



**ESTUDI GENÈTIC INTEGRAL DE LA REGIÓ 4p15 I IDENTIFICACIÓ
DE *PI4K2B* I *STIM2* COM A GENS ALTERATS EN
CÀNCER COLORECTAL**

Memòria presentada per

Álvaro Aytés Meneses

Per optar al grau de

Doctor per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada sota la direcció del
Dr. Alberto Villanueva Garatachea
Al Laboratori de Recerca Translacional de
L'Institut Català d'Oncologia.

Tesi adscrita al departament de Biologia cel·lular i anatomia patològica
Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona
Programa de Biologia i patologia cel·lular (bieni 2001-2003)
Tutor: Dr. Carles Enrich

Alberto Villanueva

Carles Enrich

Ávaro Aytés

Barcelona, Juny de 2007

Introducció

1. EL CANCER COLORECTAL

Epidemiologia i etiologia del càncer colorectal

El càncer colorectal (CCR) és la segona neoplàsia maligna més freqüent al món occidental i la segona causa de mort per càncer en la majoria de països desenvolupats. Malgrat que el tumors de pulmó i mama siguin els més freqüents en homes i dones, respectivament, l'adenocarcinoma de còlon i recte és el més freqüent que afecta ambdós sexes alhora (Borras JM., 2001).

A Catalunya, la incidència del CCR s'ha situat al 2007 al voltant del 14,6% del conjunt de neoplàsies malignes excloent-hi les de pell no melanoma. És la segona causa de mort per càncer, tant en homes com en dones, amb unes taxes del 12 % i 15,8 %, respectivament (estimació d'incidència a l'any 2005 segons el Pla director d'Oncologia a Catalunya 2001-2004). Aquesta mortalitat ha anat minvant en els darrers 15 anys, principalment degut a la implantació de protocols de cribatge que han permès la localització i resecció precoç de lesions pre-malignes abans que progressessin a tumors malignes, i incrementar així la proporció de lesions canceroses detectades en estadis més inicials i tractables. Malgrat tot, la supervivència global als 5 i 10 anys del diagnòstic és del 64 % i del 57 % respectivament. Quan la detecció és en estadis inicials i localitzats de la malaltia la supervivència incrementa fins a un 90 %, tot i que només un 39 % dels casos són diagnosticats en aquets estadis. Així doncs, la supervivència baixa fins un 68 % quan el tumor envaeix òrgans adjacents i nòduls limfàtics, i fins a un 10 % quan hi ha metàstasis a distància.

En el nostre territori l'edat mitjana d'incidència és de 68 anys en els homes i de 70 en les dones. La distribució per edats és similar en ambdós sexes fins als 60 anys en que s'estabilitza en el cas de les dones mentre que continua creixent en el dels homes. Del conjunt del CCR, el de còlon suposa el 60 % en els homes i el 70% en les dones, mentre que el de recte suposa el 40 % i 30 %, respectivament. A més, a mesura que el risc de CCR augmenta en un territori, el de còlon incrementa la seva freqüència distanciant-se del de recte.

Del total de CCR, al voltant del 70-80 % dels casos corresponen a les formes esporàdiques de la malaltia. Entre un 5 i un 10% corresponen a formes amb una predisposició hereditària, de les quals, les dues més freqüents són la Poliposi Adenomatosa Familiar (FAP, *Familial Adenomatous Polyposi*) i el Càncer Colorectal Hereditari No Polipós (HNPCC, *Hereditary Nonpolyposis*

Colorectal Cancer) (de la Chapelle, 2004; Ilyas et al., 1999). Aquestes dues formes familiars, tot i minoritàries, són les que han permès conèixer les bases genètiques de la majoria de CCR, perquè entre un 8-15 % dels tumors esporàdics segueixen la mateixa via que els HNPCC i el 85 % la mateixa que els de FAP (Boland, 1997).

El tercer i menys conegut tipus de CCR, que suposa aproximadament un 20-25 % dels casos, és aquell en que si bé la freqüència d'aparició en una mateixa família és superior a la que seria en el cas dels esporàdics, tampoc no encaixa amb el patró característic d'una síndrome hereditària. Les mostres tumorals de pacients seleccionades per als treballs d'aquesta tesi corresponen a formes esporàdiques de la malaltia.

Tot i que les alteracions moleculars suposin la principal causa de l'aparició del CCR, aquestes no sempre poden deslligar-se dels factors ambientals, principalment la dieta, el consum de tabac i alcohol, així com l'exposició a carcinògens ambientals. Nombrosos estudis han demostrat una associació positiva entre l'elevada ingesta de carn (principalment carn vermella i carn processada) i l'aparició de la malaltia (Giovannucci and Willett, 1994). D'altra banda, aquestes dietes van sovint acompanyades d'una reducció en la ingesta de fibra i fruita, components que han demostrat un efecte protector davant del càncer (Bingham, 2000). L'efecte de la fibra rauia en la seva capacitat per fixar els àcids biliars i carcinògens potencials en la llum intestinal, així com modificar la flora i incrementar el trànsit intestinal reduint el temps de contacte d'aquests carcinògens amb la mucosa colònica.

Recentment, els treballs publicats pel grup EPIC (*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*) han demostrat l'associació positiva entre la ingesta d'alcohol i el risc de CCR (Ferrari et al., 2007). Altres grups han suggerit l'associació entre una dieta pobre en ingesta de fruita i verdura i una major prevalença d'adenomes colorectals (Millen et al., 2007).

Finalment, també s'ha suggerit que la ingesta de grans quantitats de calci té un efecte de protecció davant l'aparició del CCR. El mecanisme que hi hauria al darrere podria ser la unió del calci als àcids grassos i a la bilis, que és citotòxica (Kleibeuker et al., 1996). També s'ha demostrat que nivells elevats de calci a la dieta redueixen la proliferació cel·lular a la part apical de les criptes colòniques (Bostick et al., 1995).

Anatomia i histologia del còlon i recte

A la part terminal del tracte digestiu, començant a la vàlvula ileocecal i fins a l'anús, hi trobem el còlon i el recte. Si bé anatòmicament es divideix el còlon en ascendent, transvers, descendent i sigmoide, a nivell clinicopatològic se simplifica en dues parts: el còlon proximal o dret, que inclou el cec, l'ascendent i el transvers; i el còlon distal o esquerre, format pel còlon descendent, el sigmoide i el recte. Histològicament, el gruix del tub està format per diferents capes de la llum a l'exterior: teixit epitelial, làmina pròpia, muscularis mucosa, submucosa, muscularis pròpia, subserosa i serosa. En el cas del CCR, la profunditat en la invasió d'aquestes capes serà determinant per al pronòstic de la malaltia.

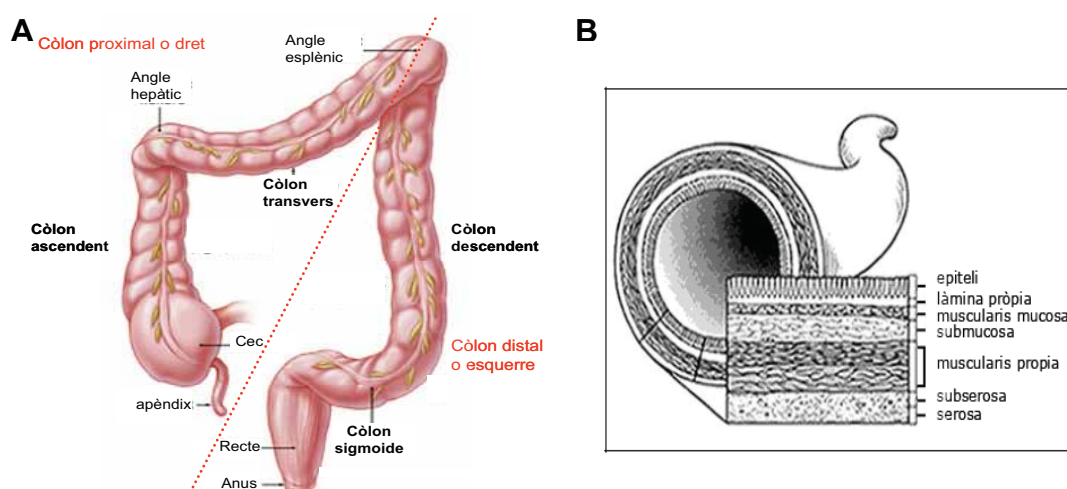


Figura 1. Anatomia de l'intestí gruixut. (A) Divisions anatòmiques i clinicopatològiques (vermell) del còlon i recte. (B) Esquema d'una secció transversal del còlon.

L'epiteli de l'intestí constitueix una barrera entre el cos i el món exterior. Està format per una monocapa de cèl·lules epitelials que revesteixen la part luminal del tracte digestiu i que són l'origen del càncer de còlon. Aquest epiteli està replet de petites cavitats anomenades criptes de Lieberkühn. En aquestes criptes té lloc una homeòstasi que dirigeix la renovació constant del epiteli intestinal. Les cèl·lules mare situades al fons de les criptes es divideixen donant lloc a cèl·lules pluripotents que viatgen des del fons a la superfície de la cripta. En aquest procés, aproximadament al final del primer

terç de la cripta, aquestes cèl·lules es diferencien en un dels tipus cel·lulars del còlon: enteròcits, cèl·lules caliciformes o cèl·lules neuroendocrines. A la superfície de la cripta, les cèl·lules ja diferenciades pateixen un procés d'apoptosi i/o extrusió al lumen quan hi arriben 5 dies després (Heath, 1996; Radtke and Clevers, 2005).

Els factors moleculars que regulen aquest procés estan implicats en la carcinogènesi. Quan s'altera aquesta regulació l'epiteli pot proliferar de forma descontrolada i donar lloc a lesions neoplàstiques. Es creu que el gradient de concentració entre les proteïnes p21 i TCF el llarg de la cripta és el responsable que les cèl·lules de la base es mantinguin indiferenciades. β -CATENINA, juntament amb TCF regularien la proliferació i diferenciació mitjançant l'activació del gen *MYC* que alhora reprimeix l'expressió de *p21*, un inhibidor de les CDK (van de Wetering et al., 2002). Alguns autors aposten per la via de WNT com a reguladora d'aquesta homeòstasi a través de la transcripció dels receptors de les efrines (*EPHB*), ja que en tots els estadis del CCR està perduda la regulació de l'expressió d'aquestes proteïnes i per tant, es troben constitutivament expressades (Batlle et al., 2002).

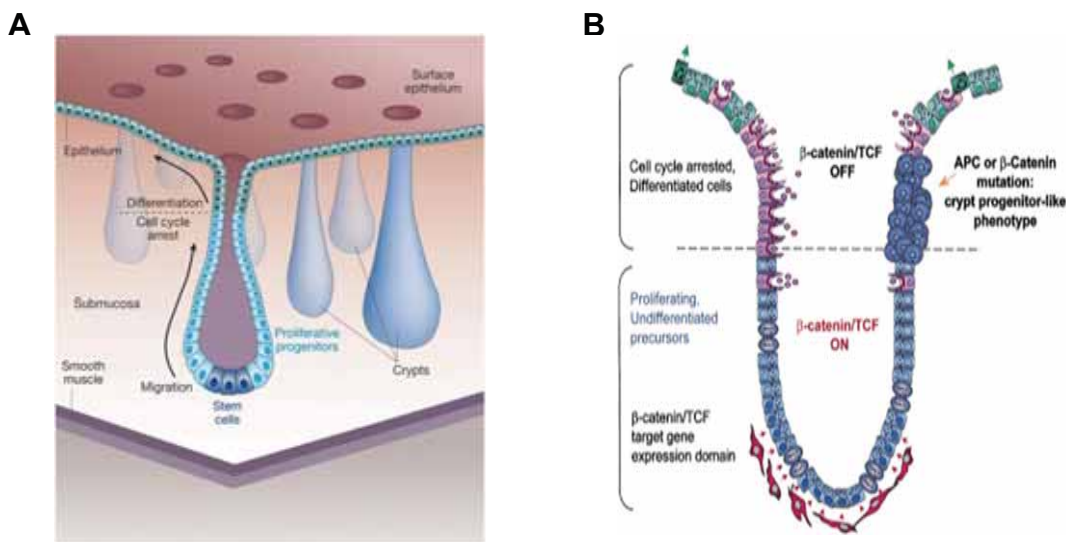


Figura 2. Epiteli intestinal. (A) Esquema de la migració cel·lular a les criptes intestinals (Reya & Clevers, 2005). (B) Representació d'una cripta del còlon. Els gradients d'activació del complex *TCF/β-CATENINA* regulen proliferació i diferenciació (van de Wetering et al, 2002)

Classificació i estadiatge

En el cas del CCR, l'estadi tumoral continua sent el factor pronòstic més potent i el principal determinant del tractament dels pacients (Duffy et al., 2007). Tant és així, que en estadis inicials la cirurgia acostuma a ser l'únic tractament necessari, mentre que en estadis més avançats són necessàries quimioteràpia i/o radioteràpia adjuvant i/o neoadjuvant.

