, acabarà progressant fins a un carcinoma amb capacitat invasiva i metastàtica (Malki et al., 2020).

Ja l'any 1990, Fearon i Vogelstein van proposar un model molecular que descriu la seqüència mutacional d'aquest tipus de càncer (*Figura 3*) i que senyala el silenciament de l'*APC* com a pas inicial i essencial, seguit de l'aparició de mutacions oncogèniques en *KRAS*, principalment. A partir d'aquest punt, la seqüència diferirà segons el fenotip molecular que prengui el tumor: inestabilitat cromosòmica (CIN), inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) i metilació de les illes CpG (CIMP). La majoria dels càncers de còlon esporàdics (~85%) presenta el fenotip CIN, amb canvis en el nombre i/o l'estructura dels cromosomes; mentre la resta mostren una alta freqüència d'errors en la replicació per part de la ADN polimerasa, sobretot en seqüències repetitives del ADN, errors que acaben derivant en MSI (Malki et al., 2020; Nguyen & Duong, 2018).

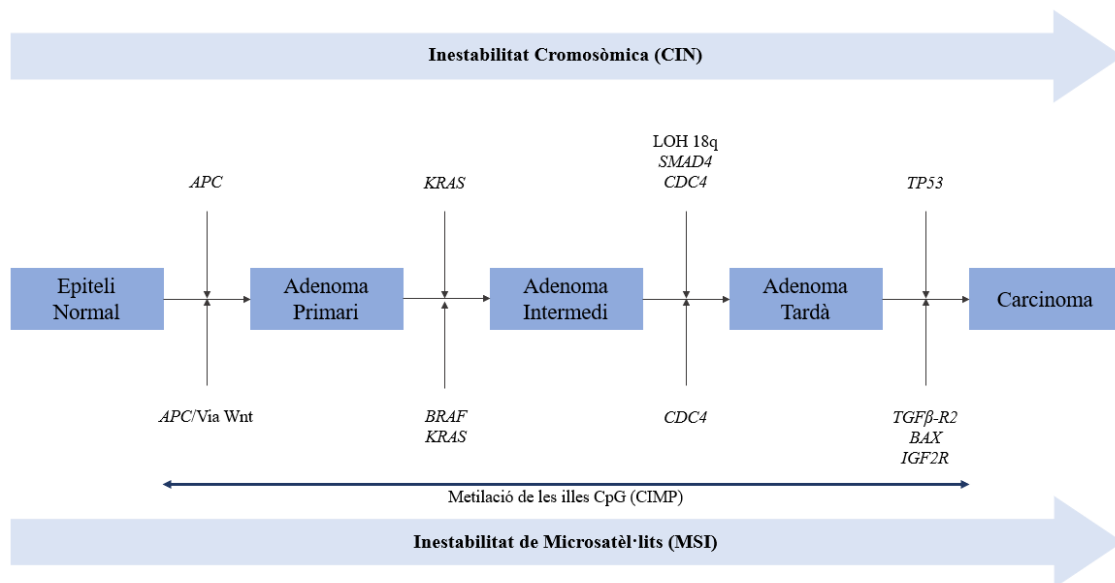


Figura 3. Seqüència mutacional del càncer colorectal segons el fenotip molecular. A diferència dels fenotips CIN i MSI, el CIMP no és exclouent sinó que es pot donar al mateix temps que qualsevol dels dos anteriors. LOH, pèrdua de l'heterozigosi (Nguyen & Duong, 2018).

Ara bé, per entendre la importància dels gens *APC* i *KRAS/BRAF* en el context del desenvolupament del càncer de còlon és necessari conèixer el seu paper dins de les funcions cel·lulars.

Per una banda, cal destacar la via Wnt/ β -catenina (Figura 4.A), que manté les cèl·lules mare indiferenciades en la base de les criptes del còlon i permet la supervivència tant de les cèl·lules normals com de les cèl·lules mare del càncer. En el seu fenotip silvestre, la proteïna *APC* controla negativament aquesta via, regulant la fosforilació del factor de transcripció β -catenina i, conseqüentment, la seva degradació per part del proteasoma. El silenciament d'aquest gen resulta en l'estabilització perllongada de la β -catenina, que acabarà migrant al nucli on promourà, juntament amb altres factors de transcripció, l'expressió de certs gens involucrats en la proliferació, diferenciació i migració (Zhang & Wang, 2020).

Per l'altra, cal esmentar també la via EGFR/RAS/RAF (Figura 4.B), també coneguda com a via MAPK, encarregada de regular funcions com la proliferació, supervivència, diferenciació, angiogènesi o migració. L'activació d'aquesta via té lloc mitjançant la unió d'un lligand a un receptor tirosina quinasa (RTK) que desencadena diverses cascades intracel·lulars com la RAS/RAF/MEK/ERK, regulant ERK la transcripció de gens en el nucli. Lògicament, qualsevol alteració que porti a l'activació constitutiva de qualsevol dels elements de la via, es traduirà en l'activació constitutiva de la pròpia via.

Els casos més comuns són mutacions puntuals del gen *BRAF* (la variant majoritària de *RAF*) i del gen *RAS*, sent *KRAS*, *NRAS* i *HRAS* les seves tres variants oncogèniques. De fet, mutacions en els gens *BRAF* i *RAS*, sovint esdevenint la variant *KRAS*, es troben freqüentment en el càncer colorectal (*Pathway of the Day: RAS/RAF/MEK/ERK / ESMO*, n.d.).

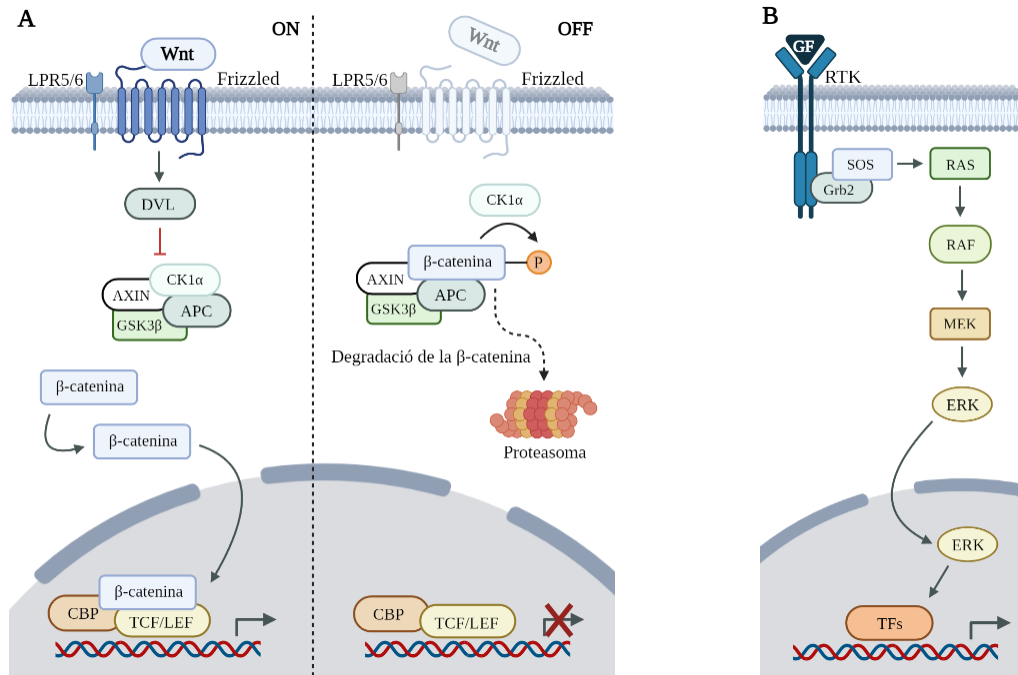


Figura 4. Representació esquemàtica de la via Wnt (A) i de la via EGFR/RAS/RAF (B). GF, factor de creixement; RTK, receptor tirosina quinasa; TFs, factors de transcripció.

