



Biomarcadors en càncer colorectal hereditari: aplicacions clíniques i estudi de la dinàmica tumoral

Mireia Gausachs Romero

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**BIOMARCADORS EN CÀNCER COLORECTAL
HEREDITARI: APLICACIONS CLÍNiques I
ESTUDI DE LA DINÀMICA TUMORAL**

Mireia Gausachs Romero

Barcelona, 2014



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Institut Català d'Oncologia



Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge

BIOMARCADORS EN CÀNCER COLORECTAL HEREDITARI: APLICACIONS CLÍNIQUES I ESTUDI DE LA DINÀMICA TUMORAL

Memòria presentada per **Mireia Gausachs Romero**

Per optar al Grau de **Doctora per la Universitat de Barcelona**

Tesi realitzada sota la direcció del **Dr. Gabriel Capellà Munar**

al Institut Català d'Oncologia

del Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge

(ICO-IDIBELL)

Tesi adscrita a la Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona **(UB)**

Programa de Doctorat en Biomedicina

Tutor: **Dr. Oriol Bachs Valldeneu**

Dr. Gabriel Capellà Munar
Director

Dr. Oriol Bachs Valldeneu
Tutor

Mireia Gausachs Romero
Doctoranda

Barcelona, 2014

Als meus pares

A la meva germana

A la meva àvia

Al Jordi

AGRAÏMENTS

Ha arribat el moment d'obrir el cor i deixar constància per escrit com d'agraïda estic a tots vosaltres. Sense el vostre suport, comprensió, ànims i empenta res de tot això hauria estat possible. Mil gràcies a tots.

Gabi, et vull agrair de tot cor que ho hagi fet possible. Vas ser tu qui em va donar la oportunitat de fer la tesi. Qui va cavil·lar les arrels d'aquesta feina. Qui em va dir: "necessitaràs un casc, perquè ens la fotrem, segur". I només va caldre escoltar aquestes paraules per engrescar-me encara més. Vas ser tu qui em va proposar un dia: "Ara pensa què més podem fer". I allò va significar una gran passa en aquest camí personal. Tu em vas oferir una estada a Michigan i sempre t'agrairé que em regalessis aquella experiència. D'allà sempre recordaré una conversa que em va fer veure que tot i que ets la persona més ocupada de la Terra i sembla que sempre estàs lluny, hi ets, saps com som i saps què dir-nos perquè no caiguem en el desànim. Has estat tu qui m'ha acompanyat fins el darrer moment. Ha estat un plaer compartir amb tu totes les converses de ciència, de les pors, dels dubtes, de la meua ciència ficció, de la vida, del reconeixement, de la família, de les Ducati, dels descapotables vermells, del poder, dels inicis i dels finals. El que sé segur és que sense tu no ho hauria fet. Gràcies per regalar-me tot això.

Gracias Sara por ayudarme en cada momento. Has sido uno de mis pilares en el laboratorio. Siempre has tenido un ratito para darme consejos sobre ciencia, sobre la vida, para darme paz y animarme. Gracias por escucharme, por creer en mí, por darme todo tu apoyo, cariño y amistad ¡¡Y por coger una pipeta por mí!!! A la Conxi per tots els consells, pel suport que m'has donat, per les xerrades al despatx, pels grans moments que hem compartit fent ciència i fent grup. Gràcies per totes les paraules d'amiga que m'has regalat i pels missatges rebuts. Gràcies pels brindis que hem compartit i, m'avanço, i t'agraeixo els que resten per arribar. A la Marta per acompanyar-me al llarg d'aquest camí animant-me i guiant-me sempre. Gràcies per "adoptar-me" científicament, per explicar-me sempre les coses amb claredat i per la paciència que sempre has demostrat.

A Jesús y a Juani, por todos los consejos que me habéis dado. He aprendido muchísimo de vosotros. Siempre que he tenido un problema con un experimento me habéis escuchado y ayudado. Habéis disfrutado de cada triunfo y me habéis apoyado cuando las cosas no acababan de salir. Hemos compartido todos estos años juntos, como una piña (Vane, tú también). Muchas gracias a los dos por lo vivido y por lo que nos queda por compartir.

Al Dani, per tot el suport, pels teus consells i per fer les coses sempre senzilles. Per totes les bones estones que hem compartit parlant de ciència, parlant de mètodes i estratègies. Per tots els ànims que sempre m'has donat, que no han estat pocs. A la Mir, a la Mireia Morell i a la Nònia per tot el suport que m'heu donat, consells i perquè sempre us heu interessat per mi. *A Laura Valle, por nuestras conversaciones. Sin duda, he aprendido mucho de la pasión y dedicación que sientes por esta profesión.* A la lolanda, per tot el suport que m'has donat i per ajudar-me sempre.

A l'Anna, per ser la primera persona que em va guiar al laboratori. Gràcies perquè sempre mostres molt d'interès en voler aprendre coses noves. Per ajudar-me i per tenir sempre una abraçada per mi (cactus!!). *A todas las chicas de diagnóstico por toda la ayuda y cariño que me habéis dado. A Carol por ser tan dulce y tener siempre una sonrisa que regalar. A Olga por ser todo corazón y darme grandes momentos. A Eva Montes por ser tan buena compañera siempre mostrando disponibilidad para ayudar. A Raqui por su fuerza y sus consejos. A Susana, por ser tan risueña, por su ayuda y por todos los momentos compartidos. A Mónica y Anabel por tener siempre una buena palabra y por ser unas luchadoras.* A la Gemma Aiza, per tots els moments i consells que m'has donat.

Als meus ninos, els doctorands d'ahir i d'avui. A l'Ester Castellsagué per haver-me donat tant, consells, moments inoblidables i suport des de la proximitat i la llunyania. Ets pura força i espero que tornis aviat per poder-te tenir aquí. A la Flipi, per haver-me ajudat i per la seva gran amistat. A la Nuria pel teu caràcter, per ser una apassionada de l'art en totes les seves dimensions i per sempre estar disposada a escoltar-te i donar-te una abraçada. Per aquells dies a Menorca, a casa teva amb la teva família, al paradís. Al Joan, moltes gràcies pel teu suport, per tota la teva proximitat, pel teu sentit de l'humor tan àcid i perquè es pot parlar amb tu de qualsevol cosa. Gràcies per ser un amic. *A Fernando, porque eres una persona de gran corazón. Por esas semanas en las que trabajamos codo con codo. Muchas gracias por enseñarme el vídeo de la cabra y por compartir las cosas que sólo te suceden a ti.* A la Borràs pel temps que vam compartir dins i fora del laboratori i pel suport que em vas donar. A la Suelen, per ser tal i com només tu ets, forta i independent. Sempre estàs disposada a donar un cop de mà, i això en un laboratori sempre s'agraeix. *A Gardenia por todo el apoyo que siempre me has dado. A Pili, muchas gracias por tu ayuda en el "labo", por tu simpatía, tu sentido del humor y por la fuerza que desprendes. A Thaisiña, gracias por estar siempre cerca, por nuestras conversaciones de futuros inciertos. Tenemos que seguir soñando. ¡¡¡Ya verás cómo lo conseguimos!!!* A Paco por sus ánimos y porque nunca dejarás de sorprenderme.

A Vanessita, por ser mi compañera, mi confidente y amiga dentro y fuera del laboratorio. Gracias por ayudarme en todos los pasos que he hecho, hasta el final. Porque siempre me has aconsejado y nunca te ha faltado una sonrisa. Porque las dos siempre hemos ido de la mano en este camino y porque, como no podía ser de otra manera, acabamos casi a la par. Ha sido un verdadero placer trabajar contigo Vane y es un placer ser tu amiga. Mi niña, muchas gracias por todo lo que me has dado, que ha sido mucho. Eres uno de los grandes regalos que me ha dado la tesis.

A l'Eva Tornero. Gràcies per ser la meva amiga, per ser tan compressiva, per entendre els meus silencis, per fer-me sentir tan especial i fer-me costat en tot aquest camí. Gràcies per saber com tractar-me, per trucar-me i donar-me senyals. Per fer-me costat quan m'han flaquejat les cames i per donar-me la mà per ajudar-me a tirar endavant. Gràcies per fer-me estimar tantes coses, entre elles la meva nova ciutat. Ets una persona meravellosa i no em cansaré mai de dir-t'ho. Gràcies.

Special thanks to Stephen Gruber and all your lab members in Ann Arbor, Michigan. I don't have enough words for thanking your warm welcome in the team, for teaching me and for sharing your knowledge. A Eduardo y M^a Dolores por vuestra ayuda tanto en el laboratorio como en el día a día en Michigan. A l'Ernest Nadal i a la Marta per adoptar-me durant la meva estada als EEUU. Moltes gràcies. A tots els meus amics que volten avui pel món, que vaig conèixer allà i que van fer que aquella experiència fos inoblidable.

A la gent de la Unitat d'Anatomia Patològica de Bellvitge, en especial al Xavier Sanjuan, a la M^a José Paulés, a la Mar i a l'Ester, per ajudar-me en el moment de la recollida de les mostres i pel suport quan vaig anar a fer microdissecció. A tots els membres que conformen la unitat de Consell Genètic, per tota la feina duta a terme i que és la base d'aquesta tesi. A l'equip del Pla Director de l'ICO, en especial a la Julieta Corral. *Gracias por tu ayuda, por ser tan cercana, y por tener la paciencia de explicármelo todo a la perfección.* Gràcies als bioestadístics, Víctor Moreno i al seu equip. En especial vull agrair l'ajuda que m'han donat la Llúcia, l'Eli i a l'Adriana. *A las chicas de Plataformas, Vane y Mon, por esas jornadas de Fluidigm ¡¡¡a tope!!!*

A la gent de LRT1 (IPS, postdocs, predocs i secres) que han compartit amb mi moments durant aquests anys, en el laboratori i fora d'ell. *Quiero agradecer a Alberto Villanueva, por enseñarme a trabajar con los ratones y por tus consejos.* A l'Oriol Casanovas, per aquella primera entrevista, pels consells i pel suport en les comissions de seguiment. Vull agrair a tots els predocs i postdocs de LRT1 amb qui he passat molt bons moments. A l'Oriol Bachs per ser el meu tutor. *A Puri Muñoz por*

adoptarme el año que Gabi se fue lejos. A la gente de HPV y a Virginia Nunes, por acogerme en sus laboratorios.

Gràcies a la gent de l'IMPPC. Gràcies Edu pels teus consells metodològics, pel suport i pel teu tarannà. Al Carles i a l'Ernest per ser tan especials, per les xerrades que hem compartit sobre ciència i sobre la vida.

A mis amigas de la Universidad, por sus ánimos y apoyo. En especial quiero agradecerles a Susana y a Anna que estén siempre a mi lado regalándome tantas cosas. A Susana por explicarme como hacer un HCA con R. Gracias por tus consejos y por echarme una mano en todos los aspectos de la vida. A l'Anna, que tot i estar a Madrid, mai he notat que la distancia ens allunyes. Gràcies per tot el suport i amor que em dones. Gracias a las dos. A les nenes del col·le (la Jèss, la M^a Àngels, la Marta, la Claudia i l'Estela, i respectius) per fer-me costat. Gràcies per donar-me tantes tones d'amor i ànims. Gràcies a la resta d'amics que m'han donat suport.

A los padres de Jordi, Maribel y Juan, y a sus hermanos, Juanan y Aritz. Gracias por toda vuestra ayuda, por entenderme y quererme tanto.

Als meus pares perquè sense ells jo no hauria fet res de tot això. Gràcies per tot l'amor que em doneu. Perquè sou el meu exemple a imitar doncs sempre heu estat uns lluitadors. Gràcies per ensenyar-me a estimar, a decidir, a somiar i enfrontar-me a les meves pors. Sou els millors pares del món. *A mi hermana Laura por ser una de las mejores personas que conozco, por sus ánimos y paciencia.* Gràcies al meu cunyat Jordi i als meus nebots (Jordi, Marc i Sergi). *A mi abuela Teresa, por cuidarme, educarme, regañarme y quererme. Siempre te echaré de menos.*

Finalmente, gracias Jordi. Por darme todo tu amor y por creer fervientemente en mí. Por entender lo importante que este proceso es para mí. Por apoyarme siempre durante todo este camino, los días soleados y los más oscuros. Gracias porque sin ti no podría haber acabado. Por aguantar estoicamente esta recta final a mi lado, por aguantar mis silencios y mis nervios. Gracias por ser la alegría de mis días, por enseñarme tantas cosas y por cada una de las carcajadas que me has arrancado. Gracias por cogerme de la mano. Cuando estamos juntos nada puede frenarnos... Gracias por quererme tanto y por lo feliz que me haces sentir cada día.

ÍNDEX

ABREVIATURES I ACRÒNIMS	i
INTRODUCCIÓ	1
1. <i>El càncer</i>	3
1.1. Epidemiologia	3
1.2. Bases moleculars del càncer	4
1.3. Origen de la carcinogènesi	7
1.3.1. La hipòtesi de l'evolució clonal	7
1.3.2. Model estocàstic i cèl·lules mare del càncer	9
1.4. Heterogeneïtat tumoral	10
2. <i>El càncer colorectal</i>	12
2.1. Epidemiologia	12
2.2. Etiologia i classificació dels tipus de càncer colorectal	13
2.2.1. CCR esporàdic	15
2.2.2. CCR familiar	15
Diferenciar entre CCR esporàdic i familiar	16
2.2.3. CCR hereditari	16
2.3. Consell genètic	17
2.4. Estadiatge i clínica del càncer colorectal	17
2.5. Anatomia i histologia del còlon i recte	20
2.6. L'epiteli intestinal i les criptes intestinals	21
2.7. El nínxol de cèl·lules mare intestinals	22
2.8. Origen de la progènie en la cripta i regió d'amplificació transitòria	24
2.9. Plasticitat de les cèl·lules de la cripta	26
2.10. Els senyals de WNT són essencials pel manteniment de les criptes	27
2.11. Altres vies que també juguen un paper important en la cripta	30
3. <i>Origen del càncer colorectal</i>	31
3.1. Quan es trenca la fidelitat genètica en la cripta del còlon	33
3.2. Bases moleculars de la carcinogènesi colorectal	37
3.2.1. Via de la inestabilitat cromosòmica (CIN)	38
APC	39
KRAS	41
3.2.2. La via de la inestabilitat dels microsatèl·lits (MSI)	43
3.2.3. Via del fenotip metilador d'illes CpG (CIMP)	45
Mutació de <i>BRAF</i> i hipermetilació del promotor d' <i>MLH1</i>	46
3.2.4. Els estudis genòmics d'alt rendiment validen aquestes vies	48
4. <i>Descripció dels tipus de CCR hereditari més freqüents</i>	51
4.1. Poliposi adenomatosa familiar (FAP) i atenuada (AFAP)	51
4.2. Poliposi associada a <i>MUTYH</i> (MAP)	54
4.3. Síndrome de Lynch (LS)	56

Índex

4.3.1. Els gens MMR	58
4.3.2. Espectre mutacional	59
4.3.3. Síndrome del dèficit constitucional de reparació MMR (CMMR-D)	60
5. <i>Selecció de les famílies candidates per l'estudi dels gens MMR</i>	60
5.1. Criteris clínics	61
5.2. Cribratge molecular	63
5.2.1. Estudi de la MSI	63
5.2.2. Estudi de l'expressió de proteïnes del sistema MMR	64
5.2.3. Cribratge Universal	64
5.2.4. Refinant la selecció: hipermetilació del promotor del gen <i>MLH1</i> i la detecció de la mutació V600E en el gen <i>BRAF</i>	65
5.3. Algoritme diagnòstic de la síndrome de Lynch	67
5.4. Estudi del cost efectivitat	68
HIPÒTESI	71
OBJECTIUS	75
RESULTATS	79
<i>ARTICLE 1: "MLH1 promoter hypermethylation in the analytical algorithm of Lynch syndrome: a cost-effectiveness study"</i>	83
<i>ARTICLE 2: "Nanofluidic digital PCR for KRAS mutation detection and quantification in gastrointestinal cancer"</i>	105
<i>ARTICLE 3: "Genetic background influences intratumoral and intracrypt heterogeneity in early colorectal tumorigenesis"</i>	127
DISCUSSIÓ	177
SUMARI	203
CONCLUSIONS	207
BIBLIOGRAFIA	211
ANNEXES	253
ANNEX I: PUBLICACIÓ ADDICIONAL	255
<i>ARTICLE 4: "The ADAMTS12 metalloprotease gene is epigenetically silenced in tumor cells and transcriptionally activated in the stroma during progression of colon cancer"</i>	257
ANNEX II: INFORME DEL DIRECTOR	267

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

AFAP	poliposi adenomatosa familiar atenuada; de l'anglès, <i>attenuated familial adenomatous polyposis</i>
APC	de l'anglès, <i>adenomatous polyposis coli</i>
BER	sistema de reparació per escissió de base; de l'anglès, <i>base excision repair</i>
BRAF	de l'anglès, <i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
CBCC	cèl·lules columnars de la base de la cripta; de l'anglès, <i>crypt base columnar cells</i>
CCR	càncer colorectal
CIMP	via del fenotip metilador d'illes CpG; de l'anglès, <i>The CpG island methylator phenotype</i>
CIN	inestabilitat cromosòmica; de l'anglès, <i>chromosomal instability</i>
CMMR-D	síndrome de dèficit constitucional de reparació MMR; de l'anglès, <i>Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome</i>
CSC	cèl·lules mare del càncer; de l'anglès, <i>cancer stem cells</i>
DNA	àcid desoxirribonucleic; de l'anglès, <i>deoxyribonucleic acid</i>
Dvl	de l'anglès, <i>Disheveled</i>
EGFR	de l'anglès, <i>epidermal growth factor receptor</i>
FAP	poliposi adenomatosa familiar; de l'anglès, <i>Familial adenomatous polyposis</i>
FFPE	mostres de teixit fixades en formol i incloses en parafina; de l'anglès, <i>formalin fixed paraffin embedded tissue</i>
GWAS	estudis d'associació de tot el genoma, de l'anglès, <i>Genome-wide association study</i>
HNPCC	càncer colorectal hereditari no associat a poliposi; de l'anglès, <i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>
ICO	Institut Català d'Oncologia
IHC	immunohistoquímica; de l'anglès, <i>immunohistochemistry</i>
KRAS	de l'anglès, <i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LGR5	de l'anglès, <i>Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5</i>
LOH	pèrdua d'heterozigositat; de l'anglès, <i>loss of heterozygosity</i>
LOVD	de l'anglès, <i>Leiden Open Variation Database</i>
LRC	cèl·lula mare de la posició +4 de la cripta de retenció de l'etiqueta; de l'anglès, <i>label-retaining cell</i>
LS	síndrome de Lynch; de l'anglès, <i>Lynch syndrome</i>
MAP	poliposi associada al gen <i>MUTYH</i> ; de l'anglès, <i>MUTYH associated polyposis</i>
MCR	regió d' <i>APC</i> anomenada de l'anglès, <i>mutation cluster region</i>
<i>MLH1</i>	de l'anglès, <i>mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)</i>
MLPA	amplificació depenent de lligasa de múltiples sondes; de l'anglès,

Abreviatures i acrònims

	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MMR	sistema de reparació de desaparellaments erronis produïts durant la replicació del DNA; de l'anglès, <i>mismatch repair</i>
MSH2	de l'anglès, <i>mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)</i>
MSH3	de l'anglès, <i>mutS homolog 3 (E.Coli)</i>
MSH6	de l'anglès, <i>mutS homolog 6 (E.Coli)</i>
MSI	inestabilitat dels microsatèl·lits; de l'anglès, <i>microsatellite instability</i>
MSI-H	inestabilitat de microsatèl·lits elevada; de l'anglès, <i>microsatellite instability high</i>
MSI-L	inestabilitat de microsatèl·lits baixa; de l'anglès, <i>microsatellite instability low</i>
MS-MCA	Anàlisi de corbes de fusió específiques de metilació; de l'anglès, <i>Methylation-specific melting curve analysis</i>
MS-MLPA	MLPA específic de metilació ; de l'anglès <i>methylation-specific MLPA</i>
MSP	PCR específica de metilació; de l'anglès, <i>Methylation-specific PCR</i>
MSS	sense inestabilitat de microsatèl·lits; de l'anglès, <i>microsatellite stable</i>
NF1	Neurofibromatosi tipus 1
NGS	seqüenciació de nova generació; de l'anglès, <i>next generation sequencing</i>
PI3KCA	de l'anglès, <i>phosphatidyl inositol 3-kinase catalytic subunit</i>
PMS1	de l'anglès, <i>PMS1 postmeiotic segregation increased 1 (S. cerevisiae)</i>
PMS2	de l'anglès, <i>PMS2 postmeiotic segregation increased 2 (S. cerevisiae)</i>
RNA	àcid ribonucleic, de l'anglès, <i>ribonucleic acid</i>
RPA	de l'anglès, replication protein A
SMAD4	de l'anglès, <i>SMAD family member 4</i>
SNuPE	de l'anglès, Single nucleotide primer extension analysis
STR	de l'anglès, <i>short tandem repeats</i>
TA	compartiment de cèl·lules d'amplificació transitòria; de l'anglès, <i>transit amplifying</i>
TP53	de l'anglès, <i>tumor protein p53</i>
WT	de l'anglès, <i>wild type</i>

INTRODUCCIÓ

1. EL CÀNCER

El càncer, és una patologia molt freqüent en l'ésser humà, però al contrari del que pot semblar, no és una malaltia moderna, doncs hi ha evidències de la seva existència segles enrere. El càncer, juntament amb les malalties cardiovasculars, són les principals dolències i causes de mort en la vellesa. L'augment d'incidència de les malalties cròniques van ser realment comunes només durant les últimes etapes del segle passat, doncs una gran proporció de persones va començar a viure més enllà de la setena, vuitena i novena dècada de vida. Paral·lelament, aquest increment en la incidència també s'explica per un augment en les exposicions a agents etiològics i la millora en el camp del diagnòstic clínic.

1.1. Epidemiologia

Segons estimacions fetes l'any 2008 el càncer és la primera causa de mort en els països econòmicament desenvolupats i la segona en països que estan en vies de desenvolupament (Ferlay, et al., 2010). Els tipus de càncers més prevalents són el de pulmó, mama i el càncer colorectal (CCR) mentre que els que provoquen una major mortalitat són els de pulmó, càncer d'estómac i càncer de fetge. La taxa d'incidència de tots els càncers en els països econòmicament desenvolupats és, gairebé, dues vegades més elevada que en els països en vies de desenvolupament econòmic, tant en homes com en dones, mentre que la taxa de mortalitat per a tots els càncers tendeix a ser similar entre els països desenvolupats i els que estan en vies de desenvolupament. (Jemal, et al., 2011). A part dels futurs canvis en la incidència, les projeccions que tenen en compte el creixement demogràfic i l'envelliment indiquen que la detecció de nous casos de càncer a tot el món augmentarà dels 12,6 milions estimats l'any 2008 fins a 21,4 milions l'any 2030 (Soerjomataram, et al., 2012).

A Espanya les estimacions més actuals, corresponents a les de l'any 2012, revelen una incidència de càncer de gairebé 215.530 casos i una mortalitat d'uns 102.760 casos (Ferlay, et al., 2013). En els homes, la incidència de càncer més freqüent va ser el de pròstata, seguit del de pulmó i CCR. Els tipus de càncer amb més mortalitat associada als homes van ser el de pulmó, seguit del CCR. Entre les dones, la incidència més elevada va correspondre al càncer de mama, seguit pel CCR i pel

de cos uterí, mentre que la causa de mort més comuna per càncer va ser pel de mama i pel CCR (Figura 1).

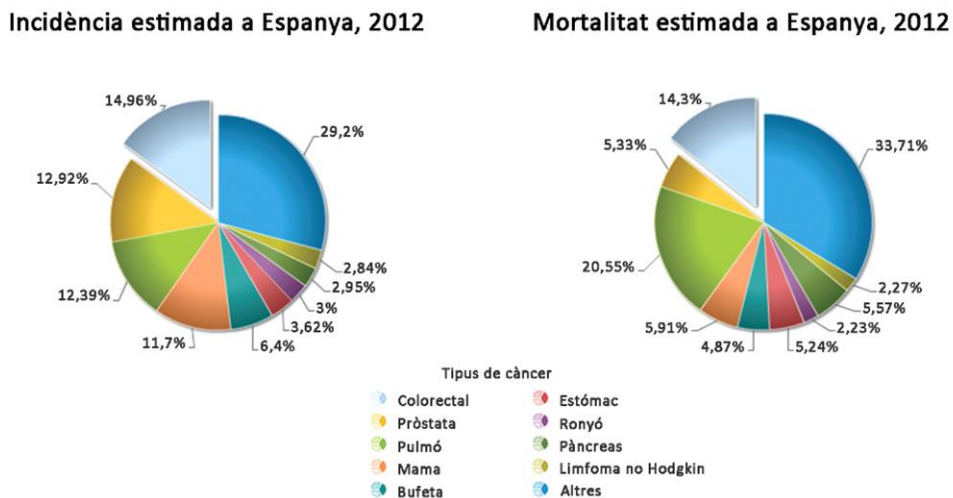


Figura 1. Incidència i mortalitat estimada dels diferents tipus de càncers en ambdós sexes a Espanya l'any 2012. Adaptat de Ferlay, et al., 2013.

1.2. Bases moleculars del càncer

Les característiques de la cèl·lula neoplàsica són l'autoinsuficiència en senyals de creixement positives, la inestabilitat a senyals d'inhibició del creixement, l'evasió de l'apoptosi, el potencial replicatiu il·limitat, el manteniment de l'angiogènesi que permet crear un micromabient (que conté, a part de vasos sanguinis, estroma i cèl·lules immunes), la desregulació energètica, l'evasió del sistema immune, la inflamació i la capacitat d'invasió local o producció de metàstasis a distància (Figura 2), (Hanahan i Weinberg, 2000; Hanahan i Weinberg, 2011). Es postula, per tant, que en les cèl·lules tumorals existeix un trencament de l'equilibri que resulta en l'acumulació de múltiples mutacions que les condicionen, el que es coneix com a fenotip mutador (Loeb, et al., 1974) o inestabilitat genètica, que pot originar-se, bé al llarg de tot el procés de la progressió tumoral (Loeb, et al., 2003) o bé en períodes concrets (Sieber, et al., 2005).

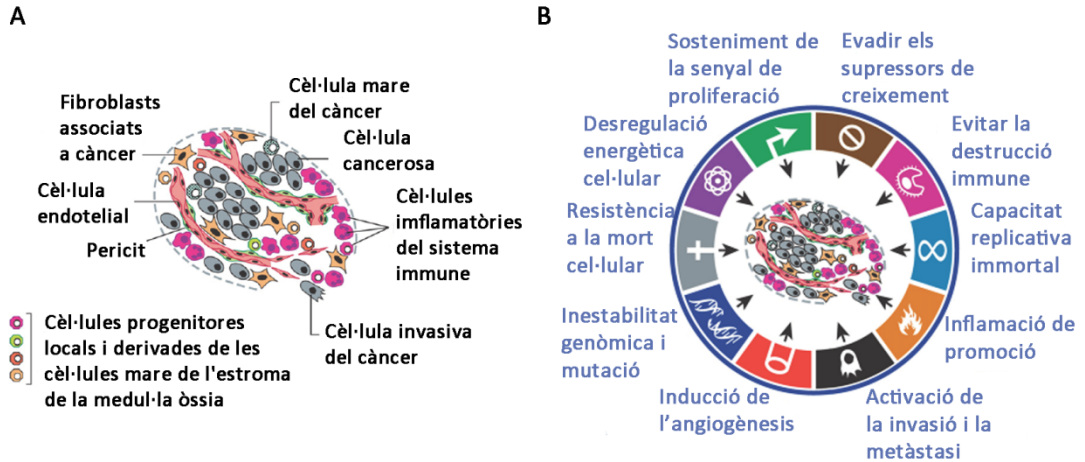


Figura 2. Característiques de la cèl·lula neoplàstica. A. Esquema dels tipus cel·lulars presents en el tumor. B. Capacitats adquirides del càncer. Adaptat de Hanahan i Weinberg, 2011.

La presència d'aquestes característiques és possible perquè al genoma de la cèl·lula es produeixen canvis en els anomenats gens del càncer que les condicionen. Els gens del càncer s'han classificat en tres tipus:

- Els oncogens: Són gens la funció dels qual, acostuma a estar relacionada amb la regulació de la proliferació cel·lular i el bloqueig de processos de la senescència i de la mort per apoptosi. La seva mutació provoca un canvi de l'estructura i la funció d'una proteïna normal, i genera una oncoproteïna (Hermsen, et al., 2002). En comparació amb la proteïna normal, les oncoproteïnes poden causar un augment en l'activitat, una pèrdua en la regulació, o bé un augment de la concentració provocant un guany de funció o una activació constitutiva que donarà lloc a un creixement descontrolat i un augment del potencial maligne de les cèl·lules. 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 selectiu pel creixement cel·lular. Exemples d'oncogens són *RAS*, *MYC*, *SRC*, *EGFR* i *CCND1*.

- Els gens supressors de tumors (*gatekeepers*): La seva funció principal és la de controlar la proliferació cel·lular i la inducció de l'apoptosi. En aquest cas, la seva alteració es manifesta amb caràcter recessiu, és a dir, que necessita que l'alteració es produeixi en ambdós al·lels del gen (*two hits*) per provocar una alteració que fenotípicament compromet la fisiologia de la cèl·lula (Knudson, 1971). Quan estan alterats en línia germinal són els responsables de les síndromes de predisposició hereditària al càncer. En les formes hereditàries inicialment un dels dos al·lels està

mutat en línia germinal i el que resta pot patir una mutació al llarg de la vida de l'individu. No obstant això, també s'ha reportat que, en certs casos, la inactivació de només un dels al·lels d'alguns gens supressors tumorals provoca la disminució en la quantitat de proteïna produïda, incrementant d'aquesta forma el risc a patir càncer (haploinsuficiència) (Santarosa i Ashworth, 2004). Exemples de gens supressors de tumors són *APC*, *TP53*, *SMAD4*, *SMAD2* i *DCC*.

- Gens estabilitzadors (*caretakers*): La mutació d'aquesta tercera classe de gens promou la tumorigènesi mitjançant l'acumulació d'alteracions en el genoma de la cèl·lula. Es creu, que més de 130 gens participen en els mecanismes de reparació del DNA en els éssers humans. Entre aquest estan els que s'encarreguen de reparar els petits errors que tenen lloc durant la replicació normal del DNA, els secundaris a l'exposició a agents mutagènics o els que reparen el dany que es produeix al llarg de la recombinació mitòtica i la segregació cromosòmica. Conseqüentment, quan aquests gens pateixen una alteració s'incrementa la taxa de les mutacions. En general, com en el cas anterior, és necessària la inactivació dels dos al·lels i, també a les síndromes de predisposició hereditària al càncer es troben alterats en heterozigosis (Friedberg, 2003). Els defectes en la reparació del DNA comporten, posteriorment, la inactivació de gens supressors de tumors o a l'activació d'oncogens. Alguns exemples d'aquests gens són *MLH1*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *PMS2*, *BLM*, i *BRCA1-2*.

L'aparició de les noves tecnologies moleculars i bioquímiques avançades, com xips d'expressió de gens i la seqüenciació de nova generació, han aplanat el camí per una millor comprensió del que succeeix a nivell molecular (Perou, et al., 2000; Verhaak, et al., 2010; Stephens, et al., 2012), fet que ha permès la separació en subtipus basada amb les diferències moleculars que tenen correlació amb variables clíniques. L'increment en la sensibilitat analítica ha permès detectar moltes modificacions genètiques i epigenètiques, així com les interaccions microambientals i, fins i tot, s'ha arribat a poder analitzar a nivell d'una única cèl·lula (Navin, et al., 2011).

Un tipus de càncer individual, pot albergar des d'un grapat de mutacions (Parsons, et al., 2011; Molenaar, et al., 2012) fins a centenars (Ding, et al., 2008). Aquesta diversitat sorprenent ha impulsat els esforços per definir els patrons i els conjunts de mutacions que contribueixen activament a la iniciació i la progressió de la malaltia (*driver mutations*), en comparació amb les que són simples acompanyants (*passenger mutations*), que no estan implicades directament a l'oncogènesi, però que tenen lloc i s'acumulen durant el desenvolupament del càncer.

Es considera que a la majoria dels càncers humans hi ha entre 2 i 8 alteracions seqüencials que es desenvolupen en el transcurs de 20 a 30 anys que serien claus pel seu desenvolupament. Cadascuna d'aquestes alteracions provoca un avantatge de creixement selectiu a la cèl·lula en la qual resideix. L'evidència fins ara, suggereix que hi ha ~140 gens implicats en el desenvolupament de tots els tumors, les mutacions intragèniques dels quals, contribueixen al càncer (anomenats com a gens *Mut-driver*). És probable, que hi hagi més gens (gens *Epi-driver*) que s'alteren exclusivament per mecanismes epigenètics i que també causen un avantatge de creixement selectiu, tot i que la identificació definitiva d'aquests gens ha estat un desafiament. Els gens *driver* funcionen a través d'una dotzena de vies de senyalització que regulen els tres processos cel·lulars bàsics: la determinació del destí cel·lular, la supervivència cel·lular i el manteniment del genoma.

En els tumors com el colorectal, el nombre de gens *driver* mutats és sovint de tres a sis, però hi ha diversos tumors on només s'han identificat fins ara una o dues alteracions *driver*. Aquests últims casos van en contra de la idea, àmpliament acceptada, que el desenvolupament i la progressió tumoral requereixen alteracions genètiques múltiples i seqüencials adquirides durant dècades. Aquest fet es pot explicar per dos motius. En primer lloc, les limitacions tècniques que fan que algunes regions del genoma no estiguin ben representades perquè les seves seqüències són difícils de cobrir, completar, capturar, o mapar de forma inequívoca al genoma (Mertes, et al., 2011; Beal, et al., 2012; Bottcher, et al., 2012; Ding, et al., 2012; Forster, et al., 2013). En segon lloc perquè, els tumors primaris contenen no només les cèl·lules neoplàsiques, sinó també a les cèl·lules de l'estroma que dilueixen el senyal procedent de la base mutada, reduint la probabilitat de trobar una mutació (Gundry i Vijg, 2012).

1.3. Origen de la carcinogènesi

L'origen del càncer i els mecanismes de la seva evolució, han estat motiu d'un ampli debat (Foulds, 1954; Nowell, 1976). S'han proposat varies teories per a descriure com s'origina el procés tumorogènic, la hipòtesi de l'evolució clonal, el model estocàstic i la teoria de les cèl·lules mare del càncer.

1.3.1. La hipòtesi de l'evolució clonal

El càncer és generat, clàssicament, per un procés de tres passos constituïts per la iniciació, la promoció i la progressió (Nordling, 1953; Knudson, 1971). La hipòtesi de la evolució clonal és una de les explicacions més plausible d'aquest desenvolupament i va ser proposada per primer cop per

Introducció

Peter Nowell (Nowell, 1976) i posteriorment desenvolupada per diversos grups (Michor, et al., 2003; Merlo, et al., 2006; Greaves, 2007; Greaves i Maley, 2012). Aquesta teoria explica com el desenvolupament neoplàsic és un procés microevolutiu a nivell somàtic, en el qual a partir de l'adquisició en una sola cèl·lula d'una sèrie de mutacions genètiques o epigenètiques, no reparades, i seguint els principis descrits per en Darwin, aquestes modificacions proporcionen un avantatge en la supervivència o en el creixement d'aquesta cèl·lula fent una expansió clonal. L'aparició de nous clons fruit de la inestabilitat genètica, o bé canvis epigenètics poden contribuir en l'expansió del tumor (Greaves, 2007; Mas, et al., 2010). Aquest procés és molt dinàmic i, en general, selecciona els clons que creixeran i dominaran el tumor a través d'un procés anomenat "escombrada selectiva" (*selective sweep*). Això es reitera en el temps a mesura que l'ecosistema del tumor evoluciona i acaba condicionant l'aparició de patrons clonals complexos (Figura 3), (Greaves i Maley, 2012).

No obstant, la dinàmica de l'evolució clonal que sustenta la carcinogènesi segueix sent poc coneguda. La comprensió de com es propaguen localment les mutacions dins d'una cèl·lula mare i la forma com les cèl·lules filles mutades es reparteixen en els teixits és crucial, com també ho és, entendre com es seleccionen els clons presents en les lesions premalignes que tenen més risc de conduir cap al càncer. El simple increment de la capacitat d'un clon no és equivalent a la producció d'un tipus de càncer, i en la majoria d'ocasions els processos queden avortats en un fenotip que no és maligne. Tals conceptes, s'apliquen, entre d'altres, en l'evolució dels adenomes colorectals (Thirlwell, et al., 2010).

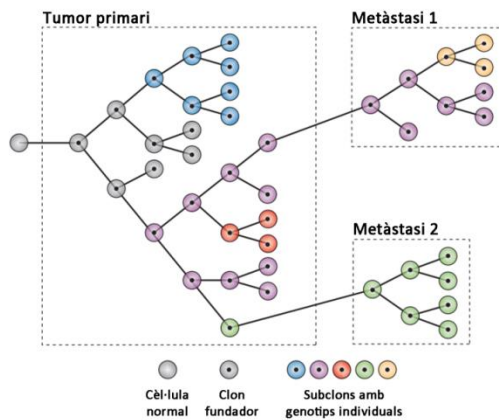


Figura 3. Representació esquemàtica de l'evolució clonal en els tumors primaris i metàstasis. El cercle gris representa una cèl·lula normal, i el punt central representa la mutació somàtica d'iniciació que impulsa el clon

fundador en el tumor. Els cercles de diferents colors representen subclons que han acumulat mutacions successives. En el tumor primari, diversos subclons coexisteixen, i encara que alguns s'expandeixen, altres romanen en estat latent o s'extingeixen. Les metàstasis poden originar-se en un clon expandit en el tumor primari (metàstasi 1), o a partir de clons de menor importància (metàstasi 2). Les metàstasis també poden sotmetre's a l'evolució clonal (com es mostra en la metàstasi 1). Adaptat de Caldas, 2012.

1.3.2. Model estocàstic i cèl·lules mare del càncer

S'han proposat dos models alternatius per explicar com s'inicien els tumors i com es desenvolupen. El primer, és el **model estocàstic** que proposa que les cèl·lules tumorals, tot i ser diferents entre sí, són equipotents i pràcticament totes elles podem funcionar com una cèl·lula fundadora de tumors, tot i que això pot ocórrer només en rars ocasions (Figura 4). L'altre és el **model jeràrquic**, i es basa en el fet que els tumors s'organitzen jeràrquicament amb un subconjunt de cèl·lules mare del cancer (CSC, *cancer stem cells*), les quals posseeixen la capacitat d'autorenovació i de diferenciació (Pierce i Dixon, 1959; Clarke, et al., 2006; Vermeulen, et al., 2008). Per tant, aquest model suggereix que els tumors s'organitzen d'una manera similar, tot i que de forma distorsionada, als seus teixits d'origen (Vermeulen, et al., 2012) (Figura 4).

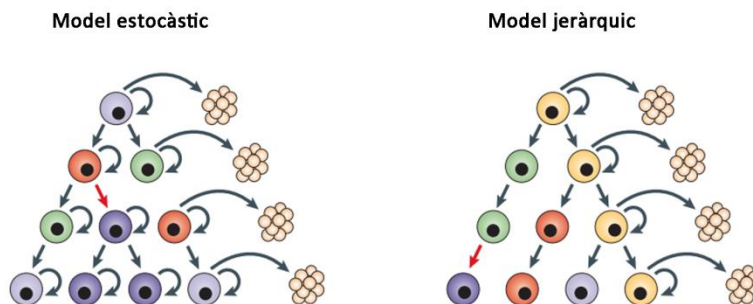


Figura 4. Representació del model estocàstic i jeràrquic per la formació del tumor. Figura adaptada de Reya, et al., 2001.

Durant molt de temps, s'ha observat que no totes les cèl·lules tumorals són idèntiques i que en alguns tipus de càncer, una proporció de les cèl·lules tumorals són més diferenciades que altres, el que va portar a suggerir que les cèl·lules tumorals no diferenciades són les CSC. Tot i que hi hagut molta controvèrsia a favor i en contra de l'existència d'aquestes cèl·lules (Medema i Vermeulen, 2011), molts investigadors consideren clau l'existència de CSC per explicar el creixement endogen de la neoplàsia (Chen, et al., 2012; Driessens, et al., 2012; Schepers, et al., 2012). De totes formes,

la identitat exacta de les CSC, en molts tumors, encara es discuteix (Medema, 2013), especialment a causa de la naturalesa imperfecta de les metodologies disponibles per avaluar les característiques d'aquestes cèl·lules.

Recentment, com explicarem més endavant en l'apartat "2.9. Plasticitat de les cèl·lules de la cripta", s'ha trencat un dogma generalitzat en la biologia que pressuposava que la cèl·lula diferenciada no podia revertir a cèl·lula mare (van Es, et al., 2012). L'evolució de l'estudi de la biologia de les CSC també està passant d'una estructura jeràrquica rígida a un model més flexible (Medema i Vermeulen, 2011; Vermeulen, et al., 2012) on les característiques d'aquestes CSC podrien ser adquirides mitjançant el canvi dels programes d'expressió gènica.

1.4. Heterogeneïtat tumoral

Avui en dia sabem que no només hi ha diferències genòmiques entre diferents tipus de càncer (amb les implicacions clíniques que comporta), sinó que també existeixen dins d'un càncer individual (heterogeneïtat intratumoral), (Figura 5). És evident que l'espectre de mutacions *drivers* entre càncers aparentment idèntics pot variar substancialment entre els pacients identificant nous subgrups i, fins i tot, que l'heterogeneïtat genètica entre les cèl·lules d'un tumor individual sempre existeix i pot afectar a la resposta terapèutica.

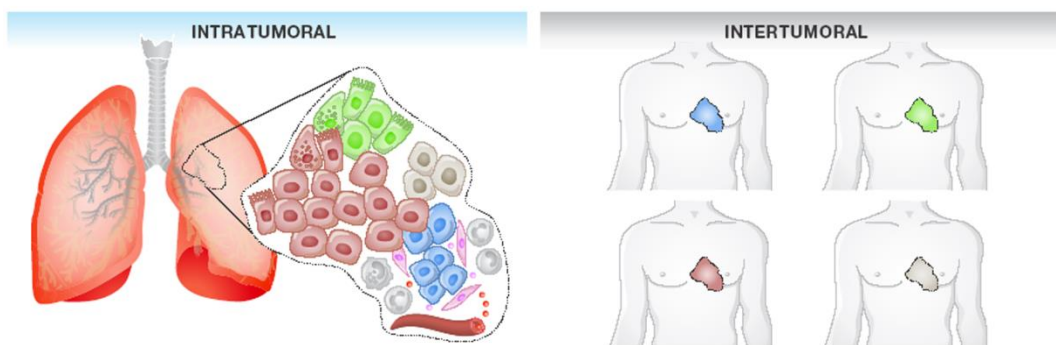


Figura 5. Representació de l'heterogeneïtat intratumoral i intertumoral. Adaptat de De Sousa, et al., 2013.

Els models de l'evolució clonal abans esmentats, el model estocàstic i els de les cèl·lules mare del tumor, no són mútuament excloents, sinó que, més aviat, són complementaris per a explicar el possible origen de la carcinogènesi i també podrien explicar fenòmens com el de l'heterogeneïtat

tumoral (Figura 6), (Vermeulen, et al., 2008). L'evolució clonal a partir d'alteracions genètiques i epigenètiques contribueix a l'aparició de l'heterogeneïtat de diferents poblacions incloent les CSC, ja que estan dotades amb la capacitat d'autorenovació. D'altra banda, aquestes CSC també poden ser una altra font d'heterogeneïtat, ja que poden ser l'origen dels nous llinatges de les cèl·lules tumorals.

Finalment, no es pot obviar el paper que juga en aquest procés el microambient del tumor que comprèn una àmplia varietat de cèl·lules no neoplàsiques, rodejades per les cèl·lules tumorals, que influeixen en les diverses etapes del desenvolupament del càncer. El microambient del tumor inclou fibroblasts associats al càncer, cèl·lules endotelials i una varietat de cèl·lules procedents de la infiltració immune, i que promouen l'heterogeneïtat del tumor de diverses maneres.

En el futur, l'estratègia de tractament més apropiat per a un pacient amb càncer s'hauria de basar en una avaluació dels components de la línia germinal del genoma del pacient i el del seu tumor. La informació dels estudis del genoma del càncer també es poden aprofitar per millorar els mètodes de prevenció i detecció precoç del càncer, el que serà essencial per reduir la morbiditat i la mortalitat d'aquesta malaltia (Vogelstein, et al., 2013).

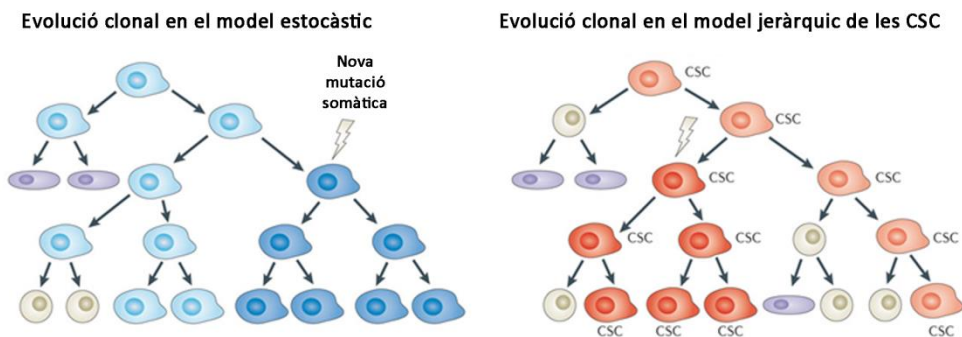


Figura 6. Representació de la combinació de l'evolució clonal amb el model estocàstic i jeràrquic. En ambdós models, les noves mutacions somàtiques poden generar la diversitat clonal, que augmenta encara més l'heterogeneïtat del tumor. Adaptat de Beck i Blanpain, 2013.

2. EL CÀNCER COLORECTAL

2.1. Epidemiologia

El CCR representa aproximadament el 9,4% del total de casos de càncer a tot el món i el 8% de totes les morts per càncer. A nivell mundial, és el tercer càncer més comú entre els homes i el segon en dones. En números absoluts s'estima que l'any 2008 es van diagnosticar més d'un milió de casos, dels quals el 60% van tenir lloc en regions desenvolupades. La incidència de CCR presenta una gran variabilitat geogràfica. Les taxes més altes s'observen a Austràlia, Nova Zelanda, Europa i Amèrica del nord, mentre que les més baixes són a l'Àfrica (excepte Sud-Àfrica) i al sud i centre de l'Àsia. Aquestes taxes estan augmentant ràpidament en diverses àrees històricament de baix risc, entre elles Espanya (Center, et al., 2009).

A Europa, el CCR és el segon tipus de càncer tant pel que fa a la incidència com a la mortalitat, amb 446.800 de casos diagnosticats i 214.670 morts estimades l'any 2012 (Ferlay, et al., 2013). Les taxes d'incidència i mortalitat per CCR són lleugerament més altes en els homes que en les dones.

A Espanya l'any 2012 s'estima que es van diagnosticar uns 32.240 casos de CCR i que van morir per aquesta malaltia unes 14.700 persones. Aquestes dades suposen el 14% de la incidència i mortalitat respecte al total de càncers a Espanya (Ferlay, et al., 2013). El CCR és el tercer càncer més freqüent en homes i el segon en dones, i és la segona causa de mort per càncer tant en homes com en dones (Figura 7), (Ferlay, et al., 2013).

En les projeccions fetes de cara un futur s'espera que la prevalença augmenti, a causa de les tendències demogràfiques i d'adaptació a l'estil de vida occidentalitzat (Karsa, et al., 2010).

Incidència i mortalitat estimada a Espanya, 2012

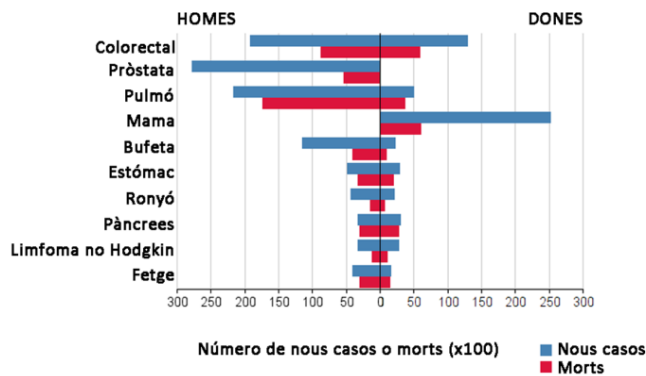


Figura 7. Incidència i mortalitat estimada dels 10 tipus de càncers més freqüents per cada sexe a Espanya a l'any 2012. Adaptat de Ferlay, et al., 2013.

L'augment de la incidència en regions concretes es creu que reflecteixen una combinació de factors que inclouen canvis en els hàbits alimentaris, obesitat i una major prevalença del tabac. Per una altra banda, la mortalitat és aproximadament la meitat que la incidència, sent menor en dones que en homes. Si bé aquestes taxes han disminuït en diferents països occidentals (Center, et al., 2009) per una millora en el tractament, una major sensibilització i detecció precoç (Chu, et al., 1994; Sant, et al., 2001; Mitry, et al., 2002; Edwards, et al., 2010), aquestes segueixen augmentant en molts països amb recursos més limitats i amb menys infraestructures sanitàries.

La supervivència relativa als 5 anys del tractament ha estat estimada en aproximadament el 50% dels casos tant a Europa com a Espanya (Adam, et al., 2010; Gatta, et al., 2013). Quan el CCR es detecta en estadis inicials, la supervivència augmenta fins al 90%, tot i això, només el 39% dels CCR es diagnostiquen en aquests estadis. Aproximadament el 20% dels pacients amb CCR tenen una malaltia metastàtica en el moment del diagnòstic (Cartwright, 2012).

2.2. Etiologia i classificació dels tipus de càncer colorectal

El CCR es considera una malaltia complexa causada per la interacció entre factors de risc extrínsecs, presents tant en l'ambient com per l'adopció d'un determinat estil de vida, i factors intrínsecs de susceptibilitat (genètics, epigenètics, processos inflamatoris, etc.) (de la Chapelle, 2004).

Els factors de risc extrínsecs inclouen la dieta, l'obesitat, el sedentarisme, el consum de carn vermella o processada, i el consum excessiu d'alcohol i tabac (Bagnardi, et al., 2001; Giovannucci, 2001; Norat, et al., 2002). L'evidència d'estudis han demostrat que les poblacions migratòries de baix risc cap a zones d'alt risc, veuen incrementada la incidència en CCR amb l'adopció de l'estil de vida i factors dietètics del país d'acollida (Johnson i Lund, 2007). Més del 50% de l'etiologia associada a CCR s'ha atribuït a la dieta i a l'estil de vida i, per tant, pot ser potencialment evitable mitjançant la modificació d'aquests factors (Johnson, 2004; Huxley, et al., 2009). Per una altra banda, hi ha nombrosos estudis on es descriuen els efectes beneficiosos de nombrosos aliments (com per exemple, els vegetals i la fibra), tot i que hi ha certes controvèrsies entre els diferents estudis (Trock, et al., 1990; Howe, et al., 1992; Friedenreich, et al., 1994; Kim, 2000).

L'edat i la predisposició genètica són els principals factors de risc no modificables per la malaltia. En general, el 90% dels nous casos i el 94% de les morts ocorren en persones majors de 50 anys, sent superior la taxa d'incidència en més de 15 vegades respecte els que tenen de 20 a 49 anys (Ries, et al., 2000; Myers, et al., 2013).

En la gènesi de la malaltia els factors genètics tenen molta incidència en la predisposició al CCR, en el seu inici i en la progressió. De fet, clàssicament es poden classificar els casos de CCR segons el grau d'agregació familiar en: esporàdics, familiars i hereditaris. Tot i que la majoria dels tumors, entre un 60%-85% (Winawer, et al., 1997; Burt, 2000), són majoritàriament secundaris a factors ambientals (els CCR esporàdics), entre un 15-20% restant agrupen els individus afectes que tenen una component familiar (els CCR familiars) i només entre un 1-5% d'aquests, hereten la predisposició a patir la malaltia (els CCR hereditaris) (Figura 8), (de la Chapelle, 2004).

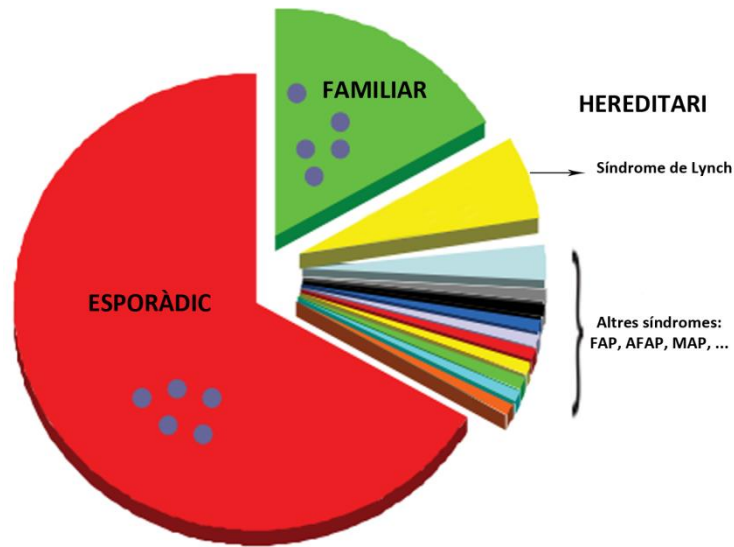


Figura 8. Classificació dels tipus de CCR en funció del patró d'herència. Adaptat de Lynch, et al., 2009.

2.2.1. CCR esporàdic

Els casos de CCR esporàdic són aquells que no tenen un patró hereditari demostrat (Pinol, et al., 2005). L'origen d'aquest tipus de CCR s'ha relacionat, per tant, a l'exposició a diferents factors ambientals, a l'edat i als estils de vida. Gairebé la majoria dels casos es diagnostiquen a partir dels 60 anys (Winawer, et al., 2003). De totes formes, no es pot descartar cap mena d'influència de la genètica doncs s'ha proposat que pot existir una certa predisposició (van Breda, et al., 2004; Gunter, et al., 2005).

2.2.2. CCR familiar

Hi ha un percentatge significatiu (entre un 20% fins a un 25% de tots els CCR) que tenen un cert grau d'agregació familiar associat però que no segueixen els mateixos patrons que s'observen en els casos hereditaris. En aquests casos, l'aparició del CCR o altres tumors es produeix a edats tardanes, coexistint en la mateixa família més individus afectes del que correspondria per atzar. S'ha observat en estudis de cohorts i, de casos i controls, com en les famílies en les que hi ha individus afectes de primer grau que tenen adenomes o CCR, el risc de desenvolupar aquesta neoplàsia s'incrementa fins a dues o tres vegades més que en la població general. També s'ha

associat a aquest tipus de CCR el fet que l'aparició de la malaltia s'avanci en el temps (Winawer, et al., 1997; Burt, 2000).

Diferenciar entre CCR esporàdic i familiar

Resulta bastant complex discriminar entre càncer esporàdic i familiar, i, en conseqüència, el percentatge corresponent a cada tipus possiblement no està ajustat a la realitat (de la Chapelle, 2004). Aquesta dificultat està relacionada amb l'existència d'una susceptibilitat genètica subjacent en aquests tipus de CCR. És probable que aquesta susceptibilitat sigui causada per alteracions en gens individuals que són menys penetrants però que són més comunes que els canvis associats amb les síndromes hereditàries. Les variants desconegudes de moderada, o bé de baixa penetrància, tendeixen a explicar, almenys en part, la falta d'heretabilitat en els casos de CCR. Hi ha alguns exemples de variants rares en els gens que predisposen al CCR i que confereixen un risc moderat o baix als portadors, com a *APC* (I1307K) (Laken, et al., 1997), *BLM* i *GALNT12* (Cleary, et al., 2003). D'elles, la variant d'*APC* I1307K és la que s'ha estudiat amb més profunditat i es produeix gairebé exclusivament en la població jueva asquenazí (Laken, et al., 1997). A més d'aquestes, estudis d'associació de tot el genoma (GWAS, *Genome-wide association study*) han identificat variants comunes de baixa penetrància d'aproximadament 20 loci genòmics relacionats amb la susceptibilitat al CCR. No obstant això, les variants comunes identificades en aquests loci exerceixen només un efecte modest sobre el risc de CCR (Dunlop, et al., 2012; Lubbe, et al., 2012; Dunlop, et al., 2013).

2.2.3. CCR hereditari

Es considera que entre el 3% i el 5% de tots els càncers de còlon pertanyen al context de les síndromes hereditàries ben definides (Lynch i de la Chapelle, 2003; Jasperson, et al., 2010), associades a mutacions heretades molt penetrants i que presenten una clínica molt característica. Aquests tipus de CCR s'agrupen en síndromes poliposes i les no poliposes. Entre les poliposes trobem les adenomatoses, de les quals destaquen: la poliposi adenomatosa familiar clàssica (FAP) i l'atenuada (AFAP, *attenuated FAP*) (<1%) i la poliposi associada al gen *MUTYH* (MAP, *MUTYH Associated Polyposis*) (<1%). Les hamartomatoses correspondrien a un altre grup menys representatiu que els anteriors. Per contra, la síndrome de Lynch (LS) és la més important del grup de les no poliposes (representant el 1-5% dels CCR) (de la Chapelle, 2004).

Tot i que els CCR hereditaris representen una petita fracció de tots els casos, l'estudi de les síndromes hereditàries ha millorat en gran mesura el coneixement dels factors i mecanismes específics que contribueixen al desenvolupament del CCR. Així doncs, l'aprofundiment sobretot de la FAP i la síndrome de Lynch, que són les més estudiades, ha permès establir paral·lelismes entre els mecanismes implicats en el desenvolupament del CCR esporàdic, doncs alguns dels gens germinalment mutats també juguen un paper clau en la carcinogènesi a nivell somàtic (Fearon i Vogelstein, 1990).

2.3. Consell genètic

El consell genètic en predisposició hereditària al càncer és el procés d'informació i comunicació a les persones o famílies en situació de risc de càncer, pel que fa a la probabilitat de presentar o transmetre a la seva descendència una determinada susceptibilitat genètica a desenvolupar una neoplàsia, sobre les seves implicacions, sobre la possibilitat de realitzar un diagnòstic molecular i sobre quines són les mesures disponibles per a la prevenció i el diagnòstic precoç. Aquest procés requereix de la participació de diferents professionals formats en aquest camp per ajudar a l'individu o la família. Les actuacions de consell genètic s'han d'emmarcar sota els principis ètics d'autonomia, privacitat, confidencialitat, beneficència, no maleficència i justícia.

El procés de valoració de risc pot incloure, o no, la realització d'un estudi genètic. L'estudi genètic és un instrument d'ajuda per la valoració del risc una vegada que, per criteris clínics, aquest es considera alt. En aquesta línia, la caracterització de les causes moleculars associades a aquestes síndromes han permès establir un diagnòstic presintomàtic dels individus portadors de les mutacions germinals. La identificació d'aquests individus i de famílies permet, a més d'una valoració individualitzada del risc de desenvolupar càncer, recomanar estratègies de prevenció i cribratge adequades al risc estimat per a la reducció de la incidència i de la mortalitat. Per una altra banda, aquest seguiment dels individus afectes permet prendre mesures terapèutiques millorant així el pronòstic i incrementant la supervivència d'aquests malalts. Els estudis genètics s'han d'efectuar sempre en el context del consell genètic, amb un assessorament abans i després de realitzar la prova genètica, discutint les seves limitacions i els possibles riscos i beneficis.

2.4. Estadiatge i clínica del càncer colorectal

En l'àmbit clínic, el grau i l'etapa del tumor són importants per tal de documentar objectivament l'extensió de la malaltia, triar el tractament adequat, pel seguiment de la resposta del pacient al

Introducció

tractament, per a pronosticar, per a millorar la capacitat de comparar els resultats del tractament a través dels sistemes de salut i facilitar la investigació.

L'abordatge quirúrgic és considerat el tractament d'elecció en pacients amb CCR resecable en estadis inicials mentre que en estadis més avançats són necessàries quimioteràpia i/o radioteràpia adjuvant i/o neoadjuvant. L'estadi del CCR es determina pel grau d'invasió i infiltració en la paret intestinal, l'afectació de ganglis limfàtics regionals i la presència de metàstasis a distància. Existeixen diversos sistemes d'estadiatge en el CCR. La més comunament utilitzada, per la seva senzillesa, claredat i correspondència amb el pronòstic és la classificació original de Dukes (Dukes, 1932). Aquest sistema es basa en el grau d'infiltració del tumor primari a través de les diverses capes de l'intestí gros i l'afectació a òrgans veïns i ganglis. Va ser modificada per Astler i Coller (Taula 1), (Astler i Coller, 1954).

Taula 1. Classificació de Dukes modificada per Astler i Coller, l'any 1954.

Estadis	Extensió del tumor
A	El tumor està limitat a la mucosa
B1	El tumor envaeix fins la muscularis pròpia
B2	El tumor travessa la capa muscularis pròpia fins a la capa serosa
C1	Igual que B1 més metàstasi ganglionar
C2	Igual que B2 més metàstasi ganglionar
D	Metàstasi a distància o invasió parietal d'òrgans adjacents

L'*American Joint Comitee on Cancer* (Hutter i Sobin, 1986) establí el sistema TNM (*Tumor, Node, Metastasis Stage Grouping*) que, sens dubte, és més correcte però més complex. Les sigles TNM fan referència a l'extensió del tumor primari (T), l'absència o la presència de metàstasi als ganglis limfàtics regionals (N), i l'absència o presència de metàstasi distant (M). Aquest sistema ha permès la classificació dels CCR en quatre estadis que es correlacionen amb el pronòstic dels pacients (Taula 2).

Taula 2. Classificació TNM pel càncer colorectal.

Categories T	Extensió que ocupa el tumor
Tx	La informació és incompleta i no es pot definir l'extensió del tumor
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> . És l'estadi més inicial, el tumor no ha travessat la mucosa
T1	El tumor ha travessat la mucosa, la muscularis mucosa, i envaeix la submucosa
T2	El tumor ha travessat la mucosa, la muscularis mucosa, la submucosa i envaeix la muscularis pròpia
T3	El tumor ha travessat la mucosa, la muscularis mucosa, la submucosa, 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 als ganglis limfàtics
Nx	La informació és incompleta i no es coneix l'afectació de ganglis limfàtics
N0	No hi ha cap gangli afectat
N1	1-3 ganglis afectats
N2	4 o més ganglis afectats
Categories M	Absència o presència de metàstasi a distància
Mx	La informació és incompleta i no hi ha descripció de metàstasi a distància
M0	No hi ha metàstasi a distància
M1	Presència de metàstasi a distància

El CCR és un procés de llarga evolució i durant les primeres etapes no sol produir simptomatologia. La detecció precoç (com el test de sang oculta en femtes o la colonoscòpia, entre d'altres) i la cirurgia poden ajudar a prevenir l'aparició de la malaltia. Els símptomes que provoca el CCR són molt inespecífics i no són diferents dels originats per altres malalties benignes. Cal destacar però, que en estadis incipients de la malaltia no es produeixen símptomes i, generalment, es presenten només en un estat avançat de la malaltia. Per aquesta raó, és molt important fer-se les proves de detecció recomanades abans que sorgeixi qualsevol símptoma.

Els símptomes varien segons la localització anatòmica del tumor i es poden resumir en: presència de sang a la femta, canvis en el ritme i en la manera habitual de fer les deposicions (aparició de restrenyiment o empitjorament del restrenyiment habitual de més de tres setmanes d'evolució, diarrees, diarrees alternant amb restrenyiment, i deposicions amb la matèria fecal més prima que de costum), sensació de tenir la panxa plena, vòmits, molèsties abdominals repetides i d'intensitat progressiva sense causa coneguda (dolor, inflamació, acumulació de gasos, cargolaments de

ventre), anèmia ferropènica no detectada prèviament i sense una causa que la pugui justificar, i, en rares ocasions, pèrdua de pes i febre.

2.5. Anatomia i histologia del còlon i recte

L'intestí gros està format pel cec, el còlon, el recte i el canal anal; és la darrera part del sistema digestiu i mesura aproximadament 1,5 m de longitud i uns 6,5 cm de diàmetre. La principal funció del còlon és la d'absorbir aigua, nutrients i minerals mentre que el recte emmagatzema els residus per a la seva expulsió. El còlon consta de tres seccions segons l'anatomia descriptiva. El primer tram està situat a la part dreta de l'abdomen, és on acaba l'intestí prim i es diu cec. Des d'aquest punt, el còlon ascendeix fins arribar a la zona del fetge (còlon ascendent) i travessa l'abdomen (còlon transvers). L'últim tram del còlon descendeix fins arribar al sigma (còlon descendent i sigmoide), el qual desemboca al recte. A nivell clínicopatològic es divideix en còlon proximal o dret, considerant l'ascendent i el transvers fins l'angle esplènic, i distal o esquerra, que inclou el descendent, el sigmoide. El recte es considera com una àrea independent del còlon (Figura 9, panell A).

Histològicament, el gruix del tub està format per vasos limfàtics i sanguinis, teixit connectiu i músculs especialitzats. Tant el còlon com el recte estan constituïts per varies capes de teixit que són des de la llum fins a l'exterior: la mucosa (cèl·lules epitelials, làmina pròpia i muscularis mucosa), submucosa, muscularis pròpia, subserosa i serosa (Figura 9, panell B).

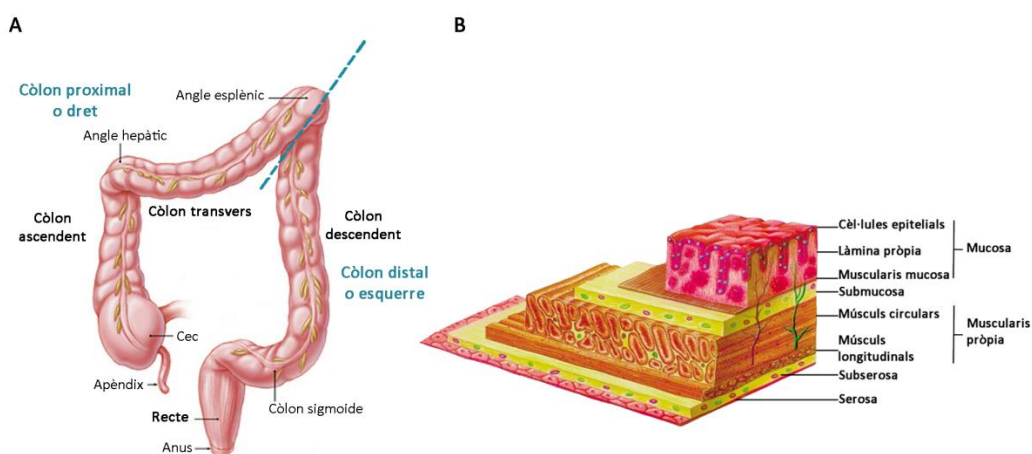


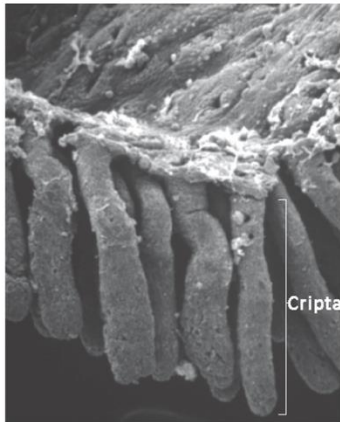
Figura 9. Anatomia de l'intestí gruixut. A. Seccions segons l'anatomia descriptiva (negre) i clínicopatològiques (blau) del còlon i recte. **B.** Esquema tridimensional de les capes histològiques que es poden observar en una secció del còlon.

2.6. L'epiteli intestinal i les criptes intestinals

La superfície interior del còlon està revestida per una monocapa de cèl·lules epitelials lligades entre si per unions estretes, que segellen els espais paracel·lulars i d'aquesta manera s'estableix la barrera gastrointestinal bàsica. Al llarg del tub digestiu, el manteniment d'un epiteli intacte és, per tant, crucial per a la integritat de la barrera (Stange i Clevers, 2013). El dany infringit a l'intestí durant la digestió és constant, i és tant de tipus mecànic com per l'assalt químic i biològic dels continguts luminals, fet que obliga a la renovació gairebé completa de l'epiteli cada 3-5 dies en els éssers humans (Leblond i Stevens, 1948), sent el teixit que més ràpidament es renova en el cos d'un mamífer (Heath, 1996). L'agressió persistent dels continguts luminals indueix una elevada taxa de mort cel·lular, arribant a perdre fins a 1000 cèl·lules epitelials (~200 g) en humans cada dia (Leblond i Walker, 1956).

La subunitat del còlon és la cripta, una estructura tubular formada per una capa d'epiteli columnar que s'invagina en el teixit connectiu subjacent de la làmina pròpia. El còlon normal consisteix en milions de criptes, i cada cripta conté aproximadament unes 2.000 cèl·lules (Cheng, et al., 1984; Potten i Loeffler, 1990; Kim i Shibata, 2002). Les criptes intestinals s'organitzen en tres compartiments seguint un eix de baix a dalt: el nínxol de cèl·lules mare que es troba en la base de la cripta i les quals es divideixen donant lloc a cèl·lules multipotents i a progenitores no diferenciades. Aquestes cèl·lules progenitores conformen el compartiment de cèl·lules d'amplificació transitòria (TA, *transit amplifying*) que proliferen i maduren ràpidament a mesura que migren en sentit ascendent per la paret ocupant aproximadament dos terços de les criptes. Finalment, la zona de la diferenciació, que s'expandeix des del terç superior de la cripta i arriba fins a la superfície de l'epiteli, on les cèl·lules deixen de proliferar i maduren a un dels tipus cel·lulars diferenciats del còlon (colonòcits, cèl·lules caliciformes o cèl·lules enteroendocrines), els quals continuen el seu viatge fins a la superfície on pateixen un procés d'apoptosi i extrusió al lumen (Figura 10), (Nathke, 2004; Radtke i Clevers, 2005).

A



B

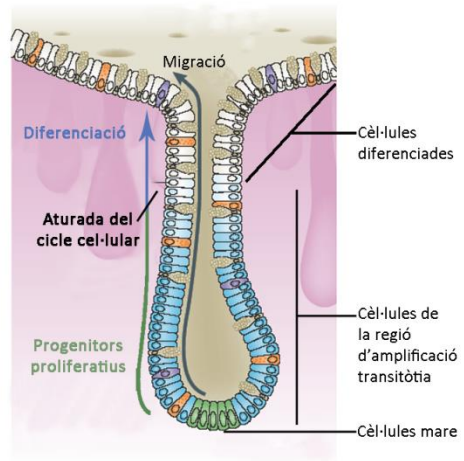


Figura 10. La cripta del còlon. A. Fotografia de l'estructuració de les criptes al còlon en microscopi electrònic de rastreig. B. Esquema de la cripta del còlon. Les cèl·lules mare a la base cripta generen les cèl·lules proliferatives del compartiment d'amplificació transitòria (TA) corresponents als dos terços inferiors de la cripta. Posteriorment, les cèl·lules TA migren i es diferencien en els diferents llinatges cel·lulars madurs de la superfície de l'epiteli. Imatge adaptada de Barker, 2014.

2.7. El nínxol de cèl·lules mare intestinals

En els òrgans existeix un sistema homeostàtic que serveix per substituir les cèl·lules senescentes o per a reparar-lo després del dany. De cèl·lules mare hi ha poques en el teixit adult i són no especialitzades, multipotents amb una capacitat de proliferació que excedeix la vida de l'individu i depenen íntimament del seu entorn, el nínxol, que sembla que condiciona les seves propietats (Miller, Lavker et al. 2005). En el marc tissular intestinal, la regeneració és impulsada per un grup de cèl·lules mare epitelials localitzades a la base de les criptes (Barker, et al., 2007), o bé, a prop (Sangiorgi i Capecchi, 2008) i que representen només una petita fracció del total (~5%) (Fuchs i Chen, 2013; Kang i Shibata, 2013). En general, s'utilitza l'intestí prim com a model per a estudiar aquest compartiment i, per tant, moltes vegades els resultats obtinguts es comproven i s'extrapolen al còlon.

Hi ha dos models per descriure la identitat de les cèl·lules mare intestinals: el model de zona de cèl·lules mare de la cripta proposat per Bjerknes i Cheng (Bjerknes i Cheng, 1981b; Bjerknes i Cheng, 1981a) i el model de cèl·lula mare de la posició +4 (referint-se a la cèl·lula que fa 4 des de la base de la cripta) proposat per Potten i col·legues (Potten, et al., 2009).

El model de zona de cèl·lules mare, tal com és proposat per Bjerknes i Cheng (Bjerknes i Cheng, 1981b; Bjerknes i Cheng, 1981a), descriu les cèl·lules columnars de la base de la cripta (CBCC, *crypt base columnar cells*) que estan en contacte amb les cèl·lules de Paneth a l'intestí prim (Figura 11). Les CBCC són petites, indiferenciades i en cicle. Quan la seva progènie ascendeix a la posició +5 de la cripta i es trenca el contacte amb les cèl·lules de Paneth, comencen a diferenciar-se. Actualment es considera LGR5 (membre de la família de receptors acoblats a proteïnes G, que contenen dominis rics en Leucines, anomenat també com GPR49), el marcador més sòlid per les CBCC (Barker, et al., 2007). S'ha demostrat que les cèl·lules LGR5+ generen tots els tipus de cel·lulars de l'epiteli de l'intestí prim durant tota la vida. Cada cripta conté, per una banda, al voltant de 15 cèl·lules LGR5+, les quals es divideixen cada dia i, per l'altre, 10 cèl·lules de Paneth (Clevers i Batlle, 2013).

S'ha vist que les cèl·lules de Paneth s'encarreguen de proporcionar senyals al nínxol de les cèl·lules mare. Ambdós tipus cel·lulars estan tan íntimament relacionats que si s'eliminen les cèl·lules de Paneth, el resultat és la pèrdua concomitant de les cèl·lules mare CBCC (Sato, et al., 2011). Aquestes cèl·lules de Paneth són les úniques que durant la renovació cel·lular no viatgen cap a dalt de la cripta i s'assenten a la base, al costat de les cèl·lules mare, empeses cap avall per les forces repulsives de les efrines i dels seus receptors (EphB) (Batlle, et al., 2002). Les cèl·lules de Paneth tenen una mitjana de vida de 6-8 setmanes, sent l'únic tipus de cèl·lula diferenciada capaç d'escapar del procés d'auto-renovació ràpid (Figura 11), (Ireland, et al., 2005). Mentre que les cèl·lules de Paneth no són presents en el còlon, s'han proposat com a homòlogues seves unes cèl·lules secretores localitzades al fons de la cripta del còlon (Altmann, 1983). Per una altra banda, en un estudi recent en ratolí, s'ha identificat una població cel·lular del còlon que comparteix múltiples característiques amb les cèl·lules de Paneth i les han proposat com a candidates per ser el possible suport del nínxol de cèl·lules mare en l'últim tram del tracte intestinal (Rothenberg, et al., 2012).

El model de les cèl·lules a la posició +4 de la cripta (LRC, *label-retaining cell*) descriu que en aquesta localització hi ha una cèl·lula mare potencial, de cicle lent o en repòs, capaç de regenerar el nínxol de cèl·lules mare de la cripta en condicions de dany (Figura 11), (Potten, et al., 1974; Potten, 1977; Potten, et al., 2002). Recentment s'han suggerit Bmi1, Tert, Hopx, i Lrig1 com a possibles marcadors per a detectar aquestes cèl·lules mare (Sangiorgi i Capecchi, 2008; Montgomery, et al., 2011; Takeda, et al., 2011).

Per tant, es pot afirmar que sembla ser que a l'intestí prim hi ha dos compartiments de cèl·lules mare on les CBCC estan activament en cicle i ofereixen les cèl·lules mare, en el dia a dia, i les cèl·lules de la posició +4, que són inactives i representen una població de reserva que respon a les lesions, com ara les produïdes per la irradiació (Li i Clevers, 2010; Tian, et al., 2011; Yan, et al., 2012). A nivell de còlon, s'han dut a terme amb èxit experiments de restauració de l'arquitectura de la cripta després de l'eliminació de la població de cèl·lules mare CBCC (LGR5+), fet que indicaria que també al final del tracte intestinal hi ha una població de cèl·lules quiescents (Tian, et al., 2011).

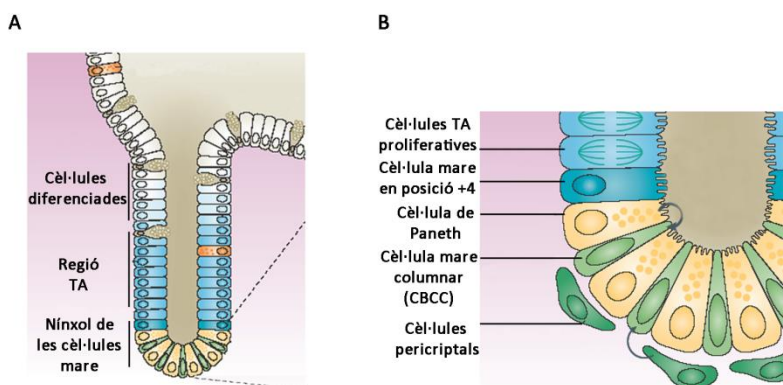


Figura 11. Nínxol de les cèl·lules mare de l'intestí prim. A. Esquema d'una cripta de l'intestí prim. B. Imatge augmentada del nínxol de les cèl·lules mare de l'intestí prim. En la imatge es mostren les cèl·lules mare CBCC i les de la posició +4. Adaptat de Barker, 2014.

2.8. Origen de la progènie en la cripta i regió d'amplificació transitòria

El procés d'autorenovació ha evolucionat fins a esdevenir un sistema altament regulat. El model més acceptat per explicar com les poblacions de cèl·lules mare aconseguen l'homeòstasi implica la divisió cel·lular asimètrica: a partir de la divisió d'una cèl·lula mare dona com a resultat dues cèl·lules amb destinacions diferents: una nova cèl·lula mare i una cèl·lula TA (Figura 12). Un altre model considerat amb menor freqüència és que les dues cèl·lules que es generen a partir d'una divisió de la cèl·lula mare no tenen perquè ser necessàriament divergents. Tal divisió simètrica de cèl·lules mare pot conduir a qualsevol combinació de destinacions de la progènie: dues cèl·lules mare, una cèl·lula mare i una cèl·lula TA o dues cèl·lules de TA (Figura 12).

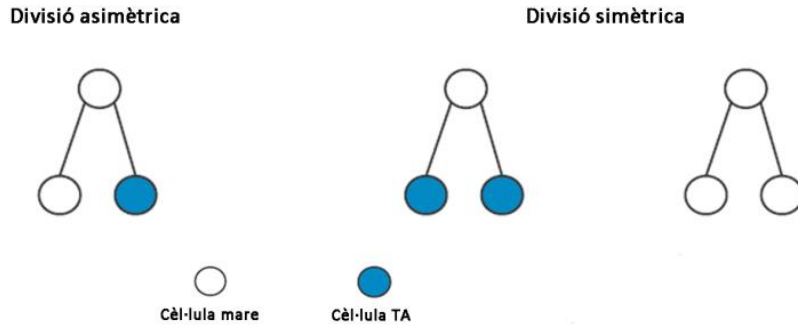


Figura 12. Representació dels dos tipus de divisions de les cèl·lules mare proposats: la asimètrica i la simètrica.

Històricament, Winton i Ponder van observar que el marcatge de les cèl·lules mare individuals dona com a resultat el marcatge de tota la cripta al cap de 3 mesos i van concloure que una sola cèl·lula mare manté cada cripta (Winton, et al., 1988). Griffith i col·laboradors, van arribar a conclusions similars a partir de criptes del còlon (Griffiths, et al., 1988). Per contra, Potten i Loeffler van proposar que les criptes poden tenir múltiples cèl·lules mare i que aquestes no tindrien perquè dividir-se asimètricament d'una manera estricta (Potten i Loeffler, 1990).

Per tal d'intentar comprendre millor aquest sistema, s'han dut a terme seguiments clonals de curt i llarg termini a cèl·lules mare LGR5+ individuals i els resultats indiquen que aquestes no sempre es divideixen asimètricament (Lopez-Garcia, et al., 2010; Snippert, et al., 2010). Així l'homeòstasi de l'epiteli i el subministrament dels compartiments cel·lulars s'aconseguiria per la competència neutra entre les cèl·lules mare que es divideixen simètricament, i que lluiten per la restricció de l'espai de nínxol a la base cripta, espai limitat probablement per la superfície que les cèl·lules de Paneth deixen disponible. Cal destacar però, que tot i que la divisió simètrica és el mecanisme dominant en ratolins, aquesta troballa encara no s'ha replicat en els éssers humans. El mecanisme pel qual es divideixen les cèl·lules mare és controvertit, existint evidències a favor i en contra de la segregació simètrica de la cadena de DNA (Potten, et al., 1978; Potten, et al., 2002; Quyn, et al., 2010; Escobar, et al., 2011; Schepers, et al., 2011; Steinhauser, et al., 2012).

Mentre que les cèl·lules mare LGR5+ es divideixen cada 24 hores, les cèl·lules TA prenen la meitat del temps per a cada un dels seus 4-5 cicles cel·lulars. Per tant, la producció cel·lular en la cripta està determinada, en gran mesura, per l'activitat proliferativa de les cèl·lules TA (Clevers, 2013).

Sembla que els senyals que mantenen l'estat de proliferació en les cèl·lules mare també condueixen a la proliferació vigorosa de les cèl·lules TA.

2.9. Plasticitat de les cèl·lules de la cripta

L'intestí té la capacitat de sobreviure a la pèrdua aguda del conjunt de cèl·lules mare actives. Això es pot relacionar amb l'existència de cèl·lules mare "de reserva" que estan en repòs (Li i Clevers, 2010) i/o amb la plasticitat general del compartiment de cèl·lules progenitores de la regió TA. Com ja hem explicat anteriorment, les cèl·lules mare LRC de la posició +4 restauren la població cel·lular de la cripta rere la destrucció de les cèl·lules CBCC (Figura 13), (Tian, et al., 2011).

Un altre exemple de plasticitat és el que implica les cèl·lules marcades amb DLL1 (DLL1+), que corresponen a les cèl·lules filles primerenques de les cèl·lules mare que resideixen al voltant de la posició +5 respecte les cèl·lules CBCC (LGR5+). DLL1+, representen unes cèl·lules progenitores efímeres (van Es, et al., 2012), que sota condicions fisiològiques determinades, produeixen petits clons mixtes de cèl·lules secretores. No obstant això, quan les cèl·lules CBCC moren per la radiació, aquestes cèl·lules progenitores DLL1+ secretores, reverteixen cap a cèl·lules mare per a poder reparar el dany (Figura 13).

Per últim, en un estudi recent, Wilton i col·legues, van descriure l'existència de precursors de cèl·lules de Paneth, de vida curta (<4 setmanes), que presenten un fenotip mixt: expressant un conjunt de marcadors de cèl·lules de Paneth, cèl·lules neuroendocrines, són LGR5+, i també són positives per a marcadors de cèl·lules mare de la posició +4. Aquestes persisteixen en aquest estat durant algunes setmanes abans de la seva diferenciació terminal. Van observar que quan es produïa dany en la cripta, aquestes cèl·lules eren capaces de retornar a l'estat de cèl·lula mare i regenerar-la. Com aquestes cèl·lules són de curta durada, no es poden considerar cèl·lules mare en el sentit estricte. No obstant això, aquestes cèl·lules constantment estan sent generades per les cèl·lules mare en cicle (Buczacki, et al., 2013). Com també s'ha proposat (Roth, et al., 2012), aquesta població de cèl·lules sempre està disponible com a cèl·lules mare "de reserva" per si hi ha dany tissular (Figura 13).

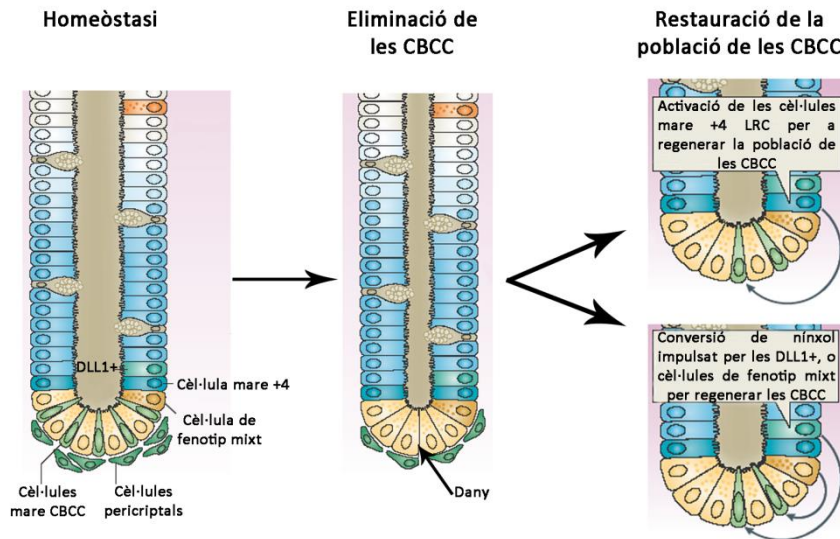


Figura 13. Plasticitat de les cèl·lules de la cripta en el model de cripta de l'intestí prim. Durant la homeòstasi les cèl·lules CBCC són les encarregades de l'autorenovació a la cripta. Quan aquestes s'eliminen altres tipus cel·lulars (les cèl·lules mare +4, les DLL1+ i les de fenotip mixt de vida curta) són les encarregades que regenerar la població de cèl·lules mare CBCC. Adaptat de Barker, 2014.

2.10. Els senyals de WNT són essencials pel manteniment de les criptes

La via canònica de WNT és la més caracteritzada i la més rellevant en la senyalització de cèl·lules mare de la cripta. La seva senyalització es basa en la interacció autocrina i paracrina de les glicoproteïnes WNT, secretades per diferents tipus cel·lulars a través de la unió amb els seus receptors (Frizzled) i coreceptors (LRP) de membrana. Així doncs, el control en la senyalització de la via de WNT regula la migració cel·lular i la diferenciació a la cripta sent la principal força motriu pel manteniment del fenotip de les cèl·lules mare intestinals i per l'autorenovació. La senyalització de WNT també indueix la diferenciació de les cèl·lules de Paneth i regula l'adequada migració de cèl·lules al llarg de l'eix de la cripta fins a la superfície, a través de la senyalització de les efrines en els receptors dependents del contacte cel·lular. Per tant, la via de WNT coordina l'expansió, el destí i el repartiment de la població de les cèl·lules de l'epiteli intestinal (Schneikert i Behrens, 2007).

Quan la proteïna WNT s'uneix a Frizzled i LRP en la superfície de la cèl·lula, CKI i GSK3 β es dirigeixen cap a la membrana i fosforilen LRP. Després, la molècula citoplasmàtica Disheveled (Dvl) es reuneix a la membrana plasmàtica per interactuar amb Frizzled. La interacció d'Axina amb LRP

Introducció

fosforilat i amb Dvl condueix cap a la desintegració del complex de destrucció (Axina, CKI i GSK3 β) i a l'acumulació de β -catenina en el citoplasma. Posteriorment, s'indueix la translocació nuclear de β -catenina i l'activació de factors de transcripció de la família TCF/LEF (Li, et al., 2012). La localització nuclear de β -catenina, que és la senyal distintiva de l'activació de la via de WNT, es localitza en les cèl·lules mare a la part inferior de les criptes intestinals (Figura 14), (van de Wetering, et al., 2002; Pinto, et al., 2003).

En absència d'unió de WNT al seu receptor, la β -catenina està al citosol lliure i és capturada, de manera eficient, pel complex d'Axina, APC, CKI, i GSK3 β . Aquestes dues últimes cinases fosforil·len el grup amino terminal de la β -catenina, permetent la unió d'un complex d'ubiquïtina lligasa E3 que s'adreça a β -catenina per la seva degradació proteosomal (Aberle, et al., 1997), prevenint així l'activació dels seus gens diana en el nucli (Figura 14). Dades recents mostren que el reclutament concret d'Axina a la cua fosforilada de LRP, condueix a la inhibició de la ubiquïtinització de β -catenina (Li, et al., 2012).

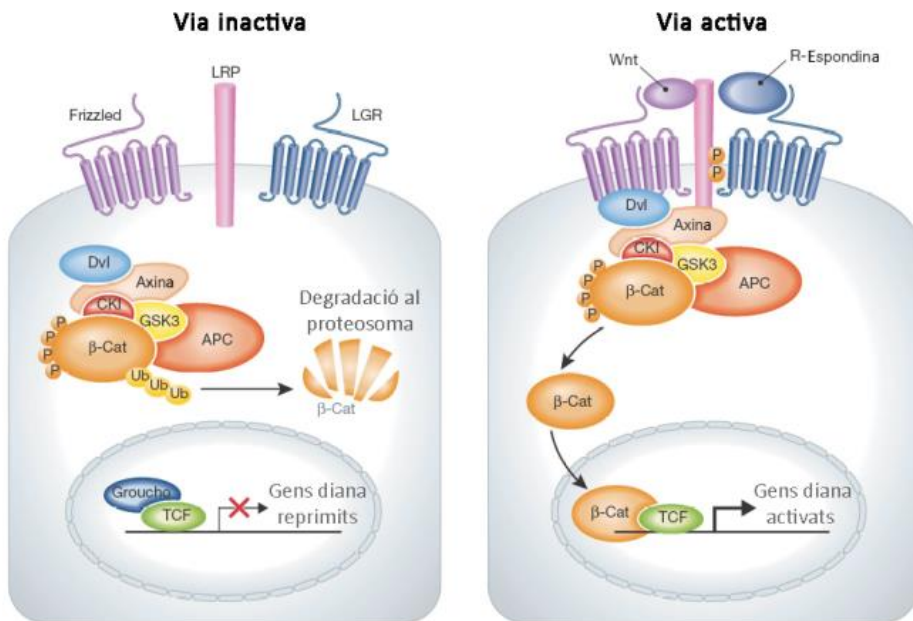


Figura 14. Via de Wnt. En el seu estat inactiu (esquerra) el complex de destrucció marca β -catenina per la seva degradació via proteosoma, i en el seu estat actiu (dreta) els senyals de WNT permeten que β -catenina s'acumuli al citoplasma i viatgi al nucli per activar transcripcionalment els gens de proliferació. Adaptat de Schuijers i Clevers, 2012.

A més del seu paper en la via WNT, β -catenina realitza una segona funció no relacionada amb epitelis simples. β -catenina és l'acompanyant essencial per la cua citoplasmàtica de diferents cadherinas, com ara E-cadherina en les unions d'adhesió (Peifer, et al., 1992). Encara que la vida mitjana de la senyalització de β -catenina és de l'ordre de minuts, el conjunt d'aquestes unions adherents són altament estables.

Diversos grups han demostrat de manera convincent la importància de la senyalització de la via de WNT en la proliferació i la diferenciació de la cripta intestinal. El gen diana de WNT, LGR5, s'expressa únicament en les cèl·lules mare CBCC del tracte intestinal (Barker, et al., 2007; Barker, et al., 2010) sent una prova directa de la importància de l'activitat WNT en les funcions d'autorenovació i de multipotència en aquests compartiments tissulars. Per una altra banda, també recentment, tres grups van identificar de forma independentment que R-espondina forma un complex ternari amb LGR5 o amb el seu homòleg LGR4 (Carmon, et al., 2011; de Lau, et al., 2011; Glinka, et al., 2011) inhibint el recanvi dels receptors de WNT. Així doncs, les R-espondines són glicoproteïnes secretades que amplifiquen la senyalització de WNT i indueixen el fenotip proliferatiu *in vivo*, reforçant l'íntima connexió entre la senyalització de WNT i l'activació de les cèl·lules mare adultes (Kim, et al., 2005).

Per tant, és fàcil deduir que és el programa genètic, que es veu activat o desactivat per aquesta via, el que modula la biologia de la cripta i que, per tant, la desregulació d'aquest programa és el que trenca l'homeòstasi de l'epiteli intestinal donant lloc al CCR. De fet, durant la progressió tumoral, la via de WNT roman constitutivament activada al llarg de tot l'eix de la cripta, permetent que les cèl·lules adquireixin un fenotip progenitor que es manté a tots els nivells de la cripta, perdent així la seva organització (van de Wetering, et al., 2002). Hi ha molts dels gens que estan regulats per β -catenina/TCF que estan relacionats amb el CCR doncs la seva desregulació ajuda a les cèl·lules a adquirir capacitats tumorigèniques. En destaquem el següents: gens com *C-MYC* i el de la ciclina D1 (*CCND1*) relacionats amb la proliferació cel·lular, el gen de la survivina té un paper antiapoptòtic, el *VEGF* que codifica per un factor clarament proangiogènic, proteases com les MMPs que juguen un paper clau en la degradació de la matriu extracel·lular necessària pel procés de metàstasi (Behrens i Lustig, 2004), i els receptors de les efrines (EphB) que són els responsables del posicionament cel·lular dins les criptes (Batlle, et al., 2002). Com veurem amb més detall més endavant, mutacions de línia germinal en el gen *APC* causen el síndrome de càncer hereditari

anomenat poliposi adenomatosa familiar (FAP, *Familial adenomatous polyposis*) (Kinzler, et al., 1991; Nishisho, et al., 1991).

2.11. Altres vies que també juguen un paper important en la cripta

La via de NOTCH coopera amb WNT en cèl·lules dependents de contacte per preservar l'auto-renovació de les cèl·lules mare. La pèrdua de la funció de NOTCH en l'epiteli intestinal provoca una conversió massiva de les cèl·lules epitelials a cèl·lules caliciformes (Milano, et al., 2004; van Es, et al., 2005b). Lligands de NOTCH (DLL1 i DLL4) s'expressen en les cèl·lules secretores circumdants, incloent les cèl·lules de Paneth.

Estímuls mitògens regulen la mida del compartiment proliferatiu. Lrig1, un marcador de les cèl·lules mare i de TA primerenques, actua com un regulador negatiu de l'activitat del receptor de tirosina quinasa (RTK) (Wong, et al., 2012).

Les proteïnes Hedgehog (HH) són necessàries pel desenvolupament i tenen un paper important en el manteniment de l'homeòstasi cel·lular en el tracte gastrointestinal. La via de HH actua com un sensor de la integritat epitelial i també com un interruptor per a la proliferació de l'epiteli. L'expressió d'aquestes proteïnes, restringeix la senyalització de WNT a la cripta i aquest equilibri és important pel posicionament i la maduració dels colonòcits (Madison, et al., 2005). Són necessàries per a la maduració de les cèl·lules de l'estroma i per la seva localització. La seva activitat en el compartiment de cèl·lules mare es creu que és indirecta, doncs una regulació a la baixa de HH causa una disminució de l'expressió de la proteïna morfogenètica òssia (BMP) i una deslocalització de les cèl·lules de l'estroma que podrien formar part del nínxol de cèl·lules mare (Kosinski, et al., 2010).

La senyalització de BMP és fonamental en l'homeòstasi intestinal adulta mitjançant la restricció de l'excessiva proliferació del compartiment de cèl·lules mare intestinals, actuant principalment en el mesènquima. La senyalització de BMP inhibeix la destinació de cèl·lules mare a l'intestí (Haramis, et al., 2004) probablement per antagonitzar la senyalització de WNT. Les BMP s'expressen principalment a cèl·lules de l'estroma que envolten l'epiteli, mentre que les cèl·lules mare intestinals estan protegides de la seva acció per la presència d'inhibidors locals, com Gremlin. Les BMP recolzen la diferenciació de les cèl·lules neuroendocrines i la maduració completa del llinatge

cel·lular secretor. També destaca la funció de les BMP com un senyal de quiescència, de restricció de la fissió de les criptes inhibint la proliferació de cèl·lules mare intestinals (Auclair, et al., 2007).

3. ORIGEN DEL CÀNCER COLORECTAL

L'any 1990, Fearon i Vogelstein van formular un model de carcinogènesi seqüencial pel CCR, que proposa que la acumulació de canvis moleculars corresponen amb les diferents etapes histològiques de desenvolupament de tumors en el còlon (Figura 15), (Fearon i 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 consisteix en una hiperplàsia i/o displàsia de l'epiteli del còlon (Takayama, et al., 1998). Concretament es defineixen per la seva aparença microscòpica i s'identifiquen per ser criptes més grans. Tenen l'espai pericriptal augmentat de tal forma que es localitzen separades de les criptes normals. Tenen una capa més gruixuda de cèl·lules epitelials que sovint es tenyeix més fosca i tenen generalment unes obertures més ovals que circulars (McLellan i Bird, 1988). Aquestes petites àrees es desenvolupen en grups microscòpics al còlon i són susceptibles de presentar microadenomes, que són un primer pas en el camí cap al desenvolupament d'un pòlip adenomatós. No obstant això, els passos intermedis d'aquest procés són encara desconeguts (Roncucci, et al., 1991).
- Adenoma primerenc: Generalment pòlips 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.

Introducció

- 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.

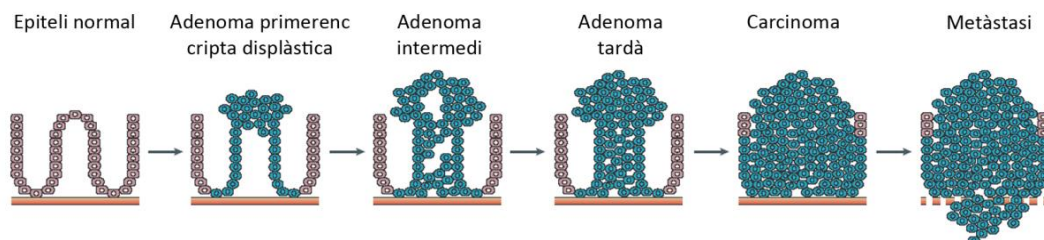


Figura 15. Seqüència de l'evolució tissular des de l'epiteli normal fins a la metàstasi. Cèl·lules alterades (verd) van proliferant i envain el teixit progressivament. Adaptat de Davies, et al., 2005.

No obstant això, actualment es pensa que la via adenoma-carcinoma explica només un 70-80% dels CCR (Leggett i Whitehall, 2010). Un dels avanços més significatius en els últims anys en el camp de l'oncologia digestiva en relació amb el CCR ha estat la identificació de les "lesions serrades" com a precursors de CCR a través de de l'anomenada "via serrada" de la carcinogènesi, responsable de fins a un 20-30% de tots els CCR (Torlakovic, et al., 2003; Leggett i Whitehall, 2010; Moreira, 2011). Aquestes lesions, amb unes característiques endoscòpiques i anatomopatològiques específiques que les diferencien dels adenomes, tenen una important rellevància clínica, atès que s'ha observat que la majoria dels CCR detectats entre dues colonoscòpies en programes de cribratge corresponen a aquests tipus de lesió. Els principals factors que s'associen a un major risc de malignitat en els pòlips serrats són la mida (≥ 10 mm), la multiplicitat, la histologia de l'adenoma serrat sèssil, la presència de displàsia associada i la localització proximal (Boparai, et al., 2010; Hiraoka, et al., 2010; Schreiner, et al., 2010).

Com hem vist, amb el temps, els adenomes poden evolucionar cap a carcinomes, tot i que estudis longitudinals han trobat que menys d'1 de cada 10 adenomes es tornen malignes entre els 10 anys des de la primera detecció (Stryker, et al., 1987). Actualment, la detecció i extirpació dels adenomes evita el desenvolupament de la malaltia, doncs hi ha un alt risc de CCR en individus amb adenomes que no s'eliminen, sent la polipectomia el mecanisme que disminueix el risc de patir CCR (Winawer, et al., 1993).

3.1. Quan es trenca la fidelitat genètica en la cripta del còlon

El còlon és un òrgan altament mitòtic doncs la majoria de les cèl·lules epitelials són substituïdes setmanalment (Potten i Loeffler, 1990; Humphries i Wright, 2008). L'arquitectura basada en l'activitat de les cèl·lules mare redueix el nombre de cèl·lules mitòtiques que tenen risc d'acumular mutacions, i els múltiples nínxols de cèl·lules mare asseguren que l'aparició d'una mutació letal en una de les cèl·lules multipotencials no tingui perquè derivar en mort de la cripta. Està descrit que les mutacions en les cèl·lules no mare normalment no es poden acumular a causa que aquestes cèl·lules es perden al cap d'una setmana.

S'accepta que les mutacions somàtiques que produeixen càncer són successos inusuals amb uns valors de freqüències reportats de 10^{-7} mutacions per gen i per generació, o bé, de 10^{-10} mutacions per parell de base, per generació cel·lular (Fox, et al., 2009). Els mecanismes de fidelitat de les cèl·lules mare humanes poden ser inferits per les quantitats i tipus de mutacions somàtiques acumulades durant tota una vida (Kang i Shibata, 2013). De totes formes, la freqüència de qualsevol mutació específica en una població de cèl·lules humanes és probable que sigui molt baixa (<5%) com per a poder-la mesurar amb la majoria de les tècniques, doncs una mutació en una cèl·lula mare seria emmascarada per les cèl·lules no mutades circumdants de la mateixa cripta.

Tot i que s'intenta mantenir una elevada fidelitat genètica, les mutacions somàtiques es poden acumular tant per l'envelliment (Kang i Shibata, 2013) com per una predisposició intrínseca. Com s'ha explicat en l'apartat "2.8. Origen de la progènie en la cripta i regió d'amplificació transitòria", en la divisió de les cèl·lules mare sembla ser que s'estableix una constant competència neutre entre les cèl·lules del nínxol de la base de la cripta. En aquest "model neutre" de competència, la superfície que la cèl·lula de Paneth deixa disponible determina el nombre de cèl·lules mare LGR5 en una cripta (van Es, et al., 2005a; Andreu, et al., 2008; Farin, et al., 2012). Està àmpliament acceptat, a partir de diferents d'estudis de seguiment de llinatge, que quan una mutació inicial es produeix a una cèl·lula mare CBCC, el clon mutat a continuació, comença a colonitzar la base de la cripta provocant la substitució de la resta de cèl·lules mare del nínxol, i produint l'esdeveniment anomenat "successió de nínxol" (Figura 16).

Nínxol de les
cèl·lules mare

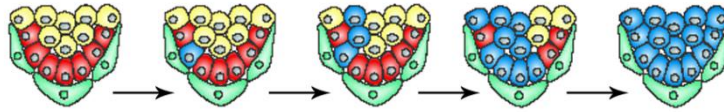


Figura 16. Successió de nínxol. En una cèl·lula mare de la cripta es produeix una mutació (blau) i aquest clon acaba substituïnt a la resta de cèl·lules mare de la cripta. Adaptat de Humphries i Wright, 2008.

Kim i Shibata van observar que es produïen diferents cicles de successió de nínxol a les criptes del còlon, el que és una evidència de l'existència de les divisions simètriques en les cèl·lules mare (Kim i Shibata, 2002). Finalment, el que té lloc és que la progènie de les cèl·lules mare mutades acaba colonitzant la cripta i donant com a resultat el que s'anomena "conversió monoclonal" (Figura 17). En altres paraules, en qualsevol moment donat, totes les cèl·lules de la cripta es deriven d'una de les 15 cèl·lules mare. Les criptes del còlon es tornen monoclonals amb el temps, seguint un patró de la dinàmica de la deriva neutra en la qual les cèl·lules mare funcionalment equivalents s'expandeixen o desapareixen estocàsticament fins que es fan càrrec de la cripta o es perden (Lopez-Garcia, et al., 2010; Snippert, et al., 2010). De fet, està reportat que es necessiten, de mitjana, 3 mesos per a què la cripta es converteixi en monoclonal. Aquesta característica, juntament amb la multipotència, s'utilitza per detectar cèl·lules mare putatives a les criptes intestinals.

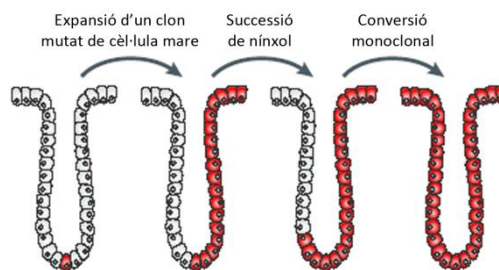


Figura 17. Esquema del procés de la conversió monoclonal a la cripta. Adaptat de Humphries i Wright, 2008.

Per una altra banda, s'han suggerit dos models per a descriure el procés pel qual una població clonal pot propagar-se a través de la mucosa intestinal. El model més acceptat que s'ha proposat com a mecanisme d'expansió clonal o cancerització de camp en la mucosa gastrointestinal (Merlo,

et al., 2006; Maley, 2007; Humphries and Wright, 2008), observat tant en còlon normal com quan hi ha una patologia associada, s'anomena "fissió de la cripta" o de la glàndula. Aquest mecanisme explica com una cripta es bifurca donant lloc a dues criptes independents (Figura 18), (Preston, et al., 2003; Greaves, et al., 2006; Gutierrez-Gonzalez, et al., 2009). Això és recolzat per l'observació que les criptes que mostren un fenotip mutat tendeixen a ocórrer en grups o agregats. Cada vegada és més clar que un clon mutat té la capacitat de propagar ràpidament i a una gran distància (Galandiuk, et al., 2012). No obstant això, la taxa de fissió de la cripta hauria de ser inusualment alta per a viatjar per tota la longitud del còlon en un marc de temps relativament curt. En els éssers humans, s'estima que la fissió de la cripta té lloc normalment a una taxa baixa, amb 9-18 anys entre els cicles de fissió (Totafurno, et al., 1987), encara que la taxa probablement augmenta una mica en la malaltia inflamatòria intestinal (Cheng, et al., 1986), així com en adenomes colorectals (Wong, et al., 2002).

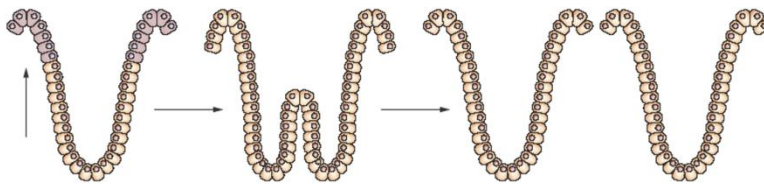


Figura 18. Esquema de la fissió de la cripta com a model d'expansió clonal. Extret de Zeki, et al., 2011.

Kim i Shibata (Kim i Shibata, 2004) van investigar i van veure que tot el procés sembla ser bastant complex. En un anàlisi detallat de l'estat de metilació de gens no expressats (utilitzant aquest estatus com a rellotge molecular) van veure que criptes veïnes no estan més relacionades entre sí que les que estan a 15 cm de distància i, a més, que les criptes que estan bifurcades (productes teòrics de la fissió) mostraven també entre sí les mateixes diferències. Aquest resultat pot indicar que, o bé les criptes aparentment producte de la fissió s'originen per fusió (Slorach, et al., 1999; Yatabe, et al., 2001; Kim i Shibata, 2002), o bé que la fissió es podria prolongar tant en el temps que diferents successions de nínxol podrien tenir lloc en els dos braços produïts per la fissió.

També s'ha suggerit un altre model d'expansió d'un clon mutat, el mecanisme de "dalt a baix", en què les cèl·lules mare mutades poden migrar lateralment cap a la cripta veïna (Shih, et al., 2001). Tal propagació de la mutació s'assembla a la depredació, sent el clon invasor qui torna a omplir el

nínxol d'un altra cripta, amb el clon mutat, envaint i eliminant potencialment la població de les cèl·lules residents (Figura 19).

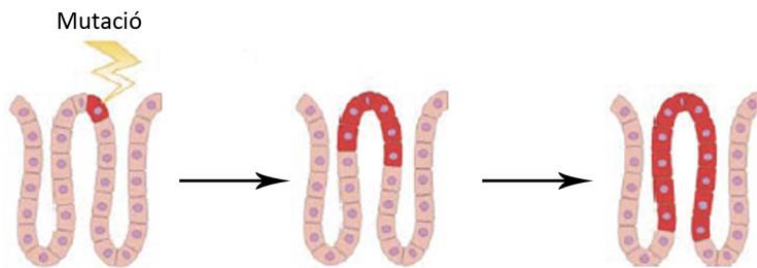


Figura 19. Esquema de l'expansió clonal mitjançant el model de dalt cap a baix. Adaptat de Alison, et al., 2008.

Aquesta migració de les cèl·lules mare a nínxols distants és una hipòtesi atractiva per explicar l'aparent expansió de clons a distàncies molt grans, com ara al llarg de tota l'extensió del còlon (Galandiuk, et al., 2012). És important tenir en compte que les cèl·lules epitelials normals no són capaces de migrar d'aquesta manera, ja que són dependents d'ancoratge i se sotmetran a la mort cel·lular per l'*anoikis* al despendre's de la membrana basal (Eisenhoffer, et al., 2012; Marinari, et al., 2012).

Donada la complexitat evident de l'evolució del tumor, sembla probable que l'expansió clonal canònica a través de la fissió de la cripta i l'expansió clonal no canònica puguin, per tant, contribuir a la difusió d'un clon mutat en la mucosa gastrointestinal, encara que la contribució relativa de cada mecanisme és probable que sigui altament dependent de cada context.

La conversió monoclonal patològica s'ha observat en la FAP que explicarem amb detall més endavant en l'apartat "4.1. Poliposi adenomatosa familiar (FAP) i atenuada (AFAP)". Els pacients que tenen aquesta condició desenvolupen adenomes a una edat primerenca i aquests mostren una tendència accelerada cap la progressió del CCR. La inactivació d'*APC* s'ha descrit com l'origen d'aquesta patologia. Les cèl·lules que tenen les dues còpies del gen *APC* mutades són típicament displàstiques, mentre que quan només hi ha una còpia inactivada, les criptes no ho són però presenten comportaments alterats, com ara un augment en la taxa de fissió críptica i l'expansió de les cèl·lules mare (Wasan, et al., 1998). De fet en els pacients afectes, hi ha criptes senceres

revestides d'epiteli displàstic envoltat per teixit completament normal. Aquestes estructures s'anomenen adenomes monocriptals (Woda, et al., 1977; Nakamura i Kino, 1984).

3.2. Bases moleculars de la carcinogènesi colorectal

El càncer de còlon representa un model ideal per estudiar els mecanismes moleculars i cel·lulars subjacents a l'aparició del tumor, i a la progressió cap a la malignitat. Com s'ha explicat anteriorment, es postula que la inestabilitat genètica augmentada en les cèl·lules tumorals permet l'acumulació de múltiples alteracions genètiques (Hanahan i Weinberg, 2011). Recentment s'ha descrit que en tumors de còlon estudiats mitjançant tècniques d'ultra seqüenciació es detecten una mitjana de 66 gens amb mutacions somàtiques subtils i que s'espera que impliquin alteracions en les proteïnes (Vogelstein, et al., 2013). Aquesta acumulació s'exacerba en els tumors amb defectes en el sistema de reparació del DNA, els quals poden adquirir fins a milers de mutacions (Vogelstein, et al., 2013). Clàssicament, estudis epidemiològics han suggerit que els tumors sòlids normalment requereixen de cinc a vuit alteracions, ara interpretades com a mutacions que directament o indirectament confereixen un avantatge de creixement selectiu a la cèl·lula, les anomenades *driver mutation*. (Armitage i Doll, 1954).

Els orígens moleculars del CCR estan relativament ben caracteritzats i fortament relacionats amb l'acumulació heterogènia de mutacions genètiques en la seva progressió i presenten diferents patrons d'inestabilitat genètica. Hi ha almenys tres vies moleculars diferents de CCR: la via de la inestabilitat cromosòmica (CIN, *chromosomal instability*) lligada a mutacions en oncogens i en gens supressors de tumor, la via de la inestabilitat dels microsatèl·lits (MSI, *microsatellite instability*) lligada a la inactivació dels gens del sistema de reparació de desaparellaments erronis produïts durant la replicació del DNA (MMR, *mismatch repair*), i que és responsable de la síndrome de Lynch, i la via del fenotip metilador d'illes CpG (CIMP, *The CpG island methylator phenotype*) que fa referència, en gran part, al fet de silenciar gens supressors de tumors mitjançant la hipermetilació dels seus promotors. Aquestes vies no s'exclouen mútuament, i alguns tumors exhibeixen característiques de més d'una. De fet, s'ha descrit que la via de CIN es relaciona exclusivament amb la via de la MSI, i aquesta es superposa parcialment amb la via CIMP (The Cancer Genome Atlas Network, 2012).

A continuació, aprofundirem una mica més al respecte, i en els gens que es veuen alterats de forma primerenca i que són els que s'han estudiat en aquesta tesi.

3.2.1. Via de la inestabilitat cromosòmica (CIN)

La via de la inestabilitat cromosòmica (CIN) va ser el primer model descrit de carcinogènesi colorectal. Proposat per Fearon i Vogelstein l'any 1990, descriu com el càncer es desenvolupa a través d'una seqüència ordenada d'alteracions genètiques i epigenètiques acumulades progressivament al llarg de la seqüència adenoma-carcinoma (Fearon i Vogelstein, 1990). En aquest model, hi ha tres característiques importants: (i) activació mutacional d'oncogens, juntament amb la inactivació mutacional dels gens supressors de tumors; (ii) són necessàries mutacions de 2 a 8 gens diferents per al desenvolupament del càncer; i (iii) l'acumulació d'aquestes alteracions genètiques, més que no pas l'ordre en què s'han adquirit, és la responsable del comportament biològic del tumor. S'ha descrit com la inactivació de les mutacions en gens supressors de tumors com *APC* i l'activació de mutacions d'oncogens, com *KRAS*, es produeixen preferentment en estadis primerencs. Posteriorment, les mutacions en gens supressors tumorals com *DCC* o *Smad4* són freqüents en la transició cap a adenomes intermedis i tardans, respectivament. Finalment, les mutacions en el gen *TP53* estan presents en un gran nombre de carcinomes. A part, s'han documentat nombrosos llocs de pèrdua d'heterozigotitat (LOH, *loss of heterozygosity*) al llarg del genoma. (Figura 20)

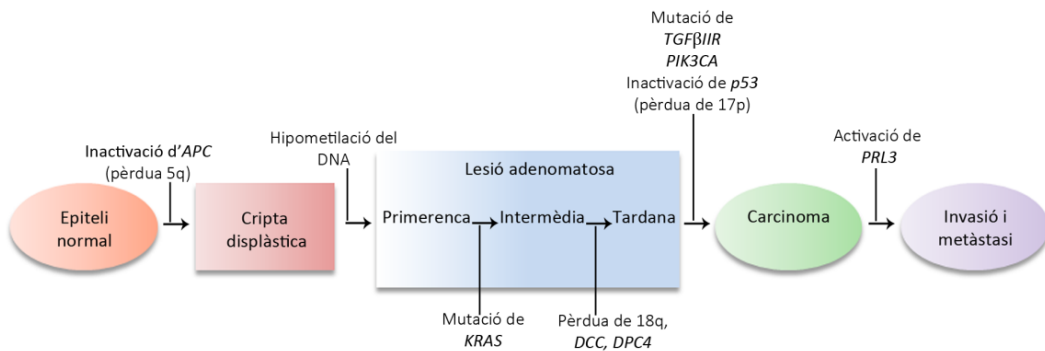


Figura 20. Representació de la via de la inestabilitat cromosòmica. Adaptat de Vilar i Gruber, 2010.

Els estudis de seqüenciació d'alt rendiment de CCRs per Sjöblom et al. (Sjöblom, et al., 2006), i l'estudi de l'Atlas del Genoma del Càncer (The Cancer Genome Atlas Network, 2012) han demostrat que, a més dels gens més freqüentment mutats (com *APC*, *KRAS*, *TP53* i *PIK3CA*) denominats "Gens muntanya", hi ha molts més que estan menys freqüentment mutats, anomenats "Gens turons" i un nombre molt més gran, 80 o més, de gens mutats a molt baixa

freqüència, la majoria dels quals sembla no contribuir a la progressió cap a la malignitat. Altres estudis han identificat alteracions genètiques en CCR que mostren consistentment la pèrdua o guany del nombre de còpies en els tumors, com ara la pèrdua de *PARK2* i el guany o amplificació de *C-MYC* com a nous gens en el desenvolupament i progressió del CCR (Poulogiannis, et al., 2010b; Poulogiannis, et al., 2010c; Day, et al., 2013).

APC

Com hem vist anteriorment, *APC* és un gen supressor tumoral que es localitza al cromosoma 5q21 (Bodmer, et al., 1987; Leppert, et al., 1987). Aquest gen consta de 8.538 pb de seqüència codificant i està format per 15 exons. Aquest gen codifica per la proteïna APC, de 2.843 aminoàcids i de massa molecular 312 kDa, que s'expressa en una àmplia varietat de teixits humans fetals i adults. A nivell cel·lular, la proteïna APC es localitza tant al nucli com al citoplasma, tot i que la seva distribució és predominantment citoplasmàtica (Brocardo, et al., 2005). Aproximadament el 70-80% dels adenomes i carcinomes colorectals esporàdics tenen mutacions somàtiques que inactiven *APC*, tot i que, en alguns estudis aquesta incidència és menor (Luchtenborg, et al., 2005). Les mutacions somàtiques d'*APC* són observades en un 5% dels focus de criptes aberrants, d'un 30% a un 70% en els adenomes esporàdics i fins al 72% en els tumors esporàdics, indicant que aquest succés és molt primerenc (Cottrell, et al., 1992; Miyaki, et al., 1994; Otori, et al., 1998). Aquests canvis, generalment, condueixen al truncament de la proteïna APC que tindrà la capacitat alterada per a dirigir la degradació de la proteïna β -catenina, la qual s'acumularà al citoplasma de la cèl·lula i el nucli, el que provocarà la desregulació de la via de senyalització de WNT, APC i β -catenina, i canvis en l'expressió en tot l'espectre de dianes de WNT (Bienz i Clevers, 2000). Així doncs, en els tumors CCR aquesta via està constitutivament activada, generalment per les mutacions en *APC* o en menys freqüència per mutacions a la pròpia β -catenina. Les mutacions somàtiques s'agrupen majoritàriament en la regió MCR (MCR, *Mutational cluster region*) de l'exò 15, entre els codons 1286 i 1513 (Miyoshi, et al., 1992). La hipermetilació del promotor d'*APC* també s'ha informat en el 18% dels carcinomes primaris de còlon i adenomes, representant un mecanisme alternatiu per a la inactivació del gen *APC* (Esteller, et al., 2000) que conduiria a una haploinsuficiència.

Les mutacions germinals en *APC* són les responsables de la FAP (Kinzler i Vogelstein, 1996). El desenvolupament dels seus adenomes, d'acord amb la hipòtesi de Knudson, és degut a què, a part de la mutació del gen *APC* a la línia germinal (*first hit*), les cèl·lules adquireixen una mutació

Introducció

somàtica addicional (*second hit*) a l'altre al·lel o bé pateixen LOH (Knudson, 1993). En els casos de FAP, tot i que, les mutacions germinals del gen *APC* es localitzen en tota la regió codificant, predominen les de la meitat 5' de l'exó 15 i en els exons 8 i 11. Els punts calents per a la producció de mutacions recurrents (*hotspot*) són el codó 1309 (18%) i el codó 1061 (12%) (Figura 21), (Lynch i de la Chapelle, 2003; Galiatsatos i Foulkes, 2006; Segditsas i Tomlinson, 2006).

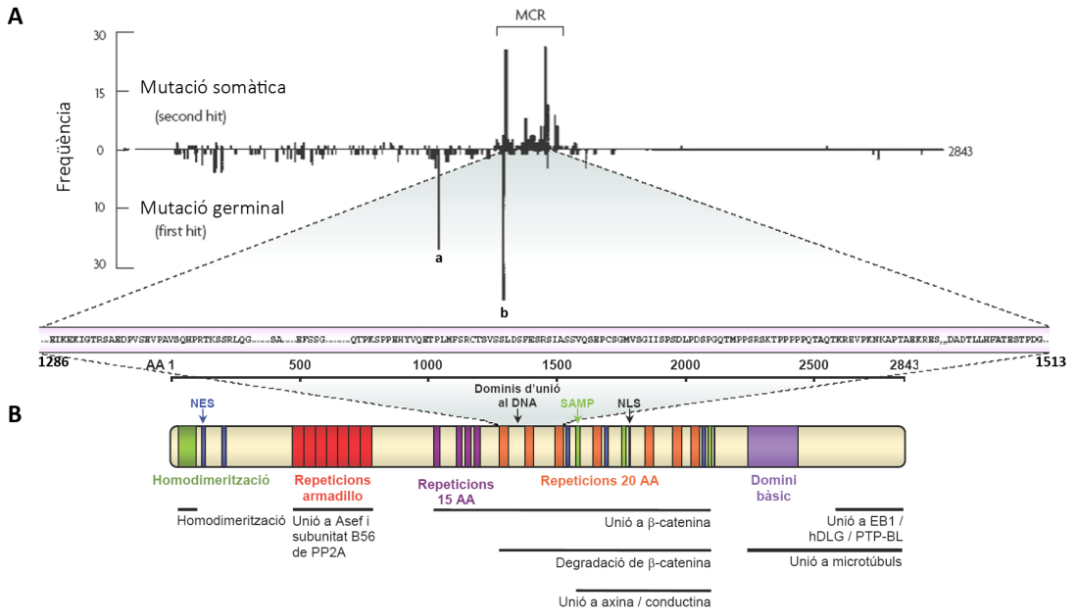


Figura 21. Esquema d'APC. A. Histograma de la freqüència de mutacions associades a la seqüència d'APC. Les mutacions germinals estan distribuïdes per tota la seqüència amb dos llocs d'elevada freqüència, els codons 1061(a) i 1309(b) associades amb FAP. Les mutacions somàtiques associades al MCR s'han observat en el CCR esporàdics. B. Dominis funcionals i interaccions de la proteïna APC. Adaptació de Klaus i Birchmeier, 2008.

Els mecanismes pel qual *APC* actua com a supressor de tumors segueixen sent una àrea d'investigació activa, amb diverses línies d'evidència que suggereix que té unes altres funcions a part de la regulació de la senyalització de WNT, que es considera la seva funció principal. La literatura actual apunta que *APC* controla la producció d'àcid retinoïc el qual, en part, es basa en el regulador transcripcional CtBP1 que suprimeix l'expressió intestinal de la retinol deshidrogenasa, i que és necessària per a la diferenciació intestinal (Nadauld, et al., 2006; Phelps, et al., 2009a). En un estudi recent s'ha vist que *APC* controla la destinació cel·lular intestinal, a través del canvi en la dinàmica de la metilació del DNA. *APC* salvatge (WT, *wild type*), juntament amb l'àcid retinoïc

regulen a la baixa la demetilasa, promovent així la metilació del DNA de gens clau i ajudant a les cèl·lules progenitores encarregades de la diferenciació (Rai, et al., 2010).

KRAS

L'oncogen *KRAS* (v-Ki-RAS2 homòleg de l'oncogen viral del sarcoma de la rata Kirsten) és membre de la família de protoncongens de *RAS*, està localitzat al braç curt del cromosoma 12 (12p12.1) i codifica per una petita proteïna d'unió a GTP (p21^{ras}). Aquesta proteïna actua com un transductor de senyal per l'intercanvi en el cicle d'unió a GDP (estat inactiu) i a GTP (estat actiu) en resposta a l'estimulació de receptors de superfície cel·lular com EGFR (Malumbres i Barbacid, 2003). La proteïna de *KRAS* activada es desactiva ràpidament per la hidròlisi intrínseca del GTP, la qual afavoreix el retorn a la forma inactiva.

Les mutacions del domini GTP (codó 12-13) o de la GTPasa (codó 61) produeixen un canvi en la seqüència d'aminoàcids, el resultat del qual, és la seva activació constitutiva. Les mutacions específiques en el gen *KRAS* codifiquen proteïnes mutades que es relacionen amb el desequilibri del control del creixement i supervivència cel·lular i, sembla que proporcionen a la cèl·lula tumoral un fenotip invasor (Figura 22), (Downward, 2003). Aquest gen es troba mutat en un 30%-60% tant en adenomes com en carcinomes colorectals (Grady i Markowitz, 2002; Santini, et al., 2008). Aquesta mutació es pensa que té lloc, sobretot, durant les primeres etapes de la progressió de l'adenoma (Barbacid, 1987), provocant el creixement tridimensional de l'adenoma primerenc (un 40-50% dels adenomes més grans d'1 cm contenen mutacions en els codons 12 i 13) i la seva transformació cap a adenoma intermedi amb característiques histològiques velloses (més del 90% dels adenomes vellosos contenen mutacions en aquest gen) (Capella, et al., 1991; Takayama, et al., 2001; Pretlow i Pretlow, 2005). Aquestes proporcions d'alteracions genètiques es mantenen en els carcinomes avançats (Tortola, et al., 1999; Esteller, et al., 2001). La naturalesa molecular de la mutació sembla influenciar l'agressivitat del tumor. En els adenomes existeix una major proporció de mutacions al codó 13 que en els carcinomes, el que suggereix aquests adenomes amb mutació al 13 tenen menys possibilitats de malignitzar (Shibata, et al., 1993). En estudis *in vitro* i *in vivo* s'ha pogut demostrar que les diferents mutacions confereixen diferents característiques a les cèl·lules tumorals (Al-Mulla, et al., 1999; Guerrero, et al., 2000; Vizan, et al., 2005; Cespedes, et al., 2006; Tejpar, et al., 2012).

Introducció

Com s'ha descrit anteriorment, les mutacions promouen la proliferació cel·lular i la supervivència independent de les senyals que arriben a receptors com EGFR. En el tractament del CCR avançat, es va descobrir que els pacients amb tumors portadors d'una mutació *KRAS* són molt menys propensos a respondre als anticossos que bloquegen la senyalització d'EGFR (Freeman, et al., 2008; Baldus, et al., 2010; De Roock, et al., 2010; Bando, et al., 2011). Aquestes troballes van portar a l'exigència de fer proves en les biòpsies dels tumors per a comprovar la presència de la mutació *KRAS* de CCR metastàtic i es va restringir l'ús dels anticossos monoclonals anti-EGFR, cetuximab i panitumumab, als pacients amb *KRAS* de tipus WT en els CCR metastàtic (Heinemann, et al., 2009; Linardou, et al., 2011). En un primer moment, això va representar un altre avenç efectiu cap al tractament personalitzat del càncer (Heinemann, et al., 2013). No obstant això, l'augment de la supervivència lliure de progressió en pacients amb tumors que són caracteritzats com a *KRAS* WT és modest (Amado, et al., 2008; Bando, et al., 2011; Molinari, et al., 2011; Pentheroudakis, et al., 2013) i, més important encara, amb el temps tots els pacients desenvolupen resistència al tractament i la recaiguda lligada a l'aparició de clons mutats (Misale, et al., 2012; Parsons i Myers, 2013).

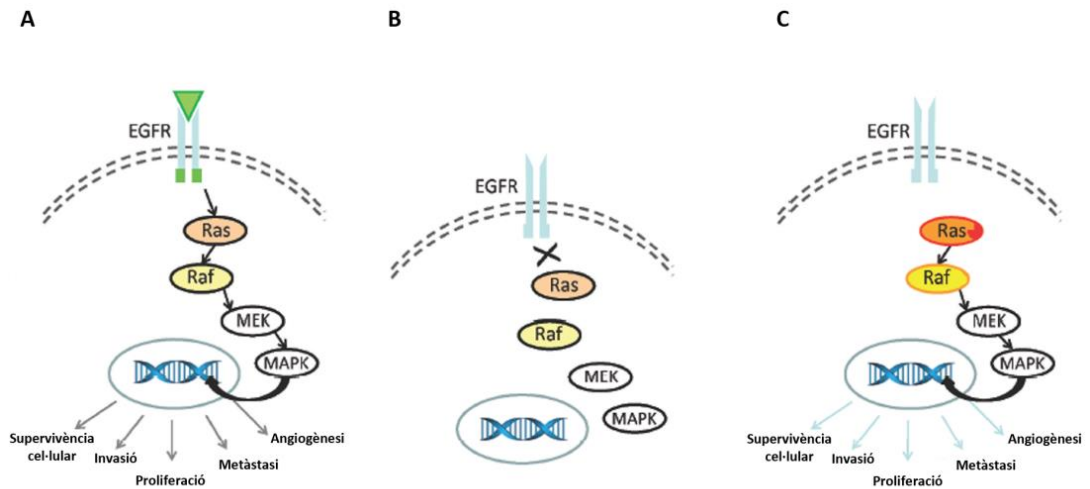


Figura 22. Via de senyalització de l'EGFR i activació constitutiva de RAS. **A.** Activació del receptor d'EGFR mitjançant factors de creixement i cascada de senyalització activada. **B.** Via inactiva, en absència de factors de creixement. **C.** Activació constitutiva de la via per la mutació de RAS. Adaptat de Bedeir i Krasinskas, 2011.

3.2.2. La via de la inestabilitat dels microsatèl·lits (MSI)

Els microsatèl·lits, també coneguts com a repeticions curtes en tàndem (STR, *short tandem repeats*), consten des d'uns pocs fins a diversos milers de motius repetits en tàndem formats per un (mono-) fins a sis (hexa-) nucleòtids i es creu que representen aproximadament el 3% del genoma (Ellegren, 2004). La seva hipervariabilitat juntament amb el seu alt grau d'heterozigositat els va fer ser els marcadors polimòrfics ideals per al mapatge del genoma, en la genètica de poblacions, i en estudis de lligament genètic, i es van utilitzar també com a eines indispensables en la medicina forense i en la medicina de trasplantaments ["empremta genètica" (*DNA fingerprint*)]. A causa de la seva estructura de seqüència repetitiva, els microsatèl·lits mostren una taxa particularment alta de mutació, en comparació amb trams de DNA no repetitius. Les polimerases de DNA durant la replicació del genoma nuclear, a causa del lliscament (*slippage*), sovint no els aconsegueixen duplicar correctament.

En eucariotes aquests errors són corregits pel sistema MMR: on els heterodímers MSH2/MSH6 i MSH2/MSH3 detecten l'error de replicació i recluten el complex MLH1/PMS2 a través del qual s'inicia la degradació del tram mutat i es produeix la resíntesi (Pena-Diaz i Jiricny, 2012). Tots aquests cooperen per exercir la seva funció principal, la reparació dels danys provocats durant la replicació del DNA, prevenint així que aquests errors o mutacions en el DNA no es mantinguin en les següents generacions. És per això, que la seva inactivació augmenta la taxa de mutació espontània (Gruber i Mukherjee, 2009).

Els defectes en el sistema MMR donen lloc a l'acumulació de tot el genoma de mutacions en els microsatèl·lits, provocant el que anomenem com a MSI que també ha estat referit com a "fenotip mutador" (Parsons, et al., 1993). Quan la inestabilitat produeix canvis en regions codificants es poden produir mutacions de canvi de pauta de lectura (*frameshift*), produint la inactivació funcional de les proteïnes afectades i proporcionant d'aquesta manera un avantatge selectiu de creixement a les cèl·lules deficientes del sistema MMR (Woerner, et al., 2005; Boland i Goel, 2010). Exemples de gens que contenen microsatèl·lits en les regions codificants que poden ser seleccionats en CCR amb MSI inclouen: gens relacionats amb la reparació del DNA (*RAD50*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *MLH1*, *BLM*, *PMS2*), l'apoptosi (*APAF1*, *BAX*, *BCL10*, *caspara-5*), transducció de senyals (*TGFβRII*, *ACTRII*, *IGFIIR*, *WISP-3*), cicle cel·lular (*PTEN*, *RIZ*), i factors de transcripció (*TCF-4*) (Figura 23), (Iacopetta, et al., 2010).

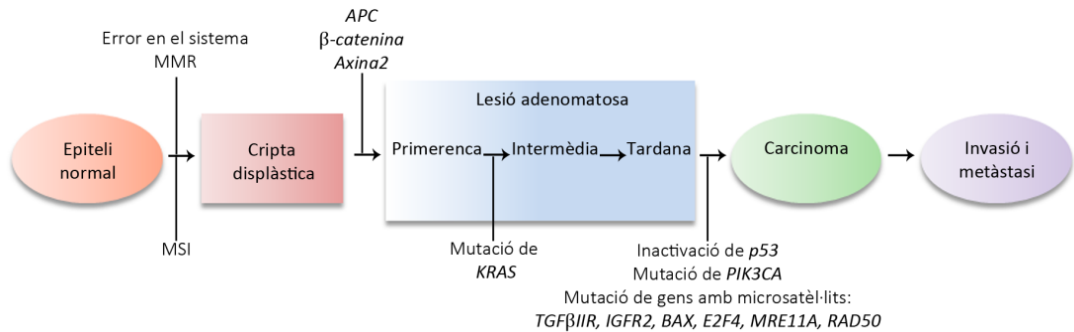


Figura 23. Via de la inestabilitat de microsatèl·lits associada a la Síndrome de Lynch. Adaptat de Vilar i Gruber, 2010.

El fenotip de MSI es produeix entre el 7 i el 15% de tots els casos de CCR. En la majoria dels casos (80%) s'associa a hipermetilació del promotor de *MLH1* i pèrdua d'expressió de la proteïna MLH1. *MLH1* conté una illa CpG gran en la seva regió promotora i està implicat tant en el desajust de reparació durant la replicació, com en la senyalització de danys en el DNA. Quan es produeix la metilació prop del lloc d'inici transcripcional a la petita regió proximal (regió C o D del promotor) del gen *MLH1*, és quan realment es produeix la reducció de l'expressió d'aquest gen (Figura 24), (Deng, et al., 1999; Cantwell-Dorris, et al., 2011).

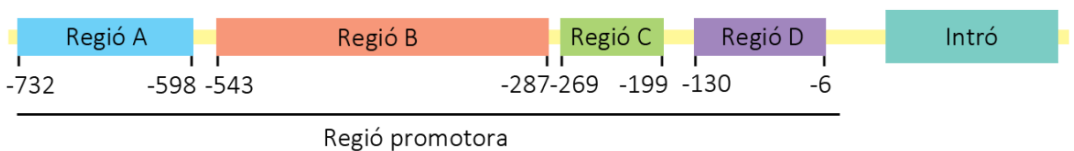


Figura 24. Esquema del promotor d'*MLH1*. Estan representades les quatre regions proposades per en Deng et al, 1999. La numeració de les parelles de bases es relaciona amb el codó d'inici d'*MLH1*.

El descobriment de MSI en la majoria de tumors CCR relacionats amb el Síndrome de Lynch (més d'un 95 %) (Aaltonen, et al., 1993; Ionov, et al., 1993; Pedroni, et al., 1999; Gonzalez-Garcia, et al., 2000) va permetre la identificació de les mutacions en la línia germinal dels gens del MMR en *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2*. Els heterozigots portadors d'una alteració en gens del MMR tenen un risc incrementat de per vida de desenvolupar càncers de l'espectre d'aquesta síndrome que

principalment són de CCR (25-70 %) i d'endometri (30-70 %) (Vasen, et al., 2013). La síndrome de Lynch es discutirà amb més detall en l'apartat en "4.3. Síndrome de Lynch (LS)".

La inactivació del sistema MMR via la metilació aberrant d'illes CpG del promotor del gen *MLH1* es solapa amb la tercer tipus d'instabilitat, l'anomenada via del fenotip metilador d'illes CpG (CIMP) que, a continuació expliquem amb més detall.

3.2.3. Via del fenotip metilador d'illes CpG (CIMP)

L'estudi de les alteracions epigenètiques que regulen l'expressió gènica en el càncer s'organitza en múltiples nivells i implica la metilació del DNA, modificacions de les histones, la remodelació de la cromatina i els RNA no codificants (Laird, 2005). Aquestes modificacions són d'interès per a les estratègies de prevenció del càncer, detecció i gestió, ja que poden estar presents en el teixit precancerós "normal" (Kaneda i Feinberg, 2005; Sakatani, et al., 2005; Kaneda i Yagi, 2011), i estan associades amb la iniciació i progressió del càncer (Baylin i Ohm, 2006; Feinberg, et al., 2006; Kaneda i Yagi, 2011).

L'alteració epigenètica més estudiada és la hipermetilació del DNA de les illes CpG que condueix al fet de silenciar transcripcionalment els gens (Soreide, et al., 2009). Les illes CpG són regions d'àcid nucleic que estan sovint situades proximalment al lloc d'inici de la transcripció de gens, en el promotor, que contenen una alta freqüència de dinucleòtids CG (Toyota, et al., 1999). En la majoria dels gens de mamífers, aquestes regions CpG es mantenen lliures de la metilació, o poden funcionar com a mecanisme epigenètic per a reprimir la transcripció de gens en processos cel·lulars normals. No obstant això, freqüentment en les cèl·lules canceroses, les illes CpG de diversos gens estan densament metilades, el que comporta la repressió de la transcripció. S'ha postulat que la carcinogènesi també pot estar condicionada per un procés caracteritzat per la metilació concomitant dels dinucleòtids CG de la regió promotora de múltiples gen: la via del fenotip metilador d'illes CpG (CIMP).

Encara que els determinants moleculars de la CIMP en les cèl·lules tumorals s'estan començant a dilucidar, el component més estudiat és la repressió de la transcripció de gens supressors de tumors i de reparació del DNA (Wong, et al., 2007). Aquest fet acaba implicant que l'expressió d'aquests gens en la cèl·lula de càncer pot ser reduïda o eliminada. La identificació de gens que estan específicament hipermetilats (el que resulta en silenciar l'expressió de gens) o hipometilats

Introducció

(el que resulta en l'augment de la transcripció) podria conduir al descobriment de nous factors que són importants per a la iniciació i la progressió del tumor (Wong, et al., 2007).

El CIMP es troba en aproximadament 20%-30% dels CCR (Ogino, et al., 2006) i alguns dels gens en els que s'ha identificat metilació en el promotor com a marcador d'aquesta via són *MLH1*, *MGMT*, *PTEN*, *DNMT3B*, així com altres gens implicats en la via de senyalització de WNT/APC/ β -catenina. El fet de silenciar la funció d'un gen supressor de tumors pot produir-se per la hipermetilació de promotors de les dues còpies d'un gen, o bé, una combinació de pèrdua d'un al·lel mitjançant deleció o mutació combinada amb la inactivació epigenètica de l'altra a través de la hipermetilació del promotor de l'altre al·lel. En revisions sistemàtiques sobre CIMP en CCR conclouen que no existeix un estàndard universal pel que fa a la definició de CIMP, dels seus subtipus (Grady and Carethers, 2008) i respecte a les connexions establertes entre la resta de vies com la MSI (Kang, 2011). D'altra banda, tampoc existeix un consens pel que fa als panells dels gens inactivats que determinen aquest fenotip, o els llindars dels marcadors o en les tècniques per a la detecció de la metilació del DNA que s'utilitza per a definir cada fenotip. No obstant això, el problema més important per a poder arribar al fons del coneixement és que desconexim la causa biològica del CIMP en CCR (Figura 25), (Hughes, et al., 2012).

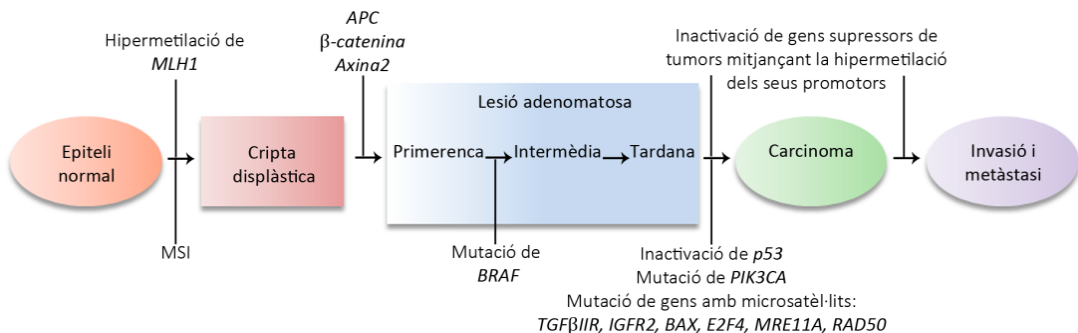


Figura 25. Esquema de la via del fenotip metilador associada a tumors esporàdics amb inestabilitat. Adaptat de Vilar i Gruber, 2010.

Mutació de *BRAF* i hipermetilació del promotor d'*MLH1*

Un esdeveniment relativament primerenc associat als tumors CIMP és la mutació en el protooncogen *BRAF* (V-RAF homòleg B1 de l'oncogen viral del sarcoma murí) que es troba al

voltant del 10% al 20% dels CCR (Weisenberger, et al., 2006). *BRAF* es troba situat en el braç llarg del cromosoma 7 (7q34) i codifica per una cinasa serina/treonina citoplasmàtica de la família RAF que, al igual que *KRAS*, és membre essencial de la ruta de senyalització de proteïnes cinases activades per mitògens. L'activació d'aquesta via produeix la fosforilació de *BRAF* que activa, constitutivament, *MEK* i *ERK* iniciant així un gran nombre de mecanismes cel·lulars implicats en la regulació cel·lular, el creixement, la diferenciació i la promoció de la apoptosi (Figura 26), (Ciampi i Nikiforov, 2005).

Les mutacions oncogèniques en el gen *BRAF* destrueixen el domini cinasa, el que es tradueix en una activació constitutiva de la proteïna. S'han detectat més de 30 mutacions en la seqüència codificant del gen *BRAF*, però en la seqüència que codifica el domini cinasa, en l'exó 15, es troba el *hotspot* que acumula més del 90% de les alteracions localitzades en el gen *BRAF*. La mutació consisteix en la substitució d'una valina per una molècula d'àcid glutàmic en el residu 600 (V600E). La proteïna resultant incrementa aproximadament 500 vegades la seva activitat cinasa en comparació amb el de tipus WT de *BRAF* (Wan, et al., 2004; Cantwell-Dorris, et al., 2011) i s'associa amb el desenvolupament i el manteniment de fenotips transformats i invasors en les cèl·lules epitelials de còlon (Minoo, et al., 2007).

La mutació *BRAF* és 3 vegades més freqüent en els tumors MSI, en comparació amb els tumors estables (Rajagopalan, et al., 2002; Cantwell-Dorris, et al., 2011). Aquesta mutació es detecta en aproximadament el 12-15% dels CCR esporàdics, així com en lesions premalignes, en els pòlips hiperplàstics i a primeres etapes del desenvolupament del CCR.

També s'ha descrit que les mutacions de *BRAF* són mútuament excloents respecte a les mutacions *KRAS* (Fransen, et al., 2004; Velho, et al., 2008). Existeix una forta relació entre la mutació *BRAF* i el fenotip CIMP en el CCR (Weisenberger, et al., 2006; Velho, et al., 2008). Paral·lelament, el fenotip CIMP està relacionat amb una elevada MSI (MSI-H, *MSI-high*) i també aquests tipus de CCR mostren metilació del promotor d'*MLH1*.

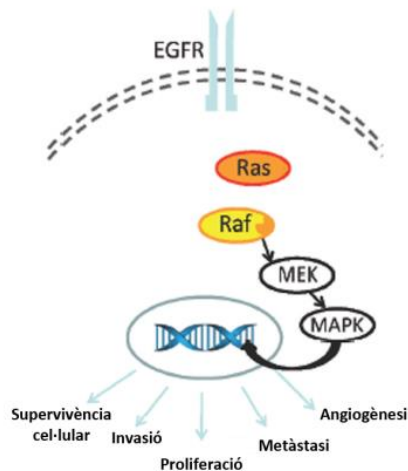


Figura 26. Activació constitutiva de la senyalització de la via per la mutació de *BRAF*. Adaptat de Bedeir i Krasinskas, 2011.

S'ha descrit que les mutacions de *BRAF* juntament amb la inactivació de la proteïna *MLH1* són freqüents en lesions precursors de tumors que sorgeixen a través de la via de la neoplàsia serrada (Noffsinger, 2009; Snover, 2011), i tenen clarament una histologia diferencial en comparació amb tumors derivats de la tradicional via d'adenoma-carcinoma (Snover, 2005; Snover, et al., 2005; East, et al., 2008; Snover, 2011). De fet, s'ha observat que al còlon dret, la via de la neoplàsia serrada s'associa sovint a la MSI, la hipermetilació del promotor de *MLH1* i la mutació *BRAF* (V600E), mentre que del costat esquerre la neoplàsia està associat a la via tradicional amb inestabilitat cromosòmica (CIN) i les mutacions del gen *KRAS* (Arends, 2013). Com veurem en l'apartat "5.2.4. Refinant la selecció: hipermetilació del promotor del gen *MLH1* i la detecció de la mutació V600E en el gen *BRAF*", són poc freqüents en la síndrome de Lynch (Iacopetta, et al., 2006).

3.2.4. Els estudis genòmics d'alt rendiment validen aquestes vies

En un estudi recent es va analitzar un elevat panell de mostres parellades d'adenocarcinomes i de mucoses normals mitjançant l'ús de tecnologies de gran sensibilitat i va fer possible establir dos perfils mutacionals clarament diferencials associats a la carcinogènesi del CCR (The Cancer Genome Atlas Network, 2012). Es van agrupar perfils de tumors no hipermutats (85%), els quals

tenien de mitja menys de 8,24 mutacions per cada 10^6 de bases analitzades, i els tumors hipermutats (15%), amb una taxa mitja de més de 12 mutacions per cada 10^6 de bases estudiades.

Els tumors no hipermutats presentaren més freqüentment mutats els gens *APC*, *TP53*, *KRAS*, *PIK3CA*, *FBXW7*, *SMAD4*, *TCF7L2* i *NRAS* entre d'altres. En canvi, els tumors amb hipermutació presenten altres gens mutats com *ACVR2A*, *APC*, *TGFBR2*, *MSH3*, *MSH6*, *SLC9A9* i *TCF7L2*, així com mutacions en *BRAF*. En general, tres dels gens que són més freqüentment mutats en els càncers no hipermutats, es van detectar en menys freqüència associats a tumors hipermutats: *APC* (81% contra 51%), *KRAS* (43% contra 30%) i *TP53* (60% contra 20%). En contrast, les mutacions en els gens de senyalització *TGF-β* i *BRAF* van ser dramàticament més elevades en els tumors hipermutats. Aquestes troballes indiquen que els tumors hipermutats i els no hipermutats progressen a través de diferents seqüències d'esdeveniments genètics (The Cancer Genome Atlas Network, 2012).

Com a complement a aquest estudi inicial, es van avaluar les característiques concretes del subgrup amb hipermutació, doncs es detectaren diferències addicionals en el perfil mutacional (Donehower, et al., 2013). La majoria dels CCR hipermutats es distingien per presentar altes taxes de metilació del promotor del gen *MLH1* i una elevada MSI. Es demostrà en aquest estudi que els CCR hipermutats podien, subseqüentment, subdividir-se en dos grups diferencials: el que ha silenciat *MLH1* mitjançant la metilació del seu promotor i el que no pateix aquest mecanisme d'inactivació transcripcional.

Els CCR hipermutats amb metilació del promotor d'*MLH1* mostren una elevada MSI, un baix nombre de mutacions en *APC* i unes taxes elevades de mutacions en *BRAF V600E*. Cal destacar que la poca freqüència de mutació en *APC* no van ser acompanyades per un increment en les taxes de mutació en altres reguladors de la via de *WNT*, fet que suggereix que aquests tumors no s'inicien ni progressen mitjançant aquesta via. Per contra, la presència freqüent de mutacions en l'oncogen *BRAF V600E* pot estar indicant que aquest esdeveniment és un motor clau per a la proliferació de cèl·lules tumorals.

En l'altre grup de CCR hipermutats sense la inactivació epigenètica del promotor d'*MLH1* presenten una elevada taxa de mutacions, així com una gran incidència de mutacions en els gens *KRAS* i *APC*, però no en el gen *BRAF*. Els autors apunten que ambdós grups presenten aquestes divergències perquè en la gènesi tumoral segueixen diferents vies. Els autors suggereixen que la

Introducció

senyalització d'un creixement positiu en el cas dels CCR hipermutats amb *MLH1* inactivat per metilació ve impulsada, en part, per l'activació de *BRAF*, mentre que la proliferació en els CCR sense la inactivació epigenètica d'*MLH1* és impulsada, en gran part, per un augment de senyalització de la via de *WNT* i de *RAS* (The Cancer Genome Atlas Network, 2012; Donehower, et al., 2013).

Per una altra banda en un altre estudi del grup de Vermeulen (De Sousa, et al., 2013b), publicat recentment, es van dur a terme perfils d'expressió gènica de mostres de CCR humans. A través d'un total de 1.100 mostres de CCR, els investigadors van definir tres subtipus de càncer de còlon: el subtipus 1, que mostra característiques del grup CIN; el subgrup 2, que consisteix enterament a un grup amb MSI i CIMP, i un altre grup totalment nou, el subtipus 3, que estava relacionat amb els adenomes sèssils serrats i es van correlacionar amb un pronòstic molt desfavorable i amb una mala resposta clínica al tractament amb cetuximab, independentment de l'estat mutacional de *KRAS*.

4. DESCRIPCIÓ DELS TIPUS DE CCR HEREDITARI MÉS FREQUËNTS

La FAP, la MAP i la LS són els tres grans tipus coneguts de càncer colorectal hereditari, representant fins a un 5% de tots els casos de càncer de còlon. Tots ells han estat objecte d'estudi en aquesta tesi, i és per aquest motiu que es farà una breu descripció de les característiques clíniques i de les pautes diagnòstiques de cadascuna d'elles.

4.1. Poliposi adenomatosa familiar (FAP) i atenuada (AFAP)

La poliposi adenomatosa familiar és una síndrome hereditària autosòmica dominant, que afecta a 1 de cada 12.000 persones i representa aproximadament entre l'1 i el 0,5% de tots els CCR (Lynch i de la Chapelle, 2003; Rustgi, 2007). La seva forma clàssica (FAP) es caracteritza per presentar més de 100 adenomes en el còlon o en el recte diagnosticats en la segona o tercera dècada de vida (Vasen, et al., 2008) encara que, com a molt, un parell d'adenomes progressen a CCR (Lynch i de la Chapelle, 2003; Rustgi, 2007). Com que la penetrància s'acosta al 100% en pacients amb FAP no tractats, amb una edat mitjana de diagnòstic de 36 anys (Galiatsatos i Foulkes, 2006), la colectomia profilàctica, quan el maneig dels pòlips no és possible per colonoscòpia, segueix sent el pilar de la seva gestió clínica. Si no s'eliminen aquests pòlips, mitjançant la colectomia profilàctica total o parcial, aquests evolucionaran cap a la malignitat donant lloc a un carcinoma colorectal a partir dels 40 anys (Fearnhead, et al., 2001; Lynch i de la Chapelle, 2003). Un 70% dels individus afectes amb FAP presenten manifestacions extracolòniques com lesions cutànies, adenomes gastroduodenals, osteomes, anomalies dentals, hipertròfia congènita de l'epiteli pigmentari de la retina, tumors desmoides, i càncers extracolònics (de fetge, pàncrees, gàstric i intestí prim, tiroides i de sistema nerviós central) (Groen, et al., 2008). Algunes d'aquestes manifestacions extracolòniques són la major causa de mortalitat en els pacients de FAP després de la cirurgia (Fearnhead, et al., 2001). Fins un 25% dels casos de FAP sembla ser causats per mutacions *de novo* de la línia germinal i, per tant, no mostren el patró característic d'herència autosòmica (Galiatsatos i Foulkes, 2006).

Hi ha una variant atenuada de FAP, anomenada AFAP i es caracteritza per un inici posterior de la malaltia en comparació amb la FAP clàssica i un menor nombre de pòlips adenomatosos, entre 10 i 99 (Kinzler K. W., 1998; Knudsen, et al., 2010). Aquests pòlips adenomatosos són més propensos a ocórrer en el còlon dret, són d'evolució menys agressiva que la FAP clàssica i d'aparició més tardana. L'expressió fenotípica sovint és variable inter i intrafamiliar (Burt, et al., 2004). La

Introducció

presència i la incidència de trastorns extraintestinals són similars als de la FAP clàssica però són més poc freqüents. Mentre que les característiques fenotípiques són sovint indistingibles d'aquelles identificades en la poliposi associada a *MUTYH* (que serà descrit en el següent apartat), el terme AFAP avui en dia s'utilitza generalment per indicar els casos amb fenotip atenuat secundaris a mutacions del gen *APC*.

Per tant, FAP i AFAP són variants fenotípiques dins de l'espectre clínic causat per mutacions germinals en el gen *APC*. Aquesta variabilitat és atribuïble, en gran mesura, als diferents efectes de les mutacions en *APC*, i s'han establert correlacions genotip-fenotip (Friedl i Aretz, 2005). Més del 95% de les mutacions conegudes són mutacions que donen lloc a una proteïna truncada a la regió C-terminal [mutacions que provoquen l'aparició directa d'un codó de terminació, (*nonsense*), (~30%) o, mutacions que provoquen el desplaçament de la pauta de lectura al produir-se insercions o delecions d'una o diverses bases (*frameshift*), (~68%)] (Galiatsatos i Foulkes, 2006; Segditsas i Tomlinson, 2006). En un alt nombre d'adenomes de còlon es presenta una de les mutacions recurrents dels codons 1309 (17%) i 1061 (11%), representant aproximadament el 30% del total mutacions descrites en la línia germinal *APC*.

La resta són mutacions que amb un sol canvi provoquen l'aparició d'un nou codó que codifica per un aminoàcid diferent al de la proteïna original (*missense*), mutacions que impedeixen el correcte processament del mRNA provocant l'aparició d'una proteïna truncada, o bé modificant un domini o regió reguladora important per a la seva funció (*splicing*) o grans delecions (Montera, et al., 2001; Sieber, et al., 2002; Aretz, et al., 2004; Castellsague, et al., 2008). En canvi, en les famílies AFAP, les mutacions *missense* representen més de la meitat de les mutacions detectades, i les grans delecions es troben en rares ocasions.

Existeix un cert grau de correlació entre els llocs de mutacions genètiques específiques i les manifestacions clíniques de la malaltia (Nagase, et al., 1992; Galiatsatos i Foulkes, 2006; Nieuwenhuis i Vasen, 2007). La ubicació de la mutació es relaciona amb l'edat mitjana d'inici de símptomes. Els pacients amb una mutació en el codó 1309 tenen una edat mitjana de manifestació de la malaltia de 20 anys, una mutació entre els codons 168 i 1580 (excloent el 1309) dona lloc a una edat mitjana d'aparició de 30 anys; mutacions a l'extrem 5' del codó 168 i a l'extrem 3' del codó 1580 comporten l'aparició de les alteracions fenotípiques a una mitjana d'edat de 52 anys (Friedl, et al., 2001). Altres correlacions entre el lloc de la mutació i el fenotip inclouen la poliposi colorectal profusa en mutacions entre els codons 1250 i 1464 (Nagase, et al., 1992); tumors

desmoides, osteomes i quists epidèrmics en mutacions entre els codons 139 i 1493 (Wallis, et al., 1999); tumors desmoides s'associen a mutacions distals del codó 1444; i hipertròfia congènita de l'epiteli pigmentari de la retina en mutacions entre els codons 311 i 1444 (Nieuwenhuis i Vasen, 2007).

Els pacients amb poliposi atenuada tendeixen a presentar mutacions germinals en tres regions característiques del gen *APC*: abans del codó 157 (extrem 5'), a l'exó 9 i després del codó 1595 (extrem 3'), (Spirio, et al., 1993; Soravia, et al., 1998). Tot i que pot haver una correlació mitjana entre un genotip i fenotip específica, existeix gran heterogeneïtat en l'expressió de la malaltia, fins i tot, entre pacients amb mutacions idèntiques. La influència del micro i del macroambient podria explicar, en part, aquestes diferències. S'ha posat de manifest que hi pot haver diferències acusades en el fenotip de dos bessons del mateix sexe, i aquest fet només es podria explicar per la presència de gens modificadors (Houlston, et al., 2001).

Aproximadament entre el 70 i 80% dels adenomes i carcinomes colorectals esporàdics tenen mutacions somàtiques que inactiven *APC*. Les mutacions somàtiques d'*APC* són un dels primers esdeveniments en la progressió tumoral. Com es va predir pel model de Knudson tots dos al·lels d'*APC* semblen ser inactivats en els adenomes i carcinomes que sorgeixen en els pacients amb FAP, així com en els adenomes i carcinomes colorectals esporàdics (Knudson, 1971; Knudson, 1993).

Ara bé, s'ha descrit que la localització de la mutació germinal condiciona el tipus de mutació somàtica d'*APC* (Lamlum, et al., 1999; Rowan, et al., 2000; Sieber, et al., 2006), fet que suposa una variació significativa de la hipòtesi de Knudson doncs pressuposava que les dues mutacions són independents. Així doncs, si la mutació germinal es troba entre els codons 1194 i 1392, llavors hi ha una pèrdua de l'al·lel WT com a segon *hit*. Si la mutació germinal es troba fora d'aquesta regió, llavors el segon *hit* és una mutació truncant a la regió MCR.

En la figura 27 es mostra l'algoritme diagnòstic que es segueix al Programa de Càncer Hereditari de l'Institut Català d'Oncologia i que engloba un equip multidisciplinar tant de la Unitat de Consell Genètic com del Programa de Diagnòstic Molecular de Càncer Hereditari, per a la identificació d'aquests pacients i la detecció de mutacions causants de la patologia (Figura 27).

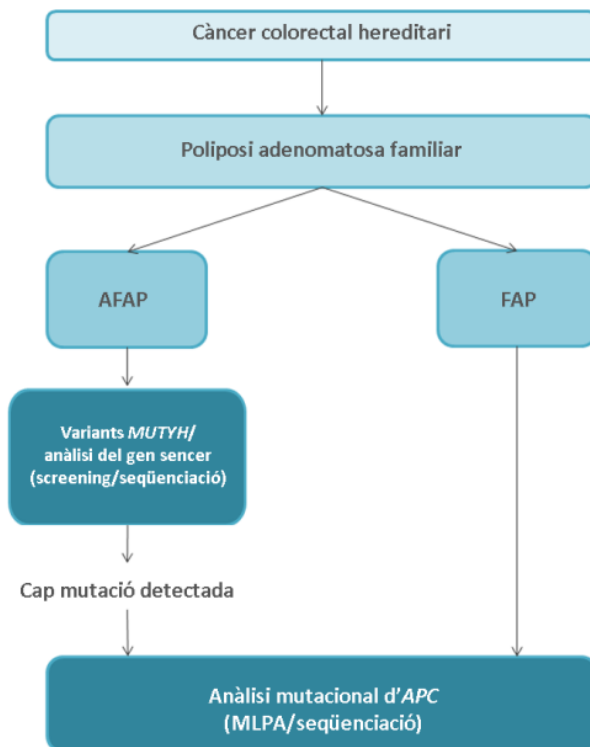


Figura 27. Algoritme diagnòstic per la poliposi adenomatosa familiar i la poliposi associada a *MUTYH*. Davant d'una família amb poliposi clàssica es procedeix directament a l'anàlisi mutacional del gen *APC* (primer, mitjançant MLPA, s'estudien les possibles grans delecions, i posteriorment, es realitza la seqüenciació de la regió codificant sencera). Si el patró és recessiu o la clínica és atenuada, primer es fa l'anàlisi mutacional del gen *MUTYH* i, si no es detecta cap mutació, es procedeix a l'estudi d'*APC*.

4.2. Poliposi associada a *MUTYH* (MAP)

L'any 2002, Al-Tassan i col·laboradors van determinar que alguns pacients amb poliposi sense mutació identificada en *APC*, són portadors de mutacions germinals bial·lèliques en el gen *MUTYH* [homòleg mutY (*Escherichia coli*)] (Al-Tassan, et al., 2002). La MAP, es va caracteritzar com una malaltia hereditària autosòmica recessiva, amb un fenotip indistingible de FAP (Al-Tassan, et al., 2002).

El gen *MUTYH* [localitzat en el cromosoma 1p34.3-1p32.1 (Slupska, et al., 1996)] codifica per un enzim DNA glicosilasa implicat en la reparació del DNA (BER, *Base Excision Repair*) danyat per espècies reactives d'oxigen (Ohtsubo, et al., 2000; Cheadle i Sampson, 2003). La lesió mutagènica 7,8-dihydroxi-8-oxoguanina (8-oxo-G), la qual té un alt potencial per a produir errors durant la

replicació del DNA (Shibutani, et al., 1991; Tchou, et al., 1991) s'aparella amb adenines (A) en lloc de citosines (C) durant la replicació del DNA, provocant transversions genètiques de guanina:citosina per timina:adenina (G:C>T:A). Normalment, MUTYH detecta aquest error i el repara escindint les adenines mal aparellades. Els gens *OGG1*, *MUTYH* i *MTH1* cooperen per prevenir mutacions somàtiques induïdes per 8-oxo-G a les cèl·lules humanes. A més, s'ha descrit la participació de MUTYH sota estrès oxidatiu, en l'activació de vies de mort cel·lular programada (Oka i Nakabeppu, 2011). D'aquesta manera la manca de funció d'aquest enzim augmentaria la taxa de mutacions somàtiques del tipus transversions, tal com ha estat demostrat en el gen *APC* i escaparia de la mort cel·lular programada, permetent el desenvolupament tumoral (Al-Tassan, et al., 2002).

La majoria dels pacients MAP tenen menys de 100 adenomes en el moment del diagnòstic, amb una edat mitjana d'uns 45 anys i desenvolupen CCR a una edat mitjana d'uns 50 anys (Out, et al., 2010). Ara bé, les característiques clíniques dels MAP varien (Morak, et al., 2010). El 60% dels pacients MAP tenen CCR en el moment del diagnòstic i alguns en absència de pòlips sincrònics (Nielsen, et al., 2009). El tumors CCR dels MAP mostren algunes similituds amb els càncers MSI, amb una ubicació proximal preferencial, una alta taxa d'histologia mucinosa i una major presència de limfòcits infiltrants del tumor (Nielsen, et al., 2009). Diversos estudis han reportat lesions extracolòniques en pacients MAP, sobretot en el tracte gastrointestinal superior (Aretz, et al., 2006; Nielsen, et al., 2006), sent totes relativament comunes en MAP. Fenotípicament, però, el fenotip MAP pot no ser distingit de FAP o d'AFAP. Per tant, les proves genètiques pel gen *MUTYH* s'ha de fer en pacients amb sospita de FAP o AFAP que són negatius per a les mutacions de la línia germinal d'*APC* (Al-Tassan, et al., 2002).

Fins a un 30% dels casos *APC* negatius són secundaris a mutacions bial·lel·liques en *MUTYH* (Cleary, et al., 2009). Fins al dia d'avui, >300 variants úniques de *MUTYH* entre els pacients i/o controls de MAP s'han descrit a la base de dades LOVD, (Out, et al., 2010) sent les variants c.536A>G; p.Tyr179Cys i c.1187G>A; p.Gly396Asp les mutacions més comunament documentades en poblacions caucàsiques (Al-Tassan, et al., 2002; Gismondi, et al., 2004; Isidro, et al., 2004) trobant-les en més de 80% de pacients caucàsics amb MAP (Sampson, et al., 2003; Gismondi, et al., 2004; Venesio, et al., 2004) i representen aproximadament el 60% dels al·lels MAP reportats (Out, et al., 2010). Els homozigots per Y179C tenen un inici de la malaltia més primerenc i fenotips més greus en comparació amb els homozigots G396D (Nielsen, et al., 2009). Per una altra banda, s'han

suggerit diferències ètniques i geogràfiques en els patrons de les mutacions del gen *MUTYH* (Sampson, et al., 2003; Yanaru-Fujisawa, et al., 2008). La majoria de les variants *MUTYH* són mutacions *missense* i els seus efectes sobre la funció de la proteïna poden ser difícils de predir quan està present en homozigosis i, encara més, quan presenten una heterozigositat composta. El portadors de mutacions bial·lèliques en *MUTYH* veuen incrementat el risc a patir CCR en 28 vegades (Theodoratou, et al., 2010).

En l'estudi molecular dels pacients portadors de la mutació bial·lèlica de *MUTYH* s'observa una elevada freqüència de transversions G:C a T:A en *APC* i en *KRAS* (Jones, et al., 2002; Lipton, et al., 2003; Nielsen, et al., 2009), però no en els gens *TP53* i *SMAD4*. Això pot indicar un efecte predominant de *MUTYH* en una fase primerenca del CCR carcinogènesi (Nielsen, et al., 2009). A més, els adenomes sèssils serrats/pòlips són comuns en els pacients MAP. La detecció exclusiva de les transversions G:C a T:A en el gen *KRAS* dels pòlips sèssils serrats suggereix fortament que aquests estan causalment relacionats amb una deficiència en *MUTYH* (Boparai, et al., 2008).

En la figura 27 es mostra com s'identifiquen aquestes mutacions dins l'algoritme diagnòstic de la poliposi (Figura 27). Com ja hem explicat, les vies moleculars de les poliposis relacionades amb *APC* i *MUTYH* convergeixen a nivell somàtic, atès que la disfunció de la *MUTYH* augmenta la taxa de mutacions somàtiques en el gen *APC*, la qual cosa, a la vegada, dóna lloc a la transformació neoplàsica.

4.3. Síndrome de Lynch (LS)

La LS, anteriorment denominada com a càncer colorectal hereditari no associat a poliposi (HNPCC, *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*), (Jass, 2006) és una malaltia hereditària autosòmica dominant, de penetrància incompleta, secundària a mutacions en la línia germinal en un dels gens de reparació del DNA del sistema MMR: *MLH1* (cromosoma 3p21.3) (Bronner, et al., 1994), *MSH2* (cromosoma 2p22-21) (Leach, et al., 1993), *MSH6* (cromosoma 2p16) (Akiyama, et al., 1997; Miyaki, et al., 1997), i *PMS2* (cromosoma 7p22.2); o deleccions constitucionals de l'extrem 3' d'*EPCAM* (cromosoma 2p21) també conegut com *TACSTD1* (Kovacs, et al., 2009; Ligtenberg, et al., 2009). També s'han descrit associacions amb altres gens reparadors com *MLH3*, *PMS1*, *EXO1* (Peltomaki, 2005) i *TGFβRII* (Hegde, et al., 2013).

La LS és la síndrome de CCR hereditària més comuna, representant aproximadament entre l'1% i el 3% de tots els casos, (Aaltonen, et al., 1994; Burt, et al., 1995; Salovaara, et al., 2000; de la Chapelle, 2005; Hampel, et al., 2005; Hampel, et al., 2008) i entre un 10% i un 15% dels CCR diagnosticats abans dels 50 anys (Aaltonen, et al., 1994; Burt, et al., 1995; Hopper, 2005). En diferents estudis poblacionals a Espanya es va detectar que la síndrome de Lynch representava entre el 0,9%-3% dels casos de CCR (Pinol, et al., 2005; Moreira, et al., 2012). Les estimacions indicades de freqüència de portadors de les mutacions de la línia germinal d'aquests gens en la població varien aproximadament a partir d'1 de cada 300 fins a 1 de cada 3000 (Dunlop, et al., 2000; Salovaara, et al., 2000; Terdiman, 2001; de la Chapelle, 2005; Pinol, et al., 2005; Boland i Shike, 2010; Hampel i de la Chapelle, 2011). S'ha estimat que a Europa aproximadament un milió de persones són portadores d'un defecte en els gens del sistema MMR (Vasen, et al., 2010). Els portadors d'una mutació en un dels gens MMR tenen un risc alt, però variable, de desenvolupar CCR (25-70%), càncer d'endometri (30-70%) i també un major risc de desenvolupar altres tumors (estómac, ovari, urèter, pelvis, renal, cervell, intestí prim i el tracte hepatobiliar). