

P18

CAPTURA POR MICRODISECCIÓN LÁSER DE POBLACIONES CELULARES DE TUMORES DE MAMA CANINOS PARA ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA.

S. Guil-Luna¹, F.J. Salguero², J. Gómez-Laguna¹, A. Alijojani², W. García-Jiménez², S. Di Palma², Y. Millán¹, J. Martín de las Mulas¹

¹Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, España. ²Department of Pathology and infectious Diseases, School of Veterinary Medicine, Surrey, Reino Unido.

Email: v22gulus@uco.es

Los tumores de mama caninos (TMC), al igual que en la especie humana, se caracterizan por su enorme heterogeneidad celular. El análisis de esta heterogeneidad intratumoral es clave para la comprensión de las bases moleculares y la patogénesis del cáncer de mama. El empleo de la microdissección con láser de captura (MDLC) en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina (FFPE) es una metodología reciente que permite seleccionar diferentes poblaciones celulares presentes en el tumor para su posterior estudio génico.

Así, la combinación de esta técnica con el consiguiente análisis génico supondrá un enorme potencial para la detección de nuevas rutas de señalización y marcadores tumorales. Sin embargo, dado el efecto del formol en la calidad y cantidad del ARN extraído, la optimización del protocolo de extracción es crucial.

Los objetivos de este estudio fueron, en primer lugar, validar la técnica de MDLC en muestras FFPE de TMC usando dos tipos de portaobjetos (PEN -membrane glass y frame membrane); en segundo lugar, validar dos kits comerciales para la extracción de RNA; y en tercer lugar, identificar el receptor de progesterona (RP), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFa) y su receptor (VEGFR2) mediante RT-PCR en las muestras obtenidas.

Para ello, se seleccionaron treinta y nueve muestras FFPE de TMC benignos y malignos con el fin de capturar poblaciones de células epiteliales y mioepiteliales normales y tumorales malignas y células del estroma tumoral mediante el láser de captura Arcturus®. Para la extracción de ARN se utilizó el kit comercial RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation kit (Ambion) y el kit RNAqueous®-Micro-kit (Ambion).

La captura de las poblaciones celulares seleccionadas se realizó con éxito con portaobjetos PEN-membrane glass. Para la extracción de RNA se obtuvieron mejores resultados en cantidad y calidad del RNA extraído con el kit RNAqueous®-Micro-kit que con el kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation.

Además, la RT-PCR del RNA aislado mediante este kit fue eficaz para la detección de los marcadores seleccionados.

En conclusión, la MDLC combinada con la extracción de RNA mediante el kit RNAqueous®-Micro-kit y su posterior análisis génico por RT-PCR es una metodología fiable para la caracterización molecular de poblaciones celulares heterogéneas en muestras FFPE de TMC.

Por tanto, esta técnica facilitará el aislamiento de poblaciones celulares específicas lo que permitirá un mayor conocimiento de la heterogeneidad tumoral y por tanto de la patogénesis del carcinoma de mama canino.