



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**

Tot va començar un dia que jo estava passejant per la Facultat de Biologia. Un cartell em va cridar l'atenció: "Es busca llicenciat/da per a la realització d'un estudi sobre embriologia. Dr. Monzó. Departament d'Anatomia i Embriologia Humana-UB". Això va ser cap el mes de maig de l'any 2002 i ara ja han passat més de 5 anys.

Quan vaig començar a treballar al Departament no sabia el que m'esperava, però ara puc dir que estic molt contenta del camí que vaig començar aquí. Al principi només hi estava jo, i ara som com una gran família on hi tenim de tot; biòlegs, informàtics, farmacèutics, metges i les millors tècnics de laboratori.

El primer que va venir a fer-me companyia va ser l'Alfons. De fet va començar a treballar al laboratori un parell o tres de mesos més tard que jo, així que pràcticament ens hem "criat" junts. Encara m'enrecordo com t'enfadaves cada vegada que no et sortien les PCRs i ara mira't, ets un crack dels microRNAs. Moltes Felicitats!!

Poc a poc el grup de 2 es va anar ampliant, i van arribar la Sònia, l'Aina, la Tània, la Silvia, el Bernat, el Miquel, l'Anna i la Carme.

A les nenes Silvia, Aina, Tània i Sònia; totes m'heu aportat coses bones en moments diferents. Hem rigut molt juntes i també ens hem desfogat entre nosaltres explicant-nos els problemes. Una cosa que no sabeu: quan estic al despatx ric molt perquè us sento cantar i fer les veuetes. No canvieu eh?? que amb alegria es treballa millor.

Silvieta, és una bona oportunitat i estic segura de que fas el que has de fer. Moltíssima sort, guapa!! Saps que et trobaré molt a faltar??

Carme, tu també ho has aconseguit! Enhorabona.

Bernat, tot i que estàs molt sol·licitat per tots, mai has tingut un "no, ara no puc" per a mi. Moltíssimes gràcies per la paciència que has tingut explicant-me els dubtes estadístics i per treure l'entrellat dels CEAs!!!

Miquel i Anna, he rigut molt amb vosaltres. Miquel, t'enrecordes quan ens van venir a filmar per la tele??... "està bé, està bé"... I tu, Gayeta, moltes coses de feina no hem compartit... de fet, ara que ho penso gairebé res, però hem rigut molt fent caricatures, als sopars... i el més important, quan et necessito i et truco, sempre hi ets. Gràcies Anna!

Elena, casi no hemos coincidido, y ahora que podríamos empezar a conocernos comienzas una nueva aventura. Mucha suerte!!

Dolors, que no m'oblido de tu!! Vaig arribar aquí amb un títol a sota el braç però sense gens d'experiència. Gràcies per ensenyar-me i per tots els bons consells.

A tots els meus companys del Departament, amb els que he passat molt bons moments compartint xerrades, cafès, dinars i algun que altre cotilleo. Gràcies per aquests kit-kats i també per la vostra ajuda a l'hora d'ensenyar-me a disfrutar de les classes d'Anatomia.

Dra. Moreno i Dr. Ibeas, gràcies a vosaltres i a la vostra col·laboració hem pogut realitzar els estudis i anar a algun que altre congrés. Ho vaig passar molt bé amb vosaltres a Saragossa!!!

No m'agradaria oblidar-me de tots els estudiants que han anat passant per aquí i als que espero haver ensenyat una mica com és la nostra feina; Sebas, Marc, Aina, Andreu, Maria, Edu, Sonia i Juan. He vist com us heu anat fet grans. Molta sort amb tot el que feu!.

Als meus germans, a les tietes, als meus cunyats, al Genar i a la Montse. Gràcies per les paraules d'ànim i els cangurs que m'heu fet.

Als meus amics de sempre, gràcies per la vostra amistat.

Laura, lluny però a la vegada tan a prop. Gràcies per ser-hi!

Dr. Monzó, per mi, Marià; moltes gràcies per haver-me donat l'oportunitat de treballar amb tu i per haver confiat en mi tots aquests anys. Ets un gran jefe i m'has ajudat moltíssim, tant a nivell de feina on he après molt com a nivell personal en moments difícils per mi en els que m'has recolzat i animat.

Mama i Jordi. Per fi s'ha acabat aquesta etapa. Sé que últimament he estat una mica pesada i nerviosa però ara ja està. Gràcies pels ànims i consells que sempre m'heu donat i no parlo només de feina. Us estimo.

Papa, un dia vas dir-me que estaves molt orgullós de mi i estic segura que ara també ho estaries. Cada dia penso en tu.

