

**POLIPOSI ADENOMATOSA FAMILIAR I CÀNCER
COLORECTAL**
Estudi genòmic i anàlisi d'alteracions de la via de Wnt

Memòria presentada per

Antònia Obrador Hevia

Per optar al Grau de

Doctor

Tesi realitzada sota la direcció del
Dr. Gabriel Capellà i Munar
a l'Institut Català d'Oncologia

Tesi adscrita al departament de Genètica de la
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona
Programa de Genètica (Bienni 2002-2004)
Tutora: Dra. Marta Pascual

Gabriel Capellà

Marta Pascual

Antònia Obrador

Barcelona, Abril de 2007

Introducció

És terrorífic pensar la quantitat de recerca que és necessària per determinar la veritat del fet més insignificant
Stendhal

NOTA PRÈVIA: les paraules subratllades són les que es troben descrites al glossari

En els països desenvolupats, aproximadament una de cada tres persones desenvoluparà un càncer i una de cada cinc morirà a causa d'aquesta malaltia. Més concretament, el càncer colorectal és el segon tipus de càncer més freqüent amb un milió de nous casos diagnosticats cada any arreu del món. Aquest tipus de càncer té un fort component social i una distribució geogràfica heterogènia, ja que en els països desenvolupats és on es concentren el 65% de tots els casos. Els pacients amb risc familiar representen un 20% del total de casos i d'aquests, entre un 5 i 10% presenten una herència autosòmica dominant (Lynch & de la Chapelle, 2003). La mort deguda al càncer colorectal ha disminuït els darrers quinze anys gràcies a una millor prevenció i detecció dels pòlips abans que esdevinguin carcinomes. La taxa de supervivència als cinc anys dels pacients als quals s'ha diagnosticat el càncer de còlon en estadis primerencs és superior al 90%. Però només en el 39% dels casos es diagnostiquen els tumors en estadis inicials. Una vegada que el càncer s'ha disseminat, la taxa de supervivència als 5 anys disminueix fins al 10%. Per això són de gran interès els estudis centrats a entendre millor la biologia del càncer per poder aplicar els coneixements a l'avenç en el diagnòstic i el tractament de la malaltia.

BASES MOLECULARS I CEL·LULARS DEL CÀNCER

En el context de la biologia cel·lular el càncer té una importància única, ja que la família de malalties agrupades sota aquesta denominació reflecteix alteracions de les funcions de comportament més fonamentals de les cèl·lules d'un organisme pluricel·lular. El càncer és una malaltia genètica en la qual la integritat del genoma cel·lular (en els teixits afectats) s'altera de manera que es generen canvis que proporcionen a la cèl·lula una capacitat proliferativa il·limitada i independència del medi que l'envolta. Al principi del segle XX, els científics varen tenir en les seves mans els elements conceptuals i instrumentals necessaris per tal d'abordar el problema del càncer. Més tard, amb el descobriment del codi genètic, els científics varen ser capaços d'entendre com es tradueix aquest codi i com les cèl·lules poden ser danyades per mutacions. Fins fa poc, la selecció de gens per a estudis mutacionals s'ha basat en informació dels estudis de lligament, identificació d'alteracions cromosòmiques en tumors o funcions conegudes de gens individuals o famílies de gens. El desxiframent de la seqüència del genoma

humà, juntament amb les millores de les tècniques de seqüenciació i de les tècniques bioinformàtiques han permès, en els darrers temps, analitzar el càncer d'una manera més directa i extensa. Aquestes aproximacions no només ajuden a la identificació de nous gens implicats en el càncer, sinó que també contribueixen a visions mecanístiques que només són evidents des d'una perspectiva de sistemes biològics (Sjoblom et al., 2006).

Actualment, s'entén el càncer com un procés en el qual la cèl·lula passa d'un comportament normal a un comportament maligne a través de canvis dinàmics en el genoma (Hanahan & Weinberg, 2000). Estudis portats a terme per la Universitat de Berkeley sobre carcinògens químics als anys 70 (McCann et al., 1975), suggerien que les cèl·lules canceroses són portadores de gens mutats, però la naturalesa d'aquests gens en aquells moments era desconeguda. Després de descartar els virus com a principal causa del càncer, irònicament la recerca en virus d'RNA que no tenen capacitat de provocar càncer, va donar les primeres pistes per trobar el gens tumorals (Weinberg, 1994). Es va descobrir que el virus del sarcoma de Rous del pollastre contenia un gen que era capaç de transformar cèl·lules normals en cèl·lules malignes (Stehelin et al., 1976). Més tard, varen veure que aquest gen no era viral en origen, sinó que un ancestre del virus l'havia capturat d'un gen present a les cèl·lules hoste normals i que el feia servir amb propietats transformants. De fet, aquest gen mai s'ha trobat alterat en cap tumor humà, però aquest descobriment va establir un precedent i en els següents anys es varen trobar oncogenes relacionats amb altres retrovirus. Cada oncogen es va anomenar segons el virus en què es va trobar per primera vegada. Així varen aparèixer *MYC* (*avian myelocytomatosis virus*: virus de la mielocitomatosi aviària), *RAS* (*rat sarcoma virus*: virus del sarcoma de rata), *ERBB1* (*avian erythroblastosis virus*: virus de l'eritroblastosi aviària), *ABL* (*murine Abelson leukemia virus*: virus de la leucèmia murina d'Abelson), etc (Weinberg, 1983). Davant la necessitat de definir el que era un oncogen, es va decidir que el gen candidat és un oncogen si, en ser introduït en una cèl·lula normal, aquest passa a tenir característiques de cèl·lules canceroses (Bishop, 1985). Weinberg (Weinberg, 1983) va descriure, l'any 1983, la cerca de seqüències de DNA en cèl·lules canceroses humanes capaces de provocar proliferació incontrolada en ser introduïdes en cèl·lules no canceroses. L'assaig es va realitzar en cultiu de cèl·lules, emprant com a hoste no cancerós una línia particular de cèl·lules 3T3 derivades de ratolí, cèl·lules NIH3T3, i transfectant-les amb DNA obtingut de cèl·lules

tumorals humanes. Les troballes varen ser importants: es varen detectar oncogens en moltes línies de cèl·lules canceroses humanes. Però en poc temps va esdevenir clar que els oncogens no eren els únics implicats en la formació dels tumors. Aquest era un procés complex que requeria també la participació dels que primer es varen anomenar antioncogens i ara coneixem com a gens supressors tumorals. El gen del retinoblastoma (*RB*), anomenat així pel tumor ocular infantil on es va identificar, és un model d'aquest grup de gens (Hollingsworth *et al.*, 1993).

Diferents observacions en cèl·lules tumorals humanes i en models animals han conduït a la noció que el desenvolupament tumoral comporta un procés anàleg a l'evolució darwiniana, en la qual una successió de canvis genètics, cada un dels quals confereix un avantatge en el creixement, condueix a la conversió progressiva de cèl·lules humanes normals en cèl·lules tumorals. Aquestes cèl·lules tumorals adquireixen finalment una capacitat invasiva que portarà les cèl·lules a viatjar a través de l'organisme i instal·lar-se en altres teixits. Aquest fenomen, anomenat metàstasi, és el causant del 90% de les morts per càncer (Sporn, 1996).

Hannahan i Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2000) varen suggerir, en la seva revisió de l'any 2000, que la majoria de genotips cancerosos són la manifestació de sis alteracions essencials del comportament cel·lular que, de manera col·lectiva, dicten el fenotip maligne. Aquestes sis alteracions constitueixen el gros del focus d'atenció de la recerca actual en càncer (figura IN.1):

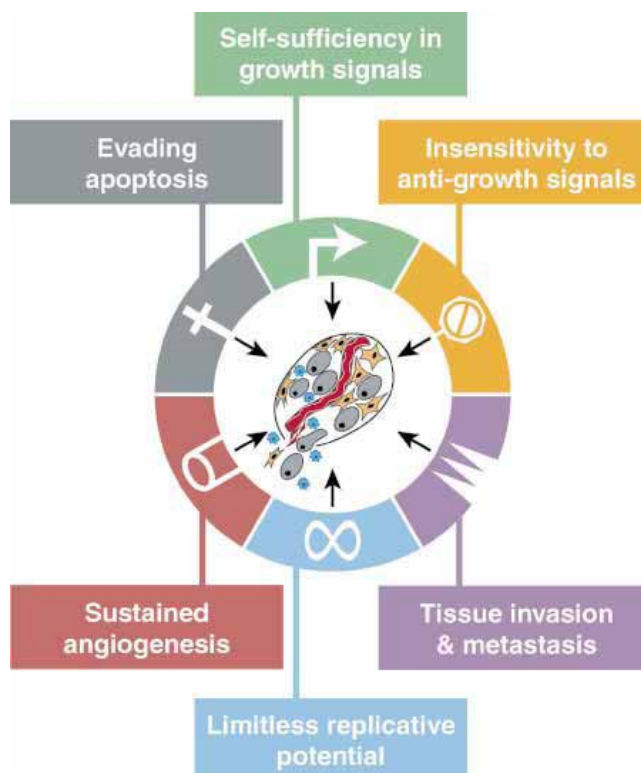


Figura IN.1. Capacitats adquirides del càncer. Extret de Hanahan & Weinberg, 2000.

- **Autosuficiència en senyals de creixement:** les cèl·lules normals necessiten senyals de creixement per passar d'un estat de quiescència a un estat proliferatiu. Molts dels oncogens actuen imitant els senyals de creixement normals. Les cèl·lules tumorals generen els senyals de creixement i així redueixen la dependència del microambient.
- **Independència de senyals d'inhibició del creixement:** en els teixits normals hi ha molts senyals inhibidors del creixement que ajuden a mantenir l'estat de quiescència i l'homeòstasi del teixits. Aquests senyals poden ser solubles o bé trobar-se a la superfície de cèl·lules veïnes o en la matriu extracel·lular. Les cèl·lules tumorals han d'escapar d'aquest control per poder proliferar.
- **Evasió de l'apoptosi:** l'habilitat de les cèl·lules tumorals d'incrementar el seu nombre no depèn només de la regulació de la seva capacitat proliferativa, sinó també del canvi del ritme de mort cel·lular. El mecanisme natural de mort cel·lular és l'apoptosi. Per tant, la resistència a l'apoptosi és un dels mecanismes que han d'incorporar les cèl·lules tumorals per a la seva expansió.
- **Potencial replicatiu il·limitat:** les tres capacitats anteriors es basen en la interacció de la cèl·lula amb el medi que l'envolta. Però les cèl·lules també tenen mecanismes intrínsecs i autònoms per limitar la multiplicitat cel·lular. Una vegada que les poblacions cel·lulars han arribat a un determinat nombre de divisions, aturen el seu creixement. Aquest procés s'anomena senescència. Es va demostrar que les cèl·lules tumorals en cultiu es troben immortalitzades (Hayflick, 1997).
- **Angiogènesi mantinguda:** per al funcionament cel·lular és essencial l'aportament d'oxigen i nutrients a través dels vasos sanguinis. El procés de formació de nous vasos, anomenat angiogènesi, és finament regulat. Les cèl·lules tumorals tenen la propietat de promoure l'angiogènesi per assegurar la irrigació necessària per obtenir els nutrients.
- **Invasió de teixits i metàstasi:** al llarg de la progressió tumoral, un conjunt de cèl·lules adquireixen la propietat d'envair els teixits veïns i després viatjar cap a localitzacions més allunyades on poden formar noves colònies. El procés de colonitzar altres teixits es coneix com a metàstasi.

Vogelstein i Kinzler (Vogelstein & Kinzler, 2004) varen explicar que a la cèl·lula cancerosa és necessària l'acumulació de mutacions en diferents gens, fet que fa que el càncer sigui una malaltia genètica complexa, a diferència de les malalties genètiques causades per la mutació en un sol gen. Descriuen tres grans grups de gens responsables del procés tumoral: oncogens, gens supressors de tumors i gens estabilitzadors. La proliferació cel·lular pot estar regulada per gens els productes dels quals ajuden a estimular la proliferació cel·lular i per gens els productes dels quals ajuden a inhibir-la:

- **Oncogens:** gens alterats per convertir en hiperactiu un gen estimulador de la proliferació. La mutació que dona lloc a aquest tipus de gens té un efecte dominant; n'hi ha prou que el canvi afecti una de les dues còpies del gen per provocar dins la cèl·lula un avantatge de creixement. Normalment això es degut a un guany de funció de la proteïna, que no és susceptible de regulació externa.
- **Gens supressors tumorals:** gens que en una situació normal inhibeixen la proliferació. En ser mutats, eliminen aquest fre. Perquè la cèl·lula quedi lliure de la inhibició és necessari que totes dues còpies del gen estiguin inactivades o delecionades, ja que cal perdre totalment la funció normal del gen.
- L'efecte de les mutacions en els **gens estabilitzadors** va per una altra via, ja que la funció normal d'aquests és mantenir la integritat del genoma, sense aparentment alterar altres funcions cel·lulars. Quan s'alteren aquests gens, s'accelera l'acumulació d'alteracions genètiques que poden afectar qualsevol gen i, en conseqüència, els dos tipus de gens que acabem de presentar.

Les limitacions tecnològiques i de la capacitat humana per a l'estudi biològic, han fet que fins fa poc els fenòmens moleculars que porten a la tumorigènesi hagin estat analitzats de manera aïllada. Són moltes les vies moleculars que participen en el procés de transformació cel·lular (figura IN.2), però no s'han d'entendre com a vies aïllades que controlen diferents processos, sinó que tota molècula de la cèl·lula té múltiples interaccions amb la resta d'elements que fan que totes les vies moleculars siguin xarxes interrelacionades (figura IN.3). L'aparició de noves tecnologies com els *microarrays* (microxips de DNA) va suposar, al final del segle passat, la disponibilitat d'eines que permeten fer un abordatge de l'estudi del càncer des d'una perspectiva molt més

àmplia i integradora. Actualment, hi ha línies d'investigació que pretenen transformar les anàlisis unidimensionals en estudis de xarxes d'interaccions multidimensionals (Rhodes & Chinnaiyan, 2005).

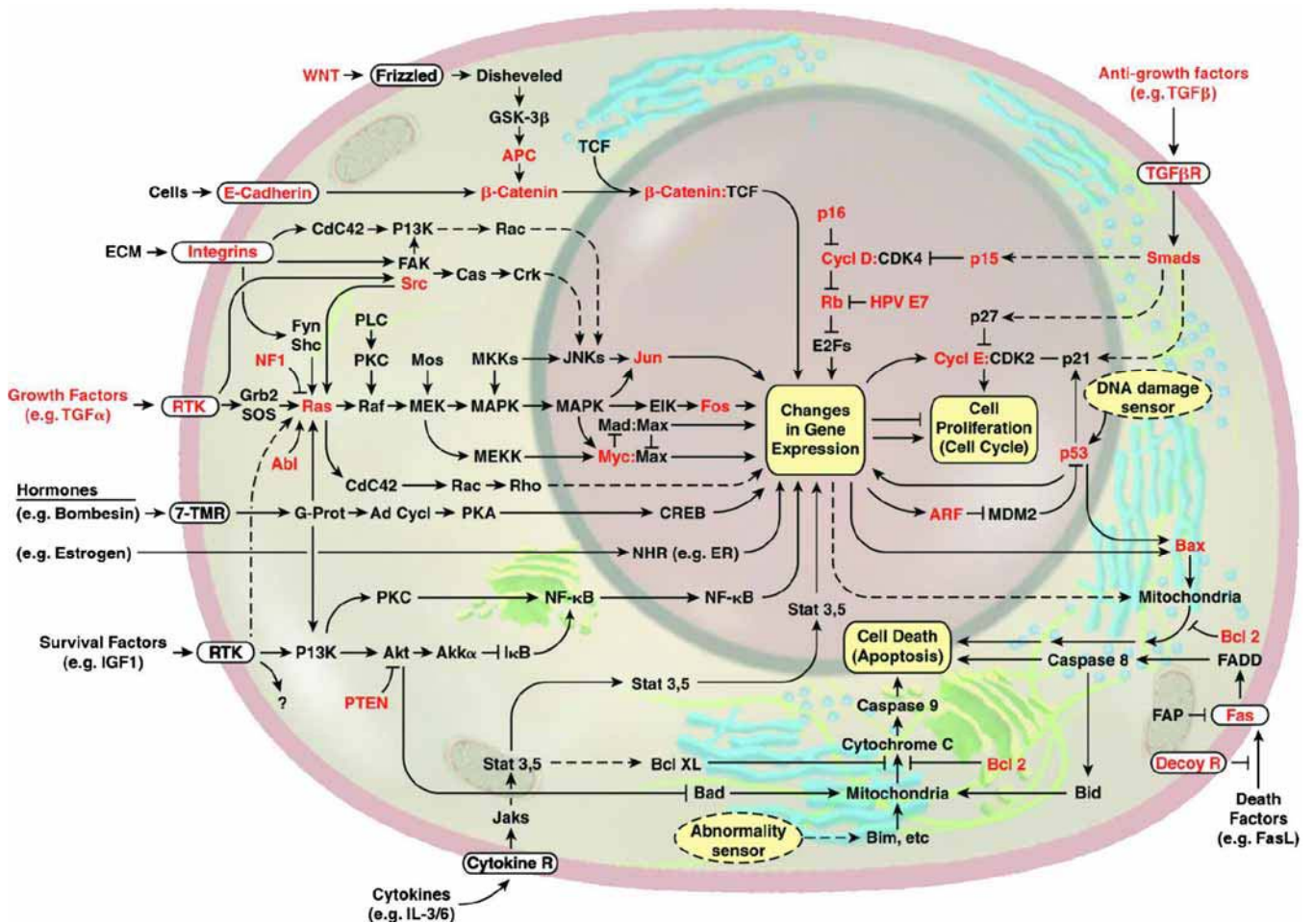


Figura IN.2. Vies moleculars principals que participen en el càncer. Extret de Hanahan & Weinberg, 2000.

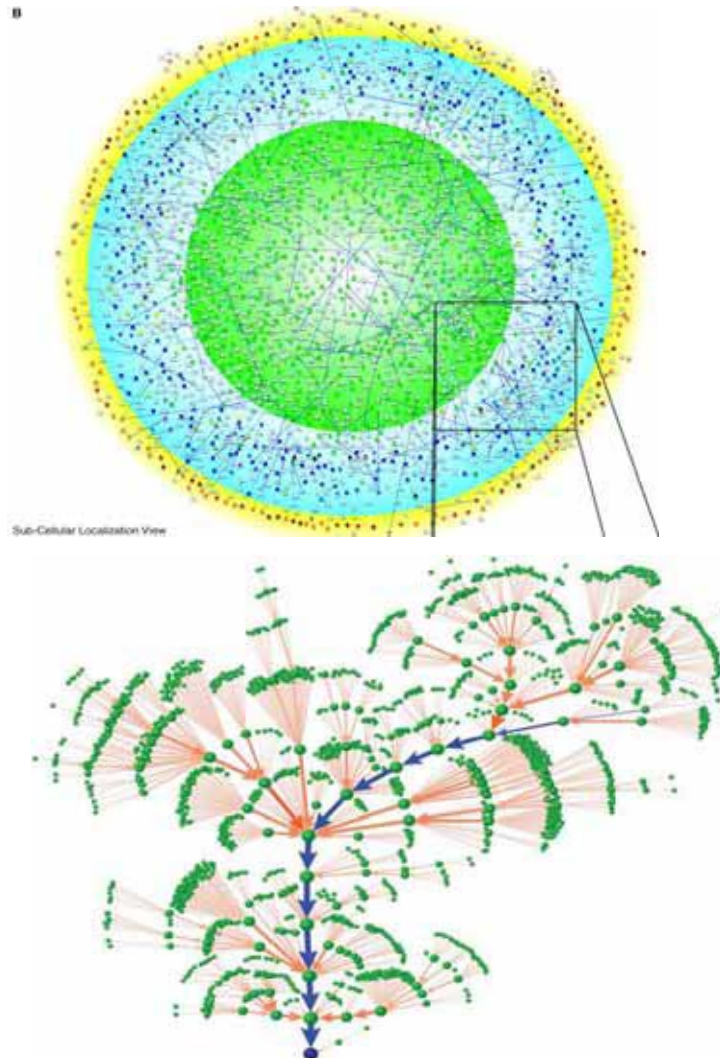


Figura IN.3. Xarxes moleculars dins la cèlula. L'esquema mostra les múltiples interaccions entre molècules.

ALTERACIÓ DE L'HOMEÒSTASI DE L'EPITELI COLÒNIC PER DONAR LLOC AL CÀNCER COLORECTAL

Biologia de l'epiteli intestinal

Al voltant de la meitat de la població occidental desenvoluparà un pòlip (adenoma) en el colon a l'edat del 70 anys. Alguns d'aquests pòlips progressaran fins a càncer i el risc de patir un càncer durant la vida és del 5%. Des del punt de vista molecular i genètic, el càncer colorectal és el tumor sòlid més ben estudiat. Això és degut a la bona accessibilitat dels tumors, al fet que diferents estadis de la mateixa malaltia poden coexistir en un mateix pacient i a l'existència de malalties hereditàries que constitueixen un model accelerat de carcinogènesi.

L'epiteli de l'intestí constitueix una barrera entre el cos i el món exterior. Està format per una monocapa de cèl·lules epitelials col·locades en forma de criptes. En l'epiteli intestinal de l'adult, les cèl·lules mare creen noves cèl·lules situades a la base de les criptes que es diferencien i viatgen a cap a la superfície de la cripta on moren per apoptosi quan hi arriben uns cinc dies després (Heath, 1996). Les cèl·lules proliferatives ocupen dos terços de la base de les criptes, mentre que les cèl·lules diferenciades constitueixen el terç superior i la superfície de l'epiteli (Radtke & Clevers, 2005) (figura IN.4).

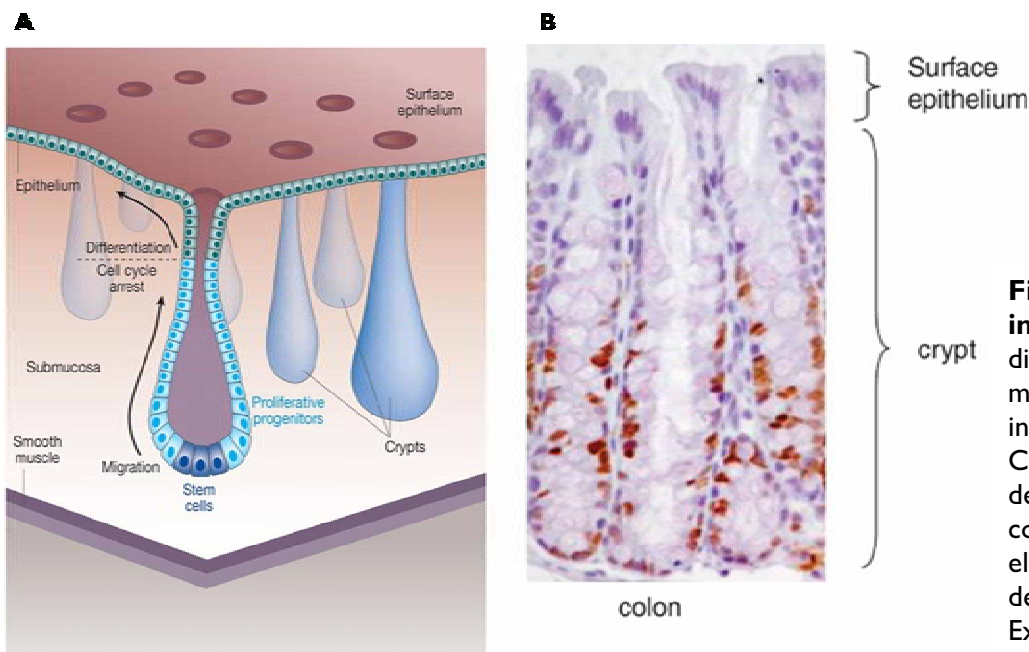


Figura IN.4. Epiteli intestinal. (A) Esquema dels diferents compartiments i la migració cel·lular en l'epiteli intestinal. Extret de Reya & Clevers, 2005. (B) Histologia de l'epiteli colònic on es veu el compartiment proliferatiu amb els nuclis tenyits pel marcador de proliferació cel·lular Ki67. Extret de Radke & Clevers, 2005.

Les cèl·lules mare es divideixen cada dotze-setze hores i generen 200 cèl·lules per cripta cada dia. Hi ha tres mecanismes que mantenen l'homeòstasi epitelial:

- 1) La producció cel·lular es veu compensada pel desprendiment cel·lular a la superfície de l'epiteli.
- 2) L'epiteli intestinal es troba en constant renovació, les cèl·lules noves arriben a la superfície en cinc dies.
- 3) Aquest mecanisme no és autònom, sinó que està dictat per les normes que imposen les cèl·lules de la cripta (nínxol de la cripta).

Hi ha quatre característiques que defineixen les cèl·lules mare de la cripta: retenció de fenotip indiferenciat, producció continuada de cèl·lules progenitores, retenció de capacitats d'autosuficiència i habilitat de recuperació després del dany cel·lular.

Tant el desenvolupament de l'epiteli intestinal durant el desenvolupament embrionari, com el manteniment de la compartimentació cel·lular en l'epiteli de l'adult són processos finament regulats per programes genètics. **Quan s'altera aquesta regulació, l'epiteli pot proliferar de manera descontrolada i donar lloc a lesions neoplàstiques.**

Alguns autors han proposat que el model de compartimentació de la cripta (compartiment proliferatiu i compartiment diferenciat, figura IN.4 A) és un procés dirigit per la via de Wnt a través de la transcripció dels receptors de les efrines (EphB). En tots els estadis del càncer colorectal, la regulació de l'expressió d'aquestes proteïnes s'ha perdut i estan constitutivament expressades (Batlle *et al.*, 2002).

Seqüència adenoma-carcinoma

En la seqüència adenoma-carcinoma, la lesió més primerenca que es pot identificar és el focus de criptes aberrants, que és una petita lesió displàstica en l'epiteli del còlon (Cheng & Lai, 2003). Hi ha dos models que expliquen l'origen i el creixement dels focus de criptes aberrants. Es pensa que els adenomes evolucionen a partir dels focus de criptes aberrants. Vogelstein va suggerir un model en el qual les cèl·lules de la superfície de l'epiteli s'escampen lateralment i cap avall per formar noves criptes (Shih *et al.*, 2001a). L'altre model proposa que els adenomes creixen des de la base cap a la superfície (Preston *et al.*, 2003). La transició des d'una lesió benigna (adenoma) a una de maligna (carcinoma) es pensa que és progressiva. Els adenomes avancen primer cap

a l'estadi de carcinoma *in situ* i després a carcinomes invasius. Els carcinomes invasius són sovint la primera presentació clínica dels tumors colorectals.

Gràcies a les anàlisis moleculars i histopatològiques s'ha determinat la seqüència de progressió tumoral adenoma-carcinoma; és a dir, d'una lesió neoplàstica benigna a una lesió maligna (Fearon & Vogelstein, 1990, Sjoblom *et al.*, 2006) (figura IN.5). Aquest model integra les tres nocions que:

- 1) Els tumors colorectals resulten de mutacions activadores d'oncogenes i inactivadores de gens supressors tumorals.
- 2) Són necessàries mutacions en diversos gens per produir malignitat. En principi, es va suggerir que serien necessàries entre quatre i sis alteracions, encara que estudis més recents indiquen que com a mínim han de ser una desena les alteracions (Sjoblom *et al.*, 2006).
- 3) Les alteracions genètiques es poden succeir en una seqüència preferencial. Aquest ordre, però, ha de propiciar des del principi alteracions que activen de forma constitutiva la via de Wnt.

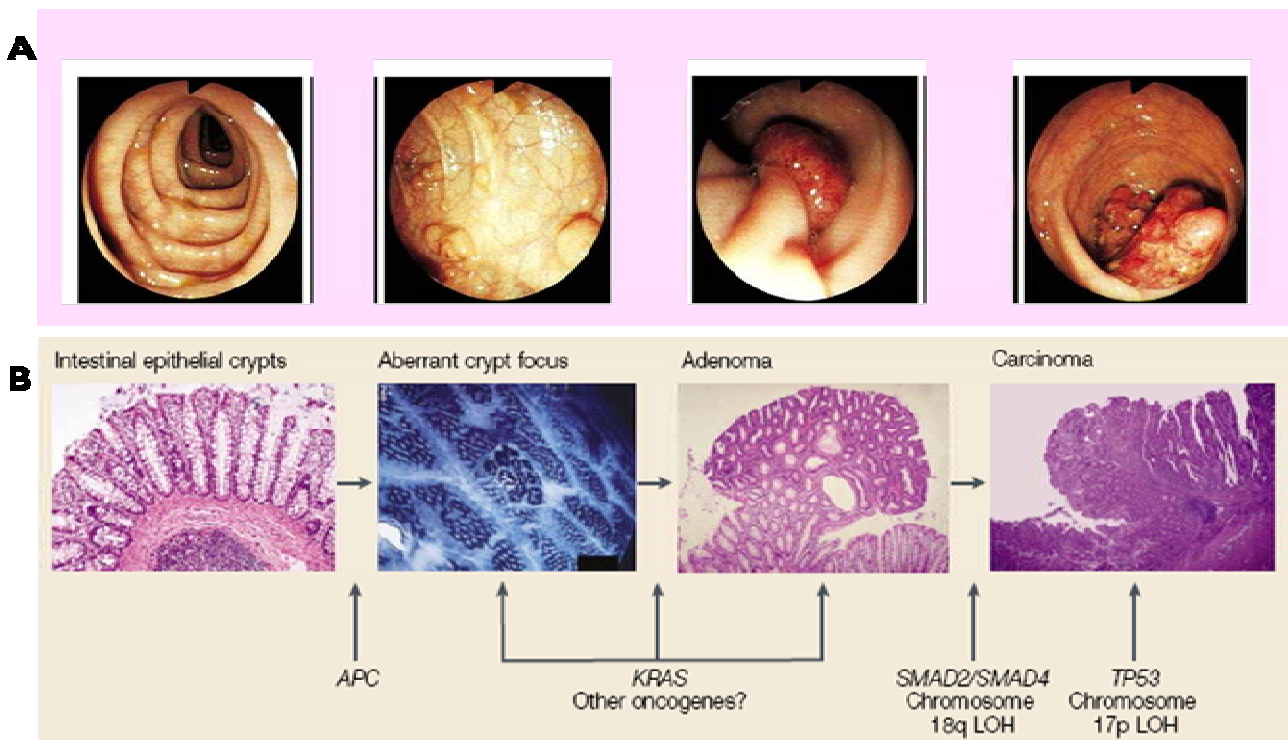


Figura IN.5. Seqüència adenoma-carcinoma i ordre d'aparició dels gens alterats durant la progressió. (A) Imatges endoscòpiques de les diferents etapes de la progressió tumoral. (B) Imatges microscòpiques de la tinció dels teixits. Modificat de Fodde *et al.*, 2001.

La via de Wnt en l'epiteli intestinal

Les cèl·lules mare adultes es troben implicades en processos d'autorenovació homeostàtica. L'estudi de la biologia de les cèl·lules mare adultes ha permès demostrar que les vies de senyalització que regulen aquests processos són un nombre reduït. En la majoria dels teixits en què la via de Wnt controla les cèl·lules mare, apareixen càncers deguts a la desregulació d'aquesta via (Reya & Clevers, 2005) (Taula IN.1).

Gen	Tumor	Referència
WNT-1	Càncer de mama murí	Nusse & Varmus, 1982
APC	Càncer de còlon	Polakis, 1997
β-CATENINA	Càncer de còlon i melanomes	Su <i>et al.</i> , 1993 Rubinfeld, 1993
AXIN1	Carcinomes hepatocel·lulars	Clevers, 2000
WNT-5A	Limfomes murins	Liang <i>et al.</i> , 2003
SFRP	Càncer de còlon	Suzuki <i>et al.</i> , 2004

Taula IN.1. Gens de la via de Wnt alterats en càncer. Informació obtinguda de la web <http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/wntcancer.html>.

També la presència d'alteracions en diferents components de la via donen lloc a desordres i malalties degeneratives (Logan & Nusse, 2004) (taula IN.2).

Gen	Malaltia	Referència
WNT3	Tetra-amelia	Niemann <i>et al.</i> , 2004
LRP5	Defectes en la densitat òssia Defectes vasculars de l'ull (<i>osteoporosis-pseudoglioma syndrome</i> ; OPPG), <i>familial exudative vitreoretinopathy</i> ; FEVR)	Boyden <i>et al.</i> 2002, Gong <i>et al.</i> , 2001 Little <i>et al.</i> , 2002 Toomes <i>et al.</i> , 2004
FZD4	Defectes de l'angiogènesi retinal (<i>familial exudative vitreoretinopathy</i> ; FEVR)	Robitaille <i>et al.</i> , 2002 Xu <i>et al.</i> , 2004 Toomes <i>et al.</i> , 2004
AXINA2	Formació de les dents Predisposició al càncer colorectal	Lammi <i>et al.</i> , 2004
APC	Càncer de còlon	Kinzler <i>et al.</i> , 1991 Nishisho <i>et al.</i> , 1991

Taula IN.2. Malalties genètiques i components de la via de Wnt. Modificat de Logan & Nusse, 2004.

La via de Wnt es troba conservada al llarg de l'evolució i és clau en el desenvolupament embrionari i en el manteniment del compartiment progenitor de les criptes del còlon, aquesta via controla el destí cel·lular al llarg de la cripta (Batlle et al., 2002). L'any 1982, Nusse i Varmus (Nusse & Varmus, 1982) varen identificar el gen *wnt1* de ratolí com el lloc preferencial d'integració del virus de tumor de mama del ratolí. Quan es va seqüenciar, es va veure que codifica per una proteïna que és secretada i és rica en cisteïna. El gen *wingless (wg)* de *Drosophila* que controla la polaritat durant el desenvolupament larvari es va identificar com a homòleg del gen *wnt1* (Rijsewijk et al., 1987). L'any 1989, McMahon i Moon (McMahon & Moon, 1989) varen observar que es duplicaven estructures de *Xenopus* després d'injectar mRNA de *wnt1* de ratolí a blastòmers d'embrions. Aquesta observació va donar suport a la teoria que la via de senyalització de Wnt era compartida entre vertebrats i invertebrats (Clevers, 2006).

Les observacions en *Drosophila* i *Xenopus* indicaven que és una via altament conservada. Independentment d'aquests estudis, es va descobrir que mutacions en el gen *APC* eren les responsables de la síndrome de FAP (*familial adenomatous polyposis*, poliposi adenomatosa familiar) (Kinzler et al., 1991, Nishisho et al., 1991). Poc després, es va veure que la proteïna APC interacciona amb β -catenina (Rubinfeld et al., 1993, Su et al., 1993). Aquesta troballa va significar la primera connexió de la via de Wnt amb càncer en humans.

La via de Wnt participa en processos de desenvolupament, però també en processos d'homeòstasi dels teixits i és essencial al llarg de tota la vida. Les mutacions en la via de Wnt fan que el balanç de l'homeòstasi es trenqui i causi condicions patològiques com el càncer.

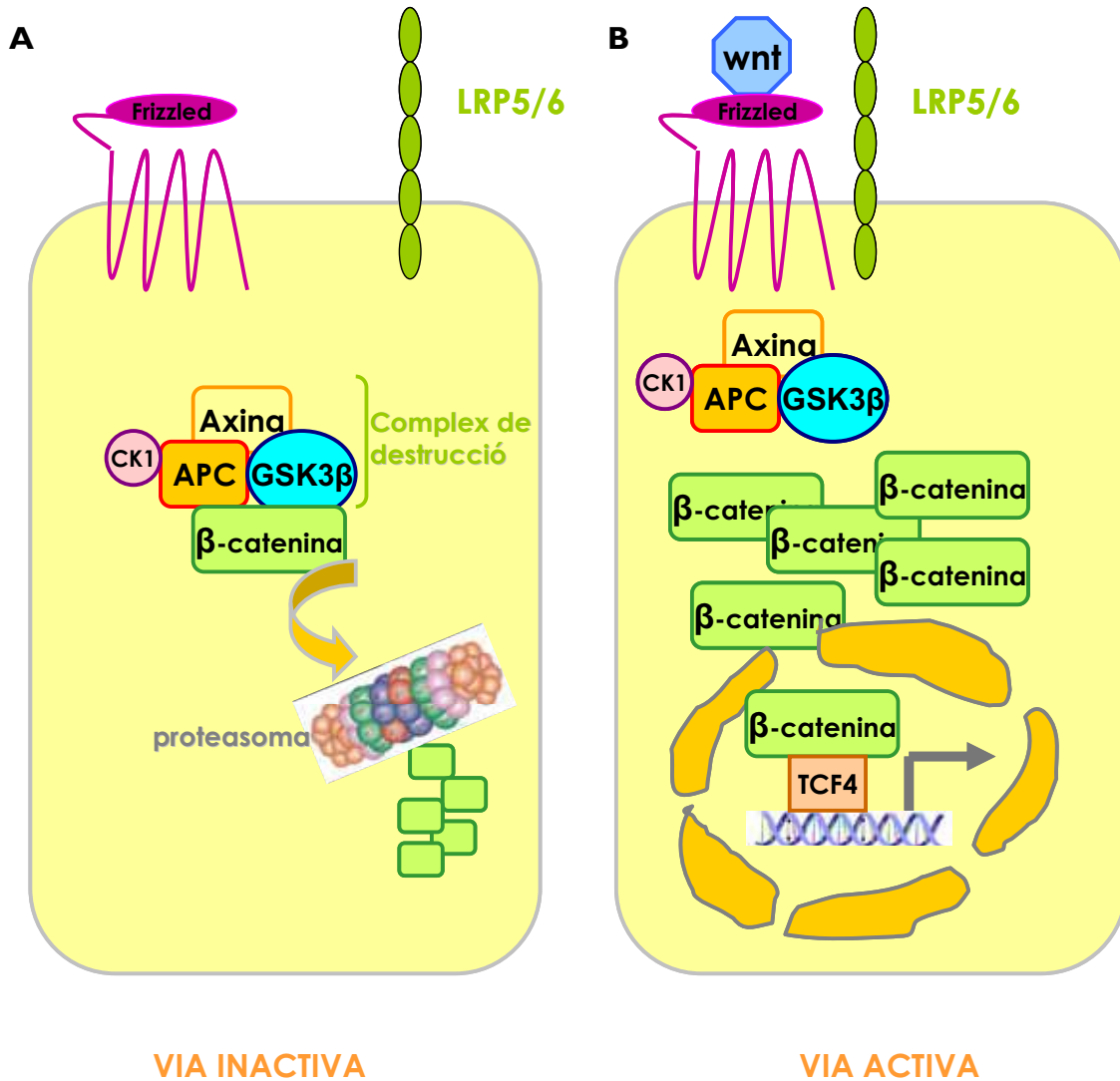


Figura IN.6. Via de Wnt en el seu estat d'inactivació (A) quan el complex de destrucció marca la β -catenina per degradació via proteasoma i en el seu estat d'activació (B) quan senyals de Wnt permeten que β -catenina s'acumuli al citoplasma i viatgi al nucli per activar transcripcionalment els gens de proliferació .

Els gens de Wnt, que es troben conservats al llarg de l'evolució, codifiquen per proteïnes que són secretades. El senyal comença quan els lligands de Wnt formen un complex amb els seus receptors Frizzled, Lrp5 i Lrp6 (figura IN.6).

La molècula clau en la cascada és una proteïna citoplasmàtica, la β -catenina que controla el programa transcripcional activat per la via de Wnt. L'estabilitat d'aquesta proteïna la regula l'anomenat complex de destrucció. Quan no hi ha unió de Wnt amb els receptors, dues proteïnes del complex destructor, els supressors tumorals APC i axina, s'uneixen a la β -catenina acabada de formar. Les cinases CKI i GSK3 β , que també formen part del complex de destrucció, fosforilen un conjunt de residus

conservats de Ser i Thr en la regió N-terminal de β -catenina. La proteïna fosforilada és segregada per la lligasa d'ubiquitina E3, que marca β -catenina per ser degradada per la via del proteosoma. Quan Wnt s'uneix als receptors, l'activitat del complex de destrucció s'inhibeix. Com a conseqüència, β -catenina s'acumula, i viatja al nucli on s'uneix a proteïnes d'unió al DNA nuclear de la família TCF/LEF. En l'absència de senyal de Wnt, les proteïnes TCF/LEF reprimeixen l'expressió dels gens diana a través de la unió amb corepressors com Groucho. La interacció amb β -catenina converteix els factors TCF/LEF en activadors transcripcionals. En definitiva, la via canònica tradueix el senyal de Wnt en la transcripció transitòria del programa transcripcional dels gens diana de TCF/LEF. En el cas del còlon, el membre de la família TCF encarregat de la transcripció és TCF4.

Actualment, hi ha molts d'estudis que han intentat desxifrar el programa transcripcional de TCF4. *MYC* i *CICLINA D1* (He *et al.*, 1998, Tetsu & McCormick, 1999), entre d'altres, són components essencials d'aquest programa. Un estudi en el qual s'induïa l'expressió de formes dominants negatives de TCF4 en línies cel·lulars de càncer colorectal i es feia una anàlisi del perfil transcripcional d'aquestes cèl·lules (van de Wetering *et al.*, 2002), va posar de manifest que TCF4 imposa el mateix programa genètic en les cèl·lules canceroses que en les cèl·lules progenitores de les criptes. **Una vegada que la via de Wnt roman activada, les cèl·lules tumorals mantenen el seu estat progenitor de manera indefinida. Això permet als adenomes persistir durant anys i, d'aquesta manera, es crea un escenari idoni per a l'adquisició de noves mutacions i, per tant, per a l'evolució de l'adenoma fins a carcinoma.**

FORMES HEREDITÀRIES DEL CÀNCER COLORECTAL: EINES PER A L'ESTUDI DEL CÀNCER

Els coneixements moleculars actuals del CCR (càncer colorectal) es basen principalment en els estudis de les formes hereditàries d'aquesta malaltia. Les síndromes hereditàries es divideixen sovint en dues categories, depenent de la presència o no de poliposi: HNPCC (*hereditary non polyposis colorectal cancer*; càncer colorectal sense poliposi) i FAP (Sancho *et al.*, 2004):

- **HNPCC** (o síndrome de Lynch): és una síndrome hereditària autosòmica dominant que predisposa a l'aparició de múltiples tumors amb absència de poliposi o amb un nombre molt reduït de pòlips i sempre menys de 100. L'edat mitjana d'aparició és entre els 40 i 45 anys. La seva característica molecular principal és la presència d'inestabilitat de microsatèl·lits (repeticions de seqüències de DNA curtes). Els estudis familiars han portat a la identificació de cinc gens de reparació del DNA MMR (*mismatch repair*) implicats en la malaltia: *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*. Els dos primers són els causants del 90% dels casos d'HNPCC. Es pensa que els defectes que genera la incorrecta funció d'aquests gens, provoca l'aparició de mutacions en gens implicats en l'aparició i progressió del càncer com els gens β -*CATENINA*, *TGFBR2*, *BAX* i *APC*, que a la vegada són els que transformen les cèl·lules.
- **FAP**: síndrome autosòmica dominant causada, en la majoria dels casos per mutacions germinals en el gen *APC*, peça clau de via de senyalització Wnt. Es diagnostica per la presència de 100 o més pòlips adenomatosos en el còlon, habitualment milers. Sovint es presenten també lesions extracolòniques com hipertròfia congènita de la retina i tumors desmoides. Representa només l'1% de tots els casos de CCR. Els adenomes apareixen a una edat mitjana de setze anys i els carcinomes als 40 anys. Aquests tumors presenten inestabilitat cromosòmica, aneuploidia i mutacions en gens supressors tumorals i oncogens com *APC*, *KRAS* i *p53*. Els pacients que la pateixen, els quals hereten un al·lel defectiu del gen (mutació germinal), desenvolupen un gran nombre de pòlips (adenomes) al còlon. Els pòlips són expansions clonals de cèl·lules epitelials en

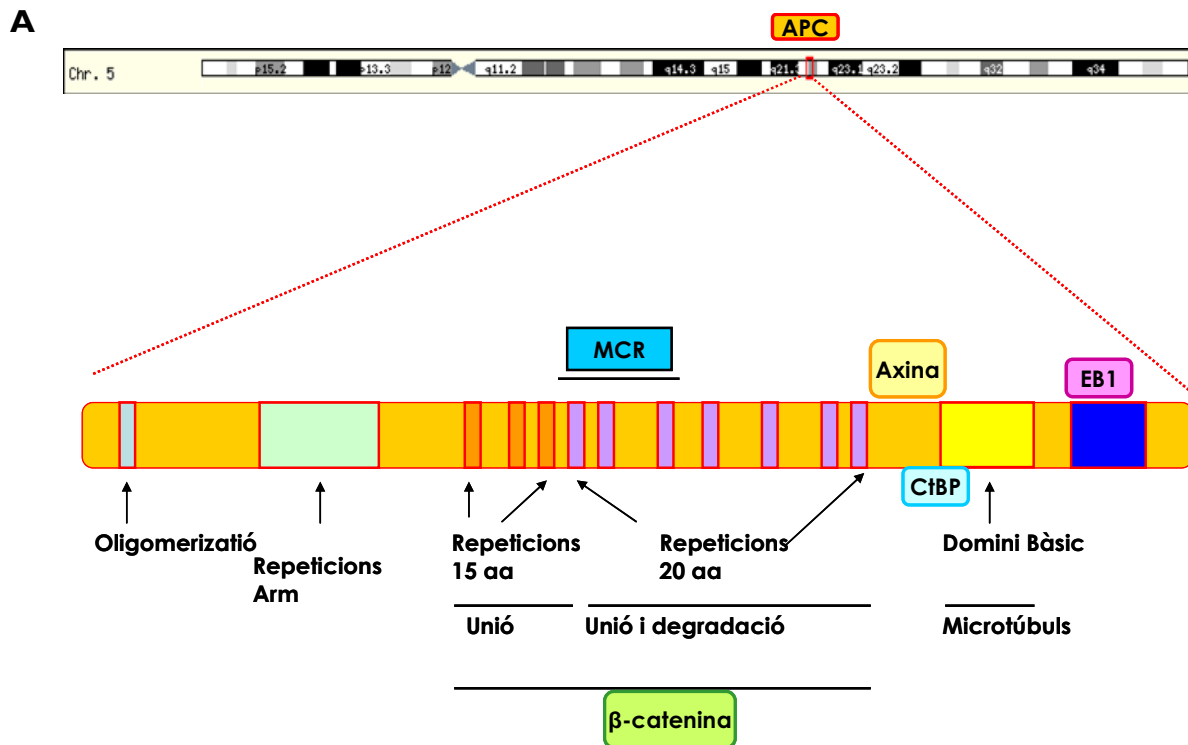
els quals el segon al·lel es troba alterat (mutació somàtica). A causa de l'acumulació de mutacions en diferents gens com *KRAS*, *p53* i *SMAD4*, els adenomes poden evolucionar cap a adenocarcinomes (figura IN.5). La progressió d'un o més dels adenomes cap a carcinoma colorectal és inevitable si no es fa una colectomia profilàctica.

Hi ha una forma atenuada de FAP, AFAP (*atenuated familial adenomatous polyposis*) que va ser proposada l'any 1990 per Leppert (Leppert et al., 1987). L'AFAP es caracteritza per múltiples adenomes (menys de 100), aparició de la malaltia a edats més tardanes i absència de lesions extracolòniques (Lipton & Tomlinson, 2006). Una altra forma de FAP és l'associada a mutacions en el gen *MYH*, MAP (*MYH associated polyposis*) amb herència autosòmica recessiva (Lipton & Tomlinson, 2006). *MYH* forma part de la maquinària de reparació del dany del DNA per excisió de bases. La MAP és difícil de diferenciar de la FAP o l'AFAP. Tendeix a aparèixer més tard i el nombre d'adenomes sempre és inferior a 100.

DE LA MUTACIÓ EN EL GEN APC A LA POLIPOSI ADENOMATOSA FAMILIAR

Estructura del gen APC

L'any 1987, Bodmer et al. (Bodmer et al., 1987) varen localitzar el gen *APC* (5q21) en el cromosoma 5 mitjançant estudis de lligament en famílies de FAP. El gen consta de 8.535 pb (parell de bases) i forma 21 exons. L'isoforma més freqüent de la proteïna està formada per 2.843 aminoàcids. L'exó 15 representa un 75% del gen i és on es localitzen la majoria de les mutacions germinals i somàtiques del gen (figura IN.7).



B

Domini	Funció
Oligomerització	Zona amb repeticions que permeten formar homo-dímers
Repeticions Arm	Consta de 7 repeticions amb alta homologia a la proteïna β -catenina
Repeticions 15 aa	Consta de 3 repeticions on s'uneix β -catenina. Aquesta regió es manté quan hi ha mutacions truncants.
Repeticions 20 aa	Consta de 7 repeticions on s'uneix β -catenina. Aquesta regió només conserva 1 o 2 repeticions quan hi ha mutacions truncants
Domini bàsic	Zona d'unió a microtúbuls i a EB1

Figura IN.7. (A) Esquema del gen d'APC amb els seus diferents dominis i interaccions, (B) taula amb la funció de cada un dels dominis.

Els coneixements actuals sobre APC provenen de l'estudi de la seva estructura i les seves possibles regions funcionals i de l'anàlisi de les proteïnes amb les quals interacciona (Goss & Groden, 2000). La predicció de l'estructura terciària del primer terç de la proteïna indica que probablement sigui el lloc d'oligomerització de la proteïna. Els primers 170 aminoàcids són suficients per a l'homodimerització *in vitro* (Joslyn *et al.*, 1993). Això implica un possible efecte dominant negatiu per a la forma mutada d'APC en aquelles cèl·lules que són heterozigotes. També en el primer terç de

la proteïna hi ha set repeticions armadillo (que s'anomenen així per l'homòleg de β -catenina en *Drosophila*, armadillo), però encara no s'han descrit proteïnes que s'uneixin a aquesta regió d'APC.

En la regió central d'APC es troben les repeticions de 15 i 20 aminoàcids. Les primeres són la regió d'unió a β -catenina (Su *et al.*, 1993). Les repeticions de 20 aminoàcids són altament conservades. Aquesta regió també pot interaccionar amb β -catenina i promou la seva degradació (Rubinfeld *et al.*, 1995). La importància d'aquesta degradació es demostra amb la localització de la regió MCR (*mutation cluster region*) en aquesta zona que codifica per les 20 repeticions.

La regió carboxiterminal és rica en residus bàsics. Aquests residus són els que es poden unir a microtúbuls a través d'EB1 que és un membre de la família EB/RP de proteïnes d'unió a tubulina. A través de l'estudi d'aquesta regió s'ha pogut postular que APC i EB1 mantenen l'estabilitat genòmica a través del control de la integritat del fus mitòtic i l'adequada segregació cromosòmica.

Funcions del gen APC

Les mutacions del gen APC que es troben en els pòlips i en els adenocarcinomes, són normalment mutacions truncants de la proteïna, cosa que suggereix que la regió C-terminal de la proteïna té un paper crític en la funció supressora tumoral, i que afecta la funció del complex destructor de la β -catenina (figura IN.8). L'existència de formes truncades implica que la unió amb β -catenina no es pot donar i per tant, els dipòsits citoplasmàtics de β -catenina augmenten i aquesta pot acumular-se al nucli on actua com a factor de transcripció juntament amb TCF4. El descobriment de la via de Wnt com a la peça clau en el càncer colorectal, va ser confirmat per la troballa de mutacions menys freqüents en altres membres de la via com β -catenina i axina2 (Liu *et al.*, 2000, Morin *et al.*, 1997). En darrer terme, la transformació de les cèl·lules epitelials és deguda a la transcripció aberrant dels gens diana dels factors de transcripció de la família TCF/LEF.

La funció més ben caracteritzada d'APC és la de proteïna reguladora de β -catenina en el complex multiproteic modulada per la via de Wnt (Fodde, 2002). Tot i això, l'APC té altres funcions que un cop alterades també podrien participar en el desenvolupament d'un tumor. L'habilitat d'afectar el citoesquelet també està implicada en la contribució

d'APC en la formació de tumors. El paper que té APC en el citoesquelet s'ha fet palès en estudis en *C. elegans* i *Drosophila*. La pèrdua de la proteïna apr1 (**APC-related protein**) en *C. elegans* indueix alteracions al llarg del desenvolupament (Hoier et al., 2000). En *Drosophila*, la manca d'APC causa defectes morfològics en la diferenciació neuronal que només es poden recuperar parcialment inactivant els factors de transcripció regulats per armadillo, la β -catenina de *Drosophila* (Ahmed et al., 1998). S'ha comentat que en l'epiteli intestinal es donen processos coordinats de migració, divisió i diferenciació de les cèl·lules que en formen part. La regulació del citoesquelet està implicat en tots aquests processos que en conjunt controlen que la vida de les cèl·lules epitelials sigui limitada. APC té un paper en la migració cel·lular i formes truncades de la proteïna que s'expressen en tumors del còlon no tenen moltes de les regions implicades en la directa interacció amb el citoesquelet, en particular els microtúbuls (Polakis, 1995). APC es pot unir als microtúbuls de manera directa i indirecta. La coincidència de la troballa de l'acumulació d'APC en els extrems de cèl·lules en migració ha portat a la hipòtesi que APC està directament implicada en la migració cel·lular (Nathke, 2004). La unió d'APC amb els microtúbuls es veu disminuïda per fosforilació, circumstància que suggereix que el seu paper en la via de Wnt i el paper com a estabilitzadora de microtúbuls estan inversament relacionades. Una vegada reconeguda la seva unió amb els microtúbuls, se li ha reconegut un paper en la formació del fus mitòtic. En el principi de la mitosi, APC es localitza als cinetocors externs. A més, APC es pot trobar en els centròmers i en el fus mitòtic. Les cèl·lules que tenen manca d'APC són més propenses a patir defectes en la segregació dels cromosomes i s'ha trobat un efecte dominant de fragments N-terminals d'APC en tumors sobre la formació del fus i la seva funció (Green & Kaplan, 2003, Kaplan et al., 2001).

A més de la seva localització citoplasmàtica i de la seva unió als grups de proteïnes associades al citoesquelet, APC també s'ha trobat al nucli (Henderson, 2000). APC té una sèrie de senyals d'exportació i importació nuclear. APC pot també unir-se a DNA a través de regions que normalment estan delecionades en les cèl·lules tumorals (Deka et al., 1999). Una de les funcions que fa en el nucli és ajudar al transport de β -catenina, encara que β -catenina també pot viatjar entre el citoplasma i el nucli de manera independent d'APC (Henderson & Fagotto, 2002). Altres funcions més especulatives

que pot tenir APC en el nucli serien les de regular la transcripció a través de la seva unió amb el DNA i la de regular les interaccions de β -catenina en el nucli. És possible que APC també tingui un paper indirecte en la regulació de l'apoptosi, ja que la inducció d'APC wt en línies cel·lulars que tenen APC mutata fa augmentar la mort cel·lular per apoptosi (Morin *et al.*, 1996). Hi ha algunes evidències que la regió d'APC implicada en apoptosi podria ser la mateixa que la d'unió a β -catenina (Goss & Groden, 2000).

APC pot participar, doncs, en processos d'adhesió i migració cel·lular, transducció de senyals, reclutament de microtúbuls i segregació cromosòmica. Tot i això, i encara que tots aquests processos estan potencialment lligats a càncer, sembla que la funció principal com a supressor tumoral resideix en la capacitat de regular de manera apropiada els nivells intracel·lulars de la β -catenina.

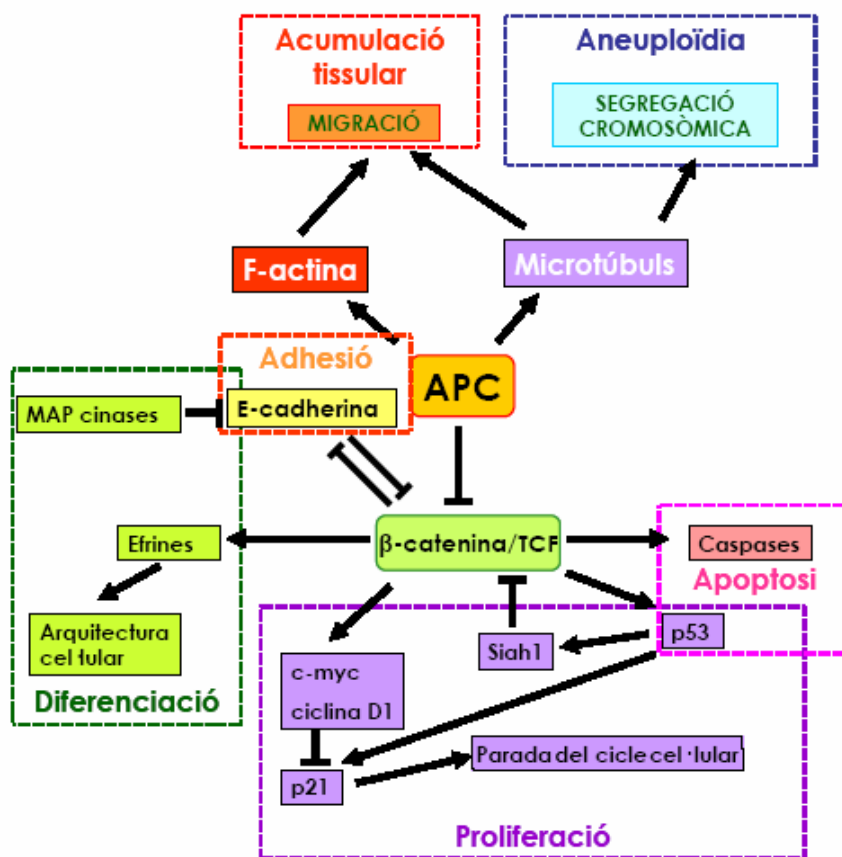


Figura IN.8. Esquema resum de les diferents funcions d'APC. Modificat de Nathke *et al.*, 2004.

Mutacions. El Ying-Yang d'APC: relacions genotip/fenotip i first-hit/second-hit

S'han identificat més de 300 mutacions diferents en el gen *APC* que causen FAP. La majoria són insercions, delecions i mutacions *nonsense* que provoquen un canvi en la pauta de lectura o codons *stop* primerencs. Hi ha diferents graus de gravetat de la malaltia. Hi ha una relació genotip-fenotip en les mutacions del gen *APC*. Segurament la causa més evident de diferències fenotípiques de la malaltia prové de la localització i el tipus de mutació germinal (Houlston *et al.*, 2001). Els casos que presenten més de 1.000 adenomes i edat primerenca d'aparició de la malaltia s'associen amb mutacions entre els codons 1.250 i 1.464. Encara que el tipus més greu és causat per mutacions al voltant del codó 1.300 on es detecta la mutació més freqüent que és la del codó 1.309. Les formes menys greus de la malaltia, amb la presència de menys de 100 adenomes (AFAP), estan associades a mutacions truncants en els extrems 5' i 3' del gen (Friedl *et al.*, 1996). Altres formes menys greus també es poden associar amb variants com la *I1307K26* (Laken *et al.*, 1997) i la *E1317Q* (Frayling *et al.*, 1998). Tot i això, les raons de l'associació entre la mutació germinal i la gravetat de la FAP no són clares. Una possibilitat és que la probabilitat d'iniciació del tumor i de la seva progressió estigui relacionada amb la retenció de la regió N-terminal i la pèrdua de la regió C-terminal de la proteïna, ja que és en la regió C-terminal on se situa el lloc d'unió amb la β -catenina. Un altre mecanisme que hi pot estar relacionat és l'estabilitat de la proteïna. S'ha descrit que la mutació més freqüent (codó 1.309: delecio de cinc pb) produeix una proteïna truncada molt estable, mentre que les mutacions en els extrems 3' i 5' donen lloc a proteïnes inestables i/o actuen de manera dominant negativa. La localització i el tipus de mutació germinal d'*APC* no pot explicar les diferències de gravetat de la malaltia dins una mateixa família o entre diferents famílies amb la mateixa mutació germinal. La influència del micro i del macroambient poden explicar, en part, aquestes diferències. Tot i que hi pot haver aquestes diferències causades per l'ambient, també és cert que estudis de parelles de germans han posat de manifest que hi pot haver diferències acusades en el fenotip de dos germans del mateix sexe i aquest fet només es podria explicar per la presència de gens modificadors (Houlston *et al.*, 2001).

Alguns autors (Lamlum *et al.*, 1999) proposen que les mutacions d'*APC* s'han de seleccionar no només per la pèrdua de funció i creuen que la posició de la mutació germinal en el gen hauria de determinar la posició i el tipus d'alteració somàtica, el que anomenen *second hit*, que es dona en els pòlips. En un estudi amb 210 adenomes, varen

trobar un 20% de pèrdues al lèliques. Hi havia una dicotomia entre pacients que presentaven majoritàriament pèrdua al lèlica en els seus tumors i aquells en els quals pràcticament no es trobava pèrdua al lèlica. Varen veure que la pèrdua al lèlica tenia una forta associació amb els casos que presenten la mutació germinal en el codó I.309 (el que es troba més freqüentment mutat) i als voltants d'aquesta posició. En canvi, la resta de pacients presentaven més freqüentment mutacions en l'MCR com a *second hit*. Varen proposar que les mutacions properes al codó I.309 són les que proporcionen un avantatge selectiu més fort i tendrien a adquirir un *second hit* per pèrdua al lèlica, deixant, d'aquesta manera, com a única representació d'APC en la cèl·lula, aquella que té la mutació en la regió del codó I.300. Les mutacions més allunyades d'aquesta localització, però encara en l'MCR, donen un avantatge menys fort i les que es troben fora de l'MCR encara menys. En aquests casos, els adenomes tendeixen a presentar mutacions en l'MCR com a *second hit* perquè seria la manera d'adquirir mutacions que atorguin avantatge selectiu més fort que la primera alteració. Però en aquest cas, la cèl·lula encara porta la mutació més feblement seleccionada i aquests adenomes, no només poden presentar un *second hit*, sinó un tercer *hit* per pèrdua de l'al·lel portador de la mutació germinal. Els avantatges selectius de les diferents mutacions en el gen, que probablement s'expliquen per la pèrdua de la capacitat de degradar β -catenina o pel desequilibri causat pel manteniment de les funcions de la regió N-terminal i la pèrdua de les de la C-terminal, es poden donar per un efecte dominant negatiu per dimerització. Aquesta interessant explicació, també lliga amb el que dèiem anteriorment sobre la gravetat de la malaltia. El fet que els pacients amb mutacions germinals properes al codó I.300 presentin pèrdua al lèlica indica que els mecanismes de deleció, no-disjunció cromosòmica i recombinació mitòtica es produeixen amb una freqüència més elevada, de manera que, en general, aquestes cèl·lules tenen una freqüència de mutació somàtica més elevada i, per tant, això s'hauria de reflectir en un fenotip més greu. En un article més recent (Crabtree et al., 2003), els mateixos autors refinen la seva teoria i expliquen que la clau en el tipus de mutacions que apareixen són el nombre de repeticions de 20 aminoàcids que queden en total entre l'al·lel portador de la mutació germinal i l'altre al·lel. És a dir, que la situació òptima per a la tumorigènesi és que quedin una o dues repeticions en total. Això s'aconsegueix amb pèrdua al lèlica en el cas de mutacions germinals al voltant del codó I.300 i per mutació truncant en l'MCR en la resta de casos.

El gen *APC* no es troba només mutat en la síndrome de FAP, sinó que la immensa majoria d'adenomes i carcinomes esporàdics també són causats per defectes en el gen *APC*. En els focus de criptes aberrants ja es poden identificar mutacions en *APC*. Això implica que la pèrdua de funció d'*APC* representa el punt d'inici en el càncer colorectal (Takayama *et al.*, 1998).

APC NO NOMÉS PARTICIPA EN LA VIA DE WNT. INESTABILITAT CROMOSÒMICA

Una de les primeres alteracions del càncer que els científics varen posar de manifest mirant al microscopi fa més de cent anys, va ser que les cèl·lules tenien un increment



Figura IN.9. Mitosis aberrants. L'any 1890 David Hansemann ja va descriure mitosis asimètriques en tumors en el seu treball publicat a la revista *Virchow's Arch. Pathol. Anat.*

en el nombre de cromosomes (figura IN.9). A més de les alteracions numèriques, els cromosomes de les cèl·lules tumorals solen presentar aberracions estructurals com inversions, delecions, duplicacions i translocacions. Aquestes aberracions són el que es coneix com a aneuploidia (Rajagopalan & Lengauer, 2004). No està clar si l'aneuploidia és una desregulació necessària per a la tumorigènesi, o bé si és només una conseqüència d'altres alteracions. La seva base genètica tampoc és ben coneguda.

D'altra banda, aproximadament un 15% dels càncers colorectals presenten un tipus

d'instabilitat genètica com a conseqüència de defectes en el sistema de reparació del dany al DNA. Aquesta és la característica principal de l'HNPCC. Aquests defectes fan que la cèl·lula

sigui susceptible d'adquirir mutacions en diferents gens i les regions de repeticions curtes són especialment sensibles a aquestes mutacions. D'aquesta manera, la

inestabilitat genètica que es troba en aquests tipus de tumors, s'anomena inestabilitat de microsatèl·lits (MIN, *microsatellite instability*). Les cèl·lules que presenten MIN tenen una freqüència de mutacions tres vegades superior a una cèl·lula normal, però aquestes cèl·lules tenen un contingut cromosòmic diploide. En canvi, **la freqüència accelerada de pèrdues i guanys cromosòmics que poden donar lloc a aneuploidia es coneix com a inestabilitat cromosòmica (CIN, *chromosomal instability*) i es presenta en el 85% dels casos de CCR.** La implicació que té aquest fenomen sobre la tumorigènesi és permetre la pèrdua d'heterozigositat (o LOH, *loss of heterozygosity*) d'alguns gens i d'amplificació d'altres per duplicació, fet que resulta important quan afecta gens supressors tumorals i oncogens respectivament. Aquests canvis poden donar lloc a un avantatge selectiu per l'increment de la proliferació cel·lular i per la disminució de la mort cel·lular (Rajagopalan et al., 2003).

El mecanisme principal implicat en la CIN és la desregulació o alteració del punt de control (*checkpoint* en anglès) de mitosi. La funció normal d'aquest *checkpoint* és la de verificar que tots els cromosomes es troben perfectament alineats al fus mitòtic abans de la segregació mitòtica (figura IN.10).

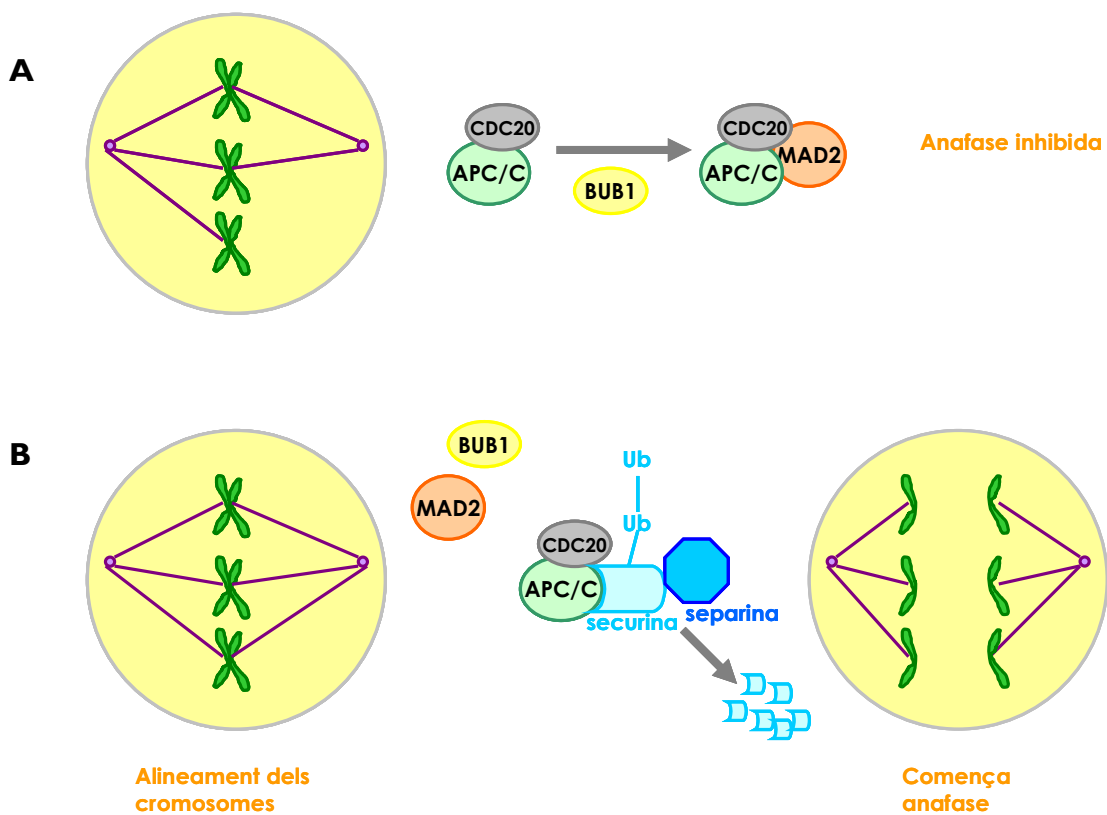


Figura IN.10. Checkpoint de mitosi.(A) Els cromosomes no units al fus generen un senyal d'inhibició de l'anafase a través de la unió de BUB1 i MAD2 a APC/C (*anaphase promoting complex*). (B) Una vegada els cromosomes estan alineats APC/C passa a ser actiu, el que determina la degradació de la securina i l'alliberament de la separina. Aquesta darrera promou la separació de les cromàtides germanes.

Com que aquest mecanisme es troba compromès en les cèl·lules que tenen CIN, s'ha postulat que hi pot haver mutacions dels gens implicats en el procés. Un gen candidat es pot anomenar gen de CIN només si compleix els següents criteris: (1) hi ha evidències inequívokes que l'expressió o funció de la proteïna està alterada en cèl·lules tumorals amb relació a les cèl·lules normals; (2) la simulació d'aquesta alteració dona lloc a CIN en cèl·lules diploides en cultiu (Rajagopalan et al., 2003).

El primer exemple d'un gen mutat que causa CIN el va proporcionar l'estudi dels gens *BUB1* i *BUBR1* (Cahill et al., 1998). Aquests gens es varen trobar mutats en alguns casos de CCR. Un altre component del *checkpoint*, *MAD2*, es va trobar transcripcionalment silenciada en el càncer de mama i altres càncers. Hi ha altres gens com *hZW10*, *hZWILCH* i *hROD* que hi podrien estar també implicats, però el seu paper en la CIN encara no s'ha demostrat de manera clara (Wang et al., 2004).

Shih et al. varen estudiar adenomes de petit diàmetre i ja hi varen trobar un cert grau d'instabilitat cromosòmica, i això indica que és una desregulació primerenca en el desenvolupament del càncer colorectal (Shih et al., 2001b). Hom ha proposat que sigui el gen *APC* que promou la CIN (Fodde et al., 2001a, Kaplan et al., 2001), ja que la proteïna truncada manca del lloc d'unió als microtúbuls.

S'ha descrit que la CIN podria resultar de mutacions en *BUB1* o *p53*, encara que mutacions en *BUB1* són molt poc freqüents en el CCR i mutacions del gen *p53* es donen massa tard en la progressió tumoral per poder ser la causa de la CIN. Alguns autors (Fodde et al., 2001a, Kaplan et al., 2001) han trobat que mutacions en el gen *APC* poden donar lloc a instabilitat cromosòmica. β -catenina participa en les unions adherents entre cèl·lules, a part de la seva funció en la via de Wnt. D'aquesta manera, *APC* pot controlar l'adhesió intercel·lular regulant l'estabilitat i la localització nuclear de la β -catenina. A part, la majoria de les mutacions en *APC* formen una proteïna truncada que manca del lloc d'unió a microtúbuls.

Estudis recents apunten que la regió C-terminal d'*APC* participa en el manteniment de l'estabilitat dels microtúbuls durant la mitosi (Fodde et al., 2001a, Kaplan et al., 2001). *APC* es localitza al cinetocor dels cromosomes metafàsics i aquesta localització es pensa que es produeix a través de la interacció entre *APC* i *EBI*. D'aquesta manera, les cèl·lules que tenen *APC* mutat, presenten microtúbuls que són incapaçs d'unir-se als cinetocors i es caracteritzen per CIN (figura IN.11). En les cèl·lules que tenen una proteïna *APC* deficient es donen dos tipus d'alteracions cromosòmiques: canvis

quantitatius (tetraploïdia) i reorganitzacions estructurals (translocacions cromosòmiques). Aquests dos processos apareixen en moltes ocasions a la vegada i sembla que responen a la funció dual d'APC sobre el control de la mitosi: l'alineament correcte del fus mitòtic amb els cromosomes que fa el cinetocor i la regulació de la duplicació dels centrosomes mitjançant la interacció amb la tubulina i el centrosoma (Fodde *et al.*, 2001b).

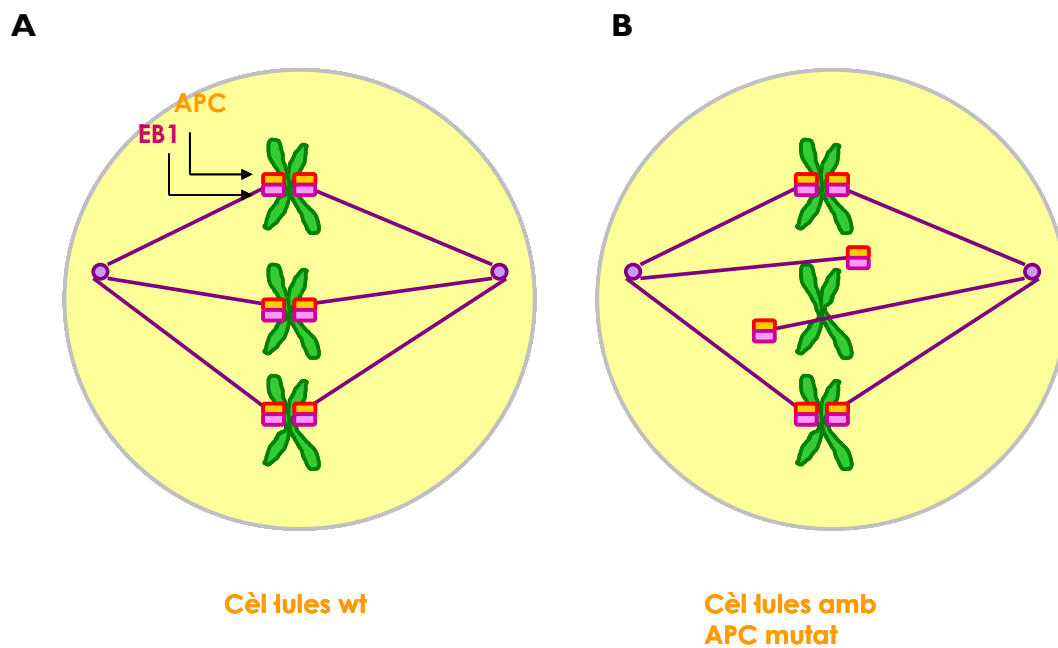


Figura IN.11. APC en el fus mitòtic. (A) En les cèl·lules wt, APC s'acumula al cinetocor on facilita la unió dels microtúbuls amb el cinetocor a través d'EB1. (B) En les cèl·lules que expressen una forma truncada d'APC, la interacció entre els cinetocors i els microtúbuls es trenca i es dona CIN.

APLICACIÓ DE LES NOVES TECNOLOGIES A L'ESTUDI DEL CÀNCER COLORECTAL

El càncer és una malaltia heterogènia. Actualment, les classificacions dels tumors es basen en criteris histopatològics i clínics. Tumors amb un mateix comportament queden englobats sota la mateixa classificació encara que poden presentar diferents característiques moleculars. Amb el naixement de tècniques d'estudi del genoma a gran escala es pretenen assolir coneixements moleculars que siguin clínicament més informatius i útils.

Tècniques d'estudi del transcriptoma

Hi ha moltes tècniques que s'han creat per identificar mRNA diferencialment expressats comparant dues poblacions cel·lulars. Tècniques com la substracció de cDNA i *Differential Display* permeten comparar diferències d'expressió gènica, però és una informació indirecta, parcial i no dona dades sobre la quantitat relativa. Amb l'aparició dels *microarrays* s'ha pogut quantificar l'expressió de milers de gens a la vegada en un sol experiment (Stremmel *et al.*, 2002). Sovint es comparen dues mostres que en el cas de la recerca del càncer poden ser un teixit tumoral i un teixit normal, de manera que s'obté un perfil d'expressió gènica del tumor que constitueix el patró diferencial entre aquest teixit i un teixit normal. Per fer aquests experiments s'extreu RNA de les mostres i se n'obté cDNA que és marcat amb fluorescència. Cada mostra es marca amb un fluorocrom diferent i s'hibriden sobre un suport que conté representacions de milers de gens. La hibridació de les dues mostres es dona per competència segons la seva abundància relativa. El senyal de cada gen es quantifica i s'obtenen uns nivells relatius d'expressió per cada gen que s'analitzen amb eines estadístiques. També hi ha altres plataformes en què la hibridació no és per competència, sinó que cada mostra és hibridada en un suport individual. La plataforma d'aquest tipus més estesa és la d'*Affymetrix*. Hi ha dues grans plataformes de *microarrays* d'expressió: *microarrays* d'oligonucleòtids i *microarrays* de cDNA (figura IN.12).

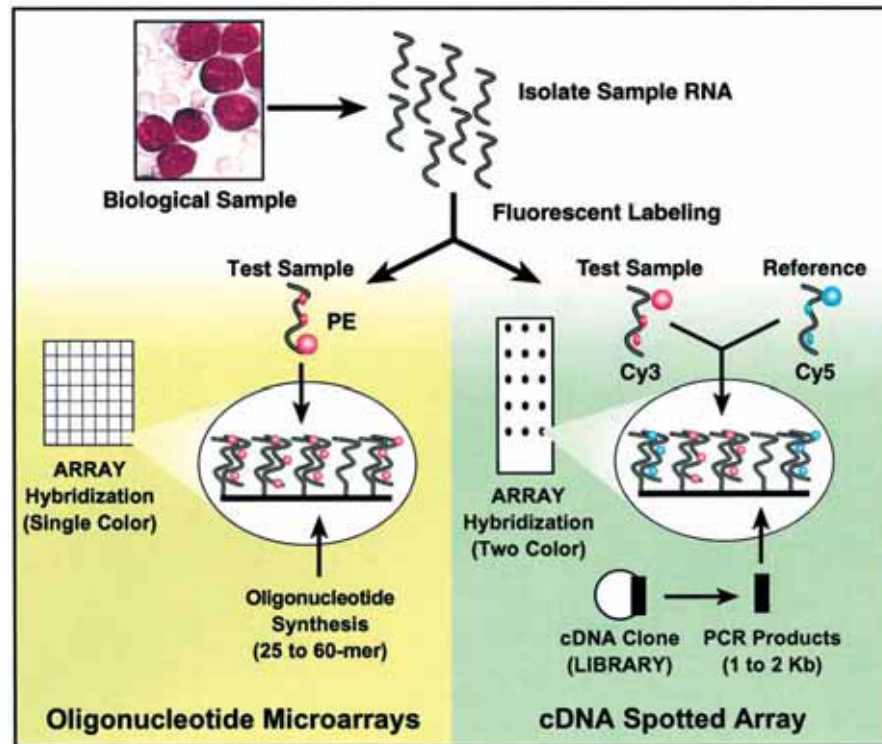


Figura IN.12. Esquema dels dos tipus majoritaris de plataformes de *microarrays* existents: d'oligonucleòtids i de cDNA. Encara que la plataforma més estesa dins els *microarrays* d'oligonucleòtids és la d'Affymetrix, que es basa en la hibridació *single color* (una sola mostra), han aparegut recentment plataformes per a hibridacions *two color* per als *microarrays* d'oligonucleòtids. Extret de Ramaswamy & Golub, 2002.

La tecnologia més representativa de l'època “-òmica” són els *microarrays*. Es varen portar a la pràctica al principi dels anys 90 i, des de llavors, s'han anat modificant, refinant i adaptant per aconseguir el present estatus de plataforma d'elecció per fer l'anàlisi massiva encaminada a la detecció de perfils d'expressió. Actualment, es publiquen uns quants milers d'articles cada any que descriuen dades de *microarrays*. Tanmateix, encara es generen dubtes sobre la reproductibilitat dels experiments en diferents llocs, la compatibilitat dels resultats de diferents plataformes i, fins i tot, la viabilitat dels resultats dins un mateix laboratori. Després de quinze anys de recerca i desenvolupament, encara mancava un consens general sobre la bona pràctica, no només del disseny experimental i la preparació de les mostres, sinó també en l'adquisició de les dades, l'anàlisi estadística i la seva interpretació. S'ha fet un esforç per determinar la reproductibilitat dels *microarrays* per part de la FDA (*food and drug administration*) a través del projecte MAQC (*microarray quality control*) en el qual participaren 137 persones de 51 organitzacions que representen la recerca, la indústria

i el govern (Strauss, 2006). La conclusió d'aquest estudi és que les mateixes mostres híbrides sobre diferents plataformes i en 3 laboratoris diferents, són comparables i generen llistes de gens similars. Per tant, sembla que formalment aquesta incertesa sobre la reproductibilitat està resolta.

La tècnica de l'estudi massiu de l'expressió gènica s'ha aplicat extensament a la recerca del càncer. Els *microarrays* d'expressió s'han analitzat utilitzant algoritmes per fer *clustering* (agrupaments) que agrupen gens i mostres segons els seus perfils d'expressió i mètodes estadístics que permeten relacionar els gens amb determinades característiques clíniques.

Aquestes anàlisis, però, tenen limitacions. Moltes vegades no tenen en compte els gens amb un valor per sota d'un determinat llindar i els gens que no són familiars per a l'investigador que els analitza. A més, el fet aïllat d'agrupar gens a partir de la seva signatura transcripcional dista molt d'explicar els processos biològics en els quals aquests gens estan implicats. En la recerca actual del càncer s'han de tenir en compte aquestes limitacions per desenvolupar nous mètodes d'anàlisi que les resolguin (Segal *et al.*, 2005).

La taula IN.3 resumeix els treballs publicats sobre CCR usant la tècnica dels *microarrays*. En la majoria dels estudis, l'RNA s'ha extret de tot el tumor, sense separar-lo del teixit estromal (cèl·lules endotelials, histiòcits, cèl·lules musculars, cèl·lules inflamatòries...) que l'envolta. Pot ser interessant estudiar els diferents tipus cel·lulars que es troben en el tumor per separat i també eliminar el teixit normal que envolta el tumor. Es pot fer microdissecció del teixit per seleccionar les cèl·lules específiques d'estudi mitjançant la captura amb làser. En la majoria dels estudis que s'han fet fins el moment, el teixit estromal és ignorat, i s'ha agafat només com a objecte d'estudi el teixit tumoral, amb la consegüent pèrdua d'informació (Galamb *et al.*, 2005).

INTRODUCCIÓ

Grup de recerca	Tipus d'array	Nombre de gens	Tipus de detecció	Nombre de mostres	Tipus de mostres	Conclusió de l'estudi
Agrawal et al., 2002	Affymetrix	8.900	Fluorescència	40 CCR; 20 met. fetge; 10 normal	Biòpsies	Generació de marcadors de progressió
Backert et al., 1999	Microarray de cDNA (Atlas)	588	Autoradiografia	6	Biòpsies	Detecció de 6 gens alterats, entre ells: WEE1Hu i p21
Bandres et al., 2004	Microarray de cDNA		Fluorescència (Cy3, Cy5)	20 CCR	Biòpsies	Alteració de l'apoptosi en CCR amb nòduls limfàtics
Bertucci et al., 2004	Microarray de cDNA	8.074	Fluorescència (Cy3, Cy5)	22 CCR; 23 normal	Biòpsies	Classificació del CCR segons supervivència a 5 anys
Bianchini et al., 2006	Microarray de cDNA		Fluorescència (Cy3, Cy5)	25 CCR; 13 normal	Biòpsies	Detecció de 584 gens diferencialment expressats entre teixit normal i carcinoma
Bikenkamp-Demtroder et al., 2002	Affymetrix	6.800	Fluorescència	21 CCR; 6 normal	Biòpsies	Classificació dels diferents estadis de CCR amb detecció de 383 gens alterats
Bikenkamp-Demtroder et al., 2005	Affymetrix	7.129	Fluorescència	25 CCR; 20 normal	Biòpsies	Detecció de 118 gens diferencialment expressats entre el CCR del cec i la resta
Chiu et al., 2005	Microarray de cDNA	8.000	Fluorescència (Cy3, Cy5)	31 CCR; 31 normal	Biòpsies	Detecció de 20 gens diferencialment expressats entre teixit normal i carcinoma
Croner et al., 2005	Affymetrix	22.284	Fluorescència	20 CCR; 10 normal	Biòpsies	Detecció de 23 gens diferencialment expressats entre teixit normal i carcinoma
Frederiksen et al., 2003	Affymetrix	5.000	Fluorescència (Cy3, Cy5)	20 CCR; 5 normal	Biòpsies	Classificació dels diferents estadis de CCR
Kitahara et al., 2001	Microarray de cDNA	9.216	Fluorescència (Cy3, Cy5)	8 CCR; 8 normal	Captura de làser	Detecció de 235 gens diferencialment expressats entre teixit normal i carcinoma
Kwon et al., 2004	Microarray de cDNA	4.608	Fluorescència (Cy3, Cy5)	12 CCR; 12 normal	Biòpsies	Classificació del CCR segons nòduls limfàtics positius o negatius
Li et al., 2004	Microarray de cDNA	23.040	Fluorescència (Cy3, Cy5)	25 CCR; 9 adenomes	Biòpsies	Detecció de gens relacionats amb metastasi hepàtica
Notterman et al., 2001	Affymetrix	3.200	Fluorescència	18 CCR; 4 adenoma; 22 normal	Biòpsies	Detecció de gens diferencialment expressats entre teixit normal, adenoma i carcinoma
Okuno et al., 2001	Array en filtre	150	Quimioluminiscència	1 CCR	Biòpsies	Detecció de gens diferencialment

						expressats entre teixit normal i carcinoma
Saito et al., 2002	Microarray de cDNA	69	Autoradiografia	2 CCR	Biòpsies	
Wang et al., 2004	Affymetrix	22.000	Fluorescència	74 CCR	Biòpsies	Signatura de predicció de pronòstic en estadi Duke's B
Williams et al., 2003	Microarray de cDNA	9.592	Fluorescència (Cy3, Cy5)	20 CCR; 20 normal	Biòpsies	Determinació paper de gens up-regulats
Zou et al., 2002	Microarray de cDNA	8.000	Fluorescència (Cy3, Cy5)	9 CCR; 8 normal	Biòpsies	Classificació del CCR amb criteris clinicopatològics

Taula IN.3. Bibliografia sobre l'aplicació dels *microarrays* en l'estudi del càncer colorectal.

Tècniques d'estudi del genoma

Les alteracions cromosòmiques es varen poder estudiar gràcies a l'aparició de tècniques citogenètiques. La tècnica més antiga és el cariotipatge i va aparèixer als anys 50. Més tard, als anys 60, varen aparèixer les tècniques de bandatge. Aquestes tècniques, però, necessiten cèl·lules en divisió i això fa que l'anàlisi sigui laboriosa i requereixi molt de temps. A més, no permet detectar petites aberracions. Per superar aquests inconvenients, als anys 80 varen aparèixer noves tècniques com FISH (*fluorescence in situ hybridization*). Però aquesta tècnica requereix un coneixement previ de la localització de les aberracions i només pot analitzar un nombre limitat de *loci* a la vegada. L'any 1992, Kallioniemi et al. (Kallioniemi et al., 1992) varen introduir una nova tècnica anomenada CGH (*comparative genomic hybridization*). Aquesta tècnica detecta i mapeja alteracions de nombre de còpies de seqüències de DNA. El DNA d'estudi (pacient) i el DNA de referència (normal) es marquen amb fluorescència verda i vermella respectivament. Els DNA s'hibriden sobre cromosomes normals en metafase per competència. D'aquesta manera, la fluorescència es quantifica i es calculen els quocients entre els senyals problema i referència per a cada un dels cromosomes. Amb la introducció de la tècnica *array*-CGH, la limitació de la resolució en la CGH convencional està resolta. En la tècnica d'*array*-CGH els cromosomes en metafase són substituïts per fragments de DNA dels quals se'n coneix la localització cel·lular. La resolució de la tècnica la determina la distància entre fragments de DNA consecutius i

la mida d'aquests fragments. Aquesta tècnica s'utilitza bàsicament en la recerca del càncer i ha permès la classificació de tumors i de gens candidats (Oostlander *et al.*, 2004). Recentment, s'ha aplicat aquesta tècnica a l'estudi del càncer colorectal amb diferents enfocaments. La taula IN.4 resumeix la bibliografia sobre aquest tema i els diferents focus d'atenció. En general es troben canvis en els cromosomes 8 i 20, però no s'han descrit regions recurrents de canvis en mostres de càncer colorectal.

Focus	Conclusió de l'estudi	Referència
Comparació entre adenomes portadors de mutacions en APC i en MYH	Tant MAP com FAP tenen 60-80% canvis aneuploides. Troben pèrdues: 1p, 17, 19 i 2 i guanys: 7 i 13.	Cardoso <i>et al.</i> , 2006
Anàlisi genòmica de línies cel·lulars de CCR amb aCGH i SNP-array	Canvis complexos donen lloc a CIN en el CCR, no només canvis en el nombre de còpies	Gaasenbeek <i>et al.</i> , 2006
Comparació de tumors colorectals amb i sense inestabilitat de microsatèl·lits	Els dos tipus de tumors donen lloc a guanys: 8q24, 16q24.3, 20q13 i pèrdues: 5q21	Camps <i>et al.</i> , 2006
Deleció la banda 20p12.1	Canvis en el gen BA318C17.1 que es troba en la regió	Davison <i>et al.</i> , 2005
Comparació dels tumors sense inestabilitat de microsatèl·lits i diploides amb altres tipus de tumors	El grup de tumors MSI-CIN- és diferent de la resta i heterogeni	Jones <i>et al.</i> , 2005
Avantatges de l'ús de mostres microdisseccionades	Demostren que poden fer aCGH a partir de 2 ng de DNA i 1.000 cèl·lules microdisseccionades	Cardoso <i>et al.</i> , 2004
Descripció canvis en tumors amb inestabilitat de microsatèl·lits	Detecció de canvis en regions petites dels cromosomes 8 i 20	Nakao <i>et al.</i> , 2004

Taula IN.4. Bibliografia sobre l'aplicació dels *arrays* de CGH en el càncer colorectal.