Així com la seqüència mutacional, les diferents etapes del càncer de còlon i les possibles estratègies de tractament es troben ben establertes. Tot i això, cal seguir refinant els mètodes d'avaluació del risc de recurrència que classifiquen els pacients de risc, concretament en estadi II, en baix, mitjà o alt.

Per una banda, aquells categoritzats erròniament com de baix risc no rebrien cap tipus de tractament adjuvant tot i el perill real de desenvolupar metàstasis i, per l'altra, a aquells classificats de manera incorrecta en els grups mitjà i alt se'ls recomanaria un tractament adjuvant, havent de patir les possibles complicacions i efectes secundaris sense necessitat.

Actualment, el risc de recurrència es valora principalment a través sistema de classificació TNM i del nombre de nòduls limfàtics afectats. Addicionalment, per afinar l'avaluació es poden tenir en compte altres característiques clínicopatològiques com el grau histològic o la invasió perineural, entre altres. Quan a marcadors moleculars, l'únic

validat i vertaderament considerat a l'hora de prendre una decisió respecte l'administració de teràpies amb adjuvants en pacients d'estadi II de càncer de còlon és l'estat MSI/MMR (Argilés et al., 2020).

Partint de la premissa que, aproximadament, la meitat de les morts per càncer s'atribueixen a la metàstasi, és doncs necessari seguir ampliant el ventall de biomarcadors de prognosi disponibles que permetin seguir refinant les tècniques d'avaluació actualment emprades per determinar el risc de recurrència.

Estudis recents del Grup de Recerca de Biomarcadors en Càncer (GReBiC) de l'IRBLleida han senyalat la fosfolipasa PLA2G12A com candidata per aquesta tasca, després d'un cribratge en *Drosophila melanogaster* com a model de càncer de còlon i la subsegüent validació en dues cohorts humanes independents. Els primers resultats associen els nivells alts del seu ARNm amb millors PFS (*Progression-Free Survival*) i OS (*Overall Survival*) i indiquen que està implicada en els processos de progressió i proliferació cel·lular.

Altrament, la inhibició de *PLA2G12A in vitro* ha demostrat els seus efectes en el desenvolupament de la metàstasi, principalment disminuint la capacitat d'invasió i de formació de colònies (resultats pendents de publicació).

Les fosfolipases A2 (PLA₂) són una superfamília d'enzims lipolítics que generalment es divideix en sis subfamílies, sent-ne una de les més estudiades les PLA₂ secretades o sPLA₂, la qual inclou la proteïna PLA2G12. En general, hidrolitzen els enllaços èster en la posició *sn-2* dels lípids de membrana alliberant, normalment, àcids grassos poliinsaturats que seran metabolitzats per formar eicosanoides (derivats de l'àcid araquidònic) o altres mediadors lipídics bioactius (Aloulou et al., 2018; Brglez et al., 2014; Peng et al., 2021).

A la majoria d'aquestes isoformes se'ls atribueixen funcions relacionades amb el control del metabolisme lipídic i els mediadors de la inflamació, que dependran de pròpia isoforma i del tipus cel·lular (Aloulou et al., 2018). Aquesta dependència es manté també en el seu paper en la carcinogènesi, ja que per una banda se les ha associat amb l'acceleració de l'apoptosi i la senescència però, per l'altra, també amb el creixement del tumor, per exemple, alterant el micro-ambient o induint un estat inflamatori (Brglez et al., 2014; Peng et al., 2021).

Ara bé, a diferència dels altres membres d'aquesta família, poc es coneix sobre el possible paper biològic de PLA2G12A, més enllà de què *in vitro* mostra una baixa activitat (Rouault et al., 2003) o de la seva possible relació amb certes condicions tant diverses com l'esquizofrènia o l'infart agut de miocardi. Igualment, tampoc s'ha profunditzat en el seu rol en el procés de carcinogènesi ni s'han explorat exhaustivament les seves possibilitats com a biomarcador (de prognosi) (Mounier et al., 2008).

2. HIPÒTESI I OBJECTIU

Tal i com s'ha exposat en l'apartat anterior, l'elevat nombre de morts per metàstasi, que se situa entre un 40 i un 50% en el càncer de còlon, fa imprescindible el fet de seguir estudiant nous elements, com els biomarcadors, que permetin refinar el sistema d'avaluació del risc de recurrència.

Amb aquest propòsit, el projecte s'ha desenvolupat al voltant de la validació de la següent hipòtesi:

El descobriment i caracterització de nous biomarcadors per a la detecció de cèl·lules tumorals amb capacitat invasiva i migratòria, com PLA2G12A, ens permetrà identificar pacients amb tumors de còlon localitzats amb major risc de desenvolupar metàstasis.

El fet de conèixer la funció de l'enzim PLA2G12A és important per a una millor comprensió dels seus efectes tant fisiològics com patològics, és per això que en aquesta investigació l'objectiu principal és:

1. Caracteritzar el paper funcional de PLA2G12A en models *in vitro* de càncer de còlon.

3. METODOLOGIA

3.1. Cultius cel·lulars i transfecció

Les línies cel·lulars humanes de càncer de còlon HCT116, HT29 i SW480 (Figura 5), obtingudes de l'*American Type Culture Collection*, es van cultivar en medi DMEM suplementat amb 10% d'FBS i 1% de penicil·lina/estreptomicina (P/E) en un incubador humidificat a 37°C i 5% de CO₂.

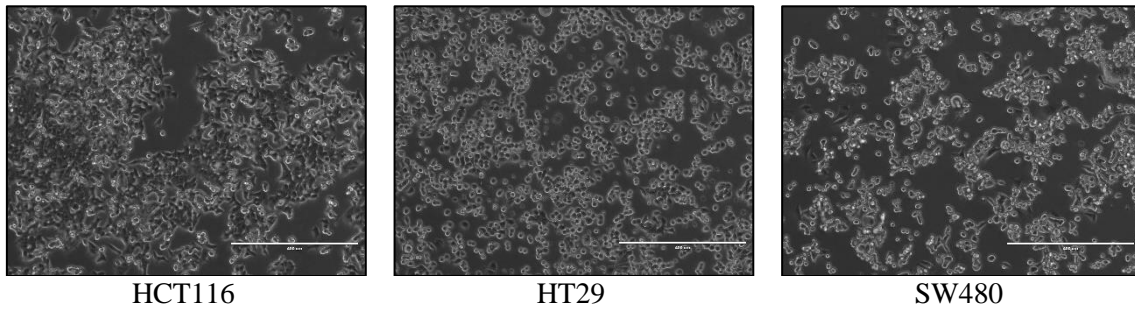


Figura 5. Línies cel·lulars de càncer de còlon. Barra d'escala, 400 µm.

