

**ANÀLISI D'ARN_m DEL MARCADOR
TUMORAL CRX EN CERVELLS DE
RATOLÍ AMB RETINOBLASTOMA
HUMÀ**

Pseudònim: Ivabim

RESUM

En aquest treball s'estudia la disseminació al SNC d'un tumor que s'origina en la retina en desenvolupament, el retinoblastoma. L'objectiu és caracteritzar la disseminació extraocular al SNC en 4 xenoempelts de RB efectuats en ratolins, a partir de l'expressió de CRX de les cèl·lules tumorals, en les quals s'hi expressa en excés. Quantificant l'expressió d'ARNm de CRX, es poden diferenciar cèl·lules sanes de cèl·lules tumorals. Les rectes de calibrat de les cèl·lules tumorals pures i les seves dilucions, que s'utilitzen per quantificar el tumor, proven que les tècniques usades són encertades. De 22 mostres de cervell analitzades, només 1 havia patit metàstasi al cervell. Aquest resultat indica que un retinoblastoma primari, cèl·lules recent extretes del pacient, sovint no es dissemina; a diferència dels resultats que s'obtenen si s'efectua l'estudi amb línies cel·lulars comercials.

ÍNDIX

1. Llistat d'abreviatures.....	4
2. Introducció, objectius i hipòtesis	6
3. Informació bàsica.....	8
3.1 Retinoblastoma: aspectes generals	8
3.1.1 Epidemiologia i clíniques del RB	8
3.1.2 Biologia del RB: mutacions i cèl·lula d'origen	12
3.1.3 Tractament del retinoblastoma: diagnòstic i teràpies actuals	17
3.2 Problemàtica del retinoblastoma	22
3.2.1 Disseminació extraocular	22
3.3 Diagnòstic molecular de la malaltia disseminada	25
3.3.1 Mètode del CRX (JAMA Ophtalmology 2015)	25
3.4 Programa d'investigació traslacional de retinoblastoma a l'HSJD	28
3.4.1 Cultius cel·lulars i models animals	28
4. Metodologia.....	29
4.1 Processament de mostres	29
4.1.1 Extracció de mostres	29
4.1.2 Extracció de RNA	31
4.2 PCR quantitativa.....	36
4.2.1 Transcripció inversa	36
4.2.2 Rt-qPCR	38
4.3 Processament de dades i anàlisi estadística.....	45
5. Resultats	47
5.1 Extracció de RNA.....	47
5.2 Dades de PCR i rectes de calibrat.....	51
5.3 Anàlisi de CRX en les mostres de cervell.....	64
6. Discussió dels resultats.....	70
7. Conclusions	76
8. Glossari.....	77
9. Fonts d'informació	80

LLISTAT D'ABREVIATURES

ADN: àcid desoxiribonucleòtid, àcid nucleic que conté la informació genètica dels éssers vius.

ARN: àcid ribonucleic, àcid nucleic amb funcions diverses. L'ARNm (àcid ribonucleic missatger) es sintetitza a partir d'una cadena motlle d'ADN (transcripció) i serveix de model químic per crear una proteïna (traducció).

CEV: carboplatin, etoposide i vincristine. Combinació de fàrmacs que s'utilitza en tractaments de quimioteràpia de retinoblastoma.

CNS: sistema nerviós central. Constituït per l'encèfal i la medul·la espinal, és un dels llocs de disseminació del retinoblastoma.

CRX: cone-rod homeobox. Gen que codifica una proteïna que és un factor de transcripció fotoreceptor específic que participa en la diferenciació de les cèl·lules fotoreceptores.

EBRT: Radioteràpia de feix extern. És un tipus de radioteràpia que dirigeix un feix de radiació des de fora del cos en els teixits cancerosos de dins el cos.

IAC: quimioteràpia intrarterial. Proporciona medicaments de quimioteràpia directament al tumor, i reduir al mínim l'exposició als teixits sans.

IVC: quimioteràpia intravenosa. La quimioteràpia va directament a una vena.

MD: disseminació mínima. Presència de cèl·lules tumorals circulants o difoses en compartiments mesenquimals del cos d'un pacient (ganglis limfàtics, sang o medul·la òssia.)

MRI: imatges per ressonància magnètica. Tècnica d'imatge mèdica utilitzada en radiologia per visualitzar l'anatomia i els processos fisiològics del cos.

MYCN: gen de la família dels factors de transcripció.

PCR: reacció en cadena de la polimerasa. Tècnica de biologia molecular utilitzada per obtenir un gran nombre de còpies d'un fragment d'ADN específic a partir d'una quantitat mínima.

ANÀLISI D'ARN_m DEL MARCADOR TUMORAL CRX
EN CERVELLS DE RATOLÍ AMB RETINOBLASTOMA HUMÀ

RB: retinoblastoma.

T / VS: en l'etiquetatge de les mostres: "T" significa que la mostra prové de les cèl·lules del tumor del pacient; i "VS", de l'anglès vitreous seeds, significa que la mostra prové de les llavors de tumor escampades per l'humor vitri.

INTRODUCCIÓ, OBJECTIUS I HIPÒTESIS

El retinoblastoma és un càncer que s'origina a la retina en desenvolupament i que afecta aproximadament 1 de cada 17.000 nens. És el tumor ocular més freqüent. Es forma quan els dos al·lels de retinoblastoma (*RBI*) han patit una mutació en una cèl·lula retinal susceptible, probablement un precursor fotoreceptor de con. La pèrdua de les funcions supressores de tumor de la proteïna de retinoblastoma (pRB) comporta la divisió cel·lular incontrolada i canvis genòmics durant la progressió del tumor.

Tot i ser dels càncers amb una supervivència força alta, la mortalitat relacionada amb aquest encara no s'ha eradicat. Una de les causes és la disseminació extraocular, ja que un cop el tumor està deslocalitzat, les probabilitats de cura són baixes. La disseminació extraocular microscòpica, la més comuna i l'estudi de la qual és més aplicable als països desenvolupats, és molt complicada de detectar. Per poder avaluar l'eficàcia dels tractaments en la malaltia disseminada, es necessita una tècnica que permeti obtenir resultats quantitius de la presència de cèl·lules de retinoblastoma d'entre cèl·lules sanes.

Com la majoria de malalties, no es desenvolupa igual en tots els pacients i conseqüentment comporta l'existència de diferents models tumorals. En un estudi de la disseminació extraocular del retinoblastoma és necessari l'ús d'un model força agressiu per obtenir resultats representatius. A més, per a què representi millor la malaltia i sigui més aplicable en pacients, s'hauria de fer l'estudi amb un tumor primari, que mantingui les propietats inicials del càncer.

Si es quantifica l'expressió d'una proteïna específica del retinoblastoma, com podria ser el CRX, seria possible detectar i quantificar la presència de tumor. Efectuant una qPCR a diferents mostres de cervell de ratolí, es podrà caracteritzar la disseminació extraocular al sistema nerviós central detectant com a mínim una cèl·lula tumoral d'entre 100 cèl·lules sanes.

Amb la comparació de la metàstasi produïda al cervell en diferents xenoempelts en ratolí de retinoblastoma, es podrà determinar la tendència a la disseminació extraocular dels models de tumor primari i definir l'agressivitat de cada un.

Per a assolir-ho, s'exposen els següents objectius:

ANÀLISI D'ARN_m DEL MARCADOR TUMORAL CRX
EN CERVELLS DE RATOLÍ AMB RETINOBLASTOMA HUMÀ

1. Demostrar que la tècnica emprada per a l'extracció de RNA és encertada i que permet determinar que les mostres de cervell tenen suficient RNA per ser analitzables i són pures, és a dir, que l'RNA no està contaminat.
2. Comprovar que utilitzant cervells de ratolí es pot detectar cèl·lules humanes, les cèl·lules de retinoblastoma humà implantades. Obtenir una recta patró perfecte de les cèl·lules tumorals i les seves dilucions per a 4 xenoempelts diferents, demostrant així que la tècnica de la qPCR és adequada per detectar el retinoblastoma mitjançant l'anàlisi de CRX.
3. Amb els objectius 1 i 2, analitzar 22 mostres de cervell de ratolí procedents dels 4 xenoempelts estudiats i detectar-ne la disseminació extraocular al sistema nerviós central comparant-les amb les corresponents rectes patró.

A més d'aquests propòsits, aquest estudi també té la finalitat de definir una metodologia adequada que permeti avaluar els tractaments que puguin evitar o disminuir la disseminació de la malaltia i determinar quin model comporta un fenotip més agressiu i, per tant, sigui idoni per a estudis de la disseminació extraocular del retinoblastoma al sistema nerviós central.

INFORMACIÓ BÀSICA

RETINOBLASTOMA: ASPECTES GENERALS

EPIDIMIOLOGIA I CLÍNQUES DEL RETINOBLASTOMA

El retinoblastoma és un tumor relativament poc freqüent en la infància; s'origina en la retina en desenvolupament i representa al voltant d'un 3% dels càncers en nens menors de 15 anys. Afecta nens molt petits: un 66,67% dels casos es diagnostiquen abans dels 2 anys i un 95% abans dels 5 anys d'edat. No hi ha cap prova vàlida que indiqui diferent incidència del retinoblastoma per la variació geogràfica o racial; de tots els nens afectats, un 11% és dels països més rics, un 69% de països d'ingressos mitjans i un 20% d'ingressos baixos. No obstant, la majoria de centres de tractament de retinoblastoma es troben en països d'alts i mitjans ingressos. Aquesta desigualtat provoca que el retinoblastoma en països més pobres està associat amb una baixa supervivència del pacient (un 30%), en comparació amb els països rics que la supervivència és >95%. Aquests mals resultats es deuen bàsicament a un diagnòstic tardà i a la dificultat en l'accés de cures específiques en retinoblastoma. Sense un diagnòstic a temps i un tractament adequat, és molt possible el desenvolupament d'una metàstasi complicada de curar.

Hi ha hagut diverses iniciatives per fer front a les desigualtats en el tractament del retinoblastoma en països desenvolupats i subdesenvolupats. L'any 2009, la Societat Oftalmològica Canadenca va publicar una guia de pràctiques clíniques del retinoblastoma que més tard també va ser adaptada per Kènia. A part, cada cop hi ha més països que abandonen la seva posició en contra de l'enucleació i es fomenta la comunicació entre famílies per abolir possibles pors i fer arribar la informació necessària a tothom. També, s'han elaborat programes d'agermanament per a l'intercanvi de coneixement i perícia i aconseguir una atenció òptima a la salut. Aquests programes es financen gràcies a organitzacions tan governamentals com no governamentals. A més, les estratègies online també faciliten la col·laboració global. Una iniciativa força exitosa (entre d'altres) va ser la de "One Retinoblastoma World", on hi ha un mapa dels centres de tractament de retinoblastoma de tot el món i permet a les famílies adreçar-se al que tinguin més a prop. La informació de les opcions de cura està a l'abast de tothom i acabarà permetent un sistema de salut global d'aprenentatge.

Un dels principals obstacles per a la recerca global és que la base de proves per la gestió clínica és feble. No hi ha suficients assajos clínics rigorosos en retinoblastoma per múltiples raons: el nombre de pacients en països amb la capacitat de dur a terme aquests assajos clínics és molt baix, sovint és molt complex ja que els dos ulls poden tenir diferents graus de gravetat malaltia, hi ha massa pocs pacients per ser una malaltia d'interès per a les indústries farmacèutiques i s'enfronta a una problemàtica social ja que moltes religions i cultures valoren els ulls de tal manera que imposen consideracions més enllà de guarir el càncer.

El retinoblastoma es pot presentar en forma hereditària i no hereditària. La malaltia hereditària representa d'un 25 a un 30% dels casos i es defineix per la presència d'una mutació en línia germinal del gen RB1. Aquesta mutació pot ser heretada d'un progenitor que ja n'estigués afectat (25% dels casos) o pot ser una mutació germinal a l'úter en el moment de la concepció en pacients amb malaltia esporàdica (75% dels casos). El retinoblastoma hereditari es pot manifestar com una malaltia unilateral o bilateral. Un 100% dels nens amb bilateralitat del retinoblastoma i aproximadament un 15% dels pacients amb malaltia unilateral tenen la forma hereditària, tot i que només un 25% dels pares estan afectats. Els tumors hereditaris solen ser diagnosticats a una edat més primerenca, normalment en els primers 12 mesos. Un retinoblastoma unilateral en nens més petits d'un any té forces probabilitats de ser hereditari, en canvi, nens més grans amb tumor unilateral segurament patiran la forma no hereditària de la malaltia.

Als Estats Units, un 11% dels càncers de nens menors d'1 any és retinoblastoma, se'n diagnostiquen uns 300 cada any i en moren menys de 5 a causa de la disseminació extraocular. Per tant, es considera dels càncers més curables i conseqüentment l'objectiu principal de la recerca en retinoblastoma no n'és només la supervivència del pacient; sinó evitar la pèrdua d'un ull o la ceguesa completa, és a dir, aconseguir que un pacient de retinoblastoma disposi d'una qualitat bona de vida.

Tot i així, encara pot ser causa de mort. Pel que fa als països desenvolupats, enlloc de ser per la disseminació del tumor primari, com a la majoria de malalties pediàtriques, és sobretot per l'aparició de tumors posteriors. En canvi als països subdesenvolupats, on s'estima que hi ha un 80% dels 8000 casos de retinoblastoma mundials en un any, en moren uns 3000 per culpa de la disseminació extraocular. Quan

el retinoblastoma ha patit metàstasi rarament és curable, encara que es sotmetés el pacient en tractaments intensius, igual que en la majoria de càncers.

Una de les causes més determinants de la disseminació de la malaltia, és l'interval de temps des de l'inici dels primers símptomes fins al diagnòstic. La detecció de les mutacions del retinoblastoma és factible en els casos familiars d'aquest, però no està disponible als països subdesenvolupats. Els càncers infantils són menys susceptibles a un diagnòstic precoç que els d'adults, tot i que les característiques úniques del retinoblastoma n'afavoreixen el diagnòstic. Els nens que presenten leucocòria (FIG. 1) normalment no poden conservar l'ull però sí s'asseguren la supervivència amb l'enucleació. No es coneix encara el temps que transcorre entre que un nen presenta leucocòria i retinoblastoma intraocular fins que desenvolupa la disseminació extraocular. S'han realitzat moltes companyes amb la finalitat de conscienciar a les famílies de les anormalitats en un ull i no subestimar-les, afavorint així la preocupació i un diagnòstic a temps, ja que molts pares no són conscients del que pot representar la leucocòria i molts metges desconeixen el retinoblastoma. Diferents estudis arriben a la conclusió que la clau per eradicar el retinoblastoma extraocular està relacionada amb la possibilitat d'un sistema de salut amb accés igualitari.



FIG. 1. Nen amb retinoblastoma que presenta leucocòria.

Font: *Pediatric Oncology Group*
<http://blogs.sun.ac.za/pog/2011/01/26/60/>

A més del problema del diagnòstic tardà, també és frustrant que pràcticament el 50% de les famílies afectades deixen el tractament un cop fet el diagnòstic. La supervivència dels pacients amb un compliment deficient del tractament recomanat com l'enucleació o la manera de seguiment dels tractaments conservatius quan hi ha la possibilitat de reactivació del tumor, és tan baixa com els que tenen la malaltia extraocular des de bon principi. Aquest abandonament del seguiment sol ser més propi dels països subdesenvolupats (on hi ha més varietat de religions i cultures) que no pas dels desenvolupats, en què la majoria de famílies solen complir amb el tractament recomanat. A més, el nivell econòmic de les famílies també pot ser un dels factors de la

limitada adherència al tractament, ja que un bon tractament comporta moltes vegades el trasllat de la família i la sovint aparició de problemes econòmics i psicològics.

Tot i així, com ja s'ha dit abans, la causa majoritària de mort del retinoblastoma és l'aparició de càncers posteriors. Els pacients amb risc de càncer secundari a conseqüència de mutacions al gen RB1 requereixen un seguiment per a tota la vida. Dues de les principals causes de mortalitat són l'anomenat retinoblastoma trilateral i les neoplàsies.

El retinoblastoma trilateral és un síndrome que es presenta en un 5 a 15% dels pacients amb la forma hereditària del retinoblastoma, i es tracta de la formació d'un tumor neuroblàstic en la línia central intracraneal i es sol presentar entre els 20 i 36 mesos de vida. Es pot detectar fàcilment en la majoria dels casos gràcies a exàmens rutinaris que es recomanen per aquells que presenten malaltia hereditària o malaltia unilateral amb antecedents positius. Tot i així, no és clar si un diagnòstic precoç pot afectar la supervivència de l'individu.

Els supervivents de retinoblastoma es troben en alt risc de presentar una neoplàsia subseqüent. Els factors de risc que influeixen és si es tracta de retinoblastoma hereditari, de tractament previ del retinoblastoma amb radioteràpia, de l'edat en el moment de la radioteràpia i de l'existència de neoplàsies subseqüents prèvies.

BIOLOGIA DEL RETINOBLASTOMA: MUTACIONS I CÈL·LULA D'ORIGEN

El retinoblastoma sorgeix a la retina i sol créixer per sota d'ella i cap a l'humor vitri. Frequentment s'envaeix també la coroides, tot i que una invasió massiva només es produeix en malaltia avançada. Després de la coroides, el tumor té accés a la circulació sistemàtica i crea la possibilitat de metàstasi. La progressió a través de les membranes oculars condueix a la invasió de l'escleròtica i l'òrbita. L'avanç a través del nervi òptic augmenta el risc de la disseminació al sistema nerviós central. En la cara anterior, el tumor que envaeix la cambra anterior pot accedir a la circulació sistemàtica a través del canal de Schlemm.

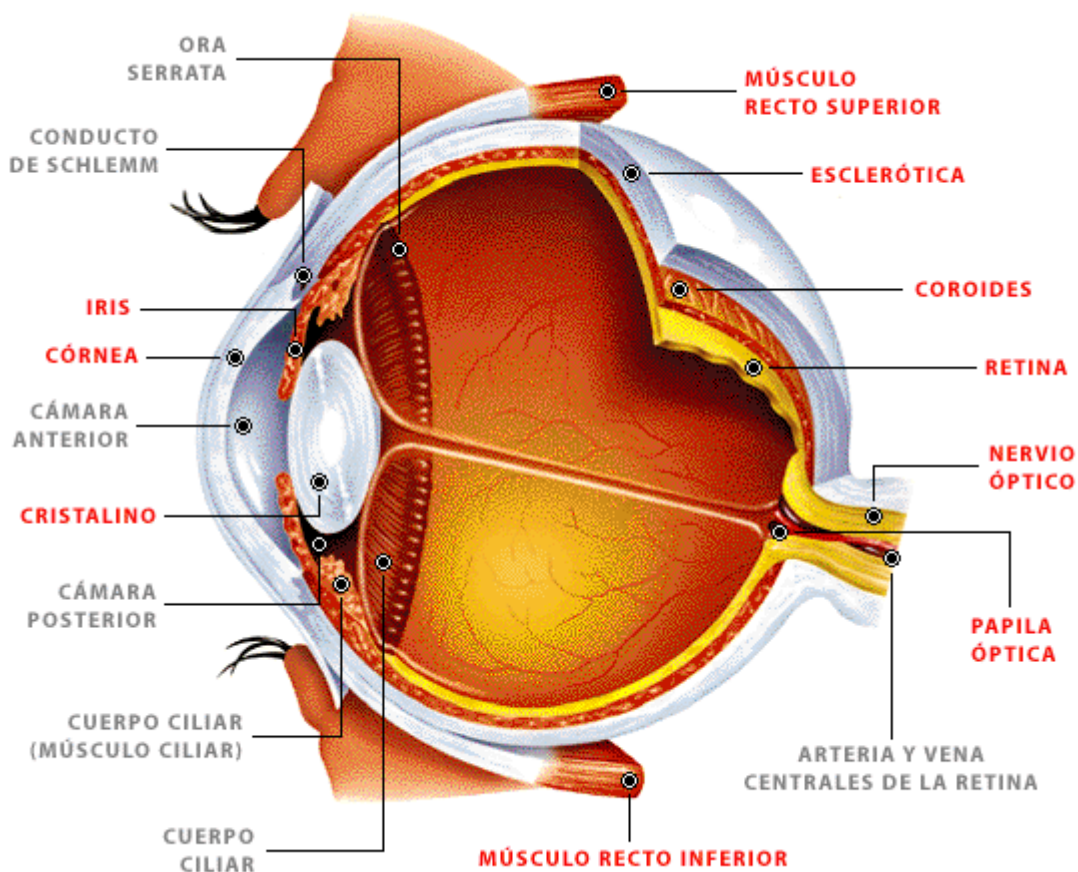


FIG. 2. Parts de l'ull

Font: <http://blocs.xtec.cat/tdrroser/>

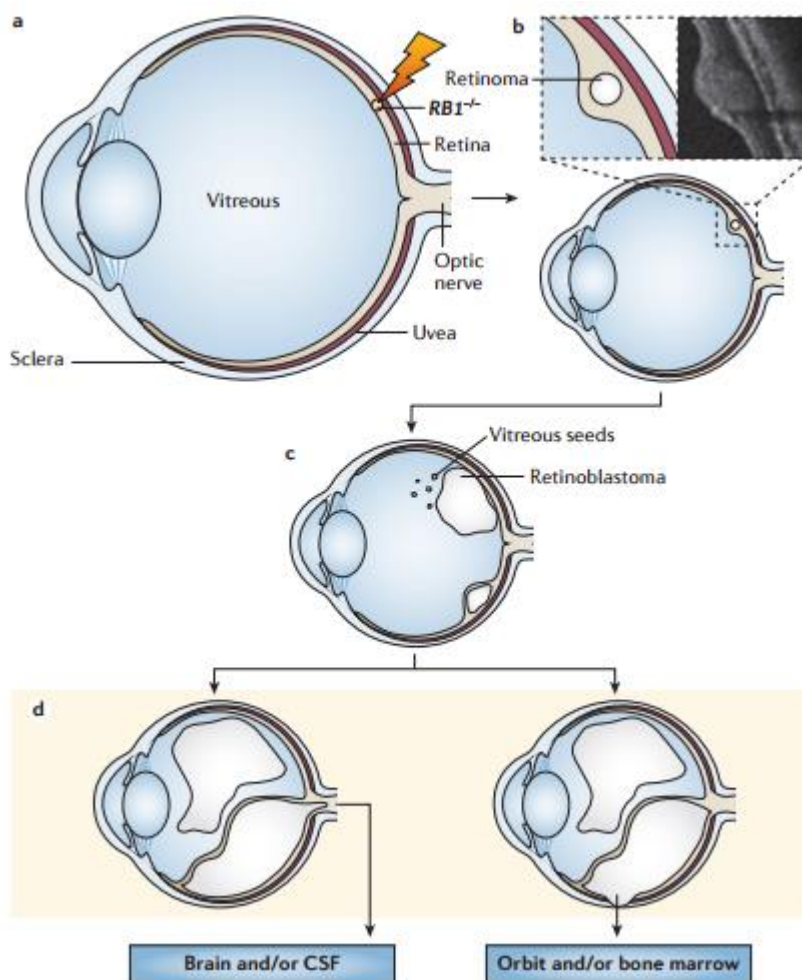


FIG. 3. Progressió del retinoblastoma

Font: Primer Retinoblastoma. B.L.G Department of Ophthalmology and Vision Sciences, The Hospital for Sick Children and University of Toronto.

El retinoblastoma normalment s'inicia per la mutació bial·lèlica del gen de retinoblastoma (*RB1*) en una sola cèl·lula retinal susceptible en desenvolupament. L'herència d'un al·lel mutant *RB1* predisposa fortament als individus a desenvolupar tumors de retinoblastoma que es formen després que el segon al·lel *RB1* sigui mutat. els principis descoberts estudiant el retinoblastoma porten al reconeixement que la inactivació dels gens supressors de tumors generalment contribueixen a la tumorigènesi humana. El retinoblastoma es desenvolupa després que una cèl·lula retinal *RB1*^{-/-} es sotmeti a la proliferació limitada i formi un retinoma no maligne (FIG. 3). Un tumor intraretinal es desenvolupa després de canvis genètics o epigenètics que condueixen a

una proliferació incontrolada. Generalment, es detecta per primera vegada quan el tumor blanc és visible a través de la pupil·la o bloqueja la visió.

El retinoblastoma de forma hereditària és causa d'una primera mutació germinal (M1) i una mutació somàtica adquirida (M2); en canvi, el retinoblastoma no hereditari sorgeix quan dues mutacions somàtiques són presents al mateix gen supressor de transformació en una cèl·lula susceptible.

RBI és un gen força llarg amb 27 exons, que codifica un RNA que posteriorment es tradueix en una proteïna de 928 aminoàcids, anomenada pRB. Hi ha moltes modificacions que alteren la funció de la pRB, com mutacions puntuals o delecions. La pRB és coneguda com un regulador del cicle cel·lular que s'uneix a factors de transcripció E2F per reprimir gens relacionats amb la proliferació cel·lular. La fosforilació de la pRB sol promoure la transició de la fase G₁ a la fase S. Es podria dir que la pRB es necessita per suprimir els factors de transcripció E2F i que la pèrdua d'aquesta funció és la principal causa del retinoblastoma.

La inactivació bial·lèlica de *RBI* és necessària per iniciar la majoria dels retinoblastomes, però no és suficient, ja que la lesió retinal benigne implica igualment la pèrdua dels dos al·lels *RBI*. Per a la transformació maligne, probablement es necessiten canvis genètics o epigenètics addicionals (FIG. 4). Tot i així, en alguns tumors no s'hi ha detectat alteracions, i aleshores l'adquisició d'aquests canvis es produirà durant la progressió tumoral.

Molts altres gens i microRNAs també mostraven una expressió alterada en les cèl·lules retinoblastoma comparat amb les cèl·lules retinals normals. Estudiant els resultats de diferents anàlisis, sembla que els retinoblastomes *RBI* progressin des de retinomes autolimitats a retinoblastomes diferenciats i després a malignitats menys diferenciades.

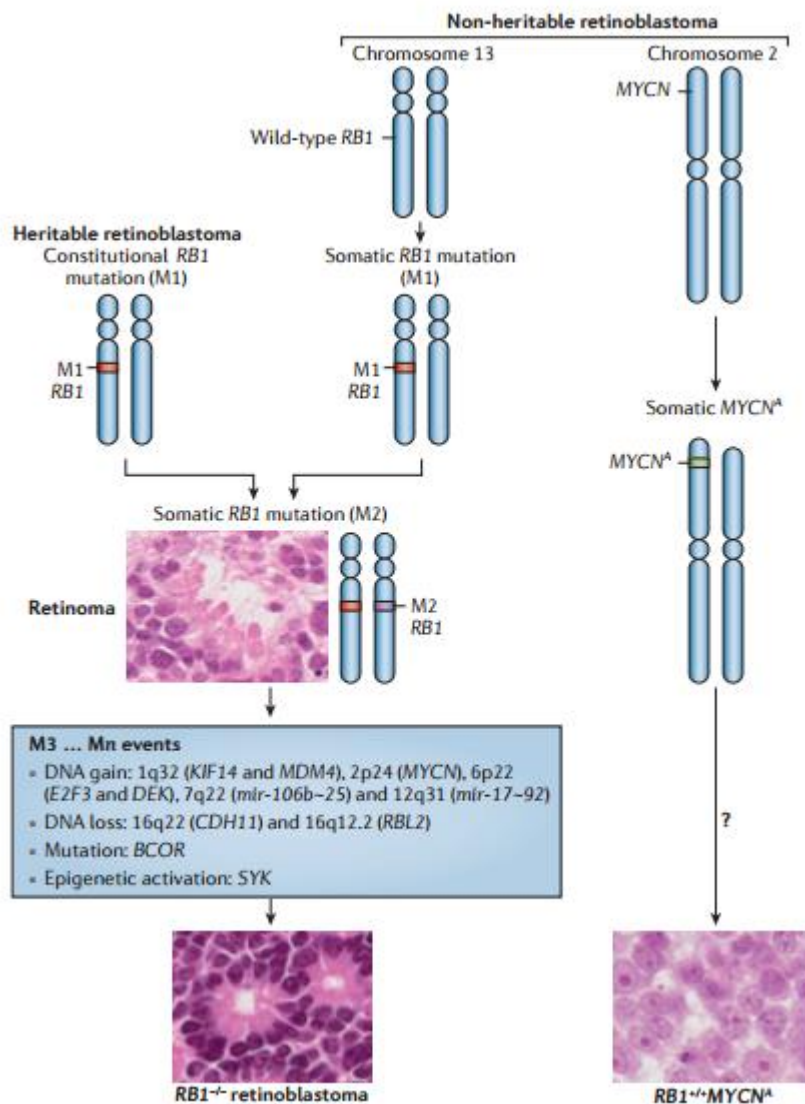


FIG. 4. Orígens genètics del retinoblastoma.

Font: Primer Retinoblastoma. B.L.G Department of Ophthalmology and Vision Sciences, The Hospital for Sick Children and University of Toronto.

Tot i que els dos al·lels de *RB1* pateixen mutacions en gairebé tots els retinoblastomes, alguns tumors unilaterals no mostraven aquestes mutacions però tenien un alt nivell d'amplificació de l'oncogen *MYCN*. Aquests tumors són sempre unilaterals, es diagnostiquen en nens més petits que els del retinoblastoma unilateral *RB1*^{-/-} i tenen una morfologia diferent, reflectint un subtipus únic. Encara que mostren una expressió aberrant de molts gens involucrats en la diferenciació de fotoreceptors, mitosis i biogènesi de RNA (com els *RB1*^{-/-}), aquests altres tumors solen tenir valors atípics de nivells d'expressió de molts altres gens, ja que són originats d'un precursor retinal previ a diferència dels tumors *RB1*^{-/-}. Hi ha un 1.5% de retinoblastomes

unilaterals no familiars que encara no s'expliquen i aparentment tenen els gens normals tan de *RBI* com de *MYCN*.

Donat que la proteïna pRB s'expressa en la majoria o totes les cèl·lules, la sensibilitat única de la retina a la pèrdua de la pRB ha estat desconcertant. Tot i que la clau a aquesta sensibilitat ve de les característiques de la cèl·lula d'origen, la identitat d'aquesta cèl·lula ha estat difícil de trobar. L'expressió de diversos marcadors cel·lulars suggereixen diferents possibilitats: una cèl·lula d'origen pluripotent, la expressió aberrant de marcadors de gens per la transformació oncogènica, o la presència de cèl·lules retinals *RBI*^{+/+} normals amb grans tumors al con. Els models en ratolins no han pogut clarificar tampoc la cèl·lula d'origen, ja que han requerit mutacions addicionals i els tumors resultants expressen una varietat diferent de marcadors retinals, de manera que es podria donar el cas que els resultats no es poguessin aplicar en humans.

Una pista sobre la cèl·lula d'origen va venir amb la trobada que la distribució topogràfica dels retinoblastomes emergents imita la ratxa visual horitzontal característica dels cons verds i vermells, que proporciona la prova que els tumors podrien derivar d'una cèl·lula del llinatge del con fotoreceptor. Els retinoblastomes *RBI*^{-/-} expressen els marcadors del con fotoreceptor però no altres proteïnes específiques de les cèl·lules retinals. A més, els precursors del con tenen una inusual alta expressió de *RBI* i d'oncoproteïnes que podrien col·laborar amb la pèrdua de la pRB per permetre la proliferació del con precursor. Recentment, s'ha demostrat que l'esgotament experimental de *RBI* indueix la proliferació cel·lular dels precursors de con humans *in vitro* i que l'esgotament de pRB forma tumors típics dels retinoblastomes diferenciats en els xenoempelts ortotòpics. La pRB podria comptar amb un programa oncogènic associat amb la maduració dels precursors del con.

Els tumors més petits detectats es situaven a la capa nuclear interna de la retina, no a l'externa on es troben els cons. Possiblement, la cèl·lula precursora dels con que perd la pRB es localitza per equivocació a la capa nuclear interna. No obstant, els retinoblastomes observats més petits també s'estenen cap a la capa nuclear externa, fent difícil identificar la capa retinal on els tumors es formen inicialment. Podria ser que els vasos sanguinis i els astròcits de retina que normalment són presents a la capa interior promoguessin el creixement cel·lular del retinoblastoma a la capa nuclear interna.

TRACTAMENT DEL RETINOBLASTOMA: DIAGNÒSTIC I TERÀPIES ACTUALS

El diagnòstic del retinoblastoma sol ser clar ja que presenta signes concrets com la leucocòria o l'estrabisme. Quan la malaltia està més avançada, canvia el color de l'iris, s'amplien la còrnia i l'ull per l'augment de la pressió, o s'inflama l'òrbita sense estar infectada. En una etapa molt tardana, l'ull podria fins i tot sobresortir fora de l'òrbita.

No es basa en l'examinació histopatològica perquè la biòpsia comporta el risc de metàstasi. Normalment, per un especialista de l'ull n'hi ha suficient amb una oftalmoscopia indirecta amb la pupila dilatada. La calcificació, una característica del retinoblastoma, es detecta per ultrasonografia ocular; i el MRI s'utilitza per avaluar la invasió al nervi òptic i la presència del retinoblastoma trilateral. S'eviten les tomografies computeritzades perquè poden induir càncers secundaris a les persones que tenen mutacions a *RBI*. Per a distingir la diagnosi diferencial i classificar la gravetat de la malaltia intraocular, es necessita un examen de la retina sota anestèsia.

Molts pacients amb retinoblastoma són els primers de ser diagnosticats de la seva família; només un 6% dels pacients examinats per mutacions *RBI* tenia un familiar que havia estat prèviament diagnosticat amb retinoblastoma. No obstant, un estudi a Anglaterra suggereix que un 35% dels pacients afectats bilateralment tenen un historial familiar. Altres tres estudis basats en la població, indicaven que aproximadament un 45% de la gent amb retinoblastoma porten la mutació *RBI* a les seves cèl·lules constitucionals. Els restants amb retinoblastoma unilateral, un 98% tenen la pèrdua bial·lelica somàtica de *RBI* i un 2% tenen els gens *RBI* normals al tumor però una amplificació somàtica de l'oncogen *MYCN*. Sense un test genètic, tots els nens amb risc s'haurien de sotmetre a múltiples exàmens sota anestèsia en els primers tres anys de vida per detectar tumors petits i fàcils de tractar. Els millors resultats en la gestió del retinoblastoma familiar depenen de l'efectivitat de l'equip d'atenció mèdica en identificar i aconsellar les famílies afectades.

Per a detectar el retinoblastoma tan aviat com sigui possible, s'ha desenvolupat una exploració de la vista i de l'ull. Tot i així, si dona negatiu no significa que el pacient roman lliure de tumor, ja que podria ser que n'aparegués un més tard o que estigués a la perifèria i no fos visible. Sovint un diagnòstic tardà és per la poca importància que es

dóna als símptomes de retinoblastoma i a la manca de consciència d'alguns metges que no es prenen seriosament algunes queixes parentals, com la detecció de fotoleucocòria.

Els individus amb la mutació germinal *RBI* que han estat tractats amb radioteràpia tenen un elevat risc de desenvolupar càncers secundaris específics, com leiomiiosarcoma, osteosarcoma, melanoma, càncer de pulmó i càncer de bufeta. Es necessita una vigilància per aquests càncers. El primer estudi en avaluar anualment el cos sencer dels individus amb predisposició a la mutació *RBI* va mostrar que era factible detectar càncers secundaris, tot i que no tenia un 100% de precisió. Una forma de minimitzar el risc és evitant radiacions innecessàries o carcinògens (tabac, alcohol excessiu, etc.) i informar de lesions inexplicables.

La gestió del retinoblastoma depèn de l'extensió de la malaltia en el diagnòstic, l'estat de l'ull oposar, la salut general del nen, les circumstàncies socioeconòmiques i l'accés a una cura experta.

Retinoblastoma intraocular:

- Tractament primari: la tria del tractament primari es basa en la probabilitat de cura, la preservació de l'ull i la darrera visió i l'estat de l'altre ull. Cal també sospesar les complicacions a curt i llarg termini del tractament. Es solen practicar l'enucleació, IVC amb teràpia focal, quimioteràpia intra-arterial amb teràpia focal i teràpia focal sola. L'EBRT no es recomana ja que comporta un elevat risc de desenvolupar càncers secundaris amb pacients amb la mutació *RBI*. Variables clíniques fortament associades amb característiques d'alt risc inclouen edat avançada, força temps des del diagnòstic fins l'enucleació, tumor anterior o sang, invasió de l'escleròtica, invasió del nervi òptic i la cel·lulitis orbital. Els intents per curar un ull amb aquestes característiques indicant alt risc d'extensió extraocular imposa el perill d'una malaltia no diagnosticada amb risc de metàstasi. No obstant, quan hi ha una falta de perícia, equipament o recursos, la millor opció de cura pel retinoblastoma bilateral és l'enucleació bilateral.
- Teràpies secundàries: significa iniciar un nou pla de gestió, en un segon intent per salvar un ull que ha fracassat en el primer intent. Hi ha varies possibilitats però les probabilitats d'èxit són baixes. Intents prolongats per salvar un ull impliquen elevats riscos pel nen, incloent la metàstasi o mort. Els criteris per l'enucleació secundària no estan ben definits però es dominen per la refractària de la retina i per

les sembres vítries, les hemorràgies vítries i els glaucomes neovasculars secundaris, com també pels factors socioeconòmics i la fatiga psicològica de salvar un all amb una visió pobre. Una combinació de IAC i quimioteràpia intravítrea són una bona opció per la salvació dels ulls quan l'IVC la radiació o l'IAC han fallat. Tot i així, en general els tractaments extensius durant un llarg període per salvar un ull augmenten l'estrès familiar, disminueixen els recursos familiars i provoquen risc de metastasi i mort. La principal causa de fallida per salvar un ull és la sembra vítria. La biodisponibilitat més elevada del fàrmac en la vítria s'aconsegueix amb quimioteràpia intravítrea.

Teràpies oculars

- **Enucleació:** és la teràpia de primera línia per la majoria d'ulls amb retinoblastoma globalment; és el tractament més ràpid i econòmic. Els ulls que tinguin risc de disseminació extraocular requereixen enucleació, i es pot confirmar només identificant característiques d'alt risc patològic a l'ull enucleat. S'aconsegueixen força bons resultats en cosmètica, reemplaçant el volum de l'ull amb un implant profund a l'òrbita i un ull prostètic. Hi ha opcions assequibles arreu del món. La provisió d'un ull prostètic al moment de l'enucleació té un efecte psicològic positiu en les famílies i les ajuda a acceptar l'enucleació.
- **IVC i teràpia focal:** Des del 1996 ha estat una teràpia de primera línia per ulls amb la malaltia no extremadament avançada l'IVC amb diferents combinacions, dosis, horaris i duracions del carboplatin, l'etoposide i el vincristine (CEV) seguits per teràpia focal per consolidar les respostes de la quimioteràpia. En molts casos es pot evitar l'EBRT i l'enucleació. L'IVC té una toxicitat aguda en el retinoblastoma que també es troba en altres càncers pediàtrics. El tractament únic amb IVC rarament eradica del tot el retinoblastoma. La teràpia focal amb repetides examinacions sota anestèsia és molt important. La localització del tumor és el vaticinador més important de l'agudesa visual final. No hi ha toxicitat local documentada de l'IVC a l'ull.
- **IAC:** aconsegueix un lliurement més selectiu per l'ull. Els radiòlegs intervencionistes passen un microcatèter a través de l'artèria femoral fins a l'orifici de l'artèria oftàlmica de l'ull amb retinoblastoma, i la quimioteràpia es proporciona durant 30 minuts. Diferents estudis suggereixen que l'IAC és un enfocament raonable com a teràpia primària pel salvament de l'ull, i també com a teràpia

secundària. Algunes complicacions oculars de l'IAC inclouen hemorràgia vítria, l'obstrucció de l'artèria retinal, espasmes arterials amb reperfusió, obstrucció de l'artèria oftàlmica, entre d'altres.

- Teràpia focal: teràpia làser i crioteràpia és l'aplicació local de teràpia en l'ull, sota visualització directe a través de la pupil·la dilatada farmacològicament. Normalment es repeteix mensualment fins que el tumor està completament atrofiat o calcificat.
- Quimioteràpia intravítrea: els tractaments primaris majoritàriament fallen quan hi ha la presència de les llavors vítries. La quimioteràpia intravítrea es pot combinar amb altres tractaments i s'inicia només després que la font de les llavors estigui controlada. L'ús d'aquesta tècnica per les llavors vítries és prometedora, especialment combinada amb una tècnica d'injecció segura i uns criteris ben definits. La toxicitat de la quimioteràpia intravítrea es limita a la toxicitat retinal perifèrica localitzada dependent de la tècnica.

Retinoblastoma extraocular

El retinoblastoma es pot presentar amb una evident malaltia extraocular, especialment als països més pobres. L'extensió orbital d'un retinoblastoma intraocular pot ser detectada clínicament en nens amb proptosis (FIG. 5), o ocasionalment amb estudis d'imatge. El tractament inclou una quimioteràpia utilitzant CEV pel retinoblastoma intraocular, seguit d'una enucleació i una excisió limitada als teixits afectats sense mutilació, radiació orbital i quimioteràpia adjunta. En una malaltia amb



metàstasi, es pot afegir quimioteràpia intratecal. Els pacients amb la malaltia orbital o la metàstasi disseminada sense la invasió al sistema nerviós central podria ser curada amb teràpia intensiva. Els resultats a llarg termini amb pacients amb retinoblastoma que presenten malaltia extraocular són complicats i efectes que es desenvolupen tard, però en general són

FIG. 5. Retinoblastoma primari orbital. L'ull dret presenta proptosis.

Font: *Saudi Journal Ophthalmology* (2011) Volume 25.
"Orbital retinoblastoma: present status and future challenges."

Pal·liació

Inclou el maneig del dolor, alleujament dels símptomes, suport nutricional i suport psicosocial pel nen i la seva família. El retinoblastoma no tractat és altament sensible a la majoria d'agents de quimioteràpia. Els pacients que presentin retinoblastoma orbital normalment pateixen força dolor i incomoditat que podria ser alleujada amb un ús assenyat de teràpia anticancer, incloent-hi la teràpia convencional, fins i tot quan no hi ha un intent curatiu. Aquests nens normalment es presenten amb una emaciació severa (pèrdua de pes), necessitant un tractament mèdic puntual. La radioteràpia també podria ser d'ajuda, especialment per la recaiguda en el sistema nerviós central o pel tractament de l'extensió orbital massiva, però normalment no és assequible en els països més pobres.

PROBLEMÀTICA DEL RETINOBLASTOMA

DISSEMINACIÓ EXTRAOCULAR

El retinoblastoma és el tumor intraocular primari més comú en nens. Quan es deixa sense tractament, gairebé sempre és mortal. Hi ha diversos factors de risc que afecten el pronòstic, dels quals el més important és l'extensió de la invasió del retinoblastoma a capes oculars i al nervi òptic. Alguns tumors petits a vegades poden ser tractats amb eficàcia utilitzant teràpia amb làser o crioteràpia, però generalment es detecten tumors més grans que requereixen l'enucleació de l'ull afectat. Una malaltia més avançada probablement també hauria d'estar tractada amb radioteràpia i quimioteràpia a més de l'enucleació; i aquests dos règims terapèutics augmenten la probabilitat que el nen que ha sobreviscut desenvolupi malignitats addicionals més endavant. Actualment no hi ha cap teràpia exitosa pel tractament de pacients que hagin desenvolupat la malaltia metastàtica.

Existeixen quatre patrons d'invasió i metastasi del retinoblastoma humà. El primer, propagació invasiva directa a través del nervi òptic cap al cervell, podent també sembrar el teixit orbital i l'os adjacent, entre d'altres. En el segon patró, les cèl·lules tumorals envaeixen el nervi òptic i els leptomeninges i després es dispersen en el líquid subaracnoïdal circulatori. A través del líquid subaracnoïdal circulatori, les cèl·lules tumorals poden arribar a la medul·la òssia, diferents llocs del cervell i el nervi òptic contralateral. La formació de tumor en aquests llocs representa més aviat la veritable metastasi que una invasió local. El tercer patró de metastasi és la disseminació hematògena que comporta una metastasi generalitzada als pulmons, al cervell i a altres vísceres. El quart patró de metastasi, caracteritzat per la disseminació limfàtica, succeeix quan el tumor està localitzat anteriorment o hi ha hagut una invasió extraocular massiva. Només els tumors amb aquestes característiques poden propagar-se a través del sistema limfàtic, perquè no hi ha vasos limfàtics ni a l'ull ni a l'òrbita. També es pot produir la propagació hematògena si el tumor arriba als ganglis limfàtics.

La majoria de models animals són models de xenoempelt que han estat creats injectant cèl·lules tumorals de retinoblastoma humà ja sigui en la cambra anterior o a l'espai subretinal dels ulls de ratolins o rates immunodeficients. La injecció de cèl·lules tumorals a la cambra anterior és més favorable per la seva accessibilitat, tant per la injecció com per l'observació del seguiment. No obstant, el xenoempelt a la cambra

anterior té una utilitat limitada per l'estudi del comportament metastàtic, perquè l'afectació tumoral de la cambra anterior sol ser tardana en una malaltia humana i el seu ambient fisiològic difereix significativament del de la cavitat vítria on els tumors es formen naturalment. El model animal en què les cèl·lules de retinoblastoma són injectades a l'espai subretinal produeix tumors que més s'assemblen al retinoblastoma humà en ubicació. Tot i així, les injeccions a l'espai subretinal travessen la coroide i la retina, fet que limita l'ús d'aquest model per estudiar la invasió i progressió del retinoblastoma.

S'han desenvolupat diferents models transgènics de retinoblastoma. Els tumors formats en els ulls dels ratolins transgènics s'assemblen al retinoblastoma humà en moltes característiques histopatològiques, però sovint els falta el fenotip fotoreceptor natural en la malaltia humana i provoca que hi hagi una freqüència més alta de tumors que es desenvolupen al cervell i en altres localitzacions extraoculars. Models animals de retinoblastoma que continguin el gen Rb mutat naturalment i que reproduïxin amb precisió els comportaments biològics dels tumors són imprescindibles per l'examinació de nous enfocaments terapèutics.

Com es comprova en l'estudi publicat en l'article "Animal Model – Metastatic and Nonmetastatic Models of Retinoblastoma" de *American Journal of Pathology*, els tumors de retinoblastoma que es desenvolupen després d'injeccions de cèl·lules de retinoblastoma humà Y79 a ratolins immunodeficients reproduïxen força fidelment els tumors humans amb un comportament agressiu i un potencial metastàtic. Encara que la sembra vítria és considerada una característica d'un retinoblastoma humà gran, el tumor format en el model murí estudiat enfoca el tumor natural pel que fa a anatomia sense travessar la coroide o l'escleròtica ni involucrar la cambra anterior. Els tumors envaeixen la subretina i l'espai coroïdal i finalment envaeixen el nervi òptic. Els tumors de Y79 exhibeixen dos dels 4 patrons d'invasió i metàstasi dels retinoblastomes humans descrits: la propagació invasiva directa i la dispersió de cèl·lules tumorals que comporten la metàstasi al cervell i al nervi òptic contralateral. Es va desenvolupar un altre model de retinoblastoma murí paral·lel utilitzant injeccions intravítries d'una altra línia cel·lular de retinoblastoma humà: WERI-Rb. El model de WERI-Rb mostra un tumor de retinoblastoma que es comporta com a un tumor localitzat que envaeix només les estructures anteriors de l'ull sense la propagació extraocular o metàstasi.

Tot i que els procediments utilitzats per induir la formació del tumor són idèntics i que els tumors que reproduïxen fidelment el retinoblastoma humà provenen de la injecció d'una línia cel·lular, les característiques dels tumors formats són notablement diferents. Els tumors de WERI-RB presenten característiques d'un retinoblastoma humà localitzat i no metastàtic, mentre que els tumors de Y79 presenten característiques histopatològiques d'un retinoblastoma humà agressiu amb invasió del nervi òptic i el cervell que probablement comportarien la malaltia metastàtica. Els animals dels dos grups al final dels experiments tenien tumors que havien reemplaçat completament els teixits oculars normals de l'ull afectat. Només els animals amb tumor Y79 tenien tumors que imitaven el retinoblastoma metastàtic agressiu i de creixement ràpid; que s'observa poc freqüentment a Europa o Nord-Amèrica però que és més comú als països subdesenvolupats. En canvi, el model animal de WERI-Rb es comportava com els pacients amb retinoblastoma no metastàtic, que més usualment es troben als països desenvolupats.

No es van observar metàstasis distants fora del sistema nerviós central en aquests models animals. En la malaltia humana poques vegades s'observa i és considerat un esdeveniment molt tardà en el curs de la malaltia. Si estigués permès que els animals sobrevisquessin més 9 setmanes, probablement en els models de cèl·lules de Y79 s'haguessin observat metàstasis distants fora del sistema nerviós central.

El grau d'invasió de la coroides, extraocular o del nervi òptic en el moment del diagnòstic sovint determina el pronòstic dels nens amb retinoblastoma; i els models animals poden ser una oportunitat per la investigació de semblances i diferències en el comportament biològic i per analitzar la resposta de tractaments del retinoblastoma metastàtic i no metastàtic.

DIAGNÒSTIC MOLECULAR DE LA MALALTIA DISSEMINADA

MÈTODE DEL CRX (JAMA Ophthalmology 2015)

El retinoblastoma disseminat és la principal causa de mortalitat associada amb aquest tumor arreu del món, sobretot en els països subdesenvolupats. El lloc més freqüent de metàstasi és la medul·la òssia, seguida pels ossos i el fetge; i pot arribar a disseminar-se al sistema nerviós central principalment a través del nervi òptic.

En diversos càncers pediàtrics s'ha estudiat la disseminació mínima mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) o la immunocitologia, tot i així, hi ha hagut pocs estudis en retinoblastoma. En un estudi es va observar que la disseminació mínima és més comuna en el diagnòstic al líquid cefaloraquídi en nens amb una invasió massiva al nervi òptic i amb glaucoma. En aquest estudi es va utilitzar la disialogangliòsid GD2 sintetasa com a marcador molecular per la disseminació mínima. No obstant, la disialogangliòsid GD2 també es pot expressar en cèl·lules mare de medul·la òssia normal demostrant una expressió de fons, i limita la seva especificitat i sensibilitat, fet que provoca que sigui menys efectiva per la confirmació del diagnòstic de mostres amb escassa cel·lularitat com podria ser el líquid cefaloraquídi.

Com que els pacients amb retinoblastoma tenen una mutació única al gen *RBI*, localitzant cèl·lules extraoculars amb aquesta mutació seria una evidència inequívoca de disseminació mínima. Ja que el retinoblastoma ve de precursors retinals, seria convenient detectar cèl·lules tumorals a teixits no oculars amb marcadors de llinatge específics. Entre aquests marcadors, s'ha descobert que el homebox de cons i bastons (CRX) s'expressa uniformement en el retinoblastoma. L'homebox de cons i bastons és un factor de transcripció crític per la diferenciació dels fotoreceptors i pel manteniment del desenvolupament normal de la retina; i com que la seva expressió es restringeix als precursors de fotoreceptors, s'investiga l'mRNA de CRX com a marcador molecular per l'avaluació diagnòstica i per l'avaluació de disseminació mínima.

En l'estudi publicat el 30 d'abril de 2015 per *JAMA Ophthalmology*, s'investiga la utilitat de la detecció de l'mRNA del CRX utilitzant la transcripció inversa i la PCR en medul·la òssia, sang perifèrica i líquid cefaloraquídi per identificar la infiltració de cèl·lules tumorals en el retinoblastoma metastàtic. També s'avalua l'mRNA de CRX com a marcador per a la disseminació mínima i es correlaciona aquesta informació per establir patrons de disseminació de la malaltia en diferents escenaris clínics.

Primer, es va validar el marcador i el mètode de detecció. Es va avaluar l'expressió d'mRNA de CRX a les línies cel·lulars de retinoblastoma Y79 i WERI-Rb1 i com a controls es va utilitzar mostres de medul·la òssia de nens amb càncers que no fossin retinoblastoma. L'expressió de l'mRNA de CRX es va analitzar utilitzant el mètode 2^{-ddCt} , que dona els valors d'expressió del CRX normalitzats amb els del gen control, en aquest cas el gen GAPDH, i relativitzat a una mostra de calibratge. La sensibilitat de la transcripció inversa seguida per la PCR es va avaluar diluint cèl·lules de WERI-Rb1 en cèl·lules mononuclears normals. La sensibilitat es va definir com la dilució més baixa amb ampliació específica. Pel que fa l'avaluació de pacients, es van incloure nens amb retinoblastoma metastàtic recent diagnosticat o amb recaiguda. Les mostres clíniques es valoraven com a positives si com a mínim dues de les tres rèpliques tenien un valor de Ct menor que 40.

En tots els tumors analitzats i a les línies cel·lulars, es va detectar una elevada expressió d'mRNA de CRX. En canvi, no es va detectar mRNA de CRX en cap de les mostres de medul·la òssia normal, només es va obtenir l'amplificació del gen GAPDH. Per tant, qualsevol expressió d'mRNA de CRX es va interpretar com a un resultat positiu però no es va poder establir un Ct concret, l'expressió d'mRNA de CRX és relativa.

En aquest estudi es va confirmar que el CRX és un marcador tumoral fiable per detectar la presència de retinoblastoma a llocs extraoculars, i les dades obtingudes suggereixen que es podria aconseguir una elevada sensibilitat i especificitat i es podria aplicar per l'avaluació de la disseminació mínima. Es va observar una àmplia gamma de nivells d'expressió relativa d'mRNA de CRX i es podria associar als diferents graus d'infiltració tumoral de cada pacient. En els nens que no patien retinoblastoma no se'ls va detectar expressió d'mRNA de CRX, per tant, es suggereix que l'especificitat i la sensibilitat eren del 100% per la medul·la òssia infiltrada amb retinoblastoma, ja que no va haver-hi ni falsos negatius ni falsos positius. Com que les cèl·lules tumorals de pacients amb recaiguda després de tractaments de quimioteràpia continuaven mostrant expressió d'mRNA CRX, permet fer un seguiment de l'activitat dels tractaments. No obstant, utilitzar la PCR per determinar la disseminació mínima en el líquid cefaloraquídi és problemàtica degut a la poca quantitat de RNA que aquest conté a nivell acel·lular, i per obtenir resultats fiables s'haurien d'utilitzar més d'una tècnica.

ANÀLISI D'ARN_m DEL MARCADOR TUMORAL CRX
EN CERVELLS DE RATOLÍ AMB RETINOBLASTOMA HUMÀ

L'estudi proporciona dades per entendre millor la cinètica de resposta als tractaments en retinoblastoma metastàtic i deduir mecanismes de disseminació. Els pacients amb metàstasi sistemàtica es poden curar amb teràpies intensives si no s'involucra el sistema nerviós central. La majoria de fracassos dels tractaments estan relacionats amb la recaiguda del sistema nerviós central.

Es conclou que l'mRNA de CRX és un marcador específic i innovador pel retinoblastoma disseminat i té interès per a la determinació de la disseminació mínima com a eina per millorar la identificació de cèl·lules tumorals en llocs extraoculars.

**PROGRAMA D'INVESTIGACIÓ TRASLACIONAL DE RETINOBLASTOMA
AL'HSJD**

CULTIUS CEL·LULARS I MODELS ANIMALS

El retinoblastoma és una malaltia poc freqüent amb una alta taxa de curació i el nombre de pacients amb tumors resistents aptes per incloure'ls en els assajos clínics és baix, negligible per a les companyies farmacèutiques. Per aquesta raó, els models preclínics que reproduïen amb precisió el retinoblastoma humà són essencials per l'estudi de nous enfocaments terapèutics. En anàlisis de genòmica i proteòmica i en estudis de l'activitat de medicaments es requereixen tan models *in vitro* com *in vivo* de retinoblastoma, i són indispensables per una investigació traslacional d'alta qualitat.

Les línies cel·lulars comercials i els ratolins transgènics no reproduïen del tot fidelment la malaltia humana i el cultiu de cèl·lules de retinoblastoma primàries està tradicionalment limitat pel seu creixement dificultós en condicions de cultiu regulars. L'aplicació de l'estratègia de cultiu de teixits proposada per MD Anderson que selecciona les cèl·lules mare neurals o les cèl·lules mare del tumor del cervell pel creixement podria millorar els mètodes disponibles.

Durant els dos últims anys, els investigadors de l'Hospital Sant Joan de Déu han generat 8 línies cel·lulars primàries de retinoblastoma de 6 pacients diferents enucleats utilitzant aquesta metodologia de cultiu cel·lular. Aquests cultius derivats de pacients expressen el marcador neuroectodèrmic GD2 i el marcador progenitor de la retina CRX, confirmant que la procedència de les cèl·lules és de retinoblastoma. D'altra banda, aquests esferoides de retinoblastoma s'empelten en ulls de ratolí immunodeficients després d'una injecció ortotòpica, proporcionant un model animal indicat per la investigació del retinoblastoma.

En el grup de recerca oncològica dirigit pel Dr. Angel Montero Carcaboso, s'han desenvolupat 4 models animals de retinoblastoma amb un 100% d'èxit en l'empelt. Els tumors intraoculars creixen en els ulls dels ratolins fins a una invasió total de les principals estructures de l'ull; l'humor vitri, la retina, el cos ciliar, l'escleròtica i el nervi òptic. Destacadament, s'ha identificat una evidència de disseminació al sistema nerviós central en alguns d'aquests models preclínics.

METODOLOGIA

PROCESSAMENT DE MOSTRES

EXTRACCIÓ DE MOSTRES

Les mostres provenen dels ratolins de la soca “athimic nude mice” que prèviament se'ls hi ha injectat el retinoblastoma de manera ortotòpica i no han rebut cap tractament.

En aquest projecte s'ha treballat amb quatre models de retinoblastoma diferents, cada un provinent de cèl·lules d'un pacient de l'Hospital Sant Joan de Déu.

Per un bon seguiment del desenvolupament del tumor, cada dia s'han pesat els ratolins i s'ha comprovat l'estat dels ulls. Aquest



FIG. 6. Ull sa: transparent vermellós

estat es classifica en 3 estadis: quan un ull està a l'estadi 1, presenta leucocòria al fons de la retina (una petita taca blanca); a l'estadi 2, es comprova que el tumor ha anat envaint part de la retina i arriba a la part frontal, fent canviar la transparència vermellosa

d'un ull sa (FIG. 6) a un blanc opac; i en l'estadi 3 el tumor està més desenvolupat i ha infectat gran part de la retina. L'animal podria patir en excés si es deixés créixer més, l'ull ha augmentat considerablement de mida i s'ha deformat, essent tot blanc i amb alguna vena marcada a la retina.



FIG. 7. Subministrament d'anestèsia per via intraperitoneal

Quan en un ratolí un ull arriba a l'estadi 3 de tumor, s'ha d'enuclear. L'enucleació es pot dur a terme sense sacrificar l'animal. S'administra una quantitat precisa d'anestèsia d'acord amb el seu pes (FIG. 7). Es treu l'ull amb unes pinces, parant l'hemorràgia amb una gasa i proveint al ratolí d'un

calmant pel dolor.

Un cop un ratolí només té un ull i aquest arriba a l'estadi 3, s'ha de sacrificar. La tècnica emprada és la dislocació cervical, que és ràpida i indolora. Després de l'eutanàsia, s'enuclea l'altre ull i es decapita el ratolí per tal de poder obtenir el cervell.

Els ratolins que s'hauran o bé d'enuclear o bé sacrificar, es marquen a la cua perquè després siguin fàcilment identificables. (FIG. 8)



FIG. 8. Ratolí marcat per la cua, per enuclear-lo o sacrificar-lo.

Amb l'ajuda d'un microscopi òptic, tisores i pinces, es treu el nervi òptic i el cristal·lí de l'ull per tal de quedar-se només amb la retina i el tumor (FIG.

9 i 10). El cervell s'analitza sencer (FIG. 11).

Les mostres es guarden en tubs de rosca eppendorf en congeladors de - 80°C.

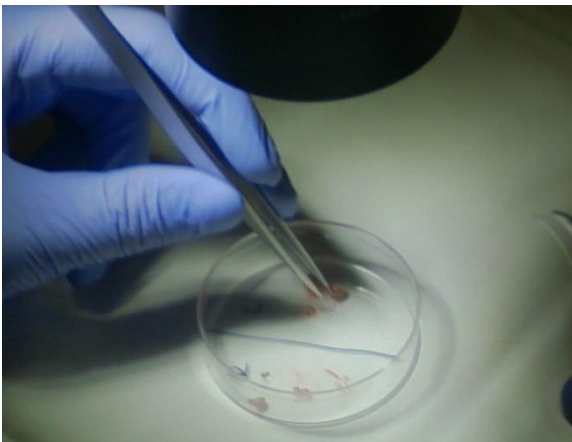


FIG. 9. Extracció de la retina i el tumor exclusivament.

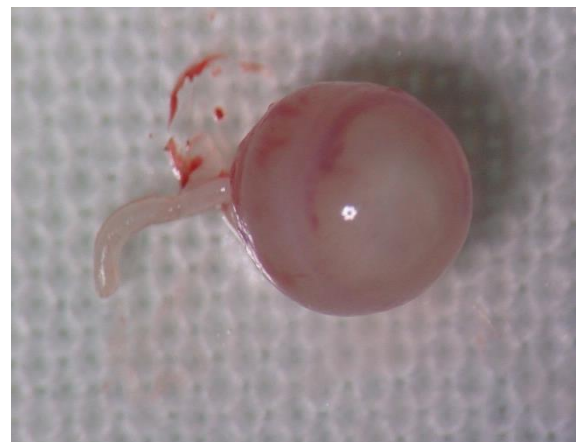


FIG. 10. Ull infectat pel retinoblastoma vist a través d'un microscopi òptic.

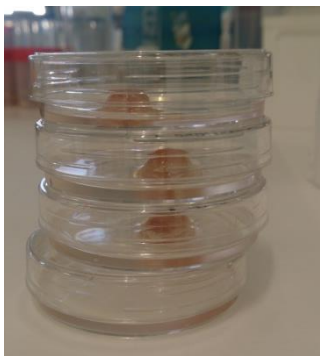


FIG. 11. Cervells recent extrets del ratolí pendents d'analitzar.

EXTRACCIÓ DE RNA

En aquest estudi no s'ha treballat amb mostres de retines, per tant, els procediments següents són només per a l'anàlisi de cervells.

Les mostres de cervell al congelador, es recullen en un recipient amb nitrogen líquid. El nitrogen líquid evita la descongelació de les mostres i conseqüentment la desnaturalització de l'ARN.

S'utilitza una gradeta, tubs eppendorf de rosca, una pipeta de 1000µL, TRIzol i xeringues d'1mL. El Trizol és una solució química que evita la desnaturalització de l'ARN encara que no estigui a baixes temperatures. Degut a la seva toxicitat, s'ha de treballar a la campana de gasos.

1. En primer lloc, es treuen els tubs amb les mostres de cervell del nitrogen líquid i a mesura que es van traient, s'hi afegeix 1mL de TRIzol i es deixen a la gradeta. (FIG. 12 i 13)



FIG. 12: Reactiu TRIzol, evita que l'ARN es desnaturalitzi encara que no estigui a baixes temperatures.

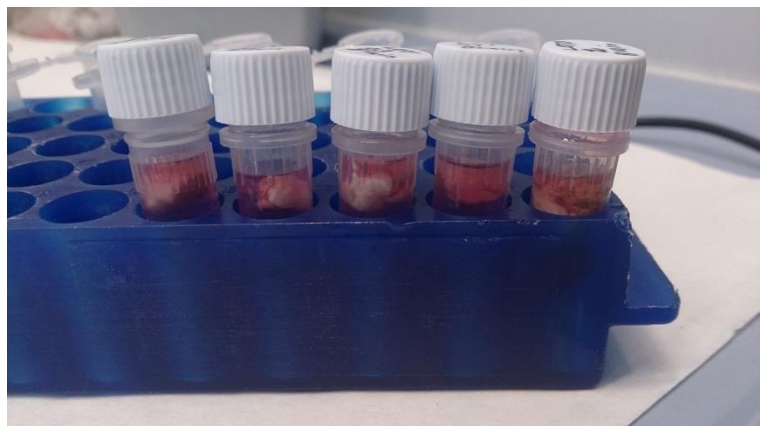


FIG. 13: cervells amb TRIzol a tubs eppendorf de rosca.



FIG. 14: Disgregació del cervell amb agulla i xeringa.

ANÀLISI D'ARNm DEL MARCADOR TUMORAL CRX
EN CERVELLS DE RATOLÍ AMB RETINOBLASTOMA HUMÀ

2. Amb agulla i xeringa, es disgrega el cervell amb el TRIZol, fins que quedi totalment desintegrat i es vegi una substància líquida de color rosat (FIG. 14). S'ha d'utilitzar una xeringa i agulla diferent per a cada mostra, per tal d'evitar la contaminació d'una mostra a l'altra.

3. S'afegeix 200 μ L de cloroform a cada tub. El cloroform reté l'ARN. Un cop s'hi ha afegit, s'ha de sacsejar i barrejar fins que quedi uniforme i rosat, ja que inicialment el cloroform estarà a la part inferior. (FIG. 15 i 16)



FIG. 15. S'hi ha afegit cloroform i aquest es queda a baix de la mescla.

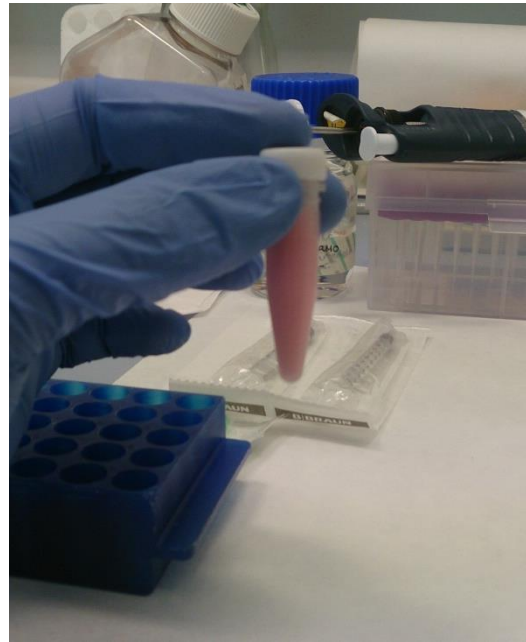


FIG. 16. Es barreja fins que queda uniforme i rosat.



FIG. 17. Tubs posats per ordre i en equilibri a la centrífuga.