L'estadi del CCR es defineix en funció del grau d'invasió i infiltració en les diferents capes de la paret intestinal, de l'afectació de ganglis limfàtics i de la presència de metàstasi a distància. Al llarg del segle XX han anat apareixent diferents sistemes de classificació. El primer va ser el de Dukes, al 1937. Criticat per una definició imprecisa, és encara molt defensat entre el col·lectiu mèdic per la seva senzillesa d'aplicació. Posteriorment, Astler i Coller (Astler and Coller, 1954) van proposar una modificació que, tot i ser molt popular pel seu valor pronòstic (Deans et al., 1992), ha generat confusió pel solapament amb la nomenclatura de Dukes. Finalment, l'any 1986 l'*American Joint Comitee on Cancer* (Hutter and Sobin, 1986) establiren el sistema TNM que, a banda d'esclarir confusions, té en compte el nombre de nòduls limfàtics afectats. Les sigles TNM fan referència a l'extensió del tumor primari (T), la presència de nòduls limfàtics afectats (N), i la presència de metàstasi a distància (M). Aquest sistema ha permès la classificació dels CCR en quatre estadis que es correlacionen amb el pronòstic dels pacients.

Taula 1. Classificació de Dukes modificada pe Astler i Coller

Estadis	Extensió del tumor
A	Tumor limitat a la mucosa
B1	Tumor envaeix fins la muscularis pròpia
B2	Tumor travessa la muscularis pròpia fins a la serosa
C1	B1 amb metàstasi ganglionar
C2	B2 amb metàstasi ganglionar
D	Metàstasi a distància o invasió parietal d'òrgans adjacents

Taula 2. Classificació TNM per al CCR

Categories T	Extensió que ocupa el tumor primari
Tx	Informació incompleta
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> . El tumor no travessa la mucosa
T1	El tumor travessa la mucosa, la muscularis mucosa i envaeix la submucosa
T2	El tumor ha travessat la submucosa i envaeix la muscularis pròpia
T3	El tumor ha travessat la muscularis pròpia i envaeix la subserosa sense arribar a cap teixit veí
T4	El tumor envaeix altres òrgans o estructures
Categories N	Absència o presència de metàstasi ganglionar
Nx	Informació incompleta
N0	No hi ha cap gangli afectat
N1	De 1 a 3 ganglis afectats
N2	4 o més ganglis afectats
Categories M	Absència o presència de metàstasi a distància
Mx	Informació incompleta
M0	No hi ha metàstasi a distància
M1	Presència de metàstasi a distància

Taula 3. Classificació del CCR pel sistema TNM i pronòstic dels pacients en funció de l'estadi

Estadi TNM	Descripció	Supervivència als 5 anys
0	Tis, N0, M0	96-100%
I	T1, N0, M0 T2, N0, M0	89-90%
II	T3, N0, M0 T4, N0, M0	50-75%
III	T1-4, N1, M0 T1-4, N2, M0	25-45%
IV	T1-4, N1-2, M1	<5%

Tractament i pronòstic

L'opció terapèutica davant un diagnòstic de CCR està fortament condicionada per l'estadi de la malaltia i la localització de la lesió. La resecció quirúrgica del tumor primari i dels nòduls limfàtics regionals és el tractament convencional per als pacients amb malaltia localitzada. Diferents estudis han comparat els avantatges entre la cirurgia oberta i laparoscòpica en relació a les taxes de recurrència i supervivència global sense trobar diferències significatives (Clinical Outcomes of Surgical Therapy Study Group, 2004).

També està sent avaluat el rol de la identificació del gangli sentinella (Bilchik et al., 2003).

Les taxes de curació, entesa com absència de malaltia residual als cinc anys de seguiment, són del 90% i 75% per als CCR en **estadi I-II**, respectivament. D'altra banda, existeix controvèrsia en l'aplicació de quimio/radioteràpia en pacients amb estadi II. Convé determinar el benefici potencial del tractament en aquests casos per tal de millorar el pronòstic del 25% que moren. Diverses anàlisi i meta-anàlisi suggereixen una millora del 2-4% en la supervivència global en pacients de CCR estadi II tractats amb quimioteràpia adjuvant basada en el 5-FU, quan es compara amb només seguiment (Gill et al., 2004; Mamounas et al., 1999). D'altra banda, la ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) publicà al 2004 que, basant-se en els resultats d'assajos clínics aleatoritzats, no hi havia evidències suficients per administrar de forma rutinària quimioteràpia adjuvant en pacients amb estadi II de CCR (Benson et al., 2004).

Per als tumors en **estadi III** la curació per cirurgia s'obté en el 40% dels casos però pot pujar fins al 60% quan s'acompanya de quimioteràpia, principalment mitjançant l'administració sistèmica de 5-FU en combinació amb oxaliplatí, i/o radioteràpia. Capecitabina, una fluoropirimidina oral que pateix una conversió enzimàtica en la cèl·lula tumoral que la converteix en 5-FU, és una alternativa equivalent en pacients candidats a tractament amb 5-FU més leucovorín (Hoff et al., 2001; Van Cutsem et al., 2001). L'estudi MOSAIC que comparava 5-FU més leucovorín amb FOLFOX4 (5-FU, leucovorín i oxaliplatí) demostrà que la incorporació d'oxaliplatí és una bona opció terapèutica per a pacients operats de CCR en estadi III (De Gramont *et al.*, 2003).

Pel que fa als malalts de CCR **estadi IV**, només entre el 5% ell 10% sobreviuen als 5 anys. Per als pacients amb metàstasi operables la taxa d'èxit està al voltant del 30%. Per a les recurrències locals i les localitzacions úniques en fetge o pulmó, la cirurgia, quan és possible, és la única opció curativa. En metàstasi hepàtiques operables, els marges de resecció lliures de tumor s'associen a increments del 25-40% en les taxes de supervivència a 5 anys (Weeks et al., 2002). A més, el tractament amb quimioteràpia de pacients amb metàstasi hepàtiques no resecables les pot convertir en operables després del tractament (Leonard et al., 2005). Un altre agent terapèutic aparegut en els darrers temps i que ha demostrat eficàcia en assajos

aleatoritzats en combinació amb 5-FU i leucovorín és l'irinotecan (inhibidor de la topoisomerasa 1). Diversos assajos han arribat a la conclusió que, com a primera línia de tractament en CCR metastàtic, FOLFOX (5-FU, Leucovorín i Oxaliplatí) i FOLFIRI (5-FU, àcid fòlic i Irinotecan) són equivalents (Colucci et al., 2005; Tournigand et al., 2004). Darrerament, l'addició de bevacizumab, un anticò amb activitat antiangiogènica, tant a IFL (irinotecan, 5-FU, leucovorín) com FOLFOX o FOLFIRI, en tractaments de segona línia, ha demostrat increments en la supervivència global i lliure de progressió (Hurwitz et al., 2004). Semblant és el cas de cetuximab, un anticò monoclonal contra el receptor de EGFR (*epidermal growth factor receptor*), que s'ha aprovat per al tractament en segona línia de CCR metastàtic resistent a 5-FU i irinotecan (Cunningham et al., 2004).

Classificadors i factors pronòstic moleculars

Tumors histològicament idèntics poden tenir un pronòstic i una resposta al tractament molt diferents. Els estudis sobre marcadors moleculars estan sent estudiats en profunditat i, en el futur, ens han de permetre identificar de forma més acurada aquells pacients amb un pitjor pronòstic i que per tant, s'haurien de beneficiar més d'un tractament adjuvant. Partint de la base que tumors amb les mateixes característiques moleculars es comportaran de manera similar, resulta fonamental establir quins són els trets que ens permeten classificar-los de manera que puguem predir empíricament el comportament d'un tumor particular.

La importància de la classificació molecular rau en el fet de reflectir els mecanismes subjacents de la carcinogènesis. Si bé es poden utilitzar marcadors moleculars únics, aquests són més adients com a predictors de resposta a tractaments que no pas com a classificadors. La CIN (*Chromosomal Instability*), la MIN (*Microsatellite Instability*) o inclús la CIMP (*CpG Island Methylator Phenotype*) han resultat molts més útils a l'hora d'agrupar els CCR en funció de les seues perfils moleculars.

Com ja desenvoluparem més endavant en aquesta introducció, la CIN i la MIN semblen ser mútuament excloents en CCR (Eshleman et al., 1995). Clàssicament, la presència de CIN s'ha avaluat mitjançant anàlisis de LOH sobre marcadors microsatèl·lit, preferiblement a 18q (Matsuzaki et al., 2005). Les tècniques d'*array*-CGH o d'*arrays* d'SNP's han aportat millores a aquestes

anàlisi però, donat que els CCR poden patir múltiples translocacions recíproques amb escassos canvis en la dosi al·lèlica (Abdel-Rahman et al., 2001), molts d'aquets CCR poden ser erròniament classificats com CIN negatius. Existeixen diferents mecanismes moleculars que poden explicar la CIN. Alteracions en gens que controlen la mitosi com *BUB1* o *BUB1B*, o que estan implicats en la regulació del nombre de centrosomes i la seva funció, com *AURKA*, en són alguns exemples (Cahill et al., 1998).

La MIN, també anomenada MSI (*MicroSatellite Instability*), RER (*Replication Error*), o fenotip mutador, és la responsable d'algunes alteracions en gens supressors com *TGF- β* o el seu receptor *TGFBR2* (Markowitz et al., 1995). La MIN s'analitza típicament mitjançant un panell de 5 marcadors microsatèl·lit aprovat pel NCI (D2S123, D5S346, D17S250, BAT25 i BAT26) (Boland et al., 1998). Els pacients amb MIN tenen millor pronòstic, tot i que també s'associa a una major quimioresistència (Popat et al., 2005; Ribic et al., 2003).

Pel que fa a la CIMP, la seva existència real, o el fet que sigui només un reflex de la MIN, és avui encara motiu de controvèrsia (Yamashita et al., 2003). Sembla clar però, que els pacients amb CIMP tenen un perfil clínic, patològic i molecular distintiu, com una major freqüència de localitzacions dretes, afectació en dones, pitjor diferenciació, MIN positiva, elevada freqüència de mutacions en *BRAF* i baixa en *TP53*, pèrdua de p27 nuclear, de p21 i/o sobreexpressió de *PTGS2* (Toyota et al., 2000). La relació entre la CIMP i el pronòstic o la resposta al tractament dels pacients amb CCR és força controvertida. Mentre que diversos estudis no hi han trobat cap associació, n'hi ha un que demostra associació entre CIMP i un pitjor pronòstic en CCRs que no tenen MIN (Ward et al., 2003), i un altre en què els pacients en estadis avançats i sense MIN tenen pitjor supervivència (Ogino et al., 2007). Donat que els tumors no-MIN amb mutacions de *BRAF* són majoritàriament CIMP positius, s'ha especulat molt sobre la possible relació entre mutacions a *BRAF* i el pronòstic dels pacients amb CIMP (Samowitz et al., 2005).

Les classificacions i les correlacions moleculars han de continuar sent eixos bàsics de la recerca en CCR. L'estudi de les correlacions moleculars ha de continuar aportant les claus de la patogènesi, així com confirmar i/o reforçar l'existència de nous subtipus moleculars de CCR. També, aquestes correlacions ens han de proveir de marcadors subrogats tant a nivell clínic com d'investigació.

