

**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

# Discussió

*Day after day, alone on the hill,  
The man with the foolish grin is keeping perfectly still.  
But nobody wants to know him,  
They can see that he's just a fool.  
And he never gives an answer ...*

*But the fool on the hill,  
Sees the sun going down.  
And the eyes in his head,  
See the world spinning around.*  
**The Beatles**



### Caracterització molecular de la poliposi adenomatosa familiar

Bona part de les alteracions que es donen al llarg de la progressió tumoral s'acumulen ja a les lesions benignes (adenomes) i és, per tant, interessant analitzar-les per tenir coneixement de quines són aquestes alteracions. El treball d'aquesta tesi s'ha centrat en l'estudi dels components de la via de Wnt, ja que és la via clau tant en l'homeòstasi normal del còlon com en la tumorigènesi colorectal.

S'ha dirigit l'estudi de les alteracions somàtiques d'adenomes de pacients de poliposi adenomatosa familiar cap a diferents aspectes: (i) cerca d'alteracions somàtiques del gen *APC*; (ii) descripció del nivell d'activació de la via de Wnt a través de l'estudi dels nivells i la localització nuclear de la  $\beta$ -catenina; (iii) estudi dels nivells d'expressió de diferents components de la via de Wnt; (iv) identificació de mutacions en el gen *KRAS*; (v) perfils genòmics per avaluar els guanys i les pèrdues del contingut de DNA de la cèl·lula.

L'estudi de les alteracions somàtiques en el gen *APC*, va demostrar que fins a un 50% dels adenomes presenta algun tipus d'alteració addicional, ja sigui pèrdua al·lèlica o mutació puntual. El mecanisme més freqüent d'alteració que s'ha pogut detectar és el de pèrdua al·lèlica o LOH (pèrdua d'heterozigositat), això pot suggerir que és el mecanisme que se selecciona de manera més avantatjosa. S'ha de tenir en compte, tanmateix, que en els adenomes on no es detecta cap tipus d'alteració somàtica, es poden donar altres mecanismes que no s'han explorat en aquesta tesi, com metilació del promotor del gen (Chen *et al.*, 2005) o mutacions en altres regions fora de l'MCR (*mutation cluster region*). També es pot hipotetitzar que, encara que *APC* és un gen supressor tumoral clàssic, hi pot haver gens modificadors que poden actuar com a substituïts del segon "hit" en els adenomes (Crabtree *et al.*, 2004). S'ha discutit també el fet que el nombre d'adenomes (superior a 100) en la FAP és massa gran perquè cada un d'ells pugui haver adquirit un *second hit*. D'aquesta manera, cal pensar que les lesions primerenques poden evolucionar sense la presència de la mutació somàtica (Segditsas & Tomlinson, 2006).

La teoria de l'associació entre la mutació germinal i la mutació somàtica (la naturalesa molecular de l'alteració germinal condiciona el tipus de mutació somàtica adquirida) que van proposar Crabtree i col·laboradors no ha estat corroborada per les dades presentades, on s'han pogut analitzar adenomes de dos pacients amb mutacions

germinals properes al codó 1.300 i de quatre pacients amb mutacions en altres regions del gen. La correlació de mutacions germinals en codons propers al 1.300 i la presència d'LOH i presència de mutacions en l'MCR en la resta de casos, no proporciona significació estadística. Això pot ser causat per una mida mostral petita, insuficient per detectar correlacions estadísticament significatives, o bé podria donar-se per diferències en les poblacions d'estudi. Un altre factor a tenir en compte és que les mostres no són adenomes microdisseccionats amb microscopi de captura de làser, circumstància que implica que hi ha teixit normal contaminant i això fa que tècnicament també sigui més difícil trobar canvis com mutacions o LOH. Aquesta possibilitat és més llunyana ja que un patòleg experimentat va poder confirmar, mitjançant anàlisi microscòpica de les seccions dels adenomes, que més del 80% de les cèl·lules que hi ha en la mostra són tumorals. També s'ha d'assenyalar que presumiblement totes les mostres haurien de presentar alteracions somàtiques, però la detecció d'algunes mutacions i d'LOH pot resultar emmascarada per l'origen policlonal dels adenomes primerencs (Novelli *et al.*, 1996). Algunes de les explicacions per a la policlonalitat serien l'existència de teixit normal amb aparença neoplàstica entre les cèl·lules de l'adenoma o la fusió de més d'un clon neoplàstic independent per formar un sol adenoma.

Els resultats de la immunohistoquímica de  $\beta$ -catenina han mostrat que en la immensa majoria dels adenomes de FAP i en els adenomes i carcinomes esporàdics es detecta un increment en els nivells de proteïna i en la seva localització nuclear. Aquests resultats porten a pensar que, encara que no s'ha pogut detectar inactivació somàtica d'APC en tots els tumors, la via de Wnt es troba àmpliament activa i podem postular que alteracions en un sol dels al·lels d'APC o altres mecanismes independents d'APC que encara no es coneixen són responsables de l'activació de la via en lesions benignes. Hi ha pocs estudis en què s'analitzin els nivells de proteïna de  $\beta$ -catenina i la seva localització subcel·lular en adenomes de FAP. Els nostres resultats es corresponen amb els descrits per Takayama *et al.* i Inomata *et al.* on demostren que en adenomes de quatre i vuit pacients respectivament es dona una acumulació nuclear i citoplasmàtica de  $\beta$ -catenina (Inomata *et al.*, 1996, Takayama *et al.*, 2001). En altres treballs els autors només detecten la translocació nuclear de  $\beta$ -catenina en un pòlip amb displàsia severa (Blaker *et al.*, 2003) i en tumors malignes (Kobayashi *et al.*, 2000), mentre que en tumors benignes que inclouen adenomes de FAP no la detecten.

No hi ha estudis previs en els quals s'investigui el comportament transcripcional d'APC en el càncer colorectal. En aquesta tesi s'ha constatat que no hi ha diferències estadísticament significatives en els nivells d'expressió de l'RNA en adenomes en comparació amb la mucosa normal. Tot i que s'observen canvis del contingut de DNA de la regió cromosòmica que conté el gen APC, aquest canvis no es correlacionen amb canvis a nivell d'mRNA. Aquest resultat suggereix que no són necessaris canvis en l'mRNA, ja que canvis a nivell de DNA poden ser suficients per inactivar la proteïna i la seva funció com a supressor tumoral. Seria interessant mirar què passa a nivell de proteïna i veure també si el fet de tenir mutacions en un dels al·lells i no en l'altre implica que l'expressió d'aquests al·lells sigui diferent i es pugui expressar més la còpia alterada del gen que l'altra còpia.