4. Es posen les mostres a la centrífuga després de 5 minuts que aquesta s'ha estat refredant. Seguidament, es centrifuguen durant 10' a 4°C i a 12000rpm (FIG. 17). En la centrífuga es posen les mostres per ordre, i si el nombre és imparell s'ha d'afegir un tub eppendorf amb un volum d'aigua aproximat per tal d'equilibrar el pes.

5. Mentre les mostres es centrifuguen, es retolen tubs eppendorf de rosca i s'hi afegeix 500µL de 2-propanol a cada un. El 2-propanol combinat amb el cloroform provoquen que l'ARN precipiti.

6. En acabar la centrifugació, s'observen tres capes: a la part superior hi ha el cloroform amb l'ARN, al mig una fina capa de proteïnes i a la part inferior el TRIzol (FIG. 18). D'aquests tubs, es pipetegen 500µL de la part superior, amb cura de no pipetejar també proteïnes, i s'afegeixen als tubs on hi ha el 2-propanol. S'eliminen els tubs on hi ha el TRIzol i la capa de proteïnes.



FIG. 18. Després de la primera centrifugació, es poden observar 3 capes a cada mostra: a dalt cloroform i ARN, al mig una capa de proteïnes i baix el TRIzol.

7. Els tubs on hi ha el cloroform, el 2-propanol i l'ARN, es barregen al VORTEX (FIG. 19) i es deixen reposar durant 5'. Un cop passat aquest temps, es centrifuguen durant 10' a 4°C a 12000rpm. A partir d'aquí, ja no cal treballar més a la campana de gasos.

8. Quan es treuen les mostres de la centrífuga, s'ha de poder observar en cada una el pellet (FIG. 20). El pellet és el sòlid que precipita a baix del tub durant la centrifugació, que en aquest cas és l'ARN. Llavors es pipeteja el cloroform i el 2-propanol amb compte de no pipetejar també el pellet i s'eliminen.

S'afegeix 1mL d'etanol, prèviament preparat al 70%, per tal que el pellet es desenganxi de la part de baix del tub (FIG. 21). L'etanol serveix com a neteja.



FIG. 19. Barrejar les mostres al
VORTEX.

9. Es centrifuguen les mostres durant 5' a 4°C a 12000rpm. Seguidament, s'ha de continuar veient el pellet i s'ha de pipetejar l'etanol i eliminar-lo, vigilant de no pipetejar el pellet.

Aleshores, per poder treure l'etanol que hagi pogut quedar a les parets de l'ependorf, es centrifuga 1 spin i es pipeteja tot l'etanol que quedi (uns 200µL).

A continuació, s'afegeix 50µL d'H₂O Mili-Q a cada tub.

10. Finalment, s'utilitza el programa de lectura ND-1000 V3.5.2 per determinar la concentració de RNA, la contaminació per proteïnes i la contaminació per alcohols de la mostra (FIG. 22). La contaminació per proteïnes és anomenada 260-280 i ha d'estar entre els paràmetres 1,80 – 2,20, i la contaminació per alcohols és anomenada 260-230 i ha d'estar entre els mateixos paràmetres, 1,80 – 2,20. Si la mostra està excessivament contaminada, s'elimina.

Les mostres es guarden al congelador de -80°C.

ANÀLISI D'ARNm DEL MARCADOR TUMORAL CRX
EN CERVELLS DE RATOLÍ AMB RETINOBLASTOMA HUMÀ

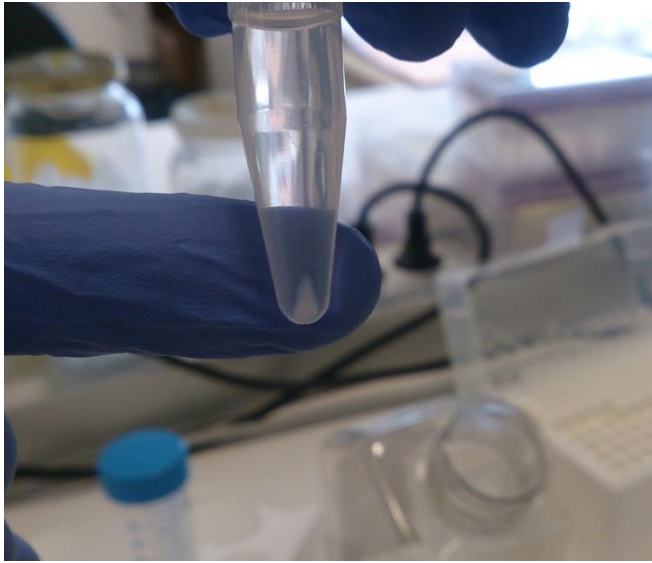


FIG. 20. Observació del pellet: ARN que ha precipitat.



FIG.21. Tirar etanol de manera que es desenganxi el pellet.



FIG. 22. Aquest és l'espectrofotòmetre on s'ha de carregar la mostra per tal que pugui ser llegida pel programa de lectura d'ordinador ND-1000 V3.5.2.

PCR QUANTITATIVA

TRANSCRIPCIÓ INVERSA

La PCR és la reacció en cadena de la polimerasa, i serveix per amplificar ADN. Degut a que les mostres són d'ARN, cal fer la transcripció inversa per obtenir l'ADN.

1. Es recullen les mostres amb gel i s'efectua la retolació dels tubs de rosca.

S'ha d'arribar a una concentració de 200ng/μL a cada mostra, afegint H₂O Mili-Q.

Càlcul del volum d'H₂O Mili-Q:

$$\frac{5\mu\text{L s}^{\circ}\text{ stock} \cdot []}{200\text{ng}/\mu\text{L}} - 5\mu\text{L}$$

[] → concentració de la mostra.

2. S'afegeix la quantitat d'aigua calculada als tubs retolats i s'introdueixen 5μL de RNA stock, RNA de les mostres inicials. S'ha d'anar deixant les mostres amb gel.

3. Retolació dels eppendorfs de PCR, microtubs, i col·locació en una gradeta. Addició de 5μL de RNA 200ng/μL a cada microtub. Escalfament dels tubs al termociclador, amb el programa 65-5 (5').

Preparació dels reactius per a la reacció en un eppendorf.

Quantitats per una reacció:

- H₂O Mili-Q → 7,5μL
 - Buffer RT 5X → 4μL
 - DNTP'S → 2μL
 - Random hexàmers → 1μL
 - M-MLV → 0,5μL
- Total: 15μL per cada reacció.

Els reactius es troben al congelador de -20°C, i s'ha d'anar en compte que l'enzim (M-MLV) no es descongeli.

Es calcula el volum necessari de cada reactiu multiplicant-lo pel número de mostres que es tingui, sempre comptant a l'alça; i es posa tot en un mateix eppendorf. Un cop feta la mescla, es barreja al VORTEX.

ANÀLISI D'ARNm DEL MARCADOR TUMORAL CRX
EN CERVELLS DE RATOLÍ AMB RETINOBLASTOMA HUMÀ

5. S'agafen les mostres del termociclador amb gel i s'hi afegeix 15 μ L de la barreja a cada microtub (on ja hi havia els 5 μ l de mostra).

Es posen les mostres al termociclador amb el programa "rt-eac", on es portaran a terme els cicles de la transcripció inversa a les temperatures adequades. La durada del procés és de 1h i 30min aproximadament.

6. Finalment, es treuen les mostres del termociclador, es posen en gel i es ressuspenen en 80 μ L d'H₂O Mili-Q. A l'ependorf on hi hagi el CDNA, s'ha de retolar "CDNA" al tub.

Les mostres es guarden en congeladors de -20°C.

RT-qPCR

Per quantificar l'expressió de CRX s'ha de fabricar artificialment una recta de calibrat. La recta de calibrat consta de 6 tubs eppendorfs: en el primer hi ha les cèl·lules del tumor pures, al segon estan diluïdes 10^{-1} amb mostra de cervell control, al tercer diluïdes 10^{-2} , al quart 10^{-3} , al cinquè 10^{-4} i al sisè 10^{-5} .

En el primer del CRX hi ha un reactiu fluorescent, que quan la PCR ha passat suficients cicles, s'ha amplificat prou i es pot veure la seva fluorescència. Comptant quants cicles necessita per aparèixer la fluorescència en el tumor pur i en les dilucions, es pot quantificar el CRX de la mostra mirant els cicles necessaris per veure's fluorescent.

Preparació de la recta

Consisteix en preparar les dilucions que serviran per fabricar artificialment la recta de calibrat. S'ha de disposar de CDNA de les cèl·lules (tumor pur) i CDNA de cervell control.

En primer lloc es posen $18\mu\text{L}$ de cervell control a 5 tubs eppendorf de rosca i es retolen indicant la dilució a la que es corresponen. Llavors, amb una pipeta de $2\mu\text{L}$, es pipetegen $2\mu\text{L}$ de tumor pur i es posen al tub de 10^{-1} i es barreja al VORTEX. Després, es pipetegen $2\mu\text{L}$ de dilució 10^{-1} , es posen al tub de 10^{-2} i es barreja al VORTEX. Això es fa successivament fins que es pipetegen $2\mu\text{L}$ de la dilució 10^{-4} cap al tub de 10^{-5} . (FIG. 23)

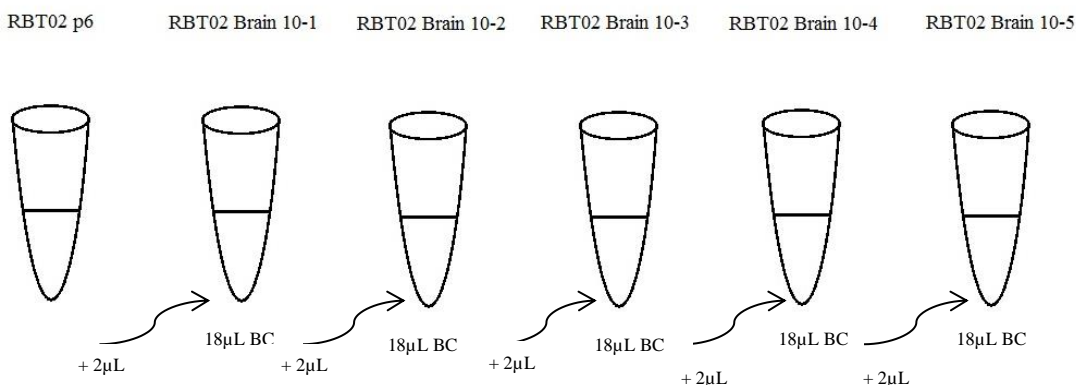


FIG. 23. Esquema de la preparació de la recta del xenoempelt RBT02.

Preparació de la placa

Es tracta de preparar la placa per tal que la PCR pugui amplificar les mostres correctament i llegir la fluorescència.

Per a la preparació, es necessita les mostres, les dilucions, el tumor pur, cervell control i els reactius següents que compondran la mescla necessària per la PCR (amb les quantitats necessàries per mostra) (FIG. 24):

- H₂O → 4,9μL
- Sybergreen → 7,5μL (mix específica per PCR, dona fluorescència)
- Primer forward per CRX/TBP → 0,3μL
- Primer reverse per CRX/TBP → 0,3μL

Total: 13μL

1. Es preparen dues mescles de PCR: una serà pel gen de CRX, que és el que s'analitza; i l'altre pel gen de TBP, que és el que s'utilitza de gen control. Les mostres, per tant, es dividiran en dos grups on en cada grup hi haurà exemples de cada mostra.

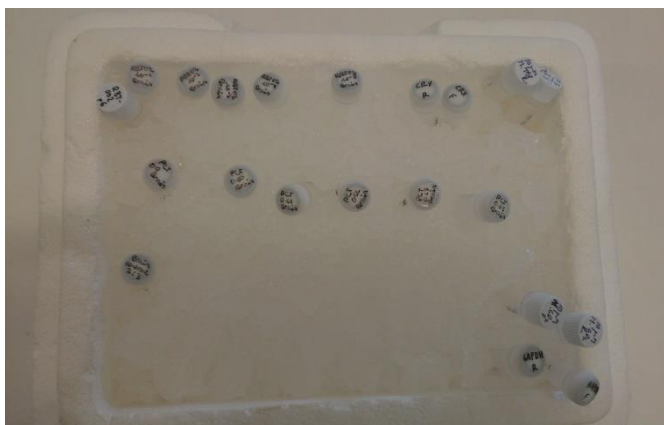


FIG. 24. Mostres amb gel.

S'utilitzen trips de 8 peuetes i es carrega cada mostra 2 vegades per cada gen, és a dir que en total es carrega 4 cops la mostra.

2. En cada mescla s'hi han d'afegir els reactius esmentats abans (amb els primers corresponents), multiplicant-ho pel nombre de mostres a l'alça. Es barreja la

mescla del CRX al VORTEX i se'n pipetegen 13μL a cada microtub del grup del CRX. A continuació, es fa el mateix amb la mescla del TBP. La quantitat de mescla sobrant s'elimina.

3. Es barregen les mostres al VORTEX i es carreguen 2μL de cada mostra al tub que li correspon (FIG. 25).

A cada microtub hi ha 2μL de mostra i 13μL de la mescla corresponent.

ANÀLISI D'ARNm DEL MARCADOR TUMORAL CRX
EN CERVELLS DE RATOLÍ AMB RETINOBLASTOMA HUMÀ

A la placa s'hi inclou una mostra anomenada "NTC" on no hi ha CDNA i una mostra de cervell control (BC).

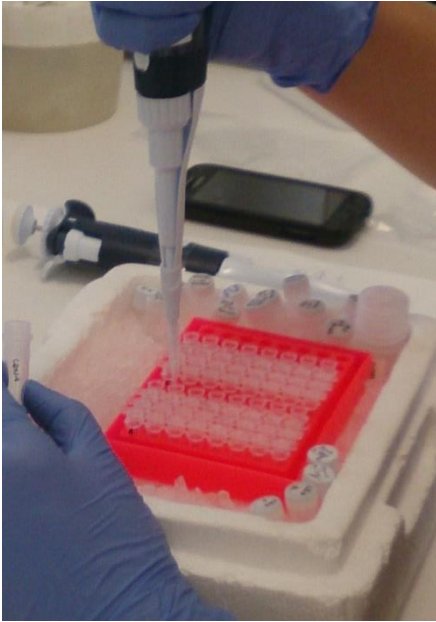
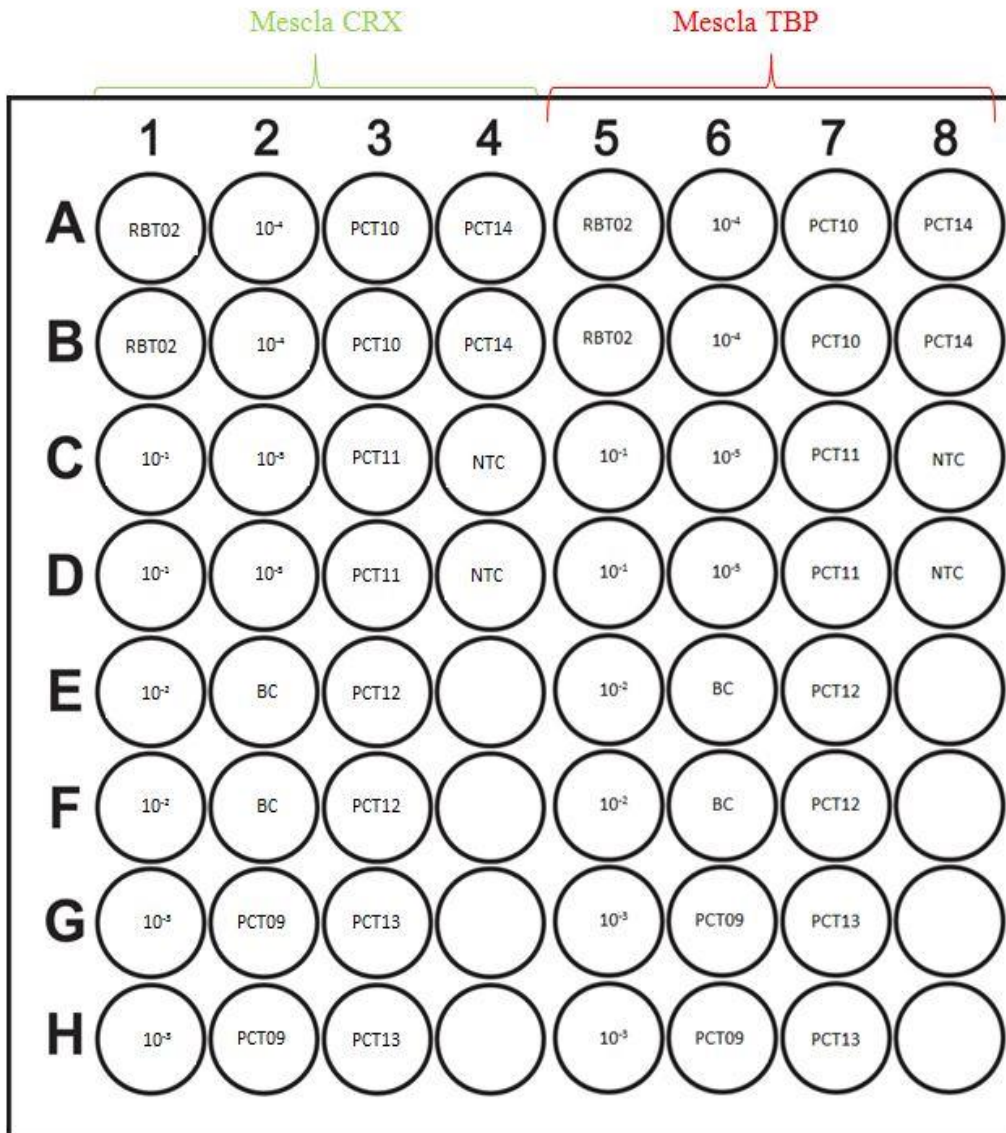


FIG. 25. Carregar les mostres als microtubs corresponents.

ANÀLISI D'ARNm DEL MARCADOR TUMORAL CRX
EN CERVELLS DE RATOLÍ AMB RETINOBLASTOMA HUMÀ

Esquemes de les plaques de cada model:

HSJD – RBT – 002



ANÀLISI D'ARNm DEL MARCADOR TUMORAL CRX
EN CERVELLS DE RATOLÍ AMB RETINOBLASTOMA HUMÀ

HSJD – RT – 005

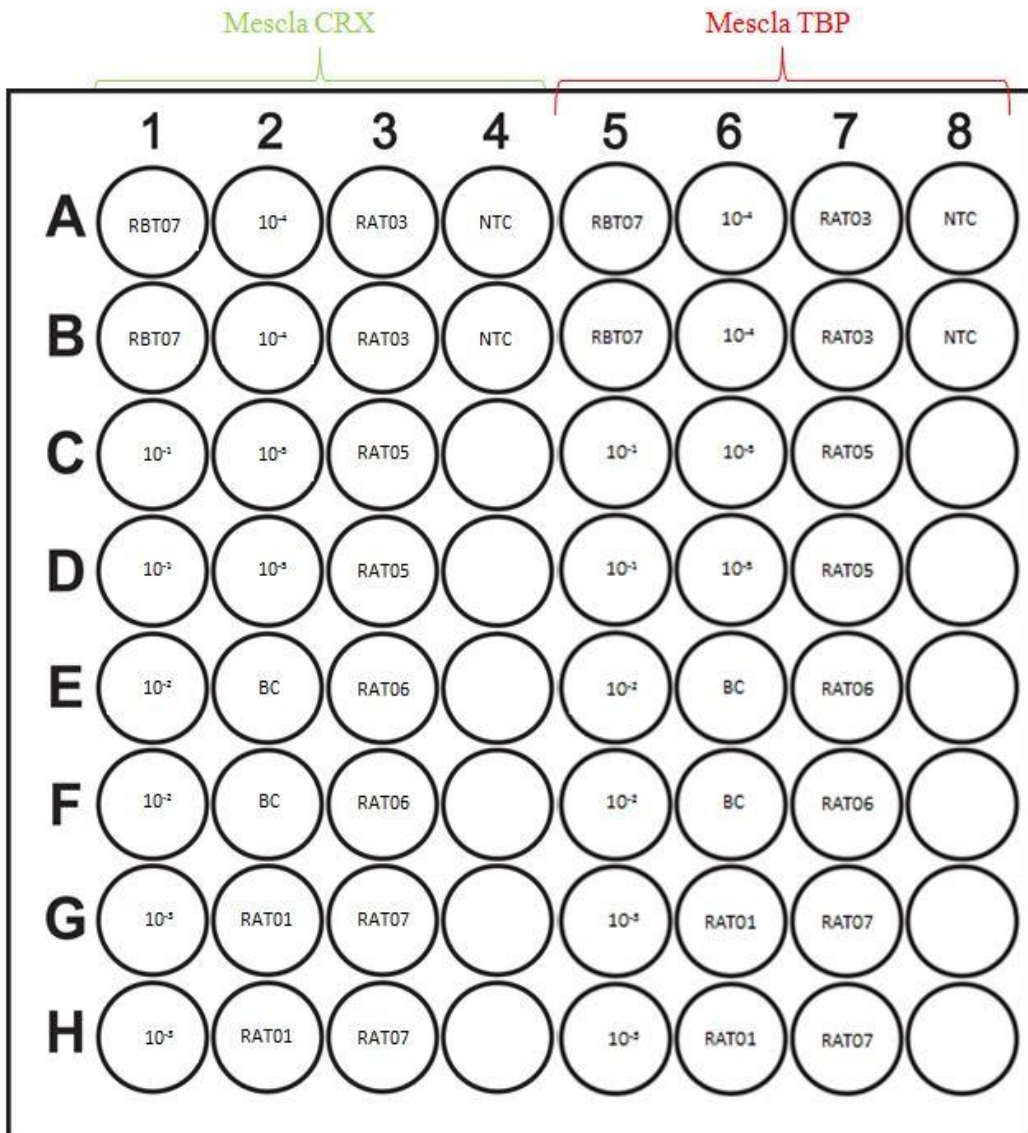
Mescla CRX

Mescla TBP

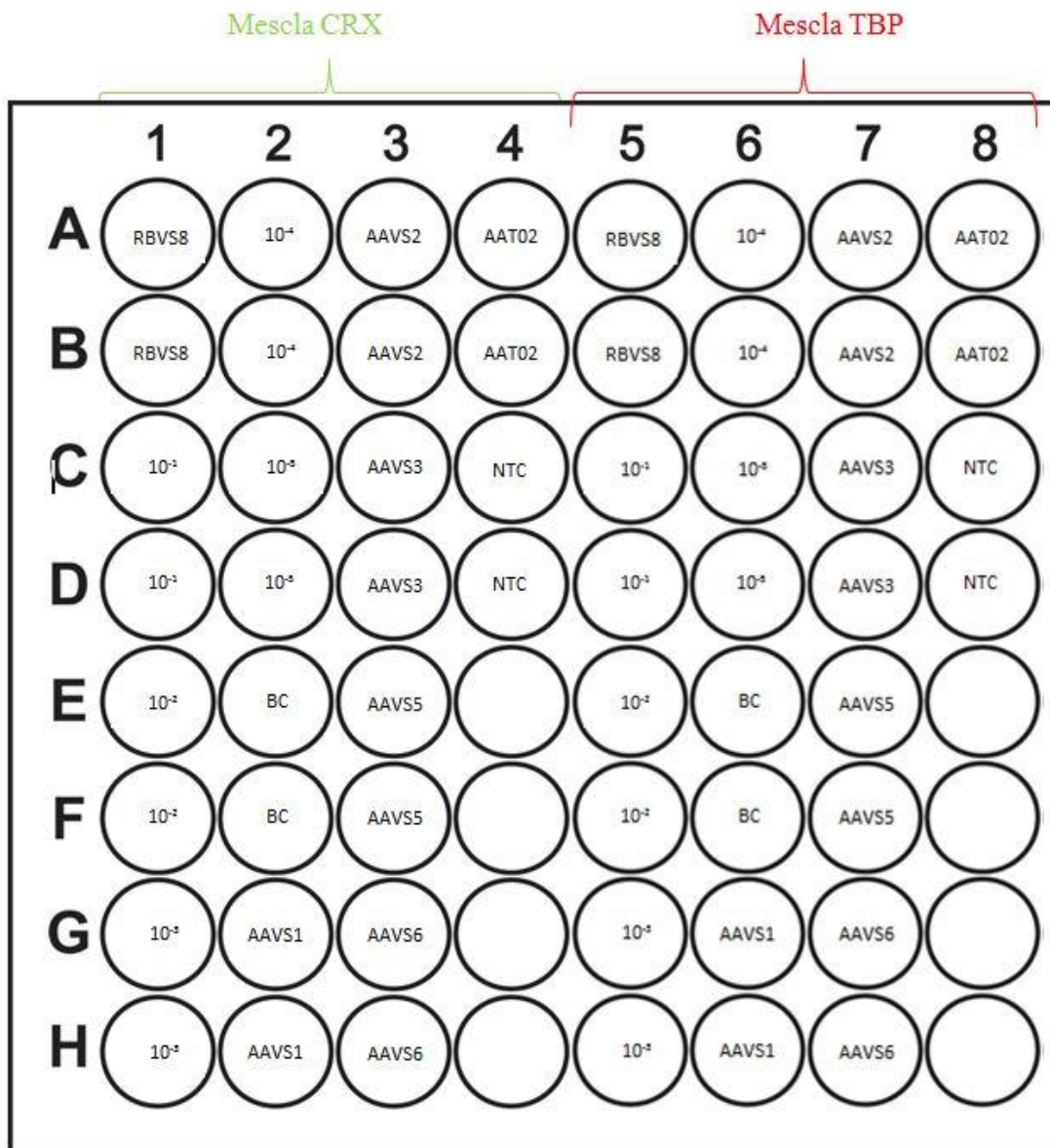
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	RBT05	10 ⁻⁴	LOT02	NTC	RBT05	10 ⁻⁴	LOT02	NTC
B	RBT05	10 ⁻⁴	LOT02	NTC	RBT05	10 ⁻⁴	LOT02	NTC
C	10 ⁻²	10 ⁻³	LOT03		10 ⁻²	10 ⁻³	LOT03	
D	10 ⁻²	10 ⁻³	LOT03		10 ⁻²	10 ⁻³	LOT03	
E	10 ⁻²	BC	LOT04		10 ⁻²	BC	LOT04	
F	10 ⁻²	BC	LOT04		10 ⁻²	BC	LOT04	
G	10 ⁻²	LOT01	LOT05		10 ⁻²	LOT01	LOT05	
H	10 ⁻²	LOT01	LOT05		10 ⁻²	LOT01	LOT05	

ANÀLISI D'ARNm DEL MARCADOR TUMORAL CRX
EN CERVELLS DE RATOLÍ AMB RETINOBLASTOMA HUMÀ

HSJD – RBT – 007



HSJD – RBVS – 008



4. Finalment, es posen les plaques en un termociclador específic anomenat “Applied Biosystems ABI 7900HT Sequence Detection System” i es programa a través d’un ordinador indicant-li la mostra i mescla que hi ha a cada lloc, per tal d’obtenir correctament els resultats.

La qPCR s’efectua en un temps de dues hores per a cada placa.

PROCESSAMENT DE DADES I ANÀLISI ESTADÍSTIC

Es tracta bàsicament d'entendre i poder analitzar les dades que dona la qPCR. La qPCR ens informa del nombre de cicles que tarda a sortir fluorescència a cada mostra tant pel CRX com pel TBP, i després de completar cada cicle duplica la quantitat de DNA.

Les qPCR poden sotmetre fins a 40 cicles d'amplificació, i si no s'ha detectat fluorescència amb aquest número de cicles, es tindrà com a resultat "Undetermined", indeterminat, que simplement vol dir que no se n'ha detectat.

El reactiu Sybergreen s'uneix específicament amb el DNA d'interès, ja que cal tenir en compte que reactius com el Syber I s'uneixen amb tot el DNA de doble cadena. Una imatge del que surt a la pantalla de l'ordinador va mostrant el curs de les mostres de la qPCR.

S'anomena "línia de base" el període de fons necessari per obtenir una amplificació significativa (3-15 cicles); i "llindar" el punt en el qual es produeix l'amplificació específica i significativa, punt que creua quan la qPCR ha detectat fluorescència i que sempre està per sobre la línia de base.

El Ct ("Threshold cycle") és el número de cicle en què el senyal de fluorescència creua el llindar i, per tant, és el que ens permet després analitzar els resultats obtinguts.

Saber el nombre cicles que es necessiten per detectar fluorescència en el gen de TBP no informa sobre la quantitat de tumor que hi pugui haver en cada mostra. No obstant, serveix per comprovar que cada mostra ha estat ben processada; és a dir, que l'ARN s'ha extret correctament i no està excessivament contaminat per alcohols ni per proteïnes. Permet comprovar que la transcripció inversa s'ha produït eficientment i que no hi ha hagut errors a l'hora de preparar la placa de la qPCR. Aquests fets es verifiquen si el Ct del gen de referència, en aquest cas el TBP, és constant.

Un cop es tenen els resultats, s'analitza l'expressió del CRX utilitzant el mètode 2^{-ddCt} .

1. En primer lloc s'efectua la mitjana del Ct de cada mostra, ja que s'han carregat dues mostres per la mix de cada gen.

2. Seguidament, es realitza la diferència entre el Ct del gen diana i el Ct del gen de referència per a cada mostra i també per al cervell control, per mirar-ne la relació ($dCt = Ct \text{ diana} - Ct \text{ referència}$).

3. Aleshores, es resta el dCt de valor més gran al dCt de cada mostra (calculat abans), ja que el dCt de valor més gran és del màxim que pot detectar fluorescència ($ddCt = dCt - dCt \text{ més gran}$).

La forma normalitzada del nivell d'expressió d'un gen és 2^{-ddCt} , elevant 2 a la diferència calculada abans.

4. Llavors, perquè quedi una recta i sigui comparable, s'efectua el logaritme de l'expressió d'abans, és a dir: $\log(2^{-ddCt})$, i d'aquí es treuen els valors per fer la recta de calibrat.

Per conèixer la càrrega tumoral, s'aplica la fórmula següent: $(\log 2^{-ddCt} - \text{ordenada a l'origen recta de calibrat}) / \text{pendent recta calibrat}$. Així es realitza el logaritme d'aquesta expressió i es troba el % de tumor de cada mostra.

D'aquesta manera, es pot crear la recta de calibrat amb els 2^{-ddCt} del tumor pur i cada dilució efectuada. Per comprovar que la recta s'aproxima a la perfecció, el coeficient de correlació al quadrat ha de ser el més pròxim a 1 possible; a més, els percentatges també poden indicar el grau de perfecció de la recta: el tumor pur hauria de donar un 100% de tumor, mentre que el tumor diluït 10^{-1} un 10%, el diluït 10^{-2} un 1%, i així successivament.

En relació a l'anàlisi de les mostres, es considerarà que hi ha hagut disseminació extraocular al CNS si aquestes es troben a dins la recta; o sigui, si tenen un Ct entre els valor de Ct del tumor pur i el valor de Ct de la solució més diluïda de tumor detectada.

RESULTATS

EXTRACCIÓ DE RNA

Els primers resultats numèrics i analitzables fan referència a l'extracció de RNA. S'obtenen de la lectura de les mostres de RNA a partir del programa d'ordinador ND-1000-V3.5.2 i responen a la concentració de RNA (ng/μL), la contaminació per alcohols i la contaminació per proteïnes.

Es van analitzar 4 models, que van ser HSJD-RBT-002, HSJD-RBT-005, HSJD-RBT-007 i HSJD-RBT-008.

Les dades es recullen en taules on es mostren els resultats. (TAULA 1, 2, 3, 4 i 5)

HSJD – RBT – 002

Mostra	Concentració (ng/μL)	260 / 280	260 / 230
PCT-009 Brain	3371,5	1,96	2,14
PCT-010 Brain	4325,8	1,56	1,67
PCT-011 Brain	2681,1	2,00	2,24
PCT-012 Brain	3814,0	1,88	2,03
PCT-013 Brain	2071,1	2,04	2,26
PCT-014 Brain	4226,9	1,53	1,61

TAULA 1. Resultats de l'extracció de RNA del model HSJD – RBT – 002.

Com es pot observar en aquets primers resultats, la concentració de RNA pot variar força, tot i que en els cervells generalment és força alta. Depèn sobretot de la mida del cervell extret. Tot i així, les diferents concentracions no indiquen diferències futures ja que prèviament a la transcripció inversa s'igualen totes les concentracions afegint-hi l'H₂O Mili-Q necessària.

Pel que fa la contaminació, en aquest model hi ha dues mostres força contaminades (PCT-010 i PCT-014) que no arriben a 1,80 ni en la contaminació per alcohols ni en la contaminació per proteïnes. Les mostres PCT-011 i PCT-013 estan

ANÀLISI D'ARNm DEL MARCADOR TUMORAL CRX
EN CERVELLS DE RATOLÍ AMB RETINOBLASTOMA HUMÀ

lleugerament contaminades per alcohols, però és pràcticament negligible i no té conseqüències posteriors.

HSJD – RBT – 005

Mostra	Concentració (ng/μL)	260 / 280	260 / 230
LOT-01 Brain	4294,4	1,65	1,81
LOT-02 Brain	4469,4	1,28	1,32
LOT-03 Brain	3855,5	1,85	2,01
LOT-04 Brain	880,8	1,98	2,28
LOT-05 Brain	2632,9	1,99	2,29

TAULA 2. Resultats de l'extracció de RNA del model HSJD – RBT – 005.

En aquest model es pot veure que hi ha una mostra altament contaminada, la LOT-02, ja que s'allunya molt dels valors a assolir tant per la contaminació per alcohols com per la contaminació per proteïnes. Hi ha altres mostres lleugerament contaminades, però aquest fet probablement no interferirà en els resultats finals; i una mostra perfecte, la LOT-03.

HSJD – RBT – 007

Mostra	Concentració (ng/μL)	260 / 280	260 / 230
RAT-01 Brain	2442,5	1,97	2,19
RAT-03 Brain	3614,8	1,88	1,95
RAT-05 Brain	2607,4	1,98	2,20
RAT-06 Brain	3826,1	1,84	1,98
RAT-07 Brain	3108,8	1,96	2,14

TAULA 3. Resultats de l'extracció de RNA del model HSJD – RBT – 007.

ANÀLISI D'ARNm DEL MARCADOR TUMORAL CRX
EN CERVELLS DE RATOLÍ AMB RETINOBLASTOMA HUMÀ

Amb els resultats obtinguts per aquest model es pot observar com cap mostra està gens contaminada, possiblement com a conseqüència d'un treball amb més precisió que amb les mostres dels altres models.

HSJD – RBVS – 008

Mostra	Concentració (ng/μL)	260 / 280	260 / 230
AAVS-01 Brain	2562,0	2,01	2,12
AAVS-02 Brain	4425,4	1,44	1,56
AAVS-03 Brain	4277,6	1,66	1,79
AAVS-05 Brain	4409,8	1,44	1,54
AAVS-06 Brain	3565,0	1,92	2,07
AAT-02 Brain	4058,5	1,77	1,91

TAULA 4. Resultats de l'extracció de RNA del model HSJD – RBVS - 008

Pel que fa al model HSJD-RBVS-008 els resultats difereixen una mica més dels desitjables. Hi ha dues mostres força contaminades (AAVS-02 i AAVS-05) i el cervell AAVS-03 també s'allunya una mica de l'interval 1,80 – 2,20; l'òptim.

GENERAL

Model	RBT002	RBT005	RBT007	RBVS008
Núm. de mostres	6	5	5	6
[RNA]±SD	3415,07±815,9	3226,6±1336,8	3119,9±541,3	3883,03±658,8
260 / 280	1,83±0,2	1,75±0,3	1,93±0,1	1,71±0,2
260 / 230	1,99±0,3	1,94±0,4	2,09±0,1	1,83±0,2

TAULA 5. Mitjanes dels paràmetres resultants de l'extracció de RNA de cada model.

ANÀLISI D'ARN_m DEL MARCADOR TUMORAL CRX
EN CERVELLS DE RATOLÍ AMB RETINOBLASTOMA HUMÀ

Es pot veure com el model menys contaminat i uniforme és el RBT007, ja que els paràmetres que indiquen la contaminació estan entre els valors òptims i a més a més tots els valors es troben propers a la mitjana.

Els models RBT005 i RBVS008 han quedat els dos lleugerament contaminats per proteïnes; però com ja s'ha esmentat abans, igualment l'experiment va procedir amb normalitat fins a esperar els resultats finals.

Pel que fa a la concentració, els quatre models han obtingut valors força similars; i tenint en compte que tot són cervells de la mateixa soca de ratolí, no és un resultat lluny de la normalitat.

DADES DE PCR I RECTES DE CALIBRAT

Els resultats de la qPCR es recullen també en unes taules on, a part dels Cts, es fan les operacions requerides pel mètode 2^{-ddCt} i s'arriba a trobar el percentatge de tumor en el cervell. (TAULA 6, 7, 8 i 9)

La mostra de cervell control sempre ha de ser "Undetermined", ja que si és cervell control vol dir que no hi ha cèl·lules tumorals i com que no s'expressa CRX aquest no emetrà fluorescència i no serà captada pel termociclador. Tot i així, pot passar que a vegades es dispari alguna fluorescència i que no posi "Undetermined" però sí que tingui un nombre molt elevat de Ct. Aquesta circumstància no només es pot donar amb el cervell control sinó també amb qualsevol mostra i es detecta perquè el Ct és més alt que el valor més alt d'una mostra de la recta.

Pel que fa a la mostra de tumor pur, és la que hauria de tenir el valor de Ct més baix ja que expressa més CRX i la fluorescència és captada ràpidament. No obstant, no dona cap resultat en el Ct del gen de referència, el TBP. Això és degut a que les cèl·lules tumorals pures no han estat injectades al ratolí, són extretes directament del pacient; per tant, no posseeixen gens de ratolí. El TBP en aquest cas és M-TBP, ja que és de ratolí, i consegüentment les mostres de tumor no reaccionen amb el primer de MTBP perquè el tumor pur són cèl·lules exclusivament humanes, i l'altre és un gen de ratolí. Per tant, per a poder fer les operacions següents; es considera com a Ct de TBP del tumor pur, la mitjana dels Cts de les altres mostres.

A més, s'espera que els percentatges de la recta s'aproximin tant com sigui possible als reals. És a dir, que el tumor pur tingui un 100%, que el diluït a 10^{-1} , un 10%, el 10^{-2} , un 1%, el 10^{-3} , un 0,1%, i així successivament.

HSJD – RBT – 002

Mostra	Gen	mCt	Gen	mCt	dCt	ddCt	2 ^{-ddCt}	Log 2 ^{ddCt}	Càrrega tumoral	% tumor
RBT02	CRX	22,598892	M-TBP	33,227941	-10,65111	-12,69111	6613,085	3,820404	0,063851	115,838008
10⁻¹	CRX	25,807465	M-TBP	33,209862	-7,402397	-9,442397	695,7365	2,842445	-0,921002	11,994931
10⁻²	CRX	29,807119	M-TBP	33,219139	-3,412020	-5,452020	43,77453	1,641221	-2,130693	0,740128
10⁻³	CRX	33,248123	M-TBP	33,037548	0,210575	-1,829425	3,553954	0,550712	-3,228890	0,059035
10⁻⁴	CRX	35,481705	M-TBP	33,445213	2,036491	-0,003509	1,002435	0,001056	-3,782421	0,016504
10⁻⁵	CRX	Undetermined	M-TBP	33,227941	-	-	-	-	-	-
BC	CRX	Undetermined	M-TBP	33,710060	-	-	-	-	-	-
PCT009	CRX	Undetermined	M-TBP	32,580437	-	-	-	-	-	-
PCT010	CRX	Undetermined	M-TBP	34,032127	-	-	-	-	-	-
PCT011	CRX	Undetermined	M-TBP	33,098473	-	-	-	-	-	-
PCT012	CRX	Undetermined	M-TBP	33,950241	-	-	-	-	-	-
PCT013	CRX	Undetermined	M-TBP	33,829960	-	-	-	-	-	-
PCT014	CRX	Undetermined	M-TBP	33,882813	-	-	-	-	-	-

TAULA 6. Resultats de la qPCR del model HSJD – RBT – 002 i operacions corresponents.

HSJD – RBT – 005

Mostra	Gen	mCt	Gen	mCt	dCt	ddCt	2 ^{-ddCt}	Log 2 ^{ddCt}	Càrrega tumoral	% tumor
RBT05	CRX	24,746891	M-TBP	33,400000	-8,653109	-8,203109	294,701170	2,469382	-0,008760	98,003066
10⁻¹	CRX	28,796497	M-TBP	33,455059	-4,658562	-4,208562	18,488570	1,266903	-0,982506	10,411037
10⁻²	CRX	32,882103	M-TBP	33,330803	-0,448700	0,001300	0,999099	-0,000391	-2,008739	0,980080
10⁻³	CRX	Undetermined	M-TBP	33,279305	-	-	-	-	-	-
10⁻⁴	CRX	Undetermined	M-TBP	33,273582	-	-	-	-	-	-
10⁻⁵	CRX	Undetermined	M-TBP	34,430077	-	-	-	-	-	-
BC	CRX	36,507969	M-TBP	33,124138	3,383831	3,833831	0,070130	-1,154098	-2,942990	0,114028
LOT001	CRX	Undetermined	M-TBP	30,964699	-	-	-	-	-	-
LOT002	CRX	Undetermined	M-TBP	30,559189	-	-	-	-	-	-
LOT003	CRX	Undetermined	M-TBP	31,064245	-	-	-	-	-	-
LOT004	CRX	37,209530	M-TBP	30,846928	6,362602	6,812602	0,008896	-2,050798	-3,669121	0,021423
LOT005	CRX	37,817039	M-TBP	30,695301	7,121738	7,571738	0,005256	-2,279320	-3,854175	0,013990

TAULA 7. Resultats de la qPCR del model HSJD – RBT – 002 i operacions corresponents.

HSJD – RBT – 007

Mostra	Gen	mCt	Gen	mCt	dCt	ddCt	2 ^{-ddCt}	Log 2 ^{ddCt}	Càrrega tumoral	% tumor
RBT07	CRX	27,796589	M-TBP	32,5	-4,703411	-8,62	394,371395	2,59590541	0,010278151	102,3948586
10⁻¹	CRX	32,120747	M-TBP	32,377724	-0,256977	-4,18	18,0882017	1,25739539	-1,02053434	9,538183294
10⁻²	CRX	35,821159	M-TBP	31,897713	3,923447	0,00	0,99761381	-0,0010376	-1,98967792	1,024052173
10⁻³	CRX	35,845600	M-TBP	30,760778	-	-	-	-	-	-
10⁻⁴	CRX	Undetermined	M-TBP	31,140076	-	-	-	-	-	-
10⁻⁵	CRX	39,723740	M-TBP	31,226994	8,496746	4,58	0,04190464	-1,3777379	-3,04990148	0,089145314
BC	CRX	Undetermined	M-TBP	31,182413	-	-	-	-	-	-
RAT001	CRX	36,905521	M-TBP	27,123844	9,781677	5,86	0,01719726	-1,7645407	-3,34778583	0,044896674
RAT003	CRX	39,698067	M-TBP	27,498087	12,199980	8,28	0,0032172	-2,4925223	-3,90841856	0,012347568
RAT005	CRX	31,747940	M-TBP	26,924942	4,822998	0,90	0,53477427	-0,2718295	-2,19822004	0,633548631
RAT006	CRX	Undetermined	M-TBP	28,784534	-	-	-	-	-	-
RAT007	CRX	Undetermined	M-TBP	36,770561	-	-	-	-	-	-

TAULA 8. Resultats de la qPCR del model HSJD – RBT – 007 i operacions corresponents.

HSJD – RBVS – 008

Mostra	Gen	mCt	Gen	mCt	dCt	ddCt	2 ^{-ddCt}	Log 2 ^{ddCt}	Càrrega tumoral	% tumor
RBVS08	CRX	20,370346	M-TBP	33,330000	-12,95965	-11,84965	3690,636490	3,567101	-0,025999	94,189235
10⁻¹	CRX	24,435934	M-TBP	33,606163	-9,170229	-8,060229	266,913591	2,426371	-1,166729	6,811938
10⁻²	CRX	28,071537	M-TBP	33,343674	-5,272137	-4,162137	17,903090	1,252928	-2,340172	0,456907
10⁻³	CRX	32,295586	M-TBP	33,401314	-1,105728	0,004272	0,997043	-0,001286	-3,594386	0,025446
10⁻⁴	CRX	33,629925	M-TBP	34,007866	-0,377941	0,732059	0,602044	-0,220372	-3,813472	0,015365
10⁻⁵	CRX	Undetermined	M-TBP	33,805977	-	-	-	-	-	-
BC	CRX	Undetermined	M-TBP	33,074162	-	-	-	-	-	-
AAVS001	CRX	38,172775	M-TBP	30,519800	7,652975	8,762975	0,002302	-2,637918	-6,231018	0,000059
AAVS002	CRX	37,230717	M-TBP	30,689262	6,541454	7,651454	0,004974	-2,303317	-5,896417	0,000127
AAVS003	CRX	38,319065	M-TBP	30,638830	7,680235	8,790235	0,002259	-2,646124	-6,239224	0,000058
AAVS005	CRX	37,553375	M-TBP	29,652632	7,900743	9,010743	0,001939	-2,712504	-6,305604	0,000049
AAVS006	CRX	36,751045	M-TBP	30,005529	6,745516	7,855516	0,004318	-2,364746	-5,957846	0,000110
AAT002	CRX	35,429142	M-TBP	29,766010	5,663132	6,773132	0,009143	-2,038916	-5,632016	0,000233

TAULA 9. Resultats de la qPCR del model HSJD – RBVS – 008 i operacions corresponents.