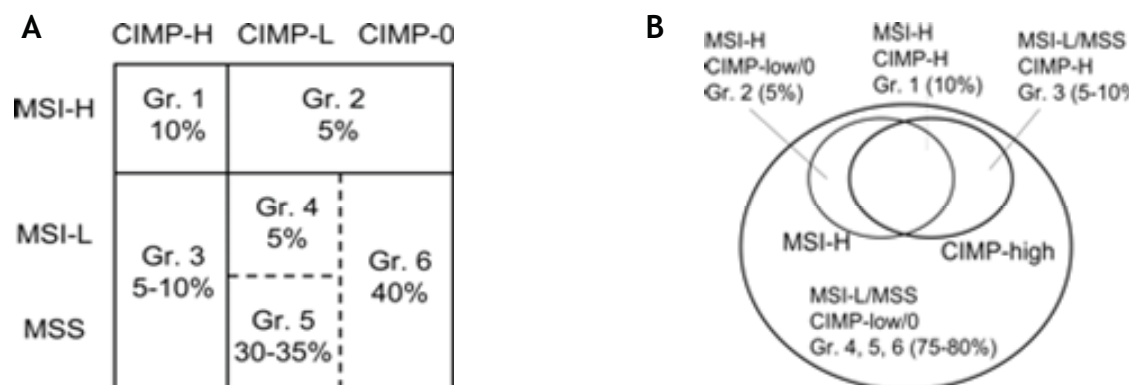


Figura 3. Exemples de classificadors moleculars. (A) Classificador de sis grups en funció de la MIN i la CIMP. (B) Classificador dels quatre grups de CCR en funció de MIN i CIMP agrupant MSI-L i MSS, i CIMP-L amb CIMP(-). Extret de Ogino *et al.*, 2008 (Ogino and Goel, 2008).

Taula 4. Correlacions moleculars entre la MIN i la CIMP en CCR (Ogino and Goel, 2008).

Molecular event	Molecular subtypes	Positive or inverse association	Note
AURKA amplification	CIN	Positive	AURKA amplification is not correlated with MSI or CIMP status
BRAF mutation	CIMP-high	Positive	BRAF mutation is not correlated with MSI-H independent of CIMP status
β -Catenin (<i>CTNNB1</i>) nuclear localization (activation)	CIMP-high	Inverse	Inverse correlation between β -catenin nuclear localization (or activation) and CIMP-high is independent of MSI status; the β -catenin activation score system is based on the system described by Jass <i>et al</i> ²¹
CIN Cyclooxygenase-2 (<i>PTGS2</i>) overexpression	CIMP MSI-H and CIMP-high	Inverse Inverse	COX-2 and p53 expressions synergistically decrease the frequencies of both MSI-H and CIMP-high in CRC
Fatty acid synthase (<i>FASN</i>) overexpression	MSI-H	Positive	Positive correlation between FASN overexpression and CIMP-high is mediated by MSI
JC virus T antigen	CIMP and CIN	Positive	JC virus T antigen is not correlated with MSI status
KRAS mutation	CIMP-low	Positive	Inverse relationship between KRAS mutation and CIMP-0 is not observed in MSI-H tumors because of the small number of MSI-H CIMP-0 tumors
KRAS mutation	CIMP-high	Inverse	Inverse relationship between KRAS mutation and CIMP-high is particularly strong among MSI-H tumors
18q loss of heterozygosity 18q loss of heterozygosity p21 (<i>CDKN1A</i>) loss	CIMP-high and CIMP-low MSI-L MSI-H and CIMP-high	Inverse Positive Inverse	MSI-H tumors are excluded MSI-H tumors are excluded Inverse relationship between p21 loss and BRAF mutation is mediated by CIMP
p53 (<i>TP53</i>) positivity (expression)	MSI-H and CIMP-high	Inverse	Inverse relationship between p53 positivity and MSI/CIMP is mediated by p21 ⁷⁵ ; p21 loss and p53 positivity are positively correlated ⁷⁵
p27 (<i>CDKN1B</i>) loss (nuclear)	MSI-H and CIMP-high	Positive	Relationship between p27 loss and BRAF mutation is mediated by CIMP; relationship between p27 and MSI/CIMP appears to be limited to p53-negative CRC
p27 (<i>CDKN1B</i>) cytoplasmic expression	MSI-H and CIMP-high	Inverse	p27 cytoplasmic expression is inversely correlated with nuclear p27 loss; relationship between cytoplasmic p27 and MSI/CIMP appears to be limited to p53-negative CRC
TGFBR2 mononucleotide mutation	CIMP-high	Positive	Only in MSI-H tumors

2. BIOLOGIA MOLECULAR I CEL·LULAR DEL CÀNCER COLORECTAL

Genètica del càncer colorectal i gens del càncer

La carcinogènesi és un procés seqüencial on cada estadi és el reflex de les alteracions genètiques que condueixen a la progressiva transformació de les cèl·lules normals en cèl·lules altament malignes. El genoma d'aquestes cèl·lules tumorals presenta, inevitablement, alteracions en múltiples llocs que poden ser tant subtils com mutacions puntuals o tant grolleres com canvis a nivell cromosòmic (Kinzler and Vogelstein, 1996). Amb tot, sembla àmpliament establert que en el desenvolupament dels tumors, de forma anàloga a l'evolució darwiniana, successius canvis a nivell genètic van conferint avantatges proliferatius i de creixement a un conjunt de cèl·lules que finalment donaran lloc al càncer (Nowell, 1976). En el cas del CCR, l'estudi de les dues síndromes hereditàries més freqüents, la Poliposi Adenomatosa Familiar (FAP) i el Càncer Colorectal Hereditari No Polipòsic (HNPCC), ha estat fonamental per esclarir quins són els esdeveniments a nivell molecular que inicien el procés tumoral.

- Familial Adenomatous Polyposis (FAP). És una malaltia autosòmica dominant que afecta a 1/7000 individus (Kinzler and Vogelstein, 1996) el gen responsable de la qual és *APC (Adenomatous Polyposis Coli)*. Es caracteritza per l'aparició de centenars a milers de pòlips adenomatosos. Existeixen formes atenuades de la malaltia amb un menor nombre d'aquests pòlips i una edat d'aparició més tardana. El gen *APC* va ser identificat per primera vegada com a marcador de la banda cromosòmica 5q21, freqüentment perduda en casos de poliposi, (Bodmer et al., 1987; Herrera et al., 1986). Més tard es van trobar alteracions en cèl·lules germinals en pacients de FAP, i somàtiques en casos esporàdics. Els pacients amb mutacions germinals d'*APC* tenen un risc molt més elevat de desenvolupar CCR. El pas limitant en la iniciació del tumor és una mutació somàtica en l'al·lel salvatge d'*APC* heretat d'un progenitor no afecte (Levy et al., 1994; Luongo et al., 1994). L'estudi d'aquesta malaltia recolza fortament la hipòtesi del doble impacte o *two hit*, formulada per Knudson, per explicar l'alta incidència de tumors infantils com el retinoblastoma o el tumor de Wilm (Knudson, 1971). La importància d'aquests estudis rau en el fet que han pogut ser traslladats als CCR esporàdics, molt més freqüents i desconeguts. L'anàlisi de 23 línies cel·lulars de CCR va evidenciar que

més del 80% presentaven mutacions en aquest gen (Kinzler and Vogelstein, 1996). Paral·lelament, en una sèrie de 106 pacients de CCR esporàdic de la Gran Bretanya, el 56% presentaven mutacions en un fragment del gen anomenat MCR (de l'anglès *Mutation Cluster Region*) (Smith et al., 2002) que conté el 90% de les mutacions en aquest gen. A més, APC s'ha trobat inactivat en els focus de criptes aberrants, posant de manifest la seva rellevància en la iniciació del procés (Takayama et al., 2001). Les formes truncades de la proteïna donen lloc a la formació de complexos β -CATENINA /TCF que, activen la transcripció de gens com MYC o *Ciclina D1*). Aquests tumors presenten inestabilitat cromosòmica i aneuploidia.

- *Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC)* o Síndrome de Lynch. És una malaltia hereditària autosòmica dominant que predisposa al desenvolupament del càncer. Està causada per mutacions als gens de reparació de desaparellaments del DNA (*Mismatch Repair (MMR) system*). La identificació dels mecanismes moleculars d'aquesta malaltia es va dur a terme a la dècada dels 90 mitjançant anàlisis de lligament que assenyalaren les regions 2p16 i 3p21 com a loci candidats a portadors dels gens responsables (Peltomaki et al., 1993). Més endavant, intentant identificar pèrdues al·lèliques (freqüentment associades a la presència de gens supressors tumorals) a 2p16 en marcadors microsatèl·lit, es va trobar que en pacients d'HNPCC apareixien nous al·lells no presents en les cèl·lules normals (Aaltonen et al., 1993). Això suggeria una mena d'inestabilitat genòmica global de la replicació o reparació de seqüències de repeticions curtes en tàndem (STR, *Short Tandem Repeats*). Aquest tipus d'inestabilitat era similar a la prèviament descrita per a alguns CCR esporàdics (Ionov et al., 1993; Peinado et al., 1992). Finalment, els gens *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS1* i *PMS2* es van identificar com a responsables de la malaltia (Grady and Markowitz, 2002; Marra and Boland, 1995). El 90% dels casos els causen mutacions en *MLH1* i *MSH2*. La rellevància d'aquestes troballes fou demostrar que, tant en els casos familiars com en els esporàdics, la taxa de mutacions era més elevada que en els teixits normals en dos o tres ordres de magnitud (Bhattacharyya et al., 1994; Eshleman et al., 1995), donant base experimental a la hipòtesi del fenotip mutador (Loeb, 1991; Perucho, 1996). Del total de pacients d'HNPCC, un 85-90% presenten Inestabilitat de Microsatèl·lits (MSI, *Microsatellite Instability*), mentre que dels esporàdics només un 10-15%.

Cal destacar que en la majoria de casos esporàdics amb MSI, la causa de la inestabilitat és la inactivació del gen *MLH1* per hipermetilació del seu promotor (Herman et al., 1998).

Però com ja ha estat esmentat, la progressió tumoral és fruit de l'adquisició d'un conjunt d'alteracions a nivell genètic, i és aquest conjunt d'alteracions més que el fet d'una en concret, el factor que acaba provocant el càncer. Així doncs, malgrat haver identificat els gens responsables d'aquestes dues síndromes familiars, i haver constatat que aquests gens estan molt freqüentment alterats en CCR esporàdic, és una evidència que continuen havent un gran nombre de casos en què aquestes alteracions no hi són presents, i que quan hi són, coexisteixen amb multitud d'altres. El perfil d'alteracions a nivell genètic o d'expressió determinarà finalment l'agressivitat i per tant el pronòstic de cada cas. En la seva revisió de l'any 2000, Hanahan i Weinberg suggereixen que la majoria dels genotips cancerosos són la manifestació de sis alteracions essencials de la fisiologia cel·lular que, conjuntament, determinen el creixement maligne (Hanahan and Weinberg, 2000). Aquestes capacitats adquirides són:

1. Autosuficiència en senyals de creixement. Per passar de la quiescència a la proliferació són necessàries senyals de creixement que es transmeten a l'interior de la cèl·lula mitjançant receptors de membrana als quals s'hi uneixen molècules senyalitzadores com factors de creixement, components de la matriu extracel·lular i molècules d'adhesió. Molts oncogenes mimetitzen senyals de creixement a les quals la cèl·lula tumoral és sensible creant així un *feed-back* positiu o estimulació autocrina.
2. Independència en senyals d'inhibició del creixement. Aquestes senyals es transmeten també mitjançant receptors de membrana acoblats a circuits de senyalització. Bloquegen la proliferació portant les cèl·lules bé a un estat quiescent, (G_0) o bé a un estat postmitòtic associat a diferenciació específica. Els circuits que permeten respondre a aquests senyals estan relacionats majoritàriament amb el control del cicle cel·lular, concretament amb el pas per G_1 . Les cèl·lules tumorals han d'evadir aquests senyal per poder proliferar.
3. Evasió de l'apoptosi. El creixement dels tumors depèn del balanç entre proliferació i mort cel·lular. L'apoptosi representa una gran proporció

d'aquesta mort. Així doncs, possiblement la resistència a l'apoptosi és una habilitat adquirida en tots els tipus de càncer.

4. Potencial replicatiu il·limitat. Un cop les cèl·lules arriben a un nombre determinat de divisions, aturen el seu creixement per entrar en senescència. L'escurçament dels telòmers en cada cicle de replicació té un límit i és el que marca el nombre total de replicacions. Pràcticament tots els tumors adquireixen la capacitat de mantenir constant la mida dels seus telòmers i aconsegueixen d'aquesta manera l'estat d'immortalització.
5. Manteniment de l'angiogènesi. Els tumors, com qualsevol altre teixit, necessiten per a proliferant nutrients i oxigen que obtenen dels vasos sanguinis. El procés de formació de nous vasos és l'angiogènesi. Les cèl·lules dels tumors solen promoure l'angiogènesi per assegurar-se nutrients i oxigen.
6. Invasió de teixits i metàstasi: Tard o d'hora en la progressió tumoral, algunes cèl·lules escapen del tumor primari i envaeixen nous teixits adjacents o a distància on, si més no inicialment, nutrients i espai no són limitants. Posteriorment, es produeixen canvis en l'acoblament físic de les cèl·lules al seu microambient i l'activació de proteases que són fonamentals en aquest procés. Les metàstasi són la causa del 90 % de les morts per càncer.

