



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**

---

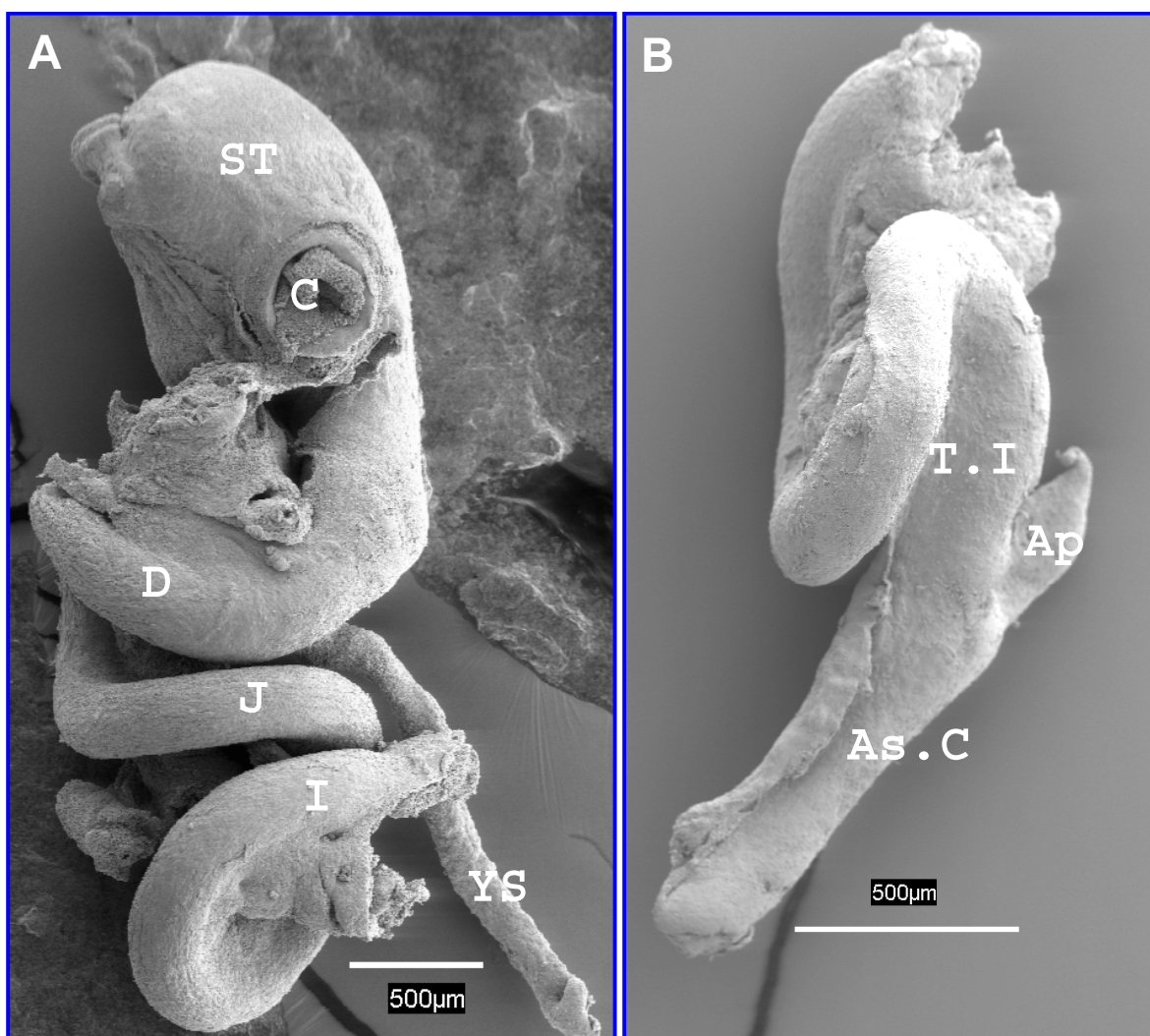
**Director Tesi  
Dr. Mariano Monzó Planella**

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

## **6.- RESULTATS**

### **6.1. Anàlisi morfològic de les mostres embrionàries**

Al final de la setena setmana de desenvolupament, l'apèndix està suficientment desenvolupat com per permetre una clara diferenciació entre intestí prim i còlon.



**Figura 27:** Sistema digestiu embrionari de 7.5 setmanes de desenvolupament observat amb SEM. A: Càrdies (C); Estómac (ST); Duodè (D); Jejú (J); Ileon (I); Mesenteri (M); Vesícula Biliar(YS). B: Ileon terminal (TI); Apèndix Vermiforme(Ap); Còlon ascendent (As. C).

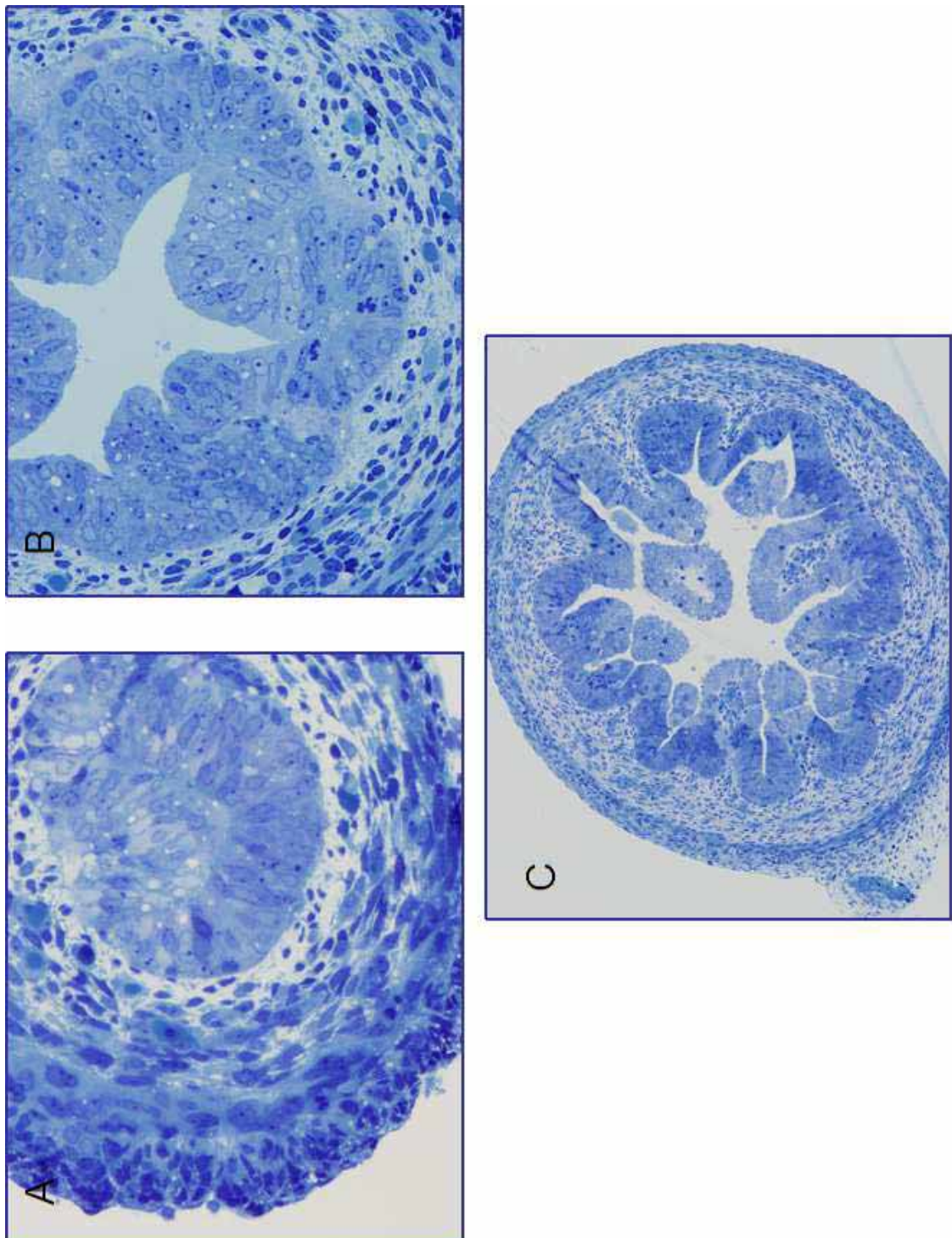
L'estómac (ST) apareix com una dilatació durant la quarta setmana de desenvolupament i les setmanes següents va modificant el seu aspecte i la seva posició com a conseqüència del creixement diferenciat de les regions de la seva paret i dels òrgans que l'envolten.

En aquesta etapa del desenvolupament, són clarament observables les nanses intestinals; l'apèndix vermiforme; el còlon i la vàlvula de Bauhin que separa l'ileon del colon ascendent (figura 27A-27B). Per assegurar de que realment es tracta de còlon, totes les mostres s'obtenen prenent com a referència l'apèndix vermiforme.

A la figura 28 podem veure l'evolució de la formació de la llum intestinal i l'aparició de les criptes. Les mostres embrionàries de còlon de 7 setmanes de desenvolupament (figura 28A) mostren un epitelí intestinal compacte format per cèl·lules fusiformes molt unides entre elles mitjançant unions intracel·lulars. Dins d'aquest epitelí també trobem un conjunt de cèl·lules vacuolades (V). La làmina conjuntiva (C) està formada per cèl·lules apoptòtiques (Apt) i més externament hi trobem les capes musculars (M) formades per tot un conjunt de cèl·lules allargades que han d'acabar de definir-se. La capa més externa que podem veure és la serosa (S), molt irregular i gruixuda.

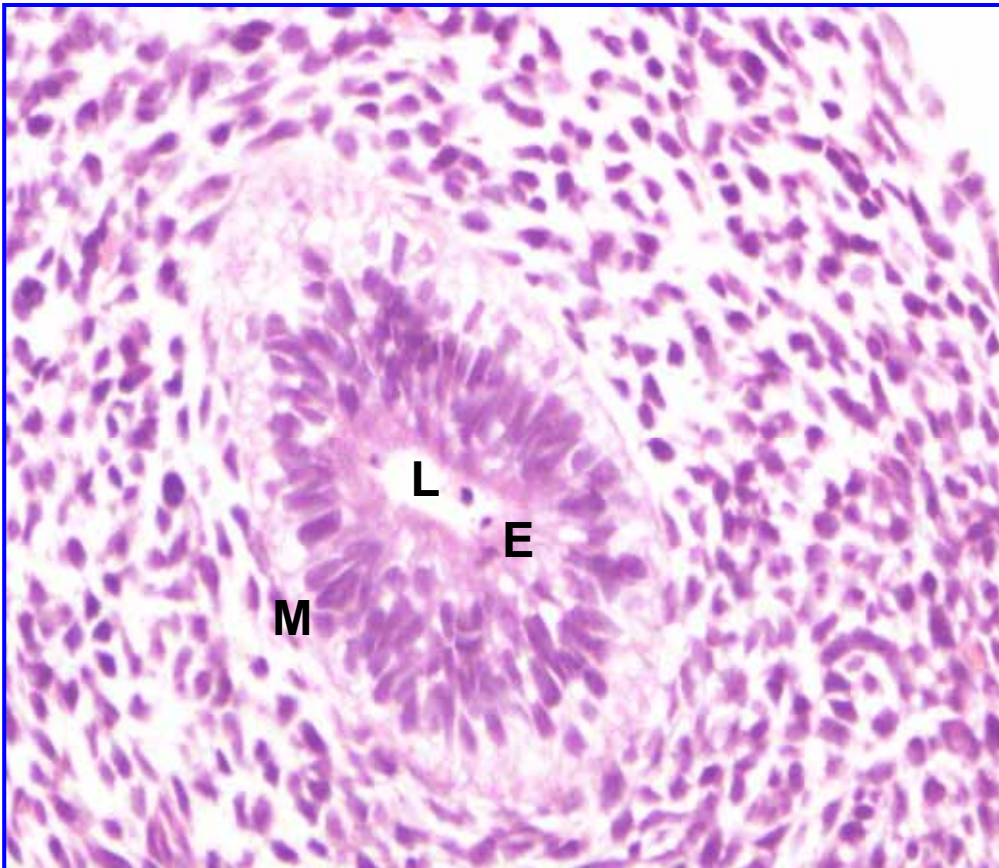
En les mostres de còlon de 9 setmanes de desenvolupament (figura 28B) veiem que les cèl·lules epitelials han començat a formar la llum del tub i que comença a insinuar-se l'aparició de les criptes. Les capes musculars les trobem molt més definides que en l'estadi anterior i podem distingir entre la capa muscular circular interna i la capa muscular longitudinal externa.

Les mostres embrionàries de còlon de 11 setmanes de desenvolupament (figura 28C) ens mostren ja una llum i unes criptes intestinals completament formades. L'extrem de les criptes és la vora estriada de la superfície luminal dels enteròcits i es correspon amb les microvellositats que podem observar amb el microscopi electrònic. Veiem la capa muscular circular interna i la capa muscular longitudinal externa molt ben definides i la cara peritoneal de la capa muscular es troba revestida per la làmina serosa, que és teixit conjuntiu lax.