Observant la taula dels resultats del model RBT02, podem veure com totes les mostres tenen el Ct del gen M-TBP gairebé igual; per tant, les mostres han estat ben processades i no hi ha hagut errors prou grans com perquè poguessin alterar els resultats, tot i tenir alguna mostra una mica contaminada.

A més, es pot observar que la qPCR en aquest model pot arribar a detectar fins a 1 cèl·lula cancerígena entre 10.000 cèl·lules sanes, s'ha detectat el tumor en la dissolució a 10^{-4} , però en canvi ja no s'han trobat cèl·lules cancerígenes a la dissolució de 10^{-5} i, com era d'esperar, tampoc s'han detectat en el cervell control, mostra que estava totalment sana.

Pel que fa a les mostres d'aquest model, totes tenen com a resultat "Undetermined", que significa que la qPCR no ha detectat cap senyal de fluorescència i per tant cap cèl·lula cancerígena, no hi ha hagut expressió de CRX.

Respecte al model RBT05, tot i no tenir els resultats del Ct del gen M-TBP tan iguals com en el model anterior, són prou similars com per poder afirmar que els resultats són vàlids i representatius. En aquest cas, el cervell control ha donat una mostra de fluorescència, però es pot considerar que s'ha disparat una fluorescència accidentalment; donat que el Ct és més alt que el més alt de les mostres detectades. És a dir, considerant que el màxim que pot detectar és d'una cèl·lula cancerígena entre 100 i que el Ct d'aquesta mostra (10^{-2}) és 32,88; no podem afirmar que en una mostra, en la qual el Ct hagi donat 36,51, contingui cèl·lules tumorals.

El mateix cas passa amb les mostres LOT004 i LOT005; tot i que la qPCR ha detectat una mínima fluorescència, o sigui, expressió de CRX, té un Ct tan elevat i superior a 32,88 que es consideraran mostres lliures de tumor. D'altra banda, les altres mostres tenen com a resultat "Undetermined" i, per tant, el retinoblastoma tampoc ha arribat a aquests cervells.

En quant al model RBT07, podem considerar com a acceptables els resultats dels Cts del gen M-TBP, a més tenint en compte que cap mostra d'aquest model havia estat contaminada ni per alcohols ni per proteïnes.

El cervell control en aquest cas ha donat el resultat esperat, “Undetermined”, i tot i que s’ha pogut detectar tumor fins a la dilució 10^{-3} , es considerarà només fins a la dilució 10^{-2} perquè els Cts de les dues són pràcticament iguals. Fet indicatiu que la qPCR ja no pot detectar més. Es pot veure com la dilució de 10^{-4} ha donat “Undetermined” i en canvi en la de 10^{-5} s’ha detectat una mica de fluorescència. Aquest fet pot ser degut a dues opcions. Que la qPCR només pugui detectar expressió de CRX fins a la dilució de 10^{-3} i que en la de 10^{-5} s’hagi disparat una fluorescència a l’atzar com ja ha passat en altres ocasions. O que les mostres de 10^{-4} i 10^{-5} en algun moment del procediment experimental fossin accidentalment intercanviades i que per tant es pugui detectar una cèl·lula de retinoblastoma entre 10.000. Davant d’aquestes possibilitats, s’ha escollit la primera opció ja que només podem considerar totalment fiables els resultats fins a la dilució 10^{-2} i que a partir d’aquí la qPCR no pot detectar expressió de CRX.

No obstant, considerant les mostres RAT001 i RAT003 com a lliures de tumor ja que tenen un Ct més elevat que la dilució de 10^{-2} , s’ha detectat una mostra en què s’hi ha produït disseminació extraocular ja que la fluorescència s’ha identificat bastant a l’inici de la qPCR i té un Ct entre el tumor pur i la dilució del tumor a 10^{-1} . Les altres dues mostres no contenen cèl·lules tumorals.

Sobre el model RBVS008, els Cts de TBP són força igualats i, a l’igual que els models anteriors, podem considerar que els resultats són fiables. En aquest cas la qPCR ha pogut detectar fluorescència, expressió de CRX, fins a la dilució de 10^{-4} ; és a dir, pot detectar una cèl·lula tumoral entre 10.000. La mostra de cervell control ha donat negativa, fet perfectament esperat que fa comprovar que era cervell control i per tant no hi havia cèl·lules de retinoblastoma.

Pel que fa a les mostres pertanyents a aquest model, tot i que cap d’elles ha donat com a resultat “Undetermined” i, per tant, en totes s’ha detectat una mínima fluorescència. No podem afirmar que hi hagi cèl·lules tumorals perquè el seu Ct és més elevat que el de la màxima detecció per la qPCR d’aquest model. De manera que no hi ha ni una cèl·lula tumoral d’entre 10.000 de sanes i, per tant, es considerarà que en totes les mostres s’ha disparat accidentalment una fluorescència i que en cap mostra s’hi ha produït metàstasi.

Finalment, els resultats es recullen en unes rectes de calibrat on visualment es pot observar si hi ha hagut disseminació extraocular al CNS en alguna de les mostres de cervell.

Les rectes de calibrat es fabriquen artificialment, fent un gràfic amb les dades de les mostres de cèl·lules tumorals pures i totes les dilucions en què hagi sigut detectada la fluorescència i per tant que s'hi hagi expressat CRX; utilitzant els valors de $\log(2^{-ddCt})$ de cada una d'elles.

A més, de la recta se'n busca el pendent i l'ordenada a l'origen per a calcular la càrrega tumoral de la mostra i el percentatge de tumor en la mostra. A part d'això, es busca quin és el coeficient de correlació i s'eleva al quadrat amb la finalitat que els resultats estiguin entre 0 i 1; essent 0 molt baixa correlació i 1 molt alta. Per tant, com més s'acosti el coeficient de correlació al quadrat a 1, voldrà dir que més precises i exactes són les mostres amb les quals formem la recta de calibrat.

Els gràfics següents mostren les rectes de calibrat de cada model. (FIGURA 26, 27, 28 i 29)

HSJD – RBT – 002

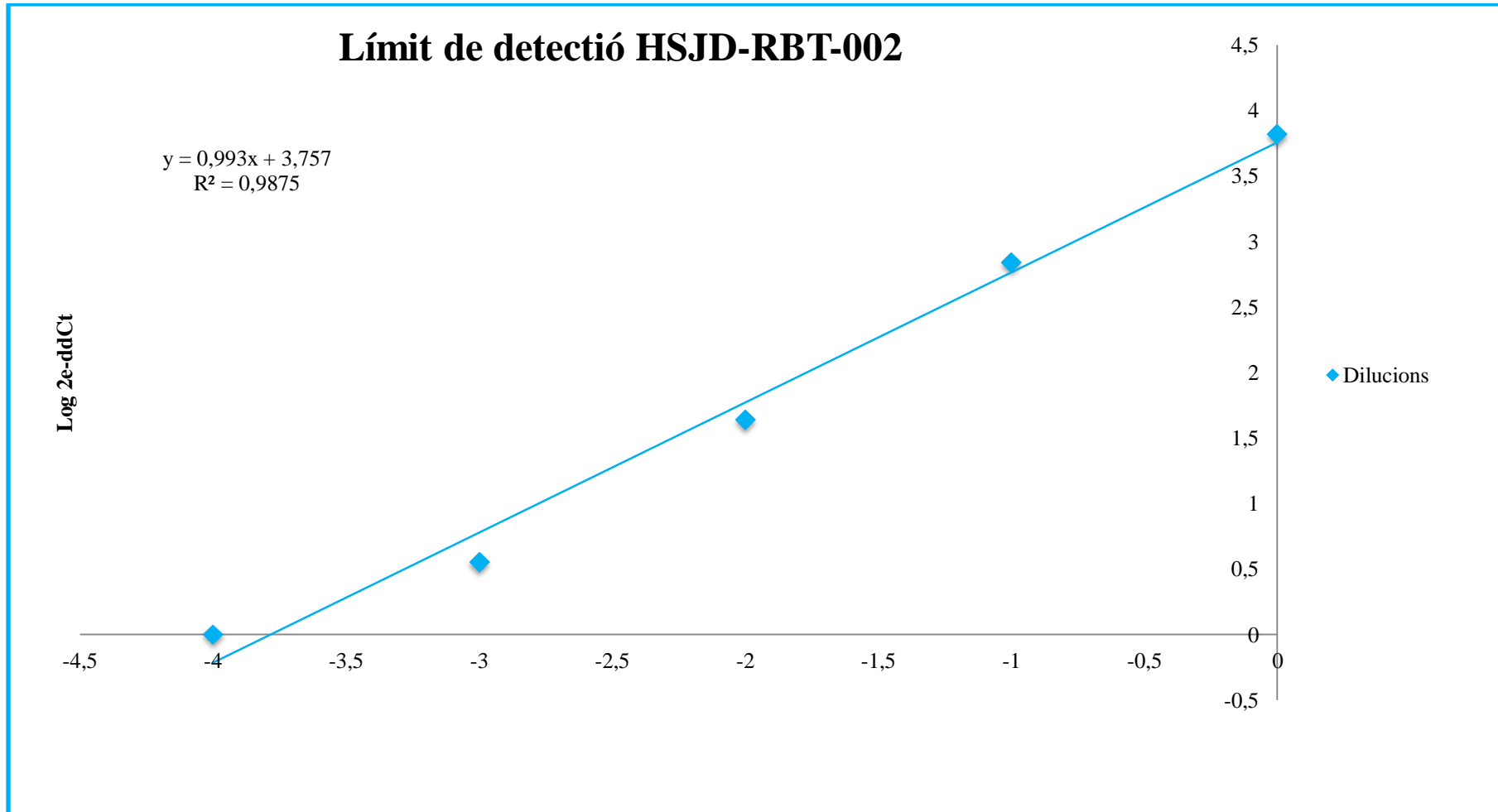


FIG. 26. Recta de calibrat del model HSJD-RBT-002.

HSJD – RBT – 005

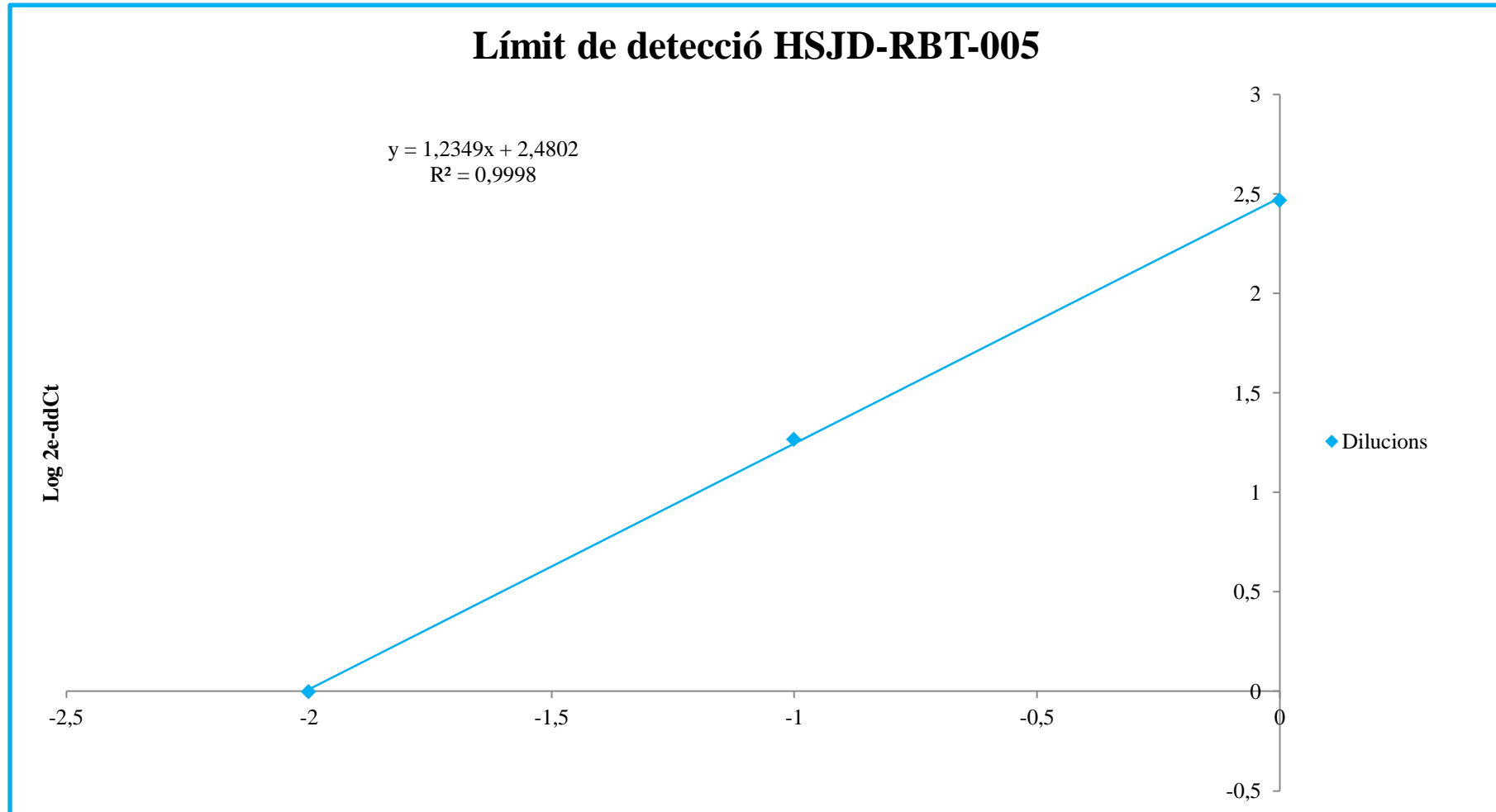


FIG. 27. Recta de calibrat del model HSJD-RBT-005.

HSJD – RBT – 007

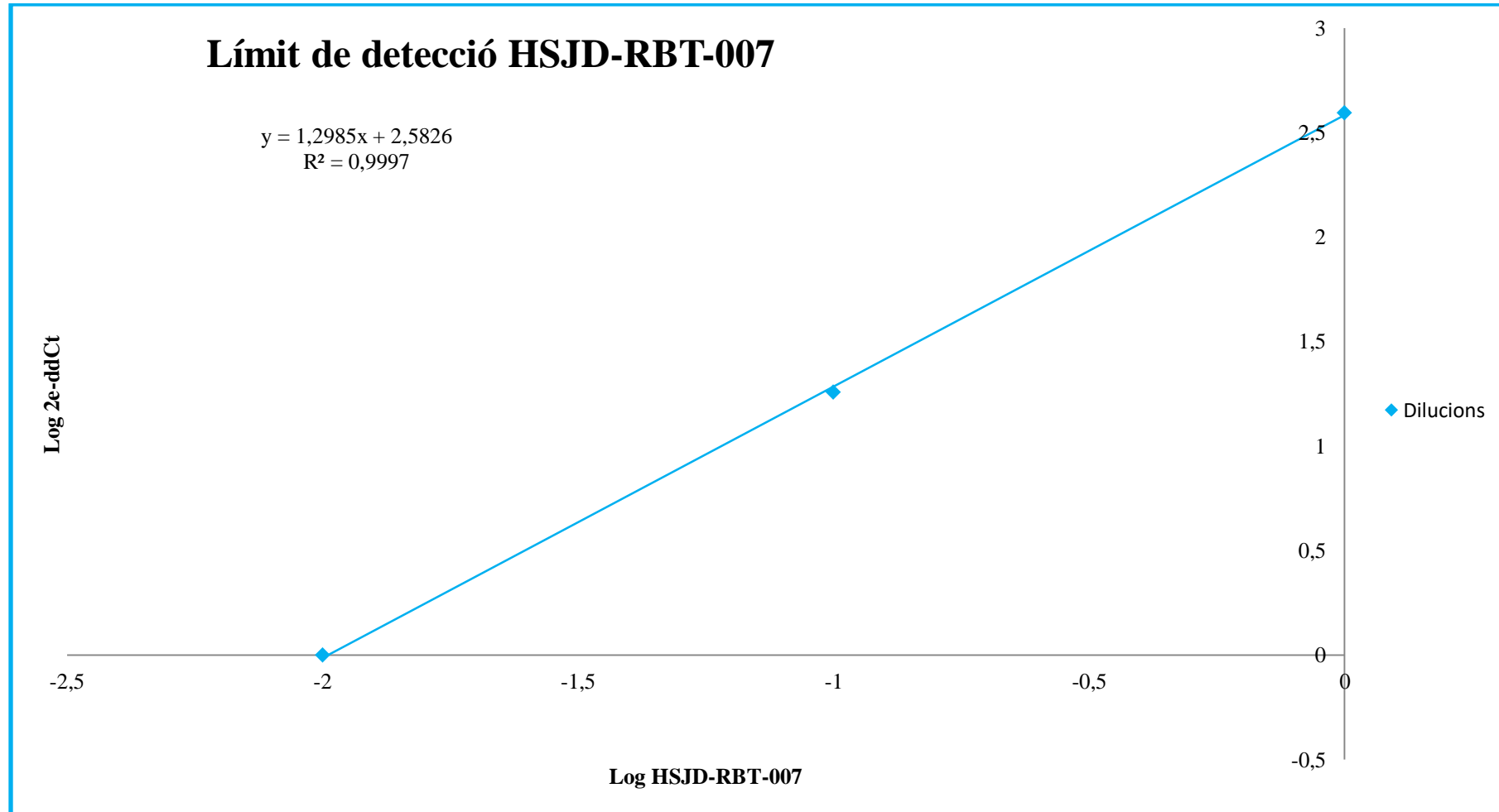


FIG. 28. Recta de calibrat del model HSJD-RBT-007.

HSJD – RBVS – 008

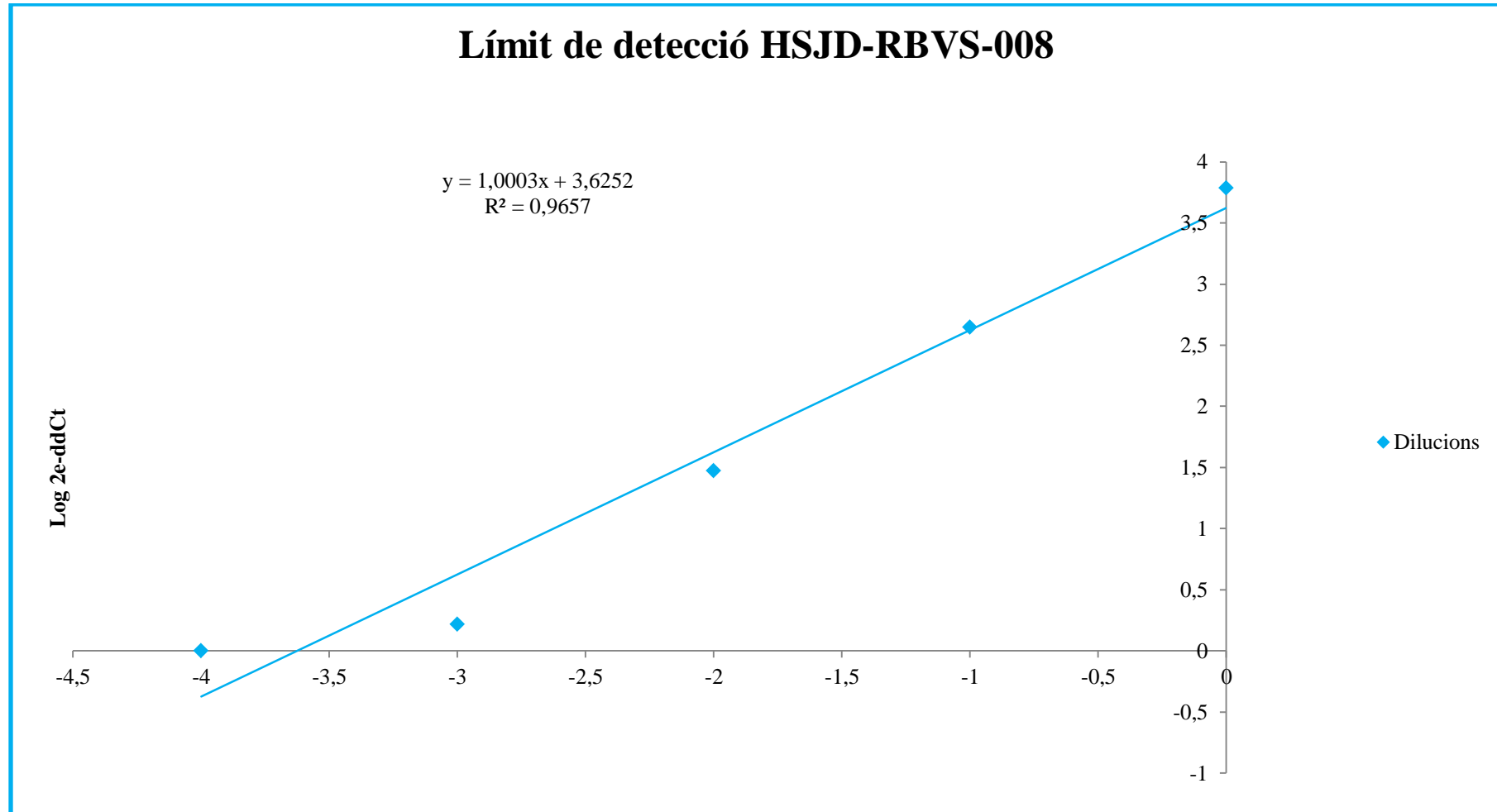


FIG. 29. recta de calibrat del model HSJD-RBVS-008.

