



Universitat Autònoma de Barcelona

**APORTACIONS A L'ESTUDI DE LA RELACIÓ
INFLAMACIÓ-TUMORIGÈNESI
EN EL CÒLON.**

TESI DOCTORAL

ELENA EYRE SÁNCHEZ

**Unitat de Fisiologia
Facultat de Veterinària**

Programa de Doctorat d'Immunologia

Bellaterra, Abril 2015

3 Estudios en el model murí AOM/DSS

3. *Estudis en el model murí AOM/DSS*

3.1 Materials i mètodes

Animals d'experimentació

Es van utilitzar ratolins femella de la soca C57BL/6 subministrats per Charles River (Santa Perpètua de la Mogoda, Barcelona). Tots els animals van arribar a l'estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona amb 7-10 setmanes d'edat. Les condicions ambientals van ser constants, amb una temperatura de 20-24°C i una humitat relativa del 40-70% i els cicles de llum/foscors van ser de 12 hores de llum/12 hores de foscors. Els animals van tenir lliure accés a menjar i aigua.

3.1.1 Disseny experimental

Estudi preliminar

Com a model de càncer de còlon associat a colitis (grup AD), es van tractar els ratolins amb d'azoximetà (AOM; Sigma-Aldrich) en dosi única de 10 mg/Kg d'AOM per via *i.p.* a dia 0. A més els ratolins van rebre periòdicament dextrasulfat sòdic (DSS; 36-50kDa; MP Biomedicals, Illkirch, França) al 2% (pes/volum) dissolt en l'aigua de beguda durant una setmana, amb intervals de recuperació de dues setmanes. Els animals, distribuïts per lots de n=4-6, es van eutanasiar a diferents temps després d'administrar l'AOM: un grup a les 11 setmanes (1 setmana després del darrer subministrament de DSS), i un altre grup a les 12 setmanes (2 setmanes després del darrer subministrament de DSS). (**Figura 3.1**)

Com a model de càncer de còlon esporàdic (grup A), es van administrar 10 mg/Kg d'AOM per via *i.p.* a dia 0; i els animals, distribuïts per lots de n=4-6, es van eutanasiar a diferents temps, després d'administrar l'AOM: un grup a les 11 setmanes, i un altre grup a les 12 setmanes. (**Figura 3.1**)

Es van utilitzar també grups de ratolins sense tractar (control, grup CT, també lots de n=4-6), que es van eutanasiar a diferents temps: un grup a les 11 setmanes d'iniciar l'estudi, i un altre grup a les 12 setmanes. (**Figura 3.1**)

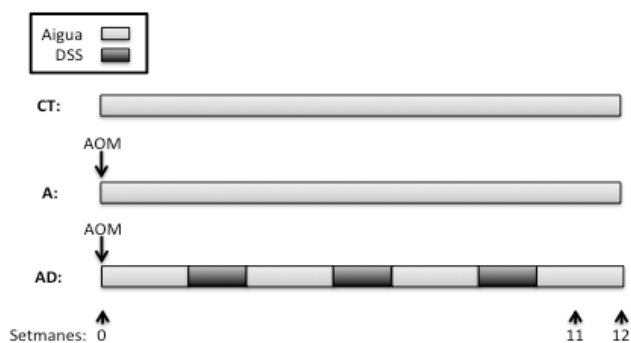


Figura 3.1. Esquema de l'estudi temporal del model. Les bandes fosques representen la setmana en que se subministra DSS 2% a l'aigua de beguda als ratolins dels lots D i AD, i les bandes clares corresponen a les dues setmanes de recuperació amb aigua.

Estudis posteriors

Per induir càncer de còlon esporàdic (grup A), es van administrar 10 mg/Kg d'AOM per via *i.p.* a dia 0; i els animals, distribuïts per lots de n=4-6, es van eutanasiar a diferents temps després d'administrar l'AOM. **(Figura 3.2)**

Per a induir colitis crònica (grups D), es va subministrar DSS al 2% (pes/volum) a l'aigua de beguda durant una setmana, amb intervals de recuperació de dues setmanes. En el cas del tractament de 9 cicles, es van deixar intervals de dues setmanes i mitja sense DSS en els tres primers cicles, per garantir la recuperació simptomàtica i evitar un agreujament excessiu al final del tractament. Els animals, distribuïts per lots de n=4-6, es van eutanasiar a diferents temps, dues setmanes després de finalitzar el darrer cicle de DSS. **(Figura 3.2)**

Per induir el càncer de còlon associat a colitis (grup AD), es van tractar els ratolins amb AOM i amb DSS: a més d'administrar 10 mg/Kg d'AOM per via *i.p.* a dia 0, periòdicament es va subministrar DSS al 2% a l'aigua de beguda durant una setmana, amb intervals de recuperació de dues setmanes. Els animals, distribuïts per lots de n=4-6, també es van eutanasiar a diferents temps després d'administrar l'AOM. **(Figura 3.2)**

Es van utilitzar també grups de ratolins sans sense tractar (control, grup CT, també lots de n=4-6), que es van eutanasiar a diferents temps. **(Figura 3.2)**

Taula 3.1. Criteris seguits a les puntuacions utilitzades pel càlcul del DAI.

Canvi al pes corporal	Puntuació	Aspecte de les femtes	Puntuació
<0% (guany)	0	Normal	0
0-2.5 % (pèrdua)	1	Femtes pastoses	1
2.5-5 % (pèrdua)	2	Femtes semi-líquides, brutícia perianal	2
5-7.5 % (pèrdua)	3	Femtes aquoses, cua bruta/mullada	3
>7.5 % (pèrdua)	4	Femtes molt aquoses, cua i dors bruts/mullats	4
Aspecte de l'animal	Puntuació	Femtes amb sang	Puntuació
Normal	0	Avaluació semi-quantitativa depenent del grau de sang observada a la sang	0-3
Pelatge eriçat	1		
Pelatge eriçat i activitat anormal	2		
Deshidratació òbvia	3		

3.1.3 Eutanàsia i recollida de mostres de teixits

Els ratolins es van eutanasiar mitjançant l'exasanguinació per punció cardíaca sota anestèsia amb isoflurà (Isobavet®; Schering-Plough, Sant Cugat del Vallès, Espanya). Els còlons es van esbandir amb sèrum salí. Després d'una inspecció macroscòpica (valoració de la presència d'estenosi, úlceres, longitud del còlon, nombre i localització de tumors) es van obtenir mostres de còlon i melsa. Es va seccionar el còlon longitudinalment i una part es va conservar en *RNAlater* (Applied Biosystems; Life Technologies) separant les zones tumorals i les zones sense alteracions macroscòpiques, per realitzar més endavant els estudis d'expressió gènica. L'altre segment es va fixar en paraformaldehid al 4% per realitzar estudis histopatològics i immunohistoquímics.

3.1.4 Anàlisi histopatològica

Es van obtenir seccions de 5 µm de còlon, fetge, melsa i intestí prim procedents de teixit fixat i parafinat, i es van tenyir amb hematoxil·lina i eosina (H&E). A continuació, les seccions de còlon tenyides amb H&E es van valorar a doble cec aplicant barems ja descrits i validats [2] [3] [4] [5] [6] [7] [8]. (Taulas 3.2-3.4)

Taula 3.2. Criteris d'avaluació de la colitis

Puntuació:	Criteris de classificació:
0	Mucosa colònica normal.
1	Reducció i pèrdua de 1/3 basal de les criptes. Inflamació lleu i edema a la <i>lamina propria</i> .
2	Pèrdua de 2/3 basal de les criptes. Inflamació moderada a la mucosa.
3	Pèrdua total de les criptes. Inflamació severa a la mucosa. L'epiteli superficial encara es manté.
4	Pèrdua total de les criptes i de l'epiteli superficial. Inflamació severa a la mucosa, la <i>muscularis propria</i> i la submucosa.

Taula 3.3. Criteris d'avaluació dels focus de criptes aberrants. ACFs = *Aberrant Crypt Foci* (Focus de criptes Aberrants); AC = *Aberrant Crypts* (Criptes Aberrants).

ACFs	Criteris:	1 AC:	Mida de la cripta: almenys 2 vegades les normals del voltant.
			Obertura luminal: més el·líptica que circular.
			Revestiment epitelial: més gruixut, amb una intensa coloració blava.
		1 FCA:	Més d'un AC. Criptes individuals iguals que les AC.
			Aparença de focus continu (no apareixen criptes normals al mig d'un grup de AC).
			Àrea total d'un ACF major que l'àrea del mateix nombre de criptes normals.
Paràmetres:	Nombre total de ACF.		
	Nombre total de AC.		
	Multiplicitat ACF: nº	1-5	
	AC/ focus	>5	
Displàsies (a molts ACFs):	Augment de la relació nucli/citoplasma.		
	Pèrdua de la polaritat nuclear.		
	Alteració de l'uniformitat arquitectònica (displàsia "de grau").		
	Disminució del nombre de cèl·lules caliciformes.		
	Aparició de criptes ramificades.		

Taula 3.4. Criteris d'avaluació dels tumors. AC = *Aberrant Crypts* (Criptes Aberrants).

Adenoma	Lesió que sobresurt, que té displàsia de baix grau – com les AC – i que també poden estar acompanyades de displàsia d'alt grau.			
	Morfologia glandular més o menys conservada:	Tubulars.		
		Túbulo-vellosos. Vellosos.		
	Lesions:	Pòlips hiperplàsics no adenomatosos.		
Adenomes tubulars.				
Carcinoma	Localització:	Proximal:	Disminució del grau de diferenciació.	
		Distal:	Augment de la capacitat infiltrant a les diferents capes intestinals.	
	Grau histològic:	Disminució del grau de diferenciació.		
		Augment de la capacitat infiltrant a les diferents capes intestinals.		
Tumors	DISPLÀSIA de baix grau	Canvis citològics:	Nuclis hiper cromàtics.	
			Estratificació nuclear amb preservació de la polaritat.	
			Menor nombre de cèl·lules caliciformes.	
			Menor quantitat de moc.	
	Característiques histològiques:	DISPLÀSIA d'alt grau	Canvis arquitecturals:	Mitosis N i atípiques.
				Glàndules amb patró de creixement vellós.
				Necrosi a la llum glandular.
				Criptes de contorn irregular.
		<i>Back to back.</i>		
		Canvis citològics:	Major estratificació amb pèrdua de citoplasma.	
			Marcada atípia.	
			Pleomorfisme.	
Pèrdua de polaritat.				
Més mitosis atípiques.				
Absència de cèl·lules caliciformes.				
Menor quantitat de moc.				

Els barems de puntuació de cada lesió es van calcular en relació a la seva extensió i la puntuació final es va calcular com el sumatori dels puntuacions associades a cada tipus de lesió.

També es va examinar si hi havia evidències de dany macroscòpic al fetge, la melsa i l'intestí prim.

3.1.5 Estudi immunohistoquímic

Es van utilitzar talls de 5 µm de teixit parafinat. Les seccions es van desparafinar mitjançant procediments histològics estàndard. Per la recuperació antigènica es va

utilitzar tampó citrat a pH=6 durant 10 minuts a ebullició. A continuació es va bloquejar l'activitat peroxidasa endògena incubant en H₂O₂ al 0.3%. La biotina endògena es va bloquejar amb el kit de bloqueig avidina/biotina (Avidin/Biotin Blocking Kit; ATOM; Vector), seguint les instruccions del fabricant. Es van bloquejar les possibles unions inespecífiques incubant amb sèrum de cabra al 10% en PBT (tampó fosfat amb Tritó X100) a temperatura ambient. Després d'incubar amb l'anticòs primari (*rabbit anti-mouse*) durant la nit a 4°C, es afegir l'anticòs secundari biotinitat (*Goat Anti-Rabbit IgG Antibody Biotin-XX*; INVITROGEN) 1-2 h a temperatura ambient. Seguidament, es va utilitzar un sistema de detecció (*Vectastain Elite ABC KIT*; ATOM; Vector) i es va revelar utilitzant DAB (3,3'-diaminobenzidina) com a cromogen i hematoxil·lina de Mayer com a contrast. En tots els casos es va realitzar un control negatiu (ometent la incubació amb anticòs primari) i es va realitzar també un control negatiu incubant els talls amb l'anticòs primari i el pèptid de bloqueig, seguit de rentat i incubació amb l'anticòs secundari. (Taula 3.5)

Taula 3.5. Anticossos utilitzats. *: la incubació de CD68 va ser realitzada per la Dra. Eva Musulen i la Dra. Raquel López, del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Germans Trias i Pujol (HGTiP).

Anticòs		Espècie contra la que reacciona	Tipus d'anticòs	Espècie de l'anticòs	Dilució	Referència
COX-2	<i>Cyclooxygenase 2</i>	Humà, Ratolí, Rata	Policlonal	Conill	1/600	Abcam (ab15191)
CCND1	<i>Cyclin D1</i>	Humà, Ratolí, Rata	Policlonal	Conill	1/400	Antibodies-online (ABIN181359)
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>	Humà, Ratolí, Rata, Hámster, Peix Zebra	Policlonal	Conill	1/600	Abcam (ab2426)
CTNNB1	<i>Beta-cathenin</i>	Humà, Ratolí, Rata, Mico	Monoclonal	Conill	1/100	Cell Signaling (9582-S)
CD68		Humà	Monoclonal	Ratolí	*	DakoCutomation (M0814)

3.1.6 Expressió gènica

A partir de les mostres de teixit d'animals de cada grup experimental mantingudes en RNAlater, es va extraure l' RNA amb *AllPrep DNA/RNA Mini Kit* (QIAGEN) i amb *mirVana™ miRNA Isolation Kit* (de LIFE TECHNOLOGIES). Es va realitzar la síntesi de cDNA amb l'ajut de *PrimeScript RT Reagent Kit* (Laboratorios Conda; TAKARA). Per a la quantificació es va utilitzar el sistema *Lightcycler™ System* (Roche Biochemicals, Idaho Falls, ID, USA). La PCR quantitativa a temps real (*real-time* qPCR) es va realitzar en tubs eppendorf on 1µL del cDNA de la mostra dil·luïda 1/12 reaccionaren amb 5 µL *SYBR^R Premix Ex Taq™* (TLi RNaseH Plus; TAKARA), aigua *RNasa free* i encebadors per a cadascun dels gens d'interès a la concentració final

3. Estudis en el model murí AOM/DSS

òptima per cada cas. (Taula 3.6) El control intern utilitzat van ser els encebadors del gen de la β -actina (*beta-actin*). L'expressió relativa dels nivells de mRNA es va calcular mitjançant el mètode $E^{(-\Delta\Delta Ct)}$.

Taula 3.6. Llistat d'encebadors utilitzats.

Gen	Sentit	Seqüència (5'- 3')	Concentració de treball	Escala / Purificació	Fabricant
<i>beta-actin</i>	forward / left	ctaaggccaaccgtgaaaag	0,25 μ M	0.02/HPR3	Tib Molbiol
<i>beta-actin</i>	reverse / right	accgaggccatacagggaca	0,25 μ M	0.02/HPR3	Tib Molbiol
<i>tlr2</i>	forward / left	accgaaacctcagacaaagc	0,50 μ M	0.02/HPR3	Tib Molbiol
<i>tlr2</i>	reverse / right	cagcgttgctgaagagga	0,50 μ M	0.02/HPR3	Tib Molbiol
<i>tlr4</i>	forward / left	ggactctgatcatggcactg	0,50 μ M	0.02/HPR3	Tib Molbiol
<i>tlr4</i>	reverse / right	ctgatccatgcatgttaggt	0,50 μ M	0.02/HPR3	Tib Molbiol
<i>myd88</i>	forward / left	catggtggtggttttctgac	0,50 μ M	0.02/HPR3	Tib Molbiol
<i>myd88</i>	reverse / right	tggagacaggctgagtcaa	0,50 μ M	0.02/HPR3	Tib Molbiol
<i>bcl2</i>	forward / left	gcctcttcaccttcagcat	0,50 μ M	0.02/HPR3	Tib Molbiol
<i>bcl2</i>	reverse / right	ctgctttttattcatgaggtacatt	0,50 μ M	0.02/HPR3	Tib Molbiol
<i>cyclin D1</i>	forward / left	taggtaattgcacacctctgg	0,50 μ M	0.02/HPR3	Tib Molbiol
<i>cyclin D1</i>	reverse / right	cacctctgccaaaaagtcc	0,50 μ M	0.02/HPR3	Tib Molbiol
<i>tgfb-1</i>	forward / left	tggagcaacatgtggaactc	0,50 μ M	0.02/HPR3	Tib Molbiol
<i>tgfb-1</i>	reverse / right	cagcagccggttaccag	0,50 μ M	0.02/HPR3	Tib Molbiol
<i>tlr9</i>	reverse / right	ccagagtctcagccagcact	0,50 μ M	0.01/HPSF	ISOGEN Life Science
<i>tlr9</i>	forward / left	tcccaacatggttctccgtc	0,50 μ M	0.01/HPSF	ISOGEN Life Science
<i>cox2</i>	forward / left	tgtgcaagatccacagccta	0,50 μ M	0.01/HPSF	ISOGEN Life Science
<i>cox2</i>	reverse / right	tctggagtgggagcactt	0,50 μ M	0.01/HPSF	ISOGEN Life Science

El fet d'obtenir valors d'aproximadament $C_p=34$ a la *real time-PCR* corresponent a l'anàlisi dels nivells de mRNA d'*il-10*, indicava una expressió d'*il-10* massa baixa com per poder obtenir resultats quantitius òptims. Així doncs, es va optar per realitzar una anàlisi semi-quantitativa de mostres transcrits (obtingudes a l'apartat anterior). Per fer una comparativa d'*il-10*, es van modificar les condicions de l'amplificació RT-PCR: més quantitat de cDNA (2X), i una concentració més elevada dels encebadors (0.5 μ M tant de la *il-10*, com del control utilitzat per a normalitzar

l'anàlisi, la β -actina). (Taula 3.7) Després, al gel d'agarosa es van utilitzar *pools* de les mostres amplificades, i es va prendre la imatge de les bandes emeses pel *Sybr Safe* (d'Invitrogen), les quals es van quantificar amb el software *Multigauge 3.0* (de Fujifilm).

L'expressió relativa dels nivells de mRNA es va calcular mitjançant el rati de les intensitats de la banda de *il-10* respecte de la de la β -actina.

Taula 3.7. Llistat de cebadors utilitzats.

Gen	Sentit	Seqüència (5'- 3')	Escala / Purificació	Fabricant
<i>il-10</i>	forward / left	cagagccacatgctcctaga	0.02/HPR3	Tib Molbiol
<i>il-10</i>	reverse / right	tgccagctggctcttgg	0.02/HPR3	Tib Molbiol
<i>beta-actin</i>	forward / left	ctaagccaacctgaaaag	0.02/HPR3	Tib Molbiol
<i>beta-actin</i>	reverse / right	accagaggcatcacaggaca	0.02/HPR3	Tib Molbiol

3.1.7 Extracció i quantificació de microRNAs

Per l'extracció i anàlisi dels microRNAs (miRNAs), es va homogeneïtzar el teixit procedent dels ratolins tractats mantingut en RNAlater. Després, per l'extracció i la purificació dels miRNAs, es va utilitzar el *mirVana™ miRNA Isolation Kit* (de LIFE TECHNOLOGIES), i es van seguir les instruccions del fabricant. Per obtenir una concentració acceptable de miRNAs, es va afegir una etapa final de precipitació amb l'addició d'acrilamida, acetat sòdic i d'etanol 100%, i deixant reposar la mostra durant dos dies a -20°C. Posteriorment, es va purificar amb etanol 80% amb dues centrifugacions, es va descartar el sobrenedant, i es va deixar assecar el pellet en una cabina de flux laminar durant 15 minuts abans de resuspendre'l amb 15 μ L d'aigua *RNase free*.

Per tal de realitzar la reacció de retrotranscripció, es van fer servir encebadors comercials específics *Taq Man® MicroRNA Assays* (Applied biosystems). Es va diluir el RNA a 2ng/ μ L amb els components de la *Master Mix RT* (MMT); es va preparar un volum per 15 μ L de reacció que contenia 4.16 μ L d'aigua *RNase free*, 0.15 μ L de dNTPs, 1.50 μ L de Buffer 10x, 1.00 μ L de *Multiscribe RT*, 0.19 μ L de *RNase inhibitor*, 5.00 μ L de RNA (conté els miRNAs), i 3.00 μ L de *Primer RT* (*Primers Taq Man® MicroRNA Assays*; Applied biosystems). Encebadors *Taq Man® MicroRNA Assays* utilitzats: sno135 (FAM/MGB-NFQ; gen de referència pels càlculs posteriors); mmu-miR-135a (FAM/MGB-NFQ), mmu-miR-21 (FAM/MGB-NFQ), mmu-miR-34a (FAM/MGB-NFQ), mmu-miR-145 (FAM/MGB-NFQ), i mmu-miR-7 (FAM/MGB-NFQ).

Un cop afegits els encebadors específics pel *Taq Man*[®] *MicroRNA Assays* es van amplificar els cDNAs sintetitzats a l'etapa prèvia de retrotranscripció. Components de la mescla de reacció: 27.61 µL d'aigua, 36.00 µL de Taqman MM, 4.80 µL del cDNA corresponent, i 3.60 µL de l'encebador corresponent. *Primers Taq Man*[®] *MicroRNA Assays* utilitzats: sno135 (FAM/MGB-NFQ; gen de referència); mmu-miR-135a (FAM/MGB-NFQ), mmu-miR-21 (FAM/MGB-NFQ), mmu-miR-34a (FAM/MGB-NFQ), mmu-miR-145 (FAM/MGB-NFQ), i mmu-miR-7 (FAM/MGB-NFQ). Per realitzar la qPCR cada cDNA es processa per triplicat, per tant es van dipositar 20µL a cadascun dels tres pous corresponents als triplicats de la placa de PCR. El control intern utilitzat van ser els encebadors del gen de sno135. L'expressió relativa dels nivells de mRNA es va calcular mitjançant el mètode $E^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.1.8 Predicció de dianes dels microRNAs

Per realitzar una predicció de possibles dianes dels miRNAs analitzats en els teixits de l'estudi del càncer colorectal associat a colitis (CAC), ens vam basar en un contrast inicial dels candidats proposats per sis bases de dades. (**Taula 3.8**)

Taula 3.8. Bases de dades en l'estudi de predicció de dianes.[9] [10]

TARGETSCAN	http://www.targetscan.org/
MIRANDA	http://www.microrna.org/
Pictar	http://pictar.mdc_berlin.de/
DIANA-MicroT v4.0	http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microtv4/index
microCosm	http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/cgi-bin/targets/v5/search.pl
miRDB	http://mirdb.org/miRDB/

Les dades de la interacció miRNA-mRNA predites per l'algoritme de **TargetScan**[11] es va obtenir de la seva pàgina web (versió 6.1, Març 2012). TargetScan aporta dues mesures: la probabilitat de dianes conservades (Pct; *Probability of conserved targeting*) i la puntuació contextual total (TCS; *Total contextual score*) per assegurar la importància de la interacció diana-miRNA.[12]

miRanda[13] és també un mètode bioinformàtic àmpliament utilitzat per predir els gens diana de microRNAs. Els algoritmes afegixen normes empíriques per incrementar el pes de certes posicions significatives en el miRNA. Al 2010 van integrar a miRanda un mètode nou que podia predir l'extensió de la regulació d'un mRNA específic per a un miRNA donat (puntuació mirSVR).[14]

PicTar[15] també busca la idèntica seqüència d'unió per predir la interacció miRNA-mRNA, semblant a TargetScan. PicTar dona una puntuació final per assegurar la fortalesa de la interacció miR-diana: és la màxima probabilitat que una seqüència 3'-UTR donada sigui diana d'un grup fix de microRNAs.

