



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**

## **7. - DISCUSSIÓ**

La primera part de l'estudi ha estat evidenciar l'expressió de Shh en mostres embrionàries humanes. Entre les setmanes 7 i 12 de desenvolupament l'aparell intestinal pateix importants canvis. L'hèrnia umbilical es retrau cap a la cavitat abdominal, l'endoderma es diferencia en epitelí intestinal i el mesoderma adjacent o mesènquima es transforma en teixit connectiu i teixit muscular. Tots aquests canvis són controlats per interaccions cel·lulars entre mesènquima i endoderma (Sukegawa, 2000; Moore-Scott, 2005).

A l'estudi realitzat hem observat que a la setena setmana de desenvolupament, l'epitelí intestinal encara no està diferenciat i que el mesènquima es caracteritza per la presència de cèl·lules apoptòtiques i per l'absència de la capa de musculatura llisa tal com es pot veure a les figures 30A i 30D. A més a més, els nivells d'expressió en aquest estadi de desenvolupament són baixos i l'expressió proteica de Shh es detecta a l'endoderma intestinal adjacent al mesènquima, tal i com pot observar-se a la figura 37A. Tot això ens indica que en estadis inicials del desenvolupament del còlon humà, Shh s'expressa en un primer moment a l'endoderma intestinal. Existeixen dades experimentals de línies cel·lulars i en cultius d'òrgans que demostren que l'expressió temprana de Shh a l'endoderma intestinal inhibeix l'expressió de cFKBP/SMAP i evita la diferenciació de la musculatura llisa propera a l'epitelí (Sukegawa, 2000). La presència de cèl·lules apoptòtiques a les proximitats de l'endoderma epitelial intestinal, suggereix que aquestes cèl·lules poden participar en processos de remodelació de l'epitelí, tal i com es pot observar en embrions de 10.5 i 11 setmanes (Bell, 1998).

L'anàlisi d'expressió mitjançant RT-QPCR ens mostra que Shh assoleix la seva màxima expressió a les 9.5 setmanes de desenvolupament (figura 40). Aquests resultats han estat confirmats per mètodes immunohistoquímics, fet que demostra que Shh es troba altament expressat a l'endoderma epitelial i al mesènquima (figures 38B i 38C).

L'anàlisi morfològic ens indica que en aquesta etapa del desenvolupament, el còlon no està encara completament format. L'endoderma epitelial presenta un patró longitudinal en zig-zag, on hi trobem la presència de miofibroblasts i podem veure que la capa muscular encara no s'ha format (figura 33 A i 33D). La presència de Shh a les zones on hi ha miofibroblasts (figura 33C) ens indica que Shh podria estar involucrat en la inducció de la diferenciació de la musculatura llisa. De fet, existeixen estudis que

demostren que a l'intestí, els miofibroblasts responen als senyals que els arriben de Shh (Madison, 2004) i que Shh és necessari per a la formació de musculatura llisa en pulmó (Pepicelli, 1998). També s'han pogut correlacionar les mutacions de Shh amb una reducció significativa de la capa de musculatura llisa i amb una malrotació del sistema digestiu (Ramalho-Santos, 2000; Takahashi, 1998).

Entre les setmanes 9 i 10 de desenvolupament, l'hèrnia fisiològica desapareix i les nanses intestinals es troben localitzades a l'interior de la cavitat peritoneal. L'aspecte de la capa de musculatura llisa en aquest moment pot jugar un paper important en tot aquest procés. A les setmanes 10 i 11 de desenvolupament, Shh és regulat a la baixa i s'expressa només a la base de les criptes colòniques. A la setmana 11 del desenvolupament, trobem evidències de que es produeix una diferenciació; aquestes evidències inclouen unions intercel·lulars, presència de cèl·lules secretores i presència de cèl·lules musculars. A més a més, trobem presència de ISEMFs a la base de les criptes (figueres 30 E i 30F). Dades experimentals ens indiquen que els ISEMFs es troben localitzats en el mesènquima embrionari i que regulen l'organogènesi del tub digestiu. Estudis realitzats en animals d'experimentació ens indiquen que els ISEMFs poden promoure l'angiogènesi i la diferenciació de l'endoderma embrionari de l'epiteli intestinal mitjançant l'activació de TGF- $\beta$ , KGF i PGE<sub>2</sub>. Shh s'expressa en els ISEMFs i participa en la formació de les criptes de l'epiteli intestinal (Madison, 2004).