**Figura28: Tall semifi. Blau de Toluidina. Formació de la llum i de les criptes intestinals en un embrió de 7 setmanes 40X (A), de 9 setmanes 20X (B) i d'11setmanes de desenvolupament 10X (C) Serosa (S); Muscular (M); Conjuntiva (C); Epiteli (Ep); Cèl·lules vacuolades (V); Cèl·lules apoptòtiques (Apt).**

L'observació per microscòpia òptica de les mostres embrionàries de còlon durant la setena setmana de desenvolupament, ens permet observar la presència d'un petit lumen intestinal situat al centre del còlon. Aquest lumen es troba envoltat de cèl·lules endodèrmiques primitives, separades del mesènquima per un espai de cèl·lules clares. El teixit muscular no es troba present en el mesènquima embrionari (figura 29).



***Figura 29: Còlon embrionari 7 setmanes de desenvolupament. Tinció H/E 10X  
Lumen (L); Endoderma primitiu (E); Mesènquima (M).***

L'observació amb microscopi electrònic de transmissió ens mostra la presència d'un espai sincitial amb cèl·lules apoptòtiques situades entre l'endoderma primitiu i el mesènquima (figura 30B). Les cèl·lules de l'endoderma primitiu encara no presenten les característiques de les cèl·lules columnars epitelials (figura 30C). Tampoc trobem presència de teixit muscular ni de fibroblasts (figura 30D).

Cap a la novena setmana de desenvolupament les cèl·lules de l'endoderma intestinal han adquirit les característiques de cèl·lules columnars epitelials en patró de zig-zag (figura 33A i D), i podem observar que el mesènquima conté miofibroblasts

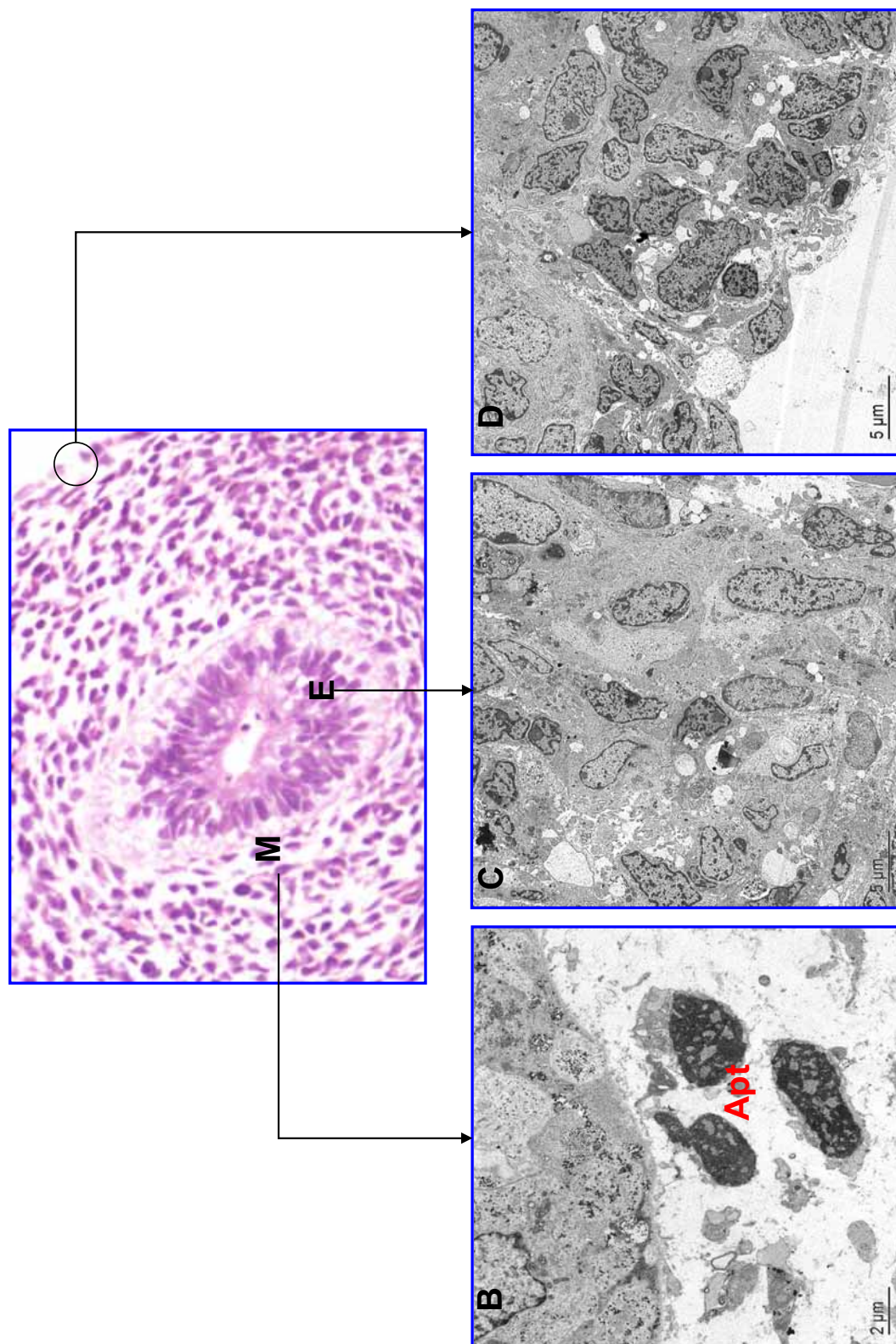
(figura 33C).

A la onzena setmana de desenvolupament l'epiteli ja està completament organitzat en criptes (figura 34).

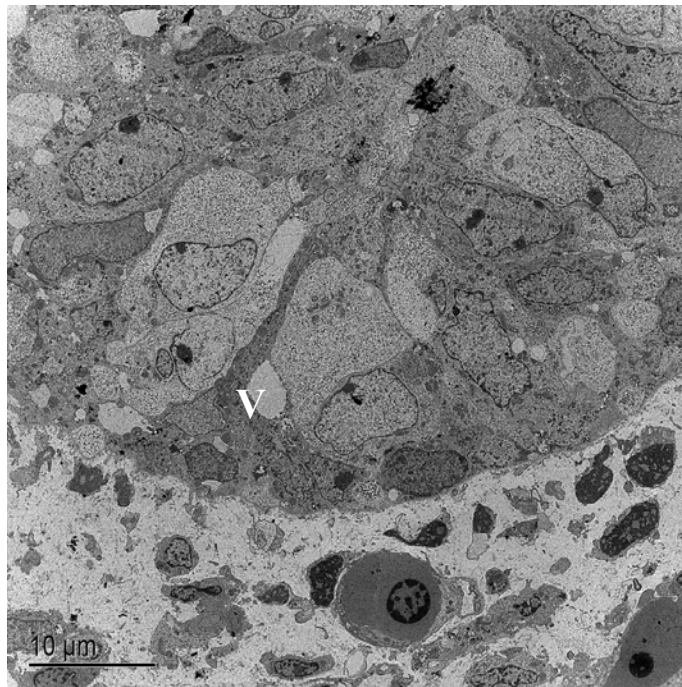
Aquesta observació amb el microscopi electrònic de transmissió també ens permet veure el grau de diferenciació que van adquirint aquestes cèl·lules i la presència de desmosomes (figura 36B) i les cèl·lules caliciformes situades a la base de les criptes (figura 35 i figura 36C)

El teixit muscular circular i longitudinal pot veure's en els extrems i la capa de cèl·lules endotelials que l'envolta també es pot veure amb claredat (figura 36D).

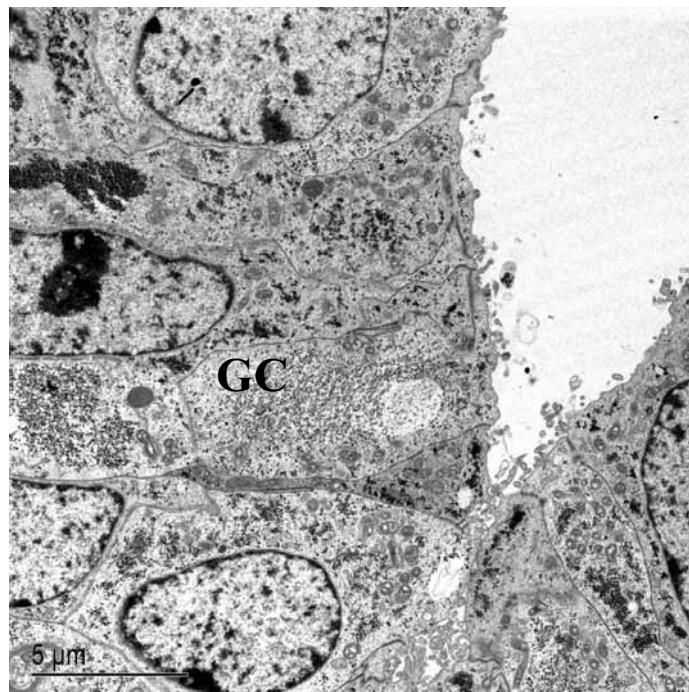
A la base de les criptes i per fora de la membrana basal, les cèl·lules pericriptals tenen una morfologia semblant a les cèl·lules ISEMFs (figura 36E i F)



**Figura 30.: Còlon humà embrionari de 7.5 setmanes de desenvolupament vist amb Microscòpia Òptica (A) i Microscòpia Electrònica(B, C i D).**  
**A: Tinció H/E. Primers estadis del lumen intestinal 10X. B: Cèl·lules apoptòtiques en el mesènquima properes a les cèl·lules endodèrmiques.**  
**C: Cèl·lules de l'endoderma primitiu D: Absència de cèl·lules musculars o endotelials.**

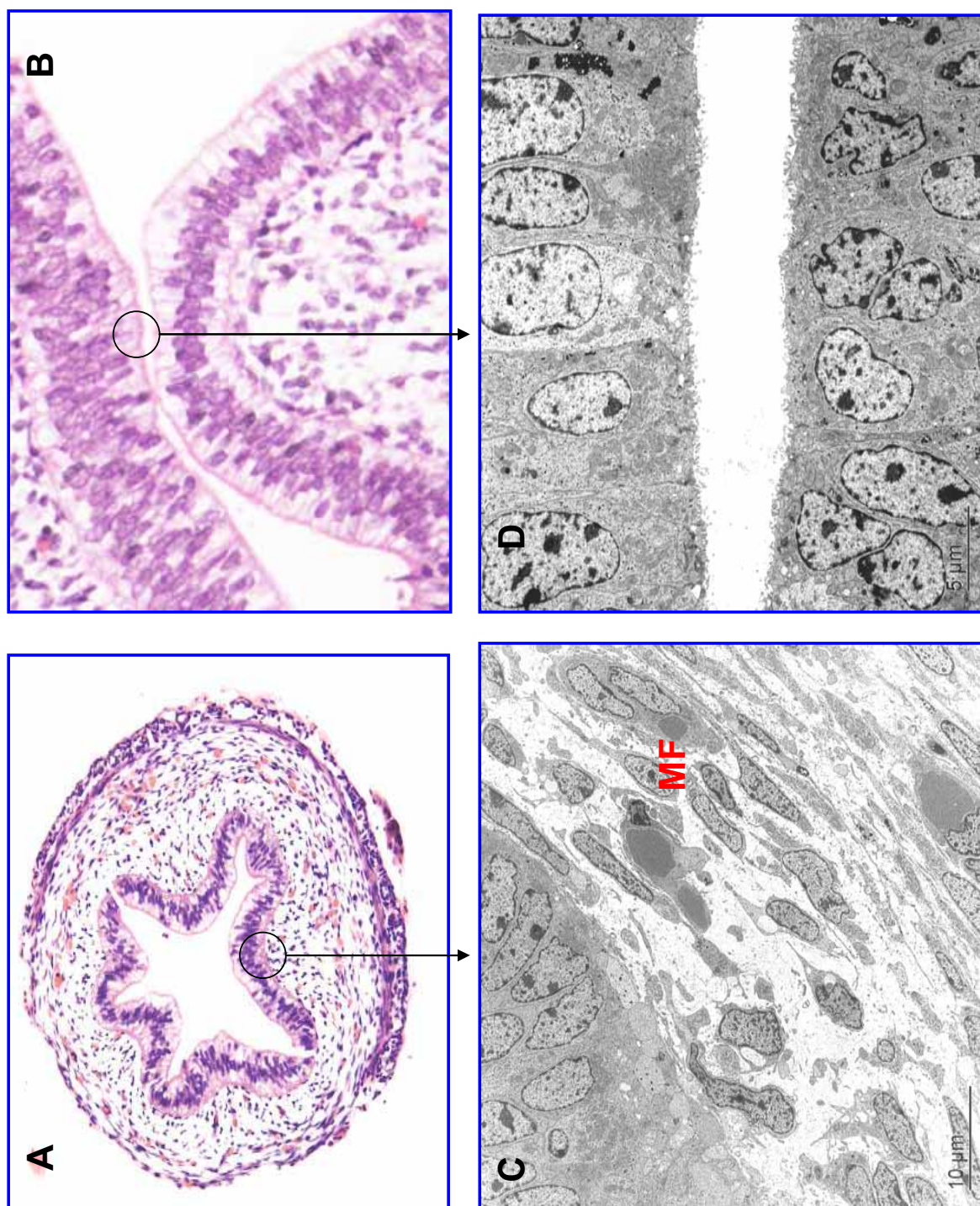


*Figura 31. Detall còlon humà de 7 setmanes de desenvolupament vist amb TEM. Visió de l'epiteli intestinal format per cèl·lules vacuolades.*