Pel que fa a la resta dels gens analitzats: *C-MYC*, *AXINA2* i *SFRP1*, s'han detectat canvis accentuats en els seus nivells d'expressió en tumors com es podia esperar de treballs previs en mostres de càncer colorectal.

*C-MYC* és un gen diana de  $\beta$ -catenina ben conegut (He et al., 1998). Els nivells d'expressió incrementats en tumors concorden amb el fet de trobar la  $\beta$ -catenina localitzada al nucli i la seva capacitat per induir l'expressió de gens del programa transcripcional de la via de Wnt a través de la unió amb factors de transcripció de la família LEF/TCF. És una constatació més que aquesta via es troba activa i no només que en els adenomes de l'estudi s'hagi donat una translocació nuclear de la  $\beta$ -catenina, sinó que aquesta translocació ha permès l'inici de l'activació transcripcional de les dianes de la via, com ara *C-MYC*.

Els altres dos gens analitzats són *SFRP1* i *AXINA2*, l'expressió dels quals sembla que també és regulada per  $\beta$ -catenina/TCF tal i com suggereixen alguns autors (Caldwell et al., 2006, Jho et al., 2002, Yan et al., 2001). Aquests dos gens codifiquen per proteïnes amb efectes inhibidors sobre la via de Wnt i la seva expressió alterada pot ser explicada per una resposta de *feedback* negatiu en les cèl·lules normals després del senyal estimulador continuat secundari a l'activació constitutiva de la via de Wnt/ $\beta$ -catenina/TCF4. Encara que hom pugui pensar que els dos gens tindran comportaments similars en els tumors, ja que ambdós són sobreexpressats per  $\beta$ -catenina, el que s'ha trobat en les mostres analitzades són canvis d'expressió en sentits oposats. S'observa expressió més elevada d'*AXINA2* en els adenomes, canvi ja observat en altres estudis

amb mostres de càncer colorectal (Hughes & Brady, 2006, Liu *et al.*, 2000, Lustig *et al.*, 2002). Encara que la sobreexpressió d'AXINA2 pot promoure la degradació de  $\beta$ -catenina en les cèl·lules tumorals (Behrens *et al.*, 1998), els nivells d'AXINA2 que observem en els teixits tumorals no són suficients per degradar  $\beta$ -catenina i, per tant, prevenir la formació dels adenomes. Per altra banda, els nivells d'SFRP són infraexpressats en els teixits tumorals, i és difícil pensar que és un efecte de la  $\beta$ -catenina sobre la transcripció, ja que s'ha demostrat que aquesta el que fa és augmentar la seva expressió. Per tant, pensem que la infraexpressió és causada per un efecte independent. Un mecanisme que molt probablement estigui actuant sobre la infraexpressió d'SFRP que s'observa és la metilació del seu promotor, ja que s'ha descrit prèviament com a mecanisme principal per a la inactivació d'SFRP en el càncer colorectal (Caldwell *et al.*, 2006). S'ha descrit anteriorment que en l'intestí prim i en el còlon, les cèl·lules mesenquimals properes a les criptes així com les cèl·lules de la submucosa expressen nivells abundants d'SFRP1 (Gregorieff *et al.*, 2005). Com el que s'ha descrit aquí en la sèrie d'adenomes de FAP i pòlips de CCR esporàdic, aquests autors també observen que SFRP1 no s'expressa en els pòlips intestinals.

Totes les observacions anteriors porten a pensar que no només ha de ser actiu el programa transcripcional de la via de Wnt, sinó que els diferents membres que participen en la via han d'adquirir un determinat estatus d'activació o inactivació per promoure la proliferació de la manera més avantatjosa i això es pot aconseguir a través de diferents mecanismes.

També s'ha posat atenció en les mutacions en el gen KRAS. Kinzler i Vogelstein (Kinzler & Vogelstein, 1996) van situar els focus de criptes aberrants després de l'adquisició de mutacions en el gen APC però abans de mutacions en el gen KRAS en la representació del diagrama dels canvis proposats que es donen entre l'epiteli normal i el càncer colorectal (Pretlow & Pretlow, 2005). Un estudi recent més detallat dels focus de criptes aberrants i adenomes de pacients amb i sense FAP suggereix que la tumorigènesi en estadis inicials pot ser diferent en aquests dos tipus de pacients (Takayama *et al.*, 2001). En pacients que no presenten FAP, les mutacions en APC no es troben mai en els focus de criptes aberrants, mentre que les mutacions en KRAS es donaven en alta freqüència. En els adenomes dels mateixos pacients es trobaven mutacions en APC en el 78% dels casos i mutacions en KRAS en el 65% dels casos. En canvi, en els pacients de FAP, els focus de criptes aberrants presentaven mutacions en

*APC* en tots els casos, mentre que les mutacions en *KRAS* eren molt menys freqüents, només en el 13% dels casos. Els adenomes d'aquests pacients presentaven també mutacions en *APC* i en un 78% dels adenomes també s'hi trobaven mutacions en *KRAS*. En els adenomes estudiats en aquesta tesi, s'han trobat mutacions de *KRAS* en el 10% dels casos, el qual és un percentatge proper als resultats que presenten aquests autors pel que fa a criptes aberrants de pacients de FAP i no tan semblant al que observen en els adenomes d'aquests pacients. Això podria indicar que les mostres són adenomes poc avançats, tot i que això va en contra de la mida dels adenomes seleccionats i del grau d'activació de la via de Wnt que s'observa. Recentment, però, s'ha comentat que encara és controvertit el moment en què apareixen les mutacions en *KRAS* (Takayama & Niitsu, 2004). És també interessant destacar que s'ha descrit que les mutacions en *KRAS* poden induir la via de Wnt *in vitro* a través de l'estabilització de la  $\beta$ -catenina, probablement a través de l'activitat cinasa de la GSK-3 $\beta$  (Li *et al.*, 2005). D'aquesta manera *KRAS* també interacciona d'alguna manera amb la via de Wnt, la qual cosa reforça el paper central d'aquesta via en la tumorigènesi colorectal i la importància de la seva regulació a diferents nivells, sempre per facilitar la seva activació.

