



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**TESI DOCTORAL
FACULTAT DE MEDICINA**

PROGRAMA DE DOCTORAT

ORGANOGENÈSI I ANATOMIA CLÍNICA I APLICADA
BIENNI 2002-2004

**ESTUDI DEL GEN SONIC HEDGEHOG (Shh) I DELS GENS DE
LA FAMÍLIA CEACAM DURANT L'EMBRIOGÈNESI DEL
CÒLON HUMÀ I LA SEVA IMPLICACIÓ EN EL
DESENVOLUPAMENT DEL CÀNCER COLORECTAL**

**Director Tesi
Dr. Mariano Monzó Planella**

**Rosa Artells i Prats
Barcelona, Gener de 2008**

5.- MATERIAL I MÈTODES

5.1. Mostres embrionàries

Els embrions i fetus utilitzats han estat donats al Servei de Donació de Cossos del Departament d'Anatomia i Embriologia Humana de la Facultat de Medicina-UB, previ consentiment patern, i han estat utilitzats per la realització d'estudis morfològics i moleculars. Les mostres inclouen 10 còlons de la setmana 7 de desenvolupament fins a la setmana 12. Per la correcta determinació de l'edat gestacional s'ha realitzat un anàlisi vèrtex-coccix a més de tenir en compte les dades ecogràfiques. Les mostres de còlon s'han obtingut utilitzant tècniques de microdissecció utilitzant un microscopi model Olympus SZ61, i les mostres s'han conservat en nitrogen líquid i han estat congelades a -80° fins la seva utilització.

5.2. Mostres de teixit tumoral i teixit normal

L'estudi ha estat realitzat en 126 mostres quirúrgiques de pacients afectes de càncer colorectal operats i tractats a l'Hospital Municipal de Badalona entre el mes d'agost de l'any 2002 fins l'agost de l'any 2004. Tots els pacients han donat el seu consentiment per a la realització de l'esmentat estudi.

De cada pacient obtenim una mostra de teixit tumoral (MT) i una mostra de teixit normal (TN) que són conservades en nitrogen líquid a -80° fins a la seva utilització. En total tenim 63 mostres de MT i 63 mostres de TN

5.3. Anàlisi morfològic de les mostres embrionàries

5.3.1. Estudi ultraestructural

Per microscòpia electrònica de transmissió (TEM), les mostres embrionàries de 7 a 12 setmanes de desenvolupament s'han fixat en una solució al 2% de paraformaldehid i 2,5% de gluteraldehid en buffer fosfat al 0,1% (pH7,2); postfixades en tetròxid d'osmi (1%), deshidratades en acetones de graduació creixent i submergides en resina Suprr. Els talls fins (0.5-1µm) han estat utilitzats per seleccionar les zones a explorar mitjançant el microscopi electrònic. Els talls ultrafins (60-80nm) han estat tallats utilitzant un ultramicròtom (Leica UCT) i utilitzant ganiveta de diamant

(Diatome). Aquests talls ultrafins han estat muntats en reixetes de coure i tenyides posteriorment amb Acetal d'Uranil al 2% durant 10 minuts i després amb citrat de plom durant 20 minuts. L'anàlisi ultraestructural s'ha realitzat utilitzant l'aparell Jeol EM1010, treballant a 80kV i utilitzant una càmera digital, del model Bioscan812 (Gatan).

Les mostres embrionàries que hem utilitzat per fer l'observació amb microscopi electrònic d'escaneig (SEM) han estat fixades en una solució que consisteix en 2,5% gluteraldèhid en buffer fosfat al 0,1% (pH7,2); post-fixades en tetròxid d'osmi (1%) en el mateix buffer fosfat utilitzat anteriorment; deshidratades en alcohol i processades segons el seu punt crític d'assecat (Polaron). Les mostres s'han observat en el model Zeiss DSM 940A treballant a 10kV.

5.3.2. Estudi Immunohistoquímic

Amb la finalitat de detectar la presència de Shh durant el desenvolupament del còlon embrionari humà, s'ha utilitzat com a anticòs (Ab) primari un Ab policlonal de cabra; *Shh N-19* (CatNo. SC-1194 goat IgG - Sta. Cruz Biotechnology, Inc).

Per aplicar l'Ab secundari s'ha utilitzat el kit *ABC Staining System SC-2023* (*goat primary antibodies*) també de la casa comercial Sta. Cruz Biotechnology, Inc. S'han utilitzat talls d'hematoxilina/eosina (H/E) per tal de facilitar la localització de les estructures cel·lulars (figura 23)

5.4. Obtenció de RNAtotal (RNAt) i cDNA

L'extracció de RNAt teixits tumorals i normals, s'ha realitzat utilitzant el kit Qiagen (QIAamp RNA Blood mini Kit) i seguint el protocol (figura 24). La concentració total i puresa ha estat determinada mitjançant l'espectrofotòmetre (GeneQuant spectrophotometer) i tant la integritat com la qualitat de l'RNA extret s'han mesurat mitjançant electroforesi en gel d'agarosa a l'1%.

Un cop coneguda la concentració de RNA de cada mostra, hem realitzat la síntesi de cDNA mitjançant TaqMan Reverse Transcription Reagents Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) i mitjançant la tècnica de la RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction).

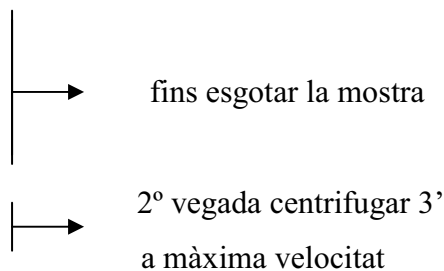
GOAT ABC KIT

1. Desparafinar fins H₂O D
2. H₂O₂ al 1% en PBS (ó H₂O D).....5-10'
3. Rentar en PBS.....3 x 5'
4. Sèrum Normal del 2º Ac 1,5% en PBS + Tween 20 0,5%.....1h a 40º
5. Eliminar l'excés de Sèrum eixugant NO RENTAR
6. Rentar en PBS
7. Desemmascament d'antigen amb Citrat Sòdic 10mM 30' a 96º
8. Ac 1ari apropiadament diluït apropiadament en
Sèrum Normal 1,5% en PBS 4ºC Overnight
9. Rentar en PBS 3 x 5'
10. Ac 2ari Biotinitzat diluït apropiadament en
Sèrum Normal 1,5% en PBS.....2h
11. Rentar en PBS..... 3 x 5'
12. A-B Complex 30'
13. Rentar en PBS 3 x 5'
14. Peroxidase Substrate (Pre-escalfat a 20-25ºC).....10'-15' (controlar al
microscopi)
15. Rentar en H₂O C 5'
16. Contratenyir amb Hematoxilina de Gill II 5''-10''
17. Rentar en H₂O D 5''-10''
18. Decolorar en alcohol HCl i rentar en H₂O C ... si cal
19. Deshidratar -- Aclarar -- Muntar

Figura 23: Protocol Tinció Immunohistoquímica

EXTRACCIÓ RNA de TEIXITS

1. Posar 20-30 mg de teixit en una placa Petri
2. Afegir 600 µl de BUFFER RLT + β-Mercaptoetanol a la placa
3. Triturar el teixit al màxim amb ajuda de bisturís
4. Pipetejar el lisat i passar-lo a una columna QIAshredder
5. Centrifugar a màxima velocitat durant 2'
6. DESCARTAR LA COLUMNA, guardar el líquid del centrifugat
7. Afegir el mateix volum d'Etanol al 70% que el que hem afegit de Buffer RLT+β – mercaptoetanol¹.
8. Pipetejar fins aconseguir una barreja homogènia. NO CENTRIFUGAR
9. Passar 700 µl de mostra a la columna QUIAAmp
(si s'han format precipitats també)
10. Centrifugar 15'' a 10.000 rpm
11. Descartar el líquid de centrifugat
o canviar la columna de tub
12. Afegir 700 µl de Buffer RW 1 a la columna.
13. Centrifugar 15'' a 10.000 rpm
14. Descartar el líquid de centrifugat
15. Afegir 500 µl de Buffer RPE a la columna.
16. Centrifugar 15'' a 8.000 rpm
17. Descartar el líquid de centrifugat
18. Centrifugar la columna buida a màxima velocitat 1'
19. Passar la columna a un eppendorf de 1,5 ml
20. Afegir 60µl d'aigua del kit a la columna
21. Centrifugar 1' a 10.000 rpm
22. Quantificar l'RNA
23. Guardar l'RNA congelat a -80°



Afegir 10µl de β-ME per 1 ml de Buffer RLT

Figura 24: Protocol d'extracció RNA de teixits

5.4.1. Base del funcionament de la RT-PCR

Aquesta tècnica ens permet l'amplificació d'una quantitat petita de RNA (tant si és mRNA com si és RNAt) mitjançant la transcripció reversa del RNA a cDNA, que posteriorment serà amplificat. La presència de RNA o DNA contaminant ha de ser evitada per tal d'impedir l'aparició de productes inespecífics (figura 25)

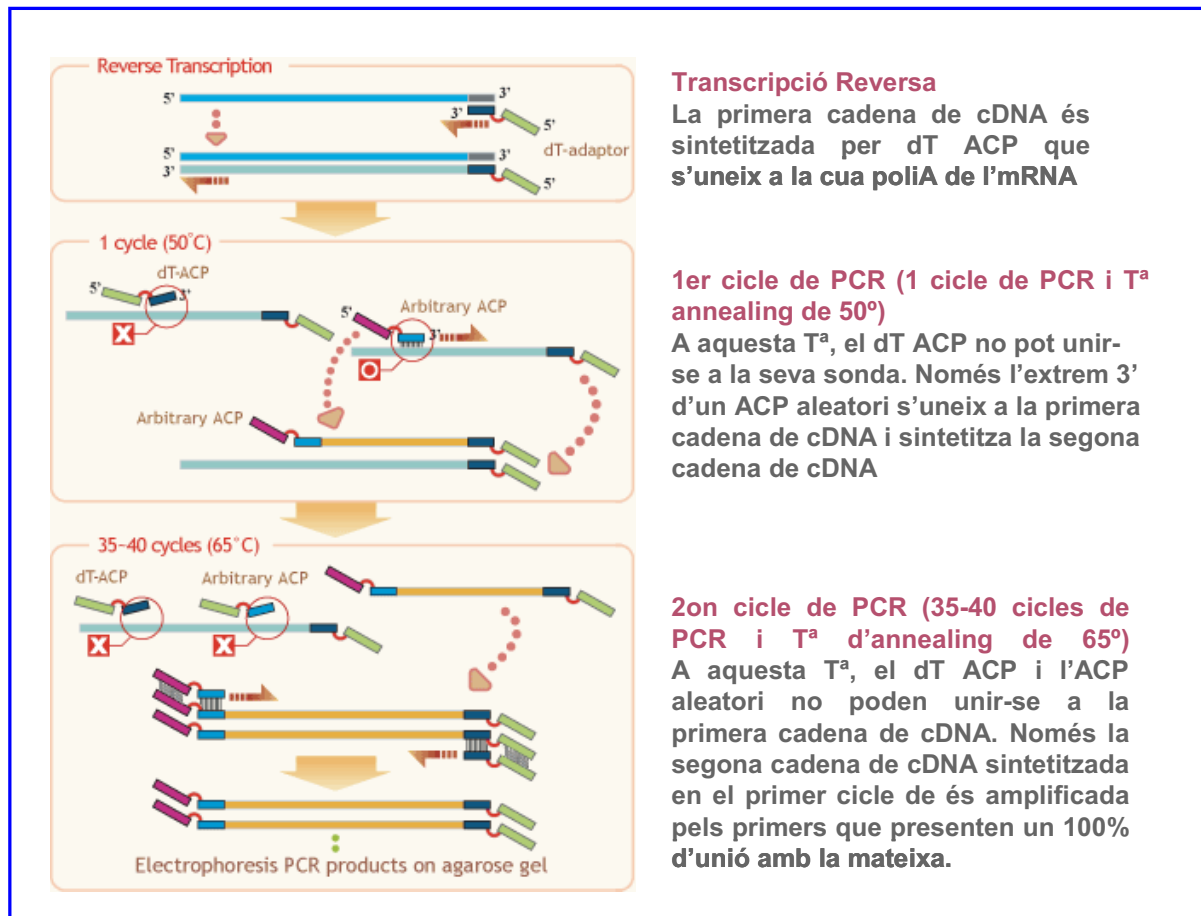


Figura 25: Esquema del funcionament de la RT-PCR.

Per fer la transcripció reversa hem utilitzat 330ng de RNAt de les nostres mostres així com 10µl TaqMan RT Buffer, 22µl (25mM) de Cl₂Mg, 20µl de dNTPs, 5µl de random hexàmers, 2µl de RNAsa inhibitor, 2,5µl de Multiscribe Reverse Transcription i H₂O lliure de RNAses fins a un volum final de 100µl. Les condicions utilitzades per a la realització de la PCR han estat: 10 minuts a 25°, 48 minuts a 30° i 5 minuts a 95°. Un cop obtingut el cDNA podem congelar-lo a -80° fins que es realitzin els diferents anàlisi, encara que posteriorment hem pogut comprovar que és millor realitzar la síntesi

de cDNA en el moment de la seva utilització ja que és una molècula que es degrada molt fàcilment i que per conservar les seves característiques només permet un cicle de congelació-descongelació.

5.5. Expressió i quantificació de mRNA mitjançant RT-qPCR

5.5.1. Bases del funcionament de la RT-QPCR.

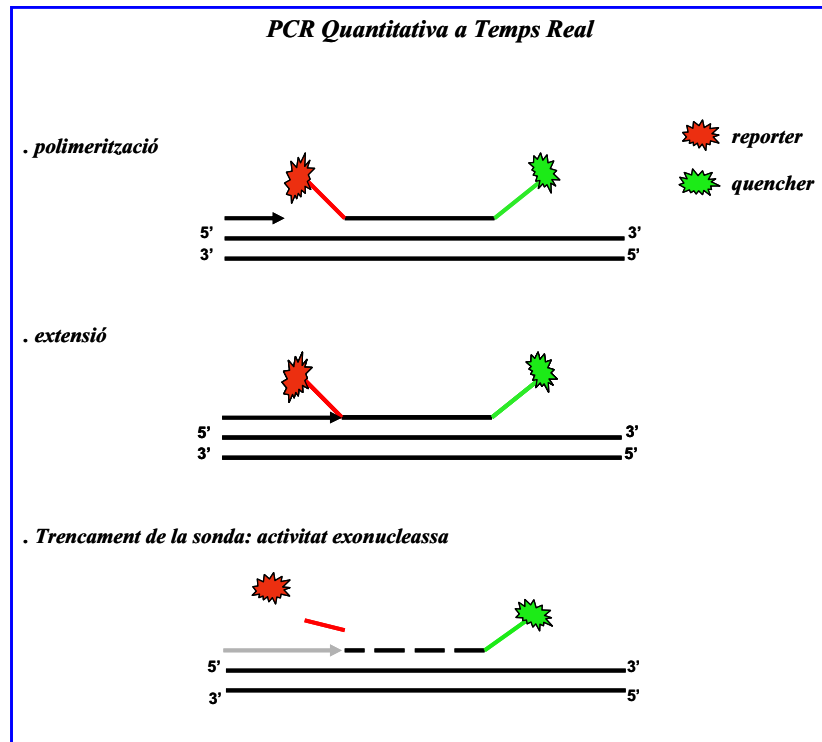


Figura 26: Esquema del funcionament de la RT-QPCR

El punt clau de la PCR Quantitativa a Temps Real (RT-QPCR) és la possibilitat de detectar a temps real l'amplificació del nostre gen d'interès. Per dur a terme aquesta detecció existeixen diferents mètodes però la gran majoria estan basats en la utilització d'un fragment de DNA (sonda) complementari a una part intermitja del fragment de DNA que volem amplificar. Aquesta sonda porta incorporada una molècula fluorescent (reporter) a un dels extrems i una altra molècula que inhibeix aquesta fluorescència (quencher) a l'altre extrem. Així, només quan la sonda és desplaçada de la seva posició per acció de la DNA polimerasa, la molècula fluorescent s'allibera de l'acció del quencher i emet fluorescència quan és il·luminada amb un làser (figura 26).

La quantificació de la fluorescència emesa durant cada cicle de la PCR serà proporcional a la quantitat de DNA que s'estarà amplificant. Aquesta tècnica requereix la realització en paral·lel d'una corba patró amb les mateixes condicions per tal de conèixer la quantitat total de DNA que s'està amplificant. Per compensar possibles variacions en la quantitat de DNA i en l'eficiència de la RT-PCR, també es realitza una quantificació del 18s, amb les mateixes condicions de PCR que el gen problema. Finalment els resultats del gen d'interès són normalitzats amb els valors de quantificació obtinguts amb el 18s. Aquest 18s és utilitzat com a control endogen, ja que es tracta d'un gen que s'expressa constitutivament a totes les cèl·lules de l'organisme.

Per tal de calibrar els resultats obtinguts, el valor normalitzat de cada mostra tumoral es divideix pel valor normalitzat del teixit normal provinent del mateix pacient. Mitjançant el programa Hes-1, els resultats finals expressen les diferències entre l'expressió del gen Shh en mostres tumorals respecte l'expressió de Shh en la mostra normal. La fórmula utilitzada és la següent:

$$N = \frac{\text{Shh mostra tumoral} / \text{18s mostra tumoral}}{\text{Shh mostra normal} / \text{18s mostra normal}}$$

La RT-QPCR s'ha realitzat amb el model ABIPrism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) amb les següents condicions:

<u>Condicions RT-qPCR</u>		<u>Master Mix</u>
2 minuts a 50° 10 minuts a 95° 15 segons a 95° 1 minut a 60°	40 cicles	10µl TaqMAN PCRUniversal MasterMix 1µl primer 3µl cDNA 6µl H2O lliure de RNAses

A cada carrera s'ha utilitzat també DNA genòmic com a control negatiu i els cDNAs, tant els que provenen de RNA de teixits tumorals, com els que provenen de teixits normals, així com també els embrionaris, han estat analitzats per duplicat.

5.5.2. Primers i sondes

Els primers i les sondes són comercials (assay on demand) i han estat demanats a Applied Biosystems, Foster City, CA (www.appliedbiosystems.com). Les sondes estan marcades a l'extrem 5' amb la molècula fluorescent FAM.

El 18s, utilitzat com a control endogen, també presenta marcatge amb FAM a nivell de l'extrem 5' (Ref 4352930E, Applied Biosystems, Foster City, CA).

Les seqüències de les sondes utilitzades són les següents:

- **Shh:** 5' GCTCGGTGAAAGCAGAGAACTCGGT 3'
- **Cea 1:** 5' ATAGTCACTGAGCTAAGTCCAGTAG 3'
- **Cea 3:** 5' CATGTATACCAAGAAAATGCCCCAG 3'
- **Cea 4:** 5' CTCCACGTACACCAAACAACGTCC 3'
- **Cea 5:** 5' ATCACAGTCTCTGCATCTGGAACTT 3'
- **Cea 6:** 5' CAGGAAGACTGGCAGATTGGACCAG 3'
- **Cea 7:** 5' ACCCTGAATGTCCGCTATGAGTCAG 3'
- **Cea 8:** 5' GGATGATCACAGTCTCTGATGCTTT 3'

5.6. Anàlisi Estadístic

L'estudi ha estat dissenyat per comparar els nivells d'expressió del mRNA de SHH en teixits tumorals i teixits normals de pacients amb CCR i per a estudiar la seva correlació amb les dades clinicopatològiques. Els nivells de SHH en teixit tumoral i normal es comparen mitjançant el test t-student i les dades clinicopatològiques es comparen mitjançant el test χ^2 amb la correcció de Yates. El nivell de significació estadística és a 0.05.

En el cas de l'anàlisi dels membres de la família CEACAM també s'ha realitzat un test t-Student per tal de comparar els nivells d'expressió del mRNA en teixits tumorals i teixits normals de pacients afectes de CCR. Per l'anàlisi del temps a la progressió i supervivència es fan servir les corbes de Kaplan-Meyer. Per tal de poder utilitzar els nivells d'expressió obtinguts dels membres de la família CEACAM com a factor pronòstic en l'estudi de supervivència, s'ha establert el punt de tall més significatiu a partir de la mediana.

A partir de les dues variables estudiades (MT i TN) definim un nou marcador com la divisió de MT entre TN (MT/TN). Aquesta nova variable la definim com un índex de CEA normalitzat respecte el seu propi teixit normal (CEA_n). Aquest valor obtingut seria un indicador de la "permeabilitat tumoral", és a dir; ens indicaria si les cèl·lules adjacents al tumor presenten un fenotip tumoral, un fenotip normal o es troben a mig camí entre l'un i l'altre.

La mediana de CEA_n ens servirà per a definir dos grups de pacients que utilitzarem per a fer l'anàlisi del temps a la progressió i les corbes de supervivència. D'aquesta manera tindrem un grup de pacients amb el CEA_n per sobre la mediana i un altre per sota. Cal no confondre aquests dos grups amb el fet que els nivells de CEA en MT siguin més grans o més petits que en TN ja que la mediana no coincideix amb el punt en que CEA_n val 1.