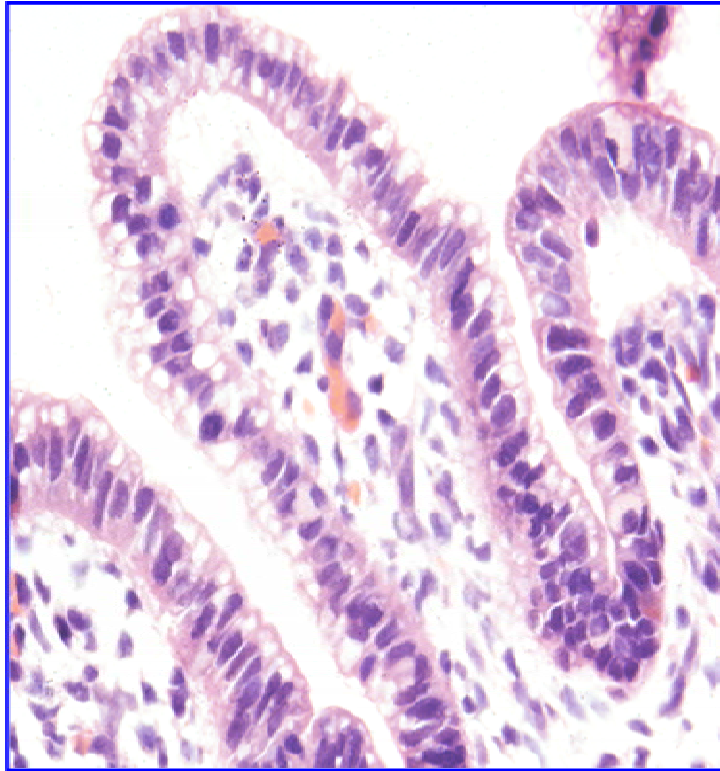
*Figura 32: Detall còlon humà de 8 setmanes de desenvolupament vist amb TEM on podem veure la formació de les primeres cèl·lules caliciformes (GC).*



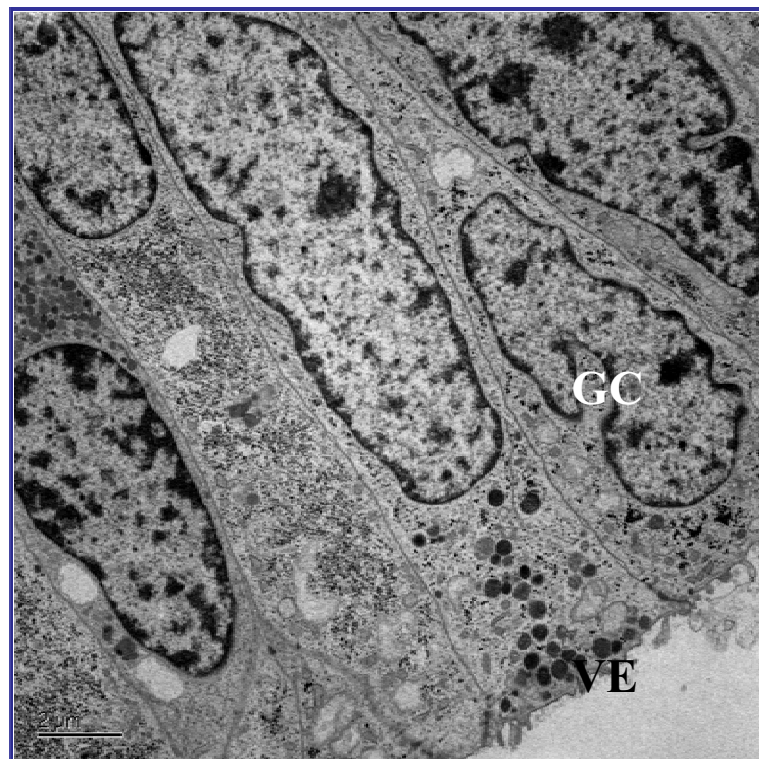


**Figura 33:** Còlon humà embrionari de 9 setmanes de desenvolupament vist amb Microscòpia Òptica (A-10X, B-50X i D) i Microscòpia Electrònica (C).

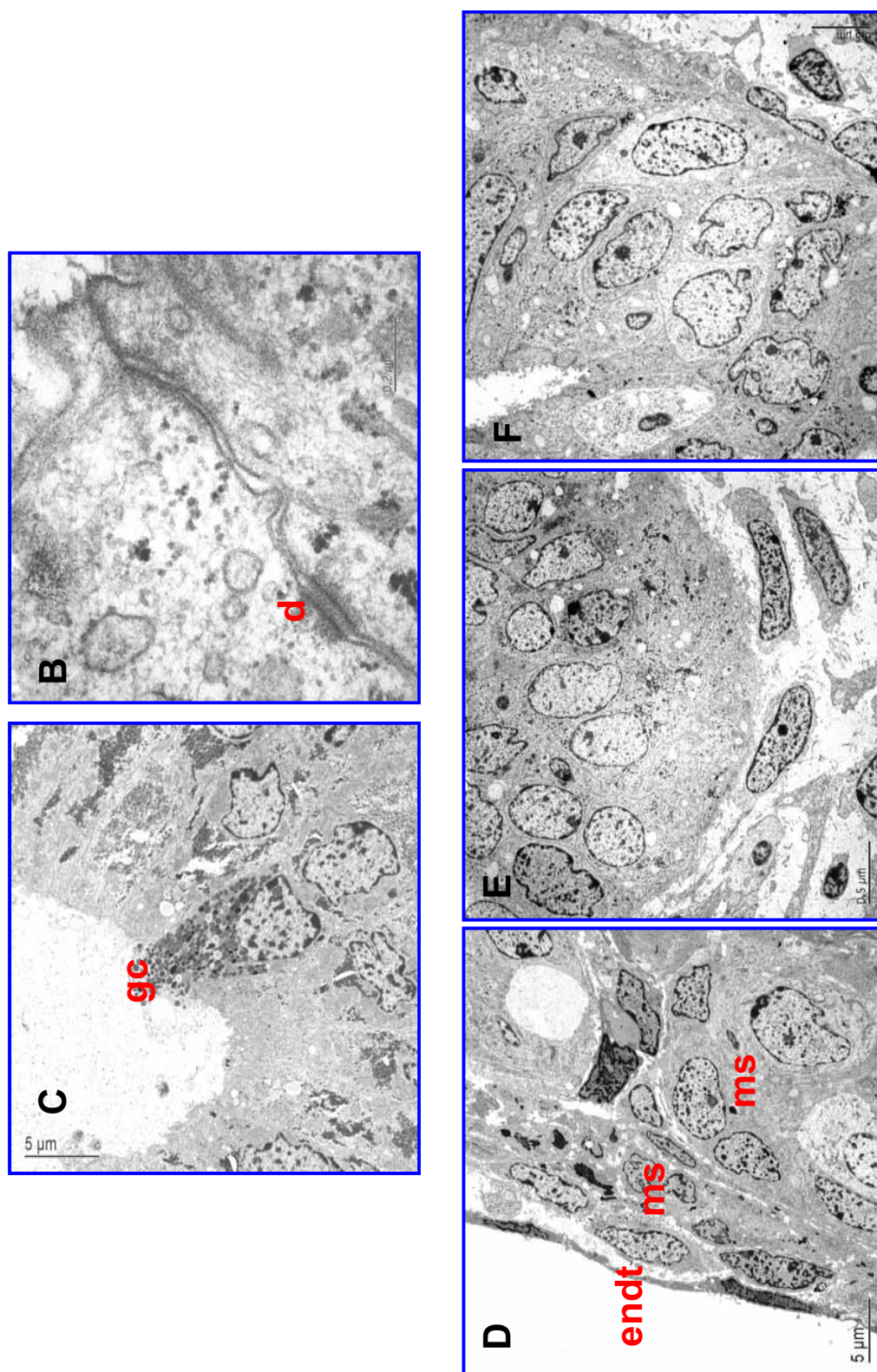
**A i B:** tinció H/E de les cèl·lules de l'epiteli columnar **C:** presència de miofibroblasts en el mesènquima (myof) **D:** cèl·lules de l'endoderma amb característiques de les cèl·lules de l'epiteli columnar.



*Figura 34: Còlon humà embrionari de 11 setmanes de desenvolupament vist amb Microscòpia Òptica. Tinció H/E de les criptes intestinals 50X.*



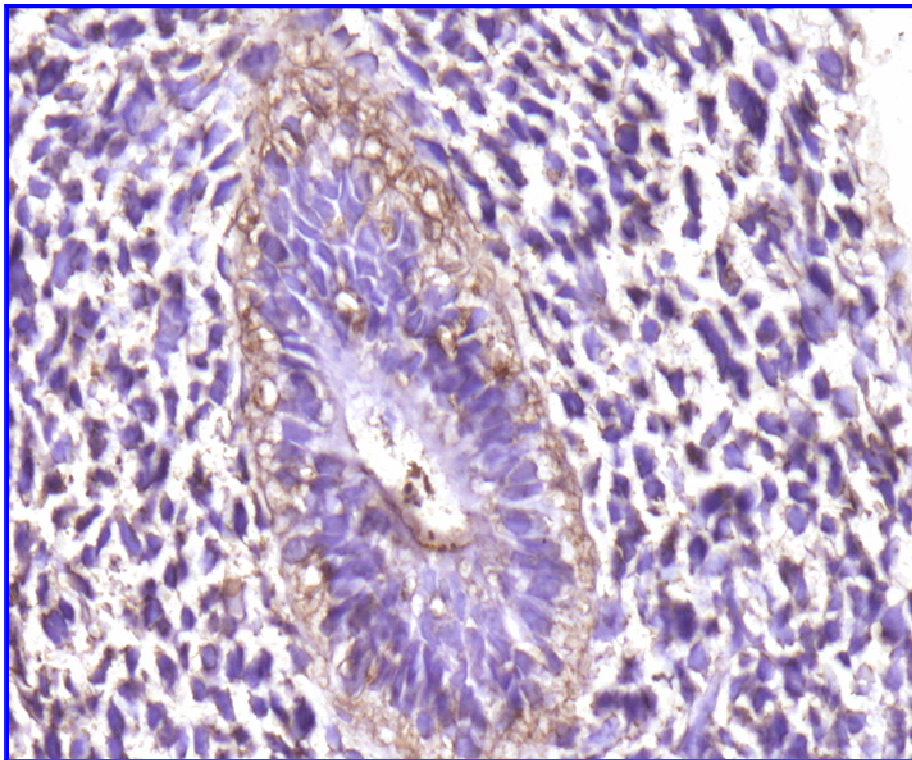
*Figura 35: Detall del lumen de còlon embrionari d'11 setmanes de desenvolupament on podem observar cèl·lules caliciformes (GC) i la vora estriada de la superfície luminal (VE).*