També hem comparat els nivells d'expressió de Shh en teixit tumoral i normal de pacients afectats de càncer colorectal. Shh actua com a morfogen que organitza les estructures embrionàries, i específicament teixits embrionaris endodèrmics. En l'adult, l'anàlisi immunohistoquímic detecta la presència de Shh en zones molt específiques; es troba sobreexpressat en zones de reparació de l'epiteli pulmonar, a la mucosa gàstrica i també s'ha detectat una senyal molt dèbil a la base de les criptes intestinals i colòniques (van den Brick, 2002). Estudis *in vitro* han detectat l'expressió de Shh en cèl·lules tumorals però no en normals (Qualthrough, 2004). En el tracte gastrointestinal adult, l'expressió de Shh es troba limitada a la regió de les cèl·lules mare i es relaciona amb la diferenciació de les cèl·lules epitelials.

En el nostre estudi hem trobat nivells d'expressió de mRNA de Shh molt més elevats en teixit tumoral que en teixit normal (figura 42). Les nostres dades tenen relació amb resultats d'estudis equivalents (Berman, 2003; Watkins, 2003) i poden estar relacionades amb l'expressió de Shh per part de les cèl·lules mare. Shh es troba expressat en el 70% de tumors pancreàtics i a cap mostra de teixit pancreàtic sa (Thayer,

2003); també trobem expressió de mRNA de Shh en el 97% de càncers d'estómac, esòfag i còlon; mentre que en el tracte gastrointestinal adult sa, la seva expressió es troba limitada a les cèl·lules mare (Berman, 2003)

L'expressió de Shh s'observa en les primeres fases del desenvolupament embrionari, a les cèl·lules mare adultes i en el desenvolupament de tumors de les vies respiratòries i del tracte gastrointestinal.

En el present estudi observem que l'expressió de Shh és més elevada en els primers estadis de desenvolupament del tumor, moment en que trobem major quantitat de cèl·lules indiferenciades, que en fases avançades de la malaltia ( $p=0.02$ ) (taula 12). També podem veure que la mitjana d'expressió de mRNA de Shh en teixit tumoral és de 0.5 mentre que en teixit normal és de 0.009 ( $p=0.00001$ ) (figura 42).

En 2 dels pacients estudiats, els nivells d'expressió de Shh tant a teixit tumoral com a teixit normal, són molt semblants. Tot i que l'estudi histopatològic va confirmar l'absència de cèl·lules tumorals en teixit normal, no podem descartar la possibilitat de que aquests teixits continguin algunes anormalitats moleculars que podrien indicar l'existència de malaltia residual, ja que s'ha observat que un dels 2 pacients amb elevats nivells d'expressió de Shh en teixit normal presenta metàstasi hepàtica.

Existeixen estudis *in vitro* i *in vivo* (Thayer, 2003; Qualtrough, 2004) realitzats en models experimentals i amb càncer de mama on es demostra que la ciclopamina inhibeix l'expressió de Shh reduint així el tamany del tumor. La ciclopamina és un inhibidor de Smo, ja que s'uneix a ell inhibint la via de transducció de senyal de Shh. Estudis realitzats demostren que un 90% de ratolins Ptc 1+/- i p53-/- desenvolupaven medul·loblastoma. Aquests ratolins tractats amb antagonistes de Hedgehog fan que els tumors siguin completament eliminats, s'aturi la proliferació cel·lular i s'estimuli l'apoptosi (Rubin, 2006).

La via de Shh és important per regular a les cèl·lules mare en diferents teixits, però hauriem de descobrir els efectes que podrien tenir els fàrmacs en aquestes cèl·lules mare així com veure els efectes que poden tenir en la regeneració i reparació tissulars.