L'estudi de gens concrets que participen en vies o determinats mecanismes dins la cèl·lula és molt interessant, però el càncer no es pot entendre considerant només mutacions individuals. L'efecte d'una mutació sovint depèn d'altres mutacions dins de la mateixa cèl·lula, el context d'altres cèl·lules mutades del tumor i el context del microambient del tumor i del pacient. El càncer és un sistema complex en el qual els tumors consisteixen en poblacions de cèl·lules heterogènies fenotípicament i genèticament que competeixen per recursos escassos (Abbott *et al.*, 2006). D'aquesta manera, es va considerar interessant també fer un abordatge de les alteracions somàtiques dels adenomes des d'una perspectiva dels canvis globals en tot el genoma. Per a aquest objectiu es va recórrer a la tècnica de l'aCGH. En aquesta tesi s'han presentat resultats d'aCGH amb mostres de FAP (vegeu el capítol 1), però la mateixa tecnologia es va aplicar també a l'estudi de la sèrie de mostres de mucosa normal, adenoma i carcinoma provinents de pacients de CCR esporàdic (mostres utilitzades per l'estudi del transcriptoma. Vegeu els resultats presentats en el capítol 3). En aquests moments s'està realitzant l'anàlisi estadística d'aquestes dades. Serà interessant poder comparar el comportament de les mostres de FAP amb les mostres de CCR



esporàdic i dins de les mostres de CCR esporàdic veure quin és el grau de correlació entre els canvis a nivell de DNA i els canvis d'expressió gènica.

Els resultats de l'estudi dels canvis del DNA revelen que hi ha aneuploïdies en fases molt primerenques de la progressió tumoral (Richter *et al.*, 2003, Shih *et al.*, 2001), cosa que planteja si ja hi podria haver signes d'instabilitat que precedeixen a la formació dels tumors. La metaanàlisi realitzada per Diep *et al.* sobre estudis amb mostres de CCR va demostrar que, en general, les pèrdues de 17p i del cromosoma 18 i els guanys de 8q, 13q i del cromosoma 20 es donen en etapes primerenques i que les pèrdues de 4p i 8p i els guanys de 7p i 17q estan associats a la transició entre carcinoma *in situ* i metàstasis. Els esdeveniments més tardans serien les pèrdues de 14q i els guanys d'1q, del cromosoma 11, de 12p i del cromosoma 19 (Diep *et al.*, 2006). En aquesta tesi s'ha treballat amb mostres d'adenomes de FAP dels quals s'han obtingut els perfils genòmics. En aquests perfils s'esperaria trobar les alteracions assenyalades en el primer grup que defineix els canvis en les etapes primerenques de la progressió. S'han trobat guanys del cromosoma 13 i de 20q11.2 que concorden amb el que descriuen Diep *et al.*, en canvi, s'ha detectat una pèrdua de la regió 14q32.33, que segons aquests autors quedaria en el grup de canvis més tardans. Mentre que la majoria dels treballs es basen en mostres esporàdiques, l'únic treball d'aCGH amb mostres d'adenomes de FAP és el de Cardoso *et al.* en el qual comparen adenomes de pacients que tenen mutacions germinals en *APC* amb pacients que tenen mutacions en l'*MYH* (Cardoso *et al.*, 2006). Ells troben regions alterades en els dos tipus de pacients: pèrdues d'1p, dels cromosomes 17, 19 i 22 i guanys que afecten els cromosomes 7 i 13. En aquesta tesi s'han trobat guanys en els cromosomes 7 i 13 que coincideixen amb aquell treball, però les dades no coincideixen per a les pèrdues. Malgrat aquesta discrepància, la metaanàlisi realitzada de forma exhaustiva per Cardoso *et al.* mostra que els canvis comuns a totes les etapes de la progressió són pèrdues en els cromosomes 4, 5, 8, 17, 18 i 20 i guanys en els cromosomes 7, 8, 13 i 20 (Cardoso *et al.*, 2007), la qual cosa es correspon a grans trets amb el que s'ha observat amb les dades presentades en aquesta tesi.

Els resultats de les regions alterades mostrats en el capítol I, contenen gens importants per a la progressió tumoral. Estudiant amb deteniment la revisió de Cardoso *et al.* (Cardoso *et al.*, 2007), es pot constatar que totes les regions descrites en aquesta tesi han estat descrites com alterades transcripcionalment o bé guanyades o

perdues en dues o més publicacions. Al llarg del capítol I s'han proposat una sèrie de gens candidats a estar implicats en les etapes primerenques del CCR. Un d'ells és la **PROTODHERINA** beta i gamma, que es localitza al cromosoma 5q31. Les cadherines tenen un paper important en les unions entre cèl·lules adjacents. Alguna proteïna d'aquesta família, com la E-cadherina, s'ha trobat infraexpressada o alterada funcionalment per mutacions en alguns tumors (Perl *et al.*, 1998) i s'ha descrit un paper en la transició d'adenoma a carcinoma. Algunes proteïnes del grup de les protocadherines també s'han trobat inactivades, freqüentment per metilació dels promotors (Imoto *et al.*, 2006, Rouget-Quermalet *et al.*, 2006, Ying *et al.*, 2007). No hi ha però cap treball que descriu un paper de les protocadherines beta i gamma en càncer. A més, s'ha trobat aquest locus amplificat, quan les evidències per als altres membres de la família apunten sempre cap a una inactivació d'aquests gens en càncer. S'hauria d'explorar el significat funcional del guany de les protocadherines beta i gamma en el CCR. Alguns autors han descrit un locus proper al de la protocadherina com a guanyat en adenomes i carcinomes, el qual conté el gen **SPARC** (Agrawal *et al.*, 2002, Birkenkamp-Demtroder *et al.*, 2002, Takemasa *et al.*, 2001, Williams *et al.*, 2003). Aquest gen també s'ha descrit com a sobreexpressat en carcinoma respecte a mucosa normal. En les dades d'aquesta tesi també s'ha trobat aquesta mateixa regió guanyada, però no s'ha inclòs en els resultats finals, ja que no arriba al 10% de representació. De manera interessant, aquest és un dels pocs gens diferencialment expressats entre adenomes i carcinomes i que s'han descrit en el capítol 3 de la tesi. Aquest gen està sobreexpressat en el carcinoma respecte a l'adenoma.