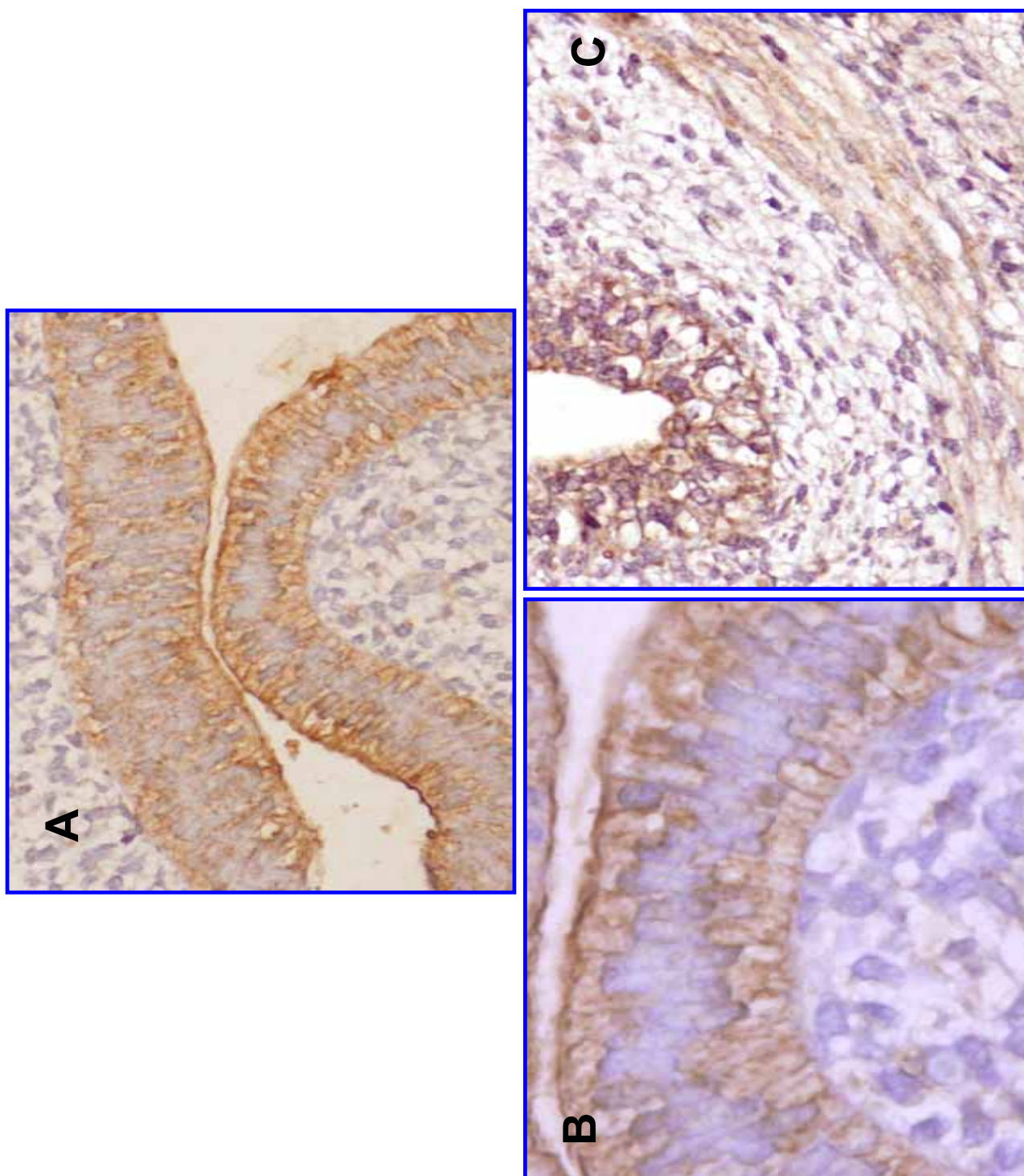
**Figura 36: Còlon humà embrionari de 11 setmanes de desenvolupament vist amb Microscòpia Electrònica B: Presència de desmosomes (d) a les cèl·lules epitelials. C: Presència de cèl·lules caliciformes (gc) a la base de la cripta D: Presència de cèl·lules musculars (ms) i endotelials (endt) en el tub digestiu E-F: cèl·lules pericríptiques situades a la part inferior de les criptes.**

## 6.2. Anàlisi Immunohistoquímic del gen Shh

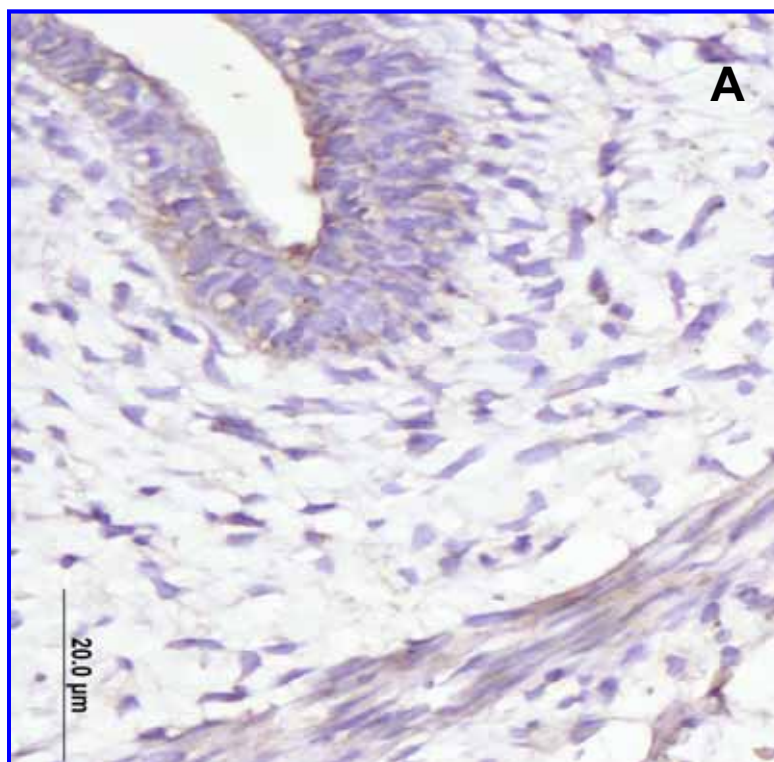
Cap a la setena setmana de desenvolupament, l'epiteli intestinal comença a estar organitzat i existeix una gran zona de mesènquima embrionari que envolta l'endoderma. En aquest estadi del desenvolupament, Shh només es detecta al voltant de l'endoderma intestinal i a les vores del mesènquima embrionari (figura 37) A la novena setmana de desenvolupament, Shh assoleix la seva màxima expressió i aquesta expressió es localitza en dues regions; a través de l'epiteli intestinal, on es veu clarament la intensitat del senyal (figura 38A i B) i a la zona mitja del mesènquima, zona on s'observen els miofibroblasts (figura 38C). A la onzena setmana del desenvolupament, l'epiteli del còlon ja està completament desenvolupat i l'expressió de Shh pot ser detectada a molt baixa intensitat a les criptes i en alguns teixits musculars (figura 39).



*Figura 37: Anàlisi immunohistoquímic de Shh en còlon humà embrionari de 7 setmanes de desenvolupament 10X.*



*Figura 38: Anàlisi immunohistoquímica de Shh en còlon humà embrionari de 9 setmanes de desenvolupament. A i B: detecció de Shh en el citoplasma cel·lular 50X. C: detecció Shh en els miofibroblasts 40X.*



*Figura 39: Anàlisi immunohistoquímic de Shh en còlon humà embrionari de 11 setmanes de desenvolupament. Detecció de Shh a les criptes i en teixit muscular.*

### **6.3. Característiques clíniques dels pacients**

La següent taula ens mostra les característiques clíniques dels 57 pacients amb CCR amb els que hem realitzat l'estudi.

La mitjana d'edat dels pacients és de 67 anys (39-87), dels quals 32 eren homes i 25 dones.

Del total de pacients, 33 presentaven càncer de còlon i 24 eren pacients amb càncer de recte. Segons la classificació TNM; 8 pacients pertanyen a l'estadi I; 19 són de l'estadi II; 14 de l'estadi III i 16 pertanyen a l'estadi IV.

50 dels pacients presenten tumors moderadament diferenciats; 4 molt poc diferenciats; 1 molt ben diferenciats i 2 dels quals no tenim informació.

13 dels pacients presenten angioinvasió i 3 tenen extensió perineural.

42 pacients presenten menys de 3 nòduls limfàtics afectats i 14 en presenten més de tres, mentre que del pacient que falta no disposem d'aquesta informació.

16 dels 57 pacients han desenvolupat metàstasis.

<b>N</b>	<b>57</b>
<b>Sexe</b>	
Homes	33 (56)
Dones	26 (43)
<b>Edat (Y)</b>	
>50	4 (7)
50-70	33 (58)
>70	20 (35)
<b>Karnofsky</b>	
>70	37 (65)
<=70	30 (35)
<b>Localització</b>	
Recte	24 (42)
Colon	33 (58)
<b>Grau Histològic</b>	
Ben diferenciat	1 (2)
Mod. Diferenciat	50 (88)
Mal diferenciat	4 (7)
No disponible	2 (3)
<b>Estadi</b>	
I	8 (14)
II	19 (33)
III	14 (25)
IV	16 (28)
<b>Angioinvasió</b>	13 (23)
<b>Invasió Perineural</b>	3 (5)
<b>Afectació Nòduls   Limfàtics</b>	
N0-1	42 (74)
N2	14 (25)
<b>Estadi</b>	
Inicial (I-II)+	27 (47)
Avançat (III-IV)	14 (25)
<b>Metastasis</b>	16 (28)

*Taula 9: Característiques clíniques dels pacients.*



#### 6.4. Extraccions de RNA de teixits adults i de mostres embrionàries

A les següents taules podem veure les [RNA] obtingudes al fer l'extracció així com també la puresa de la mostra. La puresa la coneixem a partir de la ràtio obtinguda al fer la lectura a 260/280nm en l'espectrofotòmetre. En el cas del RNA podem dir que una mostra és molt pura quan les ràtios oscil·len entre 1.9 i 2.1.

<b>Nº MOSTRA</b>	<b>[RNA]</b>	<b>ratio260/280</b>
E7.2(36)I+APX	24,4	2,2
E7.3(19)colon	23,2	2,07
E8(30)CA+APX	24	2,1
E8(32)CA+APX	117,6	1,6
E8.2(43)CR	30,4	1,7
E9.2(11)C/R	12	1,6
E9.5(10)C/R	52	1,8
E10(1)colon	26,4	2,7
E10(8)C/R	44,8	1,8
E10.4(6)C	44	1,9
E10.4(6)R	42	1,73
E11(9)C/R	67,2	1,75
E11.2(1)RECTE-SIGMA	150,4	1,7
E11.3(8)c.asc+apendix	63,2	1,86
E11.3(8)C.Trav	57,6	2,11
E11.6(11)C/R	213,6	2,1
E11.6(16)C/R	3,2	0
E12(1) colon	60,8	1,93
E12(1)C	453,6	1,83
E12(4)C/R	44	1,83
E12,2(5)CR	136,8	1,71
E12.2(2)colon	89,6	1,94
E12.2(2)Z.ANAL	142,4	1,5

Taula 10: [RNA] obtingudes de teixits embrionaris.

Nº MOSTRA	[RNA]	ratio260/280	Nº MOSTRA	[RNA]	ratio260/280
277 TN	78,4	0	277 MT	83,2	2,011
03-107 TN	21,31	0,8	03-107 MT	51	2,0735
03-176 TN	15,2	1,9	03-176 MT	492	1,93
03-190 TN	28	1,75	03-190 MT	234	2,1
03-202 TN	38,4	2,087	03-202 MT	72,8	2,09
03-220 TN	18,4	1,76	03-220 MT	94,4	2,1
03-24 TN	14,4	2	03-24 MT	66	1,95
03-259 TN	77,6	1,94	03-259 MT	82,4	2,083
03-260 TN	17	2.048	03-260 MT	194	1,99
03-3 TN	16	2,1315	03-3 MT	8	2,5
03-344 TN	87,2	2,057	03-344 MT	32,8	2,1
03-347 TN	72,4	1,8	03-347 MT	226	2,02
03-362 TN	80,8	2,02	03-362 MT	167	2,07
03-401 TN	76	2,1	03-401 MT	28	1,7
03-406 TN	29,2	2,15	03-406 MT	65	1,91
03-505 TN	24	1,45	03-505 MT	78,4	2,083
03-514 TN	40	1,92	03-514 MT	16	2,29
03-521 TN	21,1	3,4	03-521 MT	18	2,2
03-541 TN	22,9	1,1	03-541 MT	54,5	2,0605
03-567 TN	21,6	1,85	03-567 MT	41	2,071
03-571 TN	20,66	0,9	03-571 MT	164	1,82
03-589 TN	171	1,954	03-589 MT	444	2,08
03-592 TN	35	2	03-592 MT	65	1,6
03-653 TN	139	1,912	03-653 MT	453,6	2,08
03-80 TN	204,8	2,04	03-80 MT	232	2,014
04-284 TN	36	2,3	04-284 MT	35	1,872
04-293 TN	18	1,957	04-293 MT	77	1,864
04-437 TN	70	2,011	04-437 MT	135	2,087
04-440 TN	19,5	1,923	04-440 MT	33,5	2,465
04-451 TN	122	1,974	04-451 MT	68,5	1,977
04-829 TN	62	1,8	04-829 MT	6	1,9
269 TN	65,6	1,9	269 MT	83,2	2,1
270 TN	164,8	1,8	270MT	52	1,91
320 TN	61,6	1,87	320 MT	131,8	1,9
323 TN	33,6	1,9	323 MT	12	1,87

Taula 11: [RNA] obtingudes de teixits tumorals i normals adults.