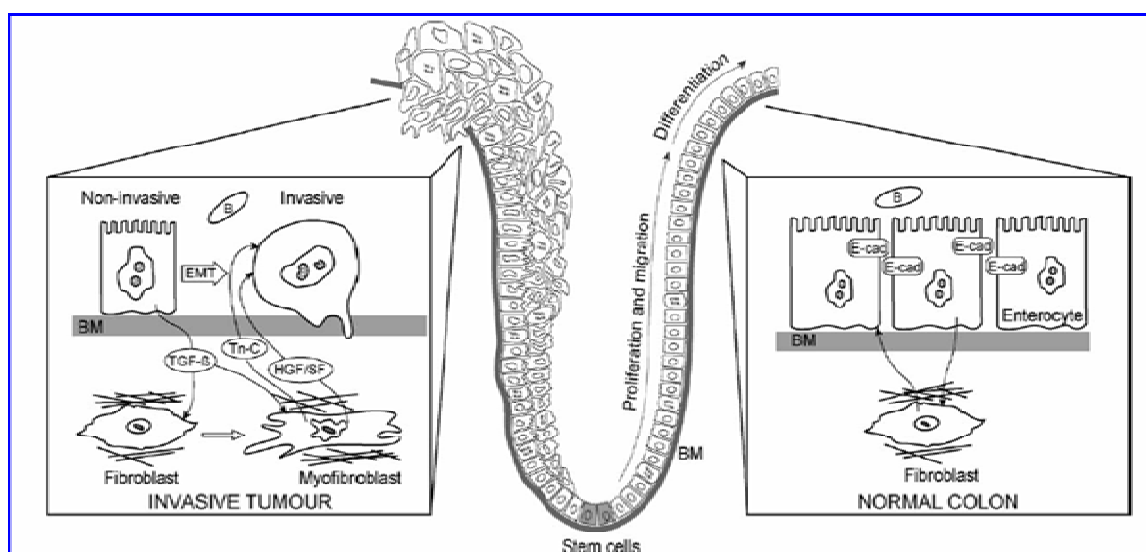
Al comparar els resultats obtinguts de l'expressió de mRNA de Shh en teixits tumorals, teixits normals i teixits embrionaris hem pogut observar que els nivells d'expressió relativa de Shh en teixit tumoral i teixits embrionaris són més semblants entre ells que no pas amb el teixit normal ( $p=0.001$ ); aquests valors indiquen que Shh pot tenir un paper important tant en l'organització del còlon embrionari com en els estadis inicials del desenvolupament del CCR (figura 46).

Shh és regulat a l'alça en estadis inicials del CCR i regulat a la baixa en teixit sa, és a dir, normal de còlon (Oniscu, 2004; Monzo, 2006). El present estudi demostra que l'expressió de Shh també es regula a l'alça en el moment en que s'està organitzant l'endoderma del còlon, és a dir, a la novena setmana de desenvolupament, quan existeix gran quantitat de cèl·lules indiferenciades; i que la seva expressió és regulada a la baixa en el moment en que es produeix la diferenciació en teixit colònic, és a dir, a la onzena setmana de desenvolupament. Aquesta teoria es veu recolzada amb els resultats obtinguts quan fem l'anàlisi comparatiu dels Cts on podem observar que els Cts obtinguts en el cas del teixit tumoral i l'embrió de 9 setmanes són molt similars (Ct=26.3) i on passa el mateix entre teixit normal i embrió d'11 setmanes de desenvolupament (Ct=32)(figura 47). Aquest fet ens indica que Shh pot jugar un paper important tant en l'organització tissular del còlon embrionari com en els estadis inicials del creixement tumoral en el CCR.

L'epiteli del còlon forma una barrera mitjançant interaccions cèl·lula a cèl·lula que inclouen unions adherents, gap junctions i desmosomes. Durant el desenvolupament d'un càncer les cèl·lules epitelials es transformen en cèl·lules de fenotip mesenquimal (EMT). Aquestes cèl·lules perden la seva posició normal degut a alteracions en els contactes entre cèl·lules, entre cèl·lula i matriu i a alteracions en l'estructura del seu citoesquelet; per tant, les cèl·lules migraran en la direcció equivocada a través de la membrana basal i per l'estroma. Com a conseqüència d'aquest procés es produeixen unes alteracions dramàtiques que constitueixen un nou microambient per a les cèl·lules canceroses. Aquestes alteracions inclouen la transformació de fibroblast en miofibroblast, la infiltració leucocitària i la formació de nous vasos sanguinis i limfàtics (De Wever, 2003). Aquestes cèl·lules canceroses de la zona invasiva es van disseminant, via circulació, per tal de formar un tumor secundari en un òrgan distant. En aquesta nova zona metastàsica, les cèl·lules poden tornar a adquirir el fenotip que tenien en el tumor primari, patint una transició de cèl·lula mesenquimal cap a cèl·lula epitelial (MET) (Brabletz, 2005). Els miofibroblasts es localitzen sota de l'epiteli de moltes superfícies mucoses com poden ser el tracte gastrointestinal i el genitourinari. No només actuen regulant la forma de les criptes sinó que també actuen com a nínxol de les cèl·lules mare en les criptes intestinals. En el nostre estudi hem observat que durant la novena setmana de desenvolupament el mesènquima conté fibroblasts (figura 33C) i, mitjançant IHQ, hi hem pogut detectar la presència de Shh (figura 38). El gen Shh assoleix el seu punt de màxima expressió a la novena setmana del desenvolupament, de