El cromosoma 7 es guanya de manera recurrent. La regió que més adenomes presenten amplificada és la que correspon a 7q22.1 on s'han trobat diferents gens candidats, entre ells **SH2B2** i **CUTLI**. S'ha descrit una interacció entre el gen candidat d'aquesta regió **SH2B2** i la proteïna FGFR3 que s'ha trobat alterada per mutacions en diferents càncers. Aquesta unió ajuda a la transducció de senyal a través d'Stat5 (Kong *et al.*, 2002). Per tant, el guany d'**SH2B2** podria tenir un paper a través d'aquesta via de senyalització. Un altre gen interessant d'aquesta regió és **CUTLI** que s'ha trobat implicat en processos de motilitat i invasió tumorals i és una diana de TGF-beta. S'ha estudiat el seu paper en càncer de mama i de pàncrees (Michl *et al.*, 2005, Ripka *et al.*, 2007). A més, té com a diana el gen **Wnt5** que participa en la via de Wnt, per tant, el guany del gen **CUTLI** podria tenir també implicacions en el CCR, i, per tant, queda clar

el paper clau d'aquesta via de senyalització. En aquesta mateixa regió cromosòmica, en la revisió de Cardoso *et al.* s'han descrit altres gens importants en altres treballs com **COLIA2** i **AZGPI** (Cardoso *et al.*, 2007). Precisament el gen **COLIA2** és dels pocs gens diferencialment expressats entre adenoma i carcinoma que es descriuen al capítol 3. Aquest gen és sobreexpressat en carcinomes respecte a adenomes.

La petita regió 8q24.3, que es perd amb més freqüència en els adenomes estudiats, conté 11 gens entre els quals s'ha trobat **BOPI** i **HSFI**. Només dos treballs parlen de **BOPI** en càncer i el més recent estudia la implicació d'aquest gen en CCR (Killian *et al.*, 2006). De manera interessant, descriuen com aquest gen que pertany a la maquinària de biogènesi del ribosoma és el component d'aquest complex que es guanya més freqüentment en CCR i es relaciona amb inestabilitat cromosòmica. Aquest fenomen és independent de **MYC** que es troba molt proper en el genoma i, fins i tot, és més freqüent que el guany de **MYC**. A més, el guany en contingut de DNA es correlaciona amb un guany d'mRNA. Per tant, els resultats observats en la sèrie d'adenomes de FAP, en els quals es mostra la pèrdua de la regió que conté aquest gen, semblen contradir els resultats presentats per Killian i col·laboradors. En un treball anterior, però, el que varen veure és que la inactivació dels gens d'aquest complex és el que indueix la inestabilitat cromosòmica (Killian *et al.*, 2004). Això podria explicar la importància de la pèrdua d'aquest gen en la sèrie de mostres de FAP. Com en el cas dels gens del control de la mitosi que s'han descrit en el capítol 2, tant guanys com pèrdues d'un mateix component del complex provoquen inestabilitat cromosòmica. Pel que fa a l'altre gen que s'ha considerat interessant, **HSFI**, és el factor de transcripció de les proteïnes *heat shock* que es coneixen bé i es troben activades en les cèl·lules tumorals. Aquest factor de transcripció s'ha trobat alterat en múltiples neoplàsies, entre les quals s'inclou el CCR (Cen *et al.*, 2004).

Per altra banda, el cromosoma 13 es troba tot guanyat. Dins aquest cromosoma destaquen com a gens candidats els factors de transcripció **GTF3A** i **HMGB1** com a alterats a nivell de DNA i RNA i validats per molts treballs que presenten dades amb mostres d'adenomes i carcinomes de CCR (Agrawal *et al.*, 2002, Bertucci *et al.*, 2004, Birkenkamp-Demtroder *et al.*, 2002, Lin *et al.*, 2002, Notterman *et al.*, 2001).

De manera molt recurrent, es perd la regió 14q32.33 que és la que correspon al locus de la cadena pesant de la **IMMUNOGLOBULINA**. Aquest fenomen no s'ha descrit prèviament en mostres de CCR, però les immunoglobulines tenen un paper important

en càncer, sobretot en els limfomes, on es troben reordenaments cromosòmics de les regions de les immunoglobulines amb gens importants per a la progressió tumoral.

Del cromosoma 20 s'ha trobat la regió 20p11.22 que es guanya i que conté un gen i tres pseudogens. El gen és **PAX1** i es tracta d'un factor de transcripció que controla processos del desenvolupament. En humans es troben mutacions en els gens **PAX3** i **PAX6** de la mateixa família i es troben implicats en càncer (Strachan & Read, 1994). No hi ha cap treball que descriu **PAX1** com a implicat en càncer, però el seu augment podria tenir un paper en la progressió tumoral del CCR, ja que en condicions normals controla processos de desenvolupament. Curiosament, un dels pseudogens d'aquesta regió és **ST13**. El gen **ST13** s'anomena *suppression of tumorigenicity 13 (colon carcinoma)* i es localitza en la regió 22q13.1. Tot i tenir aquest nom, s'ha investigat poc sobre el paper d'aquest gen en el CCR. Se sap que es troba infraexpressat en carcinomes gàstrics i del còlon (Shi *et al.*, 2007). No se sap quin seria el sentit que tindria l'augment d'aquest pseudogen observat en els adenomes.

### **APC i la inestabilitat cromosòmica en el càncer colorectal**

La base molecular de la inestabilitat cromosòmica s'ha atribuït a diferents categories de gens, entre els quals trobem els que controlen el fus mitòtic, la mitosi i el cicle cel·lular, l'escurçament dels telòmers i l'expressió dels telòmers, el nombre de centrosomes, la reparació dels talls de la doble cadena del DNA, la funció de cinetocor i la segregació cromosòmica (Rajagopalan *et al.*, 2003). Més recentment, s'ha descrit que és possible que la proteïna APC inactivada tingui un paper dual en el fenotip observat de defectes en la mitosi: APC no és només una peça principal de la via de Wnt, sinó que també està directament implicat en la maquinària del fus mitòtic. Aquesta és una possibilitat real per la contribució directa de la via de Wnt en les alteracions mitòtiques i perquè  $\beta$ -catenina és absent en els cinetocors (Kaplan *et al.*, 2001). En aquests moments no està clar quins són els gens que actuen de manera sinèrgica amb APC en la inestabilitat cromosòmica.