## 6.5. Expressió i quantificació de Shh en mostres embrionàries mitjançant RT-QPCR

L'expressió de mRNA de Shh s'observa des de la setena fins a l'onzena setmana de desenvolupament. Els nivells d'expressió, mesurats com a número de còpies de mRNA de Shh en relació al número de còpies de mRNA del housekeeping gene (18s), varien en funció de la setmana de desenvolupament en la que ens trobem. A la setena setmana els nivells d'expressió de Shh són baixos i van augmentant de manera gradual fins a assolir el seu punt de màxima expressió en la novena setmana. A partir d'aquí els nivells tornen a disminuir fins a la onzena setmana de desenvolupament, on s'estabilitzarien (figura 40). Tal i com es pot observar a la figura, com més baix és el Ct,

punt en el qual comença l'amplificació del mRNA, major quantitat de mRNA expressat

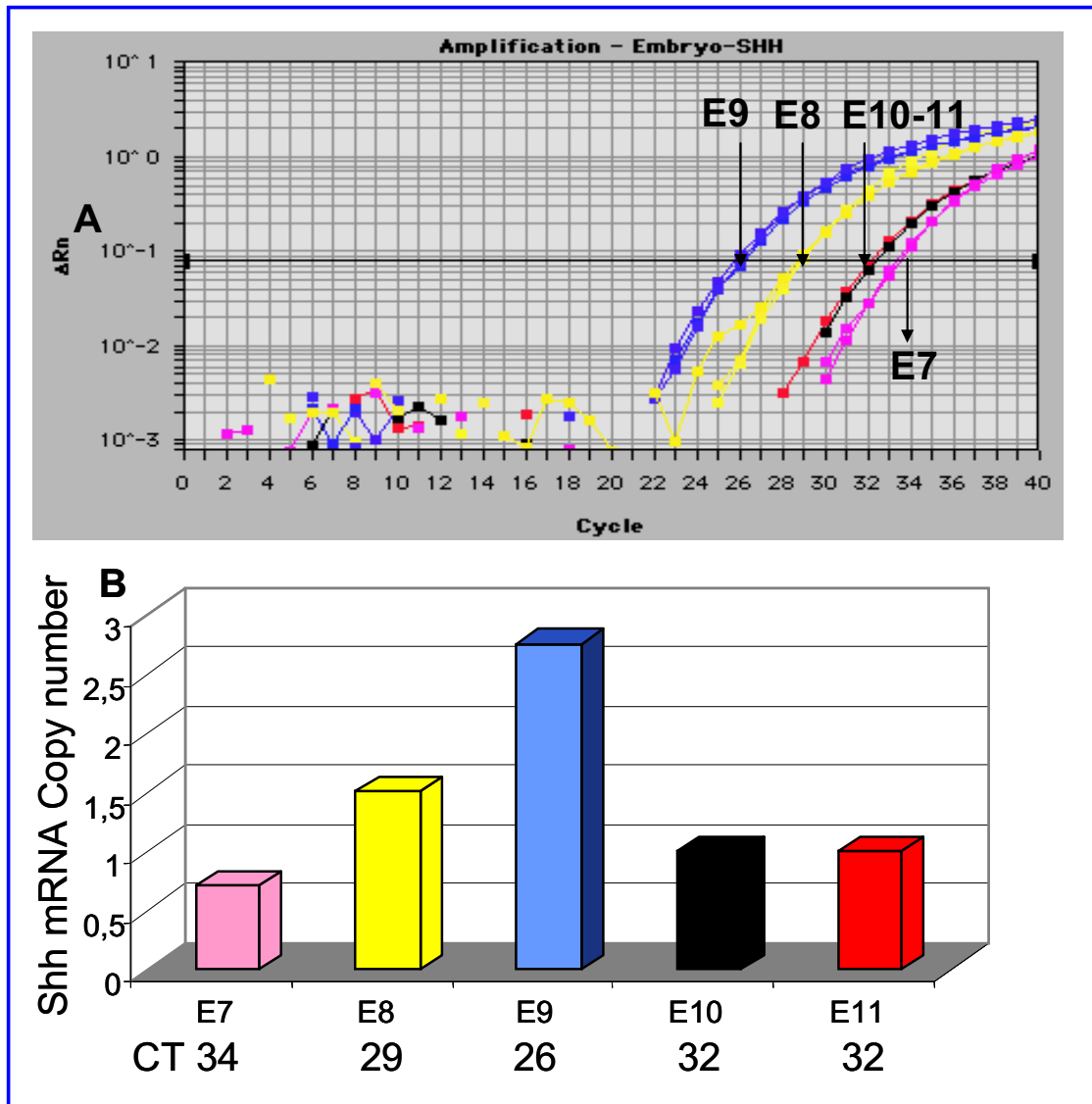
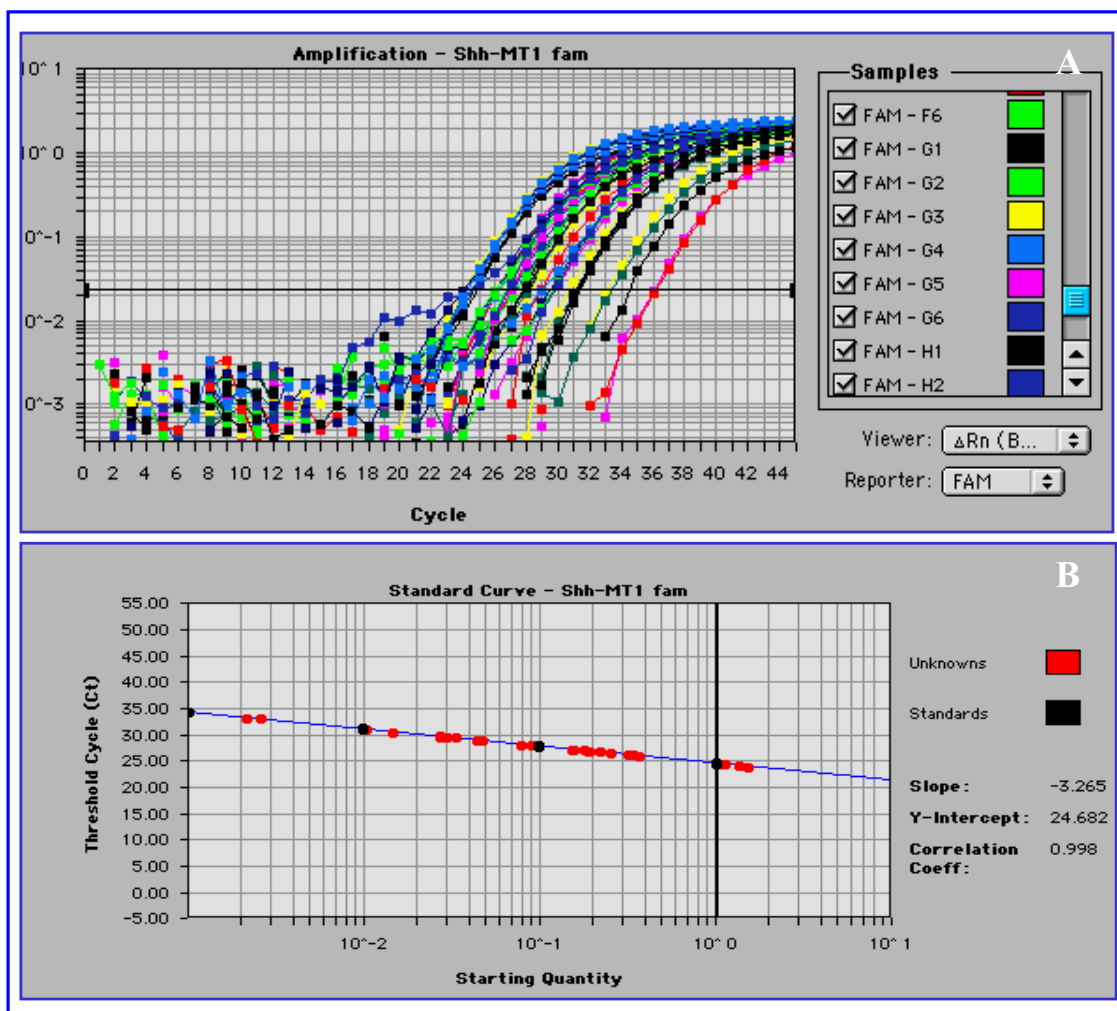


Figura 40: Expressió de mRNA de Shh mitjançant RT-qPCR ABIPrism 7700.(↓) : inici d'amplificació del mRNA (Ct).

## 6.6. Expressió i quantificació de Shh en mostres de pacients afectats de CCR

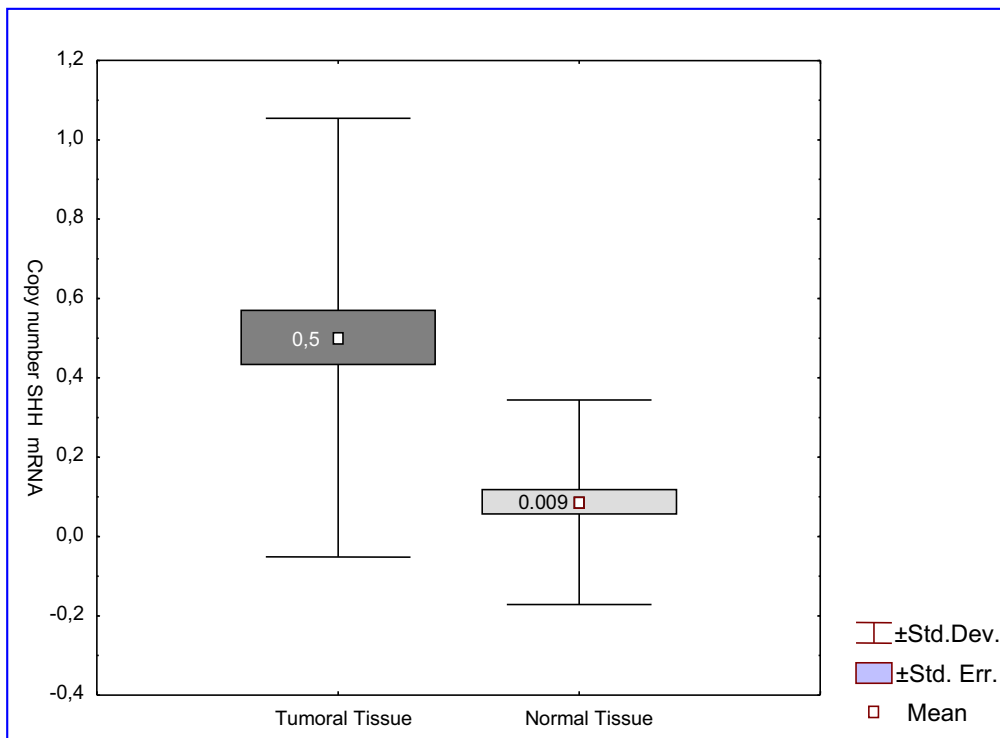


**Figura 41:** (A) Quantificació de mRNA Shh mitjançant RT-qPCR ABI Prism 7700. Les corbes en negre indiquen les dilucions seriades realitzades. (B) Corba estàndard per a la quantificació de Shh. (●) mostres problema; (●) dilucions.

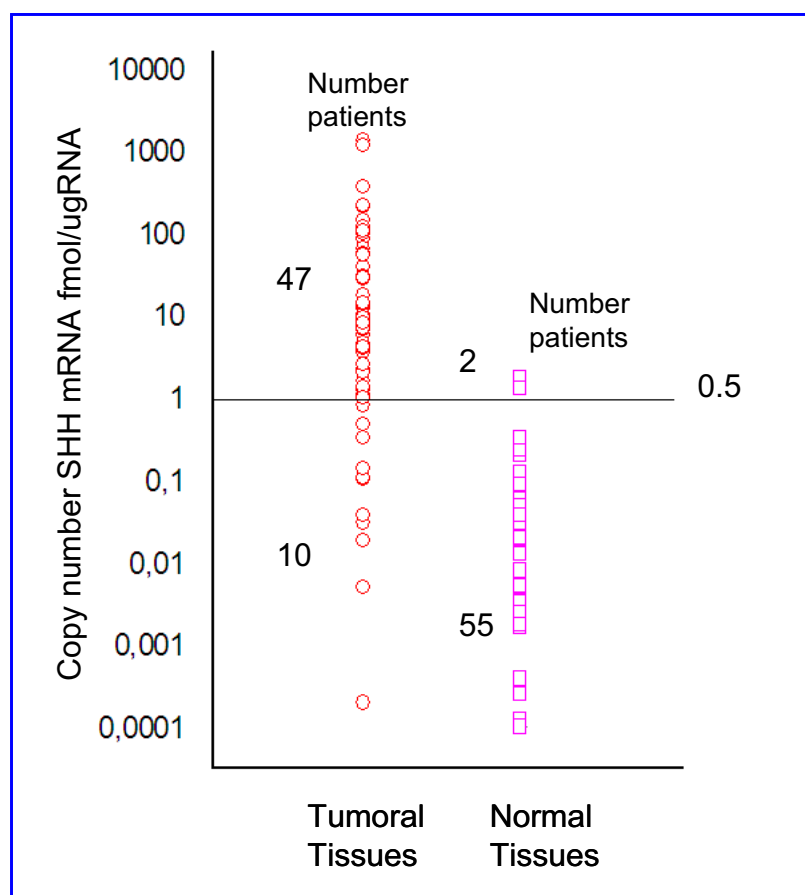
Per tal de poder quantificar el mRNA de Shh s'ha fet una corba estàndard a partir de dilucions seriades (1, 1/10; 1/100 i 1/1000) de cDNA de teixit normal, que és utilitzat com a calibrador (figura 41).

Hem observat que Shh s'expressa tant a teixit tumoral com a teixit normal del mateix pacient, però els nivells d'expressió varien entre teixit tumoral i normal essent molt més elevats en el cas del teixit tumoral.