El servidor web **DIANA microT**[16] permet l'anàlisi funcional dels miRNAs que s'investiguen mitjançant un mètode d'enllistat de dianes de miRNAs a través de la integració del coneixement extret de la bibliografia i del coneixement biològic de les vies metabòliques.[17] La versió actual del microT (v4; del 2011) es basa en dades experimentals sobre miRNAs.

MicroCosm[18] és el servidor que s'actualitza més sovint. Les seqüències dels miRNAs s'obtenien del registre de miRNAs i de la majoria de seqüències genòmiques del Ensembl. Utilitzen l'algoritme de miRanda per identificar els punts d'unió potencials per a un miRNA donat en seqüències genòmiques.

En el servidor **miRDB**[19], la base de puntuació és amb SVMs (*support vector machines*) basada en la teoria de l'aprenentatge estadístic (utilitzat també pel miRanda).

Al nostre estudi, es va considerar com a servidor de referència TargetScan, i es van seleccionar les dianes que la web associa als miRNAs d'interès. Aquestes dianes es van filtrar seguint els criteris de:

- 1) El gen candidat podria ser diana tant en humà com en murí.
- 2) Les altres bases de dades consultades també consideren al gen candidat com a diana potencial pels miRNAs analitzats.
 - Si només el consideren diana 1 ò 2 bases de dades consultades, és un gen diana que ja ha estat corroborat en alguna publicació científica com a diana del miRNA en qüestió.
- 3) Hi ha una base experimental publicada (consultes bibliogràfiques realitzades al PubMed[20]).
- 4) El gen ha d'estar relacionat amb les vies o processos de:
 - a) inflamació;
 - b) apoptosi;
 - c) proliferació;
 - d) adhesió cel·lular.

Per realitzar aquest últim filtrat, les dianes es van sotmetre a l'anàlisi d'enriquiment d'anotació gènica de l'eina AmiGO2 de la web de **GO**[21] (*Gene Ontology*). Aquesta web consta de varies eines que recullen dades sobre publicacions o directament dels propis d'investigadors. D'aquesta manera vam obtenir un llistat dels processos en els que poder interpretar les funcions afectades en la cèl·lula degut a les possibles alteracions de l'expressió gènica en veure's alterats els nivells dels miRNAs associats a aquests gens. Els resultats de l'anàlisi de les dianes es va confirmar en la web de **KEGG**[22] (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), una base de dades per la comprensió de les funcions i utilitats del sistema biològic mitjançant diverses eines de treball. En els casos que es va considerar necessari, es va completar l'anàlisi amb l'ús de la web **Panther**[23] (*Protein ANalysis Throug*

Evolutionary Relationships), que es basa en un sistema de classificació de proteïnes (i els seus gens).

3.1.9 Caracterització d'esplenòcits per citometria de flux

La mostra de partida van ser les melses dels ratolins tractats segons es descriu en els apartats anteriors. Cada melsa es va submergir en medi RPMI-1640 estèril suplementat amb 10% FBS immediatament després de seccionar-les. Es van tallar en petites porcions amb un bisturí en plaques de Petri que contenien 5mL de medi; i es van acabar de disgregar amb la part esmerilada de portaobjectes esterilitzats. Es va recuperar la suspensió d'esplenòcits amb 3mL més de medi i, després de deixar-la reposar 5 minuts, centrifugant 5 minuts a 1250-rpm, a temperatura ambient per a eliminar *debris*. Es va resuspendre el *pellet* amb 1mL de solució d'hemòlisi, i al cap de 5 minuts es van afegir 5 L més de medi i es va tornar a centrifugar per eliminar restes d'eritròcits. Finalment es va resuspendre el *pellet* final amb 2mL de PBS estèril i es va filtrar amb una malla estèril, efectuant a continuació un comptatge de cèl·lules mitjançant cambra de Neubauer.

Es van separar 100µL de suspensions cel·lulars de cada ratolí a dos tubs diferents. En un dels tubs es va utilitzar un protocol per marcatge de proteïnes de membrana exclusivament utilitzant la següent combinació d'anticossos conjugats amb fluorocroms (BDBioscience): CD3e-PerCP, CD8a-FITC, NK1.1-PE, CD19-PECy7, CD160-AFG647, i CD4-V450. (**Taula 3.9**) Els esplenòcits de l'altra alíquota es van processar de manera que fos possible marcar tant proteïnes de membrana com components intracel·lulars, utilitzant la següent combinació d'anticossos conjugats amb fluorocroms: CD4-V450, CD127-APC, CD25-PE, i FoxP3-Alexa 488. (**Taula 3.9**) Les suspensions marcades es van analitzar amb el citòmetre de flux FACSCanto II, del Servei de Citometria de l'IGTP. El sistema utilitzat pel processament dels senyals va ser el FACSDiva (aquest programa permet una compensació fora-de-línia i la configuració d'escala biexponencial).

Taula 3.9. Llistat de marcatges realitzats en l'estudi amb mostres procedents d'humans i en l'estudi amb mostres de ratolí.

Tipus cel·lular	PBMCs de ratolí
Limfòcits B	CD19+
Limfòcits T	Total Th i Tc
Limfòcits Th	CD3+ CD4+
Limfòcits Th17	CD3+ NK-T+ NK1.1- (Cèl·lules NKT productores de IL-17)
Limfòcits Treg	CD4+ CD25+ Foxp3+ CD127 ^{low/neg}
Limfòcits Tc	CD3+ CD8+
Cèl·lules iNKT	CD3+ NK-T+
Cèl·lules NK	CD3- NK1.1+

3.1.10 Anàlisi estadística

Els estudis comparatius es van realitzar utilitzant el paquet de software GraphPad Prism (6.0 per Mac). Les comparacions entre els diferents grups d'animals es van fer utilitzant el test ANOVA i els post-test de comparacions múltiples Bonferroni (per més de de 2 grups). El test *t de Student* per a dades no aparellades es va fer servir quan només es feien comparacions entre 2 grups. Les comparacions de les puntuacions DAI i de la valoració histopatològica es van fer utilitzant el test ANOVA i els post-test de comparacions múltiples Tukey. Els valors $P < 0.05$ es van considerar estadísticament significatius, i els valors $P = 0.05-0.07$ es van considerar que indicaven una tendència.

3.2 Resultats

3.2.1 Estudi Preliminar

Les **Figures 3.3A i 3.3B** mostren l'evolució ponderal dels animals (veure el disseny experimental a l'apartat 1.1 dels *Materials i Mètodes*). En el seguiment de la variació del pes es va observar que els animals patien una disminució del pes en el primer cicle de DSS però un augment de pes en el segon i el tercer cicles de DSS (visible tant en AD-11 com en AD-12). És a dir, un cop recuperats del primer cicle de DSS, els pesos dels ratolins oscil·laven en tornar a subministrar DSS, però van anar guanyant pes progressivament.

La **Figura 3.3C** mostra l'evolució del DAI. Els grups A-11 i A-12 van evolucionar de manera molt semblant als grups CT-11 i CT-12. Els grups monitoritzats al llarg d'11 ó 12 setmanes van presentar una evolució molt semblant. Aquesta similitud es va observar també en calcular l'àrea sota la corba dels valors de DAI en relació al temps (AUC; $P < 0.05$; representats a la **Figura 3.3D**): hi havia un augment significatiu als grups AD en comparació amb els grups CT i A, però només un lleu augment del DAI al grup al que es va donar més temps de recuperació abans de l'eutanàsia (AD-12).

Tant en la variació del pes dels ratolins, com a la valoració del DAI, es va observar que inicialment es podien trobar lleus diferències fins i tot entre grups sotmesos al mateix tractament (per exemple, A-11 i A-12), però més endavant es van uniformitzar.

Posteriorment, a l'examen macroscòpic dels còlons (**Figures 3.4A-3.4C**) es va trobar una elevada multiplicitat tumoral, especialment en els grups AD-11 i AD-12. L'augment significatiu del nombre de tumors de mida inferior a 1mm en el grup AD-12 en comparació amb el grup AD-11 (**Figura 3.4C**), amb l'allargament del període de monitorització, indica l'aparició de noves displàsies associades a una distorsió del procés de regeneració tissular.

El pes de la melsa es va utilitzar com a indicador del grau d'inflamació, observant que les melses dels animals dels grups AD-11 i AD-12 eren significativament més grans que les de la resta de grups (**Figura 3.4D**). Es va trobar també un augment en els pesos de les melses del grup AD-12 en comparació amb el grup AD-11. Aquests resultats indiquen la repercussió sistèmica del procés inflamatori en el còlon. De la mateixa manera, vam veure com els còlons extrems dels grups AD-11 i AD-12 eren més curts i visiblement més inflamats que els còlons dels altres grups (**Figura 3.4E**). Tot i això no vam trobar diferències significatives entre els valors de la ràtio pes/longitud dels còlons dels grups AD-11 i AD-12, possiblement, perquè una setmana de diferència no seria suficient per reduir de manera prou significativa la inflamació.

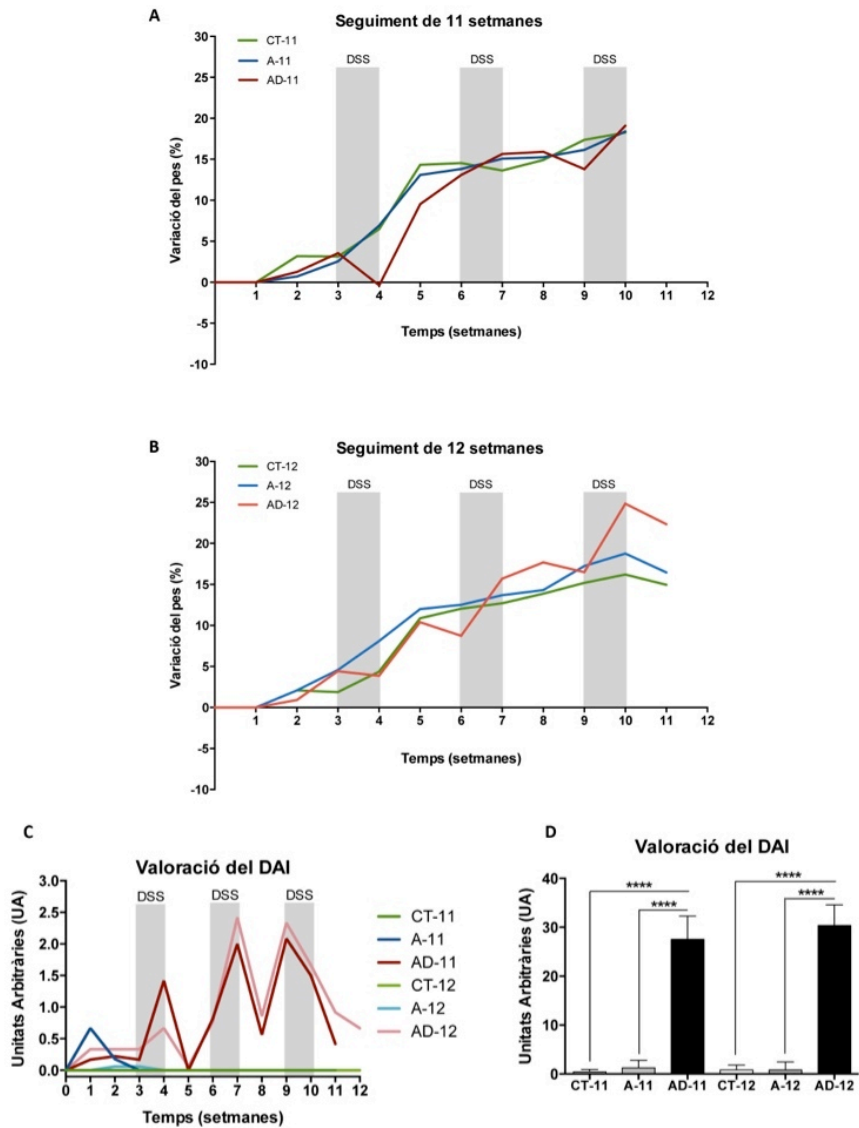


Figura 3.3. Evolució dels ratolins amb els diferents tractaments. A (11 setmanes) i B (12 setmanes): variació dels pesos al llarg de l'estudi temporal; C: puntuació de la valoració DAI al llarg de les setmanes de tractament; D: càlculs de l'àrea sota la corba (AUC; $P < 0.001$) del DAI registrat. $P < 0.05$ va ser considerat estadísticament significatiu, i els grups eren $n=6$, segons el test ANOVA i el post-test Tukey.

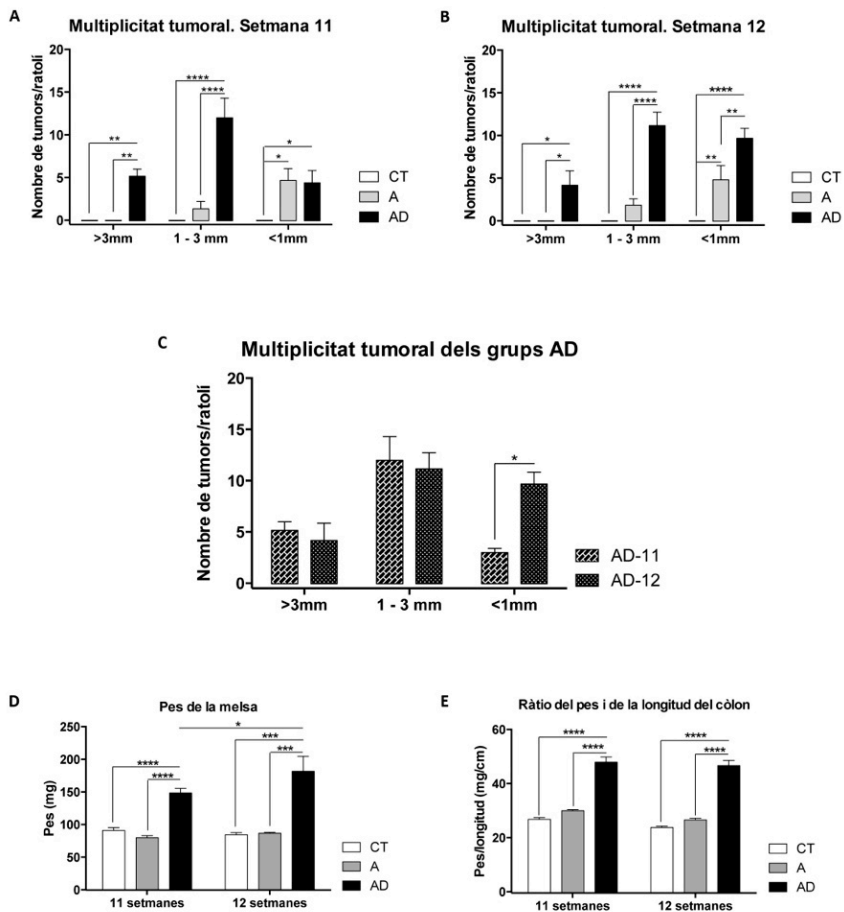


Figura 3.4. Valoració macroscòpica dels còlons i les melses dels ratolins en finalitzar el seguiment. A-C: multiplicitat tumoral dels còlons segons la setmana de l'eutanàsia (setmana 11: A; setmana 12: B) i concretament dels grups AD (C). Mesura del pes de la melsa (D) i del ràtio del pes i de la longitud del còlon dels ratolins (E). $P < 0.05$ va ser considerat estadísticament significatiu, i els grups eren $n=6$, segons el test ANOVA i el post-test Bonferroni.

L'anàlisi histopatològica de talls de còlon tenyits amb hematoxil·lina i eosina va revelar nombroses alteracions en els grups AD-11 i AD-12 (**Figura 3.5**). Es van trobar alteracions com la presència d'un pòlip amb displàsies d'alt grau (**fletxa**), metaplàsia escamosa, criptes aberrants, displàsia d'alt i de baix grau, infiltració leucocitària, formacions adenomatoses amb diferent grau de diferenciació, angiogènesi, i l'inici d'infiltració de la *lamina propria* dins l'adenoma (inici d'un adenocarcinoma) (**a-f**). Aquests resultats posen de manifest la importància del component inflamatori en el procés del CAC, ja que el grup que no havia rebut DSS les alteracions eren molt menys importants. A nivell morfològic les diferències entre els grups AD-11 i AD-12 son escasses a excepció de la multiplicitat tumoral, però no es pot descartar que a nivell molecular puguin trobar-se més canvis.

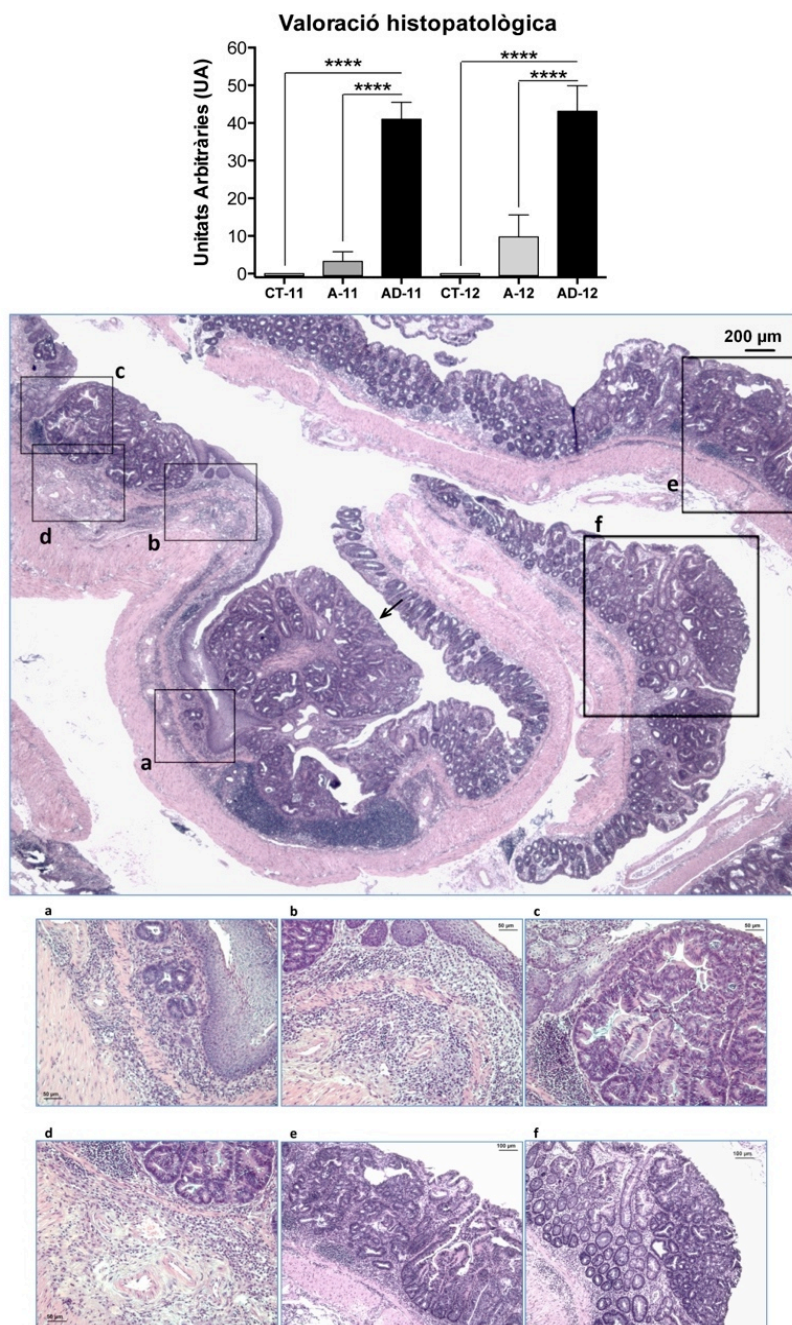


Figura 3.5. Valoració histopatològica de les mostres tenyides amb Hematoxil·lina-Eosina. Comparació dels resultats mitjançant el test ANOVA i el post-test Tukey; **** $P < 0.0001$; els grups eren $n=6$. Imatges representatives d les troballes en la valoració histològica. a: presència de metaplàsia escamosa, criptes aberrants, displàsia, infiltració leucocitària, i angiogènesi; b: forta infiltració leucocitària, presència de formacions adenomatoses i metaplàsia escamosa; c: adenoma ben diferenciat i metaplàsia escamosa; d: angiogènesi i inici d'un adenocarcinoma; e: adenomes ben

3. Estudis en el model murí AOM/DSS

diferenciats (dreta) i poc diferenciats (esquerra); f: pòlip amb presència clara de displàsia d'alt grau (dreta) i de baix grau (esquerra o a la base).

Amb la intenció de poder analitzar la presència de canvis transcripcionals es va valorar mitjançant RT-qPCR l'expressió de gens implicats en processos d'inflamació (*tlr2*, *tlr4* i *myd88*), d'apoptosis (*bcl2*), i de proliferació (*ciclina d1* i *tgfb1*). Donada la presència de component inflamatori en els grups AD en comparació amb els grups A i CT, es va decidir analitzar separatament l'expressió gènica en àrees no tumorals i tumorals del còlon (**Figures 3.6 i 3.7**). Tot i no observar diferències significatives entre teixit no tumoral dels diferents grups, en el teixit tumoral es va observar una disminució significativa de *tlr4*, *myd88* i *bcl2* en el grup AD de les 12 setmanes en comparació amb el grup A.