A la recta de calibrat del model HSJD-RBT-002, hi consten el tumor pur i les dilucions fins a 10^{-4} , que és fins on s'ha detectat expressió de CRX. Es pot constatar com les mostres estan bastant alineades, comprovant-ne el coeficient de correlació al quadrat, que en aquest cas és de 0,9875. A més de poder ser comprovat amb el coeficient de correlació, també es pot veure amb les taules anteriors, fixant-se amb el percentatge de tumor. En aquest model els percentatges són de 115,84%, 11,99%, 0,74%, 0,06% i 0,02% respectivament, uns resultats no massa allunyats dels teòrics.

Pel que fa al model HSJD-RBT-005, les dilucions han sortit gairebé perfectament alineades, tenint un coeficient de correlació de 0,9998 i uns percentatges de 98,00%, 10,41% i 0,98% respectivament; però malauradament només s'ha detectat fluorescència fins a la mostra de 10^{-2} i per tant a la recta només hi consten 3 punts.

Sobre el model HSJD-RBT-007, té les dilucions també quasi perfectament alineades, amb un coeficient de correlació de 0,9997. La qPCR ha pogut detectar expressió de CRX fins a 1 cèl·lula entre 100, o sigui, fins a la dilució de 10^{-2} . Per tant, consten 3 punts a la recta que anteriorment s'havia vist que tenien uns percentatges de 102,39%, 9,54% i 1,02% respectivament.

El darrer model, el HSJD-RBVS-008, té les dilucions força alineades, amb un coeficient de correlació del 0,9657 i uns percentatges de 94,19%, 6,81%, 0,46%, 0,025% i 0,015% respectivament, una mica allunyats dels teòrics. Ha detectat fins a la dilució de 10^{-4} , igual que el model HSJD-RBT-002.

ANÀLISI DE CRX EN LES MOSTRES DE CERVELL

La disseminació extraocular al sistema nerviós central en les mostres analitzades s'ha caracteritzat utilitzant les dades de la qPCR i comparant els resultats de les mostres amb els de les dilucions de la recta de calibrat.

Es pot deduir quines mostres hauran patit metàstasi comparant els Cts de les mostres amb els de les dilucions, però per quantificar exactament la presència tumoral en una mostra és necessari fer el seguit d'operacions del mètode 2^{-ddCt} .

Per considerar que una mostra conté tumor aquesta ha d'estar dins la recta de calibrat. És a dir, tenint en compte els resultats dels $\text{Log } 2^{-ddCt}$ de les mostres, es comprova si aquests estan entre els valors de $\text{Log } 2^{-ddCt}$ de les dilucions o les cèl·lules tumorals pures. És comparable observant les rectes de calibrat de cada model incloent-hi les mostres que no han donat "Undetermined" (FIG. 30, 31 i 32).

HSJD – RBT – 005

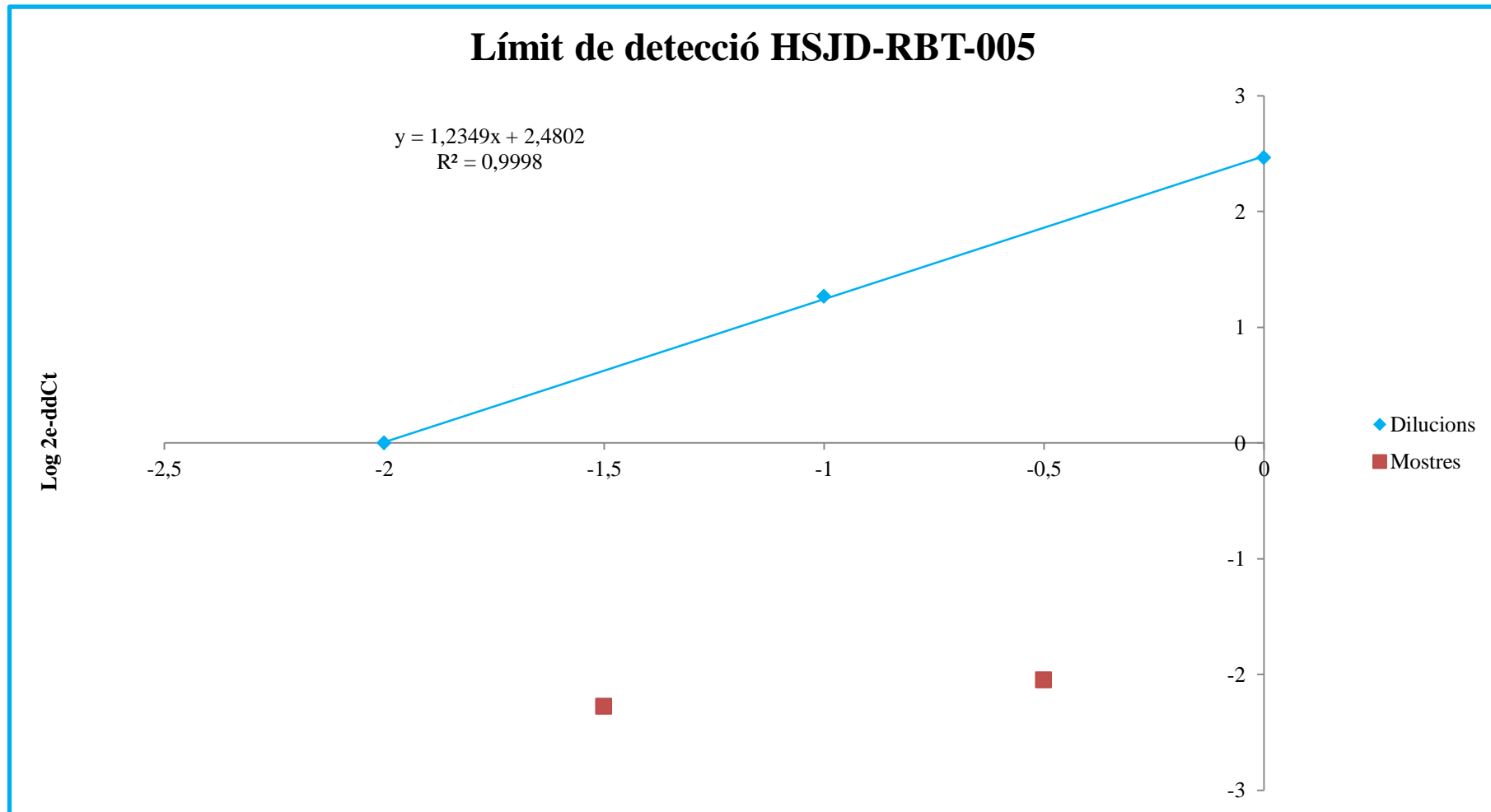


FIG. 30. Recta de calibrat del model HSJD-RBT-005 amb les mostres que no han donat “Undetermined”.

HSJD – RBT – 007

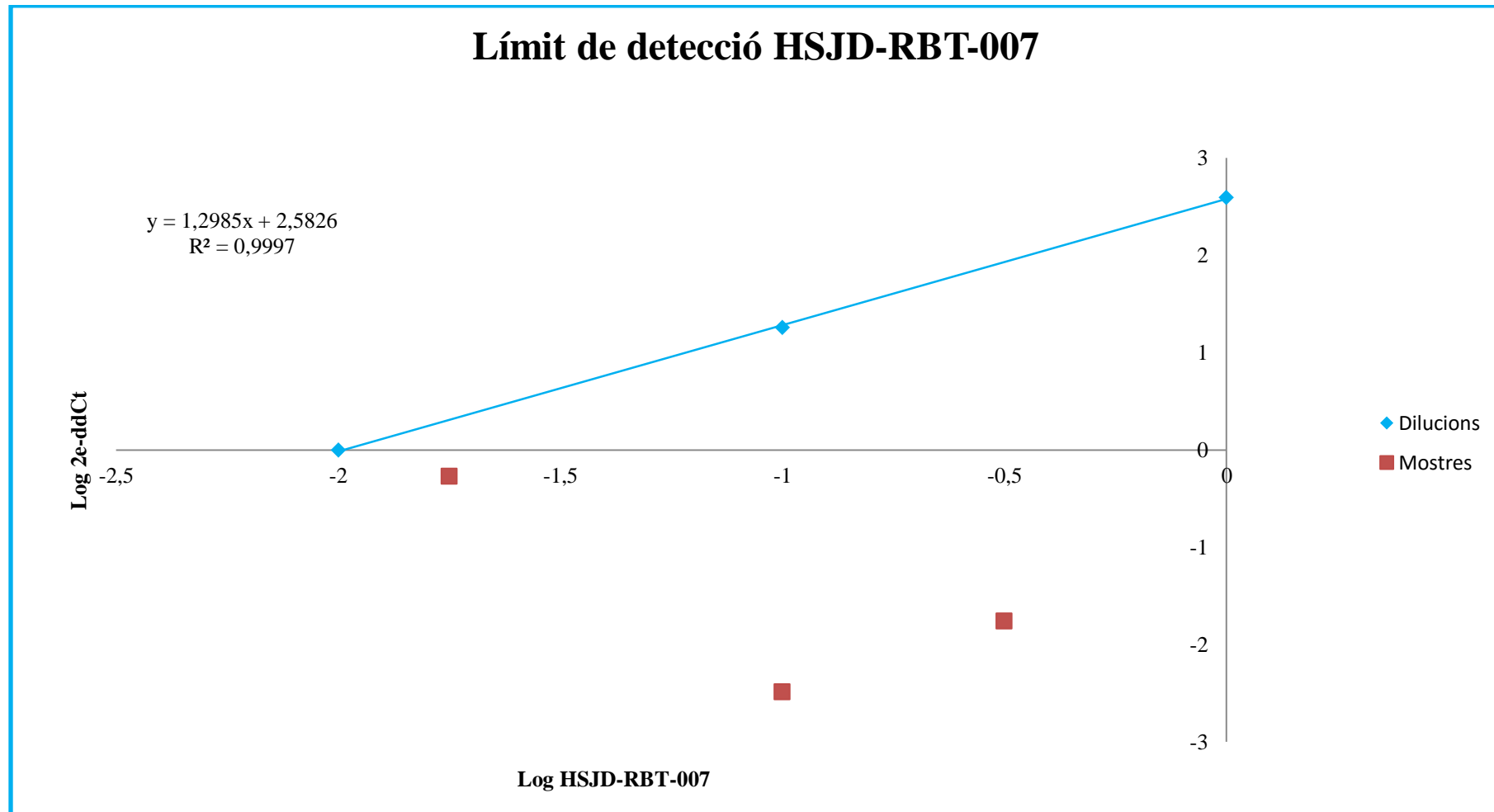


FIG. 31. Recta de calibrat del model HSJD-RBT-007 amb les mostres que no han donat "Undetermined".

HSJD – RBVS – 008

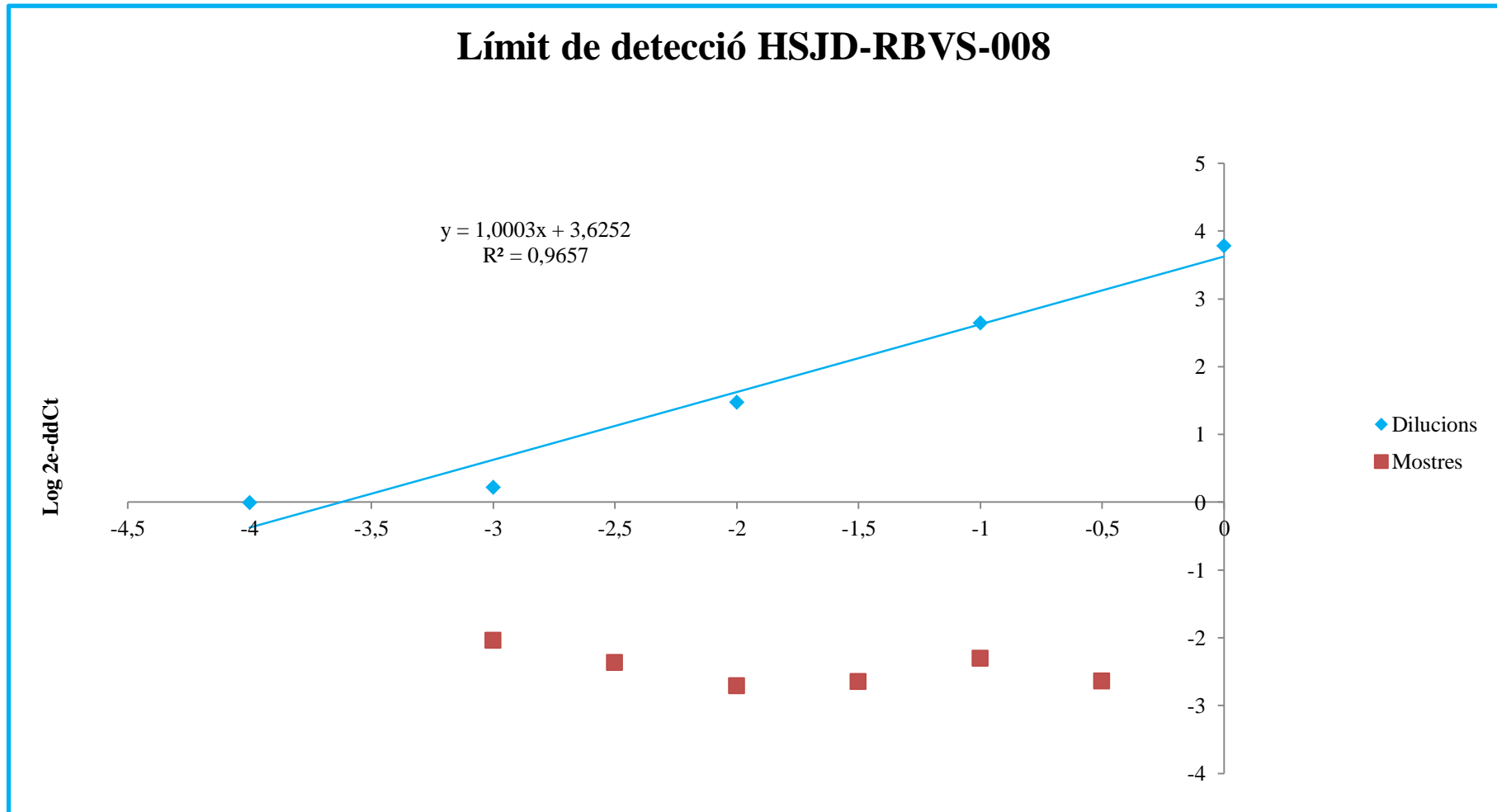


FIG. 32. Recta de calibrat del model HSJD-RBVS-008 amb les mostres que no han donat “Undetermined”.

Pel que fa al model HSJD-RBT-002, totes les mostres han donat “Undetermined”.

En el model HSJD-RBT-005, s’hi ha pogut afegir dues mostres a la recta, la LOT04 i la LOT05, però veient el gràfic es veu clarament que les mostres estan fora de la recta, és a dir, que no tenen tumor i que la fluorescència s’ha disparat sola.

Observant el gràfic del model HSJD-RBT-007, es pot veure que hi ha 3 mostres que no han donat “Undetermined”, dues que clarament estan fora de la recta i per tant que no hi ha tumor i la fluorescència s’ha disparat sola. Amb tot però n’hi ha una, la RAT005 que es podria considerar que entra dins la recta i que per tant aquesta mostra de cervell havia patit disseminació extraocular al CNS. Aquesta mostra ha donat un Ct de 31,75, ha necessitat menys cicles que la dilució de 10^{-1} per detectar expressió de CRX. El seu percentatge és d’un 0,63% de retinoblastoma

Tot i que cap mostra del model HSJD-RBVS-008 ha donat “Undetermined”, en el gràfic es pot veure com cap entra dins la recta, totes estan per sota, de manera que es pot afirmar que la fluorescència detectada per la qPCR s’ha disparat sola. A més, la mostra que representa que contindria més tumor donaria un percentatge tumoral de 0,0002%, és a dir que pràcticament nul.

A part, el percentatge de càrrega tumoral en cada mostra també és clarament indicador de si s’ha expressat CRX en la mostra o si la fluorescència detectada s’ha disparat accidentalment. (FIG. 33)

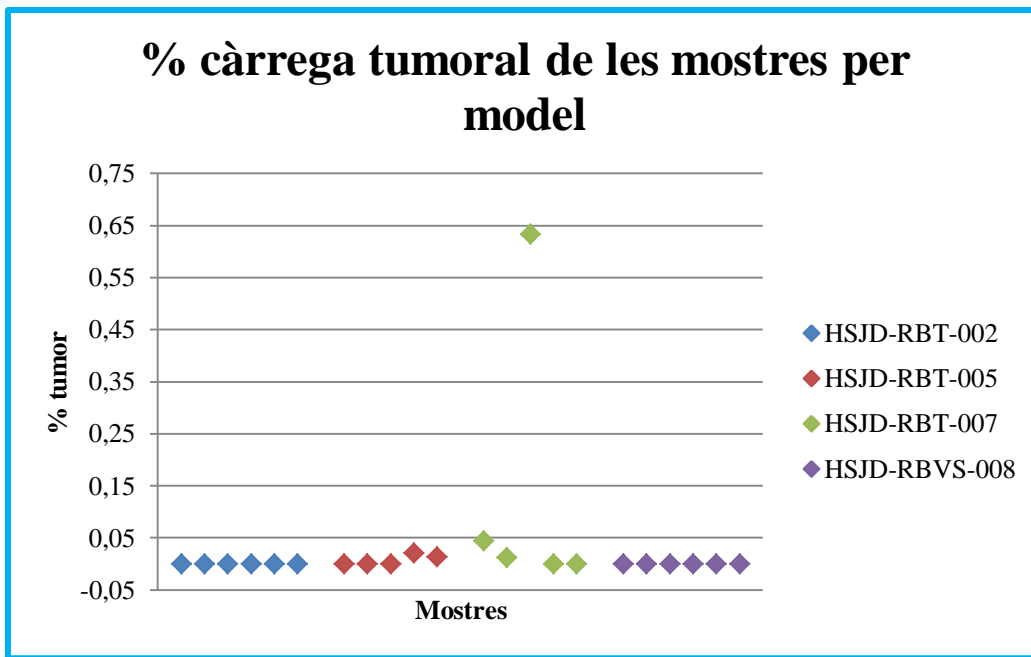


FIG. 33. Càrrega tumoral de cada mostra de cervell separades pels diferents models.

Com es pot observar en el gràfic, una mostra d'entre les 22 que formen els 4 models, té un percentatge de càrrega tumoral suficientment representatiu com per afirmar que aquest ratolí ha patit metàstasi cap al cervell. Es tracta de la mostra RAT005 del model HSJD-RBT-007.

El percentatge de retinoblastoma de les altres mostres és pràcticament negligible, ja que el més probable és que durant la qPCR s'hagi disparat una fluorescència sola accidentalment.

Les mostres que com a resultat de la qPCR havien donat "Undetermined" se'ls ha comptat un 0% de càrrega tumoral en el gràfic.

DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

Pel que fa a l'extracció de RNA, ha estat factible extreure'n concentracions força altes de totes les mostres de cervells de ratolí, demostrant que la tècnica emprada és encertada. Tot i que fàcilment s'ha extret una quantitat abundant de RNA, algunes de les mostres han donat un resultat de contaminació positiu, indicant que aquestes s'han contaminat durant el procés d'extracció.

La contaminació per proteïnes es produeix bàsicament quan, després de la primera centrifugació de les mostres, s'ha de pipetejar el cloroform amb l'RNA tenint just a sota una capa de proteïnes. Si en aquest moment també es pipetegen proteïnes, aquestes ja queden a la mostra durant tot el procés, formant part del pellet.

Quan una mostra és contaminada per alcohols, en canvi, és a causa de no realitzar un pipeteig total de l'etanol després de fer-se l'últim spin. Resta encara etanol a les parets del tub eppendorf i quan s'afegeix l'H₂O Mili-Q a les mostres s'obté una mescla totalment homogènia i, per tant, impossible de veure a simple vista.

Tot i així, en aquest treball s'han inclòs totes les mostres en els procediments posteriors, ignorant-ne la contaminació. Es continua l'experiment amb totes les mostres ja que tot i semblar contaminades podrien arribar a ser llegides correctament pel termociclador que duu a terme la qPCR, i per tant, donar resultats fiables. Per saber si han quedat alterades per alcohols o proteïnes, s'ha de comprovar que el Ct del gen control (TBP) no difereixi de les mostres lliures de contaminació.

No obstant, s'ha pogut comprovar que l'error en el procés d'extracció de RNA no és degut a la contaminació de les mostres, sinó a no haver-les diluït suficientment abans de ser llegides pel programa informàtic ND-1000 V3.5.2. Documentant-se amb el manual de l'Espectrofotòmetre NanoDrop 1000, l'aparell on es carrega la mostra, s'ha observat que aquest té un límit de detecció de 2ng/μL fins a 3000ng/μL. Coincideix exactament que aquelles mostres que han donat un resultat de contaminació positiu, sobrepassen els 4000ng/μL, una concentració molt superior en comparació amb el límit de detecció del NanoDrop. Per tant, la fallada ha estat no haver diluït més les mostres de cervell i es confia que s'han obtingut bons resultats en tots els paràmetres.

En l'obtenció de les línies cel·lulars, s'ha comprovat que efectuant una qPCR es poden detectar cèl·lules humanes en mostres de ratolins, i que és encertat quantificar la presència de retinoblastoma mitjançant l'anàlisi de l'expressió de CRX.

La intenció inicial era poder detectar com a mínim una cèl·lula de retinoblastoma entre 100 cèl·lules de ratolí. Els resultats pel que fa a aquest paràmetre han estat bastant satisfactoris. En tots els models de retinoblastoma s'ha pogut detectar fins a la dilució de 10^{-2} , és a dir, la concentració esmentada anteriorment. Tot i així, en dos models s'ha pogut detectar fins a la dilució de 10^{-4} , és a dir, una cèl·lula de retinoblastoma d'entre 10.000 cèl·lules sanes; una detecció 100 vegades major de l'esperada.