En teixits tumorals, la mitjana d'expressió és de 0.521 mentre que en el teixit normal és de 0.0094 ( $p=0.00001$ ) (figura 42). 48 dels 57 pacients (82%) tenen elevats nivells d'expressió del mRNA de Shh ( $>0.521$ ) en el seu teixit tumoral, mentre que només dos dels pacients (3%) presenten elevats nivells d'expressió de Shh en el seu teixit normal ( $>0,521$ ). La resta de pacients (96%) presenten tots baixos nivells d'expressió de Shh en els seus teixits normals (figura 43).



**Figura 42: Nivells d'expressió relativa de mRNA de Shh en teixits tumorals i teixits normals.**  
( $p= 0.00001$ )



**Figura 43:** Correlació entre el nombre de pacients i l'expressió de mRNA Shh mitjançant RT-qPCR. La línia horitzontal ens indica el valor mig de mRNA (=0.5) en les mostres tumorals.

### 6.7. Correlació entre els nivells d'expressió de Shh en pacients afectats de CCR i les característiques clinicopatològiques

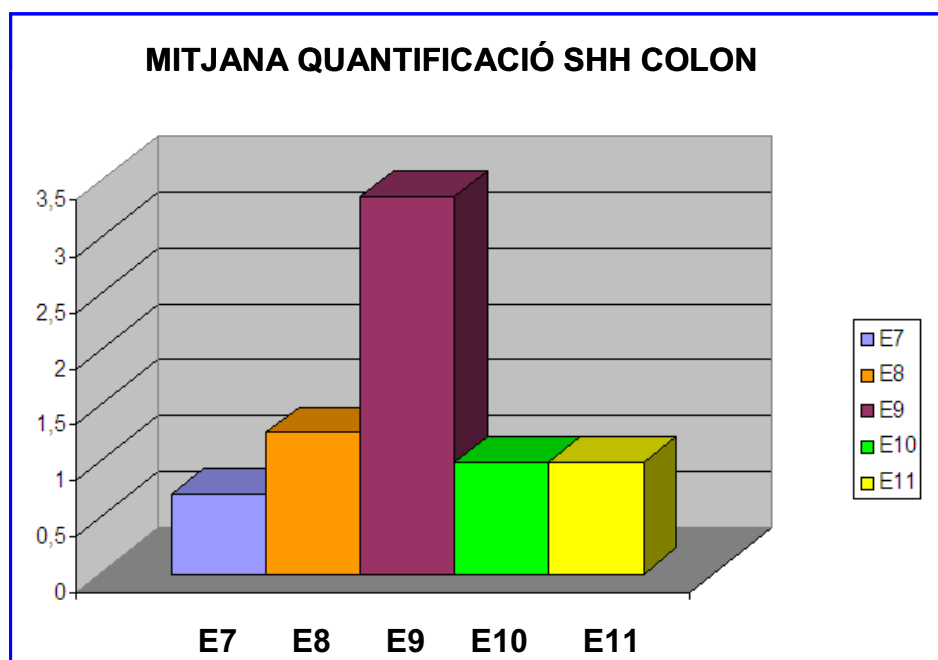
Per tal de poder analitzar millor els nivells de Shh com a variable quantitativa, els pacients amb nivells d'expressió  $> 0.521$  ( $n=57$ ) han estat dividits en dos grups; tumors amb alt i amb baix nivell d'expressió de mRNA de Shh. El llindar d'expressió per a Shh és en aquest cas a 8.9.

Elevats nivells d'expressió de mRNA de Shh ( $>8.9$ ) s'observen en els primers estadis de la formació tumoral (I-II), que és quan trobem major quantitat de cèl·lules indiferenciades i valors més baixos ( $<8.9$ ) s'observen en estadis avançats de la malaltia (III-IV) ( $p=0.02$ ) (taula 12).

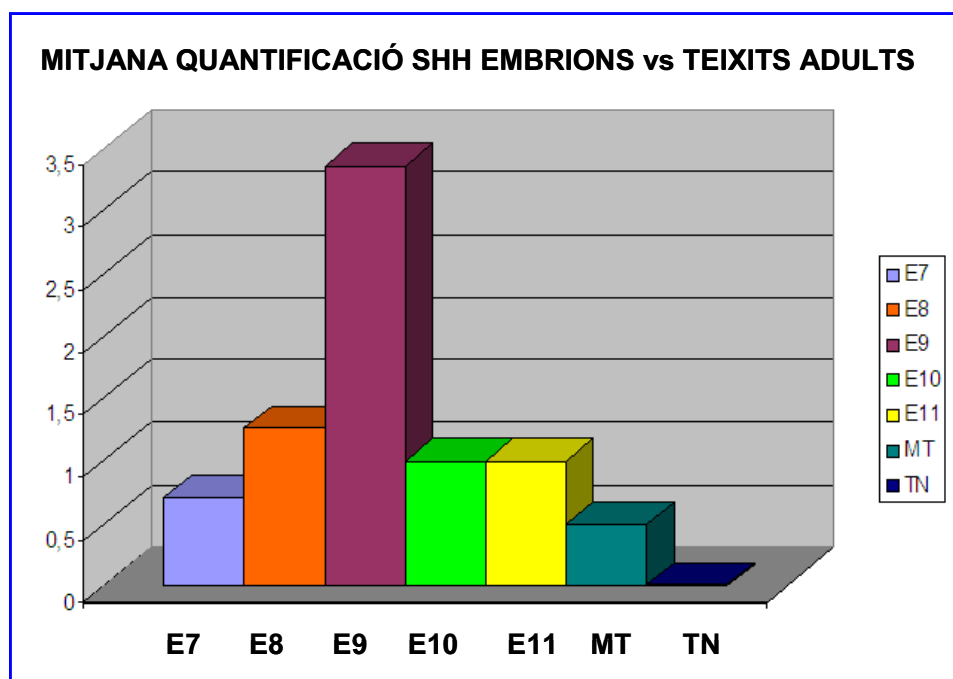
	SHH <8.9	SHH >8.9	P
N	34	23	
Sexe			
Homes	16 (47)	16 (70)	0.09
Dones	18 (53)	7 (30)	
Edat (y)			
< 50	3 (9)	1 (4)	0.90
50 – 70	22 (65)	11 (48)	0.20
> 70	9 (26)	11 (48)	0.09
Karnofsky			
> 70	24 (70)	13 (57)	0.27
<= 70	10 (30)	10 (43)	
Localització			
Recte	16 (47)	8 (33)	0.35
Colon	18 (53)	15 (66)	
Grau Histològic			
Ben diferenciat	0	1 (4)	
Mod. diferenciat	29 (85)	21 (92)	0.78
Mal diferenciat	3 (9)	1 (4)	
No disponible	2 (6)	0	
Estadi			
I	3 (9)	5 (22)	0.32
II	9 (26)	10 (44)	0.18
III	9 (26)	5 (22)	0.92
IV	13 (38)	3 (12)	0.07
Angioinvasió	8 (23)	5 (22)	0.87
Invasió Perineural	1 (3)	2 (9)	0.72
Afectació Nòduls limfàtics			
N0 - 1	24 (72)	18 (78)	0.87
N2	9 (28)	5 (22)	
Estadi			
Inicial (I - II)	12 (35)	15 (66)	0.02
Avançat (III–IV)	22 (65)	8 (33)	
Metàstasis	13 (38)	3 (12)	0.07

**Taula 12: Correlació de l'expressió de mRNA Shh en pacients amb CCR i les característiques clinicopatològiques.**

## 6.8. Expressió i quantificació de Shh en teixit tumoral, teixit normal i teixit embrionari



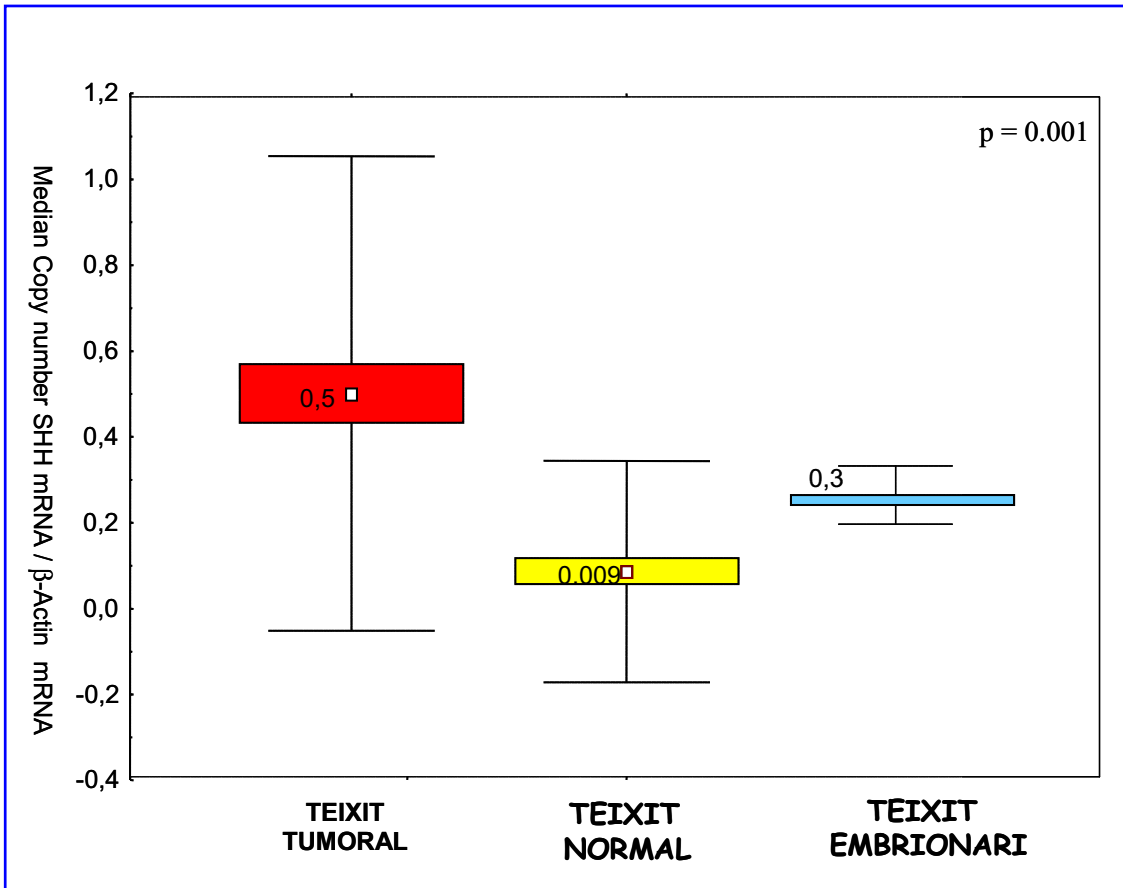
*Figura 44: Valors mitjans obtinguts de la quantificació de Shh en còlon de diferents setmanes embrionàries.*



*Figura 45: Comparativa dels diferents nivells d'expressió en còlon embrionari i en teixits tumorals i normals de pacients afectats de CCR*



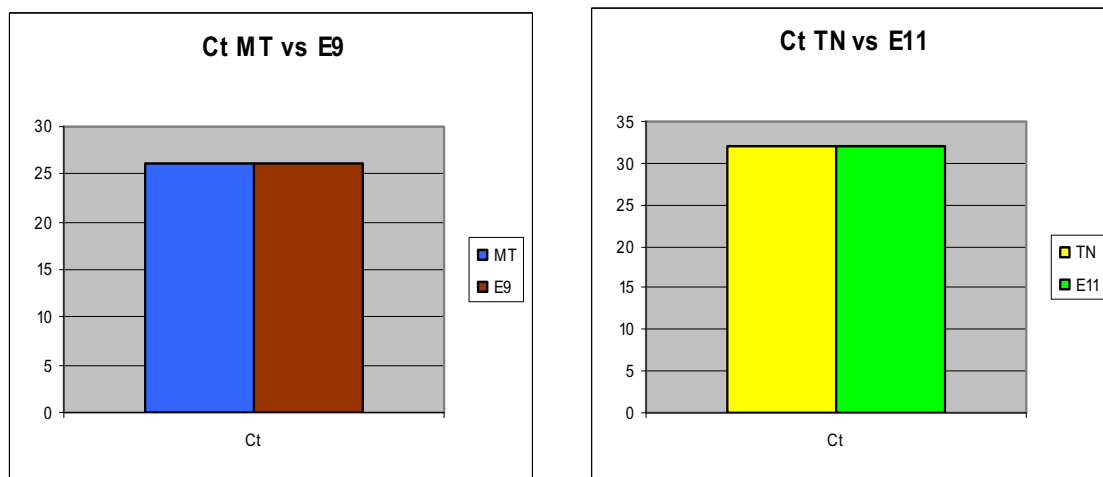
Tot i ser diferents, podríem considerar que els valors obtinguts en el cas dels teixits tumorals s'assemblarien als valors obtinguts en el cas del còlon embrionari de 7 setmanes de desenvolupament; moment en el que existeixen gran quantitat de cèl·lules indiferenciades. Els baixos valors obtinguts en el cas de teixit sa de còlon adult, estarien relacionats amb els valors obtinguts en el cas del còlon embrionari d'11 setmanes; moment en el que tenim gran quantitat de cèl·lules diferenciades.