Oriol, què t'he de dir que no sàpigues? Sense tu, i encara que soni a tòpic, no ho hauria pogut fer. En moments de desesperació m'has ajudat a no tirar la tovallola i a seguir endavant. Tu i el Marçal m'heu animat, l'un amb paraules i l'altre amb rialles a veure-ho tot clar. Marçalet, ja sé que fa alguns dies que no estic gaire per tu però ara ja s'ha acabat i torno a ser teva al 100%!! US ESTIMO MOLTÍSSIM!!!!

1.- ABREVIATURES	- 9 -
2.- JUSTIFICACIÓ DE LA TESI	- 11 -
3.- INTRODUCCIÓ	- 13 -
3.1. EMBRIOLOGIA MOLECULAR I DESCRIPTIVA DE L'APARELL INTESTINAL	- 13 -
3.1.1. <i>Embriologia Descriptiva</i>	- 13 -
3.1.2. <i>Embriologia Molecular</i>	- 19 -
3.1.3. <i>Què són les cèl·lules mare?</i>	- 21 -
3.1.4. <i>Cèl·lules mare intestinals</i>	- 23 -
3.1.5. <i>Cèl·lules mare intestinals i l'origen del càncer colorectal</i>	- 26 -
3.2.-BASES MOLECULARS DEL CÀNCER	- 28 -
3.2.1. <i>Protooncogens</i>	- 28 -
3.2.2. <i>Gens Supressors Tumorals</i>	- 29 -
3.3.- CÀNCER COLORECTAL	- 37 -
3.3.1. <i>Generalitats</i>	- 37 -
3.3.2. <i>Factors de risc</i>	- 39 -
3.3.3. <i>Carcinoma colorectal esporàdic</i>	- 39 -
3.3.4. <i>Síndromes canceroses hereditàries</i>	- 40 -
3.3.4.1. <i>Poliposi Adenomatosa Familiar</i>	- 41 -
3.3.4.2. <i>Càncer de Còlon Hereditari no Polipòsic (HNPCC)</i>	- 41 -
3.3.5. <i>Localització dels adenocarcinomes</i>	- 43 -
3.3.6. <i>Progressió del tumor</i>	- 43 -
3.3.7. <i>Característiques clíniques del càncer colorectal</i>	- 44 -
3.3.8. <i>Pronòstic del carcinoma de còlon i recte</i>	- 45 -
3.3.9. <i>Etiologia del càncer colorectal</i>	- 47 -
3.3.9.1. <i>Tabaquisme i consum de begudes alcohòliques</i>	- 47 -
3.3.9.2. <i>Exercici Físic</i>	- 48 -
3.3.9.3. <i>Hàbits alimentaris</i>	- 48 -
3.4.-GENS ESTUDIATS IMPLICATS EN EL DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI I EN EL CÀNCER COLORECTAL	- 52 -
3.4.1. <i>Generalitats</i>	- 52 -
3.4.2. <i>Família Hedgehog</i>	- 53 -
3.4.2.1. <i>Generalitats</i>	- 53 -
3.4.2.2. <i>Via de senyalització de Shh</i>	- 55 -
3.4.2.3. <i>Funcions del gen Shh i el seu paper en el càncer</i>	- 57 -