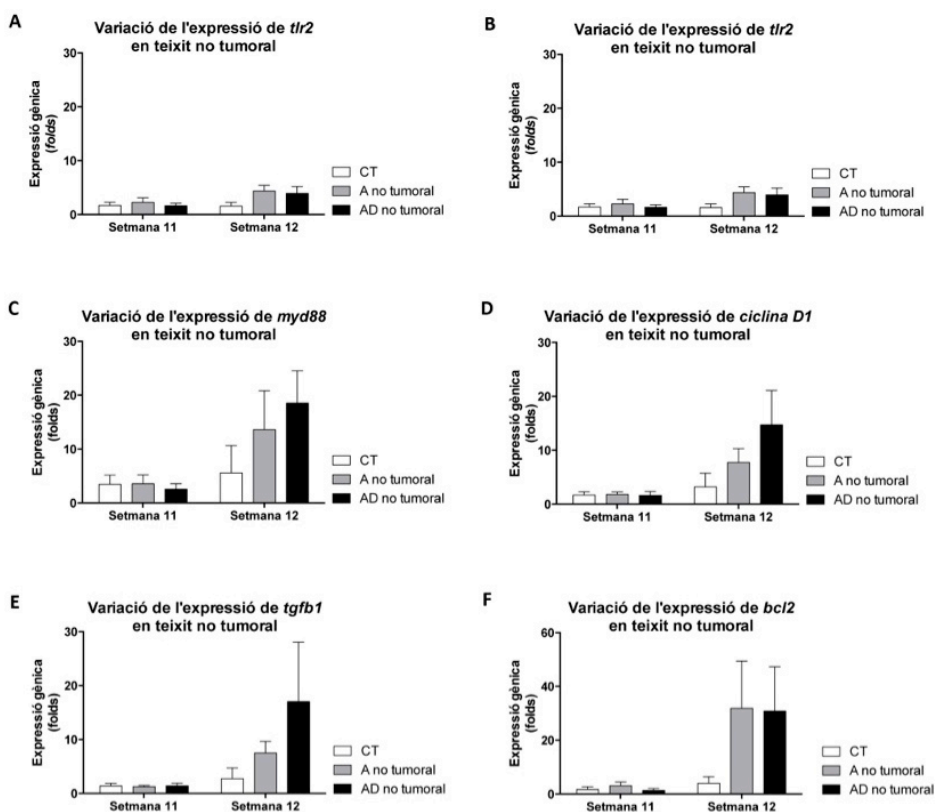


Figura 3.6. Variació de l'expressió de gens en mostres de còlon sense presència tumoral. $P < 0.05$ va ser considerat estadísticament significatiu, i $P = 0.05-0.07$ va ser considerat com a tendència; i els grups van ser $n=6$, segons el test ANOVA i el post-test Bonferroni.

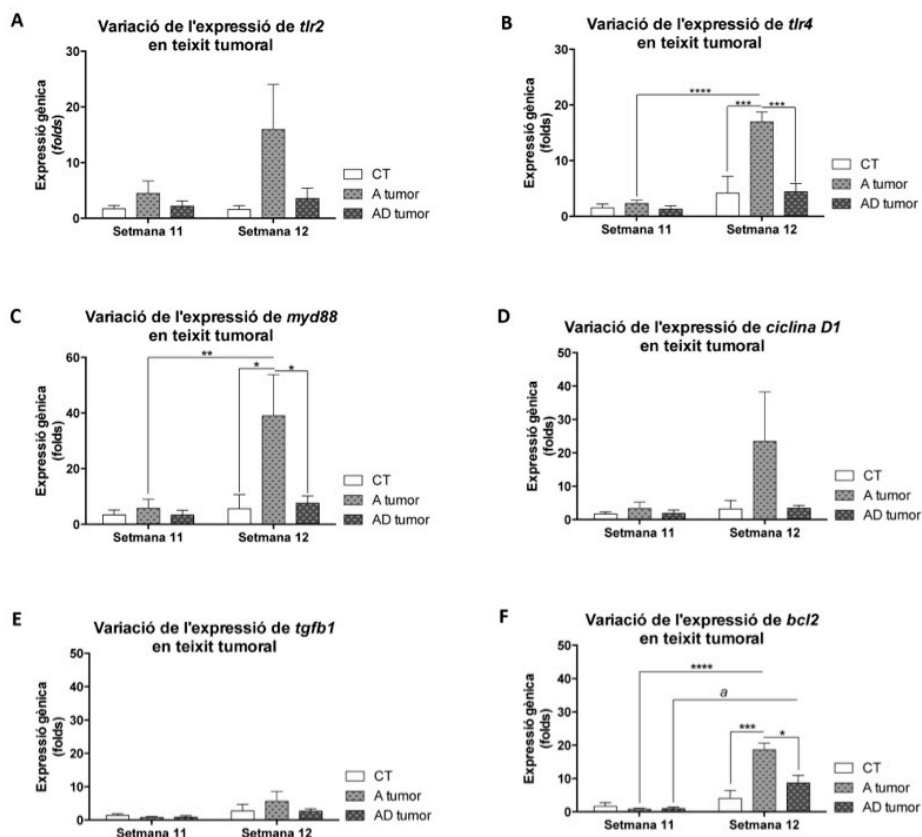


Figura 3.7. Variació de l'expressió de gens en segments de còlon amb presència tumoral. $P < 0.05$ va ser considerat estadísticament significatiu, i $P = 0.05-0.07$ va ser considerat com a tendència; i els grups van ser $n = 6$, segons el test ANOVA i el post-test Bonferroni.

Resum

En resum, els resultats obtinguts en aquest estudi indiquen que:

- L'augment de la multiplicitat tumoral, del pes de la melsa en els grups AD, de la relació pes/longitud del còlon als grups AD, i de la puntuació final de la valoració histopatològica, posen de manifest l'efecte potenciador de la inflamació sobre la proliferació i la tumorigènesi.
- L'expressió gènica difereix en el teixit tumoral i no tumoral. Les variacions en l'expressió de *tlr4*, *myd88* i *bcl2*, podrien tenir un paper important en el CRC i el CAC.
- Per a fer un seguiment més acurat dels aspectes relacionats amb la proliferació i la seva desregulació en un rerefons inflamatori, el seguiment dels animals durant 12 setmanes sembla més convenient.

3.2.2 Estudi del procés carcinogènic

Monitorització i valoració macroscòpica

Al llarg d'aquestes 12 ó 20 setmanes es va monitoritzar el pes dels ratolins CT, A, i AD (que van seguir el disseny experimental descrit a l'apartat 1.2 dels *Materials i Mètodes*). El pes a cada temps es va referir al que presentava l'animal el dia en que es va iniciar l'experiment. Les **Figures 3.8A i 3.8B** mostren l'evolució ponderal dels animals, on es va observar que els animals dels grups AD patien disminucions del pes relacionades amb el subministrament de DSS i alternades amb augments de pes relacionats amb un cert grau de recuperació dels animals en els períodes en que no reben DSS (visible tant en AD-3 com en AD-6).

En l'estudi *post mortem* dels animals no es va trobar dany tissular macroscòpic ni al fetge, ni a la melsa, ni a l'intestí prim. Els nòduls limfàtics i la melsa dels ratolins AD presentaven un notable augment de pes. El pes de la melsa es va utilitzar com a indicador del grau d'inflamació, observant que les melses dels animals dels grups AD-3 i AD-6 eren significativament més grans que les de la resta de grups. (**Figura 3.8C i 3.8D**) Es va trobar també un augment en els pesos de les melses del grup AD-6 en comparació amb el grup AD-3 (**Figura 3.8G**), compatibles amb el tractament amb DSS més llarg del grup AD-6. De la mateixa manera, vam veure com els còlons extrets dels grups AD-3 i AD-6 eren més curts i visiblement més inflamats que els còlons dels altres grups. (**Figura 3.8E i 3.8F**) També vam trobar diferències significatives entre els valors de la ràtio pes/longitud dels còlons dels grups AD-3 i AD-6. (**Figura 3.8H**) Aquests resultats podrien estar relacionats amb un increment de la proliferació de l'epiteli als grups AD en comparació amb els grups CT i A, però també amb l'edema i la fibrosi en la inflamació crònica i amb un efecte potenciador de la resposta immune sobre el procés tumoral.

A l'examen macroscòpic dels còlons (**Figura 3.9**) es va trobar una elevada multiplicitat tumoral, especialment en els grups AD-3 i AD-6. L'augment significatiu del nombre de tumors de mida entre 1 i 3 mm en el grup AD-6 en comparació amb el grup AD-3 (**Figura 3.9C**), seria compatible amb l'allargament del període de monitorització que fa possible l'aparició de noves displàsies associades a una distorsió del procés de regeneració tissular.

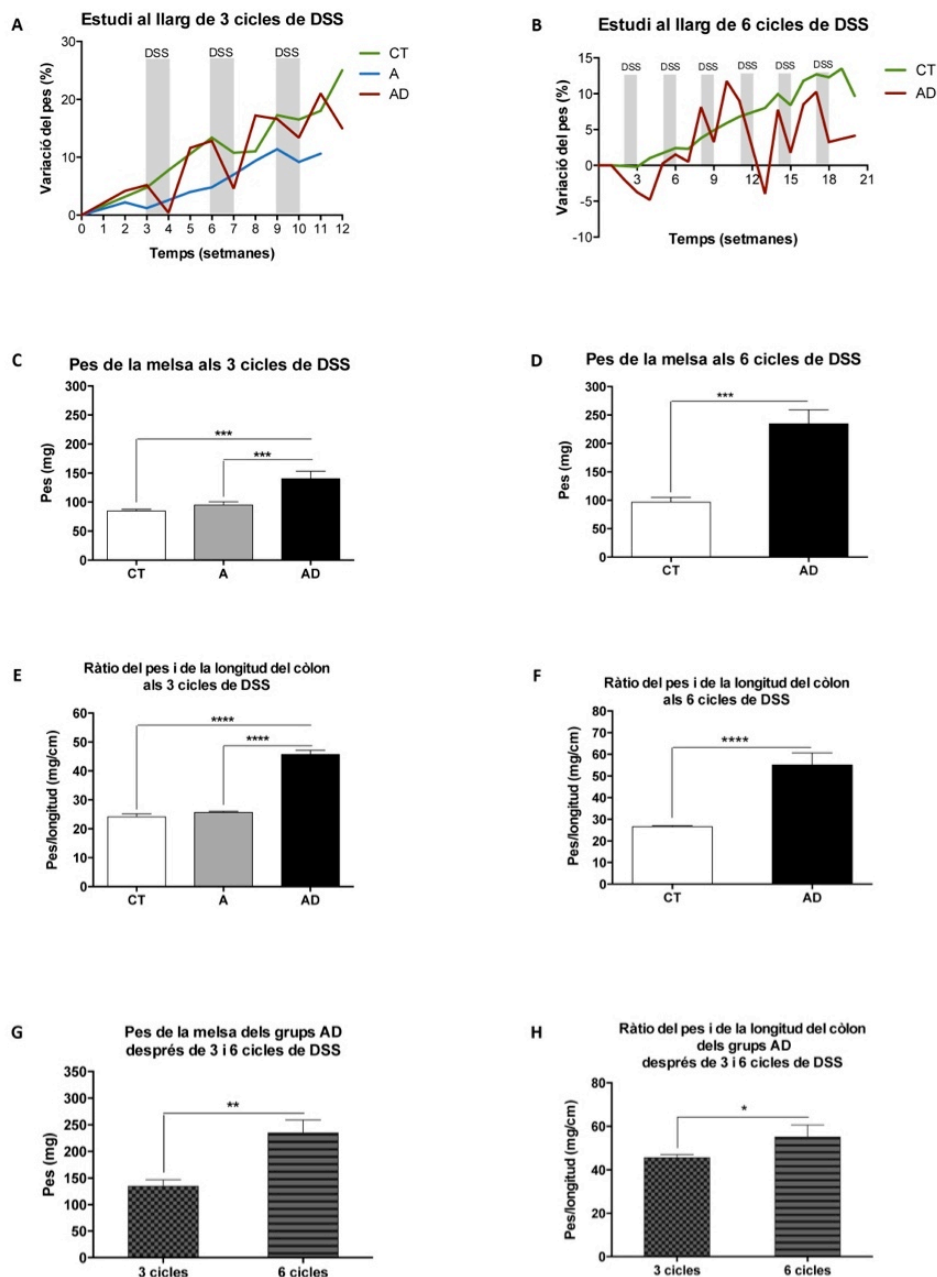


Figura 3.8. Monitorització dels pesos i valoració macroscòpica del còlon i de la melsa. A i B: monitorització de la variació del pes dels ratolins al llarg dels tractaments de 3 i 6 cicles respectivament; C i D: contrast dels pesos de les melses entre els diferents tractaments; E i F: contrast dels ràtios del pes i la longitud del còlon entre els diferents tractaments; G: comparació dels pesos de les melses dels ratolins dels grups AD en els tractaments de 3 ó 6 cicles; H: comparació dels ràtios del pes i la longitud del còlon dels ratolins dels grups AD en els tractaments de 3 ó 6 cicles. $P < 0.05$ va ser considerat estadísticament significatiu, i els grups eren $n = 5-10$, segons el test ANOVA i el post-test Bonferroni.

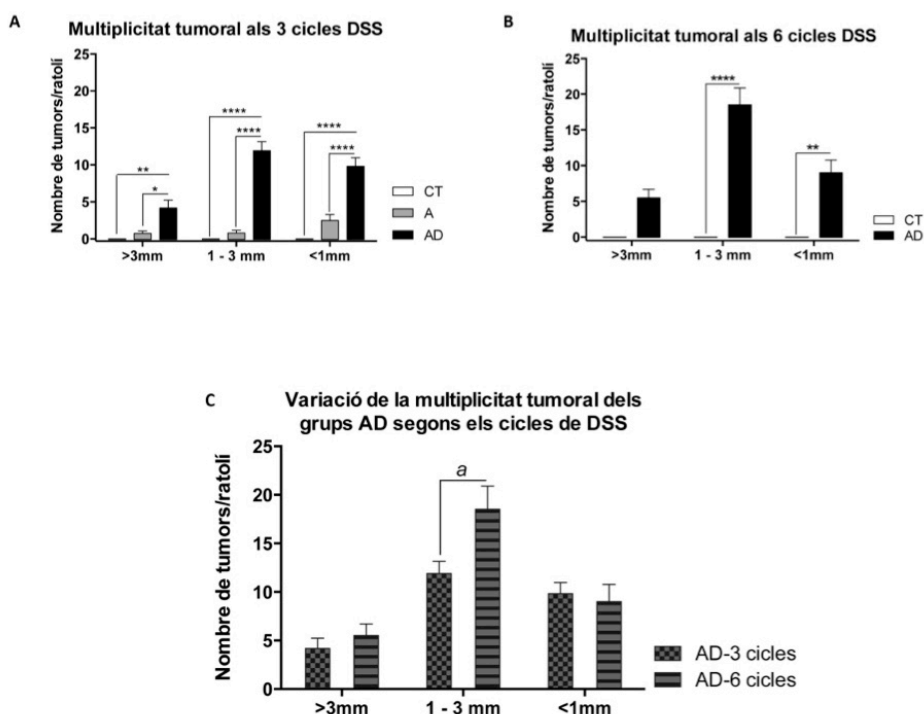


Figura 3.9. Multiplicitat tumoral. A i B: comparació de la multiplicitat tumoral entre els diferents tractaments dels ratolins de 3 i 6 cicles de DSS; C: comparació de la multiplicitat tumoral entre els ratolins dels grups AD dels tractaments de 3 ó 6 cicles. $P < 0.05$ va ser considerat estadísticament significatiu (*) i $P = 0.05-0.07$ tendència (a), i els grups eren $n = 5-10$, segons el test ANOVA i el post-test Bonferroni.

Valoració histopatològica

L'anàlisi histopatològica de talls de còlon tenyits amb H&E va revelar nombroses alteracions en els grups AD-3 i AD-6 (**Figura 3.10**). Es van trobar alteracions com criptes aberrants, focus de criptes aberrants, displàsia d'alt grau, infiltració leucocitària, formacions adenomatoses amb diferent grau de diferenciació, angiogènesi, i adenocarcinomes. Els resultats posen de manifest la importància del component inflamatori en el procés del CAC, ja que al grup que no havia rebut DSS (representatiu de CRC) les alteracions eren molt menys importants. A nivell morfològic les diferències entre els grups AD-3 i AD-6 són significatives en el cas de la formació de ACF, compatible amb un agreujament del grau de displàsia en funció del nombre de cicles de DSS del tractament.

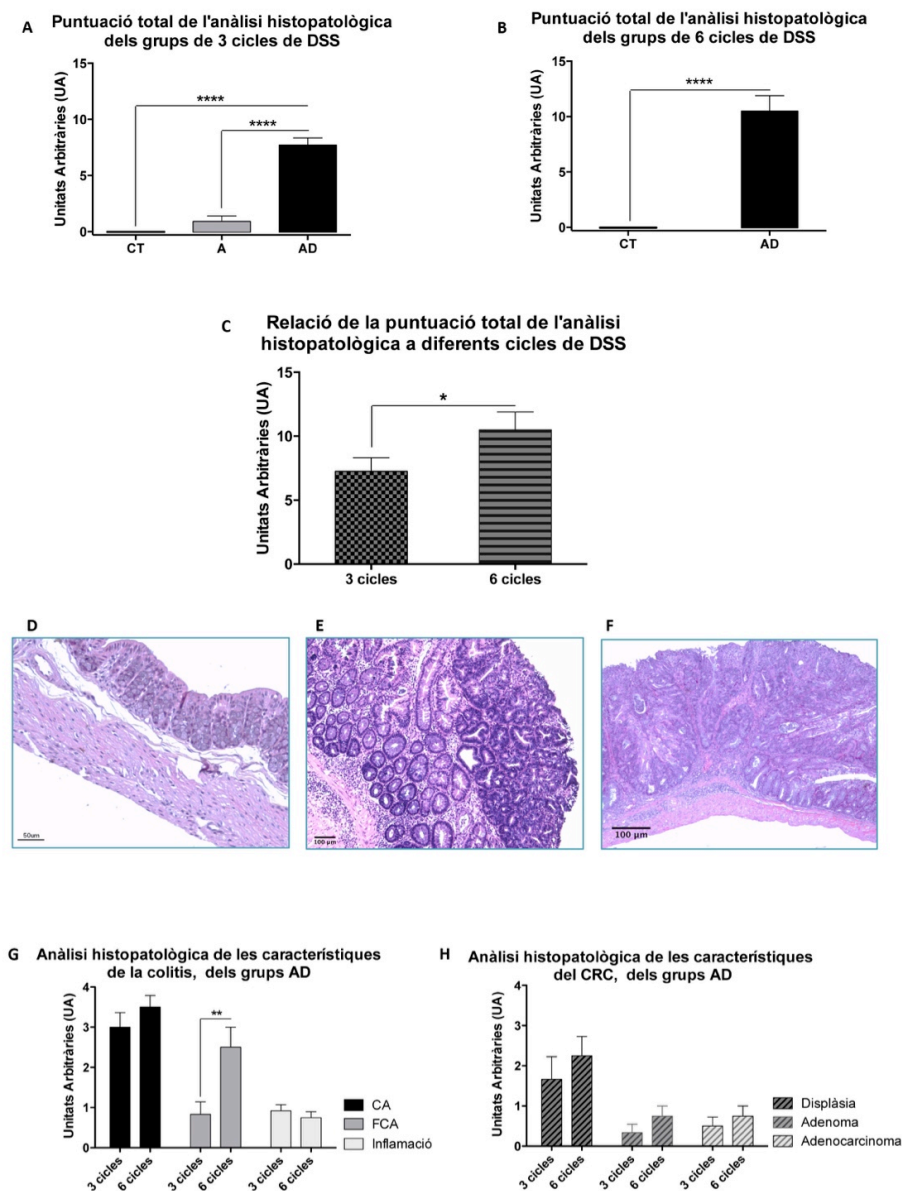


Figura 3.10. Valoració histopatològica. A i B: comparació de la puntuació total de l'anàlisi histopatològic entre els diferents tractaments dels ratolins de 3 i 6 cicles de DSS; C: comparació de la puntuació total de l'anàlisi histopatològic entre els ratolins dels grups AD dels tractaments de 3 ó 6 cicles; D-F: tincions amb Hematoxil·lina-Eosina de teixit de còlon dels grups CT, AD-3 i AD-6 respectivament; G: comparació de la puntuació histopatològica relacionada amb les característiques relacionades amb la colitis dels grups AD; H: comparació de la puntuació histopatològica relacionada amb les característiques relacionades amb el càncer colorectal dels grups AD. Es va aplicar el test ANOVA i el post-test Tukey. Valors de $P < 0.05$ van ser considerats estadísticament significatius. El nombre d'animals per grups oscil·lava entre 5 i 10.

Anàlisi immunohistoquímica i expressió gènica

Per estudiar la proliferació cel·lular associada a inflamació en el model murí AOM/DSS, es van analitzar l'expressió de gens associats amb vies de proliferació, d'inflamació i d'apoptosi, com les vies de Wnt, Tlr i Bcl2.

La immunohistoquímica va permetre localitzar proteïnes relacionades amb processos de proliferació (CTNNB, CCND1, i PCNA) i d'inflamació (COX-2).

A la **Figura 3.11** es mostren imatges de la immunoreactivitat per estudiar la localització de CTNNB i CCND1, en lesions de còlon durant la progressió tumoral. Es va observar com hi havien acumulacions de CTNNB al citoplasma dels AD, a més del nucli; a diferència dels A, en els que la CTNNB més aviat s'acumula als nuclis. També es va poder veure com hi havia més marcatge de CCND1 en les zones amb alt grau de displàsia. Aquests resultats van evidenciar la major proliferació tumoral associada amb el major nombre de cicles de DSS, és a dir, que la persistència de la inflamació crònica té un efecte potenciador sobre el procés tumoral.