La sobre-expressió de *PLA2G12A* es va aconseguir a través de la transfecció amb el plasmidi RC202955 (OriGene, MD, USA) (Figura Suplementària S1A) mitjançant Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen, CA, USA) i el protocol facilitat per aquesta mateixa companyia. Paral·lelament, aquelles cèl·lules emprades com a grup control van ser transfectades amb el plasmidi PS100010 (Invitrogen, CA, USA) (Figura Suplementària S2B) utilitzant el mateix mètode. Les cèl·lules transfectades van ser testades via RT-qPCR per determinar els nivells d'expressió de *PLA2G12A* (Figura 6).

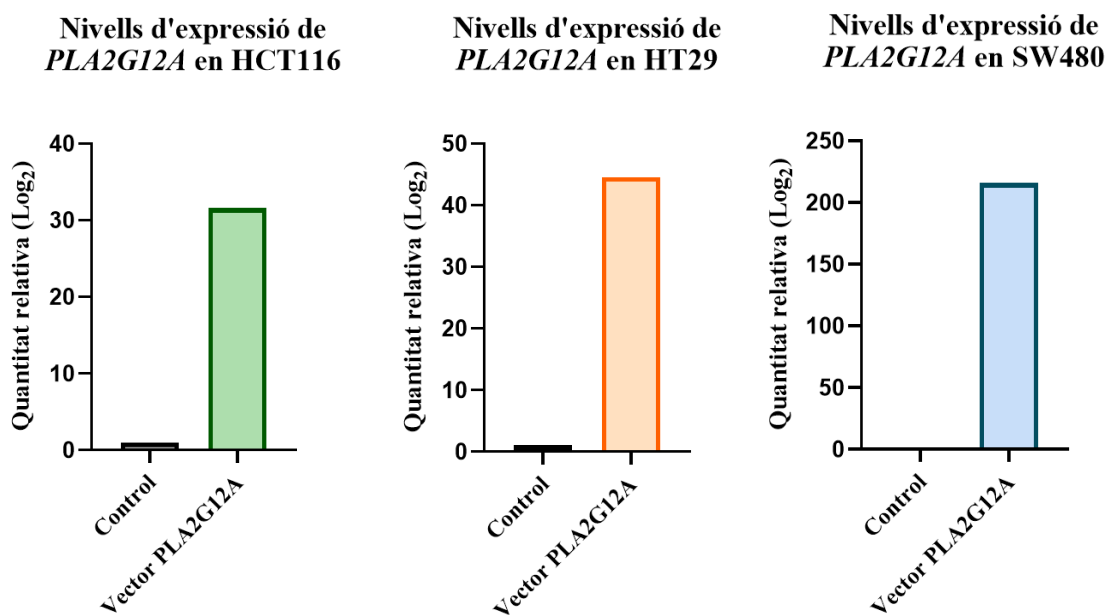


Figura 6. Nivells d'expressió de *PLA2G12A* en les diferents línies cel·lulars un cop transfectades.

Prèviament, ambdós plasmidis van ser amplificats en *E. coli* en un procés de transformació de cèl·lules competents per xoc tèrmic amb la subsegüent selecció amb l'antibiòtic corresponent: kanamicina per al vector RC202955 i ampil·lina per al PS100010. La posterior extracció i purificació dels plasmidis es va realitzar amb E.Z.N.A.® Plasmid DNA mini Kit I (Omega Bio-Tek Inc, GA, USA).

3.2. Assaig de proliferació

Per avaluar la capacitat de proliferació de les diferents línies cel·lulars, es va començar sembrant 6,000 cèl·lules en 1 mL de DMEM suplementat en plaques de 24 pous. A continuació, es va recollir el contingut de diferents pous passades 24, 48 i 72 hores per després procedir al seu comptatge amb la cambra de Neubauer.

3.3. Assaig en *Soft Agar*

La capacitat de formació de colònies de les cèl·lules es va avaluar mitjançant l'assaig en *Soft Agar*. Primerament, per formar la capa base es van mesclar a parts iguals (1:1) una solució d'agar a l'1% i medi DMEM 2x (20% d'FBS i 2% de P/E) obtenint així una solució final de 0.5% d'agar, 10% d'FBS i 1% de P/E, de la qual se'n van afegir 1.5 mL en cada pou (placa multi-pou 6X).

Per aconseguir la capa superior, es va seguir el mateix procés però aquest cop partint d'una solució d'agar al 0.7% i medi DMEM 2x inoculat amb un nombre suficient de cèl·lules (6,000 per pou), constant així la mescla final de 0.35% d'agar, 10% d'FBS i 1% de P/E. De nou, es van afegir 1.5 mL a cada pou un cop la capa base havia polimeritzat.

Es van incubar les plaques durant 14 dies, afegint 0.5 mL de medi 2-3 cops per setmana. Passat aquest temps, es van tenyir les cèl·lules amb cristall violeta 0.005% preparat en PBS. Finalment, es van obtenir les imatges amb el microscopi Nikon SMZ18 i l'objectiu de 0.5x, a partir de les quals es va calcular tant el nombre total de colònies com l'àrea total coberta per aquestes mitjançant l'*ImageJ* (Fiji, V1.49, codi obert).

3.4. Assaig *Transwell*

L'assaig *Transwell* es pot emprar per analitzar tant la migració com la invasió cel·lular. En aquest cas, l'assaig *Transwell* es va utilitzar per determinar la capacitat d'invasió de les cèl·lules i, per tant, es va cobrir la superfície inferior de l'insert *transwell* (8 µm)

amb 25 μL d'una mescla de Matrigel (Corning Inc, NY, USA) i DMEM (1:3) que s'assimila a la matriu basal de les cèl·lules de mamífers.

Un cop gelificada la solució, es van transferir els inserts a una placa de 24 pous on prèviament s'havien afegit 500 μL de DMEM, també amb un 10% d'FBS que funcionarà com a quimiotàctic. Finalment, es van inocular unes 50,000 cèl·lules en cada pou en 400 μL de medi DMEM (*Figura 7*).

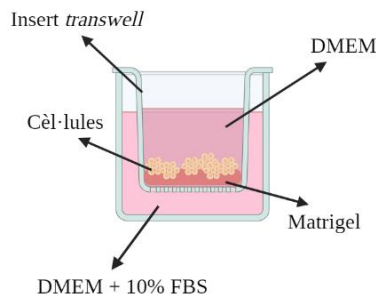


Figura 7. Esquema d'un pou en l'assaig Transwell.

Passat el temps d'incubació, les cèl·lules es van fixar afegint paraformaldehid fins a arribar a una concentració final del 4% en ambdós costats de l'insert *transwell* i, posteriorment, el resultat es va netejar amb PBS estèril per eliminar les restes de cèl·lules no adherides així com l'excés de paraformaldehid. Per la tinció de les cèl·lules es va utilitzar el colorant Hoescht 33342 (Thermo Fisher Scientific Inc, MA, USA).

El total de cèl·lules es va quantificar prenent fotografies de diferents camps per cada membrana amb el microscopi Nikon ECLIPSE Ts2R i l'objectiu 10x. Seguidament, es van retirar les restes de la membrana de Matrigel amb un hisop de cotó i es van tornar a prendre les imatges amb les mateixes condicions, observant llavors només aquelles que havien envaït la membrana.

El tractament de les fotografies així com el comptatge del nombre de cèl·lules es va realitzar mitjançant el programari *ImageJ* (Fiji, V1.49, codi obert) per, finalment, calcular el percentatge de cèl·lules amb capacitat d'invasió.