3.4.3.	<i>Família CEA</i>	- 59 -
3.4.3.1.	Generalitats	- 59 -
3.4.3.2.	Membres de la subfamília CEA	- 60 -
3.4.3.3.	Expressió dels membres de la família CEA en teixits adults sans.....	- 64 -
3.4.3.4.	Expressió dels membres de la família CEA en tumors.....	- 65 -
3.4.3.5.	Factors que poden afectar els nivells de CEA en el sèrum de pacients amb CCR.....	- 67 -
4.-	OBJECTIUS	- 71 -
5.-	MATERIAL I MÈTODES	- 73 -
5.1.	MOSTRES EMBRIONÀRIES	- 73 -
5.2.	MOSTRES DE TEIXIT TUMORAL I TEIXIT NORMAL	- 73 -
5.3.	ANÀLISI MORFOLÒGIC DE LES MOSTRES EMBRIONÀRIES.....	- 73 -
5.3.1.	<i>Estudi ultraestructural</i>	- 73 -
5.3.2.	<i>Estudi Immunohistoquímic</i>	- 74 -
5.4.	OBTENCIÓ DE RNATOTAL (RNAT) I CDNA	- 74 -
5.4.1.	<i>Base del funcionament de la RT-PCR</i>	- 77 -
5.5.	EXPRESSIÓ I QUANTIFICACIÓ DE MRNA MITJANÇANT RT-QPCR	- 78 -
5.5.1.	<i>Bases del funcionament de la RT-QPCR</i>	- 78 -
5.5.2.	<i>Primers i sondes</i>	- 80 -
5.6.	ANÀLISI ESTADÍSTIC	- 80 -
6.-	RESULTATS	- 83 -
6.1.	ANÀLISI MORFOLÒGIC DE LES MOSTRES EMBRIONÀRIES.....	- 83 -
6.2.	ANÀLISI IMMUNOHISTOQUÍMIC DEL GEN SHH.....	- 93 -
6.3.	CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques DELS PACIENTS	- 96 -
6.4.	EXTRACCIONS DE RNAT DE TEIXITS ADULTS I DE MOSTRES EMBRIONÀRIES.....	- 98 -
6.5.	EXPRESSIÓ I QUANTIFICACIÓ DE SHH EN MOSTRES EMBRIONÀRIES MITJANÇANT RT-QPCR	- 99 -
6.6.	EXPRESSIÓ I QUANTIFICACIÓ DE SHH EN MOSTRES DE PACIENTS AFECTATS DE CCR.....	- 101 -
6.7.	CORRELACIÓ ENTRE ELS NIVELLS D'EXPRESSIÓ DE SHH EN PACIENTS AFECTATS DE CCR I LES CARACTERÍSTIQUES CLINICOPATOLÒGIQUES	- 103 -
6.8.	EXPRESSIÓ I QUANTIFICACIÓ DE SHH EN MT, TN I TEIXIT EMBRIONARI	- 105 -
6.9.	EXPRESSIÓ DELS MEMBRES DE LA FAMÍLIA CEACAM EN DIFERENTS ESTADIS EMBRIONARIS...-	108 -
6.10.	EXPRESSIÓ DELS MEMBRES DE LA FAMÍLIA CEACAM EN MT I TN.	- 110 -
6.10.1.	<i>Comparació de l'expressió dels membres de la família CEACAM entre MT i TN i comparació segons l'estadiatge tumoral</i>	- 110 -
6.10.2.	<i>Anàlisi dels nivells d'expressió de CEA5 en sang perifèrica i MT</i>	- 115 -

7. - DISCUSSIÓ	- 117 -
8.- CONCLUSIONS	- 125 -
9.- BIBLIOGRAFIA.....	- 127 -
10.- ARTICLES PUBLICATS RELACIONATS AMB LA TESI.....	- 143 -
11.- ALTRES ARTICLES PUBLICATS DURANT EL PERÍODE DE TESI.....	- 145 -

1.- ABREVIATURES

AA	aminoàcids
Ab	anticòs
Ag	antigen
APC	adenomatosis polyposis coli
BCC	basal cell adenocarcinoma
BMP	bone morphogenic protein 4
CCR	càncer colorectal
cDNA	DNA còpia
CE	carcinoma embrionari
CEA	carcinoembryonic antigen
CEA _n	CEA normalitzat
Ci	Cubitus interruptus
Cl ₂ Mg	clorur de magnesi
Cos2	Costal 2
DCC	deleted in colorectal cancer
Dhh	Desert hedgehog
DNA	àcid desoxiribonucleic
dNTPs	dideoxinucleòtids fosfat
DPC	deleted in pancreatic cancer locus 4
dpc	dies post coit
EMT	epithelial-mesenchymal transition
FAP	familial adenomatous polyposis
Fu	Fused
Gli	Glioma-associated oncogen
GSK3 β	Glicogen sintasa quinassa 3 β
GTP	guanosina trifosfat
H/E	hematoxilina-eosina
Hh	Hedgehog
HIP	Hedgehog inhibitory protein
HNPCC	heretary nonpolyposis colorectal cancer

ICM	inner cell mass
Ig	Immunoglobulina
Ihh	Indian hedgehog
IHQ	immunohistoquímica
ISEMFs	intestinal subepithelial myofibroblast cells
MET	mesenchymal-epithelial transition
MMR	mismatch repair genes
mRNA	RNA missatger
MSI	microsatellite instability
MT	massa tumoral
NER	nucleotide excision repair
PCR	polymerase chain reaction
PGS	Pregnancy-specific glycoprotein
PKA	Proteïna Kinasa A
POUF5/OCT3-4	octamer-binding transcription factor 3-4
Ptch	Patched
RNA	àcid ribonucleic
RNA _t	RNA total
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
RT-QPCR	real time quantitative PCR
SEM	scanning electron microscopy
Shh	Sonic hedgehog
Smo	Smoothened
SP	sang perifèrica
ST	sang tumoral
TCF	transcription factor
TEM	transmission electron microscopy
TN	teixit normal
VEGF	vasoendothelial growth factor
µg, ml ,ng, mM	micrograms, mil·lilitres, nanograms, mil·limolar