A la **Figura 3.12** es mostren imatges de la localització d'immunoreactivitat per COX-2 i PCNA, en lesions de còlon durant la progressió tumoral. Es va observar un increment substancial en el marcatge de COX-2 dels grups AD-3 i AD-6 respecte als controls, precisament en zones amb infiltració leucocitària. I amb el marcatge de PCNA es va confirmar una gran proliferació en AD-6. Aquests resultats van suggerir que es produeix un canvi entre els 3 i els 6 cicles de DSS que agreugen les lesions morfològicament, amb una possible participació del sistema immune.

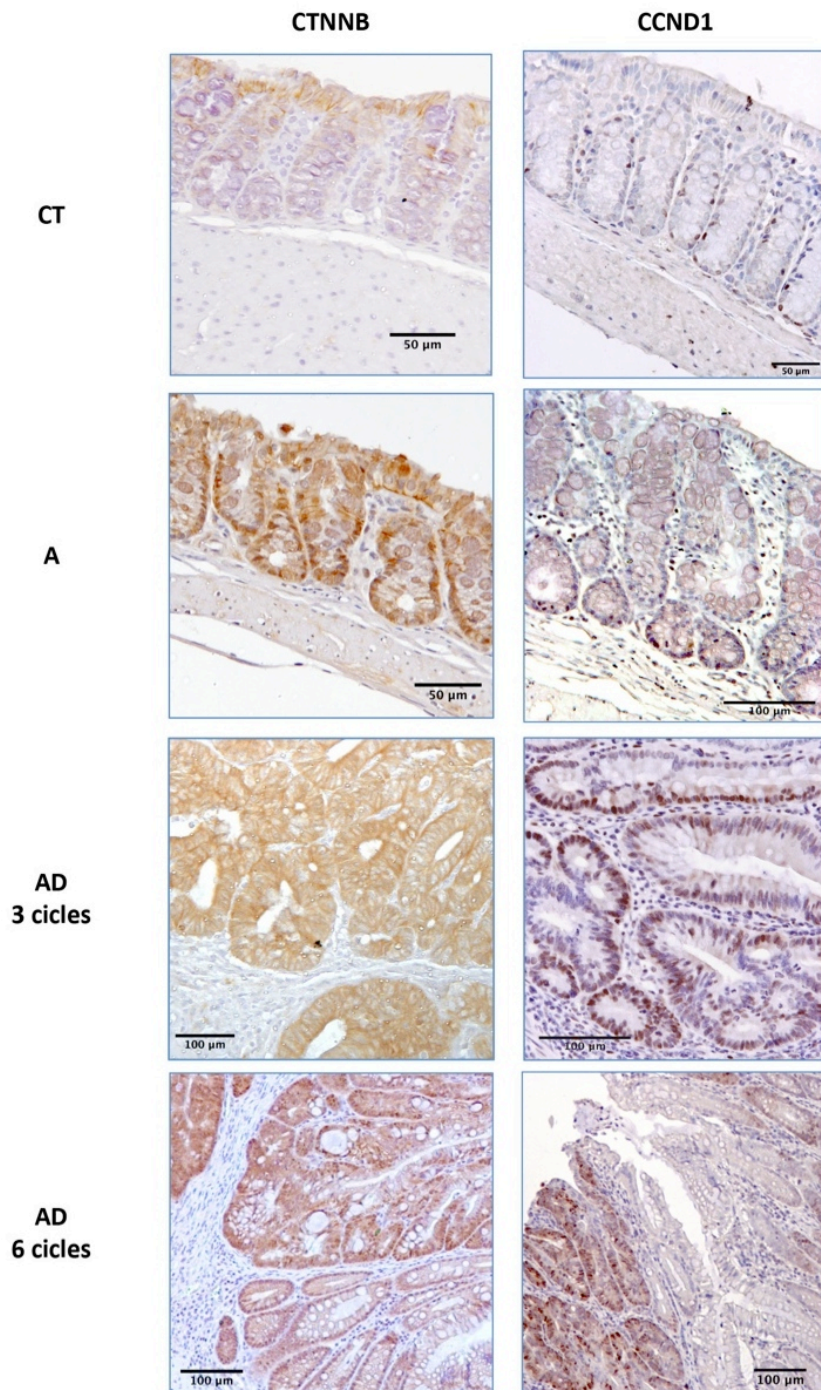


Figura 3.11. Immunohistoquímica per CTNNB i CCND1. Tinció immunohistoquímica per la proteïna CTNNB i la CCND1 del còlon amb lesions de criptes aberrants, focus de criptes aberrants, i displàsies d'alt grau, dels ratolins tractats amb AOM/DSS.

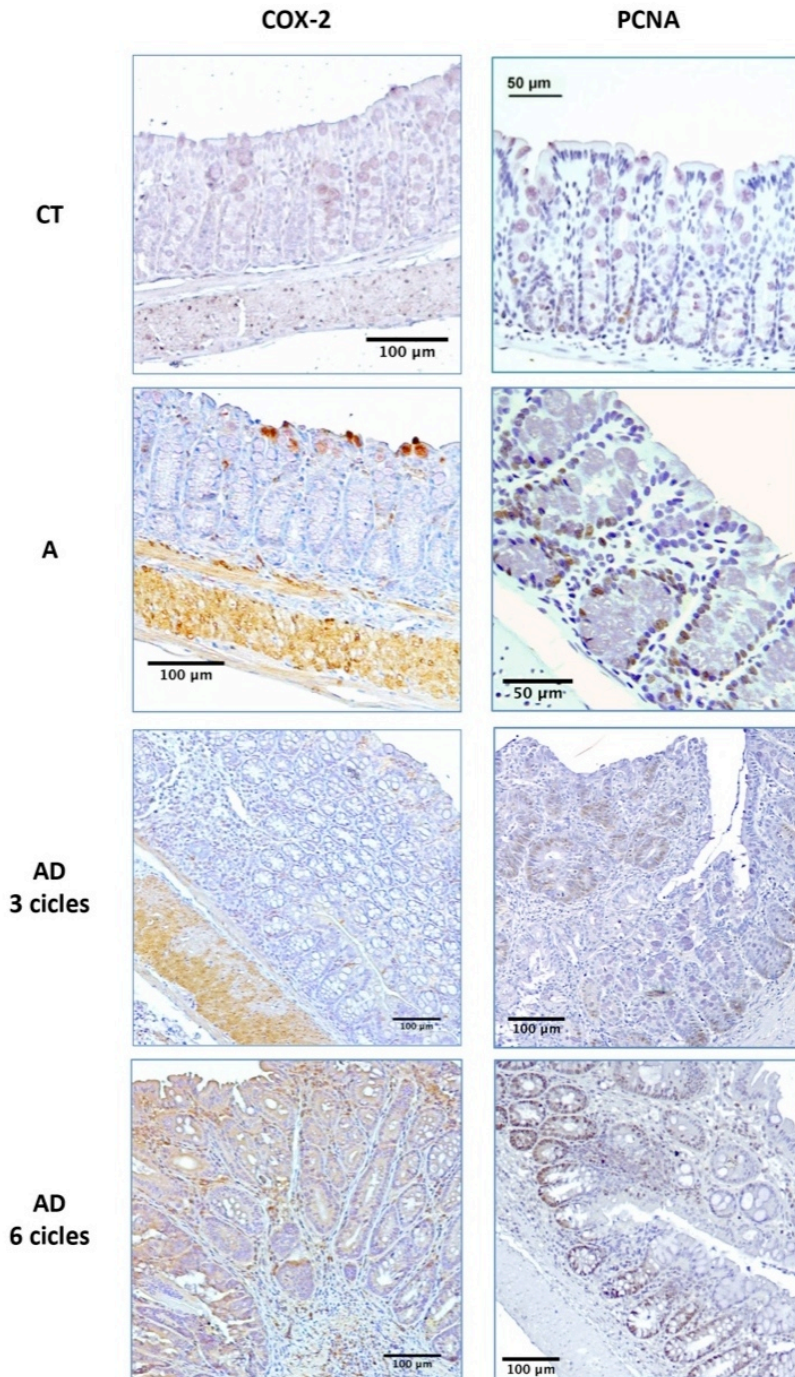


Figura 3.12. Immunohistoquímica per COX-2 i PCNA. Tinció immunohistoquímica per la proteïna COX-2 i la PCNA del còlon amb lesions de criptes aberrants, focus de criptes aberrants, i displàsies d'alt grau, dels ratolins tractats amb AOM/DSS.

Aquest estudi es va completar amb l'anàlisi dels nivells d'expressió de gens associats a proliferació (*tgfb1* i *ciclina d1*), inflamació (*tlr2*, *tlr4*, *tlr9*, *myd88*, i *cox-2*), i apoptosis (*bcl2*), dels teixits sà del grup CT, i no tumoral i tumoral dels grups A i AD-3. A la **Figura 3.13** es mostra com, en comparar tots els grups d'aquest estudi, únicament es van trobar diferències significatives en la variació d'expressió de: *ciclina d1* (**Figura 3.13B**), *tlr4* (**Figura 3.13D**), i *cox-2* (**Figura 3.13G**). L'augment de *ciclina d1* als tumors del grup AD es correspondria amb la gran proliferació cel·lular que es va observar, i l'augment de *cox-2* del mateix teixit concorda amb l'efecte potenciador de la inflamació sobre el procés tumoral. L'augment significatiu de *tlr4* del teixit no tumoral del grup AD en relació amb el grup CT suggereix la participació d'aquest gen en els processos previs a l'aparició dels tumors.

Vam considerar adient comparar també el teixit no tumoral dels grups A i AD, per a valorar com són els canvis que la inflamació determina en el còlon abans que es formi un tumor. L'expressió de *tlr4* i *tlr9* del teixit no tumoral del grup AD era significativament elevada (**Figura 3.14D i 3.14E**); aquest canvi que no es va mantenir en l'anàlisi de l'expressió gènica del teixit tumoral (**Figures 3.15D i 3.15E**). En teixit tumoral, es van trobar significativament augmentades l'expressió de *ciclina d1* (**Figura 3.15B**) i *cox2* (**Figura 3.15G**) en el grup AD. Pel que fa a *tlr9*, es va observar una major expressió en el grup A respecte el grup AD, tot i que la diferència va assolir tan sols el nivell de tendència (**Figura 3.15E**); un perfil semblant es repeteix en el cas de *bcl2* (**Figura 3.15H**) sense arribar a ser estadísticament significatiu. Aquests resultats assenyalen la implicació de *tlr9* i *bcl2* en la transició d'inflamació crònica a tumorigènesi.

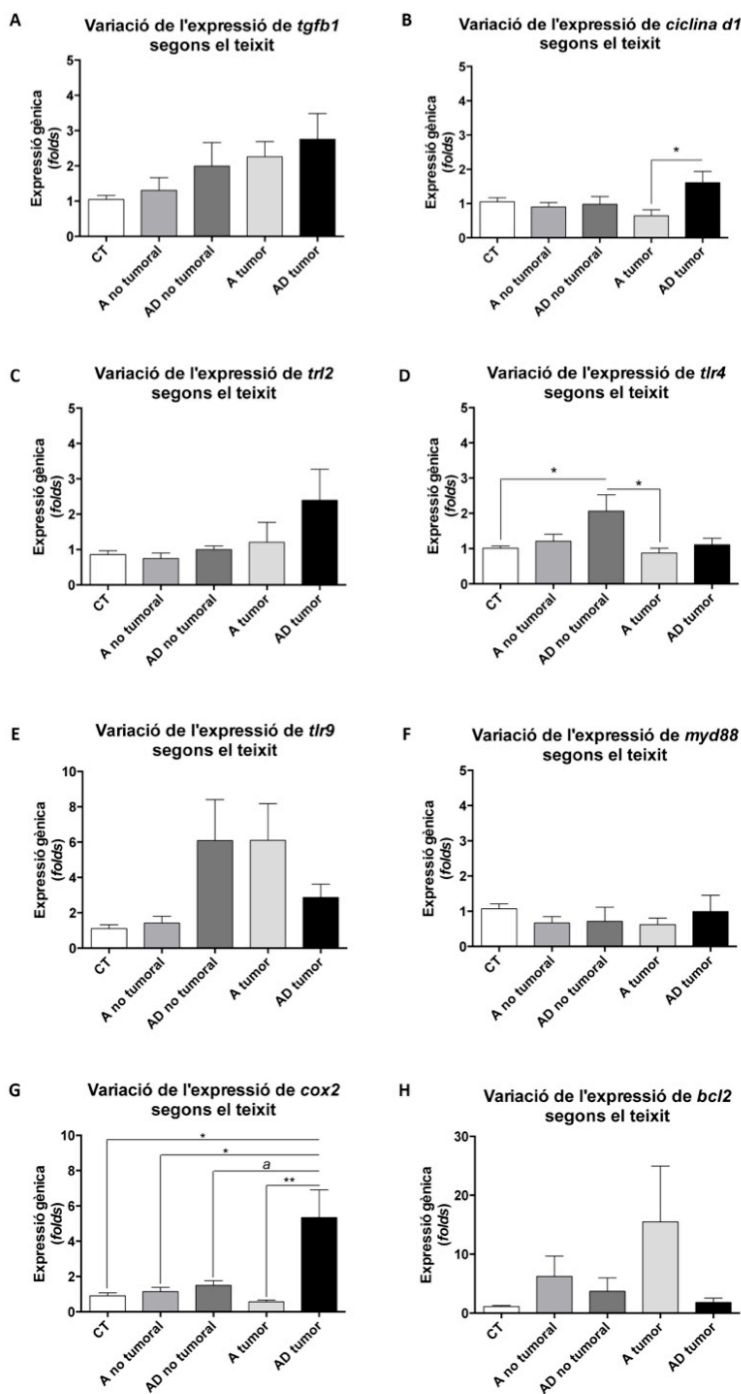


Figura 3.13. Variació de l'expressió gènica en els diferents grups. A-H: variació de l'expressió gènica de *tgfb1*, *ciclina d1*, *tlr2*, *tlr4*, *tlr9*, *myd88*, *cox2*, i *bcl2* segons els teixits sà del grup CT, i tumoral o no tumoral dels grups A i AD. $P < 0.05$ va ser considerat estadísticament significatiu (*) i $P = 0.05-0.07$ tendència (a), i els grups eren $n = 5-10$, segons el test ANOVA i el post-test Bonferroni.

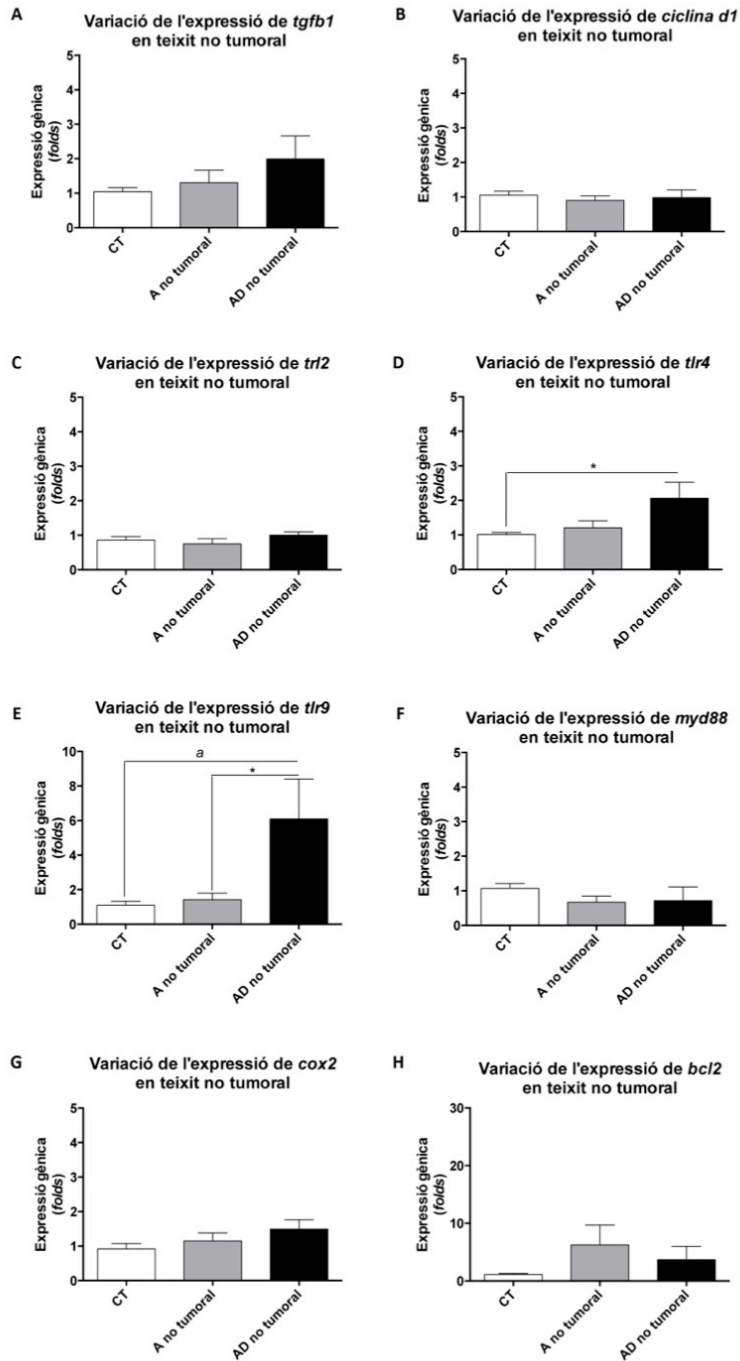


Figura 3.14. Variacions d'expressió gènica en els teixits sans i no tumorals. A-H: variació de l'expressió gènica de *tgfb1*, *ciclina d1*, *tlr2*, *tlr4*, *tlr9*, *myd88*, *cox2*, i *bcl2* segons els teixits sà del grup CT, i no tumoral dels grups A i AD. $P < 0.05$ va ser considerat estadísticament significatiu (*) i $P = 0.05-0.07$ tendència (a), i els grups eren $n = 5-10$, segons el test ANOVA i el post-test Bonferroni.

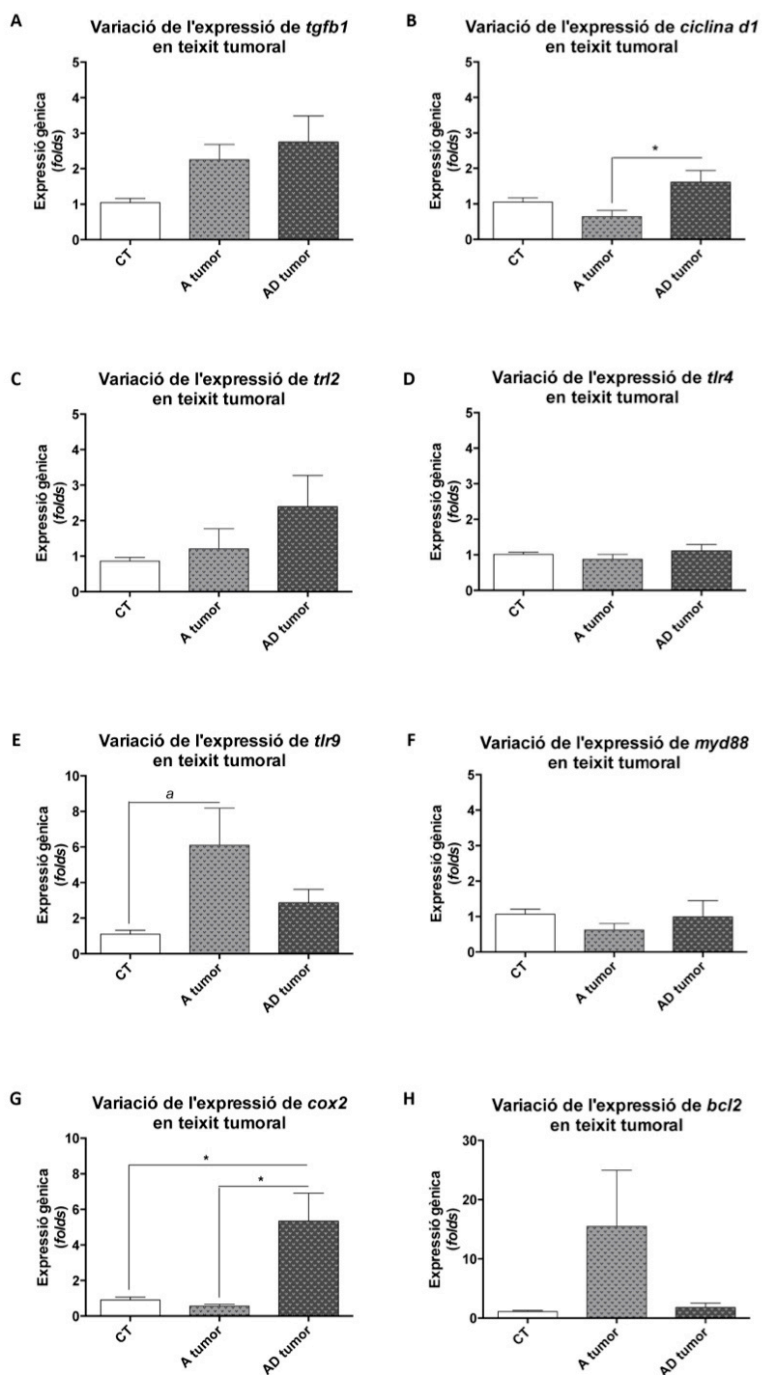


Figura 3.15. Variacions d'expressió gènica en els teixits sans i tumorals. A-H: variació de l'expressió gènica de *tgfb1*, *ciclina d1*, *tlr2*, *tlr4*, *tlr9*, *myd88*, *cox2*, i *bcl2* segons els teixits sà del grup CT, i tumoral dels grups A i AD. $P < 0.05$ va ser considerat estadísticament significatiu (*) i $P = 0.05-0.07$ tendència (a), i els grups eren $n = 5-10$, segons el test ANOVA i el post-test Bonferroni.

Un últim indicador d'inflamació analitzat va ser l'expressió d'*il10* (**Figura 3.16**). Es va realitzar una anàlisi semi-quantitativa (quantificació de les bandes del gel d'agarosa) que va posar de manifest una disminució de l'expressió de IL10 més pronunciada en el cas del grup AD, i encara més en el cas del teixit no tumoral AD.