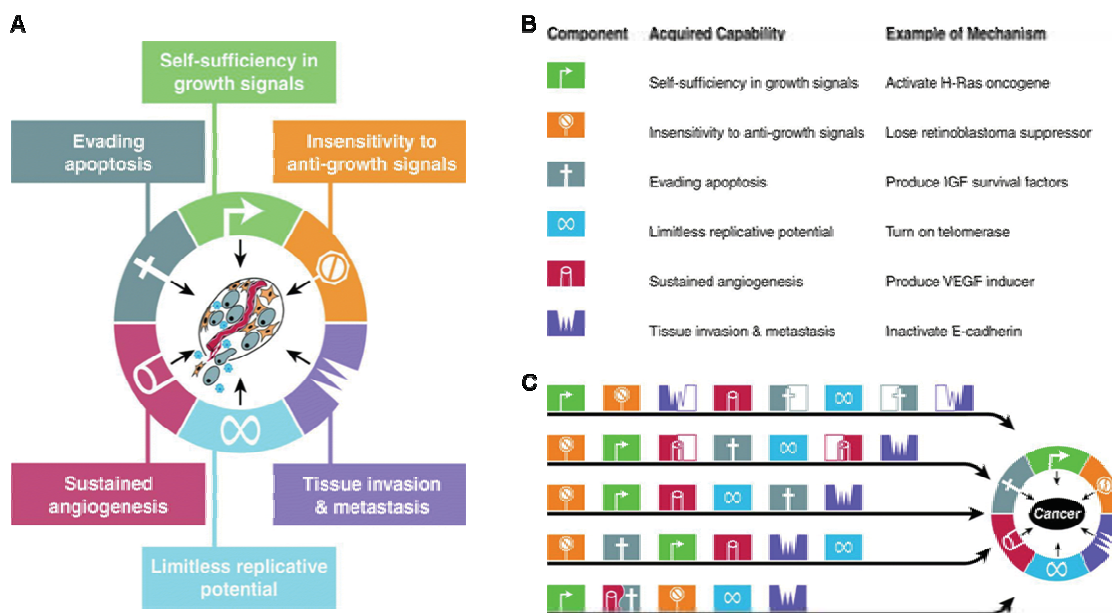


Figura 4. Capacitats adquirides en càncer. (A) Esquema de les capacitats adquirides al llarg de la progressió. (B) Exemples dels mecanismes moleculars que donen lloc a l'adquisició d'aquests capacitats. (C) Exemples de diferents vies de progressió en funció de l'ordre d'adquisició. Extret de Hanahan & Weinberg, 2000

La seqüència d'adquisició de cadascuna d'aquestes capacitats pot variar molt entre tumors del mateix tipus i òbviament entre tumors de diferent tipus però, independentment de com i en quin ordre s'adquireixen, el resultat biològic és comú a tots ells. Des d'un punt de vista reduccionista, podem afirmar que hi ha bàsicament dos tipus de gens responsables de l'aparició de tumors: Oncogèns i Gens Supressors Tumorals.

- **Oncogèns:** Són gens la funció dels quals acostuma a estar relacionada amb la regulació de la proliferació cel·lular ordenada. Les mutacions carcinogèniques en aquests gens confereixen un guany de funció o una activació constitutiva que donarà lloc a un creixement descontrolat, invasivitat i malignitat de les cèl·lules. Poden ser oncogèns aquells gens que codifiquen per a receptors de membrana amb activitat tirosina-quinasa, membres de vies de transducció de senyal, factors de transcripció o proteïnes implicades en el control del cycle cel·lular. La mutació en aquests 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. En tumors colorectals s'han vist implicats entre d'altres els oncogèns *RAS*, *MYC*, *SRC*, *EGFR* i *CCND1*.
- **Gens Supressors Tumorals:** La funció principal d'aquests gens és la de controlar la proliferació cel·lular. Aquests gens són de caràcter recessiu, és a dir, cal la inactivació d'ambdues còpies del gen per a silenciar-los. Això explica que, en les síndromes hereditàries en les quals s'hereta un al·lel inactiu, l'aparició dels tumors sigui en edats més primerenques. Els gens supressors es classifiquen en *Gatekeepers* (guardians) i *Caretakers* (cuidadors), segons si controlen la proliferació cel·lular o mantenen l'estabilitat del genoma corregint els errors de replicació (membres del sistema de reparació, MMR). Exemples il·lustres de *gatekeepers* serien *RB*, *APC*, *TP53* o *SMAD4*, mentre que serien *caretakers* *MSH2*, *MLH1* o *BUB-1*.

Gens supressors tumorals. Acomodant la haploinsuficiència al model de Knudson

Durant anys la naturalesa recessiva dels gens supressors tumorals ha estat un dogma inqüestionable. No és estrany doncs, que els esforços per identificar nous gens supressors tumorals hagin estat guiats per la hipòtesi dels dos

impactes o “two hit” de Knudson ((Knudson, 1971) i focalitzats en la cooperació entre aberracions genòmiques i mutacions germinals.

Hi ha quatre principis bàsics que defineixen els gens supressors tumorals:

1. Són recessius i pateixen inactivació bial·lèlica en els tumors
2. L’herència d’un sol al·lel mutat accelera la susceptibilitat a desenvolupar tumors
3. Es troben també freqüentment alterats en tumors esporàdics
4. Quan es restaura la seva activitat, poden revertir les propietats tumorogèniques de la cèl·lula

Sobta però, que tot i el creixent nombre de regions amb LOH i/o deleció física identificades en diversos tumors humans en els darrers anys, la localització dels putatius gens supressors hagi estat tant lenta. Possiblement, això hagi estat així perquè molts dels gens ubicats en aquestes prometedores regions no encaixen en la concepció clàssica que postula que la inactivació d’ambdós al·lells és necessària per a permetre la progressió tumoral (Balmain, 2002). L’estratègia de reduir al màxim una regió crítica mitjançant mapatge per LOH, seguit de la cerca exhaustiva de mutacions al segment intacte del cromosoma homòleg, falla o no és útil quan el segon al·lel està epigenèticament silenciats, o quan el gen candidat és haploinsuficient per a la funció supressora, és a dir, quan la pèrdua d’un sol al·lel és suficient per a conferir un avantatge selectiu pel creixement tumoral (Cook and McCaw, 2000; Quon and Berns, 2001). Els resultats obtinguts en nombrosos estudis sobre canvis al cromosoma 3p en càncer de pulmó mostren que, malgrat que molts gens amb activitat supressora tumoral estan localitzats en una regió freqüent de LOH, els al·lells romanents estan molt rarament mutats (Ji et al., 2002). L’evidència més forta d’aquesta haploinsuficiència és però, és la que fa referència als gens *TP53* i *p27^{Kip1}*. Venkatachalam i col·laboradors demostraren que la penetrància de tumors espontanis en ratolins *TP53*^{+/-} era del 95%, i que menys de la meitat havien patit pèrdua o mutació en l’al·lel salvatge, que a més codificava per una proteïna funcional. Els tumors en ratolins *TP53*^{+/-} apareixien una mica més tard que els *-/-* però significativament abans que els de ratolins *+/+* (Venkatachalam et al., 1998). Pel que fa a *p27^{Kip1}*, el seu estatus de gen supressor tumoral ha estat sovint qüestionat perquè no s’hi han trobat ni pèrdues en homozigosi ni mutacions

germinals (Pietenpol et al., 1995). Malgrat tot, hi ha moltes evidències que la seva pèrdua és tumorogènica i que té un rol principal com a quinasa inhibidora del cicle cel·lular (Coats et al., 1996; Polyak et al., 1994). Fero i col·laboradors van mostrar que en ratolins $p27^{Kip1} +/-$ el tumors apareixien, tot i que tard, abans que qualsevol dels apareguts en els ratolins control $+/+$. Per suposat, cap tumor havia perdut el segon al·lel, la seqüència del qual era salvatge en tots els casos.

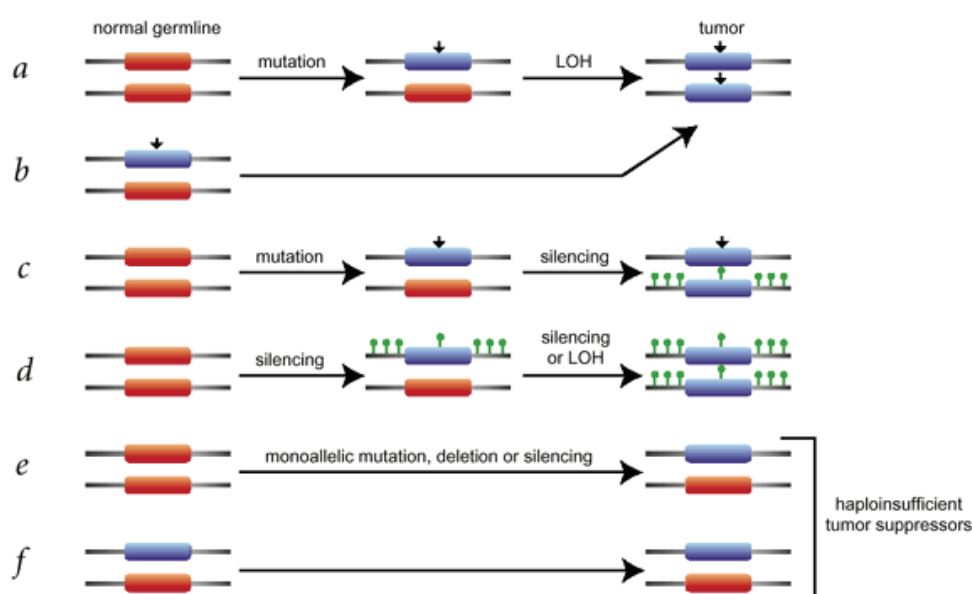


Figura 5. Mecanismes d'inactivació de gens supressors tumorals. Les caixetes blaves representen gens inactivats. (a, b) Model clàssic dels dos impactes de Knudson, mutació i LOH produït per no disjunció, recombinació mitòtica o deleció. (c) El segon *hit* que genera el silenciament és la hipermetilació de la regió promotora. (d) Hipermetilació bial·lèlica. (e, f) Gens supressors haploinsuficients.

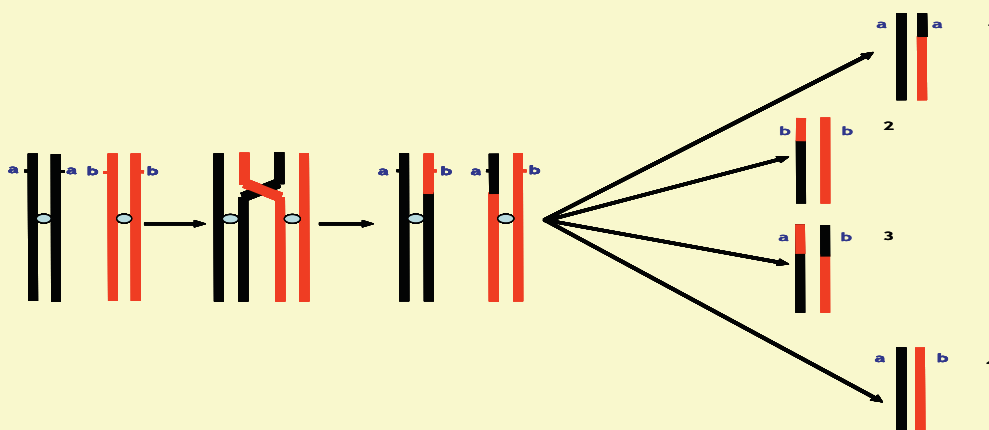
Cada cop són més nombrosos els gens supressors tumorals haploinsuficients identificats. En són alguns exemples DCC (Cho et al., 1994), NF1 (Jacks et al., 1994), MSH2 (de Wind et al., 1998), PTEN (Podsypanina et al., 1999), TSC2 (Kobayashi et al., 1999) o CBFA2 (Song et al., 1999). Amb tot, alguns autors suggereixen que podrien ser només un subestimació de la realitat donada la dificultat de demostrar fefaentment l'absència de mutacions a ambdós al·lells. Addicionalment, i més enllà de la haploinsuficiència, les mutacions en alguns gens supressors poden donar lloc a efectes dominants negatius o a guanys de funció (Payne and Kemp, 2005).