3.5. Assaig *Wound Healing*

En plaques de 6 pous es van sembrar les línies d'estudi, inoculant unes 600,000 cèl·lules per pou amb un volum final de 2 mL. Passades 4-5 hores en un incubador humidificat a 37°C i 5% de CO₂, es va realitzar la lesió o *scratch* amb una punta de

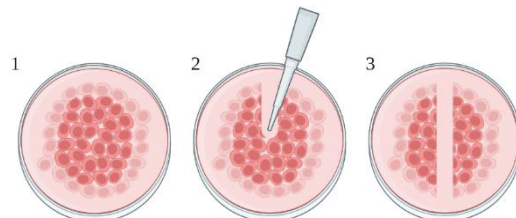


Figura 8. Realització de la lesió o *scratch*.

pipeta P200: mantenint una pressió constant i amb un moviment vertical al centre del pou (*Figura 8*). Seguidament, es va aspirar el medi per eliminar així les cèl·lules que

s'haguessin desenganxat i es van afegir de nou 2 mL de DMEM, suplementat amb 10% d'FBS i 1% de P/E.

Un cop finalitzat aquest procediment es van prendre les primeres imatges (T0) amb un microscopi EVOS FL, amb l'objectiu 4x i un 30% de lluminositat. En les mateixes condicions es van prendre 5 imatges més fins a un màxim de 66 hores.

L'escalatge de les fotografies i la mesura de l'àrea de les diferents lesions es va dur a terme a través del programari *ImageJ* (Fiji, V1.49, codi obert) per, finalment, expressar la velocitat de migració en $\mu\text{m}^2/\text{h}$.

3.6. Anàlisi estadística

Partint dels resultats obtinguts dels quatre assaigs, en tots els casos conseqüència de tres rèpliques biològiques, englobant cadascuna tres rèpliques tècniques, tots els anàlisis estadístics es van realitzar amb el programa *GraphPad Prism* 8.0.1, sempre considerant estadísticament significatius aquells p-valors < 0.05 (*) i < 0.005 (**). Concretament, es va utilitzar el test U de Mann-Whitney, una prova no paramètrica aplicada a mostres independents com en aquest cas, de dues cues.

4. RESULTATS

A continuació, es mostren els resultats obtinguts a partir dels experiments *in vitro* realitzats en tres línies cel·lulars humanes de càncer de còlon (HCT116, HT29 i SW480) amb diferents orígens (*Taula Suplementària S1*) i perfil mutacional (*Taula Suplementària S2*), amb l'objectiu d'analitzar els possibles canvis cel·lulars induïts per la sobre-expressió del gen *PLA2G12A*, per així avaluar el seu rol fisiopatològic i caracteritzar el seu paper funcional dins del context de la promoció i progressió del càncer de còlon.

4.1. Avaluació de la taxa de proliferació cel·lular

Les modificacions en la capacitat proliferativa es van quantificar mitjançant un assaig de proliferació, dividint els resultats obtinguts pel nombre inicial de cèl·lules en cada pou per així calcular la taxa de proliferació cel·lular.

Tal i com es mostra en la *Figura 9*, la sobre-expressió de *PLA2G12A* no causa diferències significatives en les línies HT29 i SW480, en canvi, sí que se n'observen en les cèl·lules HCT116, ja a partir de les 24h després de la transfecció.

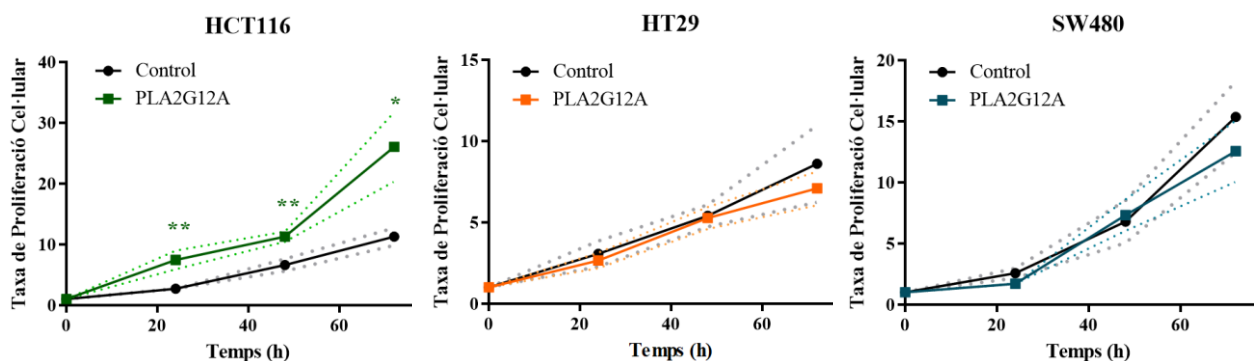


Figura 9. Taxa de proliferació cel·lular de les línies HCT116, HT29 i SW480 on es sobre-expressa el gen *PLA2G12A* respecte el control. Els valors es mostren com una mitjana \pm SEM ($N = 3$).

4.2. Avaluació de la capacitat de formació de colònies

Un dels trets més característics de les cèl·lules metastàtiques és l'habilitat de créixer de manera independent al contacte intercel·lular, una qualitat avaluada mitjançant la capacitat de formació de colònies.

Per una banda, analitzant el creixement de les cèl·lules en un assaig en *Soft Agar* no s'aprecia que existeixi una diferència entre el nombre de colònies formades per les cèl·lules que sobre-expressen el gen respecte les control. Ara bé, sí que les HT29

transfectades mostren certa tendència (p -valor = 0.0503) que podria arribar a ser significativa amb una N superior (*Figura 10B*).

D'altra banda però, s'han calculat també les àrees ocupades per aquestes colònies i, en aquest cas sí que s'ha obtingut un resultat significatiu en el cas de les HCT116 on, tal i com ja s'observa a ull nu (*Figura 10A*), aquelles cèl·lules transfectades han proliferat molt més (*Figura 10C*), fet que concorda amb els resultats de l'apartat anterior.