la mateixa manera que passa amb els teixits tumorals.

D'aquí en podem concloure també, que un teixit tumoral es comporta com un teixit embrionari com a conseqüència del procés de EMT, ja que la nova formació de miofibroblast, degut a l'aparició d'un càncer, implicaria l'aparició de cèl·lules indiferenciades que proliferarien sense control perquè han perdut la seva capacitat de diferenciació.



*Figura 54 : Còlon normal i còlon cancerós (Debruyne, 2006).*

Els membres de la família CEACAM s'expressen en teixit normal adult i també durant el desenvolupament embrionari. CEACAM1, CEA, CEACAM6 i CEACAM7 s'expressen en el còlon normal d'individus adults. Tots quatre membres presenten elevats nivells d'expressió en les cèl·lules columnars epitelials i a les cèl·lules altament diferenciades de les criptes. Per contra, les cèl·lules indiferenciades no expressen ni CEACAM1 ni CEACAM7 i els nivells d'expressió detectats de CEA i CEACAM6 són molt baixos (Hammarström, 2001).

Al realitzar l'anàlisi d'expressió dels membres de la família CEACAM en mostres de diferents estadis embrionaris els resultats obtinguts estan en relació amb aquestes dades, ja que detectem expressió de CEACAM1, CEA5, CEACAM6 i CEACAM7 en mostres de 7 a 11 setmanes de desenvolupament embrionari. En el cas

de CEACAM1, CEA i CEACAM7 els nivells d'expressió detectats són relativament baixos però veiem que en el cas de CEACAM6 els nivells d'expressió són força elevats, trobant nivells mínims a la setena setmana de desenvolupament i nivells màxims a l'onzena setmana de desenvolupament, és a dir, els nivells de CEACAM6 (figura 48) van augmentant a mida que augmenta el grau de diferenciació cel·lular tal i com ja havia postulat Gadler (Gadler, 1980)

Existeixen estudis que demostren que CEACAM5 comença a expressar-se durant les setmanes 9-14 de desenvolupament embrionari (Nap, 1998) i que la seva expressió es manté tota la vida. Les dades obtingudes amb el nostre estudi concorden amb aquestes ja que no detectem expressió de CEACAM5 fins a la setmana 10 de desenvolupament embrionari.

L'embrió d'11 setmanes de desenvolupament ja està completament format i en ell hi podem distingir el lumen i les criptes de Lieberkhün. Però fins arribar a aquesta situació, el còlon, al llarg del seu desenvolupament, va patint tot un conjunt de canvis que l'ajudaran a assolir la seva morfologia final. Aquests canvis s'inicien a la setena setmana del desenvolupament, on ens trobem amb un epiteli intestinal compacte format per un conjunt de cèl·lules altament unides entre si. A mida que augmenta l'edat de l'embrió, s'aniran induint processos apoptòtics que actuaran sobre aquestes cèl·lules epitelials facilitant així la formació del lumen intestinal i la posterior formació de les criptes. Per tal de formar aquesta llum, les cèl·lules epitelials van patint alteracions, entre elles pèrdua de les unions cel·lulars. Aquestes cèl·lules que han perdut el seu punt d'anclatge amb la matriu patiran processos d'anoikis, un tipus d'apoptosi que actua com a mecanisme de control per mantenir l'arquitectura tissular normal. Ilantzis i els seus col·laboradors (Ilantzis, 2002) publiquen un estudi on postulen que una sobreexpressió dels nivells de CEACAM5 i CEACAM6 afecta a la polaritat de les cèl·lules i inhibeix la diferenciació cel·lular. En el cas dels colonòcits, aquesta desregulació en l'expressió de CEA5/CEACAM6 implica l'aparició d'aberracions en l'arquitectura tissular del còlon, l'alteració de la funció d'integrines específiques i *in vitro*, la sobreexpressió forçada de CEA5/CEACAM6 inhibeix també l'anoikis.

En estadis inicials del desenvolupament, on existeix molta mobilitat cel·lular, els nivells de CEACAM6 són baixos, cosa que ens fa pensar que es tracta d'etapes on ha d'existir activitat apoptòtica per tal de permetre la formació de diferents estructures. A mida que anem avançant en el desenvolupament, com que el còlon ja va adquirint la seva morfologia definitiva i la diferenciació cel·lular ja s'ha produït és normal trobar

nivells elevats (correspondrien a uns nivells de manteniment) d'aquesta molècula i la inhibició corresponent de l'anoikis.

L'anàlisi d'expressió dels nivells de CEACAM1 obtinguts en MT i TN (figura 49) no ens aporta cap informació respecte el temps a la progressió i la supervivència ja que en els resultats obtinguts no trobem diferències significatives en cap dels dos casos. A l'analitzar l'expressió de CEACAM6 en mostres tumorals de pacients afectats de CCR (figura 51), la situació amb la que ens trobem és que la MT presenta molta més expressió d'aquesta molècula que el TN ( $p=0.00003$ ), per tant, s'inhibiria l'anoikis i ens trobariem amb gran quantitat de cèl·lules que han perdut la seva unió amb cèl·lules adjacents que al no ser destruïdes tindran la capacitat de circular lliurement i, via torrent circulatori, arribar a òrgans distals on podran induir la formació metastàsica.

Veiem que existeixen diferències d'expressió significatives entre els nivells d'expressió de CEACAM5 en MT i TN ( $p=0.00008$ ), sent molt més elevats en teixit tumoral que en teixit normal. Si mirem les dades que ens proporciona la gràfica del temps a la progressió veiem que aquell grup de pacients que presenta una relació de CEACAM5<sub>n</sub> més elevada que la mediana, tenen millor pronòstic (figura 50). En clínica, el marcador utilitzat per excel·lència per a detectar malaltia residual és el CEACAM5. Com més elevats són els seus nivells, pitjor pronòstic pels malalts. En un primer moment, les dades poden semblar contradictòries però no ho són. En el nostre estudi el que hem mesurat són els nivells de mRNA de CEACAM5 tant en teixit tumoral com en teixit normal; en clínica el que s'utilitza són els nivells de proteïna en sang. No tot l'mRNA que detectem es tradueix a proteïna, ja que poden existir mecanismes de control post-transcripcional, com és el cas de l'actuació de microRNAs.

A la figura 53 hi trobem l'explicació d'aquesta aparent contradicció; les mostres de sang perifèrica prequirúrgica que són negatives en quant a la detecció de CEACAM5 presenten nivells elevats de mRNA d'aquesta molècula en MT i hem pogut comprovar que es tracta de malalts que no presenten tant risc de desenvolupar metàstasi (5/51, 9.8%). Això és degut a que CEACAM5 encara es troba unit a la membrana de les cèl·lules i que aquestes encara no han perdut les seves unions amb les cèl·lules veïnes i per tant no han pogut disseminar-se a través de la circulació. Per contra, detecció de CEACAM5 en sang perifèrica prequirúrgica es relaciona amb pitjor pronòstic i amb formació metastàsica ja que en aquesta situació les MT dels malalts tenen menys nivells de mRNA de CEACAM5, ja que les cèl·lules han migrat del seu lloc d'origen i, a través de la sang, poden arribar a òrgans distants on poden induir la formació de metàstasi



(4/12, 33.3%) (p=0.016).

En un còlon normal, les cèl·lules epitelials columnars expressen exclusivament CEACAM5 a la superfície apical de les seves cèl·lules i excreten una quantitat diària de CEACAM5 cap al lumen intestinal que s'elimina per les femtes i que no té accés a la sang. En un còlon cancerós, les cèl·lules han perdut la seva capacitat de polarització i expressen CEACAM5 a tota la superfície cel·lular. Com a resultat de l'exfoliació, CEACAM5 pot dirigir-se al lumen i ser excretat per les femtes però a la vegada també té lliure accés als vasos sanguinis i limfàtics afavorint-se així la seva difusió (Hammarström, 1999).