**Figura 46: Nivells d'expressió relativa de mRNA de Shh en teixits tumorals, teixits normals i teixit embrionari de còlon (p=0.001).**

En teixits tumorals, la mitjana d'expressió és de 0.521 mentre que en el teixit normal és de 0.0094. també veiem que en el cas dels teixits embrionaris, aquesta mitjana d'expressió és de 0,3; valor molt més semblant a l'obtingut en el cas de teixits tumorals que no pas en el cas dels teixits normals (p=0.001) (figura 46).

Si fem una comparació dels Ct obtinguts en les diferents edats embrionàries i en els teixits tumorals i teixits normals pot observar-se que en el cas de MT i embrió de 9 setmanes els valors obtinguts són molt similars (Ct=26.3). El mateix passa si observem els Ct de TN i embrió d'11 setmanes (Ct= 32) (figura 47).



**Figura 47: Mitjana de Cts obtinguts en les mostres de teixit adult i en els embrions.**

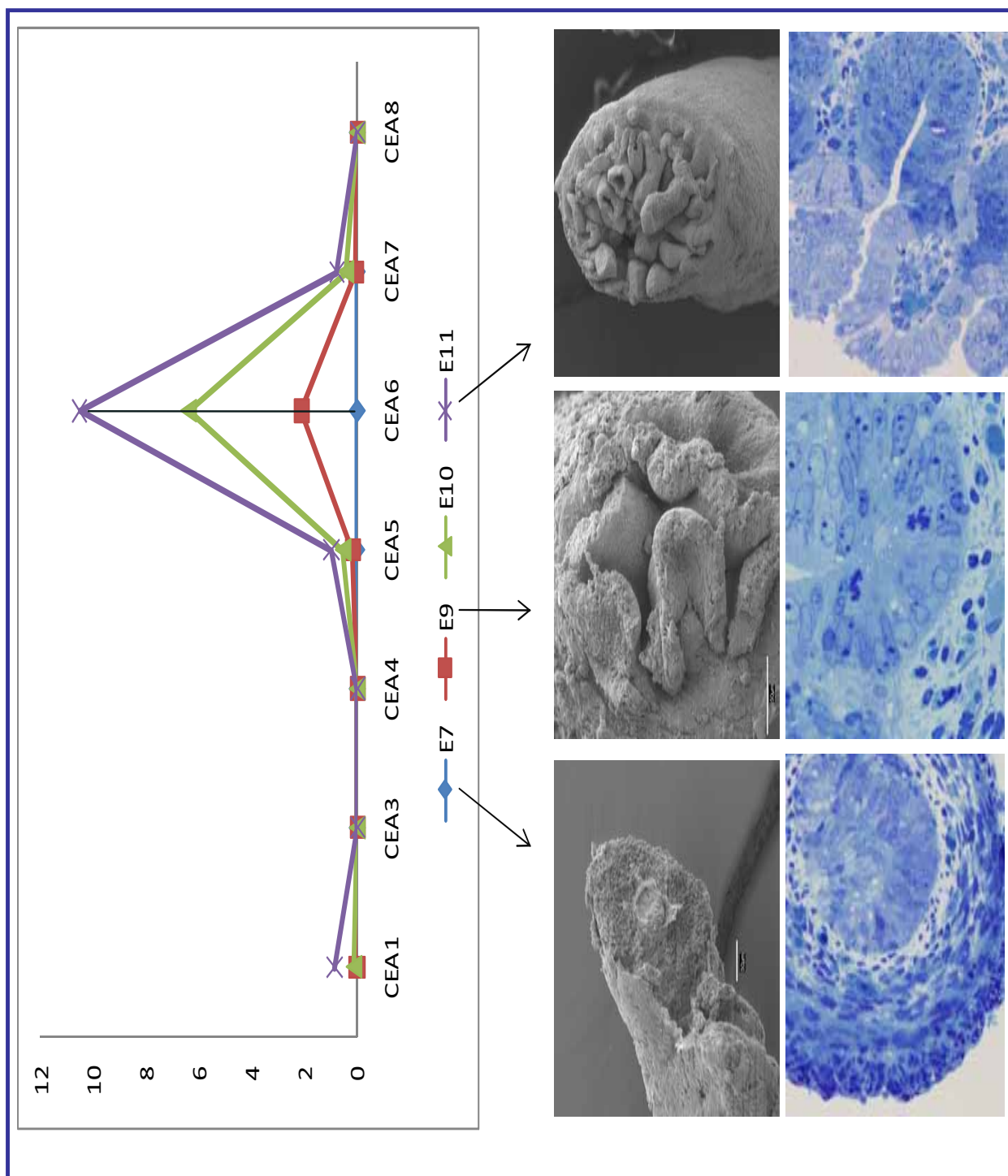
## **6.9. Expressió dels membres de la família CEACAM en els diferents estadis embrionaris**

Un cop analitzats els nivells d'expressió de tots els membres de la família CEACAM en els diferents estadis de desenvolupament embrionari podem observar, tal i com es pot veure a la figura 48, que en els casos de CEACAM3, CEACAM4 i CEACAM8 no es detecta expressió durant el desenvolupament.

Podem observar també una lleugera expressió de CEACAM1, CEACAM5 i CEACAM7, durant les setmanes 10 i 11 de desenvolupament, tot i que les diferències en els nivells d'expressió entre aquests dos estadis del desenvolupament no són massa grans.

El fet més significatiu que veiem són els elevats nivells d'expressió de CEACAM6 que observem entre les setmanes 9 i 11 de desenvolupament embrionari. Aquests nivells d'expressió augmenten de manera progressiva i tenen el seu pic màxim en l'embrió d'11 setmanes.

Tal i com podem observar en les imatges de microscòpia, veiem que existeix una progressió morfològica tant de l'epiteli com dels teixits adjacents



**Figura 48: Nivells d'expressió dels membres de la família CEACAM en diferents estadis del desenvolupament embrionari del còlon humà.**

## 6.10. Expressió dels membres de la família CEACAM en MT i TN de pacients afectats de CCR.

Els membres de la família CEACAM que presentaven expressió en el desenvolupament del còlon embrionari, CEACAM1, CEACAM5 i CEACAM6, els hem analitzat en les mostres de teixit tumoral i teixit normal de pacients afectats de CCR i els resultats obtinguts són els següents:

### 6.10.1. Comparació de l'expressió dels membres de la família CEACAM entre MT i TN i comparació segons l'estadiatge tumoral

CEACAMs	N	MITJA	DESV.ESTD	p
CEACAM1 MT	62	0.5204	0.84117	0.103
CEACAM1 TN	62	0.8905	1.5401	
CEACAM5 MT	63	5.3275	8.12138	0.000085979
CEACAM5 TN	63	1.3733	2.79862	
CEACAM6 MT	62	10.9495	16.98083	0.000033593
CEACAM6 TN	62	1.4342	2.94374	

Taula 13: Expressió de CEACAM1, CEACAM5 i CEACAM6 en MT i TN.

Estadi inicial I-II	N	MITJA	DESV.ESTD	p
CEACAM1 MT estadis inicials	31	0.4486	0.6086	0.506
estadis avançats	31	0.59122	1.029	
CEACAM5 MT estadis inicials	31	5.5186	8.68546	0.856
estadis avançats	32	5.1424	7.670591	
CEACAM6 MT estadis inicials	31	9.0307	15.86316	0.378
estadis avançats	31	12.8683	18.08479	

Taula 14: Expressió de CEACAM1, CEACAM5 i CEACAM6 segons l'estadiatge tumoral.

L'anàlisi d'expressió de CEACAM1 en teixit tumoral i teixit normal ens indica que existeix una major expressió de mRNA de CEACAM1 en teixit normal que en tumoral però que aquestes diferències d'expressió no són estadísticament significatives ( $p=0.103$ ) (figura 49A).

Analitzat els nivells d'expressió de CEACAM1 segons l'estadiatge i considerant com a estadis inicials I-II i com a estadis avançats III-IV; no s'aprecien diferències ( $p=0.506$ ) (figura 49B).

Tot i que l'anàlisi de Kaplan-Meier a l'analitzar el temps a la progressió i les corbes de supervivència (figura 49C i D), ens mostra l'aparició de dos grups; blau (CEACAM1<sub>n</sub> per sobre la mediana) i vermell (CEACAM1<sub>n</sub> per sota la mediana), les diferències no són prou significatives com per predir si un dels dos grups evoluciona més favorablement que l'altre ( $p=0.383$ ) o si la supervivència és major ( $p=0.442$ ).

L'anàlisi d'expressió de CEACAM5 en teixit tumoral i teixit normal ens indica que existeix una major expressió de mRNA de CEACAM5 en teixit tumoral que en normal ( $p=0.00008$ ) (figura 50A).

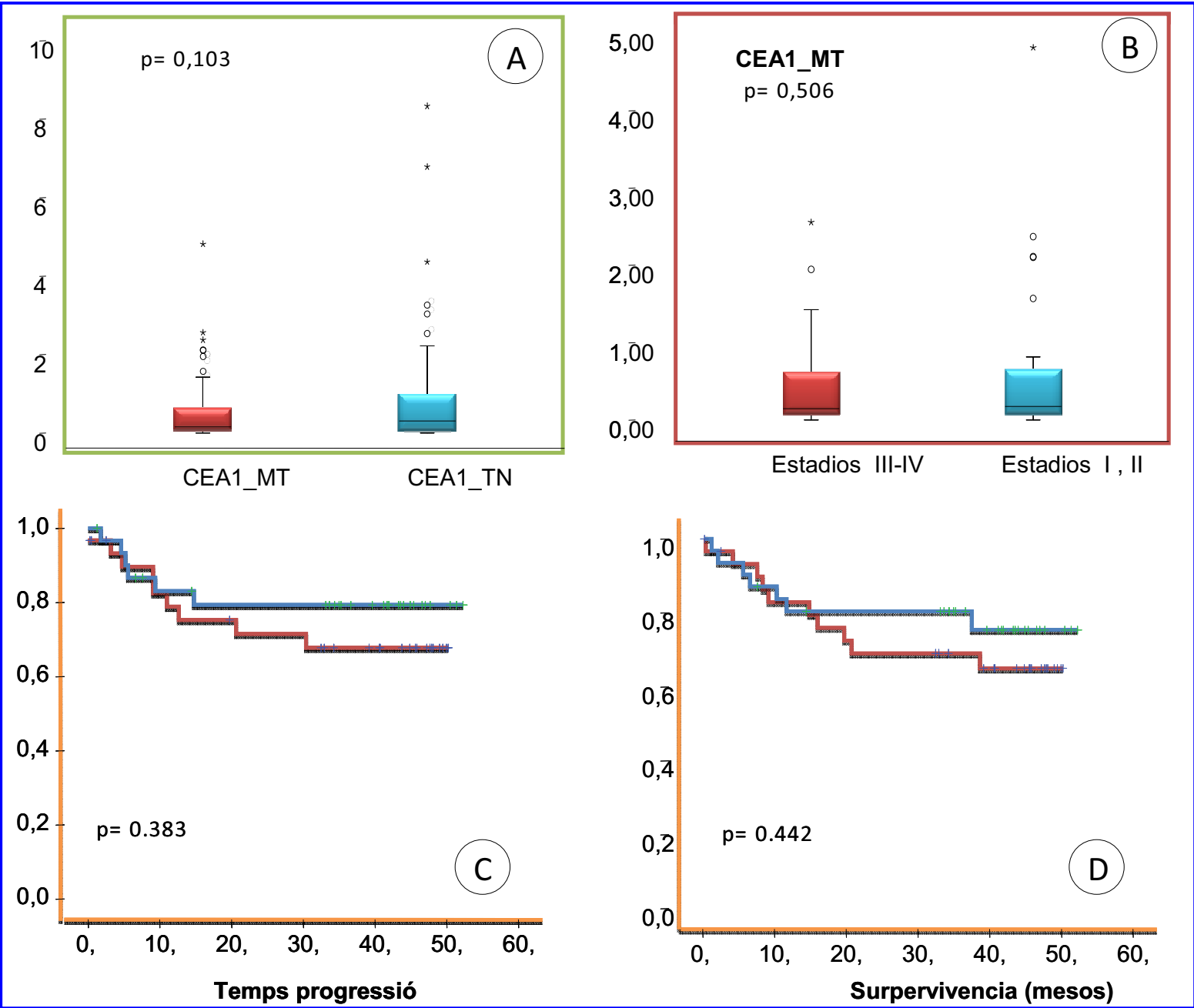
Analitzant els nivells d'expressió de CEACAM5 segons l'estadiatge veiem que les diferències en quant a l'expressió no són significatives ( $p=0.805$ ) (figura 50B).

En canvi, les corbes de Kaplan-Meier a l'analitzar el temps a la progressió i la supervivència (figura 50C i D), ens mostren l'aparició de dos grups; clarament diferenciats, (CEACAM5<sub>n</sub> per sobre la mediana) i vermell (CEACAM5<sub>n</sub> per sota la mediana). En els dos casos observem que els pacients que pertanyen al grup amb nivells de CEACAM5 elevats progressen més favorablement ( $p=0.001$ ) i tenen també una major supervivència ( $p=0.006$ ).