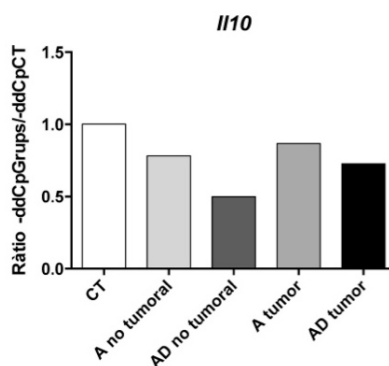


Figura 3.16. Variació de l'expressió gènica de *il10*. Variació de l'expressió gènica de *il10* segons els teixits sà del grup CT, i tumoral o no tumoral dels grups A i AD. Els grups van ser n=1.

Resum

Els resultats obtinguts en aquest estudi indiquen que:

- El model animal utilitzat confirma l'efecte potenciador de la inflamació crònica sobre el procés tumoral.
- L'absència de dany tissular en fetge, melsa i intestí prim indica que en aquest models i en els intervals de temps estudiats encara no s'ha produït metàstasi.
- Entre els 3 i 6 cicles de DSS s'agreugen les lesions morfològiques del còlon, amb possible participació limfocitària.
- Hi ha indicis de la participació de la família dels TLR (*tlr4* i *tlr9*) en els estadis inicials del desenvolupament del CAC.
- L'expressió de COX-2 podria tenir un paper important com a potenciador del procés tumoral.

3.2.3 Estudi del procés carcinogènic

Monitorització i valoració macroscòpica

Les **Figures 3.17A i 3.17B** mostren l'evolució ponderal dels animals CT i D (segons el disseny experimental descrit a l'apartat 3.1. dels *Materials i Mètodes*), que va mostrar que els animals dels grups D patien disminucions del pes relacionades amb el subministrament de DSS alternades amb augmentos de pes relacionats amb els períodes de recuperació amb aigua. La major diferència del grup D9 amb el grup CT, en comparació amb D3 i D6 amb els seus CT, estaria relacionat amb els períodes de recuperació inicialment més llargs, per poder assegurar la supervivència dels animals als 9 cicles de DSS.

El pesos de les melses del animals dels grups D3, D6 i D9 eren significativament més grans que els dels grups CT. (**Figura 3.17D**) En comparar els grups D de diferent nombre de cicles de DSS, vam trobar també un augment significatiu dels pesos de les melses en augmentar el nombre de cicles. Els còlons extrets dels grups D eren més curts i visiblement més inflamats en comparació amb els còlons dels grups CT. (**Figura 3.17E**) No vam trobar diferències significatives entre els valors de la ràtio pes/longitud dels còlons dels grups D3, D6 i D9.

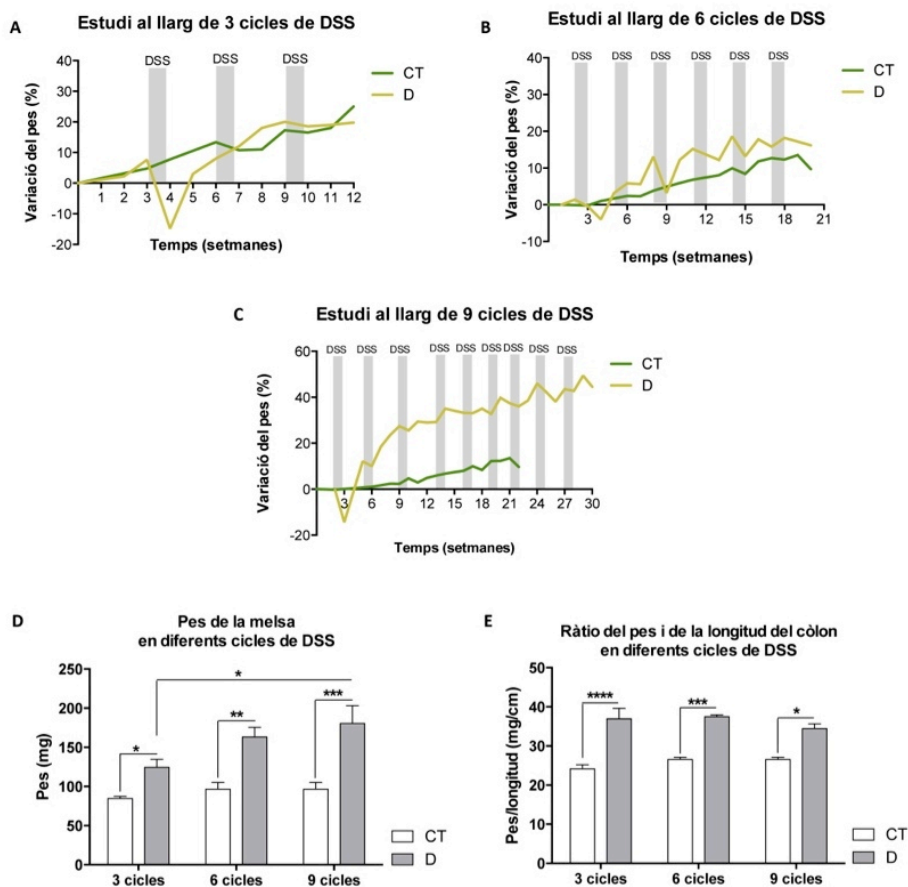


Figura 3.17. Monitorització dels pesos i valoració macroscòpica del còlon i de la melsa. A-C: monitorització de la variació del pes dels ratolins al llarg dels tractaments de 3, 6, i 9 cicles respectivament; D: contrast dels pesos de les melses entre els diferents tractaments i cicles de DSS; E: contrast dels ratisos del pes i la longitud del còlon entre els diferents tractaments i cicles de DSS. $P < 0.05$ va ser considerat estadísticament significatiu (*), i els grups eren $n = 5-10$, segons el test ANOVA i el post-test Bonferroni.

A l'examen macroscòpic dels còlons, no es van evidenciar tumoracions a cap dels grups D però sí hiperplàsia generalitzada en el grup D9. Aquest resultat va suggerir que després de 9 cicles de DSS es produeixen els primers canvis relacionats amb el viratge d'una inflamació crònica cap a un procés tumoral.

Anàlisi histopatològica

L'anàlisi histopatològica de talls de còlon tenyits amb H&E va revelar nombroses alteracions en els grups D3, D6 i D9. (**Figura 3.18**) Es van trobar criptes aberrants, focus de criptes aberrants, displàsia d'alt grau, infiltració leucocitària, angiogènesi, i formacions adenomatoses amb diferent grau de diferenciació, però no es va observar presència d'adenocarcinomes. A nivell morfològic, les diferències entre els grups D3, D6 i D9 no són significatives en la puntuació total, però entre els 6 i els 9 cicles es va observar un canvi important: es passava d'una tendència d'hiperplàsia, a una disminució de la presència de criptes amb intensa infiltració cel·lular i un augment significatiu de presència de displàsies d'alt grau. Els resultats suggereixen que en absència d'un agent carcinogènic com l'AOM, el component inflamatori determina l'aparició dels primers canvis moleculars associables al CAC, a partir dels 9 cicles.

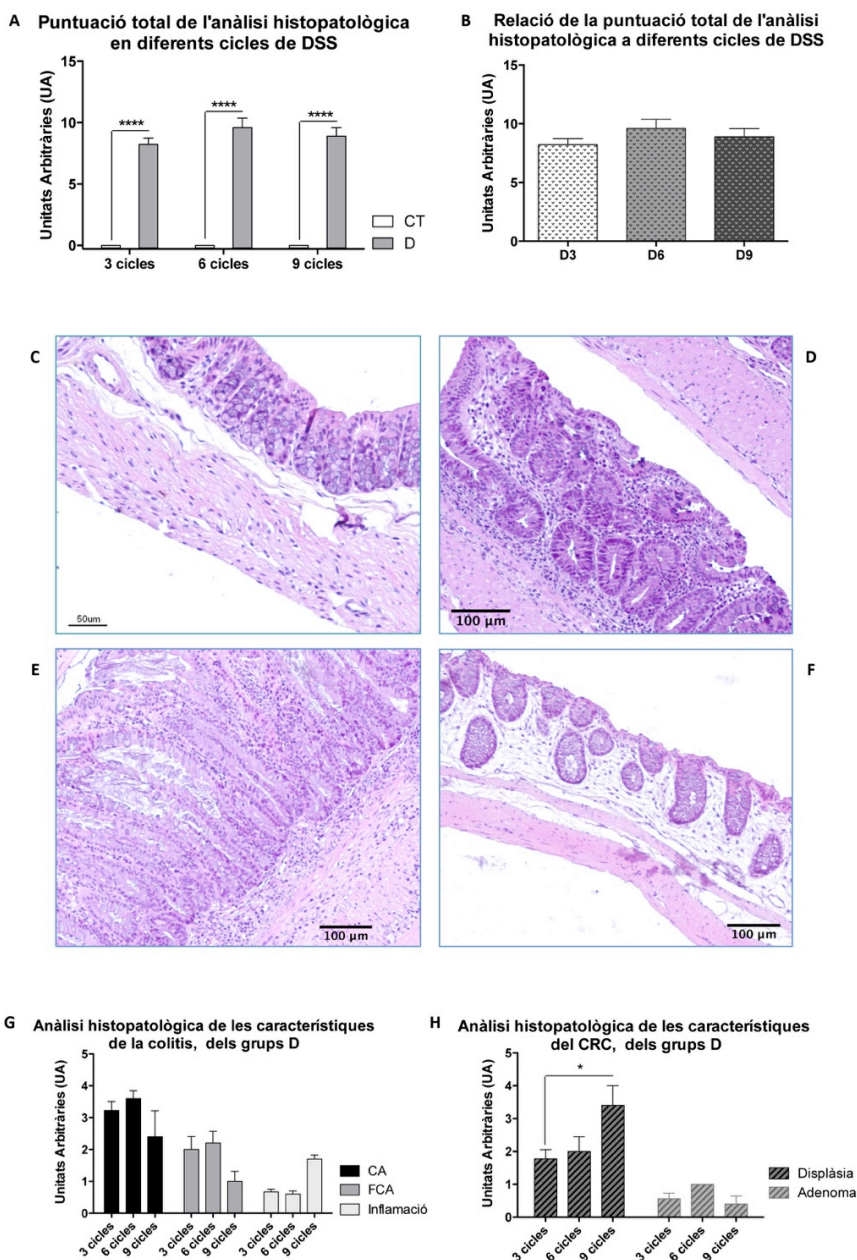


Figura 3.18. Valoració histopatològica. A: comparació de la puntuació total de l'anàlisi histopatològica entre els diferents tractaments dels ratolins de 3, 6 i 9 cicles de DSS; B: comparació de la puntuació total de l'anàlisi histopatològica entre els ratolins dels grups D dels tractaments de 3, 6 i 9 cicles de DSS; C-F: tincions amb Hematoxil-lina-Eosina de teixit de còlon dels grups CT, D-3, D-6, i D-9 respectivament; G: comparació de la puntuació relacionada amb les característiques de la colitis dels grups D; H: comparació de la puntuació relacionada amb trets de càncer colorectal dels grups D. $P < 0.05$ va ser considerat estadísticament significatiu, i els grups eren $n = 5-10$, segons el test ANOVA i el post-test Tukey.

Anàlisi immunohistoquímica i expressió gènica

Per estudiar la proliferació cel·lular associada a inflamació, es va analitzar l'expressió de gens associats a vies de proliferació, d'inflamació i d'apoptosis, com les vies de Wnt, Tlr i Bcl2, de la mateixa manera que al *capítol 1.2*. i la localització immunohistoquímica de proteïnes relacionades amb processos de proliferació (CTNNB, CCND1, i PCNA) i d'inflamació (COX-2).

A la **Figura 3.19** es mostren imatges de la immunoreactivitat per CTNNB i CCND1 en lesions còlon durant la progressió inflamatòria. Als grups D3, D6 i D9, no es va apreciar una acumulació significativa de CTNNB al citoplasma, sinó als nuclis. També es va poder veure com hi havia més marcatge de CCND1 en les zones amb alt grau de displàsia. Aquests resultats indiquen la presència de canvis característics del CRC en el procés de colitis.

A la **Figura 3.20** es mostren imatges de la immunoreactivitat per a COX-2 i PCNA, en lesions còlon durant la progressió inflamatòria. Es va observar un increment substancial del marcatge de COX-2 en els grups D3, D6 i D9, precisament en zones amb infiltració leucocitària. I amb el marcatge de PCNA es va confirmar un augment de l'activitat proliferativa en D3, D6 i D9. Aquests dos fenòmens podrien estar vinculats i tenir un paper significatiu en el desenvolupament de CAC.

Es va completar l'estudi molecular amb l'anàlisi dels nivells d'expressió de gens associats a proliferació (*tgfb1* i *ciclina d1*), inflamació (*tlr2*, *tlr4*, *tlr9*, *myd88*, i *cox-2*), i apoptosi (*bcl2*), dels teixits dels grups CT i D. A la **Figura 3.21** es mostra com, en comparar tots els tractaments d'aquest estudi, únicament es van trobar diferències significatives en l'expressió de *tgfb1* (**Figura 3.21A**), *tlr9* (**Figura 3.21E**), i *bcl2* (**Figura 3.21H**). El grup D va presentar un augment d'expressió de *tgfb1* i *tlr9*, i una disminució de *bcl2*, indicant un augment de la proliferació cel·lular (característica del CRC) i de la inflamació (característica del UC). Aquests resultats relacionarien el nivell d'expressió d'aquests gens amb la cronificació de la inflamació i els processos de proliferació tumoral en els seus estadis inicials.

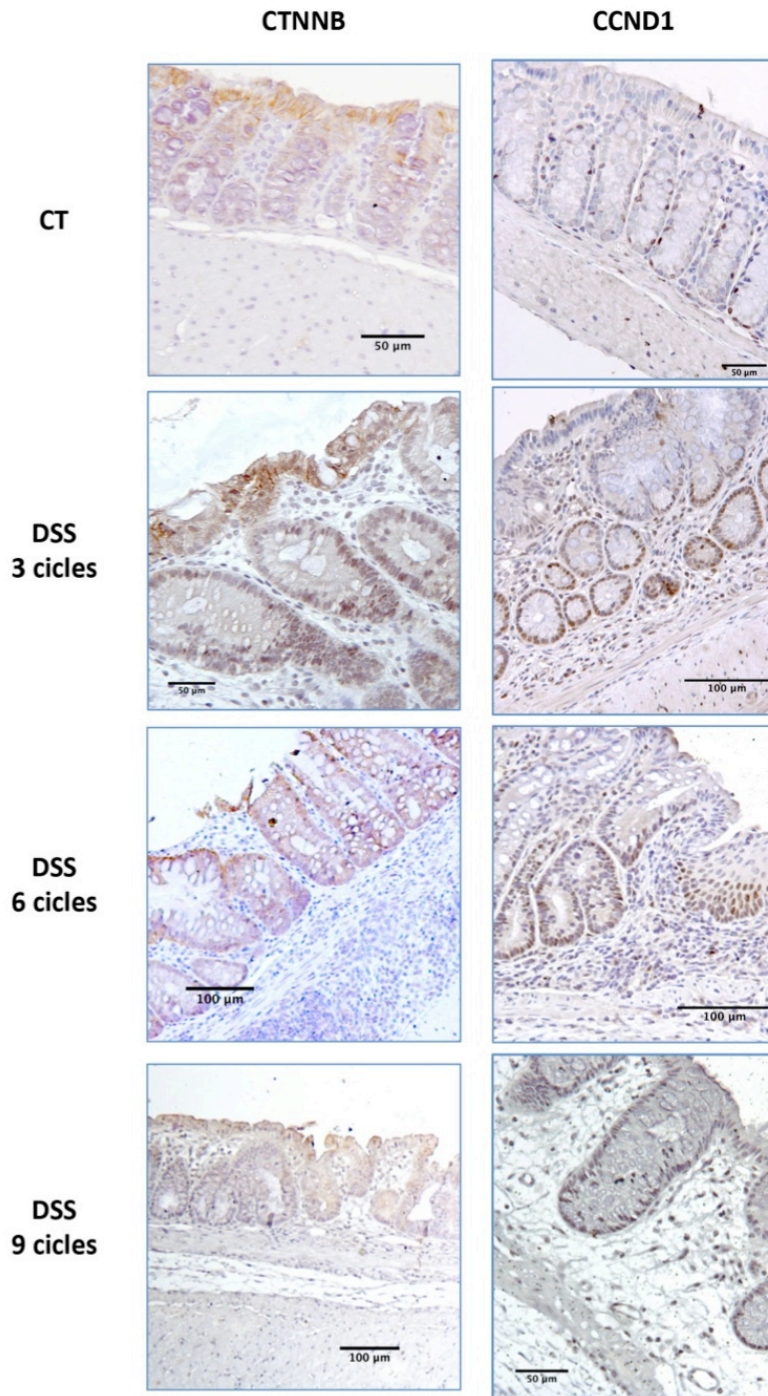


Figura 3.19. Immunohistoquímica per CTNNB i CCND1. Localització de la proteïna CTNNB i la CCND1 mitjançant tinció immunohistoquímica, als còlons dels ratolins tractats amb DSS, els quals presenten lesions de criptes aberrants, focus de criptes aberrants, i displàsies d'alt grau.

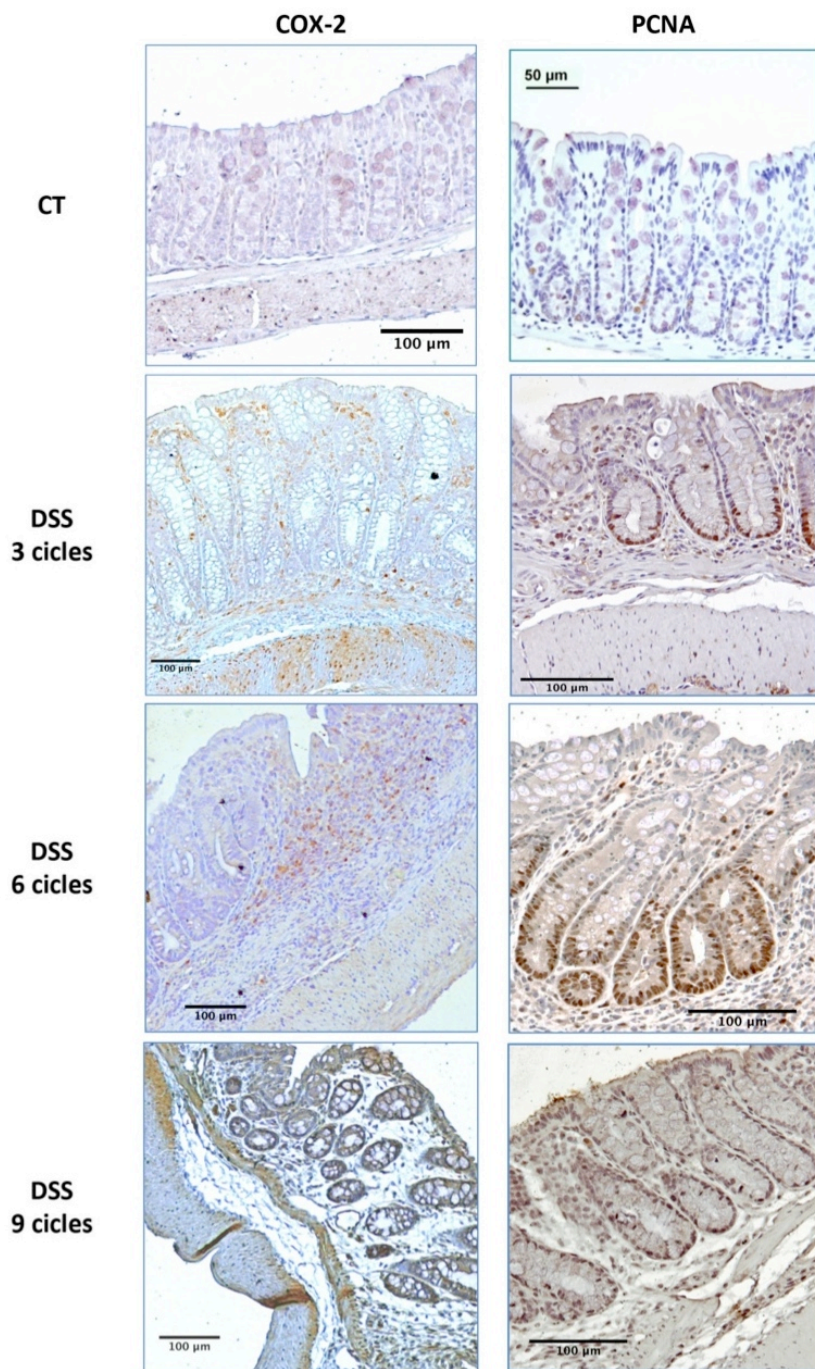


Figura 3.20. Immunohistoquímica per COX-2 i PCNA. Localització de la proteïna COX-2 i la PCNA mitjançant tinció immunohistoquímica, als còlons dels ratolins tractats amb DSS, els quals presenten lesions de criptes aberrants, focus de criptes aberrants, i displàsies d'alt grau.