Conseqüentment, una diferència que es pot apreciar entre els 4 models, és l'expressió de CRX de cada un. Es pot comprovar que tots els tumors, tot i ser del mateix tipus, són diferents. Es veu clarament mirant els Cts de les cèl·lules tumorals, on hi ha tumor pur; alguns poden ser detectats amb només uns 20 cicles i d'altres en necessiten fins a 27. Per tant, no es podria utilitzar la mateixa recta per a tots els models perquè no expressen el CRX de la mateixa manera i en alguns la qPCR només és capaç de detectar fins a la dilució de 10^{-2} i d'altres fins a la de 10^{-4} .

En aquest cas es pot veure com el model RBT07 té poca expressió de CRX, ja que necessita molts cicles perquè sigui detectada la fluorescència en la mostra de cèl·lules tumorals pures; i en canvi el model RBVS08 té una expressió de CRX molt més elevada. Amb menys cicles la qPCR és capaç de detectar fluorescència en la mostra del tumor pur. Per tant, si es posa pel cas que es tingués com a referent la recta del model RBT07 per les mostres del model RBVS08, es diria que AAT002 contindria tumor, i en canvi, no en té.

Aquests resultats es correlacionen correctament amb els resultats a nivell d'expressió de CRX d'un altre experiment de *Western blot* dut a terme per Guillem Pascual. (FIG. 34)

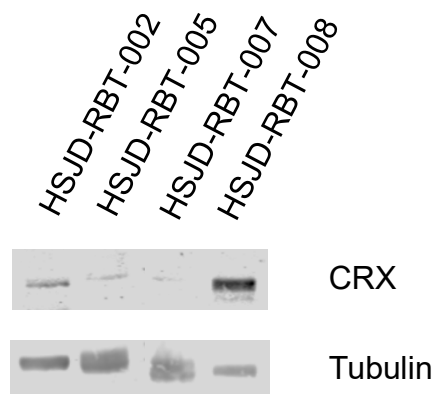


FIG. 34. Resultats de *Western blot* dels models estudiats. Els models RBT002 i RBT008 tenen una expressió més elevada de CRX.

A més, també es correlacionen amb els resultats obtinguts d'un estudi publicat a l'article "Association of Cone-Rod Homeobox Transcription Factor Messenger RNA with Pediatric Metastatic Retinoblasoma" de *JAMA Ophthalmology*, on es demostra que tot i que tots els models retinoblastoma presenten una expressió alta de CRX, s'expressa de manera relativa per a cada model. (FIG. 35)

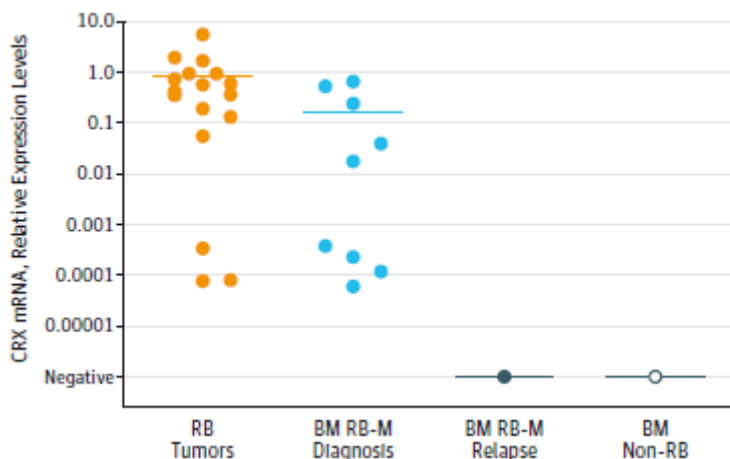


FIG. 35. Nivells d'expressió relatiu de l'mRNA de CRX, no tots els models expressen el CRX en la mateixa mesura.

A més de diferenciar-se cada model pel que fa al nivell d'expressió de CRX, entre molts altres aspectes no treballats en aquest estudi, també s'ha comparat que cadascun d'ells presenta unes corbes i dies de supervivència diferents. (FIG. 36)

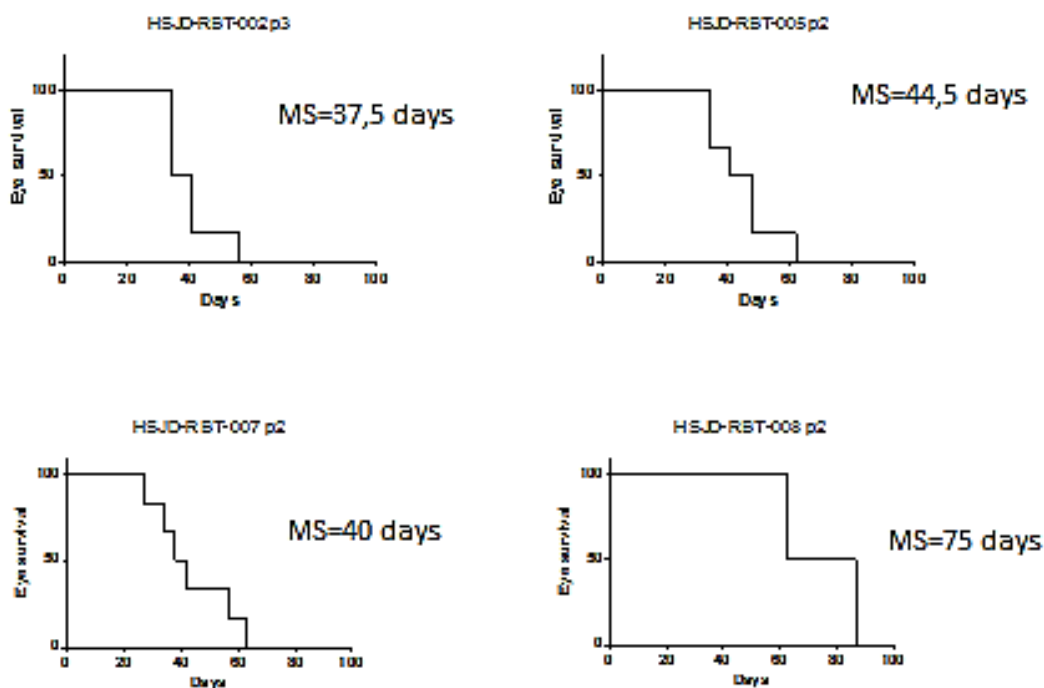


FIG. 36. Corbes de supervivència de cada model

En les corbes de supervivència es pot observar la supervivència dels ulls de cada model. Al principi, el 100% dels ulls estan vius; però a mesura que passen els dies aquest percentatge disminueix, és a dir, els ulls es van enucleant.

Es comprova que hi ha tres models en que la supervivència dels ulls és relativament similar, però el model HSJD-RBT-008 té gairebé el doble de supervivència que els altres. Aquest paràmetre depèn en part de l'agressivitat de cada model i la forma de desenvolupament que té.

A part de la durada dels ulls, es pot comprovar que hi ha models en què els ulls dels ratolins evolucionen de forma diferent; és a dir, que en alguns ulls el retinoblastoma es desenvolupa més ràpidament que en altres tot i ser el mateix model. Un clar exemple és el model HSJD-RBT-007, en el qual alguns ulls s'han hagut d'enuclear al cap de poc més de vint dies, i els altres van arribant a l'estadi 3 de tumor a diferents velocitats, fins que n'hi ha que han sobreviscut més de 60 dies. D'altra banda, el model HSJD-RBT-008 s'han enucleat el 50% dels ulls en 60 dies i tota l'altra meitat al cap d'uns 90 dies.

Comparant la càrrega tumoral i la supervivència dels ulls a cada model, no se'n pot deduir una clara relació. El model que ha tingut menys supervivència, en aquest cas el HSJD-RBT-002, i el model en el que els ratolins s'han sacrificat més tard, concretament el doble de dies, tenen uns resultats força equivalents. En els dos models no es presenta cap cervell amb metàstasi, és a dir que no hi ha ratolins que hagin patit disseminació extraocular. A més, són els models amb més expressió de CRX ja que la qPCR, ha detectat fluorescència en els dos casos fins a la dilució de 10^{-4} . Per tant, tot i ser el màxim diferenciats pel que fa a la supervivència dels ulls, tots els altres resultats són relativament semblants.

Havent comprovat uns resultats favorables dels objectius 1 i 2, s'ha aplicat la tècnica proposada a les mostres dels ratolins.

En els 4 models analitzats, la metàstasi al cervell ha estat escassa: només una mostra d'un dels models ha donat positiva. No obstant, en estudis posteriors del model RBT002 s'han detectat mostres on s'havia produït la disseminació, mentre que en aquest estudi totes han donat negatives. Aquesta desconcordança pot ser deguda a dos

aspectes. Podria ser que hagi estat casualitat i que el baix nombre de mostres analitzades en aquest estudi sigui insuficient per ser representatiu pel model. D'altra banda, cal considerar que l'estudi dut a terme per Guillem Pascual és posterior, és a dir, les cèl·lules tenen un "pase" més alt; i possiblement en el cultiu cel·lular es van seleccionar de manera natural les cèl·lules més agressives. Conseqüentment, com que les mostres analitzades en aquest estudi són de cèl·lules molt inicials del cultiu, són menys agressives.

Els resultats d'aquest estudi permeten seleccionar el model RBT007 per estudis posteriors sobre la disseminació extraocular al sistema nerviós central, ja que és el més agressiu i en el que s'observaria més clarament l'acció de diversos tractaments. A més, com que comporta un fenotip agressiu, un pacient que presenti aquest model de retinoblastoma haurà d'estar més controlat. També s'ha pogut comprovar que la tècnica és adequada per a ratolins amb retinoblastoma i pot ser indicadora de l'activitat dels tractaments.

Les línies cel·lulars estan molt seleccionades *in vitro*, i una originalitat d'aquest estudi és que s'han utilitzat cultius primaris. Un cultiu primari és quan les cèl·lules dels pacients són molt recents i encara mantenen les propietats inicials de la malaltia. Representen millor la malaltia que per exemple el model Y79, una línia cel·lular àmpliament utilitzada com a referent. Si l'estudi hagués estat efectuat amb mostres del model Y79, probablement haurien donat totes positives. Si es compara els resultats de mostres de línies cel·lulars amb les de l'estudi, es pot comprovar que els tumors analitzats en aquest estudi són menys agressius. Són resultats esperables perquè els tumors estudiats no estan tan evolucionats com les línies cel·lulars.

En un futur és possible que no sigui necessari analitzar el cervell sencer per detectar la disseminació extraocular al sistema nerviós central. En un estudi fet per Guillem Pascual, on s'analitza la disseminació al cervell amb una tècnica immunohistoquímica, es pot comprovar que existeixen llocs concrets de disseminació i que, per tant, es podria analitzar només el lloc específic. (FIG. 37)

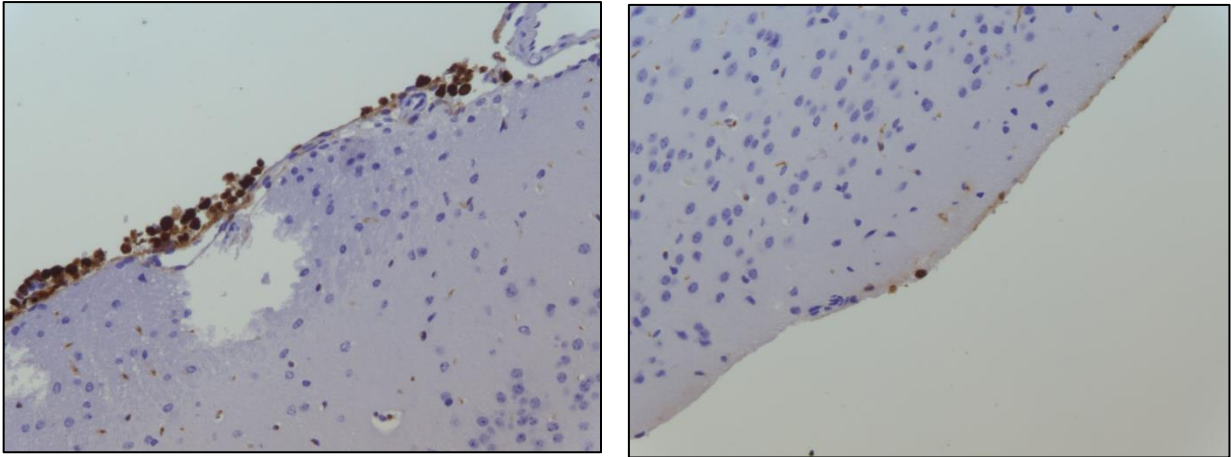


FIG. 37. Fotos de cervells amb retinoblastoma.

En el laboratori s'està intentant caracteritzar la disseminació al CNS a partir del líquid cefaloraquidi, ja que a la localització de les cèl·lules de retinoblastoma s'ha detectat que hi és present. Analitzant el líquid cefaloraquidi es podrà estudiar igualment la disseminació, i aplicant aquesta tècnica serà possible fer un seguiment en pacients i en models preclínic.

CONCLUSIONS

L'estudi de la disseminació extraocular del retinoblastoma al sistema nerviós central a través de l'anàlisi de mostres de 4 xenoempeles en ratolí diferents ha permès extreure les conclusions següents:

- Les mostres de cervell de ratolí contenen suficient RNA per ser analitzables, i és factible extreure'n una gran quantitat i sense contaminació mitjançant les tècniques descrites en aquest treball.
- És possible estudiar el retinoblastoma humà a través de models animals, ja que les cèl·lules humanes de retinoblastoma implantades en ratolins han estat detectades amb èxit per la qPCR.
- La qPCR és una tècnica adequada per quantificar la presència de retinoblastoma en una mostra mitjançant la detecció de la fluorescència emesa pel marcador tumoral CRX quan s'associa a un encebador específic. S'ha detectat expressió de CRX en els quatre models, i les rectes de calibrat demostren correctament la relació entre les cèl·lules tumorals pures i les corresponents dilucions.
- L'expressió de CRX és relativa per a cada model. Els models RBT002 i RBT008 tenen una expressió més elevada de CRX que els models RBT005 i RBT007.
- No existeix una relació entre el nombre de dies de supervivència dels ulls i la disseminació extraocular, en aquest cas reflectida en la càrrega tumoral de les mostres de cervell.
- La metàstasi en els tumors primaris és escassa, un tumor primari és menys agressiu que els tumors de les línies cel·lulars comercials.
- El model RBT007 és el més agressiu dels 4 models analitzats, i consegüentment el més adequat per a estudis posteriors sobre la disseminació extraocular al sistema nerviós central i sobre l'activitat dels tractaments.

GLOSSARI

Bial·lèlic/a: que pertany als dos al·lels d'un gen (en un heterozigot).

Biogènesi: procés fonamental dels éssers vius que produeix altres éssers vius.

Biòpsia: extracció i examen d'un òrgan o fragment de teixit d'un cos viu.

Càncer: el creixement incontrolat de cèl·lules anormals del cos. Es desenvolupa quan el mecanisme normal de control del cos deixa de funcionar. Aquestes cèl·lules extremes poden formar una massa de teixit anomenada tumor.

Cicles de PCR: consisteixen a sotmetre l'ADN en 2-3 passos a diferents temperatures. Quan finalitza cada cicle, l'ADN s'ha duplicat.

Ectòpic: en un xenoemplant, injectar el tumor en una posició que no és la seva habitual.

Emaciació: pèrdua de pes considerable degut a una malaltia.

Enucleació: extirpació quirúrgica d'un tumor, d'un òrgan o d'un cos estrany, en el cas d'aquest treball, d'un ull.

Epigenètic: canvi heretable en l'expressió genètica o del fenotip cel·lular sense un canvi en la seqüència d'ADN.

Estrabisme: desviació de l'alineament d'un ull en relació a l'altre, implica la falta de coordinació entre els músculs oculars.

Eutanàsia: mort indolora i provocada.

Gen diana: gen del qual se'n vol analitzar l'expressió, gen que s'estudia.

Genòmica: part de la genètica que s'ocupa de la caracterització molecular dels genomes complets.

Glaucoma: augment de la pressió intraocular que, en privar l'ull de la necessària irrigació sanguínia, causa l'enduriment del globus i l'atròfia del nervi òptic.

H₂O Mili-Q: Milli-Q és una marca creada per Millipore Corporation per descriure "ultrapura". L'aigua Milli-Q és una aigua sense impureses.

Histopatologia: estudi amb el microscopi dels teixits i òrgans malalts.

Immunocitologia: prové de la immunocitoquímica, una tècnica de laboratori comuna que s'utilitza per visualitzar anatòmicament la localització d'una proteïna específica en cèl·lules.

Immunohistoquímica: tècnica que permet reconèixer o diferenciar cèl·lules mitjançant la unió antígen-anticòs. Es fa servir en el diagnòstic de cèl·lules anormals com les que es troben en els tumors cancerosos.

Leucocòria: alteració en què apareix un reflex o taca blanca a la pupila.

Marcadors de llinatge: són aquells l'associació dels quals no canvia de generació en generació. Són els marcadors de la regió no recombinant del cromosoma Y i del DNA mitocondrial.

Metàstasi: és l'extensió d'una malaltia d'un òrgan o part a un altre òrgan o part no adjacent. Només els tumors malignes i les infeccions tenen la capacitat de metastatitzar.

Mutació germinal: afecten a la capacitat reproductora de l'individu, poden ser transmeses a part de la descendència.

Mutació somàtica: no afecten a les cèl·lules reproductores, no es poden transmetre a la descendència però afecten a l'individu.

Ortotòpic: en un xenoemplant, injectar un tumor al seu lloc normal.

Pal·liació: l'atenuació d'una malaltia sense guarir-la.

“Pase”: el concepte “pase” és el nombre de vegades que les línies cel·lulars s'han disgregat i s'han retornat al cultiu amb menor número de cèl·lules per a que continuïn creixent.

Pellet: precipitat que es forma en la centrifugació.

Perícia: pràctica, habilitat, en una art, en una ciència.

Primer: segment de DNA o RNA complementari a una seqüència de DNA donat que es necessita per iniciar la replicació d'aquest amb la DNA polimerasa.

Proptosis: desplaçament anterior del globus de l'ull per augment del volum o per una causa posterior que els empeny.

Proteòmica: estudi bioquímic de les proteïnes. El proteoma és el conjunt sencer de proteïnes expressades per un genoma, cèl·lula, teixit biològic o un organisme.

Resuspendre: tornar a posar en suspensió en un fluid.

Retinoma: precursor benigne al retinoblastoma. És una massa grisa translúcida que es forma a la retina.

Spin: centrifugació molt curta, pràcticament engegar i parar la centrífuga.

Termociclador: màquina usada en biologia molecular que permet realitzar de forma automàtica i programada els cicles de temperatures necessaris per a una reacció en cadena de la polimerasa d'amplificació d'ADN.

Tubs Eppendorf: tubs de microcentrífuga.

Tumor primari: tumor que manté les propietats inicials de la malaltia, les cèl·lules dels quals són recentment extretes del pacient.

Tumorigènesi: producció d'un nou tumor.

VORTEX: dispositiu utilitzat comunament en laboratoris per barrejar petits flascons de líquids.

Western blot: tècnica utilitzada en biologia molecular, bioquímica, biotecnologia i immunogenètica per detectar proteïnes en una mostra de teixit o extracte.

Xenoempelt: teixit extret d'un donant d'una espècie i injectat a un receptor d'una espècie diferent.

FONTS D'INFORMACIÓ

ARTICLES

BRENNAN, R. i altres. “Targeting the p53 Pathway in Retinoblastoma with subconjunctival Nutlin-3a”, *Cancer Research*, Volum 71, 15 de juny de 2011, número 12, pàgines 4205 – 4213. Publicat prèviament en línia el 22 d'abril de 2011.

CHANTADA, G. L. “Retinoblastoma: Lessons and challenges from developing countries. Ellsworth Lecture 2011”, *Ophthalmic Genetics*, Volum 32, 23 de maig de 2011, número 4, pàgines 196 – 203.

CHÉVEZ-BARRIOS, P. i altres. “Metastatic and Nonmetastatic Models of Retinoblastoma”, *American Journal of Pathology*, Volum 157, octubre del 2000, número 4, pàgines 1405 – 1412.

DIMARAS, H. i altres. “Retinoblastoma”, *Nature reviews*, Volum 1, publicat en línia el 27 d'agost de 2015, pàgines 1 – 22.

LIVAK, K. i SCHMITTGEN, T. “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ddCt} Method”, *Methods*, Volum 25, 2001, pàgines 402 – 408.

RODRÍGUEZ-GARCÍA, A. i altres. “Safety and Efficacy of VCN-01, an Oncolytic Adenovirus Combining Fiber HSG-Binding Domain Replacement with RGD and Hyaluronidase Expression”, *Clinical Cancer Reserarch*, Volum 21, 15 de març de 2015, número 6, pàgines 1406 – 1418.

TORBIDONI, A. i altres. “Association of Cone-Rod Homebox Transcription Factor Messenger RNA With Pediatric Metastatic Retinoblastoma”, *JAMA Ophtalmology*, publicat en línia el 30 d'abril de 2015.

WADHWA, L. i altres. “Treatment of Invasive Retinoblastoma in a Murine Model Using an Oncolytic Picornavirus”, *Cancer Research*, Volum 67, 15 de novembre de 2007, número 22, pàgines 10653 – 10656.

PÀGINES D'INTERNET

FUNDACIÓ SANT JOAN DE DÉU

Recerca / Innovació.

<http://www.fsjd.org/ca>

[Consulta: 28.06.15]

SABiociences, AQIAGENT COMPANY

Manuals, qPCR.

<http://sabiosciences.com/manuals/IntrotoqPCR.pdf>

[Consulta: 22.09.15]

INSTITUTO NACIONAL DEL CANCER.

Tipos de cancer, retinoblastoma, tratamiento.

<http://www.cancer.gov/espanol/tipos/retinoblastoma/paciente/tratamiento-retinoblastoma-pdq>

[Consultes vàries del 13.07.15 al 12.11.15]

ENCICLOPÈDIA DE CONTINGUT LLIURE

Edició del 16 de març del 2001.

<https://en.wikipedia.org>

[Consultes: 22.07.15 i 30.11.15]

CANCER TREATMENT CENTERS OF AMERICA

Commonly searched, what is cancer and treatments.

<http://www.cancercenter.com/treatments/>

[Consulta: 30.11.15]

AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH

Font de diferents articles consultats.

<http://www.aacrjournals.org/>

Foto de la portada:

DR. GILMAN and DR. VOSTER

Patient education.

<http://www.gveyes.com/patienteducation.php>

[Consulta: 01.12.15]

FONTS ORALS

Angel M. Caracaboso

Guillem Pascual

Mònica Vilà