Amb l'objectiu d'investigar les vies moleculars implicades en les aberracions mitòtiques observades, es va fer una anàlisi dels perfils d'expressió de tumors de models animals de càncer colorectal. Entre tots els gens desregulats, es va detectar l'expressió diferencial de diferents gens importants per a la divisió cel·lular i la mitosi. Aquests

gens no han estat descrits com a gens diana de la via canònica de Wnt (vegeu la web <http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets/.html>). L'increment d'expressió de les proteïnes del *checkpoint* de mitosi, BUB1B i MAD2L1, suggereix que estan relacionades amb l'increment de la incidència de les aberracions mitòtiques associades amb la pèrdua de funció d'APC. En el mateix sentit, Kaplan *et al.* varen descriure que durant la mitosi, APC es localitza al final dels microtúbuls i forma un complex amb les proteïnes del *checkpoint* de mitosi Bub1 i Bub3. A més, van veure que APC era un substrat d'alta afinitat per les Bub cinases (Kaplan *et al.*, 2001). Es pot postular que APC suporta i amplifica el senyal del *checkpoint* de Bub1/BuR1 i així contribueix a la fidelitat de la segregació cromosòmica. Aquests autors també descriuen la presència de proteïnes com BUB1B i MAD2L1 en cèl·lules amb inestabilitat cromosòmica, encara que això no és degut a un error general en la infraregulació de les proteïnes del *checkpoint* durant l'anafase (Green & Kaplan, 2003). De fet, es va descriure una resposta normal del *checkpoint* en cèl·lules mare embrionàries mutants d'APC que presenten moltes aberracions cromosòmiques (Fodde *et al.*, 2001a), així com en cèl·lules embrionàries de ratolins Min/Min (Kaplan *et al.*, 2001).

L'anàlisi transcripcional obtinguda en models animals per a la síndrome de FAP (ratolins APC<sup>L638N</sup>) es correspon amb els canvis transcripcionals trobats en els pacients de FAP. En concordança, els experiments *in vitro* per reconstituir o bloquejar la funció d'APC també suggereixen que APC està involucrat en el control transcripcional dels gens del *checkpoint* de mitosi.

Altres treballs han analitzat l'expressió d'*STMN1* i *MAD2*. *STMN1* se sobreexpressa en leucèmia (Hanash *et al.*, 1988), càncer de mama (Curmi *et al.*, 2000) i càncer d'ovari (Price *et al.*, 2000). S'ha descrit també que nivells elevats d'*STMN1* es correlacionen amb el fenotipus metastàtic dels sarcomes (Baldassarre *et al.*, 2005). La inducció directa de l'expressió de *MAD2* per E2F-1, s'ha vist que contribueix a CIN (Hernando *et al.*, 2004). Actualment es pensa que *MAD2* té un paper supressor tumoral ja que s'han trobat mutacions inactivadores a càncers de melsa, mama i estomac (Hernando *et al.*, 2001, Kim *et al.*, 2005, Percy *et al.*, 2000).

Aquests resultats indiquen que APC inactivat pot ser un element clau en la sobreexpressió aberrant de gens que participen en la correcta realització de la mitosi. Cal destacar que la sobreexpressió dels gens *STMN1*, *BUB1B* i *MAD2L1* representa un esdeveniment primerenc en la tumorigènesi colorectal, pel fet que es troba ja present

en la mucosa microscòpicament normal de pacients de FAP. Recentment, s'ha descrit que la sobreexpressió de *MAD2* en ratolins condueix a la iniciació tumoral, probablement a través de l'adquisició d'un fenotip de CIN que es dona abans de la transformació (Sotillo *et al.*, 2007). L'expressió de *MAD2* ha de ser finament regulada perquè tant nivells reduïts com augmentats de la proteïna indueixen aneuploidia (Dobles *et al.*, 2000, Hernando *et al.*, 2004, Michel *et al.*, 2001). Una sola alteració en el gen *APC* podria ser suficient per promoure aquesta sobreexpressió, que es manté al llarg de la tumorigènesi en els adenomes i en estadis més avançats de la progressió tumoral. Això concorda amb un possible paper d'*APC* en la inestabilitat cromosòmica en passos inicials on ja es donen aberracions mitòtiques (Cardoso *et al.*, 2006, Fodde *et al.*, 2001b). La deleció d'un dels al·lels de *MAD2* s'ha demostrat que dona com a resultat una elevada freqüència de defectes en la segregació cromosòmica i la implicació d'errors en el *checkpoint* de mitosi en la tumorigènesi (Michel *et al.*, 2001). La sobreexpressió de *MAD2* en el càncer colorectal s'ha correlacionat amb l'expressió de p53 (Li *et al.*, 2003) i l'expressió aberrant de la proteïna s'ha postulat que compromet la mitosi i predisposa les cèl·lules a la inestabilitat genòmica (Hernando *et al.*, 2004). La sobreexpressió del gen homòleg *MAD2L2* s'ha mostrat que coincideix amb la presència de ponts anafàsics i mal pronòstic en el càncer colorectal (Rimkus *et al.*, 2007). La inactivació dels *checkpoints* dependents de p53 i *MAD2* dona com a resultat un alt grau de CIN degut a la manca d'un *checkpoint* funcional (Burds *et al.*, 2005). En la mateixa línia d'evidències, els resultats obtinguts amb el ratolí *BUB1B*<sup>+/-</sup> *APC*<sup>Min/+</sup> suggereixen una interacció funcional entre aquests dos gens en la regulació de la transició de la metafase a l'anafase. Un error en aquesta interacció podria tenir un paper en la inestabilitat genòmica i en el desenvolupament i la progressió del càncer colorectal (Rao *et al.*, 2005).

L'observació que els tres gens analitzats: *BUB1B*, *MAD2L1* i *STMN1*, presenten en cada mostra un nivell d'expressió molt similar i que això representa un patró d'expressió comú al llarg de la sèrie de mostres analitzades, suggereix que hom es troba davant de gens regulats pel mateix mecanisme. Els experiments *in vitro* per reconstituir *APC* en cèl·lules de càncer de còlon on aquest es troba totalment inactiu (SW480), suggereixen que la via de Wnt pot ser aquest mecanisme regulador comú. Per estudiar la possible regulació directa de l'expressió dels gens *BUB1B*, *MAD2L1* i *STMN1* per  $\beta$ -catenina, es varen realitzar experiments d'immunoprecipitació de cromatina per