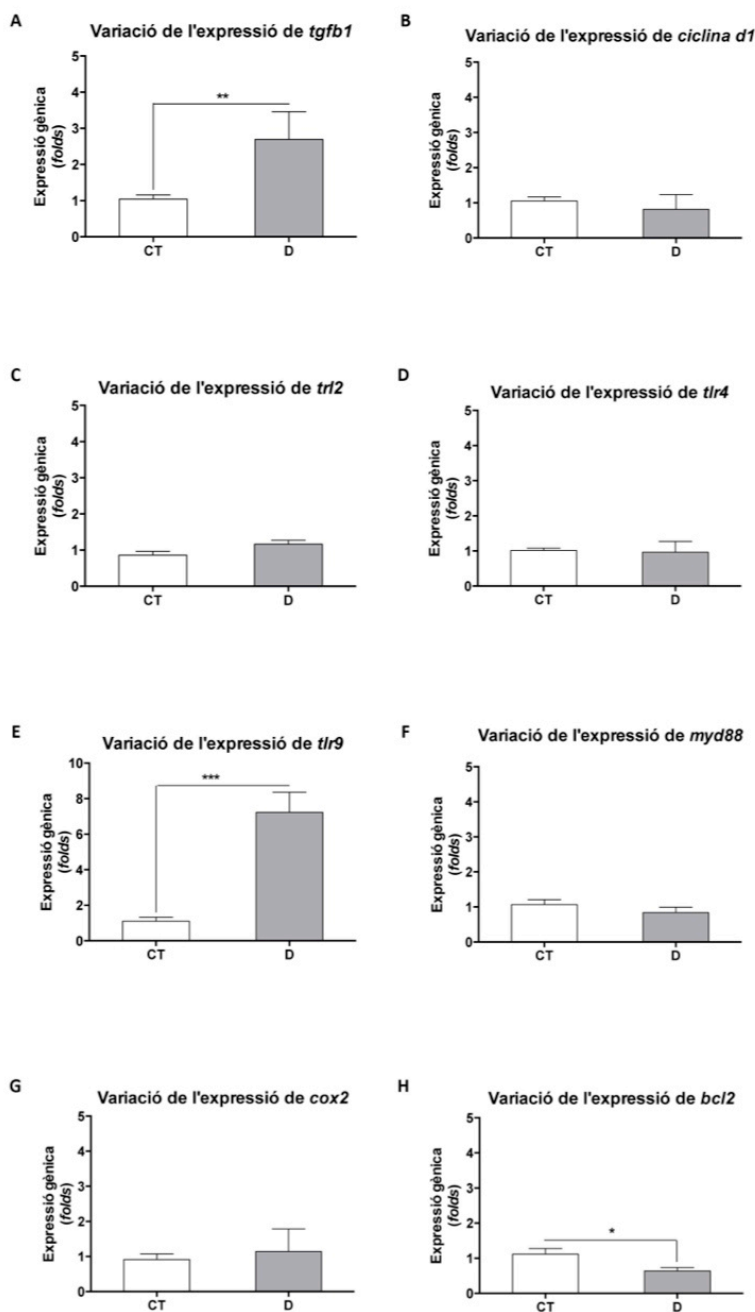


Figura 3.21. Variacions d'expressió gènica al còlon. A-H: variació de l'expressió gènica de *tgfb1*, *ciclina d1*, *tlr2*, *tlr4*, *tlr9*, *myd88*, *cox2*, i *bcl2* referit als valors trobats en teixit sà del grup CT, i del D. P<0.05 va ser considerat estadísticament significatiu, i els grups eren n=5-10, segons el test ANOVA i el post-test Bonferroni.

Pel que fa a l'expressió gènica d'*il10* del grup CT i D3 (**Figura 3.22**), de manera semblant als resultats del **capítol 1.2 (Figura 3.16)**, es va observar una disminució de l'expressió d'*il10*.

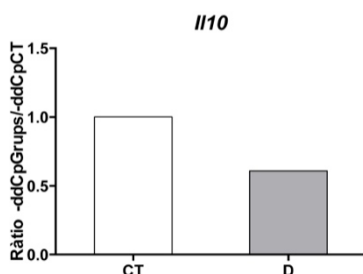


Figura 3.22. Variació de l'expressió gènica de *il10*. Variació de l'expressió gènica de *il10* segons els teixits sà del grup CT, i del D. Els grups van ser n=1.

Resum

Aquest estudi mostra que:

- La major part dels canvis observats relacionen directament l'augment del nombre de cicles de DSS amb una major inflamació i una major proliferació cel·lular.
- Els primers canvis morfològics associables al CAC es podrien produir als 9 cicles de DSS- Tot i així, encara serien molt anteriors al desenvolupament del CAC visible en els grups AD dels altres capítols.
- En canvi, l'alteració de l'expressió gènica de *tgfb1*, *bcl2*, i *tlr9* podria estar relacionada amb els primers estadis del desenvolupament del CAC, ja que presentaria una relació entre la cronificació de la UC i l'aparició de CAC.
- A més, estímuls inflamatoris persistents, com la producció de COX-2 es podrien relacionar amb el desenvolupament de CAC.

3.2.4 Expressió de miRNAs

En aquest estudi hem volgut:

- Comprovar en teixits de ratolins amb CAC els canvis que produeix la presència d'inflamació en l'expressió de miRNAs que la literatura associa al CRC.
- Identificar dianes associades als miRNAs analitzats, relacionades amb processos d'inflamació, proliferació, apoptosi i adhesió cel·lular.
- Cercar entre els miRNA que trobem alterats aquells que poden tenir major interès com a biomarcadors en funció de les seves dianes.

Nivells d'expressió dels miRNAs

Vam analitzar els nivells d'expressió gènica de *miR-135a*, *miR-21*, *miR-145*, *miR-34a*, *miR-7* i *miR-202*, per ser representatius dels canvis que es produeixen als diferents estadis de l'evolució del CRC. (Figura 3.23)

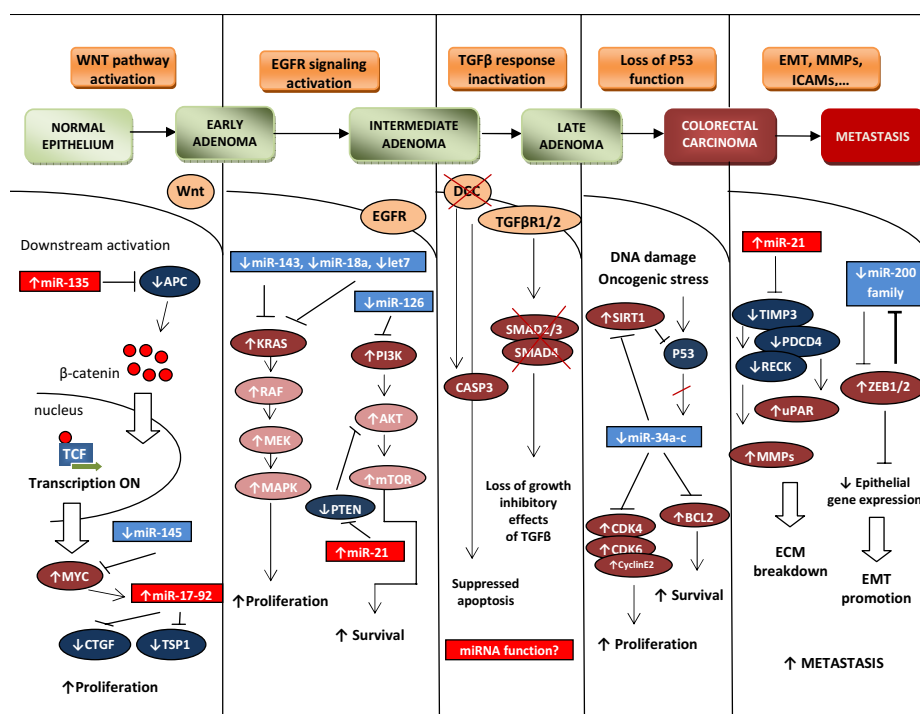


Figura 3.23. Model de Slaby de la implicació dels miRNAs al CRC.[24]

Vam seleccionar teixits procedents de ratolins A i de ratolins AD (AD3; AD de 3 cicles de DSS) de l'estudi corresponent al *Capítol 1.2*, amb intenció de contrastar possibles variacions degudes a la presència d'inflamació. Per aquesta raó, també

3. Estudis en el model murí AOM/DSS

vam analitzar separatament mostres de teixit tumoral identificable macroscòpicament, i de teixit aparentment sà. En aquest estudi no es va utilitzar un grup CT, sinó teixit aparentment sà d'animals del mateix grup per a reduir les diferències interindividuals.

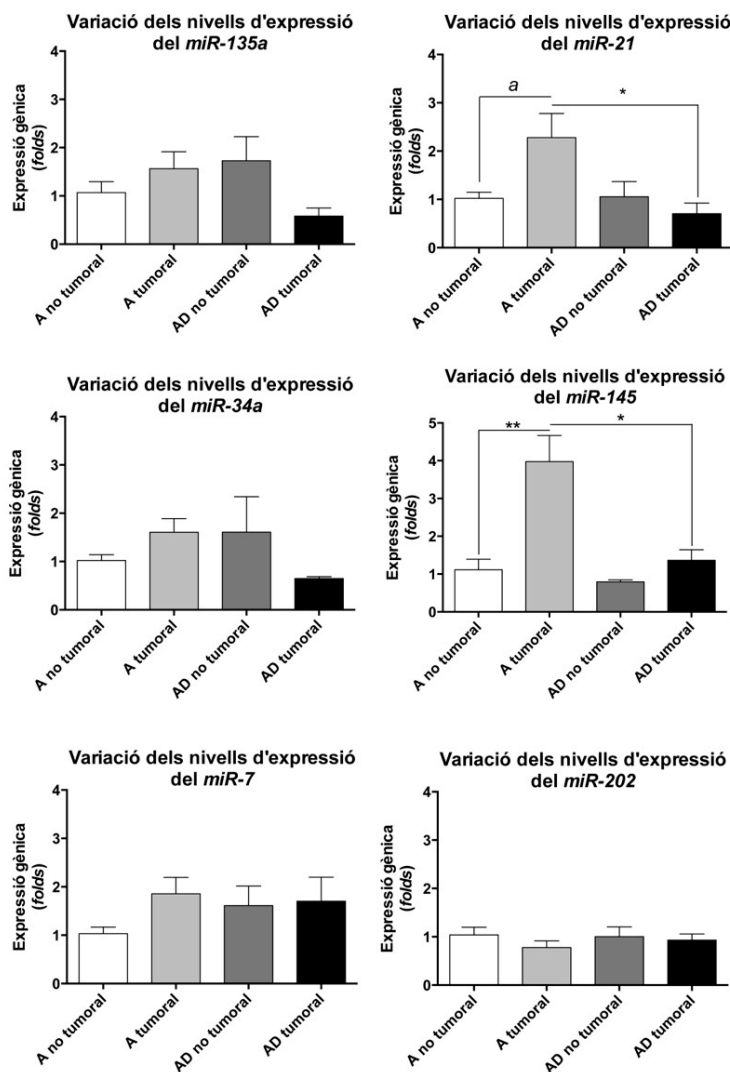


Figura 3.24. Comparació dels nivells d'expressió dels miRNAs analitzats en els teixits analitzats. Variació de l'expressió de *miR-135a*, *miR-21*, *miR-34a*, *miR-145*, *miR-7* i *miR-202* segons els teixits tumoral o no tumoral dels grups A i AD. $P < 0.05$ va ser considerat estadísticament significatiu (*) i $P = 0.05-0.07$ tendència (a), i els grups eren $n = 5-10$, segons el test ANOVA i el post-test Bonferroni.

A la **Figura 3.24**, s'observa la comparació de les expressions de *miR-135a*, *miR-21*, *miR-145*, *miR-34a*, *miR-7* i *miR-202*, dels teixits no tumorals i tumorals dels grups A i

AD. Es van obtenir variacions significatives en el cas dels *miR-21* i *miR-145*, en els dos casos el teixit tumoral d'A presenta increments significatius respecte el teixit no tumoral d'A i tumoral d'AD. Aquests primers resultats suggereixen la conveniència d'analitzar les conseqüències de les variacions d'expressió de *miR-21* i *miR-145*, mitjançant l'estudi de les seves dianes.

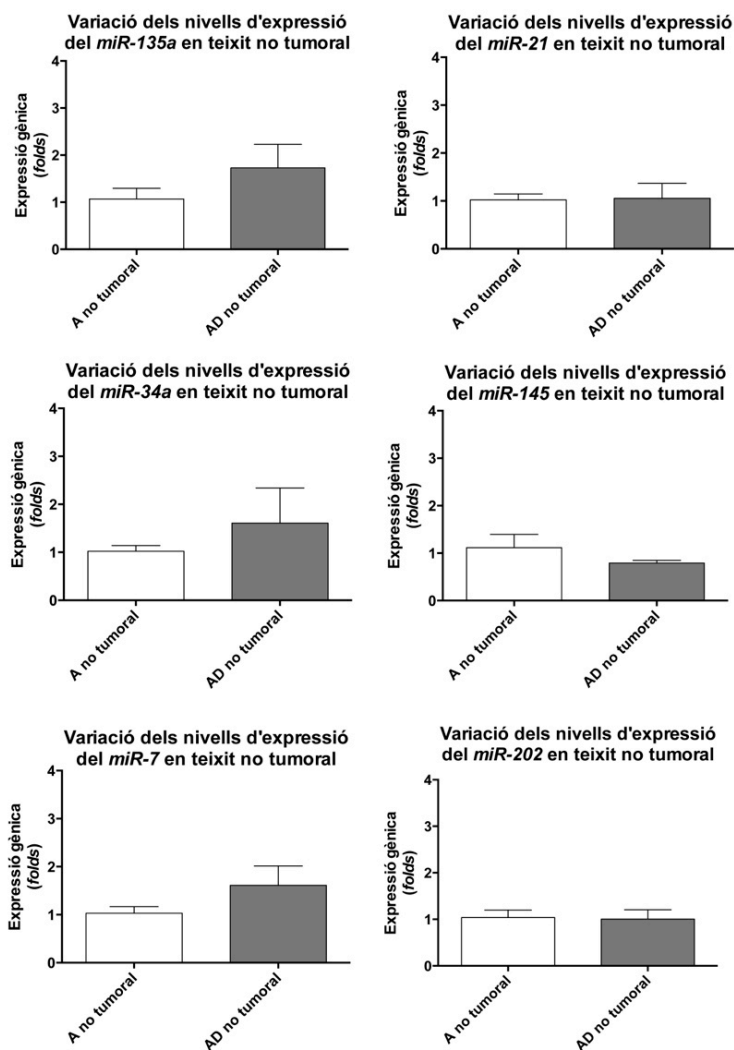


Figura 3.25. Comparació dels nivells d'expressió dels miRNAs analitzats en el teixit no tumoral. Variació de l'expressió gènica de *miR-135a*, *miR-21*, *miR-34a*, *miR-145*, *miR-7* i *miR-202* en teixits no tumorals dels grups A i AD. $P < 0.05$ va ser considerat estadísticament significatiu (*) i $P = 0.05-0.07$ tendència (a), i els grups eren $n = 5-10$, segons el test ANOVA i el post-test Bonferroni.

3. Estudis en el model murí AOM/DSS

La comparació dels nivells d'expressió de miRNA en teixit no tumoral havia d'assenyalar com influeix el procés inflamatori (absent en els ratolins A i present en el grup AD) en la potenciació de l'aparició de displàsies microscòpiques. A la **Figura 3.25** es pot observar que no es van trobar variacions significatives, possiblement degut a la gran diversitat d'estats displàsics microscòpics presents als teixits no tumorals.

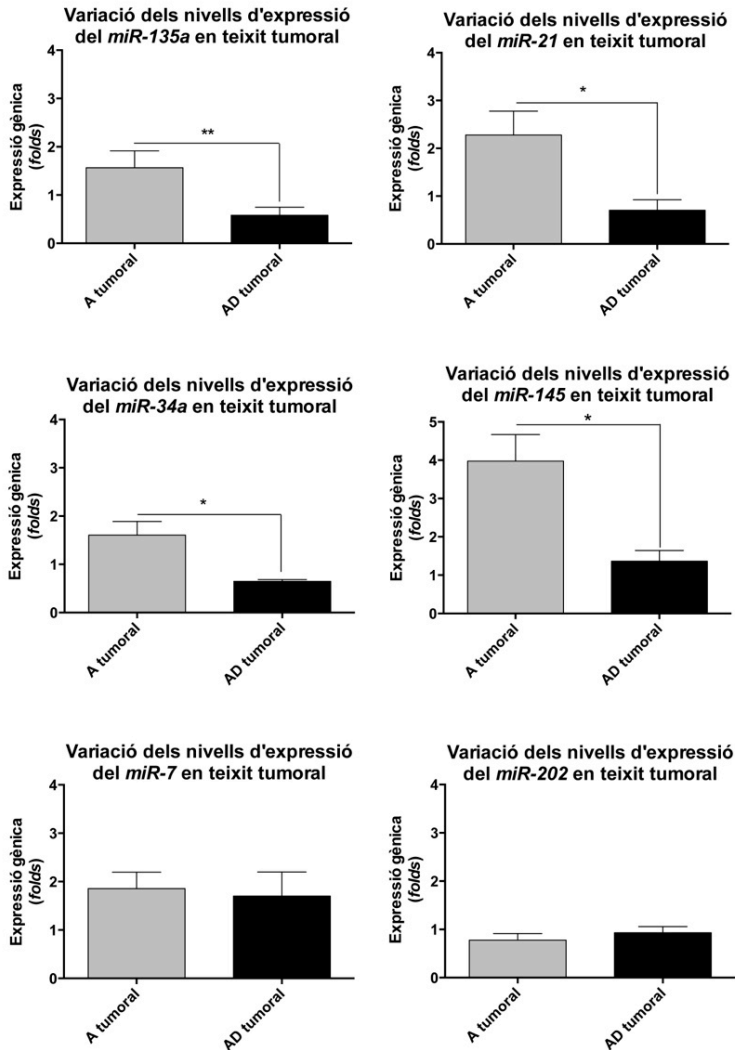


Figura 3.26. Comparació dels nivells d'expressió dels miRNAs analitzats en el teixit tumoral. Variació de l'expressió gènica de *miR-135a*, *miR-21*, *miR-34a*, *miR-145*, *miR-7* i *miR-202* en teixit tumoral dels grups A i AD. $P < 0.05$ va ser considerat estadísticament significatiu (*) i $P = 0.05-0.07$ tendència (a), i els grups eren $n = 5-10$, segons el test ANOVA i el post-test Bonferroni.

El teixit tumoral ens aporta informació de com varia l'expressió de miRNA en un teixit amb tumor macroscòpic que s'ha originat a partir d'un teixit sà (CRC), enfront d'un teixit tumoral originat a partir d'un teixit inflammat (CAC). A la **Figura 3.26** es poden observar les disminucions significatives en els casos dels *miR-135a*, *miR-21*, *miR-145*, i *miR-34a*; per contra, no es va trobar variació significativa en els *miR-7* i *miR-202*. Això ens indicaria que en el tractament realitzat als ratolins, la presència d'inflamació marca una diferència significativa en processos regulats per *miR-135a*, *miR-21*, *miR-145*, i *miR-34a*.

Els resultats, doncs, ens van assenyalar *miR-135a*, *miR-21*, *miR-145*, i *miR-34a* com a miRNAs d'interès mentre que, *a priori*, *miR-7* i *miR-202* semblen poc rellevants en el procés estudiat.

Selecció de les dianes

Es va assumir que els gens diana estan associats negativament amb els miRNAs corresponents, és a dir, que un augment en els nivells dels miRNAs suposa una disminució dels nivells d'expressió dels gens diana; i, per contra, una disminució dels nivells de miRNAs comporta l'augment dels nivells d'expressió dels seus gens diana.

Es van consultar diferents bases de dades per seleccionar i realitzar un cribatge de les dianes tal i com es descriu a l'apartat de *Material i Mètodes* del *Capítol 1*.

Al nostre estudi, la base de dades TargetScan es va fer servir de referència: es van seleccionar dianes que la web associa als miRNAs que vam estudiar. També es van afegir al llistat de gens alguns que no apareixen en al TargetScan però que podien ser interessants en base a dades publicades: *bcl2l2*, *tlr4* (gens candidats per *miR-135a*) i *birc5* (candidat per *miR-145*). (**Taula 3.10**)

Taula 3.10. Primer llistat de gens diana candidats dels miRNAs estudiats.

miRNA	Gens diana candidats
mmu-miR-135a	<i>stat6, mmp11, mapre2, mtdh, ptk2, bmpr1a, ccng2, tcf7l2, smad5, jak2, taf4, pim2, hif1an, klf4, tab3, dnta, (bcl2l2), angptl2, foxo1, mtss1, fzd1, nfat5, tgfb1, gs3kb, atg14, fermt2, gata3, pard3, cxcl12, tgfb2, traf4, rasal2, (tlr4)</i>
mmu-miR-21	<i>pel1, spry1, fmn1, acvr1c, stat3, map3k1, mapk10, pik3r1, btg2, klf6, tiam1, ccl1, smad7, il12a, pdcd4, fasl, notch2, ppara, nfat5, tgfb2, jag2</i>
mmu-miR-145	<i>nuak1, fscn1, pdcd4, ap2b1, elmo1, srgap1, plce1, rtkn, socs7, snx27, smad5, angpt2, smad3, ctnd1, tgfb2, cttnbip1, adam17, map3k3, irs1, actb, arhgap21, foxo1, pxn, cdh2, rassf2, podxl, tgfb2, rasa1, pak4, e2f3, klf4, (birc5)</i>
mmu-miR-34a	<i>notch1, pdgfra, ddx17, tgif2, mta2, notch2, casp2, acsl4, lef1, map2k1, axl, col12a1, csf1r, adipor2, daam1, dixdc1, met, ccne2, fut8, atg4b, ppargc1b, grem2, vcl, mtus1, jag1, camta1, ret, wnt1, sipa1, e2f3, gas1, bcl2</i>

3. Estudis en el model murí AOM/DSS

Vam descartar els gens candidats que no apareixien en més de dos bases de dades, llevat d'aquells que, tot i ser considerats diana només a 1 ò 2 bases de dades consultades, han estat corroborats en alguna publicació científica com a diana del miRNA en qüestió. Ens vam trobar amb que no hi havia cap cas en què totes les bases de dades consultades coincidissin a assenyalar algun gen candidat dels miRNAs analitzats, possiblement degut a les diferències de criteris de les bases de dades a l'hora d'establir els seus algorismes. (Taules 3.11-3.14)

Taula 3.11. Llistats del consens de les bases de dades consultades pels candidats de miR-135a.

6 de 6	5 de 6	4 de 6	3 de 6	2 de 6	1 de 6
	<i>ptk2</i>	<i>stat6</i>	<i>mtdh</i>	<i>foxo1</i>	
	<i>pim2</i>	<i>mapre2</i>	<i>mmp11</i>	<i>mtss1</i>	
		<i>ccng2</i>	<i>bmpr1a</i>		
		<i>tcf7l2</i>	<i>taf4</i>		
		<i>jak2</i>	<i>tab3</i>		
		<i>hif1an</i>	<i>tgfbr1</i>		
		<i>klf4</i>	<i>gsk3b</i>		
		<i>dnta</i>	<i>gata3</i>		
			<i>rasal2</i>		

Taula 3.12. Llistats del consens de les bases de dades consultades pels candidats de miR-21.