Pèrdua d'heterozigositat (*loss of heterzignty, LOH*)

Un gen o locus és heterozigot quan els dos al·lells, provinents cadascú d'un dels dos progenitors, són diferents. Per determinar l'heterozigositat o homozigositat d'un locus s'acostumen a usar seqüències repetitives del DNA com els microsatèl·lits o els polimorfismes d'un sol nucleòtid o SNP (*single nuclotide polymorfisms*)

La pèrdua d'heterozigositat per a un locus del genoma representa la pèrdua de la contribució d'un dels progenitors a aquell locus. En càncer aquesta alteració s'ha associat tradicionalment amb la inactivació per deleció de gens supressors de tumors. No obstant, l'LOH pot donar-se per diferents mecanismes:

- **Deleció:** o pèrdua física d'un fragment més o menys llarg de material genètic que pot comportar la inactivació d'un dels dos al·lells d'un gen. La pèrdua d'un cromosoma sencer es pot donar, però va sovint acompanyada de la duplicació de l'altre.
- **Conversió gènica:** és un fenomen de recombinació genètica durant la meiosis per una mala reparació dels desaparellaments de nucleòtids. La conseqüència és l'intercanvi no recíproc de material genètic entre cromosomes homòlegs.
- **Recombinació mitòtica:** és un fenomen de recombinació somàtica de les cèl·lules durant la mitosis. Es dona després de la replicació del material genètic. Com es mostra en la figura, quan les cromàtides es segreguen, alguna de les cèl·lules filles resultants pot haver adquirit el mateix al·lel parental per als dos cromosomes homòlegs (casos 1 i 2 a l'esquema)



La pèrdua d'heterozigositat per tant, no sempre comporta una reducció de material genètic. Cal doncs tenir en compte, que els càncers amb freqüències elevades de LOH poden veure's afectats per qualsevol d'aquests mecanismes i que els al·lells afectats poden no haver perdut cap de les dues còpies malgrat que el locus s'hagi convertit en homozigot.

La seqüència adenoma-carcinoma. El model de Vogelstein

Des del punt de vista molecular i genètic el CCR és probablement un dels tumors sòlids més coneguts i estudiats. Això és degut a la seva accessibilitat i a la possibilitat d'obtenir en un mateix pacient biòpsies dels diferents estadis de l'avenç de la malaltia. Ja al 1990, Fearon i Vogelstein van proposar un model de carcinogènesi seqüencial en el qual l'adquisició de diferents alteracions a nivell molecular corresponien a l'aparició d'estadis més avançats del procés cancerós (Fearon and Vogelstein, 1990). De les formes benignes a les més agressives, la progressió del CCR es divideix en les següents fases o estadis:

- *Focus de criptes aberrants*: Lesió més primerenca que es pot identificar i que consisteix en una hiperplàsia i/o displàsia de l'epiteli del còlon, el potencial maligne de les quals és encara motiu de controvèrsia.
- *Adenoma primerenc*: Generalment pòlips hiperplàsics de menys d'un cm de diàmetre
- *Adenoma intermedi*: Generalment pòlips adenomatosos o adenomes tubulars de més d'un cm de diàmetre i sense focus de carcinoma
- *Adenoma tardà*: Adenomes de més d'un cm. de diàmetre amb focus de carcinoma intraepitelial (carcinoma *in situ*).
- *Carcinoma*: És el càncer pròpiament dit i es considera instaurat quan les cèl·lules invasives arriben a la membrana basal de l'epiteli. Aquest carcinoma invasiu és sovint la primera manifestació clínica del CCR.
- *Metàstasi*: És la colonització i creixement mitjançant una disseminació hematògena i/o limfàtica de noves lesions tumorals en òrgans a distància a partir de cèl·lules que es desprenen del tumor primari.

Hi ha dos models per a l'aparició dels primers estadis del CCR, és a dir les criptes aberrants i els adenomes. Vogelstein suggerí un model en el qual les cèl·lules diferenciades de la superfície de les criptes s'escampen lateralment i s'invaginen donant lloc a noves criptes (Shih et al., 2001). L'altre model és el que postula que els adenomes s'originen a les bases de les criptes i creixen cap a la superfície donant lloc als pòlips adenomatosos (Preston et al., 2003).

Aquesta seqüència d'esdeveniments, observada a nivell histològic, va acompanyada de canvis i alteracions a nivell genètic i epigenètic. Tant en l'aparició de lesions premalignes com en l'evolució d'aquestes a malignes i

metastàtiques, són necessàries mutacions activadores d'oncogèns i inactivadores de gens supressors tumorals. Inicialment, es va suggerir que entre quatre i sis d'aquestes alteracions eren suficients per produir la malignitat. Revisions posteriors les han elevat fins a un mínim de deu (Sjoblom et al., 2006). Si bé és cert que alteracions en gens particulars s'associen a estadis concrets, i per tant hi ha una seqüència temporal preferencial d'adquisició de mutacions (Vogelstein and Kinzler, 1992), el que està clar és que l'acumulació d'aquestes alteracions, per sobre de l'ordre d'adquisició, és el que finalment determina la malignitat (Fearon and Jones, 1992). Així i tot, sembla establert que l'activació constitutiva de la via de WNT es situa a l'origen de les lesions premalignes i que, posteriorment, mutacions en oncogèns com *K-RAS* o en gens supressors tumorals com *DCC* són freqüents en la transició cap a adenomes intermedis i tardans, respectivament. Finalment, mutacions en el gen *TP53* són presents en un gran nombre de carcinomes en comparació als adenomes primerencs. A partir d'aquí, l'acumulació de noves anomalies genètiques, tant a nivell gènic com cromosòmic, conferiran a les cèl·lules tumorals les seves capacitats metastàtiques.

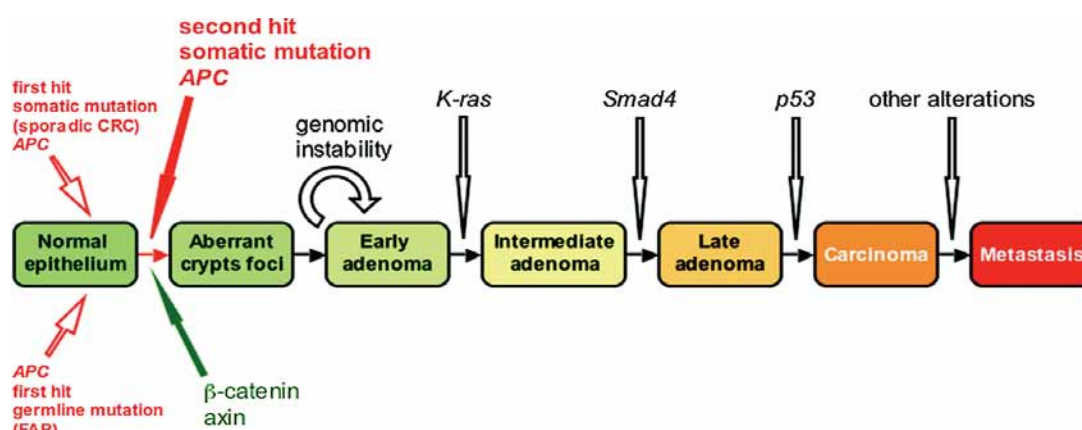


Figura 6. Seqüència adenoma-carcinoma. Adaptat de Fearon & Vogelstein, 1990

Inestabilitat genètica i expansió clonal

Com ja s'ha comentat, l'acumulació d'alteracions genètiques és un tret característic per a la majoria de tumors. L'existència d'un desmesurat nombre d'aquestes alteracions en tumors, tot i ser molt freqüent, no implica que aquests siguin inestables. El concepte d'inestabilitat fa referència a una taxa d'adquisició de mutacions, mentre que el nombre de mutacions present en un tumor en un moment determinat és un estat i no proporciona

informació sobre la freqüència amb la que es van adquirint (Lengauer et al., 1998). El focus del debat doncs, no és saber si els tumors presenten un elevat nombre d'alteracions. Més enllà, cal dilucidar els mecanismes pels quals aquest elevat nombre de mutacions són generades. Mentre hi ha qui defensa que la inestabilitat genètica és el motor que genera les múltiples mutacions presents en càncer (Loeb, 1991), altres suggereixen que les taxes normals de mutació, sumades a ones de selecció i expansió clonal, són suficients perquè es doni el procés d'adquisició de totes les mutacions necessàries (Tomlinson et al., 1996).

Però com es manifesta i quines conseqüències té la inestabilitat genètica? S'han descrit dos tipus principals d'inestabilitat tenint en compte el tipus d'alteració genètica que comporta:

- Inestabilitat de microsatèl·lits o *Microsatellite Instability (MIN)*. Comporta canvis subtils a la seqüència de DNA tipus insercions o delecions. De fet, aquesta inestabilitat es dona com a resultat d'una deficiència en el sistema de reparació d'errors (*Mismatch Repair*) i com ja s'ha dit, està associada a la majoria de casos de HNPCC i al voltant d'un 15% dels CCR esporàdics.
- Inestabilitat cromosòmica o *Chromosome Instability (CIN)*. És molt més freqüent en la majoria de tumors sòlids, i es pot manifestar de dues maneres diferents: (i) alteracions numèriques: aneuploïdies i poliploïdies que representen guanys i pèrdues de cromosomes sencers; o (ii) alteracions estructurals, que poden comportar guanys o pèrdues de material genètic (amplificacions i delecions) o només reorganització (translocacions i inversions).

Sembla ser que aquests dos tipus d'inestabilitat tenen una relació inversa. Els tumors que presenten MIN són generalment diploides i presenten una taxa normal d'alteracions cromosòmiques. En canvi, els tumors amb un sistema de reparació d'errors eficient són normalment aneuploïdes i exhibeixen una elevada taxa d'alteracions cromosòmiques o CIN. A més, mentre que MIN seria un tret recessiu (Casares et al., 1995), CIN apareixeria com a dominant. Quan es fusionen cèl·lules amb MIN amb cèl·lules amb CIN, els híbrids resultants exhibeixen CIN però no MIN, perquè l'expressió dels gens MMR salvatges restaura la seva funció (Koi et al., 1994). El fet que les cèl·lules MIN no complementin el fenotip CIN implica que aquest és probablement resultat

d'un guany de funció d'una proteïna més que no pas de la inactivació d'un gen (Lengauer et al., 1998).

Però encara no queda clar si el gran nombre de mutacions dels tumors és fruit d'una taxa d'adquisició incrementada o d'un procés de selecció i expansió clonal. La resposta a aquest dilema podria diferir en funció del tipus d'instabilitat. En el cas de la MIN seria plausible que el fenotip mutador fos una característica adquirida a posteriori. En primer lloc, una taxa mutacional normal provocaria mutacions avantatjoses. La selecció seria necessària i suficient en un model basat en la hipòtesi d'una o dues mutacions en un oncogèn o un gen supressor tumoral (Tomlinson et al., 1996). El problema rau en discernir si l'escenari més plausible per a la iniciació del tumor passa per un únic oncogèn activat (un *hit* o mutació) o gen supressor inactivat (dos *hits* o mutacions), o si són necessàries un major nombre de mutacions per a iniciar el procés. Si fos així, el més probable és que la majoria de tumors comencessin a créixer amb una taxa mutacional incrementada. No obstant, considerant el valor de la pressió selectiva, cal tenir en compte que com més gran és aquesta, més petit és l'increment de la taxa mutacional. En definitiva, podem concloure que l'adquisició d'un fenotip mutador acceleraria el procés evolutiu de selecció de mutacions avantatjoses però resta veure si n'és el factor iniciador.

Pel que fa als tumors amb CIN, ens trobem amb la mateixa controvèrsia. CIN implica una elevada freqüència en l'adquisició d'alteracions cromosòmiques. Fallaria doncs, el mecanisme de control de la permissibilitat d'alterar el contingut i estructura dels cromosomes. Com que els mecanismes moleculars que generen aquest tipus d'instabilitat són més confusos, els dubtes a resoldre són encara majors. L'increment preferencial de cèl·lules amb un nombre anormal de cromosomes en el que es seleccionessin guanys, que comportessin l'activació d'oncogèns, o pèrdues, que impliquessin la inactivació de supressors, podria ser l'origen de l'aneuploidia. Hi ha dades experimentals que avalen la teoria que és una instabilitat cromosòmica inicial la que genera aquesta aneuploidia (Hartwell, 1992; Hartwell et al., 1994). Assajos en els quals s'ha induït l'aneuploidia de forma artificial, mitjançant fusió cel·lular, han demostrat que aquesta no és la causa que comporta la instabilitat (Lengauer et al., 1997; Phear et al., 1996).