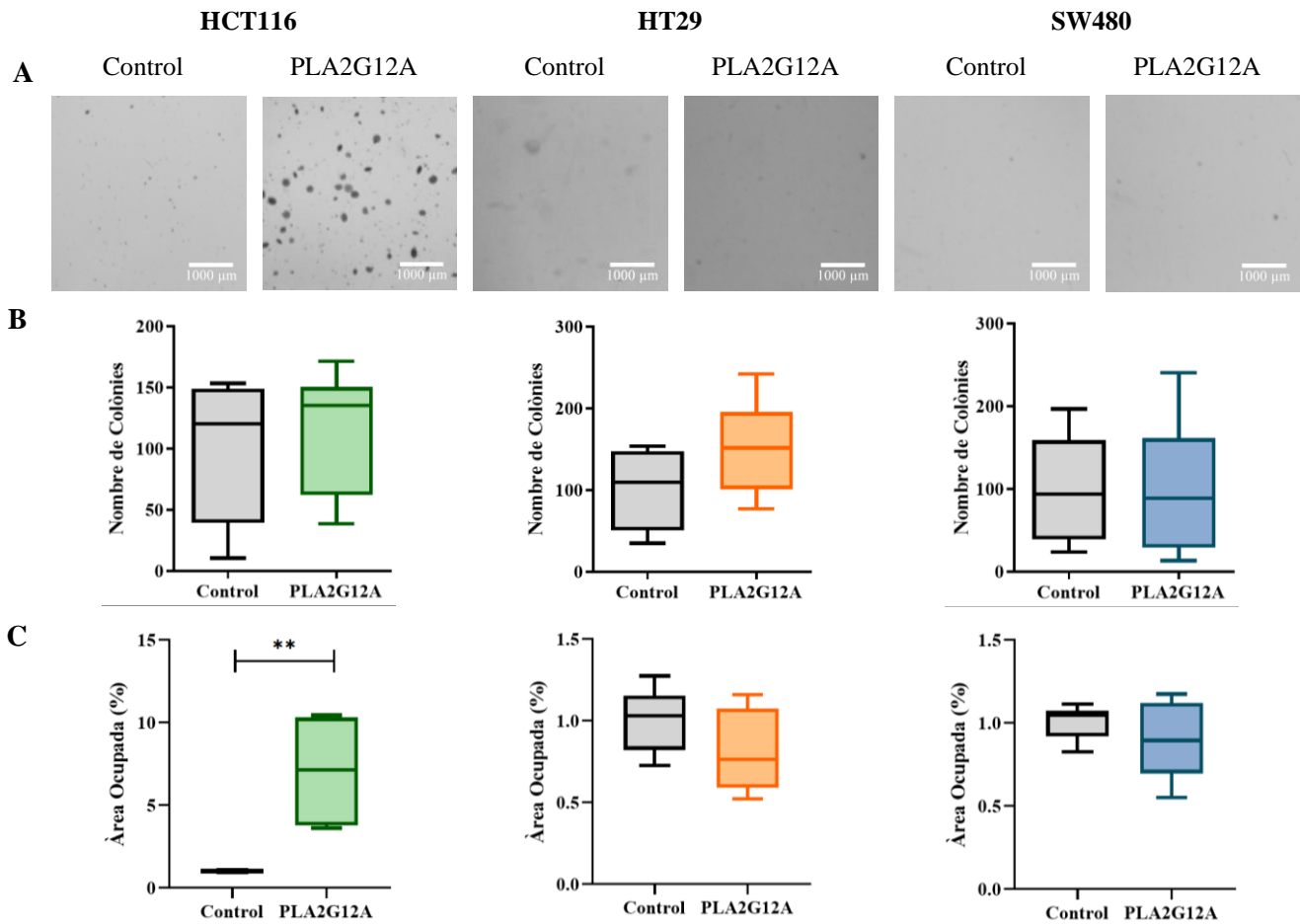


Figura 10. (A) Imatges representatives de l'assaig en Soft Agar, (B) quantificació del nombre de noves colònies formades i (C) de l'àrea ocupada per aquestes colònies. Els box plots mostren la mediana \pm IQR (rang d'interquartil) ($N = 3$). Barra d'escala, 1000 μ m.

4.3. Avaluació de la capacitat d'invasió

Una altra de les propietats que adquireixen les cèl·lules metastàtiques és la capacitat d'invasió, és a dir, de degradar la matriu extracel·lular per esdevenir mòbils i poder envair altres teixits i/o òrgans.

Els gràfics de la *Figura 11* mostren que, en les línies HCT116 i HT29, no hi ha una diferència clara entre les cèl·lules que han estat transfectades amb *PLA2G12A* respecte

les que no. No obstant, en les SW480, quan es comparen les dues condicions, és el grup control el que mostra un major nombre de cèl·lules en la capa inferior de la cambra, suggerint que la sobre-expressió de *PLA2G12A* podria reduir la capacitat invasiva de les cèl·lules.

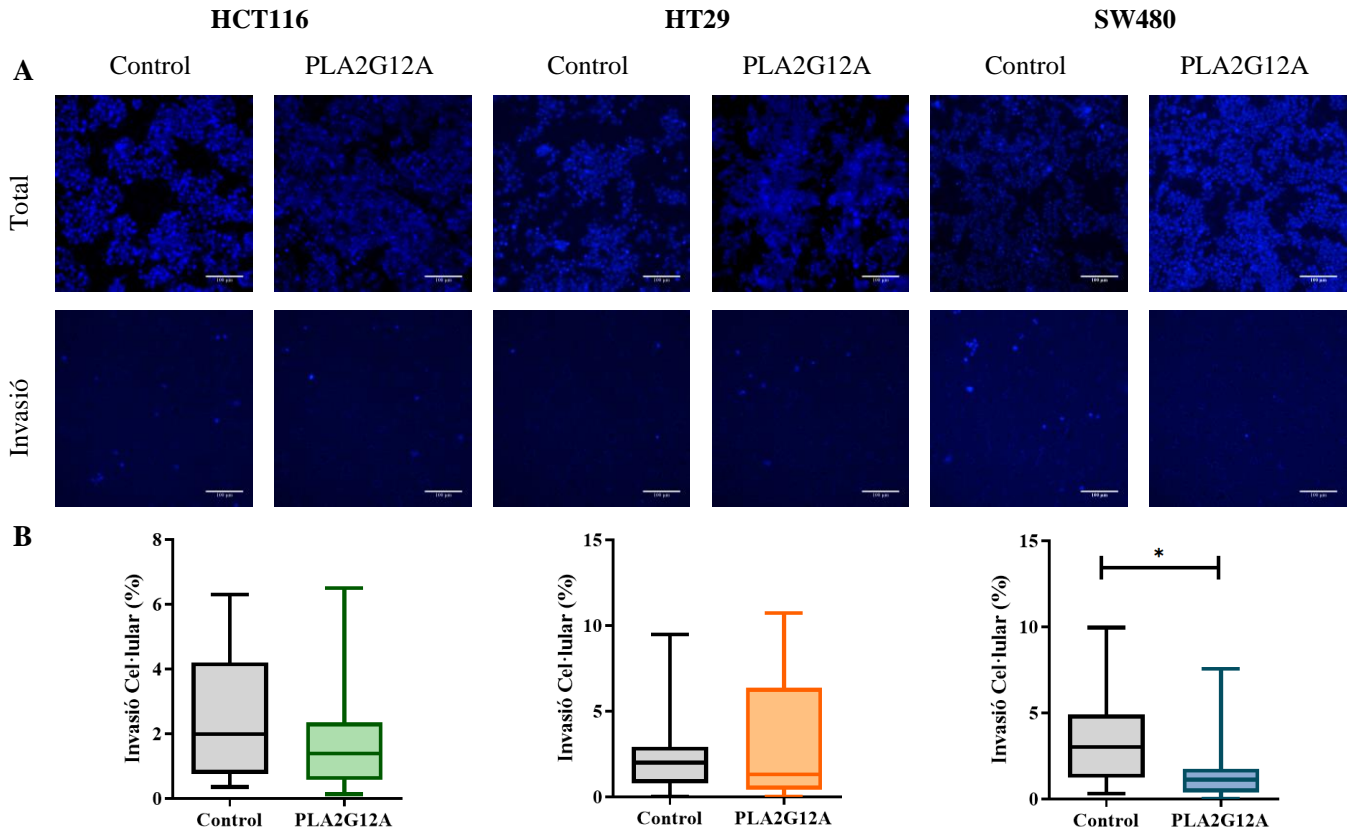


Figura 11. (A) Imatges representatives de l'assaig Transwell i (B) quantificació del percentatge d'invasió, calculat a través del ràtio entre el nombre de cèl·lules amb la capacitat de travessar la capa de Matrigel i el nombre total de cèl·lules. Els box plots mostren la mediana \pm IQR (rang d'interquartil) ($N = 3$). Barra d'escala, 100 μm .

