

Títol del treball: Disseny experimental per a la caracterització de models cel·lulars amb els gens ST3GAL3 i ST3GAL4 silenciats.

Estudiant: Pol Fernández López

Grau en Biologia

Correu electrònic: pfernandezl94@gmail.com

Tutor: Dra. Sílvia Barrabés Vera

Empresa / institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor

Nom del tutor: Dra. Sílvia Barrabés Vera

Empresa / institució: Universitat de Girona

Correu(s) electrònic(s): silvia.barrabes@udg.edu

Agraïments

Primerament, m'agradaria agrair enormement la dedicació i les pautes d'orientació de la tutora del treball, la Dra. Sílvia Barrabés. No només ha demostrat interès, paciència i perseverança, si no que ha més ha posat gran esforç de la seva part en les correccions i el *feedback* en general, per tal de millorar la qualitat del treball i entregar-lo a la convocatòria del juny.

En segon lloc, gràcies a la Dra. Anna Massaguer, membre del grup de recerca de Bioquímica del Càncer de la UdG, per les dades sobre cultius cel·lulars que m'ha comunicat en petit comitè, i que han servit per concretar alguns detalls en el disseny experimental.

En tercer lloc, agraeixo a la Dra. Rosa Peracaula i el Dr. Rafael de Llorens, les petites indicacions i la resolució de dubtes que han proporcionat, sobretot a l'inici del treball, que han facilitat la cerca d'informació i l'enteniment d'alguns conceptes.

Finalment, moltes gràcies a la meva mare, la meva germana petita, la meva parella i els meus amics, que m'han ajudat a suportar la tensió i els nervis del treball, i que m'han animat fins al final.

Gràcies a tots els que han fet possible aquest treball.

(I) Resum

El càncer és un problema mundial de salut en constant increment, que representa la segona causa de mort en els països desenvolupats. L'adenocarcinoma de pàncrees, sovint referit com a adenocarcinoma ductal de pàncrees (PDAC), és una de les quatre causes principals de mort per càncer a Europa i els EUA, amb una taxa de mortalitat de més del 90%, malgrat només representa un 3-6 % dels casos de càncer en la població.

Les alteracions glucídiques associades al procés tumoral són una característica àmpliament descrita. En aquest context, la sobreexpressió en PDAC dels antígens glucídics Sialyl Lewis X (SLeX) i Sialyl Lewis A (SLeA) promou molt l'agressivitat de la patologia (més capacitat de migració, invasió i metastasi).

La síntesi d'aquests antígens és complexa i involucra, entre d'altres, les sialyltransferases (STs), que són enzims que col·loquen àcids siàlics (Sias) en posició terminal de cadenes glucídiques. Els Sias són diversos en estructura, però tenen en comú que estan negativament carregats, promovent així la des-adhesió de les cèl·lules del tumor per repulsió de càrregues (i per tant, contribuint en la formació de metastasis).

En aquest treball, se centra l'atenció sobre els antígens SLeX i SLeA, i en les STs implicades en la formació dels mateixos: ST3Gal III i ST3Gal IV. Així doncs, es parteix de la premissa que una manca d'aquests enzims, s'hauria de traduir en una disminució dels antígens i del comportament metastàtic de les cèl·lules.

El punt de partida són línies de PDAC parentals (no silenciades), i línies silenciades pels gens ST3GAL3 i/o ST3GAL4. L'objectiu és doncs, definir un disseny experimental a partir de cerca bibliogràfica que permeti, d'una banda caracteritzar el silenciament, i d'altra banda, caracteritzar el fenotip metastàtic.

Per aconseguir-ho, primerament s'han proposat anàlisis a nivell d'expressió de proteïna (western blot per quantificar les STs) i antígen (citometria de flux contra les estructures SLeX i SLeA), així com un assaig de viabilitat (MTT) per comprovar que la falta d'STs o antígens SLeX i/o SLeA no suposi un compromís en la viabilitat de les cèl·lules.

Finalment, i per a la caracterització del fenotip metastàtic, s'han proposat assaigs d'adhesió i migració cel·lular (*scratch assay* i *transwell assay*). D'aquesta manera es pretén avaluar l'efecte dels antígens SLeX i SLeA en aquests paràmetres característics de cèl·lules metastàtiques.

(II) Resumen

El cáncer es un problema mundial de salud en constante incremento, que representa la segunda causa de muerte en países desarrollados. El adenocarcinoma de páncreas, a menudo referido como adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC), es una de las cuatro causas principales de muerte por cáncer en Europa y los EUA, con una tasa de mortalidad de más del 90%, aun que solamente representa un 3-6 % de los casos de cáncer en la población.

Las alteraciones glucídicas asociadas al proceso tumoral son una característica ampliamente descrita. En este contexto, la sobreexpresión en PDAC de los antígenos glucídicos Sialyl Lewis X (SLeX) y Sialyl Lewis A (SLeA) promueve enormemente la agresividad de la patología (más capacidad de migración, invasión y metástasis).

La síntesis de estos antígenos es compleja y involucra, entre otros, las sialyltransferasas (STs), que son enzimas que colocan ácidos siálicos (Sias) en posición terminal de las cadenas glucídicas. Los Sias son diversos en estructura, pero tienen en común que están cargados negativamente, promoviendo así la desadherencia de las células del tumor por repulsión de cargas (y por tanto, contribuyendo en la formación de metástasis).

En este trabajo, se centra la atención sobre los antígenos SLeX y SLeA, y en las STs implicadas en su formación: ST3Gal III y ST3Gal IV. Así pues, se parte de la premisa que una ausencia de estas enzimas, tendría que significar una disminución de los antígenos y del comportamiento metastático de las células.

El punto de partida son líneas de PDAC parentales (no silenciadas), y líneas silenciadas en los genes ST3GAL3 y/o ST3GAL4. El objetivo pues, es definir un diseño experimental en base a información bibliográfica que permita, por una parte caracterizar el silenciamiento, y por otra parte, caracterizar el fenotipo metastático.

Con tal de lograrlo, primeramente se proponen análisis a nivel de la expresión proteica (Western blot para cuantificar las STs) y de los antígenos (citometría de flujo contra las estructuras SLeX y SLeA), así como un ensayo de viabilidad (MTT) para comprobar que la falta de STs o antígenos SLeX y/o SLeA no supone un compromiso en la viabilidad de las células.

Finalmente, y para la caracterización del fenotipo metastático, se proponen ensayos de adhesión y migración celular (*scratch assay* y *transwell assay*). De esta manera se pretende evaluar el efecto de los antígenos SLeX y el SLeA en estos parámetros característicos de células metastáticas.

(III) Summary

Cancer is nowadays a global health problem constantly increasing, being the second cause of death in developed countries. Pancreatic adenocarcinoma, often referred as pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), is the fourth leading cause of cancer death in Europe and EEUU with a mortality rate greater than 90%, even though it only represents a 3-6 % of cancer cases within population.

The glucidic alteration associated to tumoral processes is a well described feature. In this context, the overexpression of the glucidic antigens Sialyl Lewis X (SLeX) and Sialyl Lewis A (SLeA) in PDAC, significantly enhances the aggressiveness of the pathology (more migration, invasion and metastasis capability).

The synthesis of these antigens is complex and involves the sialyltransferases (STs) and other enzymes. STs are enzymes that place sialic acids (Sias) in terminal position of glucidic chains. The sias are diverse in structure, but they all are negatively charged, promoting de-adhesion of tumour cells by charge repulsion (and thus, contributing to metastasis formation).

In this work, the attention is centred on SLeX and SLeA antigens, and on ST implicated in their formation: ST3Gal III and ST3Gal IV. In this line, a lack of these enzymes should directly mean a reduction of the antigens and the metastatic behaviour of the cells.

The starting point is having different cell lines of PDAC: parental (non-silenced), and silenced in ST3GAL3, ST3GAL4 or in both genes. Thus, the objective is to define an experimental design by searching bibliography, allowing to, firstly, characterise the silencing, and secondly, characterise the metastatic phenotype. Attempting to achieve this objective, different analyses have been proposed.

The first part includes: quantification of protein expression levels (by western blot, in order to quantify the STs), quantification of the antigens (by flow cytometry against the SLeX and SLeA structures) and a viability assay (MTT), with the intention to check out if lack of STs or SLeX and/or SLeA antigens aren't a significant compromise for cell viability. These analyses make up the silencing characterisation.

For the second part (metastatic phenotype characterisation), cellular adhesion and migration (scratch assay and transwell assay) have been suggested. These protocols are intended to evaluate the effect of the antigens SLeX and SleA on these parameters, typical from metastatic cells.

Índex

1. INTRODUCTION	8
1.1 Pancreatic Cancer	8
1.2 Glycobiology	9
1.3 Sialylated antigens and Sialyltransferases	12
2. HIPÒTESI	14
3. OBJECTIVES	14
4. MATERIALS I MÈTODES	15
5. RESULTATS I DISCUSSIÓ	17
Establiment de les línies	17
Caracterització	20
Caracterització del fenotip metastàtic	26
6. CONCLUSIONS	31
7. ÈTICA I SOSTENIBILITAT	32
8. BIBLIOGRAFIA	33

1. Introduction

1.1 PANCREATIC CANCER

Cancer is a major health problem all over the world [1], with a worrying high prevalence that tends to increase [2]. It comprehends different pathologies characterized by uncontrolled cellular proliferation and growth, tumour cell migration, invasion and metastasis. Cancer is triggered by mutations in proto-oncogenes, tumour suppressor genes or DNA repair genes of cells, resulting in missregulation of regulatory, signal transduction and apoptotic pathways. Tumours originating from epithelial cells are known as carcinomas, which are the most common cancers. Carcinomas with glandular organization are called adenocarcinomas [2].

Within the four first causes of cancer death in United States, pancreatic adenocarcinoma stands out, with a high mortality rate (usually higher than 90%) [3]. Moreover, only 6% of patients survive after 5 years [1]. This worrying mortality rate relies on the late diagnosis of the disease [4], in addition to its capability to produce early metastasis and its resistance to various therapies (chemotherapy and physiotherapy) [5].

In view of this concern, many researchers have focused on characterizing, studying and describing adenocarcinoma's features: cell adhesion, migration, metastasis capability, and how they interact.

An emerging field of study is the characterization of glycosylated antigens of adenocarcinoma cells. Metastasis is a multistep process that involves migration of the tumour cells, invasion of either blood or lymphatic vessels, and development of metastatic tumours in distant organs [6]. Within this process, the role of some glycosylated antigens (especially Sialyl Lewis X –SLeX– and Sialyl Lewis A –SLeA–) is closely related to invasion and migration, due to the fact that these antigens are ligands of different adhesion proteins, like selectins [7] [8].

1.2 GLYCOBIOLOGY

Saccharids, also known as sugars or carbohydrates, were typically considered exclusively as energy and structure molecules, in the past [9]. Yet, within the last 30 years, the term glycobiology has gained strength. The word glycobiology first surged in the late 80s, from the fusion of carbohydrate chemistry and biochemistry, to understand the molecular biology of glycans, and especially, the glycoconjugates [9].

There are a big variety of saccharids. Saccharids exist as monomers (monosaccharids) or aggregation of these monomers (disaccharides, trisaccharides, oligosaccharides, polysaccharides...). Regarding to monosaccharids, there are different types, depending on the number of carbon atoms conforming them and other features (for example, uronic acids are hexoses with a negatively charged carboxylate at the 6-position). In addition, saccharids can link to other saccharids by α or β bonds, or to other molecules, like proteins [9].

As a result of the huge diversity of the glycans, plus the different structures they can form, it is believed that they develop various functions. These functions include cell communication, cell recognition, protection against protein proteolysis, regulation events (of genetic expression, for instance), and many others. Furthermore, glycans appear to have a critical importance regarding to cell to cell contact, and thus, adhesion and other related functions [9].

Every free-living cell is covered in a dense and complex layer of glycans. Glycans can be found in glycoconjugates, meaning they are attached to proteins or lipids. The formation of these complexes depends on the activity of several glycosyltransferases, and occurs in the Endoplasmatic Reticulum (ER) and Golgi apparatus [9].

Focusing on glycoconjugates, that involves both glycoproteins and glycolipids, it is important to underline that glycosylation of proteins occur in specific amino acids. There are two main classes of glycans: the *O*-glycans and the *N*-glycans.

O-glycans mainly are an *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) moiety covalently α -linked to the -OH of serine or threonine by an *O*-glycosidic bond, and the structures are named mucin *O*-glycans or *O*-GalNAc glycans. There are also several types of nonmucin *O*-glycans, including α -linked *O*-fucose, β -linked *O*-xylose, α -linked *O*-mannose and others. 4 common *O*-glycan cores (1 to 4) exist, as well as 4 cores of rare occurrence

(5 to 8). The structure of these common cores (1 to 4) is complex, and it is represented below (figure 1) [9].

The simplest mucin O-glycan is a single *N*-acetylgalactosamine residue linked to serine or threonine, and it is named the Tn antigen. The most common O-GalNAc glycan is Gal β 1-3GalNAc- (core 1). It is found in many glycoproteins and mucins and it is named T antigen. Both Tn and T antigens can be sialylated, consisting in the addition of a sialic acid (Sia) monosaccharide.

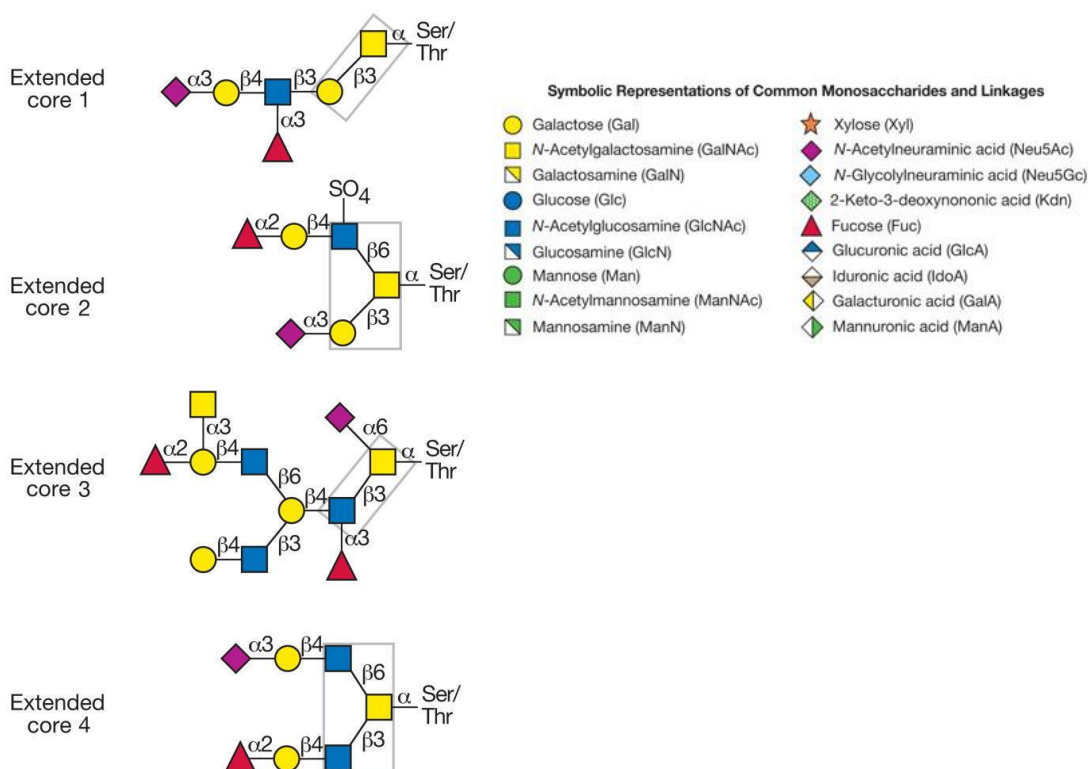


Figure 1. Representation of the most common O-glycan cores (left), and symbols for common monosaccharides and linkages (useful for interpretation of some of the figures in this work). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1896/figure/ch9.f2/?report=objectonly>

In contrast, *N*-glycans consist on an *N*-acetylglucosamine covalently attached to proteins at asparagine residues by an *N*-glycosidic bond (GlcNAc β 1-Asn). The signal

sequence that allows this *N*-glycosilation is Asn-X-Ser/Thr, where X corresponds to any possible aminoacid except Pro. *N*-glycan pathways are very complex, and some are conserved in animals, plants and yeast, and related pathways are found also in archea and bacteria. All them have a common core structure of Man α 1–6(Man α 1–3)Man β 1–4GlcNAc β 1–4GlcNAc β 1-Asn-X-Ser/Thr (penthasaccharide core, figure 2). *N*-glycans are classified into three types: high mannose type (containing only mannose residues), complex (containing several different monosaccharides) and hybrid (which is a mixture of the previous two) (figure 2) [9].

N-glycan bonds affect glycoprotein's properties, such as conformation, solubility, antigenicity and recognition by glycan-binding proteins [9].

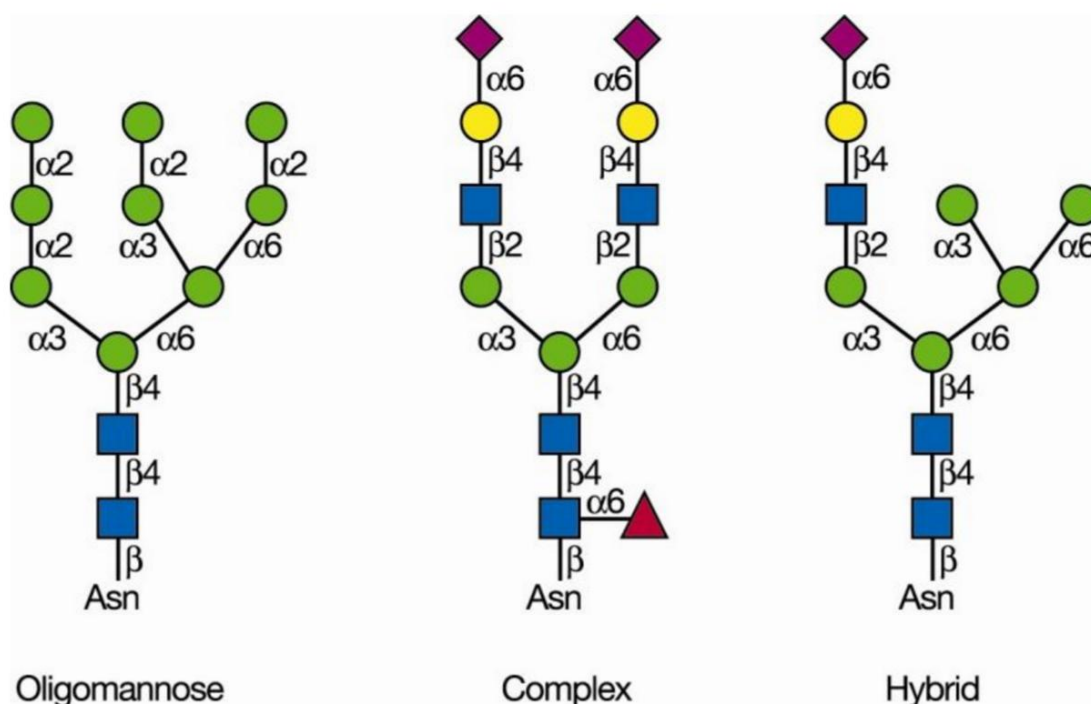


Figure 2. Representation of the different classes of *N*-glycans. The figure shows the common shared part (the core, at the bottom the chains) and the structure of the saccharides. Blue squares represent N-acetylglucosamines, green circles symbolize mannoses, triangle represents fucose, yellow circles represent galactoses and rhombuses represent sialic acids. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1917/figure/ch8.f1/?report=objectonly>

Different altered patterns of glycosylation in cancer are well described. Briefly: (i) increased branching of *N*-glycans, usually triggered by overexpression of enzymes that initiate the antenna synthesis; (ii) increase in sias covering the cell surface, that may lead to cell detachment, potential migration and could even protect cancer cells from

immune system recognition; (iii) increase in Lewis structures or (iv) altered expression and glycosylation of mucins, that are thought to act as “anti-adhesins” and consequently, promote migration [2].

1.3 SIALYLATED ANTIGENS AND SIALYLTRANSFERASES

Although the core structure of *O*- and *N*-glycans is well defined, the terminating branches may vary. Sias are negatively charged monosaccharides typically found as terminating branches of (complex or hybrid) *N*-glycans and *O*-glycans. The most common sialic acid is *N*-acetyl-neuraminic (Neu5Ac).

Sias display a wide variety of roles, involving stabilization of molecules and interaction with the environment. Yet, because of their characteristic features, Sias may be related to many pathologies when they are missregulated (usually overexpressed) [9]. Focusing in cancer, the addition of Sias may facilitate cell detachment (by charge repulsion) [10], meaning an increased cell invasion capability.

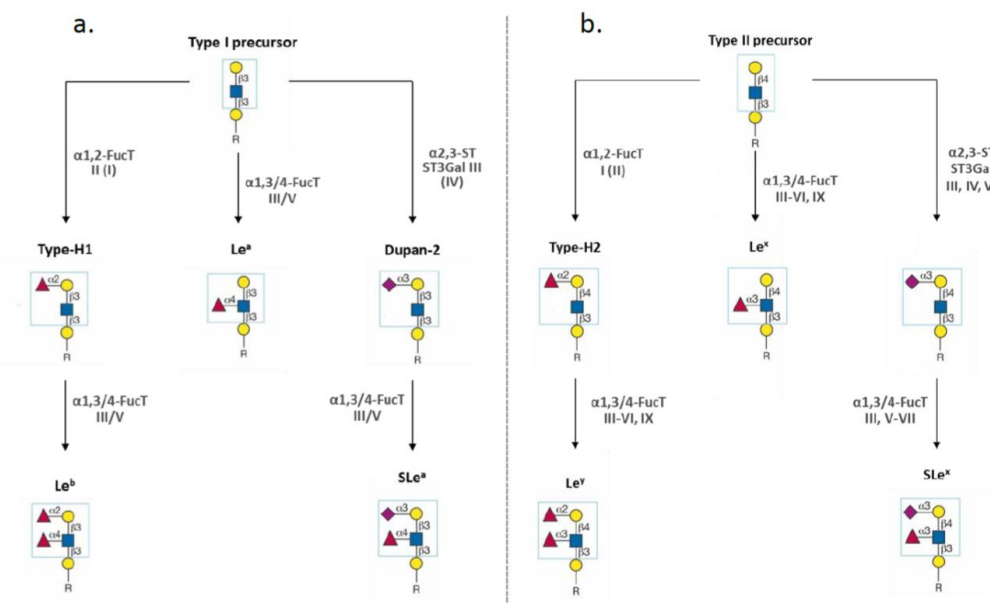


Figure 3. SLeA (a) and SLeX (b) antigen formation. Blue squares represent GlcNAc, yellow circles represent galactose, triangles represent fucose and rhombuses represent sias, as it can be checked in figure 1 (right side). The enzymes involved in the synthesis of each antigen appear also in the image. Retrieved from Regulation and Functions of sialyltransferases in pancreatic cancer, Sònia Bassagañas, 2015 [20].

The transfer of Sias to the sugar chains is mediated by sialyltransferases. More than 20 sialyltransferases (STs) are encoded in the human genome [11]. These enzymes catalyze the transfer of sialic acid from the activated donor substrate CMP-Sia to the terminal nonreducing positions of the oligosaccharide chains of glycoproteins and glycolipids [12]. This work focuses its interest on ST3Gal III and ST3Gal IV, which are responsible for the synthesis of SLeA and SLeX (figure 3) [12]. As it is shown in figure 3, ST3Gal III is responsible for both antigens synthesis [13], and so is ST3Gal III, though with lower efficiency. These antigens (SLeA and SLeX) derive from the Lewis blood group determinant that, in turn, is a modified *N*-glycan, *O*-glycan or glycosphingolipid structure [12].

Many reports have led to the conclusion that changes in glycosylation (either on the cell membrane or secreted glycoconjugates) are markers of tumour progression [14] [15]. Overexpression of Sialyl Lewis antigens (such as SLeX), in cell lines, [16] [17] as well as in tissues, [18] [19] has been reported by several researchers, giving strength to the relation between the high expression of different sialyltransferases and the metastatic capability of adenocarcinoma's cells [20]. SLeX and SLeA are natural ligand of selectins [9] [21] [22], and a higher expression of the antigens can be correlated with metastatic processes [9].

Selectins are a family of adhesion proteins, known as CAMs (Cell adhesion molecules), and are included in the huge family of the C-type Lectins [9]. Interactions between the selectins and cell-surface glycoconjugate ligands, play key roles in adhesive interactions among these cells. These interactions are crucial for leukocyte recruitment and homing to secondary lymphoid organs. There are three selectin types: L, E and P. L-selectin is expressed on leukocytes, E-selectin is expressed on cytokine-activated endothelial cells and P-selectin is expressed on activated platelets and endothelial cells. All selectins can bind the SLeX and SLeA antigens with different affinity, but concretely the E-selectin, interacting with glycoproteins presenting SLeX on either *N*- or *O*-glycans, is the one having a potential role in cancer metastasis [9]

In light of the points above, an experimental design is proposed, in order to add more information regarding to sialyltransferases, their role in SLeX and SLeA expression, and the implications of these proteins in metastatic potential.

2. Hipòtesi

L'elevada expressió dels antígens SLeX i SLeA, és característica de patologies com l'adenocarcinoma pancreàtic (tal com s'ha explicat a la introducció), i va relacionada amb l'expressió de diferents sialyltransferases, com ara les ST3GAL3 i ST3GAL4 [20]. A més, ha estat descrita per molts investigadors com a intensificadora de les capacitats de migració, adhesió [23] i, en definitiva, invasió dels teixits [24].

Així doncs, es pren com a punt de partida el fet que les sialyltransferases ST3Gal III i/o ST3Gal IV estan implicades en la formació d'aquests antígens (tal com figura en la introducció) i que cal esperar que una manca d'aquests enzims tingui com a conseqüència la reducció dels antígens SLeX i SLeA i, per tant, una disminució del fenotip metastàtic.

3. Objectives

The main purpose of this work is to define an experimental design, aiming to evaluate whether silencing the sialyltransferases ST3GAL3 and ST3GAL4 has an impact in terms of cell characteristics, making especial incidence on cell migration and adhesion.

In order to achieve this objective, the design is divided into two parts:

The first one refers to the characterization of the cell lines. This is intended to demonstrate that the cells, that have been previously successfully silenced, present the wished effect (a decrease of sialylated antigens SLeX and SLeA).

Then, regarding to the different expression of sialylated antigens, *in vitro* cell adhesion and cell migration have to be analysed as a second step of the design. The measure of these parameters should give an idea of the relation between them and the reduced expression of the antigens, in order to observe if the invasive behaviour of cells is repressed by the absence of the antigens.

4. Materials i mètodes

En ser un treball bibliogràfic, els mètodes que es presenten a continuació descriuen la cerca realitzada, tant amb diferents motors de cerca i bases de dades, com els diferents recursos que hi havia a disposició del grup de recerca. A continuació, es recullen en una taula resum (taula 1), els motors de cerca emprats i les diferents paraules utilitzades en els mateixos, així com les referències més destacables que s'han trobat.

TAULA 1

Recull de la informació més rellevant a l'hora de realitzar la cerca bibliogràfica per elaborar els resultats del treball. Hi figuren els diferents motors de cerca utilitzats, així com les paraules clau i les referències més destacables. Les paraules marcades amb un asterisc (*), s'han buscat en més d'un dels motors de cerca assenyalats, per tal d'ampliar la cerca i/o accedir a articles d'accés no gratuït.

Motor de cerca emprat o origen del recurs	Paraula (o paraules) utilitzades	Número de referència	Tipus de referència
Cercador + de la UdG	MTT viability assay*	[36] [37]	Llibre electrònic Pàgina Web
Cercador + de la UdG	Pancreatic adenocarcinoma migration*	[3] [4] [5] [13] [20] [41]	Articles científics
Cercador + de la UdG	Wound healing assay*	[38] [40]	Article científic Pàgina web
Pub Med	Scratch Assay*	[39]	Article científic
Google i Google Acadèmic	Subculture cell passage	[25] [26] [28] [29]	Article Pàgines Web
TDX de la UdG	Marta Pérez Garay	[34]	Tesi doctoral
TDX de la UdG	Sònia Bassagañas	[12]	Tesi doctoral
Google i Google Acadèmic	Cell Adhesion* Binding Assay	[22] [23] [44]	Articles científics

TAULA 1

Recull de la informació més rellevant a l'hora de realitzar la cerca bibliogràfica per elaborar els resultats del treball. Hi figuren els diferents motors de cerca utilitzats, així com les paraules clau i les referències més destacables. Les paraules marcades amb un asterisc (*), s'han buscat en més d'un dels motors de cerca assenyalats, per tal d'ampliar la cerca i/o accedir a articles d'accés no gratuït.

Google i Google Acadèmic	Western Protein Blotting	[31] [32]	Protocol en PDF (llibre electrònic) Protocol en PDF (pàgina web)
Google i Google Acadèmic	Cell cryopreservation*	[30]	Article científic
Cercador + de la UdG	Pancreas Cancer glycosilation	[2]	Tesi doctoral
Cercador + de la UdG	Sialyl Lewis adenocarcinoma* Sialyl Lewis cancer*	[6] [8] [14] [15] [17] [18] [19] [21]	Articles científics
Cercador + UdG	Sialyltransferase pancreatic cancer*	[11] [13] [20]	Articles científics

Les paraules clau utilitzades han estat molt diverses, i s'han provat en diverses combinacions (*cell migration*, *cell migration assay*, *pancreatic cancer migration*, i altres). A més, s'han provat diferents paraules clau per cercar protocols concrets (*Scratch Assay*, i *Wound healing assay*, per exemple).

Per trobar les referències, es buscava generalment en cercadors amb més ampli ventall de fonts (com Google Acadèmic), i es refinava la cerca en recursos de més qualitat i concreció (Scopus, Pub-Med, Cercador +, etc...). Cal apuntar que majoritàriament era necessari trobar els mateixos articles en el Cercador + (pel nom de l'article concret), ja que no s'hi podia accedir gratuïtament de manera directa.

Apart de la cerca bibliogràfica, incloent la informació recollida en la Taula 1, s'ha rebut informació addicional pel treball, en forma de "comunicació personal". Aquesta informació, estava referida a diversos punts del treball, com per exemple, les línies cel·lulars i el seu subcultiu, parts del protocol del Western Blot, etc.

5. Resultats i discussió

El disseny experimental elaborat a partir de la cerca consta de diferents parts. Prèviament a la realització dels experiments, cal establir línies cel·lulars mitjançant subcultius, que permetin reproduir les mateixes condicions experimentals sempre que sigui necessari, per exemple, per fer rèpliques.

Aquestes cèl·lules cal caracteritzar-les. La caracterització s'ha de dur a terme a dos nivells:

Primerament, es requereix una comprovació i descripció dels efectes del silenciament. Aquest pas contempla els efectes més directes de la falta de sialyltransferases funcionals (ST3Gal III, i/o ST3Gal IV). Així doncs, els primers experiments serviran per avaluar la presència/absència dels antígens glucídics i les sialyltransferases silenciades, així com la viabilitat de les cèl·lules.

En segon lloc, s'ha d'establir una relació entre la falta d'aquests enzims i la capacitat metastàtica de l'adenocarcinoma pancreàtic. Els paràmetres utilitzats per aquesta finalitat són la capacitat d'adhesió i la motilitat de les cèl·lules.

Cal considerar que el disseny que es proposa està basat en bibliografia diversa, i que està subjecte a optimització al laboratori, ja que moltes de les condicions s'haurien d'ajustar ben bé per les cèl·lules utilitzades, i pels enzims silenciats (ST3GAL3 i ST3GAL4), pels qual existeix bibliografia limitada.

Establiment de les línies

Es parteix de 8 línies cel·lulars, aïllades de tumor primari d'adenocarcinoma pancreàtic, o d'una metàstasi (sis línies de l'ATCC *Pancreatic cancer panel*, Capan-1 i Capan-2). Prèviament s'ha caracteritzat l'expressió de SLeX i SLeA d'aquestes línies, i s'han triat aquelles que tenien més expressió d'un o altre antigen, o d'ambdós. Per cada línia (n'hi ha tant de tumor primari com de metàstasi), s'han establert els següents models: amb el gen ST3GAL3 silenciats, amb el gen ST3GAL4 silenciats, amb els dos gens silenciats, i no silenciats o parentals. Cal emfatitzar que el fet que les línies cel·lulars provenguin d'una metàstasi o d'un tumor primari, no implica necessàriament que *in vitro* tinguin més o menys capacitat metastàtica.

El silenciament de les cèl·lules es faria amb la tècnica de CRISPR, i l'edició gènica estaria prèviament validada mitjançant seqüenciació. En aquest treball es presenta el disseny experimental per a la seva caracterització fenotípica. De les línies cel·lulars disposades, és important que se seleccionin aquelles amb una expressió de ST3GAL3 i ST3GAL4 més elevada, per tal de posar de manifest si hi ha diferències en els diferents experiments del disseny més fàcilment.

Prèviament als experiments, cal subcultivar les cèl·lules diverses vegades. El fet de fer aquests subcultius, es denomina canvi de passatge [25]. Això implica que la població es torna més homogènia, ja que se seleccionen positivament aquelles subpoblacions que creixen de manera més ràpida [26]. A més, les cèl·lules poden variar en morfologia, resposta a estímuls, expressió de proteïnes, permeabilitat a diferents molècules, etc. [27] [28] respecte els primers passatges, si se subcultiven massa. El nombre de passatges que han de tenir les cèl·lules utilitzades en els experiments ha variat al llarg dels anys, i difereix entre línies i criteris dels investigadors. Malgrat en general es recomana treballar amb passatges baixos (entre el 0 i el 10) [25], se solen allargar les cèl·lules fins a passatges més elevats (30-35, aproximadament) [29].

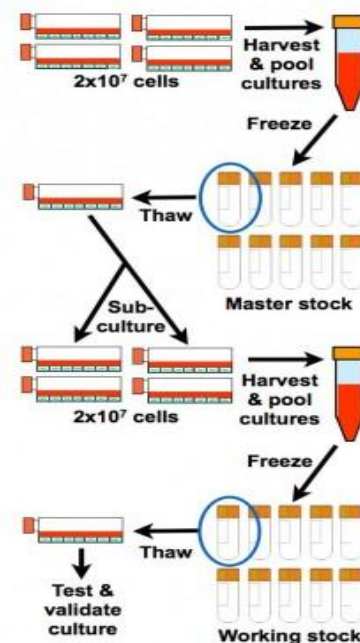


Figura 4. Representació de l'expansió de les cèl·lules comercials (a dalt de tot), i la creació de subcultius i "stocks" que permetin el manteniment i l'emmagatzematge de les línies. Cal apreciar que en cada pas de subcultiu es congelen tubs amb cèl·lules del passatge en qüestió, per poder-les emprar en el moment pertinent. Recuperat de <http://www.bionique.com/mycoplasma-resources/technical-articles/certified-working-cell-bank.html>.

A més dels canvis de passatge, el manteniment de les línies també inclou passos de criopreservació de les cèl·lules [25]. Els avantatges d'aquest procediment són clau, ja que estalvien el manteniment de múltiples cultius cel·lulars, eviten que les cèl·lules perdin les característiques originals (ja que molts canvis de passatges acaben provocant que la població de cèl·lules cultivades s'assembli menys a la comercial), i eviten contaminacions, entre d'altres [30]. Aquests passos de criopreservació generaran un gran magatzem de cèl·lules (*working stock*, figura 4), que es poden recuperar per repetir experiments, o bé perquè els passatges posteriors estan alterats o contaminats.

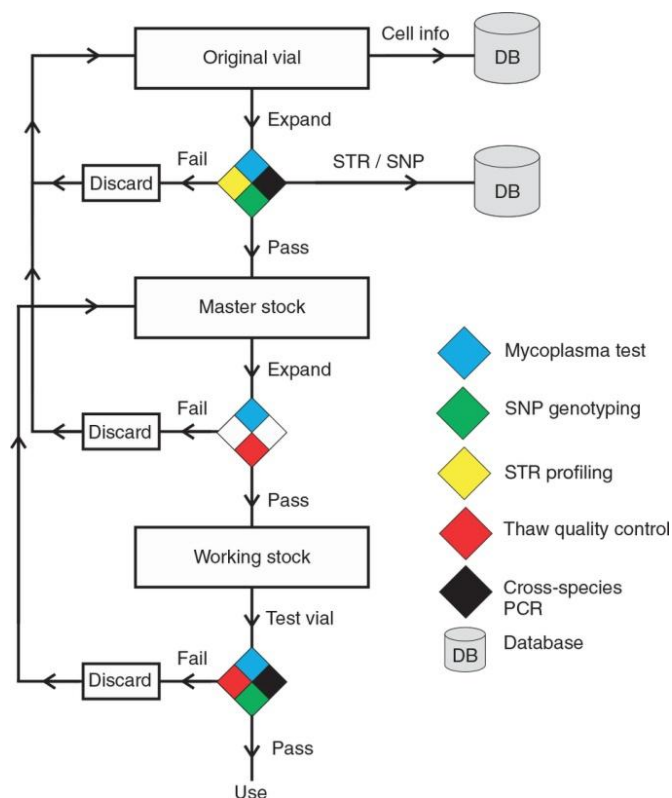


Figura 5. Procediment esquemàtic dels diferents tests per generar "stocks" de cèl·lules per treballar. Entre d'altres, cal parar atenció als tests de contaminació (micoplasma, fonamentalment), mutacions i la qualitat i nombre de cèl·lules que es recuperen en la resuscitació. Si els tests se superen s'expandeixen les cèl·lules per generar "stocks" que serviran, o bé per fer els experiments (*working stocks*), o bé per fer més expansions posteriorment (*master stocks*). Recuperat de la revista Nature, <http://www.nature.com/nature/journal/v520/n7547/images/nature14397-f3.jpg>

En la figura 5, apareix informació complementària, relativa a diferents tests que s'apliquen als cultius abans d'emmagatzemar-los o subcultivar-los. Val la pena practicar alguns tests rutinaris, ja que tots els experiments es faran amb les cèl·lules que s'obtinguin de l'expansió dels diferents passatges, i que per tant, han d'estar lliures de mutacions, contaminacions, etc.

Caracterització

Un cop es disposa de les diferents línies i els "stocks" pertinents, es pot procedir amb els experiments. Com s'ha comentat anteriorment, els primers experiments plantejats van encaminats a la caracterització del silenciament.

Determinació de l'expressió gènica – Western Blot

Per quantificar l'expressió gènica de les sialyltransferases silenciades, que en principi hauria de ser reduïda (o en el millor dels casos, pràcticament nul·la), s'ha escollit com a possibilitat pel disseny el Western Blot. La quantitat de les sialyltransferases es compararia en front a la β -actina o la α -tubulina, proteïnes que s'expressen fortament i de forma constitutiva.

Abans de dur a terme el Western Blot pròpiament dit, s'hauria de fer un llistat de les cèl·lules en cultiu i una posterior electroforesi (en SDS-PAGE), amb els marcadors moleculars pertinents. Per fer el llistat, existeixen diversos tampons, i l'utilitzat en aquest cas seria el RIPA complet (20mM Tris-HCl ph 7.4, 150 mM NaCl, 1% Tritó, 2mM EDTA i diversos inhibidors de proteases), ja que és el que normalment fa servir el grup de Bioquímica de la UdG. En referència a l'electroforesi, es carregarien entre 20 i 50 μ g de proteïna provinent del llistat [12], a optimitzar en funció dels resultats obtinguts. Cal remarcar, que existeixen diversos mètodes de transferència, i s'escolliria la transferència electroforètica perquè és fàcil, eficient i ràpida, i preserva la separació resolutiva del PAGE [31].

Un cop s'ha realitzat l'electroforesi, es transfereixen les proteïnes a una membrana de PVDF (figura 6) (*over-night* i a 4°C). Com que les proteïnes que es pretendrien quantificar amb el Western (les sialyltransferases, que són proteïnes ancorades a la membrana de l'aparell de Golgi) tenen un punt isoelèctric bàsic (al voltant de pH 9), la transferència caldria fer-la amb un tampó també bàsic (com el carbonat, que té un pH aproximat de 9.9 [31]).

Després de la transferència, és imprescindible bloquejar la membrana per evitar unions inespecífiques. Segons el protocol del grup de bioquímica de la UdG, i en aquest cas concret, el bloqueig es faria durant 1 hora a temperatura ambient amb 25 mL de TBST (Tris-buffered saline, 0.1% Tween [32]) amb 3% de BSA.

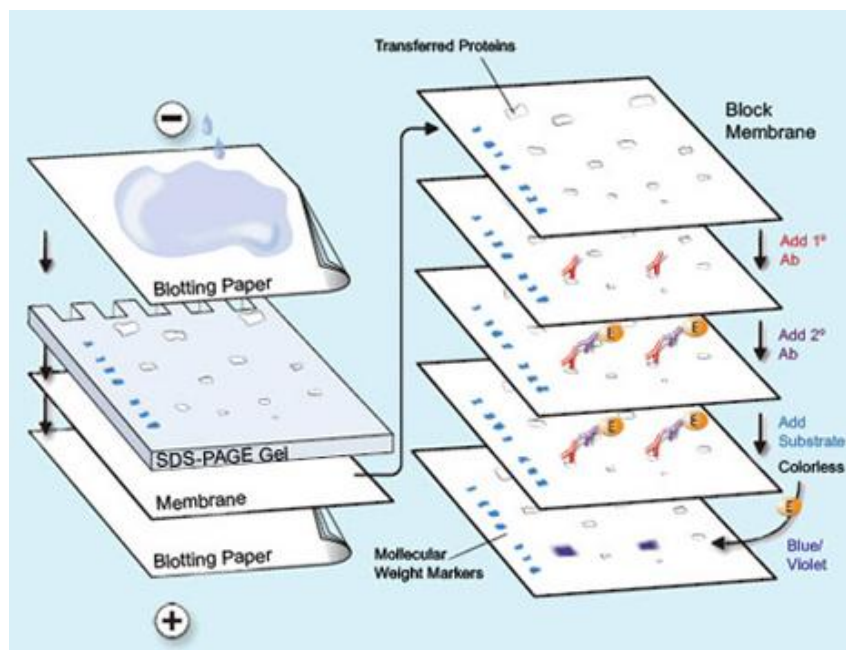


Figura 6. Western Blot, procediment general. Hi figura la transferència del gel d'electroforesi a la membrana de PVDF (a l'esquerra), el bloqueig, l'addició dels anticossos (1ari i 2ari), i l'addició del substrat per a la lectura de senyal. Recuperat de https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/static/WFS/Merck-Site/-/Merck/en_US/Freestyle/BI-Bioscience/Protein-Detection/western-blotting/western-blotting/8.jpg

Així doncs, el procediment continuaria amb un rentat i l'addició de l'anticòs primari (figura 6). En aquest cas, el grup de recerca compta amb dos anticossos primaris: anti-ST3Gal III monoclonal de conill (s'utilitza diluït 1/5000 en TBST, 1% BSA) i anti-ST3Gal IV monoclonal de ratolí (diluït 250 TBST, 1% BSA). Es deixen incubar a temperatura ambient durant 1 hora. Després de la incubació, es fan 3 rentats amb TBST.

Per detectar els anticossos primaris, s'afegeixen anticossos secundaris conjugats amb un enzim que en permeti la detecció. Per detectar l'anticòs anti-ST3Gal III es fa servir un anticòs Goat anti-Rabbit marcat amb l'enzim peroxidasa (1/50000 en TBST, 1%

BSA), i un Goat anti-mouse (fragments Fab) marcat per peroxidasa per detectar l'anti-ST3Gal IV (també 1/50000 en TBST, 1% BSA).

Finalment, i després de rentar amb TBST, s'afegiria el substrat de la peroxidasa conjugada als anticossos secundaris (figura 6). El substrat (o revelador), és hidrolitzat per la peroxidasa i emet quimiluminiscència durant la reacció, que pot ser detectada per una càmera molt sensible, permetent així quantificar la llum emesa [33]. Cal apuntar que el substrat es pot esgotar, pel qual el senyal va disminuint amb el temps [33].

Detecció dels antígens – Citometria de flux

Una manera de posar de manifest si la presència dels sucres a la superfície de la membrana ha disminuït és amb la citometria de flux. L'objectiu és comparar els grups parentals amb els silenciats, i veure si els antígens glucídics han variat. El fet que les sialyltransferases (ST3Gal III i ST3Gal IV) estiguin silenciades, podria provocar que altres glycosyltransferases (incloses altres sialyltransferases) que normalment competeixen pel mateix substrat, puguin donar lloc a altres epítops.

En la figura 7, es representa el funcionament (poc detallat) i el tipus de resultat que proporciona la citometria de flux. Prèviament a passar les cèl·lules pel citòmetre però, s'han d'haver marcat fluorescentment.

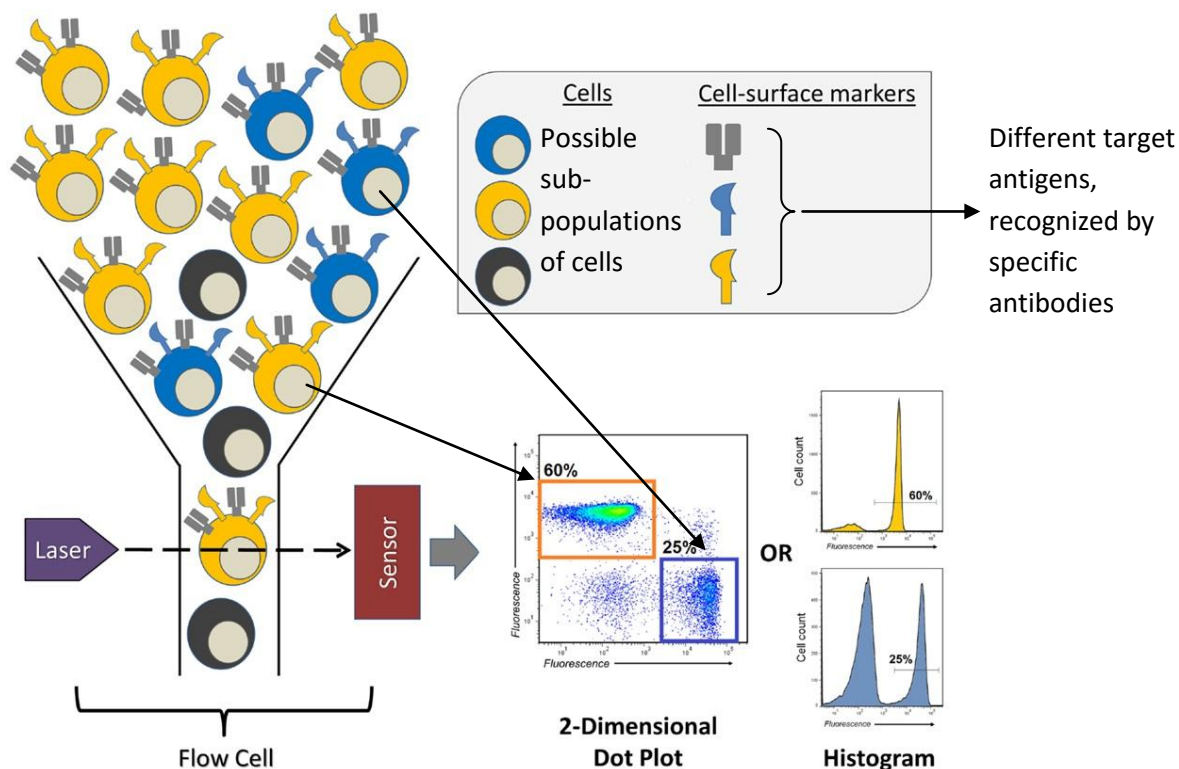


Figura 7. Funcionament i interpretació d'una citometria de flux. Com es veu en el dibuix, es passen les cèl·lules a través d'un làser. Com que les cèl·lules estan marcades amb anticossos específics marcats fluorescentment contra determinats antigens que es volen detectar, al passar pel làser emeten fluorescència a una longitud d'ona determinada. Al processar les dades, es pot fer un plot de punts en dos dimensions, o un histograma. Les poblacions poc marcades (a la cantonada inferior esquerra del dot plot) solen ser les cèl·lules mortes. Recuperat de http://www.frontiersin.org/files/Articles/154622/fimmu-06-00380-HTML/image_m/fimmu-06-00380-q001.jpg

El protocol per aquesta tècnica està establert en el grup de bioquímica de la UdG, així que el disseny s'ha basat en aquesta informació prèvia [34]: es tripsinitzen les cèl·lules en cultiu i es compten. Es disposen en tubs eppendorf, on s'afegeix un anticòs primari en solució. En el cas concret d'aquest treball, els anticossos primaris utilitzats serien: monoclonal de ratolí KM93 dilució 1/40 en PBS 1% BSA [34], que és específic per l'epítip SLeX, i monoclonal de ratolí KM231 dilució 1/20 en PBS 1% BSA [34], específic per l'epítip SLeA. Després d'una incubació de 30 minuts a 4°C, es fa un rentat amb PBS, i se centrifuguen els tubs, per fer que les cèl·lules quedin al pellet. En retirar el sobrenedant, s'afegeix una solució amb l'anticòs secundari marcat fluorescentment, en aquest cas, Goat anti-mouse marcat amb el compost Alexa Fluor 488 [34]. Es repeteixen el processos d'incubació i rentat anteriors. Finalment, es passen pel citòmetre (figura 7).

El número de cèl·lules en cada eppendorf, hauria de ser de la vora de $2 \cdot 10^5$ - $5 \cdot 10^5$, per assegurar que encara que es perdin cèl·lules en els rentats, n'hi hagi suficient per la citometria. D'aquesta mostra, el citòmetre n'ha de comptar aproximadament $2 \cdot 10^4$, per tenir un resultat robust. En cas que els resultats siguin difícils d'interpretar (moltes cèl·lules mortes, molt soroll de fons, massa poc senyal, etc.) s'hauria d'ajustar el nombre de cèl·lules d'entrada.

Finalment cal apuntar que la intenció inicial seria fer l'experiment amb els anticossos primaris, anti-SLeX i anti-SLeA. Si els resultats fossin rellevants, i hi haguessin diferències entre les diferents línies, podria ser interessant plantejar experiments amb altres anticossos contra altres antígens glucídics, o lectines específiques contra certes estructures glucídiques, per veure quins epítops divergeixen a causa de la manca de les sialyltransferases [34].

Viabilitat – MTT

El fet que molts antígens glucídics (i en concret, els antígens Lewis) juguen un rol important en l'adhesió cel·lular i el contacte cèl·lula-cèl·lula [35], fa interessant comprovar que la mancança d'aquests enzims no sigui un compromís per la seva viabilitat. Amb aquesta finalitat, doncs, es proposa dur a terme un assaig MTT.

Els assaigs MTT es basen en la capacitat de metabolitzar aquest compost (MTT) per donar com a producte formazans, que poden ser detectats colorimètricament [36]. Malgrat no és un indicador directe de proliferació, sí que indica la proporció de cèl·lules metabòlicament actives. Per tant, permetrà estimar l'estat de les cèl·lules.

El procediment es descriu breument en la figura 8, on apareixen en ordre els passos clau de l'experiment.

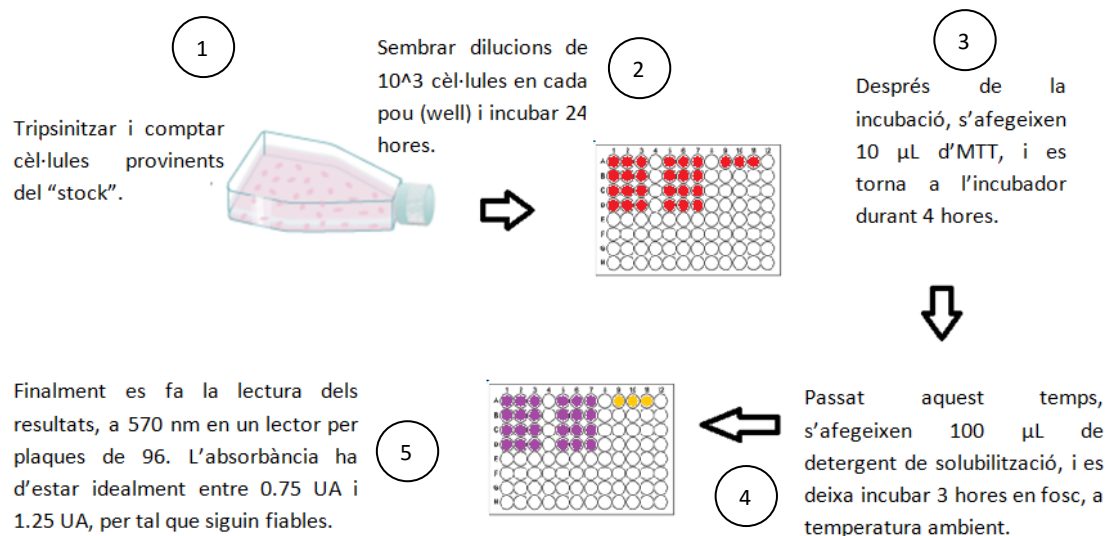


Figura 8. Esquema del procediment per l'assaig MTT. Figuren les quantitats dels reactius més rellevants, així com els temps d'incubació. A menys que s'indiquin condicions especials, es considera incubació a 37°C (amb les condicions d'humitat i pressió parcial de CO_2 adequades pel cultiu). En el pas 2, se simbolitza la sembra amb els medis, i la distribució correspon als triplicats i als diferents grups de línies cel·lulars (tumor primari i metàstasi separades per una columna en blanc). En el pas 5 es representa la metabolització de l'MTT (pous de color lila) i els blancs (pous taronges).

Reprement punts anteriors del treball, cal recordar que es parteix de diverses línies cel·lulars, i per cada una d'elles, hi ha els corresponents grups experimentals, que són: cèl·lules silenciades per ST3GAL3, cèl·lules silenciades per ST3GAL4, cèl·lules silenciades per ambdós gens, i cèl·lules no silenciades, o parentals.

Així doncs, en la figura 8 es representa la distribució d'aquests grups en la placa, per triplicat, tot i que fer quintuplicats també és molt recomanable.

Les condicions que apareixen en la mateixa figura 8 s'han establert gràcies a diferents articles [34] [36] i/o protocols de pàgines web [37], ajustant les condicions al cas concret de cèl·lules d'adenocarcinoma.

Cal tenir en compte algunes consideracions per optimitzar les condicions. És necessari sembrar relativament poques cèl·lules, que puguin proliferar i arribar a un estat força actiu metabòlicament. Si se sembren moltes cèl·lules inicialment, es pot produir inhibició del metabolisme per contacte. Per tal que això no succeeixi, s'haurien de tenir en compte els ràtios de creixement de cada línia, per tal de preveure el moment de la

sembla i que es puguin determinar diferències en el creixement a l'hora de realitzar l'assaig MTT.

Altres aspectes importants a tenir en compte són les concentracions de l'MTT. Alguns protocols fan esment a la proporció d'MTT i el detergent de solubilització dels cristalls [37], que s'ha de mantenir en 1:10 (en general, 100 µL de detergent per 10 µL d'MTT). Finalment, i tal com es marca en la figura 8, el rang llegit a l'espectrofotòmetre ha d'estar comprès entre 0.75 UA i 1.25 UA.

En cas d'obtenir valors fora d'aquest interval, caldria repetir l'experiment, ajustant el temps d'incubació dels reactius, la seva concentració, o la concentració inicial de cèl·lules sembrades.

Caracterització del fenotip metastàtic

En acabat, després d'assegurar que hi ha hagut un correcte silenciament, i que aquest ha suposat una reducció dels antígens SLeX i/o SLeA, cal descriure les diferències fisiològiques i/o fenotípiques entre les cèl·lules silenciades i les parentals. Per aquest motiu, es defineixen dos experiments que permetin establir una relació entre la capacitat metastàtica i la falta de sialyltransferases, si la hi ha.

Migració

La capacitat de migració és una altra de les principals característiques de les cèl·lules metastàtiques. A continuació, es desenvolupen dos experiments que ofereixen resultats sobre aquest paràmetre.

Migració – Wound Healing

El *wound healing* és un experiment senzill, pel qual es pot estimar la velocitat de migració de les cèl·lules. Tal com es veu en la figura 9, es fan "ferides" amb una punta de pipeta a plaques en cultiu confluent. Posteriorment, s'espera que aquesta ferida es tanqui, a causa de la migració de les cèl·lules cap a aquest punt [38].

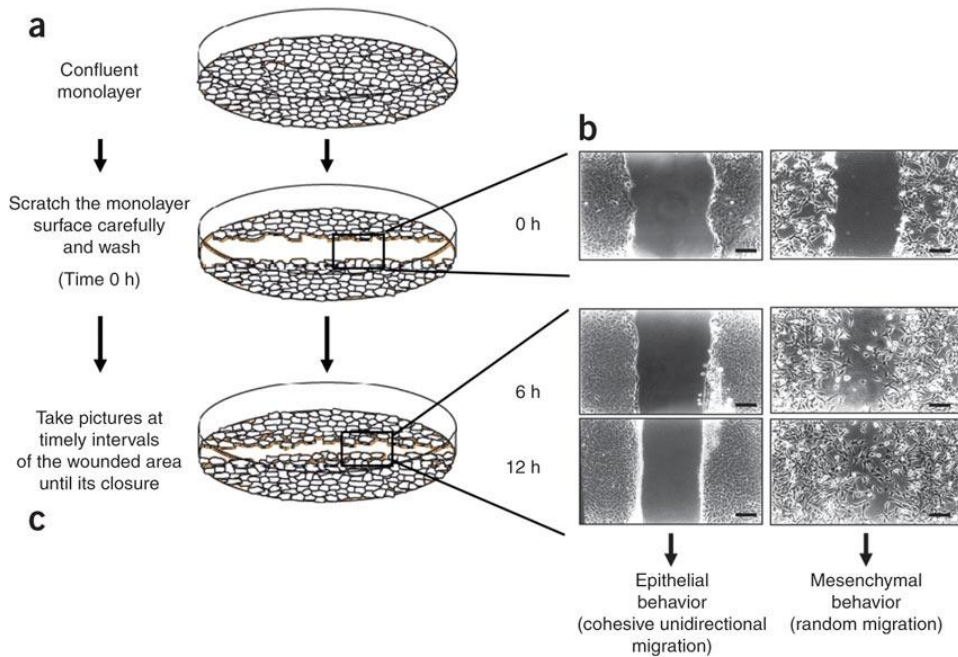


Figura 9. Assaig "wound healing". Es parteix d'un cultiu confluent (a) i se li provoca una ferida amb una punta de pipeta (b). Per mesurar la migració, es prenen fotografies periòdicament al microscopi (c), i amb programes com Image J es pot fer una estimació de la velocitat de migració de les cèl·lules [40]. Recuperat de https://www.researchgate.net/figure/38015722_fig4_Figure-5-Wound-healing-assayThis-assay-permits-analysis-of-the-motile-cell-behavior

Els resultats són visuals: es prenen fotografies al microscopi invertit, periòdicament. Si es processen les imatges amb programes com *Image J*, es pot estimar la velocitat de migració de les cèl·lules [39]. Per tal que el processament de les dades sigui adequat, i la interpretació dels resultats sigui correcta, s'han de tenir en compte diferents aspectes [40]:

La ferida s'ha de fer amb una punta groga de pipeta, i en un angle aproximat d'uns 30°. Això permetrà, que la ferida no sigui massa gran i es pugui tancar, i a més, es podran veure al microscopi els dos costats de la ferida (molt important pel pas de processar les imatges informàticament). Cal afegir, que el temps de tancament de la ferida no pot ser gran (d'un dia o més), ja que llavors la pròpia proliferació de les cèl·lules estaria tapant la ferida, i faria invàlids els resultats.

Migració – Well migration

De manera complementària al *wound healing*, existeix la possibilitat de fer un assaig de migració amb *transwells*. Aquests suports, són uns "inserts" que es col·loquen

sobre pous de plaques (generalment de 24 o 96 pous). Aquest insert té una membrana amb porus que deixen passar les cèl·lules. En la figura 10, en el primer pas, apareix un dibuix de l'insert, i l'insert dins d'un dels pous de la placa.

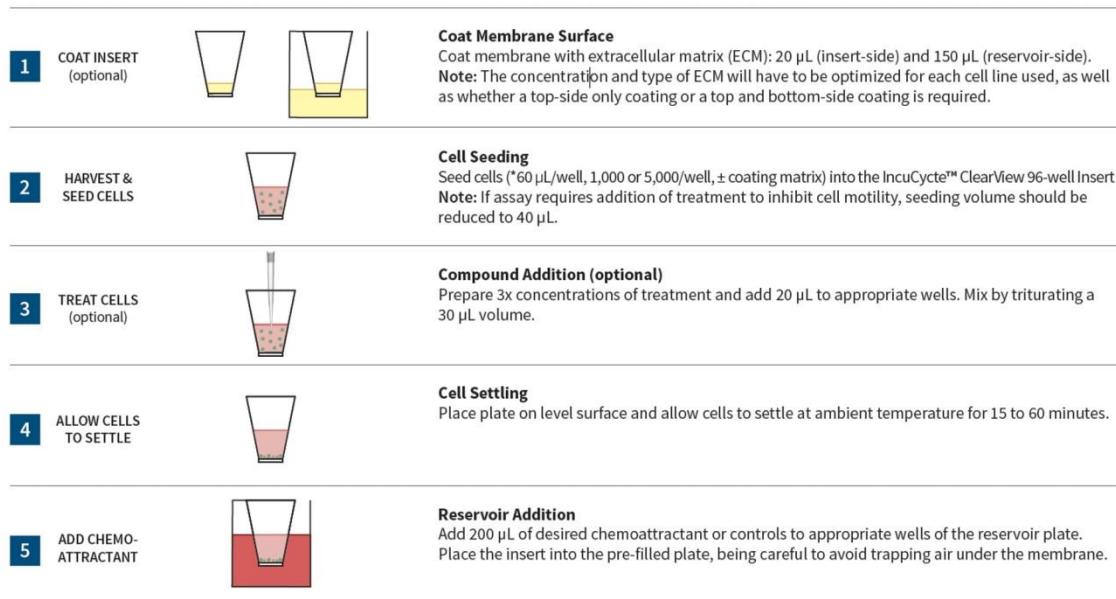


Figura 10. Esquema del procediment d'un assaig de migració in vitro amb transwells. Primerament s'obtenen inserts revestits amb matriu extracel·lular (per exemple, col·lagen I). Després es sembren les cèl·lules (prèviament tripsinitzades i comptades) i es deixa que s'adhereixin al fons de l'insert, i que migrin pels porus del mateix, gràcies a l'addició d'un quími-atraient. Recuperat de <http://www.essenbioscience.com/media/assets/ec/ef1cc98791be90c7a71aac2c83961ca162a586.jpg>

Per procedir amb l'assaig de migració, es proposa utilitzar inserts revestits amb col·lagen tipus I, ja que s'ha descrit que aquest facilita l'adhesió i la migració de les cèl·lules [41].

El nombre de cèl·lules sembrades i el temps d'incubació, varia molt en funció de les línies cel·lulars [20] [34], així que inicialment es provaria amb $2.5 \cdot 10^4$ cèl·lules per well amb 6 hores d'incubació, ja que són condicions comunes en diferents línies cel·lulars de diferents treballs [20] [34]. Caldria ajustar el temps empíricament en funció dels resultats que donés el primer assaig.

El medi que caldria utilitzar en els inserts (plaques de 24) són 300 µL de DMEM. En els pouets de les plaques es posa DMEM amb 1% FBS, que actua com a quími-atraient (a causa dels factors de creixement que conté). Per dur a terme el control negatiu,

s'utilitzaria DMEM sense FBS tant en l'insert com en els fons dels pouets, figura 10 [20].

Finalment, es retiren les cèl·lules que no s'han adherit mitjançant un rentat, per a la lectura dels resultats. Es realitza una fixació de les cèl·lules migrades amb colorant (com el cristall violeta [42], o hematoxicilina-eosina [34]) i es compten al microscopi invertit per camps (a 40X). Es fa la mitjana dels camps, i es fan els càlculs pertinents per estimar el nombre de cèl·lules per pou. També es pot realitzar l'assaig MTT de viabilitat cel·lular. Els resultats s'expressarien idealment com a la mitjana (dels triplicats) de cèl·lules per pou.

Adherència

L'últim protocol que es presenta en aquest disseny és un assaig d'adhesió a elements de la matriu extracel·lular. Una de les propietats més comunes en les cèl·lules amb capacitat metastàtica, és la facilitat d'enganxar-se a diferents components de la matriu extracel·lular presents, o a l'endoteli dels vasos sanguinis (les cèl·lules endotelials expressen selectines en la seva membrana, com s'ha explicat prèviament en la introducció).

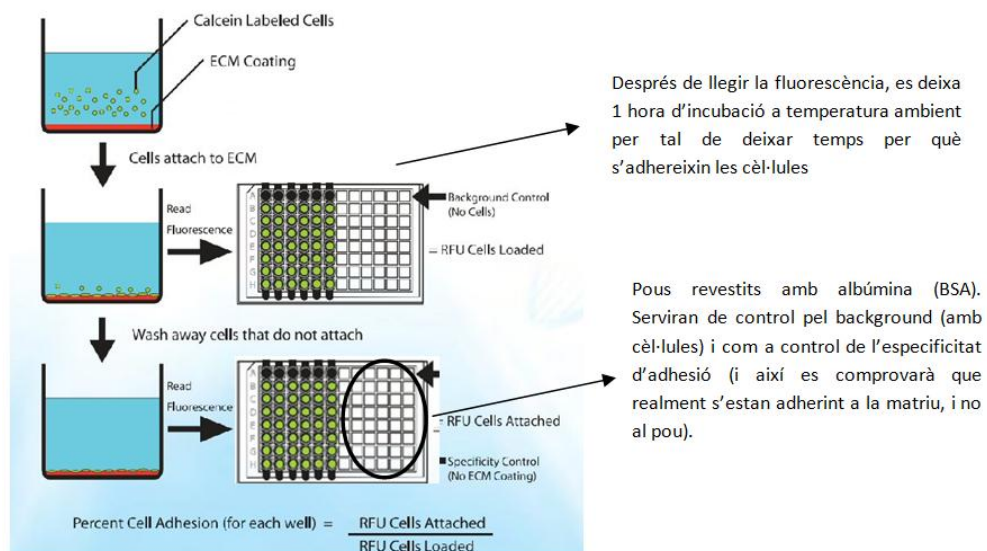


Figura 11. Assaig d'adhesió. Per tal d'adaptar el disseny i que sigui òptim per l'objectiu del treball, s'han introduït algunes modificacions en base a protocols d'articles [34]. En la imatge figura el procés bàsic: revestiment dels pous amb una matriu proteica, sembra de cèl·lules marcades fluorescentment, lectura de la fluorescència, rentat de les cèl·lules no adherides i segona lectura. Imatge original recuperada de <http://www.amsbio.com/images/stemcells/Cell%20Adhesion%20Assay.jpg>.

Per avaluar aquesta propietat de manera experimental, el disseny proposat és el de la figura 11.

Tal com es pot apreciar en la figura 11, el primer que es fa és incubar les plaques de 96 pouets amb una solució que conté components de la matriu extracel·lular, en especial proteïcs (en la figura 11, *ECM coating*). Les dues proteïnes que es proposa utilitzar són la fibronectina i el col·lagen tipus I, que són les típiques proteïnes presents en la matriu extracel·lular de l'adenocarcinoma pancreàtic [43]. Com a control negatiu, la meitat dreta de les plaques es revestiria amb albúmina (BSA). La concentració de les proteïnes per revestir els pous ha d'estar dintre d'un rang de 1-20 µg/mL en 100 µL [44]. En aquest cas, es faran servir 10 µg/mL [12].

Un cop s'han revestit els pous amb les proteïnes corresponents (durant 10 minuts a 37°C [12]) se sembren $4 \cdot 10^4$ cèl·lules a cada pou [12]. Cal fixar-se que les cèl·lules sembrades porten un component fluorescent (calceïna, figura 11), per tal de facilitar-ne el comptatge posteriorment. Per marcar les cèl·lules amb calceïna, existeixen diversos *kits* dels quals se'n pot consultar el protocol [45]. Abans d'incubar les cèl·lules perquè s'adhereixin, es fa una primera lectura de la fluorescència, que correspondrà a la fluorescència màxima, és a dir, les cèl·lules totals carregades (*cells loaded*, figura 11). Aquesta lectura serà imprescindible per a la normalització de les dades.

Un cop s'han incubat les cèl·lules (durant una hora a temperatura ambient), es retiren les que no s'han adherit. Per fer-ho, es realitzen 2 rentats amb PBS. Finalment, es fa la segona lectura de fluorescència, i es pot calcular la ràtio entre cèl·lules sembrades i les cèl·lules adherides (figura 11).

5. Conclusions

Glycobiology and, in particular, the study of sialyltransferases ST3Gal III and ST3Gal IV and their importance in pancreatic cancer is a relatively recent field of study. Still, the number of publications has greatly increased over the past years, so the available information has been enough to support and perform the experimental design.

Many of the reviewed works centre its attention in other glycosylated antigen synthesis pathways, especially the action of fucosyltransferases. The bibliography referring to ST3Gal III and ST3Gal IV, their functions and roles in sialyl antigens' synthesis, and other features is limited, in the context of pancreatic cancer. In spite of that fact, the experimental design has been successfully established, as protocols and relevant information of every experiment could be found. In addition, some resources were available from UdG's Biochemistry research group, having especial support from two doctoral theses (referenced properly during the work [\[12\]](#) [\[34\]](#)).

On the other hand, setting the conditions has not been easy, most of the conditions should be optimised when performing real experiments. In this sense, it is important to adapt incubation times, reagents' concentration and other considerations exposed in this work, according to the possible unexpected events (such as incoherent, too low or too high values in the assays), the cell lines used and their features (growth rate, for instance).

In summary, defining an experimental design, stating every important point and possible variation of protocols, like number of cells seeded in every well, appears to be easier than done. Even having reference articles of the Biochemistry's group, numerous sources have been consulted, in search for such details and level of concretion. In other words, research literally implies re-searching, over and over, to obtain better results and knowledge.

6. Ètica i sostenibilitat

La perspectiva d'eradicar el càncer, una de les principals causes de mort arreu del món, és una motivació més que temptadora per emprendre un projecte.

A part dels beneficis a nivell sanitari i de qualitat de vida dels pacients, la cura de malalties com aquesta suscita l'interès d'altres fins més obscurs, com és el potencial econòmic que suposaria llençar fàrmacs o teràpies efectives al mercat.

A nivell personal i del meu treball, es tracta d'un petit projecte molt focalitzat a l'estudi concret dels mecanismes de metàstasi d'un dels càncers amb major índex de mortalitat, l'adenocarcinoma de pàncrees. Així doncs, malgrat les possibles aplicacions que podria plantejar (com per exemple, el disseny de noves estratègies terapèutiques), les úniques pretensions que té és aportar més coneixement.

Per bé que la recerca proposada no té intencions de suposar un gran avenç en l'àmbit sanitari a causa del seu objectiu tan concret, sí que són necessàries aportacions d'aquest tipus en la ciència. Petites fites factibles, sense pressupostos desmesurats, i que acabin generant un impacte beneficiós en la societat en el seu conjunt.

En el cas concret del camp definit en aquest treball: l'estudi i comprensió dels mecanismes de metàstasi de l'adenocarcinoma pancreàtic, podrien suposar un augment significatiu en l'esperança de vida dels pacients que, en gran part, moren per la formació de múltiples metàstasis derivades del tumor primari.

Un problema addicional de la recerca és l'ús de reactius de difícil eliminació, i que suposen un problema a nivell de medi ambient. En aquest sentit, l'important és ser conscients dels perills dels reactius que s'utilitzen i els protocols de gestió dels residus adequats.

Cal afegir, a més, l'ètica associada a l'ús de models animals, que en general ofereixen resultats més aproximats a la realitat, i que en ocasions són difícils de substituir.

Molts científics han declarat la seva oposició al mal ús d'animals com a models, i al sacrifici indegut dels mateixos. Per aquest motiu, el plantejament del treball es basa en models *in vitro* que respectin al màxim el benestar dels animals, i a minimitzar sacrificis, fent ús de cèl·lules fàcilment manipulables i renovables.

Així doncs, i en conclusió, és difícil traçar la línia entre el coneixement i els interessos que el mouen, així com és difícil idear experiments que garanteixin bons resultats alhora que respecten les qüestions ètiques que puguin despertar. Malgrat això i al meu entendre, és responsabilitat de qualsevol investigador plantejar-se on li queda aquesta línia, i si es pot permetre o no creuar-la.

7. Bibliografia

- 1 Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(1), 5–29. <http://doi.org/10.3322/caac.21254>
- 2 Sarrats Carbó, A. (2010). *Glycan alterations of serum proteins as tumour markers Prostate-specific antigen in prostate cancer and acute-phase proteins in pancreatic cancer*. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10803/31943>
- 3 University of Southern California, Department of Surgery. Diagnosis, staging and treatment for adenocarcinoma of the pancreas. Retrieved May 21, 2016, from USC Center for Pancreatic and Biliary Diseases, <http://www.surgery.usc.edu/divisions/tumor/pancreasdiseases/web%20pages/pancreas%20cancer/Adenocarcinoma%20of%20pancreas.html>
- 4 Ryan, D. P., Hong, T. S., & Bardeesy, N. (2014). Pancreatic Adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine*, 371(11), 1039–1049. <http://doi.org/10.1056/NEJMra1404198>
- 5 Hermann, P. C., Huber, S. L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J. W., Guba, M., ... Heeschen, C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 1(3), 313–23. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2007.06.002>
- 6 Yoshihama, N., Yamaguchi, K., Chigita, S., Mine, M., Abe, M., Ishii, K., ... Sugiura, T. (2015). A Novel Function of CD82/KAI1 in Sialyl Lewis Antigen-Mediated Adhesion of Cancer Cells: Evidence for an Anti-Metastasis Effect by Down-Regulation of Sialyl Lewis Antigens. *PLoS One*, 10(4), e0124743. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0124743>
- 7 Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyazaki, K., & Kimura, N. (2004). Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Science*, 95(5), 377–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15132763>

- 8 Takada, A., Ohmori, K., Takahashi, N., Tsuyuoka, K., Yago, A., Zenita, K., ... Kannagi, R. (1991). Adhesion of human cancer cells to vascular endothelium mediated by a carbohydrate antigen, sialyl Lewis A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 179(2), 713–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1716885>
- 9 Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., ... Etzler, M. E. (2009). *Essentials of Glycobiology* (2nd ed.). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1908/>
- 10 Narayanan, S. (1994). Sialic acid as a tumor marker. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 24(4), 376–384. Retrieved from <http://www.annclinlabsci.org/content/24/4/376.short>
- 11 Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M.-A., Samyn-Petit, B., Julien, S., & Delannoy, P. (2001). The human sialyltransferase family. *Biochimie*, 83(8), 727–737. [http://doi.org/10.1016/S0300-9084\(01\)01301-3](http://doi.org/10.1016/S0300-9084(01)01301-3)
- 12 Bassagañas i Puigdemont, S. (2015). *Regulation and function of sialyltransferases in pancreatic cancer*. Universitat de Girona. Retrieved from <http://www.tdx.cat/handle/10803/285783>
- 13 Pérez-Garay, M., Arteta, B., Pagès, L., de Llorens, R., de Bolòs, C., Vidal-Vanaclocha, F., & Peracaula, R. (2010). alpha2,3-sialyltransferase ST3Gal III modulates pancreatic cancer cell motility and adhesion in vitro and enhances its metastatic potential in vivo. *PLoS One*, 5(9). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0012524>
- 14 Balmaña, M., Sarrats, A., Llop, E., Barrabés, S., Saldova, R., Ferri, M. J., ... Peracaula, R. (2015). Identification of potential pancreatic cancer serum markers: Increased sialyl-Lewis X on ceruloplasmin. *Clinica Chimica Acta*, 442, 56–62. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2015.01.007>
- 15 Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Takahashi, K., Moriya, S., & Miyagi, T. (2011). Regulation of sialyl Lewis antigen expression in colon cancer cells by sialidase NEU4. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(24), 21052–61. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.231191>
- 16 Hosono, J., Narita, T., Kimura, N., Sato, M., Nakashio, T., Kasai, Y., ... Kannagi, R. (1998). Involvement of adhesion molecules in metastasis of SW1990, human pancreatic cancer cells. *Journal of Surgical Oncology*, 67(2), 77–84. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9098\(199802\)67:2<77::AID-JSO2>3.0.CO;2-I](http://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9098(199802)67:2<77::AID-JSO2>3.0.CO;2-I)
- 17 Peracaula, R., Tabarés, G., López-Ferrer, A., Brossmer, R., de Bolós, C., & de Llorens, R. (2005). Role of sialyltransferases involved in the biosynthesis of Lewis antigens in human pancreatic tumour cells. *Glycoconjugate Journal*, 22(3), 135–44. <http://doi.org/10.1007/s10719-005-0734-2>

- 18 Kim, Y. S., Itzkowitz, S. H., Yuan, M., Chung, Y., Satake, K., Umeyama, K., & Hakomori, S. (1988). Lex and Ley antigen expression in human pancreatic cancer. *Cancer Research*, 48(2), 475–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3335015>
- 19 Sinn, H. P., Brown, S. A., Oberle, E., & Thompson, J. S. (1992). Analysis of the Lewisx epitope in human pancreas and pancreatic adenocarcinomas. *International Journal of Pancreatology: Official Journal of the International Association of Pancreatology*, 11(2), 125–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1376758>
- 20 Pérez-Garay, M., Arteta, B., Llop, E., Cobler, L., Pagès, L., Ortiz, R., ... Peracaula, R. (2013). α 2,3-Sialyltransferase ST3Gal IV promotes migration and metastasis in pancreatic adenocarcinoma cells and tends to be highly expressed in pancreatic adenocarcinoma tissues. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(8), 1748–57. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.05.015>
- 21 Zhang, X., Bogorin, D. F., & Moy, V. T. (2004). Molecular basis of the dynamic strength of the sialyl Lewis X--selectin interaction. *Chemphyschem: A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry*, 5(2), 175–82. <http://doi.org/10.1002/cphc.200300813>
- 22 Weitz-Schmidt, G., Stokmaier, D., Scheel, G., Nifant'ev, N. E., Tuzikov, A. B., & Bovin, N. V. (1996). An E-selectin binding assay based on a polyacrylamide-type glycoconjugate. *Analytical Biochemistry*, 238(2), 184–90. <http://doi.org/10.1006/abio.1996.0273>
- 23 Takada, A., Ohmori, K., Yoneda, T., Tsuyuoka, K., Hasegawa, A., Kiso, M., & Kannagi, R. (1993). Contribution of Carbohydrate Antigens Sialyl Lewis A and Sialyl Lewis X to Adhesion of Human Cancer Cells to Vascular Endothelium. *Cancer Res.*, 53(2), 354–361. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/53/2/354.short>
- 24 Wang, P.-H., Li, Y. F., Juang, C.-M., Lee, Y.-R., Chao, H.-T., Ng, H.-T., ... Yuan, C.-C. (2002). Expression of Sialyltransferase Family Members in Cervix Squamous Cell Carcinoma Correlates with Lymph Node Metastasis. *Gynecologic Oncology*, 86(1), 45–52. <http://doi.org/10.1006/gyno.2002.6714>
- 25 Crow, E., behura, sasmita, & Porterfield, A. (2013, May 1). *What's in a number: Getting the right passage in cell culture*. Retrieved May 24, 2016, from Cells and Model Organisms, <http://bitesizebio.com/13685/cell-culture-passage-number-explained/>
- 26 Universidad del País Vasco. Retrieved May 23, 2016, from Universidad del País Vasco, http://www.ehu.eus/biofisica/juanma/mbb/pdf/cultivo_celular.pdf
- 27 ATCC. (2010). *Passage number effects in cell lines*. Retrieved from <https://www.atcc.org/~media/PDFs/Technical%20Bulletins/tb07.ashx>

- 28 Briske-Anderson, M. J., Finley, J. W., & Newman, S. M. (1997). The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* (New York, N.Y.), 214(3), 248–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9083258>
- 29 Research Gate. (2014, May 21). *Is it important to know how many passages of the cell line have..* Retrieved May 24, 2016, from https://www.researchgate.net/post/Is_it_important_to_know_how_many_passages_of_the_cell_line_have_passed
- 30 Yokoyama, W. M. (2001). Cryopreservation of cells. *Current Protocols in Immunology / Edited by John E. Coligan ... [et Al.], Appendix 3, Appendix 3G.*
- 31 BioRad. *Protein Blotting Guide (Bulletin 2895).* Retrieved May 25, 2016, from http://zxsyst.med.stu.edu.cn/upload/file/artdir/Bulletin_2895.pdf
- 32 Abcam plc. (2016, May 25). *Buffers and stock solutions for western blot.* Retrieved May 25, 2016, from <http://www.abcam.com/protocols/buffer-and-stock-solutions-for-western-blot#8>
- 33 ThermoFisher. (2013, May 8). *Chemiluminescent western blotting.* Retrieved May 25, 2016, from ThermoFisher Scientific, <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemiluminescent-western-blotting.html>
- 34 Pérez Garay, M. (2011). *Role of alpha-2,3-sialyltransferases ST3Gal III and ST3Gal IV in pancreatic ductal adenocarcinoma.* Universitat de Girona. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10803/7644>
- 35 Fukuda, M., Hiraoka, N., & Yeh, J. C. (1999). C-type lectins and sialyl Lewis X oligosaccharides. Versatile roles in cell-cell interaction. *The Journal of Cell Biology*, 147(3), 467–70. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2151194&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 36 Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). *Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual.* Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>
- 37 ATCC. *MTT Cell proliferation assay.* Retrieved May 26, 2016, from ATCC, <http://www.atcc.org/~media/DA5285A1F52C414E864C966FD78C9A79.ashx>
- 38 Zordan, M. D., Mill, C. P., Riese, D. J., & Leary, J. F. (2011). A high throughput, interactive imaging, bright-field wound healing assay. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 79(3), 227–32. <http://doi.org/10.1002/cyto.a.21029>

- 39 Liang, C.-C., Park, A. Y., & Guan, J.-L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, 2(2), 329–33. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
- 40 University of Leicester. (2016, January 21). *Wound healing assay — university of Leicester*. Retrieved May 24, 2016, from <http://www2.le.ac.uk/colleges/medbiopsych/facilities-and-services/cbs/lite/aif/tips-and-tricks-1/wound-healing-assay>
- 41 Senger, D. R., Perruzzi, C. A., Streit, M., Koteliansky, V. E., de Fougères, A. R., & Detmar, M. (2002). The alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. *The American Journal of Pathology*, 160(1), 195–204. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1867136&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 42 Olasso, E., Salado, C., Egilegor, E., Gutierrez, V., Santisteban, A., Sancho-Bru, P., ... Vidal-Vanaclocha, F. (2003). Proangiogenic role of tumor-activated hepatic stellate cells in experimental melanoma metastasis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 37(3), 674–85. <http://doi.org/10.1053/jhep.2003.50068>
- 43 Venkatasubramanian, P. N. (2012). Imaging the pancreatic ECM. Transworld Research Network. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98936/>
- 44 Humphries, M. J. (2001). Cell adhesion assays. *Molecular Biotechnology*, 18(1), 57–61. <http://doi.org/10.1385/MB:18:1:57>
- 45 Trevigen. *Calcein AM Viability Assay Kit, # 4892-010-K*. Retrieved May 24, 2016, from https://www.trevigen.com/docs/protocol_4892-010-K.pdf?guid=1444671373