determinar si la  $\beta$ -catenina s'uneix directament al promotor dels gens *BUB1B*, *MAD2L1* i *STMN1* comparant línies cel·lulars que tenien o ni tenien inactivació d'APC. Es varen triar primers que amplifiquen regions del promotor que contenen seqüències consens d'unió dels factors de transcripció  $\beta$ -catenina/TCF4. Els resultats, però, no varen ser consistents després de diferents rèpliques i els controls negatius varen fallar. Tot i això, alguns experiments semblaven indicar que les seqüències promotores estaven enriquides en aquelles línies cel·lulars on APC està inactivat. Els esforços per respondre aquesta pregunta amb la tècnica d'immunoprecipitació de cromatina varen ser estèrils, però recentment s'han publicat dos treballs que poden donar algunes pistes sobre això. Per una banda, Menssen *et al.* han demostrat que *MAD2* és un gen diana de *C-MYC* (Menssen *et al.*, 2007). A més, aquests autors analitzaren 16 carcinomes de còlon humans i varen observar que *MAD2* s'expressa molt en cèl·lules tumorals, però no en cèl·lules normals (on només s'expressa a les bases de les criptes) i que aquesta expressió es correspon amb el patró d'expressió de *C-MYC*. Demostraren que *C-MYC* retarda el pas a prometafase a través de la inducció de l'expressió de *MAD2* i *BUBR1*. Tornant als resultats de la tesi, es pot especular doncs que, almenys per a *MAD2*, l'explicació a la regulació d'aquest gens es dona per la via de Wnt, però d'una manera indirecta.  $\beta$ -catenina activa l'expressió de *C-MYC* i aquest a la vegada activa l'expressió de *MAD2*. Seria interessant doncs, investigar si els altres dos gens poden ser regulats per *C-MYC* i expliquin així el patró d'expressió similar per als tres gens. En un altre treball recent, s'ha descrit *STMN2* com a diana de  $\beta$ -catenina (Lee *et al.*, 2006), encara que els autors varen analitzar altres membres de la família, entre ells *STMN1*, i no varen veure que la seva expressió sigui dependent de la via de Wnt.

L'anàlisi de les vies de senyalització implicades en l'abolició de la citocinesi clarificaran l'associació de la citocinesi incompleta i la sobreexpressió de les proteïnes mitòtiques. El defecte simultani d'alinejar correctament els cromosomes i la incapacitat del *checkpoint* per detectar aquestes errades representen una potent combinació que pot contribuir a la inestabilitat cromosòmica en les cèl·lules tumorals (Green *et al.*, 2005). Encara que s'ha d'investigar més el mecanisme a través del qual APC podria regular la transició metafase-anafase, es pot especular que les anomalies en la segregació cromosòmica relacionades amb APC han de ser acompanyades per una modificació de la maquinària

que té cura de la integritat del genoma. Això podria compensar la creixent inestabilitat genòmica i assegurar un avantatge en el creixement de les cèl·lules tumorals.

La inestabilitat genètica acompanya la progressió tumoral i d'aquesta manera assegura una bona taxa de variabilitat genètica per poder superar les barreres de la selecció (Cahill *et al.*, 1999). Aquesta hipòtesi també inclou la possibilitat d'un *feedback* negatiu que resulta de la CIN. Un altre mecanisme que s'ha publicat recentment (Hadjihannas *et al.*, 2006) que lliga la via de Wnt amb la inestabilitat cromosòmica en el càncer colorectal és a través de l'*axina2*. En aquesta tesi s'ha descrit que aquest gen es troba sobreexpressat en tumors de còlon. Els autors expliquen que *axina2* és també sobreexpressada durant la mitosi i que es localitza al fus mitòtic on s'uneix a la cinasa *polo-like 1*. Els nivells elevats d'aquesta proteïna, comprometen el *checkpoint* de mitosi. Resumint, s'ha descrit que canvis en gens relacionats amb mitosi, validats en una sèrie llarga de tumors colorectals humans proporcionen una evidència més de la implicació d'APC en la correcta unió del fus mitòtic i del seu posicionament i suporten el paper d'APC en l'aparició de la inestabilitat cromosòmica.

### Perfils d'expressió del càncer colorectal

Actualment, un dels camps que s'està desenvolupant més ràpidament en la recerca biomèdica és la tecnologia dels *microarrays*. L'elucidació de diferències en expressió entre alteracions histològiques diferents ens dona l'oportunitat d'identificar gens específics de malalties i de desenvolupar diagnòstics individualitzats i eines terapèutiques noves (Galamb *et al.*, 2005). Un dels estudis de *microarrays* més ben conegut i que més ha encoratjat els investigadors pels seus resultats prometedors en la classificació dels tumors, ha estat el d'Alizadeh (Alizadeh *et al.*, 2000). En aquest treball es va aplicar el *hierarchical clustering* per a identificar dues formes molecularment diferents de limfomes B que tenen bon i mal pronòstic. De manera que l'ús dels *microarrays* pot ajudar a classificar subtipus de càncer que són clínicament importants. Ja l'any 1987, Augenlicht va iniciar els estudis dels perfils d'expressió del càncer colorectal i va ser capaç d'identificar diferències en els patrons d'expressió de la mucosa normal, de l'adenoma i del carcinoma (Augenlicht *et al.*, 1987). Aproximadament deu anys més tard, Alon i col·laboradors varen ser els primers a utilitzar una plataforma que contenia representacions de tot el genoma per a l'estudi



d'una sèrie llarga de mostres de càncer colorectal i varen demostrar clarament que els perfils d'expressió dels tumors colorectals són diferents de la mucosa normal (Alon *et al.*, 1999). A partir de llavors s'ha aplicat aquesta tecnologia amb diferents objectius.

Els primers treballs que es varen publicar aplicant la tecnologia dels *microarrays* a la recerca en CCR pretenien trobar diferències entre el carcinoma i el teixit normal del còlon (Backert *et al.*, 1999, Croner *et al.*, 2005, Kitahara *et al.*, 2001, Notterman *et al.*, 2001, Okuno *et al.*, 2001, Saito *et al.*, 2002, Williams *et al.*, 2003) de manera que descrivien gens desregulats en CCR. Més recentment, han aparegut treballs que intenten trobar diferències pel que fa a estadi, metàstasi (Agrawal *et al.*, 2002, Bandres *et al.*, 2004, Bertucci *et al.*, 2004, Birkenkamp-Demtroder *et al.*, 2002, Chiu *et al.*, 2005, Frederiksen *et al.*, 2003, Kwon *et al.*, 2004, Li *et al.*, 2004, Zou *et al.*, 2002), presència d'instabilitat de microsatèl·lits, localització (Bertucci *et al.*, 2004, Birkenkamp-Demtroder *et al.*, 2005, Chiu *et al.*, 2005, Zou *et al.*, 2002) i pronòstic (Wang *et al.*, 2004).

En aquesta tesi s'ha pogut mostrar que els adenomes i els carcinomes que s'originen en un mateix malalt són extraordinàriament semblants a nivell transcriptòmic. La majoria dels canvis detectats entre el teixit normal i els adenomes i carcinomes són pèrdues d'expressió i només uns pocs, però rellevants, són sobreexpressats.