6 de 6	5 de 6	4 de 6	3 de 6	2 de 6	1 de 6
	<i>pel1</i>	<i>spry1</i>	<i>fmn1</i>	<i>btg2</i>	<i>tgfbr2</i>
	<i>tiam1</i>	<i>acvr1c</i>	<i>yap1</i>		
	<i>fasl</i>	<i>stat3</i>	<i>ppara</i>		
		<i>map3k1</i>			
		<i>mapk10</i>			
		<i>klf6</i>			
		<i>ccl1</i>			
		<i>smad7</i>			
		<i>il12a</i>			
		<i>pdcd4</i>			
		<i>jag1</i>			

Taula 3.13. Llistats del consens de les bases de dades consultades pels candidats de miR-145.

6 de 6	5 de 6	4 de 6	3 de 6	2 de 6	1 de 6
	<i>nuak1</i>	<i>fscn1</i>	<i>socs7</i>	<i>cdh2</i>	<i>pak4</i>
	<i>pdcd1</i>	<i>ap2b1</i>	<i>snx27</i>		<i>e2f3</i>
	<i>srgap1</i>	<i>elmo1</i>	<i>smad5</i>		<i>klf4</i>
	<i>rtkn</i>	<i>plce1</i>	<i>ctnnbip1</i>		
	<i>actb</i>	<i>angpt2</i>	<i>adam17</i>		
		<i>smad3</i>	<i>cyr61</i>		
		<i>ctnnd1</i>	<i>foxo1</i>		
		<i>tgfbr2</i>	<i>birc5</i>		
		<i>map3k3</i>			
		<i>irs1</i>			

Taula 3.14. Llistats del consens de les bases de dades consultades per dianes candidates de miR-34a.

6 de 6	5 de 6	4 de 6	3 de 6	2 de 6	1 de 6
	<i>notch1</i>	<i>ddx17</i>	<i>notch2</i>	<i>gas1</i>	<i>e2f3</i>
	<i>pdgfra</i>	<i>tgif2</i>	<i>map2k1</i>	<i>bcl2</i>	
	<i>lef1</i>	<i>mta2</i>	<i>col12a1</i>	<i>atg4b</i>	
		<i>casp2</i>	<i>met</i>		
		<i>acs14</i>	<i>ccne2</i>		
		<i>axl</i>	<i>ppargc1b</i>		
		<i>csf1r</i>	<i>vcl</i>		
		<i>daam1</i>	<i>jag1</i>		
		<i>fut8</i>	<i>wnt1</i>		
			<i>sipa1</i>		

La següent selecció va ser en base a publicacions prèvies (PubMed) que confirmessin els gens candidats com a dianes dels miRNAs. Es van descartar els gens diana que altres autors havien comprovat que no es veien alterats per la variació de l'expressió dels miRNAs en qüestió en teixit de CRC. (Taulas 3.15-3.18)

Taula 3.15. Gens diana candidats per miR-135a que han estat confirmats com a dianes per altres autors.

6 de 6	5 de 6	4 de 6	3 de 6	2 de 6	1 de 6
	<i>ptk2</i>	<i>stat6</i>		<i>foxo1</i>	
		<i>jak2</i>		<i>mtss1</i>	

Taula 3.16. Gens diana candidats per miR-21 que han estat confirmats com a dianes per altres autors.

6 de 6	5 de 6	4 de 6	3 de 6	2 de 6	1 de 6
	<i>pel1</i>	<i>spry1</i>		<i>btg2</i>	<i>tgfbr2</i>
	<i>tiam1</i>	<i>stat3</i>			
	<i>fasl</i>	<i>smad7</i>			
		<i>il12a</i>			
		<i>pdcd4</i>			
		<i>jag1</i>			

Taula 3.17. Gens diana candidats per miR-145 que han estat confirmats com a dianes per altres autors.

6 de 6	5 de 6	4 de 6	3 de 6	2 de 6	1 de 6
	<i>rtnk</i>	<i>angpt2</i>	<i>socs7</i>	<i>cadh2</i>	<i>pak4</i>
		<i>smad3</i>	<i>foxo1</i>		<i>klf4</i>
		<i>ctnnd1</i>	<i>birc5</i>		
		<i>tgfbr2</i>			
		<i>irs1</i>			

3. Estudis en el model murí AOM/DSS

Taula 3.18. Gens diana candidats per miR-34a que han estat confirmats com a dianes per altres autors.

6 de 6	5 de 6	4 de 6	3 de 6	2 de 6	1 de 6
	<i>notch1</i>	<i>mta2</i>	<i>notch2</i>	<i>gas1</i>	
	<i>lef1</i>	<i>axl</i>	<i>vcl</i>	<i>bcl2</i>	
		<i>fut8</i>	<i>jag1</i>	<i>atg4b</i>	
			<i>wnt1</i>		
			<i>met</i>		

Els llistats obtinguts (**Taules 3.15-3.19**) fins aquí van ser el punt de partida per explorar les vies de senyalització en les que participen. Vam seleccionar les vies dels processos d'inflamació, de proliferació, apoptosi i adhesió cel·lular, per la seva evident repercussió en processos inflamatoris i carcinogènics. En els processos d'inflamació, es va tenir en compte la participació en la resposta immune innata i adaptativa, especialment que tinguin relació amb les vies de senyalització dels TLRs; i es va descartar el mecanisme de la fagocitosi. Dins dels processos de proliferació que es van tenir en compte hi ha: la via de senyalització de les STATs, la via de senyalització Wnt/CTNNB, la via de senyalització del TGF β , processos de participació de gens identificats com a proto-oncogens, i processos d'angiogènesi (com la linfangiogènesi, o la via de senyalització HIF1). I es van descartar altres processos, com el de metàstasi, per considerar que les anàlisis realitzades en els apartats previs d'aquest capítol mostraven que encara no s'havia arribat a aquests estadis. (**Taules 3.19-3.22**)

Taula 3.19. Dianes de miR-135a que participen en els processos seleccionats.

6 de 6	5 de 6	4 de 6	3 de 6	2 de 6	1 de 6
	<i>ptk2</i>	<i>stat6</i>			
		<i>jak2</i>			

Taula 3.20. Dianes de miR-21 que participen en els processos seleccionats.

6 de 6	5 de 6	4 de 6	3 de 6	2 de 6	1 de 6
	<i>pel1</i>	<i>stat3</i>		<i>btg2</i>	<i>tgfbr2</i>
	<i>tiam1</i>	<i>smad7</i>			
	<i>fasl</i>	<i>il12a</i>			
		<i>pdcd4</i>			
		<i>jag1</i>			

Taula 3.21. Dianes de miR-145 que participen en els processos seleccionats.

6 de 6	5 de 6	4 de 6	3 de 6	2 de 6	1 de 6
	<i>rtnk</i>	<i>angpt2</i>	<i>socs7</i>		<i>pak4</i>
		<i>smad3</i>	<i>birc5</i>		<i>klf4</i>
		<i>ctnnd1</i>			
		<i>tgfbr2</i>			
		<i>irs1</i>			

Taula 3.22. Dianes de miR-34a que participen en els processos seleccionats.

6 de 6	5 de 6	4 de 6	3 de 6	2 de 6	1 de 6
	<i>notch1</i>		<i>notch2</i>	<i>bcl2</i>	
	<i>lef1</i>		<i>vcl</i>		
			<i>jag1</i>		
			<i>wnt1</i>		

En resum, aquest estudi mostra que:

- La variació de la seva expressió gènica alterada de manera diferent dels *miR-135a*, *miR-21*, *miR-145*, i *miR-34a* a les mostres A i AD tumorals va indicar la necessitat d'estudiar la possible regulació de l'expressió d'aquests miRNAs en teixits sotmesos a una inflamació crònica.
- *A priori*, no sembla que *miR-7* i *miR-202* puguin afectar als canvis observats entre aquests grups.
- Gens diana candidats per *miR-135a*: *ptk2*, *stat6*, i *jak2*.
- Gens diana per *miR-21*: *pel1*, *tiam1*, *fasl*, *stat3*, *smad7*, *il12a*, *pdcd4*, *jag1*, *btg2*, i *tgfbr2*.
- Gens diana per *miR-145*: *rtnk*, *angpt2*, *smad3*, *ctnnd1*, *tgfbr2*, *irs1*, *socs7*, *birc5*, *pak4*, i *klf4*.
- Gens diana per *miR-34a*: *notch1*, *lef1*, *notch2*, *vcl*, *jag1*, *wnt1*, i *bcl2*.

3.2.5 Caracterització de poblacions d'esplenòcits

Estudi de poblacions

Les poblacions leucocitàries determinades van ser: limfòcits T totals (el total de Th i Tc), limfòcits B (CD19+), limfòcits Th (CD3+ CD4+), limfòcits Tc (CD3+ CD8+), limfòcits Treg (CD4+ CD25+ Foxp3+ CD127^{low/neg}), cèl·lules NK (CD3- NK1.1+), cèl·lules NKT (CD3+ CD160+), i cèl·lules productores d'IL-17 (CD3+ 160+ NK1.1-). A les **Taules 3.23-3.26** es mostren els resultats dels càlculs percentuals d'aquestes poblacions segons els lots de ratolins estudiats i el nombre de cicles de DSS en referència a la població total de limfòcits.

Taula 3.23. Distribució de les poblacions d'esplenòcits en l'estudi de 12 setmanes de duració de 3 cicles de DSS en els diferents lots en referència a la població total de limfòcits. Els resultats que es presenten corresponen als valors mitjans i als errors estàndards d'aquests. Es van considerar estadísticament significatius valors de $P < 0.05$ i els valors $P = 0.05-0.07$ es van com una tendència ($a = *$ vs CT; $b = **$ vs CT; $c = \#$ vs D; $d = \#\#$ vs D; $e = \#\#\#$ vs D; $f = @$ vs A; $g = @@$ vs A; $h =$ tendència vs CT), els grups eren $n=5-10$, i es van realitzar el test ANOVA i el post-test Bonferroni.

	T totals	B	Th	Tc	Treg	NK	NKT	Productores d'IL-17
CT	28,03 ±0,4812	59,70 ±0,7938	16,83 ±0,1840	11,14 ±0,3398	0,1100 ±0,02550	2,625 ±0,1945	2,121 ±0,2660	1,344 ±0,1629
D	27,52 ±2,042	51,88 ±4,123	17,73 ±1,702	9,759 ±0,4485	0,7250 ±0,1718 (a)	3,367 ±0,5545	2,855± 0,05346 (a)	1,820 ±0,09670
A	32,49 ±1,223	57,24 ±1,595	17,89 ±0,7324	14,58 ±0,6588 (c)	0,6060 ±0,01208 (h)	2,918 ±0,2788	1,900 ±0,05520 (e)	1,114 ±0,02146 (d)
AD	30,91 ±1,944	45,96 ±1,748 (b; g)	19,21 ±1,127	11,67 ±0,9126	0,5520 ±0,1020 (h)	5,347 ±0,5237 (a; f)	2,161 ±0,09215 (d)	1,290 ±0,09094 (c)

A **Taula 3.23**, les poblacions amb variació significativa van ser les de les cèl·lules B, Tc, Treg, NK, NKT i les productores d'IL-17, de l'estudi de 12 setmanes (estudi associat a 3 cicles de DSS). A les cèl·lules B disminuïa significativament el grup AD. Es va constatar que en el grup D els nivells de cèl·lules Tc eren significativament més baix que en el grup A. Es van observar augments en les Treg en tots els grups respecte el grup CT. Pel que fa a les cèl·lules NK, es van trobar nivells significativament elevats només en els animals que estan desenvolupant càncer colorectal associat a colitis, fet que podria suggerir que l'augment d'aquesta població estigués relacionat a la tumorigènesi potenciada per inflamació. S'hi va observar també un augment poblacional significatiu del grup D tant de les NKT com de les cèl·lules productores d'IL-17; en ser en els dos casos significativament major que les poblacions dels grups A i AD, i aquestes ser semblants entre elles, indicaria un biaix diferent en les poblacions de cèl·lules NKT i de les cèl·lules productores d'IL-17 quan solament s'està produint un procés purament inflamatori (els nivells

cel·lulars dels grups D de les dues poblacions augmentaven) respecte a les situacions en les que s'estan desenvolupant tumors associats a colitis (els nivells cel·lulars dels grups AD de les dues poblacions es mantenen als mateixos nivells que els CT).

Taula 3.24. Distribució de les poblacions d'esplenòcits en l'estudi de 20 setmanes de duració de 6 cicles de DSS en els diferents lots en referència a la població total de limfòcits. Els resultats que es presenten corresponen als valors mitjans i als errors estàndards d'aquests. Es van considerar estadísticament significatius valors de $P < 0.05$ i valors $P = 0.05 - 0.07$ es van com una tendència ($a = *$ vs CT; $b =$ tendència vs CT); els grups eren $n = 5 - 10$, i es van realitzar el test ANOVA i el post-test Bonferroni.

	T totals	B	Th	Tc	Treg	NK	NKT	Productores d'IL-17
CT	30,92 ±3,351	56,68 ±3,699	18,90 ±2,197	11,98 ±1,238	0,2860 ±0,04130	3,235 ±0,4089	1,674 ±0,2026	0,9636 ±0,1189
D	23,53 ±1,823	42,83 ±4,378 (b)	14,98 ±1,165	8,522 ±0,6647 (b)	0,5000 ±0,1761	3,463 ±0,2339	1,999 ±0,1397	1,163 ±0,07165
AD	21,76 ±0,1487	41,83 ±0,2919	13,52 ±0,2072	7,530 ±0,7254 (a)	0,2000 ±0,06245	3,567 ±0,2243	1,947 ±0,2054	1,129 ±0,07824

A la **Taula 3.24**, les poblacions amb variació significativa van ser les de les cèl·lules B i Tc, de l'estudi de 20 setmanes (estudi associat als 6 cicles de DSS). En animals que no havien rebut l'agent carcinogènic, la població de cèl·lules B estava significativament disminuïda. Es va observar una reducció dels nivells les cèl·lules de Tc respecte al control, tant als animals AD com als D (aquests últims, una tendència). Les cèl·lules Treg es mantenen en nivells de població elevats al grup D, tot i que la diferència no va arribar a ser estadísticament significativa.

Taula 3.25. Distribució de les poblacions d'esplenòcits en l'estudi de 30 setmanes de duració de 9 cicles de DSS segons els diferents lots en referència a la població total de limfòcits. Els resultats que es presenten corresponen als valors mitjans i als errors estàndards d'aquests. Es van considerar estadísticament significatius valors de $P < 0.05$ ($a = *$ vs CT; $b = **$ vs CT); els grups eren $n = 5 - 10$, i es van realitzar el test t.

	T totals	B	Th	Tc	Treg	NK	NKT	Productores d'IL-17
CT	30,92 ±3,351	56,68 ±3,699	18,90 ±2,197	11,98 ±1,238	0,2860 ±0,04130	3,235 ±0,4089	1,674 ±0,2026	0,9636 ±0,1189
D	34,34 ±2,650	40,86 ±1,782 (b)	22,41 ±1,873	12,72 ±0,3093	0,6740 ±0,1464 (a)	3,969 ±0,1999	2,300 ±0,07450 (a)	1,053 ±0,02916

A la **Taula 3.25**, les poblacions que van variar significativament van ser les de les cèl·lules B, Treg, i NKT, de les 30 setmanes d'estudi (estudi associat als 9 cicles de DSS). En animals amb colitis, la població de cèl·lules B estava disminuïda. La proporció de Treg i NKT va ser significativament més alta en el grup D.

En observar que es trobaven variacions a les poblacions Tc però no a les Th respecte a la població total de limfòcits, es van voler calcular les variacions poblacionals de

3. Estudis en el model murí AOM/DSS

les cèl·lules Th i Tc en referència a la població total de cèl·lules T per comprovar si es repeteix el perfil de cèl·lules T en 3, 6 i 9 cicles de DSS (**Taula 3.26**; no es van calcular els percentatges de les poblacions de cèl·lules Treg, per tenir poca presència a les mostres en comparació amb les de Th i Tc). Al cap de 12 setmanes (estudi associat a 3 cicles de DSS) es va observar que, a la població de cèl·lules Th, el lot A presentava una disminució dels seus nivells, mentre que als lots D i AD s'observava un augment (a les 30 setmanes –estudi associat a 9 cicles de DSS–, el grup D torna a presentar un augment dels nivells de les Th); de manera i magnitud similar es va veure que hi havia una variació dels nivells de cèl·lules Tc als mateixos lots (a les 30 setmanes, el grup D torna a presentar una disminució dels nivells de les Th), però en sentit invers. Això va suggerir que, dins la població de cèl·lules T, les poblacions de cèl·lules Th i Tc segueixen patrons diferents quan es tractava d'un desenvolupament de càncer colorectal esporàdic (les Th disminueixen, i les Tc augmenten) que si es tractava de càncer colorectal associat a colitis (les Th i les Tc es mantenen aproximadament al mateix nivell que els CT), i uns nivells cel·lulars semblants en els casos de colitis i càncer colorectal associat a colitis.

Taula 3.26. Poblacions limfocitàries de Th i Tc en relació a la població total de cèl·lules T. Els resultats que es presenten corresponen als valors mitjans i als errors estàndards d'aquests. Es van considerar estadísticament significatius valors de $P < 0.05$ i els valors $P = 0.05 - 0.07$ es van considerar com una tendència ($a = *$ vs CT; $b = ###$ vs D; $c = @@@$ vs A; $d =$ tendència vs CT), els grups eren $n = 5 - 10$, i es van realitzar el test ANOVA i el post-test Bonferroni (a les poblacions cel·lulars associades als lots de 3 i 6 cicles de DSS) i el test t (a les poblacions cel·lulars associades als lots de 9 cicles de DSS).

	3 cicles de DSS /12 setmanes		6 cicles de DSS /20 setmanes		9 cicles de DSS /30 setmanes	
	Th	Tc	Th	Tc	Th	Tc
CT	60,07 $\pm 0,5886$	39,71 $\pm 0,5985$	60,88 $\pm 1,186$	39,00 $\pm 1,190$	60,88 $\pm 1,186$	39,00 $\pm 1,190$
D	64,13 $\pm 1,561$	35,76 $\pm 1,568$	63,67 $\pm 0,4132$	36,23 $\pm 0,4194$	65,19 $\pm 1,017 (a)$	34,71 $\pm 1,019 (a)$
A	55,05 $\pm 1,025 (d; b)$	44,87 $\pm 1,023 (d; b)$	-	-	-	-
AD	62,43 $\pm 0,9890 (c)$	37,48 $\pm 0,9910 (c)$	61,54 $\pm 1,142$	38,32 $\pm 1,147$	-	-

En resum, les primeres observacions van indicar que la variació la població de cèl·lules Treg podria reflectir l'activació dels processos inflamatoris que en cronificar-se podrien estar associats d'alguna manera amb la proliferació cel·lular (potser amb la hiperplàsia observada al *capítol 1.3*); tot i així, aquesta població és tan minoritària, que els seus resultats en aquests estudis són poc conclouents. D'altra banda, es va observar una disminució progressiva de la població de cèl·lules B que podria estar relacionada amb el desenvolupament del càncer colorectal associat a colitis. L'augment dels nivells de cèl·lules NK observat a les 12 setmanes en els grups de ratolins que desenvolupaven tumorigènesi associada a colitis, disminuïa posteriorment en els estudis més llargs (20 i 30 setmanes) fins a nivells

del grup CT. I la resta de poblacions van mostrar unes variacions diferents segons es tractava d'un procés inflamatori crònic o d'una proliferació tumoral (associada o no a inflamació).

Per tenir una visió més clara de les variacions de les poblacions cel·lulars en els estudis fets, es van comparar: els ràtios de les poblacions de cada grup respecte al grup CT (**Figures 3.27**) i, separadament, les progressions fenotípiques dels grups AD (**Figures 3.28 i 3.29**) i dels grups D (**Figures 3.30 i 3.31**).

A la comparació dels ràtios (**Figura 3.27**), es buscava plasmar com variaven les poblacions estudiades als diferents grups experimentals (colitis, tumoracions esporàdiques, o tumoracions associades a colitis) respecte a una situació normal. Va destacar la disminució de la població de cèl·lules B del grup AD als 3 cicles de DSS (a les 12 setmanes; **Figura 3.27A**), i els augments de les poblacions NK del grup AD (**Figura 3.27B**) i de les poblacions NKT i de les cèl·lules productores d'IL-17 del grup D (**Figura 3.27C i 3.27D**), també als 3 cicles de DSS. Als grups de 6 i 9 cicles no es van trobar variacions significatives.

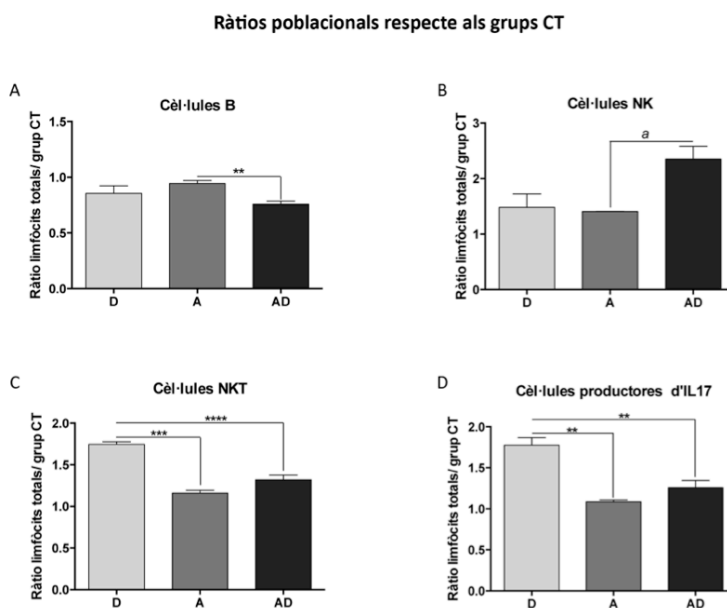


Figura 3.27. Ràtios poblacionals de les cèl·lules B, NK, NKT i productores d'IL17, respecte als grups CT. Ràtios poblacionals significatius de les cèl·lules B, NK, NKT, i productores d'IL17, pels diferents grups de ratolins corresponents als tractaments de 3 cicles de DSS. Es van considerar estadísticament significatius valors de $P < 0.05$ (*), mentre que valors $P = 0.05-0.07$ es van considerar com una tendència (a), i els grups eren $n = 5-10$, segons el test ANOVA i el post-test Bonferroni.

Evolució dels diferents grups experimentals

Per observar els canvis poblacionals presents en processos crònics, els quals estarien associats al desenvolupament tumoral associat a colitis (als grups AD; **Figures 3.28 i 3.29**) i a la colitis (als grups D; **Figures 3.30 i 3.31**), es van contrastar les poblacions cel·lulars en funció del nombre de cicles de DSS que han rebut els animals.