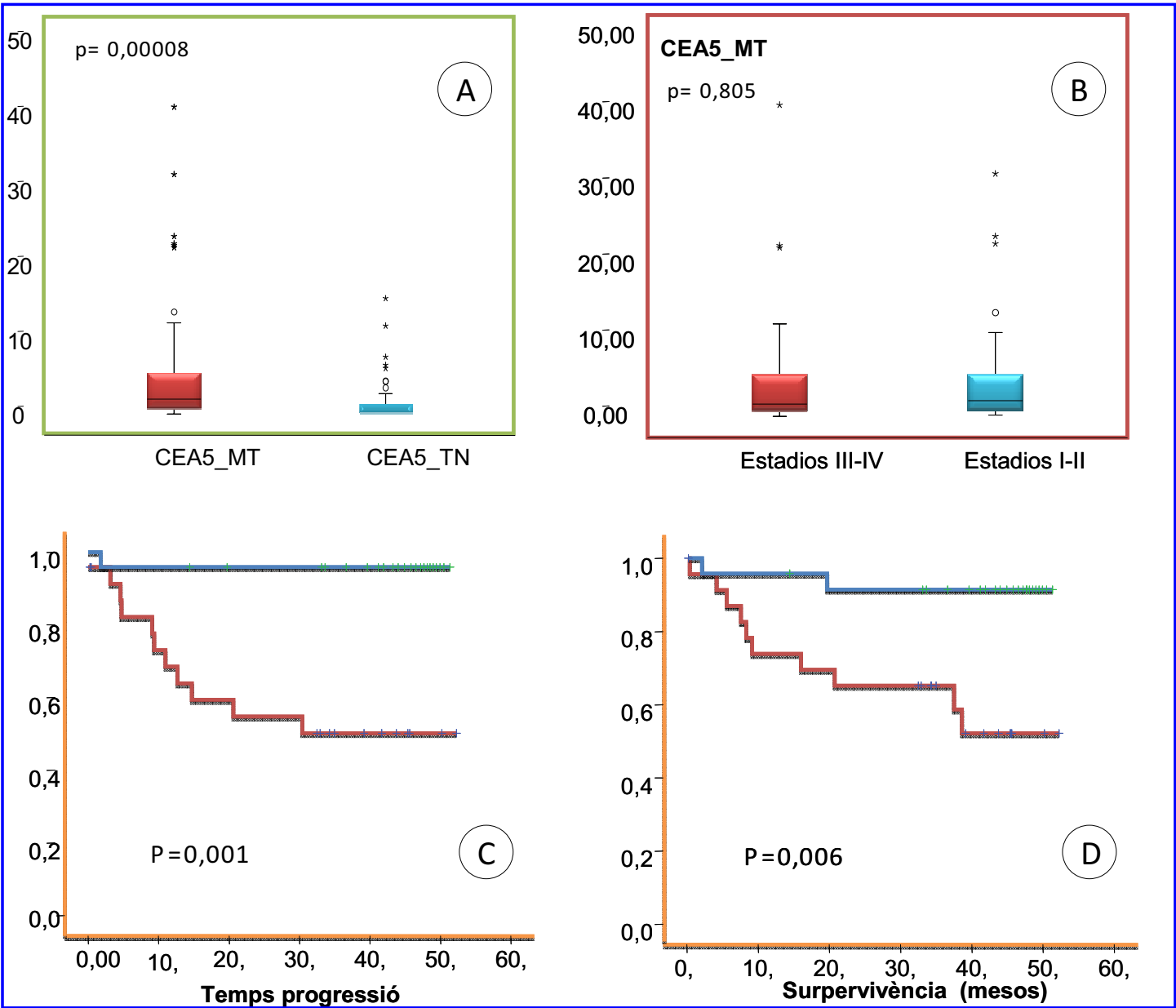
L'expressió de CEACAM6 és troba molt més elevada en MT que en TN ( $p=0.00003$ ) (figura 51A).

A l'analitzar els nivells d'expressió de CEACAM6 segons l'estadiatge veiem que es troba molt més expressat en estadiatges avançats, les diferències no són prou significatives ( $p=0.378$ ) (figura 51B)

A l'analitzar el temps a la progressió, les corbes de Kaplan Meyer ens mostren una tendència en la que pacients pertanyents al grup blau (CEACAM6<sub>n</sub> per sobre la mediana) presentarien un millor pronòstic que els pertanyents al grup vermell ( $p=0.095$ ) (figura 51C). En canvi, quan mirem la supervivència no trobem diferències significatives entre els dos grups ( $p=0.273$ ) (figura 51D).



*Figura 49: A: Nivells d'expressió de CEA1 en MT i TN. B: Expressió de CEA1 segons l'estadiatge. C: Temps a la Progressió. D: Supervivència. ( — CEA1<sub>MT</sub> > mediana ) ( — CEA1<sub>MT</sub> < mediana )*



**Figura 50:** A: Nivells d'expressió de CEACAM5 en MT i NT. B: Expressió de CEACAM5 segons l'estadiatge. C: Temps a la Progressió. D: Supervivència.  
▭ CEACAM5<sub>n</sub> > median) ▭ CEACAM5<sub>n</sub> < median)



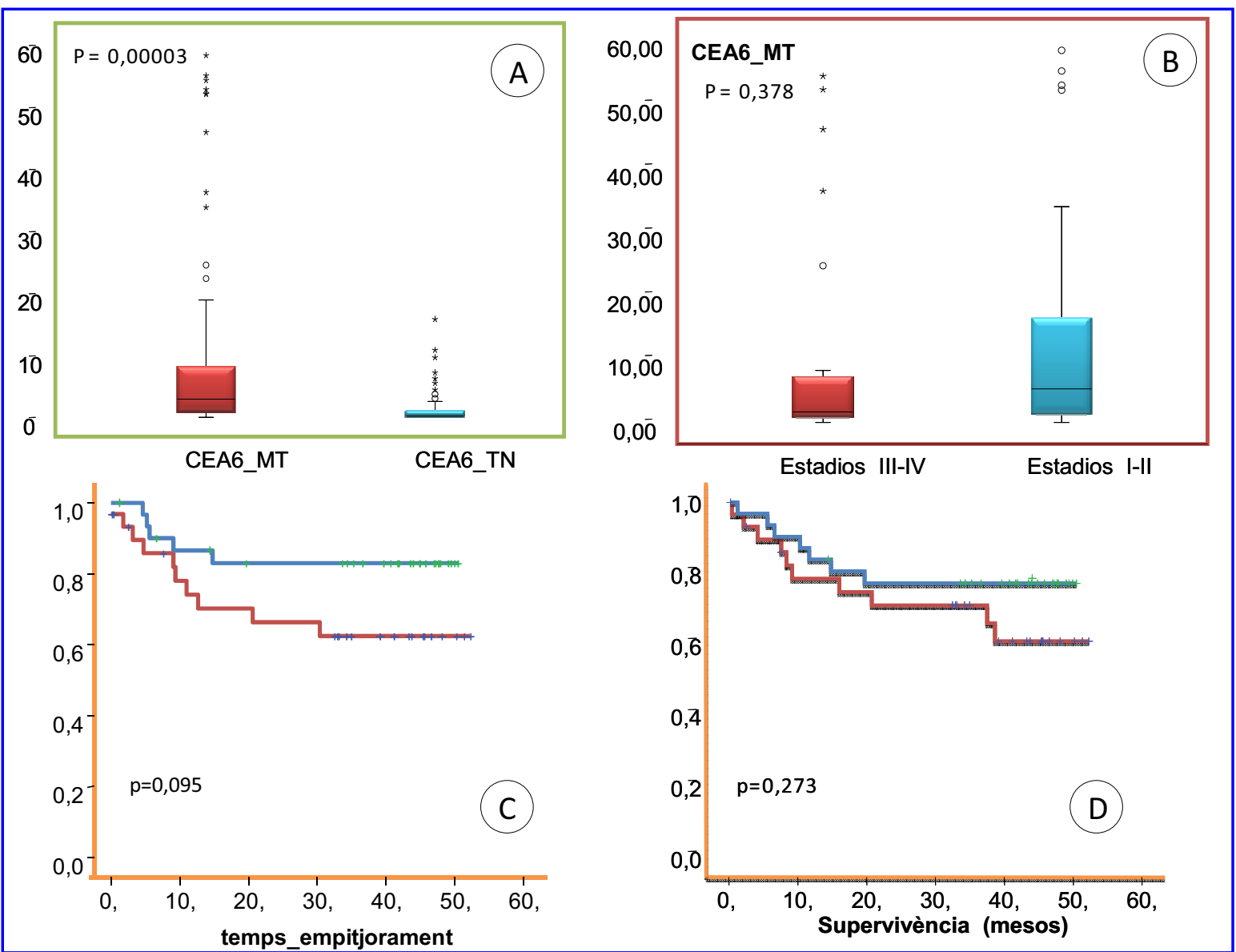


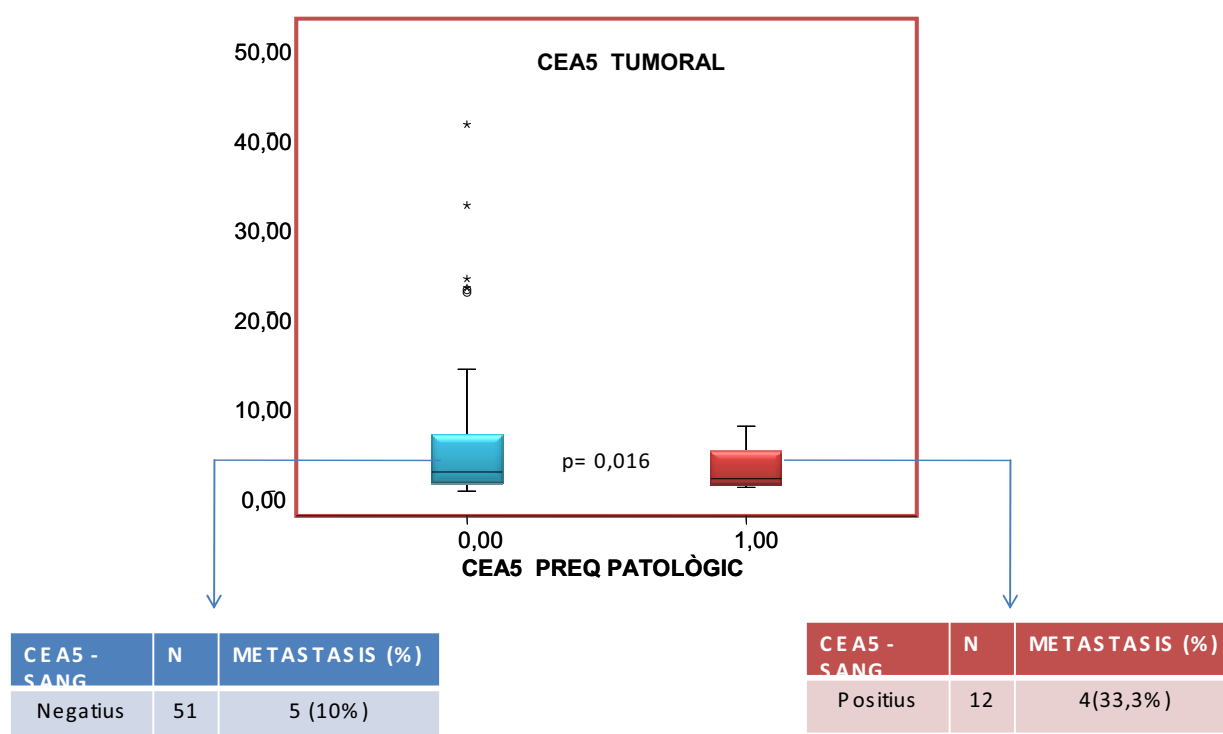
Figura 51: A: Nivells d'expressió de CEA6 en MT i NT. B: Expressió de CEA6 segons l'estadiatge. C: Temps a la Progressió. D: Supervivència.  
 (— CEA6<sub>MT</sub> > mediana) (— CEA6<sub>MT</sub> < mediana)

### 6.10.2. Anàlisi dels nivells d'expressió de CEACAM5 en sang perifèrica i MT

Dels 63 casos estudiats, 51 pacients presenten uns nivells negatius de CEACAM5 en sang prequirúrgica i 12 presenten uns nivells positius de CEACAM5 en sang prequirúrgica.

Al comparar aquesta presència/absència amb els nivells de CEACAM5 obtinguts a l'analitzar els tumors veiem que aquells pacients que no presenten expressió de CEACAM en sang perifèrica prequirúrgica tenen major expressió de CEACAM5 en MT i un menor risc de desenvolupar metàstasi (8%) ja que dels 51 casos estudiats, només 5 han format metàstasi.

Per contra, l'expressió de CEACAM5 en sang perifèrica es correspon amb baixos nivells d'expressió de CEACAM5 per part del tumor i implica un major risc de desenvolupar metàstasi (12%) ja que dels 12 casos amb nivells positius 4 n'han acabat desenvolupant (p=0.016) (figura 52).



**Figura 52: Comparació entre els nivells d'expressió de CEACAM5 en tumor i la presència/absència de CEACAM5 prequirúrgic en sang perifèrica.**