En aquesta tesi, l'anàlisi estadística aplicada a l'estudi de mostres de CCR ha proporcionat dades que permeten trobar canvis amb molts pocs falsos positius, tal i com es pot constatar amb el FDR. Per tant, s'han generat dades de qualitat que poden donar lloc a la troballa de bons marcadors per al diagnòstic. S'han pogut validar aquests canvis a través de la bibliografia i per la validació experimental amb la PCRq. A continuació es descriuen una sèrie de canvis trobats que s'han considerat interessants i que han estat descrits anteriorment en la bibliografia. Cal destacar, però, que les dades més interessants que ha proporcionat aquest estudi són els canvis no descrits prèviament en la bibliografia i que poden donar noves pistes de les vies i gens implicats en la carcinogènesi colorectal. Com s'ha comentat abans, aquests canvis són altament fiables pel tipus d'anàlisi estadística que s'ha aplicat. Malauradament, aquests resultats d'alt interès no es poden mostrar en aquesta tesi, perquè en el moment actual estan encara en el procés d'avaluació de la propietat intel·lectual per a la possible creació de patents.

En la llista de gens que canvien entre els tumors (adenomes o carcinomes) i la mucosa normal, s'ha trobat que la **GUANILINA** és infraexpressada en adenomes i carcinomes. És una hormona que se secreta en l'epiteli intestinal. Steinbrecher i col·laboradors descriuen baixos nivells d'RNA de guanilina en adenomes d'humans i de models animals suggerint que és un marcador de transformació epitelial (Steinbrecher *et al.*, 2000). El mateix fet és observat en adenocarcinomes per Cohen *et al.* (Cohen *et al.*, 1998). Notterman *et al.* van treballar amb mostres de carcinomes de càncer colorectal d'un sol pacient i amb *microarrays* d'oligonucleòtids i també varen fer servir quatre adenomes per observar les diferències entre aquests dos teixits. Van detectar la guanilina com a infraexpressada en els tumors (Notterman *et al.*, 2001). Una família de gens que apareix recurrentment com a infraexpressada en càncer de còlon en els treballs de *microarrays* és la de l'**ANHIDRASA CARBÒNICA**, concretament els membres I, II i IV, que són els que s'han detectat en la llista de gens infraexpressats en adenomes i carcinomes. L'expressió de l'anhidrasa carbònica I, II (Augenlicht & Heerd, 2001, Birkenkamp-Demtroder *et al.*, 2005, Croner *et al.*, 2005, Williams *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 1997) i IV (Bertucci *et al.*, 2004, Birkenkamp-Demtroder *et al.*, 2002, Birkenkamp-Demtroder *et al.*, 2005, Croner *et al.*, 2005, Chiu *et al.*, 2005, Notterman *et al.*, 2001) es va trobar disminuïda en el CCR. La baixa expressió de l'anhidrasa carbònica I en el càncer colorectal es correlaciona amb el grau d'invasió vascular i amb un pronòstic dolent (Mori *et al.*, 1993). Un altre dels gens que es troba infraexpressat tant en adenomes com en carcinomes és l'**MMP28** (*matrix metalloproteinase-28*). La majoria de les MMPs clàssiques se sobreexpressen en situacions de carcinogènesi, ja que són necessàries per a la destrucció de la matriu extracel·lular en els processos d'invasió. En canvi algunes MMP com *MMP19*, *MMP26* i *MMP28* s'expressen de manera normal en l'intestí i, al contrari de la resta de MMP, es troben infraexpressades durant la transformació maligna i poden tenir un paper en l'homeòstasi dels teixits. Bister *et al.* examinen teixits normals, condicions d'inflamació i malignitat de l'epiteli colònic i troben que *MMP28* és infraexpressada en l'epiteli tumoral i no s'associa al procés inflamatori (Bister *et al.*, 2004).

La llista de gens infraexpressats és superior a la de gens sobreexpressats. Altres autors s'han trobat ja amb aquest fenomen en dades de *microarrays* de càncer colorectal (Croner *et al.*, 2005). La infraexpressió en CCR de molts gens responsables de la

diferenciació tissular pot indicar la regressió dels tumors en un estat pluripotent comparable al d'un organisme fetal.

Entre el gens sobreexpressats en el tumors respecte a la mucosa normal, s'hi ha trobat el gen **DIPEPTIDASA** (*DPEPI*) sobreexpressat en adenomes i carcinomes. El mateix resultat és detectat per McIver *et al.* usant *microarrays* per trobar marcadors de cèl·lules tumorals del còlon en sang. Troben que *DPEPI* és altament expressada en carcinomes del còlon comparat amb la mucosa normal (McIver *et al.*, 2004). Dins la llista de gens sobreexpressats, també s'hi troben gens que s'han pogut validar amb la tècnica de la PCRq i que es troben descrits a la bibliografia, tal és el cas de **C-MYC** i d'**AXINA2** dels quals hem parlat àmpliament més amunt. Es pot concloure que els gens que es troben alterats són gens que participen en diferents processos cel·lulars, la majoria dels quals han de tenir un paper important en el còlon normal i, en conseqüència, en la progressió tumoral i això ho podem constatar en molts casos a través de treballs publicats per diferents grups que exploren les funcions i el significat biològic d'aquests canvis.

També es va considerar interessant estudiar les diferències moleculars entre diferents estadis i localitzacions del tumor. Hi ha moltes evidències que els mecanismes de carcinogènesi poden ser diferents segons la localització del tumor. S'han demostrat diferències entre càncer de còlon localitzat al còlon dret i al còlon esquerre pel que fa a característiques moleculars, morfològiques i epidemiològiques (Campbell *et al.*, 1998). Els càncers que es formen al còlon dret i al còlon esquerre poden donar lloc a grups de tumors diferents a causa del seu origen embrionari diferent i de la diferent exposició a carcinògens. En aquest sentit és important destacar que hi ha diferències entre còlon dret i esquerre quant a l'edat d'aparició i al sexe. El càncer del còlon dret és més freqüent en homes i el càncer de còlon esquerre és més freqüent en dones (Distler & Holt, 1997). No s'han trobat diferències en la distribució dels estadis de Dukes o en la mortalitat entre els càncers de còlon dret o esquerre. Hi ha alguns treballs que suggereixen que hi pot haver diferències moleculars en l'expressió entre les dues localitzacions. Kapiteijn *et al.* han demostrat que existeix una major expressió de p53 i  $\beta$ -catenina en el recte respecte a càncers proximals (Kapiteijn *et al.*, 2001). Fric *et al.* demostraren una expressió augmentada de *C-ERBB2*, *EGFR*, *PCNA* i *DPP IV* en el còlon dret respecte al còlon esquerre (Fric *et al.*, 2000). En les dades presentades en aquesta tesi, les majors diferències es troben entre còlon dret i esquerre tant en