Grups AD:

En la comparació entre els grups AD de 3 i 6 cicles de DSS (**Figures 3.28**), es va observar una disminució significativa de les poblacions de cèl·lules T totals, Th, Tc, Treg i NK, en relació als limfòcits totals (**Figura 3.28**). La reducció dels nivells de cèl·lules Tc pot ser en part responsable de la progressió de lesions displàsiques en aquesta fase. Tot i que la variació va ser estadísticament significativa, és arriscat extreure conclusions de la variació en la població de cèl·lules Treg, ja que aquesta és extremadament minoritària.

Grups D:

A la comparació de la variació de poblacions cel·lulars entre els grups D de 3, 6 i 9 cicles de DSS (**Figures 3.29**) es va observar una disminució significativa dels nivells de les poblacions de cèl·lules NKT i de cèl·lules productores d'IL-17, i un augment significatiu de les poblacions T totals, Th i Tc, en referència als limfòcits totals (**Figura 3. 29**).

Les poblacions dels grups AD

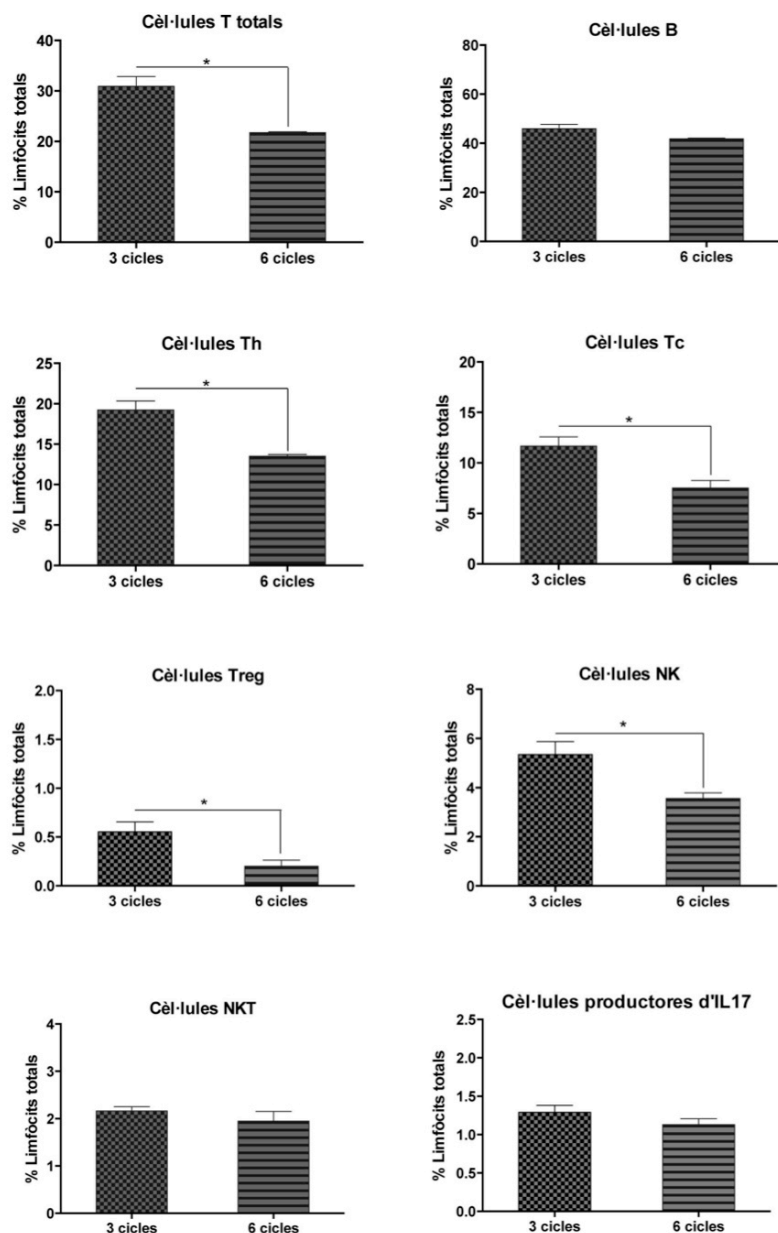


Figura 3.28. Evolució de les poblacions dels grups AD de 3 i 6 cicles de DSS. Poblacions de les cèl·lules T totals, B, Th, Tc, Treg, NK, NKT i productores d'IL-17 dels grups AD de 3 i 6 cicles de DSS. Es van considerar estadísticament significatius valors de $P < 0.05$ (*) i mentre que valors $P = 0.05 - 0.07$ es van considerar com una tendència (α), i els grups eren $n = 5 - 10$, segons el test ANOVA i el post-test Bonferroni.

Les poblacions dels grups D

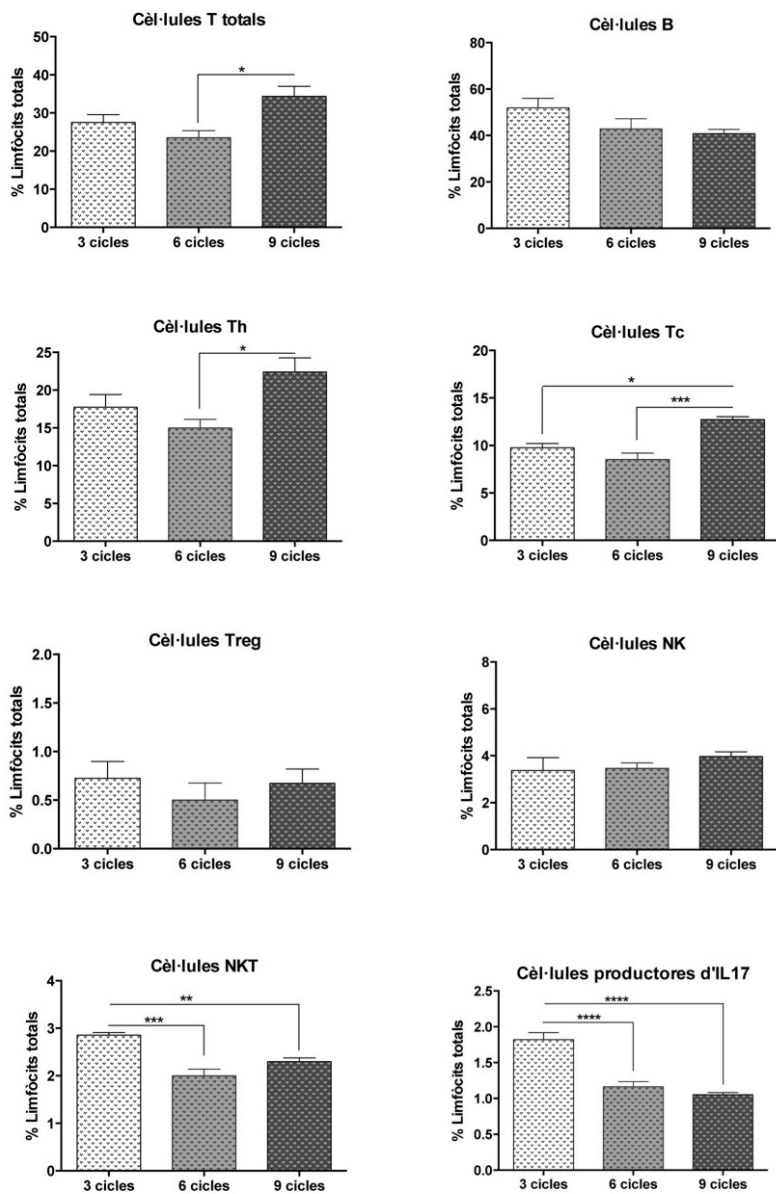


Figura 3.29. Evolució de les poblacions dels grups D de 3, 6 i 9 cicles de DSS. Evolució de les poblacions de les cèl·lules T totals, B, Th, Tc, Treg, NK, NKT i productores d'IL-17 dels grups D de 3, 6 i 9 cicles de DSS. Es van considerar estadísticament significatius valors de $P < 0.05$ (*) i mentre que valors $P = 0.05-0.07$ es van considerar com una tendència (α), i els grups eren $n = 5-10$, segons el test ANOVA i el post-test Bonferroni.

Va cridar l'atenció el fet que algunes poblacions cel·lulars presentessin tendències oposades en els grups AD i D en incrementar el nombre de cicles de DSS. Per fer inequívoc aquest fet vam realitzar una nova anàlisi: la comparació dels pendents de l'evolució d'aquestes poblacions als grups AD i D en funció del nombre de cicles de DSS (**Figura 3.30**). D'altra banda, les disminucions progressives de les poblacions de les cèl·lules NKT i cèl·lules productores d'IL-17 suggereixen una relació amb la inflamació crònica. L'anàlisi des pendents va permetre també una valoració d'aquest fet

Es van calcular els pendents de les rectes que representen l'evolució de cada població en funció del nombre de cicles, tan pels grups AD com D de cara a valorar si aquest paràmetre podia tenir interès per a monitoritzar colitis cròniques que puguin desenvolupar càncer colorectal associat a colitis.

A la **Figura 3.30** s'observa com les rectes de regressió corresponents a cada grup per a l'evolució de cada poblacions en funció dels cicles de DSS són de signe oposat en alguns casos (T totals, Th, Tc i NK), mentre que en d'altres es mantenen quasi paral·leles (B i NKT) o no s'arribaven a creuar (al menys en estudis d'aquesta extensió temporal) (Treg i productores d'IL17). Els casos més interessants van ser aquells en que les rectes dels grups D i dels grups AD es creuaven, ja que suggerien que la població cel·lular en qüestió podria servir com a paràmetre indicador d'un canvi des d'una situació inflamatòria cap a una situació de tumorigènesi.

I a la **Taula 3.27** es mostren les dades corresponents a les rectes de regressió de la **Figura 3.30** (pendent i R^2 ; el valor P indica si el pendent és diferent de 0). Això va permetre identificar en quines situacions l'existència d'un procés tumorigènic es correlacionava amb una evolució diferencial de cada població en concret en relació al que succeeix en un procés inflamatori no associat a tumorigènesi. Les poblacions cel·lulars més interessants van ser les cèl·lules les T totals, Th, Tc i NK perquè almenys un dels pendents no tendia a 0 o bé les línies de regressió segueixen pendents de signe o magnitud marcadament diferent. Així, per les cèl·lules NK el grup AD, a diferència del grup D, presentava un pendent diferent de 0, suggerint una associació de la progressió tumorigènica amb un descens d'aquesta població.

A les comparacions dels pendents de les rectes de regressió dels grups D amb les dels grups AD es va trobar indicis que apuntaven el possible interès de monitoritzar els nivells cel·lulars de les poblacions T totals, Th i Tc que presenten inversió dels pendents que podria estar relacionada amb una deriva del procés inflamatori cap a la formació de tumors. Aquests resultats donen suport a l'interès de fer un seguiment d'aquestes poblacions en pacients de colitis i valorar com es correlacionen amb els canvis endoscòpics (si van acompanyats o no d'aparició de displàsies o lesions més greus a la mucosa del còlon).

3. Estudis en el model murí AOM/DSS

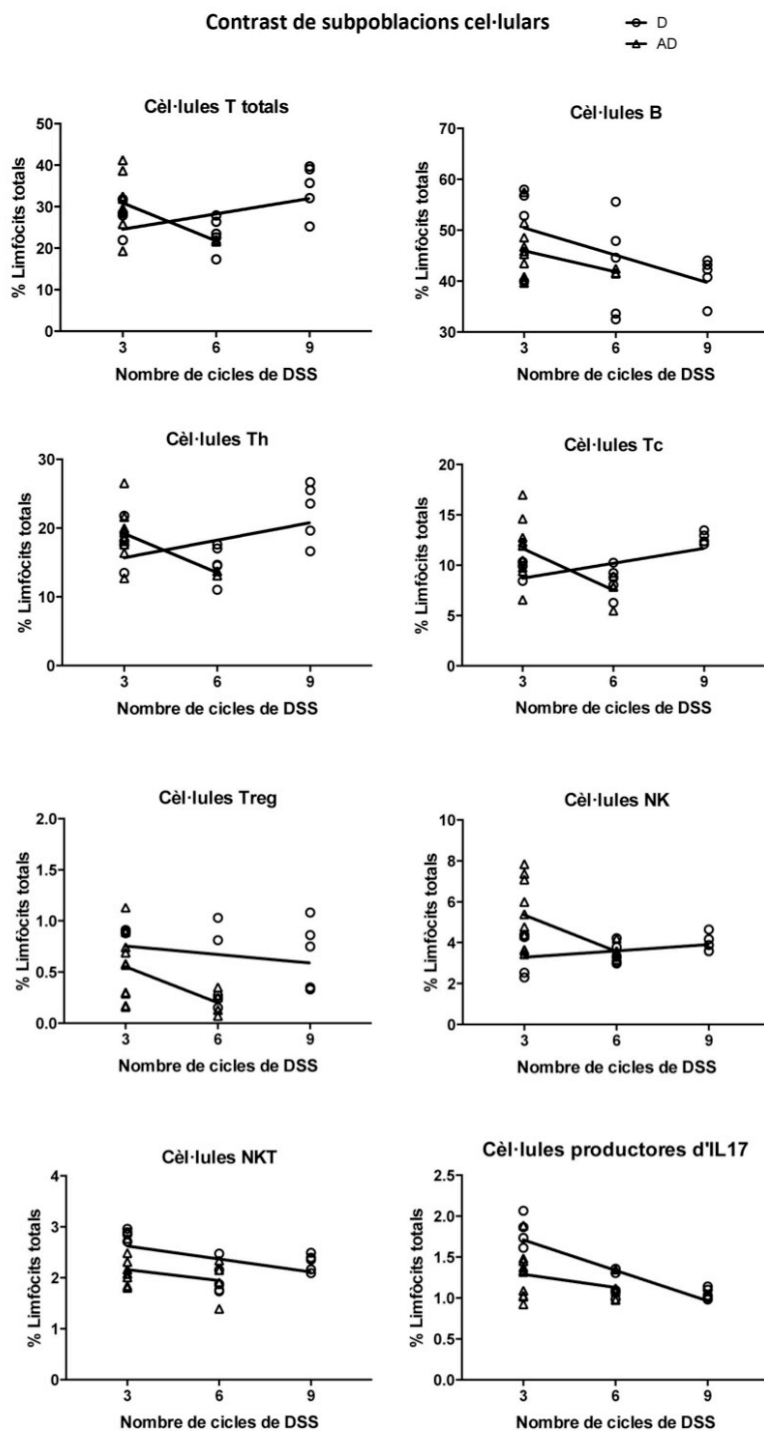


Figura 3.30. Evolució de sub poblacions cel·lulars. Evolucions de T total, B, Th, Tc, Treg, NK, NKT i cèl·lules productores d'IL17, en els grups D (O) i AD(Δ).

Taula 3.27. Dades corresponents a les rectes de regressió de la Figura 1.32. Estadísticament $P < 0.05$ va ser considerat significatiu i $P = 0.05-0.07$ tendència, i els grups eren $n = 5-10$. Les pendents es van considerar properes a 0 si eren < 0.15 i > -0.15 . Les poblacions interessants es mostren marcades.

Població	Paràmetres	Grups D	Grups AD
<u>T total</u>	Pendent	1.235	-3.048
	Pendent proper a 0?	No , > 0.15	No , < 0.15
	Pendent significativament diferent a 0? (valor P)	Tendència, $P = 0.0899$	Sí, $P = 0.0296$
B	Pendent	-1.790	-1.377
	Pendent proper a 0?	No, < 0.15	No, < 0.15
	Pendent significativament diferent a 0? (valor P)	Tendència, $P = 0.0560$	No, $P = 0.2358$
<u>Th</u>	Pendent	0.8483	-1.897
	Pendent proper a 0?	No , > 0.15	No , < 0.15
	Pendent significativament diferent a 0? (valor P)	No, $P = 0.0976$	Sí, $P = 0.0214$
<u>Tc</u>	Pendent	0.4939	-1.380
	Pendent proper a 0?	No , > 0.15	No , < 0.15
	Pendent significativament diferent a 0? (valor P)	Sí, $P = 0.0388$	Sí, $P = 0.0197$
Treg	Pendent	-0.0276	-0.1173
	Pendent proper a 0?	Sí	Sí
	Pendent significativament diferent a 0? (valor P)	No, $P = 0.5168$	Tendència, $P = 0.0597$
<u>NK</u>	Pendent	0.1031	-0.5934
	Pendent proper a 0?	Sí	No , < 0.15
	Pendent significativament diferent a 0? (valor P)	No , $P = 0.2054$	Tendència, $P = 0.0604$
NKT	Pendent	-0.08486	-0.07145
	Pendent proper a 0?	Sí	Sí
	Pendent significativament diferent a 0? (valor P)	Tendència, $P = 0.0596$	No, $P = 0.2873$
Productores d'IL-17	Pendent	-0.1242	-0.05345
	Pendent proper a 0?	Sí	Sí
	Pendent significativament diferent a 0? (valor P)	No, $P = 0.0001$	Sí, $P = 0.3196$

Immunolocalització al còlon

L'estudi fenotípic es va completar amb la localització de macròfags marcats amb anticossos anti-CD68 en teixit de còlon corresponent al lot AD (**Figura 3.31**; pàgina següent).

Es va observar que una part remarcable de l'infiltrat leucocitari associat a la inflamació corresponia a macròfags (**Figures 3.31 A-D**). Hi havia més presència de macròfags en zones amb baix grau de displàsia (**Figures 3.31F i 3.31G**), i disminuïa la presència en zones d'alt grau de displàsia (**Figures 3.31E i 3.31H**). Aquest resultat podria indicar una relació d'una disminució de l'activitat macrofàgica amb l'inici del desenvolupament de tumors en teixit inflamat.

Resum

Contrastant els grups experimentals va destacar:

- una disminució progressiva de la població de cèl·lules B, més pronunciada amb quan hi ha un procés tumorigènic associat a la inflamació;
- un augment de la població de cèl·lules NK al grup AD (3 cicles de DSS) que disminuïen a nivells no significatius posteriorment;
- en el grups D i AD les cèl·lules Th i Tc es mantien en uns nivells similars, però en el lot A aquestes poblacions estan alterades;
- les cèl·lules NKT i productores d'IL-17 evolucionen de forma similar en els lots experimentals en els quals hi ha un procés tumorigènic (A i AD) en comparació amb el lot D (situació purament inflamatòria).

Les disminucions progressives dels nivells cel·lulars de les poblacions de Treg, NKT, i cèl·lules productores d'IL-17 (també s'aprecia lleugerament a les cèl·lules B), poden estar relacionades amb la tumorigènesi associada a colitis, tot i que l'elevada variabilitat en aquestes poblacions tan minoritàries (cèl·lules Treg, NK, NKT i les productores d'IL-17) impedeix afirmar de forma concloent el seu valor per a monitoritzar l'evolució tumoral de processos inflamatoris crònics.

En els resultats van destacar les variacions de les poblacions de cèl·lules T totals, Th i Tc respecte als limfòcits totals. També es va apreciar que els canvis fenotípics característics de la tumorigènesi associada a inflamació ja es podrien començar a trobar entre els 6 i els 9 cicles de DSS.

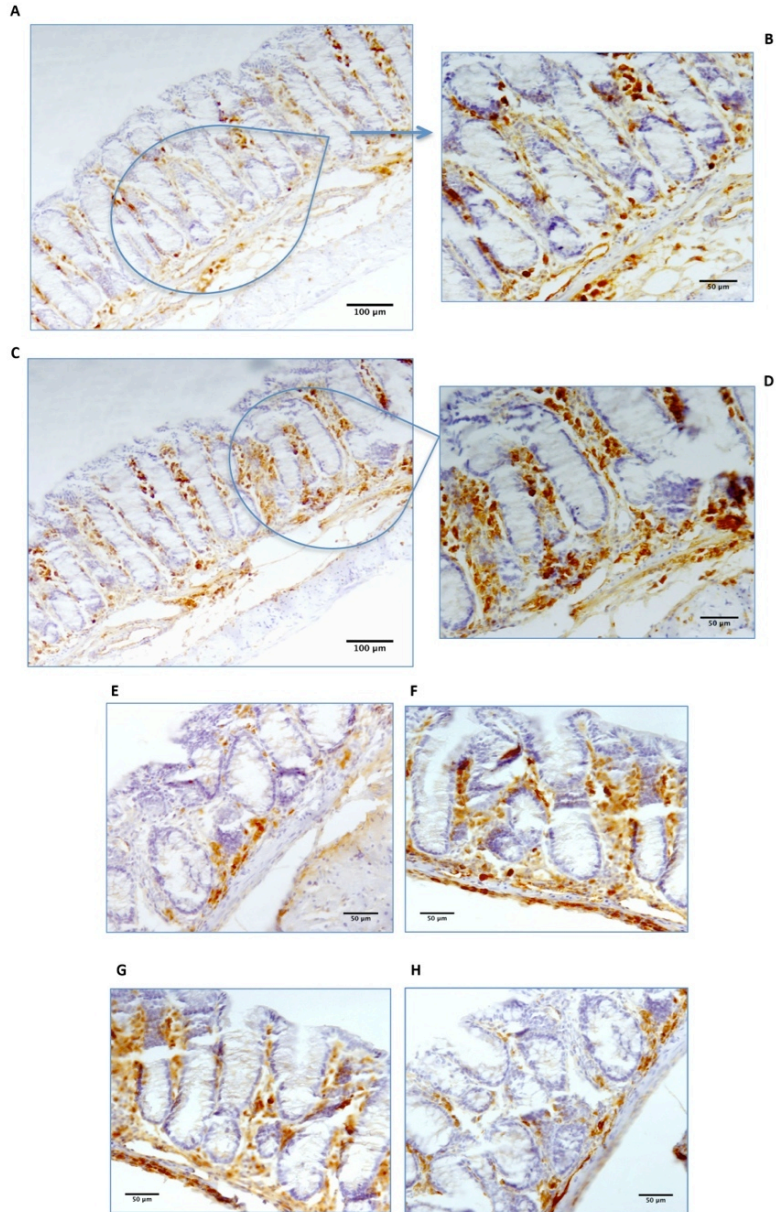


Figura 3.31. Localització de CD68. Tinció per IHQ de mostres de ratolins AD-3 amb anticòs anti-CD68.