Tant la MIN com la CIN són fenòmens que s'han observat en estadis molt inicials del procés tumoral (Bardi et al., 1997; Bomme et al., 1998). Sembla que, a la fi, les dues posicions enfrontades poden reconciliar-se. Les alteracions genètiques fruit de la inestabilitat, bé sigui MIN o CIN, incrementen durant la progressió tumoral. Aquest increment és l'esperat durant la selecció clonal. Així doncs, no té sentit continuar invocant a la selecció clonal o la freqüència elevada de mutacions com a mecanismes excloents generadors d'un fenotip mutador. Ans al contrari, experiments en bacteris suggereixen que ambdós mecanismes són operatius i probablement depenen l'un de l'altre (Mao et al., 1997). Cada ronda de selecció no només afavoreix mutacions avantatjoses en oncogèns o supressors, si no també les mutacions en gens que incrementen la taxa de mutació, és a dir, gens mutadors. El progressiu enriquiment en mutacions mutadores sumat a successives rondes de selecció seria el fet rellevant en la progressió (Loeb and Loeb, 2000).

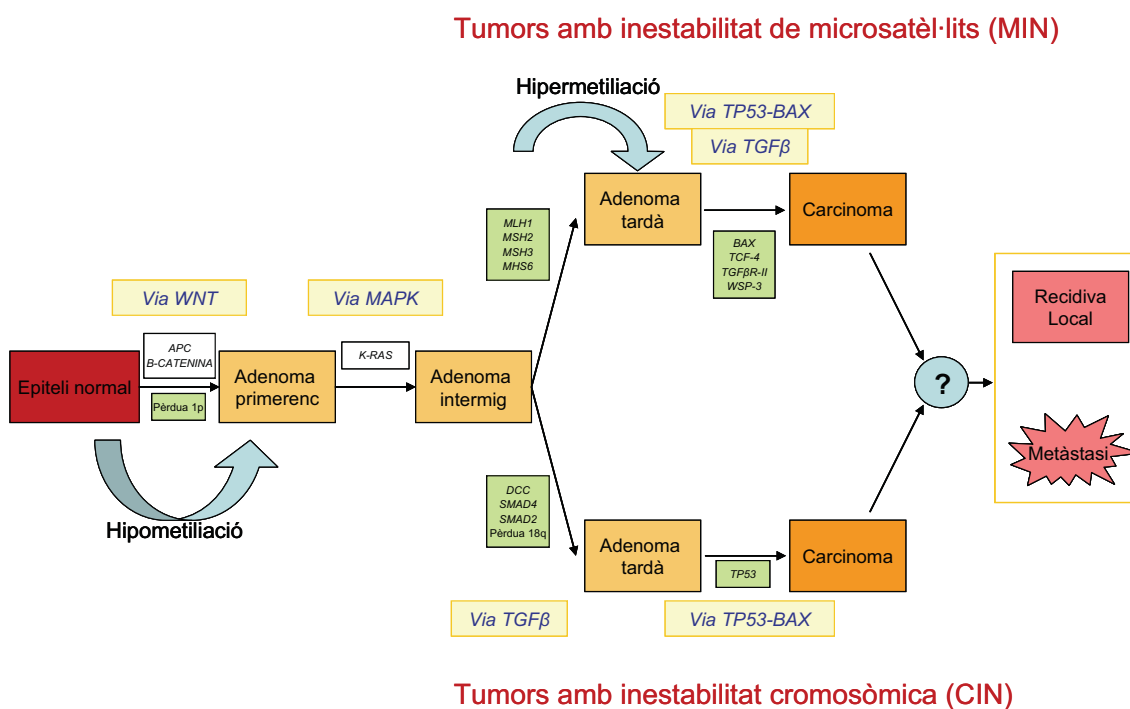


Figura 7. Modificació de la seqüència adenoma carcinoma. L'esquema inclou no només els principals gens alterats en cada pas, també les vies de senyalització afectades. S'integra també la dualitat entre MIN i CIN.

Alteracions epigenètiques i càncer colorectal.

L'epigenètica és l'estudi dels canvis en la funció gènica que són heretats mitòtica i/o meióticament i que no impliquen un canvi en la seqüència del DNA. Basant-nos en aquesta definició, fins fa poc només hi havia dos sistemes epigenètics que complien els criteris d'heretabilitat mitòtica: la metil·lació del DNA i els complexos de proteïnes dels grups *Polycomb-tritorax*. En els darrers anys, dins de les múltiples modificacions que pateix la cromatina, la metilació de les histones ha passat també a formar part dels sistemes epigenètics.

La pèrdua de metilació del DNA va ser la primera alteració epigenètica descrita en càncer. L'any 1983, dos grups independents van descriure la disminució del contingut total de 5-metilcitosina en cèl·lules canceroses (Feinberg and Vogelstein, 1983; Gama-Sosa et al., 1983). Més endavant, es va demostrar que aquesta hipometilació afectava qualsevol tipus de tumor estudiat, tant benigne com maligne. A més, en CCR, l'estat pre-maligne d'adenoma també presentava un elevat grau d'hipometilació, que diferia d'un 8 % a un 10 % del teixit normal (Feinberg et al., 1988). Alguns treballs han reportat una associació entre el grau d'hipometilació i la progressió tumoral. En el cas del CCR, el grau d'hipometilació en lesions polipòsiques benignes és pràcticament igual al dels adenocarcinomes (Feinberg et al., 1988).

Els mecanismes mitjançant els quals la hipometilació contribueix al procés tumoral són bàsicament tres:

- L'activació gènica. El principal grup de gens que presenten hipometilació i en els què aquesta s'associa amb un increment o aparició d'expressió gènica són els gens "imprintats" (Feinberg and Tycko, 2004). Pel que fa a gens tumorals, s'ha proposat que *HRAS* i *MYC* podrien trobar-se sobreexpressats en alguns tipus tumorals com a conseqüència d'una hipometilació de la seva regió promotora (Del Senno et al., 1989; Vachtenheim et al., 1994), tot i que les evidències no són gaire clares. Si que s'ha trobat aquesta relació en altres gens agrupats en famílies com *MAGE*, *GAGE*, *CTAG/LAGE* i *SAGE*, que codifiquen per antígens específics de tumor.
- Activació de retrotransposons. Són per exemple les seqüències LINE i Alu. El moviment d'aquests retrotransposons pot provocar alteracions en l'expressió de gens importants del procés tumoral, com per exemple *APC* i

MYC en càncer de còlon i mama, respectivament (Miki et al., 1992; Morse et al., 1988). També el gen *MLH1* presenta sovint insercions d'elements Alu en pacients de CCR (Nystrom-Lahti et al., 1995).

- Inestabilitat genòmica. Sembla ser que una de les relacions més clares entre el grau d'hipometilació i la inestabilitat genòmica vindria donada per un increment en el nombre de guanys i pèrdues cromosòmiques (Eden et al., 2003; Gaudet et al., 2003). Es creu que les seqüències satèl·lit del DNA, que es troben extraordinàriament representades en els centròmers dels cromosomes podrien estar darrere d'aquesta inestabilitat, ja que la hipometilació d'aquestes seqüències donaria lloc a alteracions com isocromosomes, translocacions juxtacentromèriques no balancejades i delecions de braços cromosòmics sencers (Narayan et al., 1998; Qu et al., 1999; Wong et al., 2001).

L'altre alteració en el patró de metilació del DNA és la hipermetilació. És sens dubte l'alteració epigenètica millor caracteritzada, i avui en dia, ningú discuteix la correlació entre la metilació de les regions promotores de molts gens i el seu silenciament transcripcional (Jones and Laird, 1999). Els gens que són susceptibles de patir hipermetilació estan implicats en el control de cicle cel·lular, diferenciació, reparació del DNA, resistència a drogues, detoxificació, apoptosi, angiogènesi i metàstasi (Costello and Plass, 2001). Val a dir però, que la hipermetilació s'ha d'entendre com un procés global en què molts gens es trobaran afectats, dels quals només uns quants tindran una significació funcional. La hipermetilació en càncer ha estat de gran interès pel seu paper com a *hit* alternatiu a la LOH o la mutació en el model de Knudson. A la línia de CCR HCT116, el gen *CDKN2A* presenta una copia mutada i l'altra hipermetilada i es troba silenciada. Altres estudis han demostrat que en famílies amb mutació germinal en els gens supressors tumorals *MLH1*, *BRCA1* o *LKB1/STK11* la hipermetilació només afecta a aquells al·lels no mutats (Esteller et al., 2001a).

Un dels vincles més clars entre les alteracions genètiques i les alteracions en la metilació del DNA té lloc en la inactivació epigenètica dels gens reparadors del DNA. Per exemple, el silenciament de *MLH1* en càncer colorectal esporàdic es tradueix en una deficiència reparadora dels desaparellaments (Kane et al., 1997). S'ha estimat que en un 84% dels casos, aquest silenciament està provocat per la hipermetilació de la zona

promotora. Un altre exemple el constitueix el gen O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT), una proteïna reparadora del DNA que es troba freqüentment hipermetilada en càncer de còlon (Esteller et al., 1999). Aquesta inactivació s'associa a la manca de reparació en les transicions de guanines a adenines en l'oncogen *K-RAS* (Esteller et al., 2000) i *TP53* (Esteller et al., 2001b). Per tant, aquests dos gens són dos exemples paradigmàtics de com una alteració epigenètica inicial desencadena un augment en les alteracions genètiques posteriors.

Hi ha altres mecanismes epigenètics que s'ha relacionat amb l'aparició i la progressió tumoral. Ja em comentat el cas dels grups *Polycomb-tritorax* i les modificacions de les histones. De entre les modificacions posttraduccionals que poden patir les histones, les millor conegudes i que més freqüentment s'han relacionat amb càncer són la metilació de lisines i arginines, i l'acetilació de lisines. L'acetilació de les histones és correlaciona amb l'activitat transcripcional i és el fruit d'un balanç entre l'acció de les deacetilases d'histones (HDAC) i les acetil transferases d'histones (HAC). Les alteracions en aquest equilibri s'han associat també a defectes en la replicació del DNA i en els mecanismes de reparació (Iizuka and Smith, 2003). La metilació de les histones la porten a terme les HMT (*histone methyl transferases*), i s'associa tant a activació com a repressió transcripcional.

En el treball que ha donat lloc a aquesta tesi, ens hem centrat únicament en la metilació del DNA com a possible mecanisme de regulació de l'expressió gènica.

3. IDENTIFICACIÓ DE GENS RELLEVANTS EN EL PROCÉS TUMORAL.

Els models animals

Els models animals per a l'estudi del càncer, proporcionen una molt bona alternativa a l'hora de determinar les causes i els tractaments del procés tumoral. Una mida reduïda, la seva capacitat de reproduir-se en captivitat, una cicle vital d'uns 3 anys, les extenses similituds fisiològiques i moleculars amb els humans i el fet que el seu genoma s'hagi seqüenciat per complet, fan del ratolí, *Mus musculus*, un dels millors models per a l'investigació en càncer (Frese and Tuveson, 2007).

Hi ha diversos tipus de models murins en funció del seu grau de complexitat. És important triar el model més apropiat per a cada disseny experimental. Les tècniques de cultiu *in vitro* van permetre el descobriment de gens transformants i van posar les bases per al desenvolupament de la biologia cel·lular del càncer. Actualment però, considerem el càncer com una malaltia més complexa on les interaccions amb altres cèl·lules normals, fibroblasts i cèl·lules del sistema immunitari, són fonamentals en la progressió. Malauradament, processos com l'angiogènesi o la metàstasi, per exemple, no es poden avaluar sobre cultius cel·lulars.

Algunes soques de ratolí desenvolupen tumors de forma espontània o induïda per exposició a radiació, agents químics, virus o flora microbiana (Balmain and Pragnell, 1983; Hardisty, 1985; van Kranen et al., 1995). Tot i que han estat molt útils en la identificació d'oncogens i gens supressors tumorals, així com en el mapatge de gens de susceptibilitat, aquestes soques es troben limitades a un nombre baix de tipus tumorals, graus amb penetrància incompleta i latència molt variable.

Els models de ratolins més sofisticats són els d'enginyeria genètica o GEM (*Genetically Engineered Models*), que es poden dividir en transgènics i endògens. Els models transgènics són bàsicament ratolins mutants que expressen oncogens o gens supressors tumorals dominants negatius, de manera no fisiològica, mitjançant promotors ectòpics. Es poden generar per injecció, en oòcits fertilitzats, de construccions de cDNA portadores de regions promotores dissenyades per a restringir el tropisme per alguns teixits. També es poden generar per transducció amb lentivirus, en cèl·lules mare embrionàries. Tenen el gran avantatge de permetre controlar l'expressió del

gen diana amb lligands exògens, com la doxiciclina o l'interferó (Kuhn et al., 1995; Schonig et al., 2002), i fins i tot, promoure i inhibir la transcripció de forma específica de teixit, mitjançant factors de transcripció regulats per tetraciclina. S'ha calculat però, que el temps i la inversió necessària per generar aquests models és d'aproximadament dotze mesos i uns 100.000 US\$. Els models de GEM endògens, són ratolins mutants que perden l'expressió de gens supressors tumorals o expressen els dominants negatius i oncògens des dels seus propis promotors (Tuveson and Jacks, 2002). Els models de knock-out foren els primers tipus d'aquests models de ratolí. Degut a que la inactivació bial·lèlica de gens supressors tumorals en línia germinal acostuma a ser letal, aquests models són casi sempre mutants heterozigots en els quals la pèrdua d'heterozigositat somàtica (LOH) o la haploinsuficiència són identificats com a mediadors bàsics de la carcinogènesi. Els models més avançats d'aquests ratolins són els condicionats, que mitjançant la incorporació de recombinases específiques de seqüència o SSR, (*site-specific-recombinases*), permeten el control espai-temporal de la mutació del genoma.

El desenvolupament de **models de xenoempelt** ha permès una fàcil i ràpida avaluació de línies i teixits tumorals en ratolins immunocompromesos (Kendall et al., 2006). Els models de xenoempelt en ratolins han de ser considerats un pas entremig del cultiu cel·lular i el model cancerós, motiu pel qual alguns autors proposen anomenar-los "cultius animals" (Frese and Tuveson, 2007). Aquests ratolins atímics o immunocompromesos, presenten una mutació autosòmica recessiva amb efectes pleiotròpics entre els que destaca la immunosupressió (Pantelouris, 1968). Presenten una disminució en el nombre de limfòcits T. Això permet a aquests ratolins acceptar transplantaments heteròlegs de fragments tumorals humans sense fer rebuig. D'aquesta manera es poden obtenir, a partir de poques cèl·lules, fragments tumorals de mides considerables en que el contingut en cèl·lula tumoral és d'origen humà, mentre que l'estroma i la resta de cèl·lules no tumorals són d'origen murí. Molts dels aspectes crucials del microambient tumoral es troben alterats en aquests models, com per exemple el teixit normal veí, les cèl·lules estromals i immunes o la circulació vascular i limfàtica (Becher and Holland, 2006; Sikder et al., 2003). Malgrat aquests inconvenients, aquests models són molt útils en la identificació de gens alterats específics de cèl·lula tumoral. Sovint, un dels problemes que presenten les mostres de teixit humà és que la putativa

mutació, silenciament o sobreexpressió que s'hauria de detectar en les cèl·lules malignes, es veu emmascarada per una contaminació del teixit normal acompanyant. Un dels principals avantatges dels models de xenoempelt en ratolí atímic és que permeten, mitjançant tècniques de biologia molecular, analitzar de forma exclusiva la fracció cel·lular tumoral.

Dins aquests models de xenoempelt, cal diferenciar entre la injecció de cèl·lules d'un cultiu o la implantació d'un fragment tumoral. La primera alternativa té l'inconvenient que els tumors que es generen no reproduïen el patró histològic. A més, durant el procés es poden injectar cèl·lules directament als vasos sanguines o limfàtics, falsejant els patrons de disseminació, la taxa d'acceptació i la capacitat metastàtica (Fu et al., 1992; Fu et al., 1991). La implantació ortotòpica (en el teixit d'origen) de fragments de tumor sòlid és un bon model per a l'estudi de la progressió tumoral, ja que permet el creixement, la invasió de teixits adjacents i vasos sanguinis i limfàtics, la circulació de les cèl·lules tumorals pel torrent sanguini, l'extravasació, i l'assentament i creixement en òrgans a distància (Fu et al., 1991).

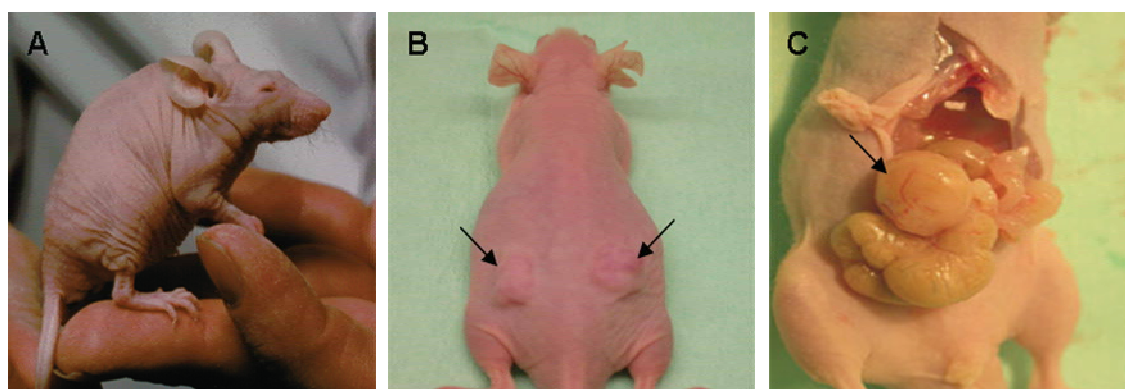


Figura 8. Tumors xenoempeltats en ratolins atímics. (A) Ratolí atímic o *nude*.. (B) Creixement subcutani. (C) Implantació ortotòpica en el cec del ratolí.

Estratègies moleculars d'anàlisi global

Els darrers 25 anys han estat molt prolífics pel que fa a la identificació i caracterització de gens implicats en el procés d'iniciació, creixement i expansió del càncer. Així i tot, estudis a gran escala apunten que el nombre de gens que resten per ser descoberts és encara molt gran. Es calcula que, per terme mig, el número de mutacions d'un tumor és entre 10^3 i 10^5 (Loeb and Christians, 1996) i que el 30% del genoma dels tumors sòlids presenta

aberracions en el número de còpies (Iwabuchi et al., 1995). És evident que un gran número d'aquestes alteracions són el resultat de la inestabilitat genètica subjacent, i que per tant, cal rebaixar les expectatives a l'hora de buscar marcadors realment rellevants. El repte és escatir quines, entre totes aquestes alteracions, són les realment transcendents i quines són només “soroll de fons”.

La implantació de tècniques de *high-throughput* han permès l'abordatge massiu de múltiples marcadors en un mateix experiment. Entre elles, els *micro-arrays* són la tècnica més representativa (Stremmel et al., 2002). Són la punta de llança de l'era “-omics” (*genomics and proteomics*). Tot i que han esta força qüestionats per la seva manca de reproductibilitat entre experiments i laboratoris, sembla que els dubtes relacionats amb la seva fiabilitat es comencen a resoldre. La FDA (*Food and Drug Administration*) ha fet un gran esforç per determinar aquesta reproductibilitat a través del projecte MAQC (*microarray quality control*) (Strauss, 2006). En aquestl treball es va aconseguir que les mateixes mostres, en hibridar-les sobre diferents plataformes, donessin resultats comparables i llistes de gens similars.

Quan parlem d'anàlisi global, cal diferenciar entre les tècniques que van dirigides a nivell del genoma, del transcriptoma o a nivell proteic

- Estudi del genoma. La primera aproximació a l'estudi global del genoma foren les tècniques de cariotipatge. Més endavant, als anys 60 és van desenvolupar les de tinció de bandes G. Ambdues tècniques permeten la visualització del genoma a nivell cromosòmic i la detecció de grans alteracions estructurals i numèriques. No obstant, es necessita que les cèl·lules estiguin en divisió i són molt llargues i laborioses. A més, el seu grau de definició és baix i no permeten la detecció de petites aberracions. Per això, als anys 80, es va desenvolupar la tècnica de FISH (*fluorescent in situ hybridization*), que permet visualitzar el nombre de còpies per a un o pocs loci. El problema però, es que la localització de l'alteració que es vol detectar a de ser coneguda a priori. Les tècniques de “pintat” cromosòmic (*painting*), o de citogenètica molecular, el M-FISH (*multiplex-FISH*) i l'SKY (*spectral karyotyping*), aporten millores que permeten la visualització de tot el genoma i per tant, avaluar-lo des d'un punt de vista numèric i estructural. En realitat són una evolució del bandatge que permet identificar de forma inequívoca els reordenaments entre cromosomes.

L'any 1992, s'introduí la tècnica que ha revolucionat l'anàlisi global del genoma, la CGH (*comparative genomic hybridization*) (Kallioniemi et al., 1992). Basada en la hibridació competitiva de dos DNAs diferents (tumoral i normal, per exemple) sobre cromosomes normals, permet la detecció de guanys i pèrdues de petites regions cromosòmiques al llarg de tot el genoma. Té el gran avantatge de que no necessita que les mostres a estudiar siguin cèl·lules en creixement, i això explica la seva popularitat en l'estudi de tumors sòlids en els quals és molt difícil obtenir aquestes condicions. Fins a l'any 2000, en tan sols 8 anys, s'havien publicat més de 3900 articles basats en aquesta metodologia. La resolució de la tècnica però, que detecta alteracions al voltant de les 10 Mb, no permetia resoldre amplifacions o delecions de seqüències concretes del genoma. Per això es va desenvolupar la *array*-CGH, on els cromosomes en metafase són substituïts per fragments de DNA dels quals se'n coneix la localització. La resolució determina la distància entre els fragments consecutius i la mida d'aquests fragments. Aquesta tècnica ha facilitat una millor classificació dels tumors, així com la identificació de gens candidats (Oostlander et al., 2004), objectiu primordial de la recerca en càncer. Des d'un punt de vista estrictament molecular, no citogenètic, la AP-PCR (*arbitrary-primer polymerase chain reaction*) ha estat molt utilitzada per a identificar seqüències de DNA infra o sobrerrepresentades en mostres tumorals. L'amplificació del genoma amb *primers* arbitraris genera una empremta (*fingerprinting* de DNA) on es poden identificar bandes que apareixen o desapareixen en els tumors respecte dels teixits normals. Tot i haver demostrat la seva utilitat tant en la detecció d'alteracions (Peinado et al., 1992), com en la definició de les conseqüències de la inestabilitat de microsatèl·lits (Arribas et al., 1997; Ionov et al., 1993; Perucho et al., 1994), el seu poder de discriminació és molt variable en funció del nombre i la mida dels *primers* utilitzats, així com de les condicions d'amplificació. A més, és difícil d'estandarditzar i reproduir, i la seva sensibilitat per detectar pèrdues d'heterozigositat està limitada quan el desequilibri al·lèlic es dona per recombinació mitòtica, conversió gènica o pèrdua seguida de duplicació de l'altre al·lel (Arribas et al., 1999b).

- Estudi del transcriptoma. En càncer, l'objectiu de l'estudi del transcriptoma és trobar patrons de gens diferencialment expressats en els tumors respecte dels teixits normals. També s'utilitza per aconseguir una

millor classificació dels tumors que no es poden distingir des d'un punt de vista clinicopatològic. S'han desenvolupat moltes tècniques per identificar aquests mRNAs diferencialment expressats. La sostracció de cDNA (*differential display*) identifica gens desigualment expressats però de forma indirecta, i no dona informació de la quantitat relativa. La RAP-PCR (*RNA arbitrary-primer PCR*) és una modificació de la AP-PCR adreçada a l'anàlisi del mRNA que, malgrat que identifica transcrits diferentment representats en dues mostres, presenta les mateixes limitacions tècniques que la seva predecessora. Altres tècniques són el SAGE (*serial analysis of gene expression*) o la sostracció d'àcids nucleics. Actualment però, els *micro-arrays* d'expressió són la plataforma més utilitzada per a l'estudi dels patrons d'expressió. Normalment s'analitzen utilitzant algorismes per fer agrupaments o *clustering* de gens o mostres segons el seu perfil d'expressió gènica. Després es poden relacionar aquests perfils amb variables clinicopatològiques. Aquestes anàlisis no tenen en compte aquells gens l'expressió dels quals és ja de per si molt baixa i que, per tant, es troben sota el llindar de detecció. A més, la quantitat ingent d'informació que es genera, fa que aquells gens que no són familiars per a l'investigador s'acabin menystenint. Finalment, cal recordar que el fet d'agrupar gens en funció de la seva signatura transcripcional, dista molt d'explicar en quins processos biològics estan implicats (Segal et al., 2005). Tanmateix, molts estudis han demostrat la utilitat d'aquesta tecnologia en l'estudi de molts tipus de tumors com limfomes (Alizadeh et al., 2000), mama (Perou et al., 2000), pàncrees (Iacobuzio-Donahue et al., 2003), gàstric (Tay et al., 2003) i naturalment còlon (Bertucci et al., 2004; Iacobuzio-Donahue et al., 2003; Kitahara et al., 2001; Koehler et al., 2004).

La majoria d'estudis d'expressió basats en la tecnologia dels *micro-arrays* han obviat, però, el component estromal i de cèl·lula normal present en qualsevol tumor amb la consegüent pèrdua d'informació deguda a la "contaminació" (Galamb et al., 2005). La separació dels components cel·lulars dels tumors en aquests estudis d'expressió, representa un repte de futur que aportarà més informació al paper del microambient en la progressió tumoral. La captura de làser és una de les tècniques que permet aquesta separació, malgrat que la qualitat de l'RNA que se'n obté

no és en absolut comparable a la del DNA o la de l'RNA dels fragments de teixit congelat.

- Estudis de proteòmica. Actualment, l'alternativa als *micro-arrays* genòmics en el camp de l'anàlisi global proteic, és l'electroforesi bidimensional (2D-PAGE). Encara però, es troba en un estat més immadur com a tècnica de rutina en laboratoris de recerca. Malgrat el seu extraordinari potencial, l'anàlisi dels resultats és de gran complexitat i els patrons que s'obtenen en experiments diferents són encara difícils de comparar (Fels et al., 2003; Steinert et al., 2002).

L'altre eina que ha adquirit una rellevància important en l'estudi proteic són els *arrays* de teixits, altrament anomenats *tissue micro-arrays (TMA)*. Tot i que aquestes matrius no permeten l'estudi simultani de diferents marcadors, han estat molt útils en la validació del potencial pronòstic d'un marcador molecular concret en àmplies sèries de tumors. S'ha de tenir en compte però, que la pèrdua de cilindres de biòpsia durant el procés tècnic, que es situa al voltant del 30%, pot afectar els resultats d'anàlisi basats en proteïnes d'expressió irregular. Aquestes matrius a més, serveixen com a plataforma, no només per anàlisis proteiques, sino també per a estudis del genoma i el transcriptoma, ja que sobre els cilindres que els formen s'hi poden realitzar, per exemple, hibridacions *in situ*.

Taula 5. Tècniques emprades en estudis d'anàlisi global

Anàlisi del genoma	Anàlisi del transcriptoma	Anàlisi proteïc
<ul style="list-style-type: none"> ◦ Cariotipatge ◦ Bandes G ◦ M-FISH, SKY ◦ Hibridació genòmica comparada (CGH) ◦ RDA (<i>representational difference analysis</i>) ◦ RLGs (<i>restriction landmark genome scanning</i>) ◦ <i>Wide Genome</i> LOH ◦ AP-PCR ◦ <i>Array</i>-CGH 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ <i>Differential Display</i> ◦ RAP-PCR ◦ SAGE (<i>serial analysis gene expression</i>) ◦ <i>Nucleic acid subtraction</i> ◦ <i>Micro-arrays</i> d'expressió 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Electroforesi bidimensionals (2D-PAGE) ◦ <i>Micro-arrays</i> de teixits o TMA (<i>tissue micro-array</i>)

- Estudis globals de canvis de metilació genòmica. Tant les pèrdues (hipometilacions) com els guanys (hipermetilacions) de metilació del DNA,

coexisteixen en la majoria de tumors. Les tècniques d'anàlisi de la metilació del DNA es diferencien en dos grans grups. Un primer grup està format per les tècniques de rastreig, que permeten buscar nous marcadors o canvis de metilació entre dues mostres de DNA diferents, per exemple, teixit normal i teixit tumoral. Un segon bloc està integrat per aquelles tècniques que permeten realitzar estudis a nivell específic d'una o poques seqüències, prèviament conegudes. Les tècniques de rastreig consten de dues parts ben diferenciades. Una primera part serveix per identificar les diferències de metilació entre les dues mostres. Generalment, aquesta part consta d'una digestió enzimàtica amb enzims de restricció sensibles a la metilació. La segona part serveix per visualitzar les diferències de metilació prèviament identificades. Entre les tècniques d'estudi global més utilitzades destaquen el *Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS)* (Hayashizaki et al., 1993), *Differential Methylation Hybridization (DMH)* (Huang et al., 1999), *Methylation-Sensitive-Representational Difference Analysis (MS-RDA)* (Ushijima et al., 1997), *Methylated CpG island Amplification (MCA)* (Toyota et al., 1999) i, finalment, una de les poques tècniques no basades en digestió enzimàtica i que es fonamenta en columnes d'afinitat amb domini d'unió a CpG metilats (Brock et al., 2001). Exceptuant la tècnica MS-RDA, la resta de tècniques esmentades s'han dissenyat per detectar canvis d'hipermetilació en illes CpG, tot limitant-ne el seu ús en la detecció d'hipometilacions. Un resum de les diferents tècniques de rastreig es mostra a la taula_. Altres mètodes per a la detecció de guanys i pèrdues es basaven en l'ús d'encebadors arbitraris, com *Arbitrarily Primed-PCR (AP-PCR)* (Welsh and McClelland, 1990) i *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)* (Williams et al., 1990).

Taula 6. Mètodes de rastreig de canvis de metilació genòmica. Extret de Cottrell, 2004 (Cottrell, 2004).

Method	Description	Strengths/weaknesses
MSAP-PCR	methylation-specific restriction digest, arbitrarily primed PCR amplification	limited to enzyme recognition sites
MCA	methylation-specific restriction digest and linker ligation, PCR amplification with linker primers	Limited to enzyme recognition sites
DMH	methylation-specific restriction digest, hybridize digested and undigested DNA to array of CpG islands	limited to CpG island sequences in the array; potential for high throughput
ECIST	methylation and expression measured on same array	information on both methylation and expression
RLGS	methylation-specific restriction digest, two-dimensional electrophoresis	requires high-quality DNA
5-Azacytidine expression	re-expression array analysis of genes reactivated by the methylation inhibitor 5-azacytidine	selection by function
MAD	MCA with microarray-based detection	limited to enzyme recognition sites
NorI-CODE	NorI digestion; linker ligation and PCR, subtraction, hybridization to NorI library array	Simultaneous detection of hypermethylation and deletions
AIMS	MCA-style amplicon generation, visualization by gel electrophoresis	limited to enzyme recognition sites
Size fractionation profiling	methylation-specific restriction digest; size fractionation, hybridization to microarray	requires a lot of DNA (>20 µg)
ICEAMP	Methyl CpG binding domain column, subtractive hybridization	prone to false positives

- La biologia de sistemes. Aquesta és la darrera disciplina que s'ha incorporat a les anàlisis globals;. Si bé el mètode científic busca confirmar o refutar hipòtesis amb resultats obtinguts a partir de l'experimentació, la biologia de sistemes es basa en la modelització. Mitjançant eines matemàtiques i estadístiques, es fan projeccions sobre la plausibilitat de possibles interaccions entre els marcadors moleculars responsables de l'aparició i progressió dels tumors. Tot i que aquestes interaccions han de ser corroborades experimentalment, la forma com els gens candidats han estat identificats o caracteritzats és el que canvia. Mentre les dades "òmiques" continuïn creixent, la necessitat d'integrar-les mitjançant la bioinformàtica serà primordial per entendre les xarxes cel·lulars i com estan desregulades en càncer (Rhodes and Chinnaiyan, 2005). Una d'aquestes aproximacions d'integració són les meta-anàlisis, que busquen identificar perfils més robusts entre grups de dades independents. Un altre tipus són les anàlisis funcionals o d'enriquiment del grup de gens. El van

descriure Mootha i col·laboradors que, usant el test de Kolmogorov-Smirnov, trobaren que els gens involucrats en la fosforilació oxidativa estaven infraexpressats de forma coordinada en la musculatura dels diabètics (Mootha et al., 2003). Al conjunt de gens funcionalment relacionats se l'anomena sovint mòdul. Els gens d'un mòdul estan condicionalment activats o reprimits en un ampli ventall de tipus tumorals. Diversos treballs han identificat com alguns d'aquests mòduls estan alterats en càncer (Segal et al., 2004).

Els mapes d'interaccions de proteïnes o interactoma i les xarxes transcripcionals globals o transcriptoma són altres aproximacions per a arribar a una millor comprensió del procés tumoral.

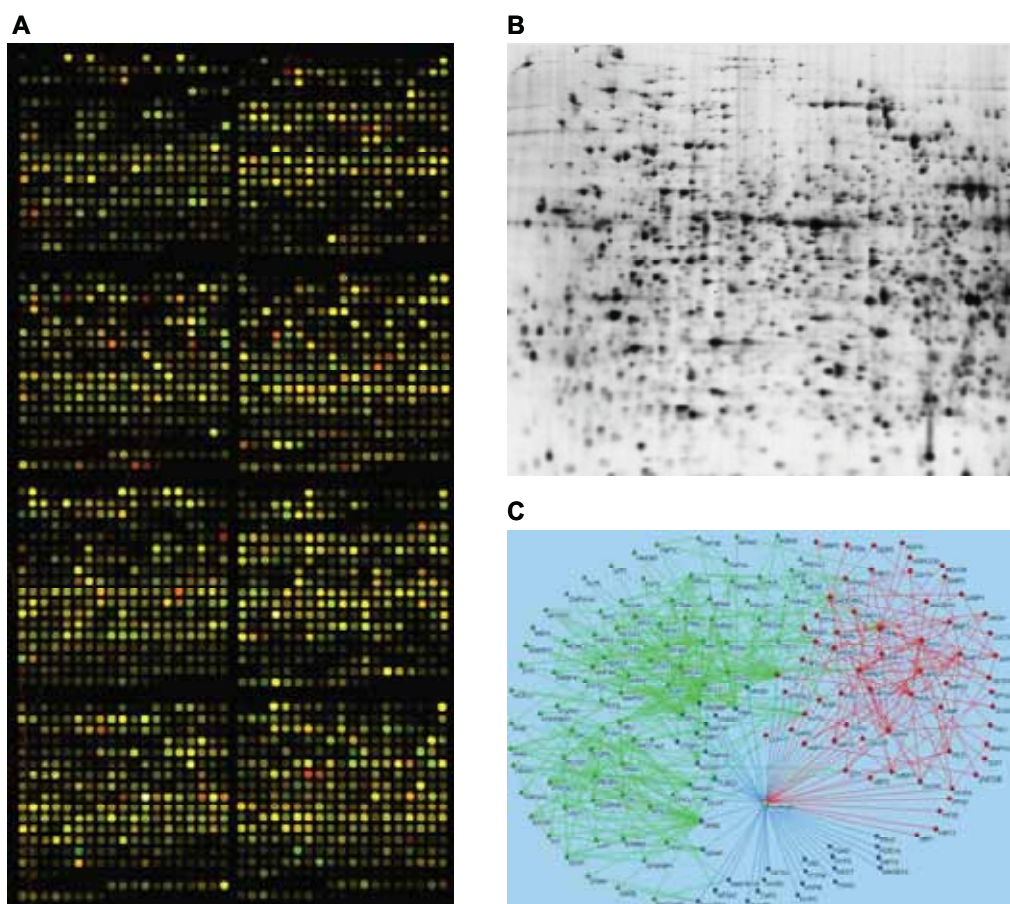


Figura 9. Tècniques d'anàlisi global. (A) Imatge d'una hibridació sobre array d'expressió. La paleta de colors és arbitrària. (B) Electroforesi de dues dimensions. (C) Xarxa de múltiples interaccions moleculars modelada mitjançant biologia de sistemes.