adenomes com en carcinomes i en els estadis I-II i III-IV en els carcinomes situats al recte i còlon esquerre. Amb l'estudi de les variables clinicopatològiques s'ha constatat una vegada més que la majoria de les alteracions apareixen en l'estadi d'adenoma i es mantenen en el carcinoma. Això mateix ha estat apuntat en algunes publicacions com la de Birkenkamp-Demtroder *et al.* (Birkenkamp-Demtroder *et al.*, 2002) on diuen que la majoria dels gens alterats coneguts que troben (70%) canvien entre el teixit normal i els tumors menys avançats (Dukes A). Pocs gens, a part d'aquests que ho fan al principi, canvien al llarg de la progressió pels diferents estadis de Dukes. Això indica que les propietats bàsiques de les cèl·lules tumorals s'adquireixen en les primeres etapes i en la progressió hi ha canvis menors, segurament aquells que afecten els components de l'estroma (Liotta & Kohn, 2001). Des d'un punt de vista terapèutic aquest fet és important perquè els mateixos gens alterats són presents en totes les etapes de la progressió.

L'anàlisi de GO terms va assenyalar la implicació de diferents mecanismes cel·lulars en els tumors colorectals, entre els quals es troben els gens de l'homeòstasi del core. Alguns dels gens d'aquesta categoria ja han estat prèviament identificats com a implicats en càncer colorectal en tres estudis previs (Birkenkamp-Demtroder *et al.*, 2002, Kim *et al.*, 2004, Lin *et al.*, 2002).

Finalment i per tal d'aprofundir una mica més quin paper podria tenir l'activació constitutiva de la via WNT/ $\beta$ -catenina en la transició adenoma-carcinoma es va explorar quina proporció dels gens diferencialment expressats podien estar regulats per la senyalització activa WNT/ $\beta$ -catenina. El fet que més d'un terç dels gens continguin presumptes llocs d'unió per als factors de transcripció TCF demostra, una vegada més, la importància d'aquesta via també en la transició adenoma-carcinoma.

### Discussió global

Encara que les síndromes hereditàries de càncer colorectal s'han fet servir com a instrument per a l'estudi de les bases genètiques d'aquest tipus de càncer, la seva contribució relativa al total del càncer colorectal és petita, només un 5% dels casos, i això indica que la majoria dels factors genètics que predisposen al càncer colorectal encara estan per descobrir.

Una estratègia potencial per a la prevenció dels adenomes colorectals i del càncer seria reduir la freqüència de mutacions somàtiques del gen *APC*. La recerca de quimioprevenció s'haurà de centrar a trobar agents modificadors que influèncin la funció de la proteïna. El nombre de mutacions que es produeixen entre un estat benigne i un estat metastàtic és molt més gran del que es pensava fins ara (Sjoblom et al., 2006). És clar que no hi ha cap model animal o *in vitro* que sigui capaç de recapitular l'escenari d'un tumor humà. S'hauran d'invertir molts esforços a fer metaanàlisis de les dades aportades pels diferents grups de recerca en càncer colorectal per poder entendre la complexitat del procés de carcinogènesi.

La via de Wnt té molts repressors, fet que indica que la via ha d'estar finament regulada. Aquesta idea es reforça pel fet que les mutacions que promouen l'activació de la via de forma constitutiva estan fortament implicades en l'inici i la progressió del càncer (Moon et al., 2004). Les mutacions de la via més ben estudiades són les que afecten mutacions heretades o esporàdiques del gen *APC*. Es requereix l'activació de  $\beta$ -catenina no només en l'inici, sinó en el manteniment de l'estat tumoral, cosa que podria significar que les teràpies que modulen aquesta via podrien ser efectives.

S'han començat a desenvolupar agents terapèutics per modular la via de Wnt. Aquestes aproximacions inclouen molècules petites inhibidores que bloquegen la interacció de  $\beta$ -catenina amb TCF (Lepourcelet et al., 2004), així com siRNA (Giles et al., 2003) i anticossos contra Wnts (He et al., 2004, You et al., 2004).

En un estudi amb 32 adenomes i 25 carcinomes Van der Flier et al. varen descriure 121 gens sobreexpressats entre els tumors i el teixit normal i 51 i 36 gens sobreexpressats només a adenomes i carcinomes respectivament (Van der Flier et al., 2007). Els gens individuals dins del grup de gens diferencialment expressats representen dianes prometedores per a la teràpia del CCR, ja que la seva expressió es troba activada per l'acció directa de mutacions en els components de la via.

La tecnologia dels *microarrays* és encara cara i relativament nova i la seva anàlisi estadística no està encara completament establerta. La sistematització dels resultats dels *microarrays* provinents de diferents equips de treball és encara complicada. Per ser totalment comparables, s'haurien d'estandarditzar totes les passes del procés experimental i l'anàlisi de les dades. És difícil trobar marcadors de progressió, pronòstic, etc. de manera consensuada, ja que cada laboratori treballa amb una sèrie de mostres, sovint insuficientment extenses, i té els seus propis criteris de classificació,

el que fa que els diferents resultats siguin heterogenis i moltes vegades no comparables. Tal i com es descriu en l'excel·lent revisió de Cardoso i col·laboradors, encara que les categories funcionals a les quals pertanyen els gens alterats són comunes entre les diferents dades publicades, no es troba cap (o molts pocs) gen coincident (Cardoso *et al.*, 2007).

Es pensa, però, que en un futur quan les alteracions a nivell genètic i epigenètic siguin ben conegudes, la tecnologia dels *microarrays* es podrà fer servir en la pràctica clínica diària, a part dels mètodes de diagnòstic clàssics. La definició de perfils d'expressió específics pot ajudar a una prevenció més eficient i a una detecció precoç de formes hereditàries del CCR.

Els resultats descrits en els tres capítols d'aquesta tesi donen lloc al concepte global que és en les lesions benignes del còlon, els adenomes, ja siguin de pacients de FAP com de càncer colorectal esporàdic, on s'acumulen gran nombre d'alteracions genètiques que afecten mecanismes molt diversos del funcionament cel·lular. Totes les alteracions detectades permeten la progressió tumoral ja que afecten la proliferació, la mitosi i moltes altres funcions importants per a la cèl·lula. El coneixement de les alteracions moleculars que afecten els adenomes és important per proporcionar més evidències dels mecanismes moleculars i cel·lulars implicats en els primers estadis de la progressió tumoral i donar lloc a noves estratègies de diagnòstic precoç i teràpies preventives, tan importants en la lluita contra el càncer.