4.4. Avaluació de la capacitat i velocitat de migració

Finalment, mitjançant l'assaig *Wound Healing* s'han analitzat els canvis en la capacitat de migració que provoca la sobre-expressió del gen *PLA2G12A*, mesurant al llarg de 66 hores l'àrea coberta per les cèl·lules per, més endavant, calcular la seva velocitat de migració en $\mu\text{m}^2/\text{h}$.

Sols observant la *Figura 12A*, es pot determinar que cap de les dues condicions sembla atorgar una major capacitat de migració a les cèl·lules. Quant als gràfics (*Figura 12B*), tot i la gran variabilitat en els resultats, com amb les SW480, en cap cas existeix una diferència significativa entre les cèl·lules del grup control i aquelles amb majors nivells de *PLA2G12A*.

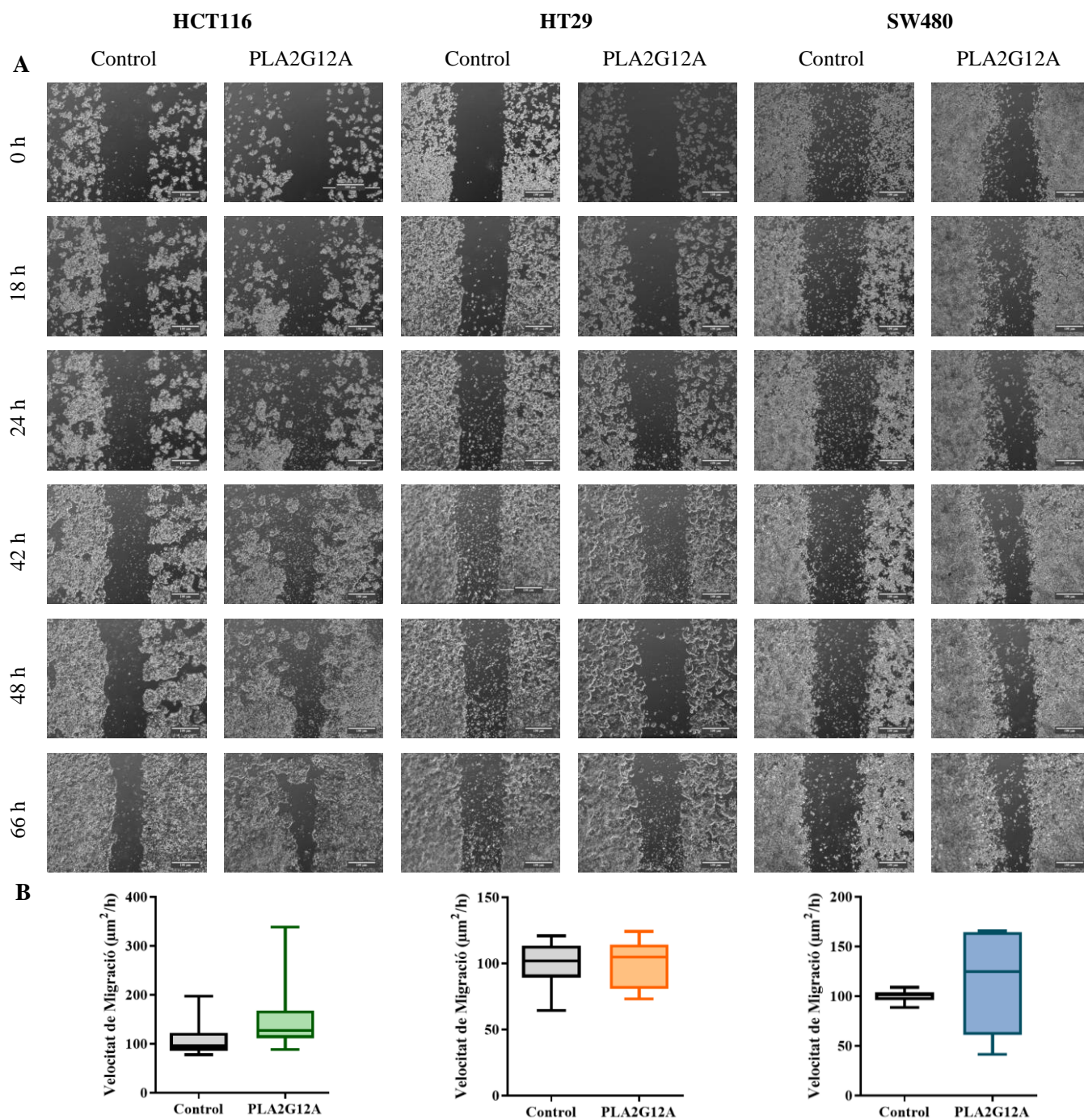


Figura 12. (A) Imatges representatives de l'assaig Wound Healing i (B) quantificació de la velocitat de migració en $\mu\text{m}^2/\text{h}$. Els box plots mostren la mediana \pm IQR (rang d'interquartil) ($N = 3$). Barra d'escala, 100 μm .

5. DISCUSSIÓ

En aquest projecte s'han realitzat diferents experiments *in vitro* amb l'objectiu de caracteritzar el paper funcional de PLA2G12A en els processos de proliferació i migració cel·lular en càncer de còlon.

A través d'un primer cribratge en un model de càncer colorectal *in vivo* en *Drosophila melanogaster*, seguit d'una validació en dues cohorts humanes independents, el grup d'investigació GReBiC va establir el poder com a biomarcador de prognòs del gen PLA2G12A. Es va determinar que nivells baixos de la seva expressió correlacionaven amb un major índex de recurrència, així com amb una menor taxa de supervivència.

En el mateix estudi, i també amb la finalitat de definir la funció de PLA2G12A en la progressió tumoral, és van realitzar els mateixos estudis *in vitro* però inhibint l'expressió del gen mitjançant ARN d'interferència. Els resultats mostren l'existència de diferències significatives per algunes de les línies cel·lulars quant a la capacitat de proliferació i la velocitat de migració, però on realment s'observen els efectes de la manca de PLA2G12A és en la capacitat d'invasió i de formació de colònies, dues característiques essencials de les cèl·lules metastàtiques (resultats pendents de publicació).

Centrant-se únicament en els resultats de la present investigació, és difícil determinar el rol del gen, ara bé, un cop posats en context dins de la totalitat del projecte sí que prenen més sentit. La sobre-expressió de PLA2G12A ha aconseguit en la majoria dels casos que les cèl·lules tumorals mantinguin un fenotip estable respecte el grup control i, en les SW480, fins i tot han reduït significativament la capacitat invasiva (*Figura 11*). Si bé, la línia HCT116 mostra uns majors nivells de proliferació (*Figura 9* i *Figura 10C*), això podria atribuir-se al diferent perfil mutacional, ja que aquesta línia presenta un fenotip molecular d'MSI mentre les HT29 i les SW480, de CIN (Ahmed et al., 2013).

Altrament, cal tenir en compte que l'eficiència de transfecció és variable i, en aquest cas, relativament baixa (al voltant del 10%) (*Figura Suplementària S2*). A més, el fet de sobre-expressar una proteïna pot suposar un augment de l'estrès cel·lular i la desregulació de diverses vies de senyalització que, per a PLA2G12A, romanen desconegudes. Ambdues condicions tenen la capacitat d'alterar els resultats dels experiments.

Enfocant-se de nou en les característiques de PLA2G12A, i tal com s'esmenta en la introducció, aquesta proteïna forma part d'una superfamília d'enzims, les fosfolipases A2 (PLA₂), que hidrolitzen fosfolípids i, com a resultat, alliberen àcids grassos i altres mediadors lipídics. Aquestes molècules bioactives es troben implicades en diverses vies de senyalització i funcions cel·lulars, tals com la proliferació, l'angiogènesi, la inflamació, la diferenciació o la immunitat, totes susceptibles de contribuir al creixement tumoral o la metastàsis en cas de desregulació (Brglez et al., 2014; PLA2G12A - Gene - NCBI, *n.d.*; PLA2G12A Gene - GeneCards, *n.d.*; Nevalainen et al., 2012; Peng et al., 2021).

La família PLA₂ comprèn sis tipus d'enzims, sent el més abundant i estudiat les fosfolipases A2 secretades (sPLA₂), un grup que engloba onze isoformes en mamífers, la majoria amb el centre catalític, el bucle d'unió a calci i els ponts disulfur altament conservats. Altrament, els grups III i XII es classifiquen com a formes atípiques, una característica que podria suggerir que les seves funcions també difereixen de la resta de les isoformes (Aloulou et al., 2018; Murakami et al., 2003, 2014).

Si bé diversos estudis s'han centrat en determinar la relació entre les sPLA₂ i el càncer, sobretot pel que fa a la seva implicació amb els processos inflamatoris, els resultats indiquen que podrien tenir papers oposats segons el teixit. Per exemple, en càncer de mama, pulmó, pròstata, ovaris i esòfag tenen un caràcter pro-oncogènic, mentre en el cas dels gàstrics i intestinals, anti-oncogènic (Peng et al., 2021). De fet, quant al càncer colorectal, existeixen ja articles que proven que alguns grups com el II i X, també el III, mostren nivells d'expressió alterats (Brglez et al., 2014; Mounier et al., 2008).

Tot i que s'ha demostrat que *PLA2G12A* es troba expressat en diversos òrgans de l'aparell digestiu, incloent els intestins (Peuravuori et al., 2014), segueix sent desconeguda la seva funció tant fisiològica com patològica. Ara bé, sembla que a diferència de la resta d'isoformes la seva relació amb el càncer no rau en el procés inflamatori, ja que ha demostrat no incrementar ni la producció ni l'alliberament de prostaglandina E2 (Murakami et al., 2003). Així mateix, la seva concentració en sèrum no es troba elevada en malalties inflamatòries severes (Peuravuori et al., 2014).

Malgrat la seva baixa activitat *in vitro*, Murakami et al. (2003), van determinar que aquelles cèl·lules transfectades amb *PLA2G12A* exhibien una morfologia anormal,

indicant un aspecte funcional únic d'aquest enzim. Tenint en compte que ens molts casos les cèl·lules metastàtiques presenten alteracions en el citoesquelet, per ser així més deformables i contràctils, aquest podria ser el vincle entre ambdós, el gen *PLA2G12A* i el càncer, que correspondria amb els resultats obtinguts prèviament comentats en què s'observa com el fet d'alterar els nivells d'expressió del gen, ja sigui inhibint-lo o sobre-expressant-lo, afecten sobretot a la capacitat d'invasió i de formació de colònies, dues qualitats fonamentals de les cèl·lules amb poder metastàtic.

6. CONCLUSIÓ

En aquesta investigació, la sobre-expressió del gen *PLA2G12A* en tres línies cel·lulars humanes de càncer de còlon (HCT116, HT29 i SW480) s'ha emprat per determinar de manera més detallada el seu paper fisiopatològic.

Els resultats obtinguts confirmen els estudis anteriors del grup GReBiC que presenten *PLA2G12A* com a possible supressor tumoral, atès que a conseqüència de l'augment en els seus nivells d'expressió les capacitats proliferativa, migratòria i de formació de les tres línies cel·lulars s'han mantingut estables respecte els respectius controls, a excepció de la capacitat de proliferació de les HCT116. A més a més, es pot observar com en les HCT116 i les HT29, la sobre-expressió de *PLA2G12A* es tradueix en certa tendència a reduir la capacitat d'invasió que, en les SW480 arriba a ser significativa.

Considerant tota la informació recollida en aquest projecte, es pot concloure que, tot i que es necessitaran estudis addicionals per confirmar el seu rol amb exactitud, *PLA2G12A* intervé en la progressió tumoral, impeding principalment la disseminació. Conseqüentment, *PLA2G12A* es presenta com un prometedor biomarcador de prognosi en càncer colorectal en estadis inicials.

7. BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, D., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Danielsen, S. A., Eknæs, M., Hektoen, M., Lind, G. E., & Lothe, R. A. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, 2. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.35>
- Aloulou, A., Rahier, R., Arhab, Y., Noiriél, A., & Abousalham, A. (2018). Phospholipases: An overview. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1835, pp. 69–105). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_3
- Argilés, G., Tabernero, J., Labianca, R., Hochhauser, D., Salazar, R., Iveson, T., Laurent-Puig, P., Quirke, P., Yoshino, T., Taieb, J., Martinelli, E., & Arnold, D. (2020). Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*, 31(10), 1291–1305. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.06.022>
- Brglez, V., Lambeau, G., & Petan, T. (2014). Secreted phospholipases A2 in cancer: Diverse mechanisms of action. In *Biochimie* (Vol. 107, Issue Part A, pp. 114–123). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.09.023>
- Cancer Today*. (n.d.). Retrieved March 10, 2023, from https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0
- PLA2G12A - Gene - NCBI*. (n.d.). Retrieved March 22, 2023, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/81579>
- Malki, A., Elruz, R. A., Gupta, I., Allouch, A., Vranic, S., & Al Moustafa, A. E. (2020). Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 1–24. <https://doi.org/10.3390/IJMS22010130>
- Mounier, C. M., Wendum, D., Greenspan, E., Fléjou, J. F., Rosenberg, D. W., & Lambeau, G. (2008). Distinct expression pattern of the full set of secreted phospholipases A2 in human colorectal adenocarcinomas: SPLA2-III as a

- biomarker candidate. *British Journal of Cancer*, 98(3), 587–595.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604184>
- Murakami, M., Masuda, S., Shimbara, S., Bezzine, S., Lazdunski, M., Lambeau, G., Gelb, M. H., Matsukura, S., Kokubu, F., Adachi, M., & Kudo, I. (2003). Cellular arachidonate-releasing function of novel classes of secretory phospholipase A2S (groups III and XII). *Journal of Biological Chemistry*, 278(12), 10657–10667.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M211325200>
- Murakami, M., Taketomi, Y., Miki, Y., Sato, H., Yamamoto, K., & Lambeau, G. (2014). Emerging roles of secreted phospholipase A2 enzymes: The 3rd edition. *Biochimie*, 107(Part A), 105–113. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2014.09.003>
- Murphy, N., Moreno, V., Hughes, D. J., Vodicka, L., Vodicka, P., Aglago, E. K., Gunter, M. J., & Jenab, M. (2019). Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 69, pp. 2–9). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.06.005>
- Nevalainen, T. J., Cardoso, J. C. R., & Riikonen, P. T. (2012). Conserved domains and evolution of secreted phospholipases A2. *The FEBS Journal*, 279(4), 636–649.
<https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2011.08453.X>
- Nguyen, H. T., & Duong, H. Q. (2018). The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncology Letters*, 16(1), 9–18.
<https://doi.org/10.3892/OL.2018.8679>
- Pathway of the Day: RAS/RAF/MEK/ERK | ESMO*. (n.d.). Retrieved March 7, 2023, from <https://www.esmo.org/meeting-calendar/past-meetings/esmo-2014-congress/News-Articles/pathway-of-the-day-ras-raf-mek-erk>
- Peng, Z., Chang, Y., Fan, J., Ji, W., & Su, C. (2021). Phospholipase A2 superfamily in cancer. In *Cancer Letters* (Vol. 497, pp. 165–177). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.10.021>
- Peuravuori, H., Kollanus, S., & Nevalainen, T. J. (2014). Expression of group XIIA phospholipase A2 in human digestive organs. *APMIS*, 122(12), 1171–1177.
<https://doi.org/10.1111/APM.12280>

- Pijuan, J., Barceló, C., Moreno, D. F., Maiques, O., Sisó, P., Martí, R. M., Macià, A., & Panosa, A. (2019). In vitro cell migration, invasion, and adhesion assays: From cell imaging to data analysis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7(JUN). <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00107>
- PLA2G12A Gene - GeneCards | PG12A Protein | PG12A Antibody*. (n.d.). Retrieved March 22, 2023, from <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PLA2G12A>
- Rouault, M., Bollinger, J. G., Lazdunski, M., Gelb, M. H., & Lambeau, G. (2003). *Novel Mammalian Group XII Secreted Phospholipase A 2 Lacking Enzymatic Activity* †, ‡. <https://doi.org/10.1021/bi0349930>
- Sawicki, T., Ruszkowska, M., Danielewicz, A., Niedźwiedzka, E., Arłukowicz, T., & Przybyłowicz, K. E. (2021). A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis. In *Cancers* (Vol. 13, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers13092025>
- Valle, L., Vilar, E., Tavtigian, S. V., & Stoffel, E. M. (2019). Genetic predisposition to colorectal cancer: syndromes, genes, classification of genetic variants and implications for precision medicine. *The Journal of Pathology*, 247(5), 574. <https://doi.org/10.1002/PATH.5229>
- Zhang, Y., & Wang, X. (2020). Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer. *Journal of Hematology & Oncology 2020* 13:1, 13(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S13045-020-00990-3>

ANNEX

Figures suplementàries

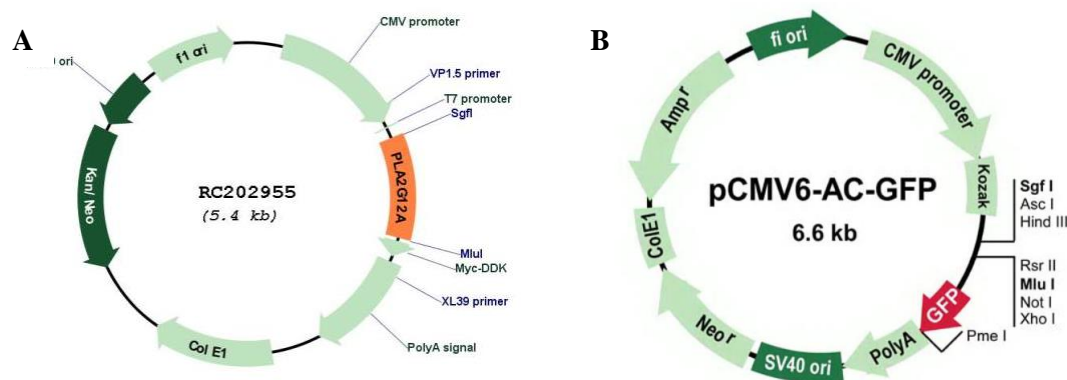


Figura S1. (A) Mapa del plasmidi RC202955 i (B) mapa del plasmidi PS100010.

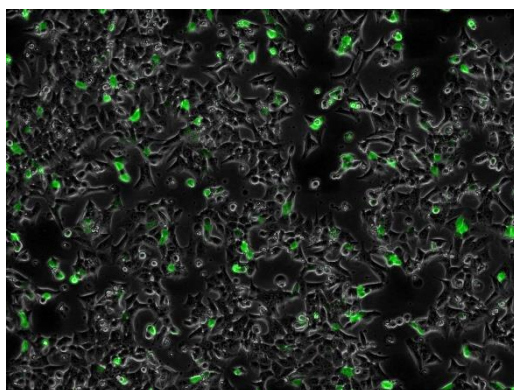


Figura S2. Superposició de les cèl·lules transfectedes (verd) sobre el total, en la línia HCT116.

Taules suplementàries

Taula S1. Orígens de les línies cel·lulars de càncer de còlon. Adaptat d'Ahmed et al. (2013).

Línia cel·lular	Pacient (edat)	Malaltia	Estadi	Derivat de
HCT116	Home (48 anys)	Carcinoma colorectal	D - Dukes	Tumor primari
HT29	Dona (44 anys)	Adenocarcinoma colorectal	C - Dukes	Tumor primari
SW480	Home (50 anys)	Adenocarcinoma colorectal	B - Dukes	Tumor primari

Taula S2. Estat de mutació de gens clau del càncer en les línies cel·lulars de càncer de còlon. Adaptat d'Ahmed et al. (2013).

Línia cel·lular	KRAS	BRAF	PIK3CA	PTEN	TP53
HCT116	G13D	wt	H1047R	wt	wt
HT29	wt	V600E	P449T	wt	R273H
SW480	G12V	wt	wt	wt	R273H;P309S

Les mutacions s'especifiquen a nivell de proteïna utilitzant les abreviacions estàndard d'aminoàcids d'una lletra; wt, fenotip silvestre.

AUTOAVALUACIÓ

La realització d'aquest projecte ha constatat de dues parts ben diferenciades, les tasques de laboratori i la confecció de la memòria, que, al seu torn, han contribuït de maneres diferents al meu desenvolupament personal.

Per una banda, totes les activitats relacionades amb la pràctica de laboratori m'han permès, no sols familiaritzar-me amb noves tècniques sinó també consolidar aquelles que ja havíem treballat durant la carrera universitària, com és el cas de la transformació de bacteris o els cultius cel·lulars. A més, penso que un punt molt positiu és el fet que m'ha ajudat a guanyar confiança i autonomia a l'hora de realitzar les diferents feines de laboratori.

D'altra banda, la redacció del projecte m'ha aportat molt més del que hagués pogut esperar en un principi. Tots i les diferents tasques i informes que hem dut a terme durant aquest últims cinc anys, aquesta és la primera vegada que realment he redactat un treball en forma d'article científic a partir d'uns resultats propis. Això m'ha obligat a seleccionar bibliografia adequada i d'extraure'n les parts escaients, no sols per ampliar els meus coneixements sobre aquest tema en concret sinó per poder elaborar una discussió completa.

En definitiva, aquest treball de final de grau, considerant tant les pràctiques com la memòria, m'ha permès aplicar molts dels coneixements adquirits durant els estudis de grau i, a més, veure de primera mà com es treballa en un laboratori dedicat a la recerca real, una experiència molt enriquidora per algú que, com jo, voldria començar una carrera en aquesta direcció professional.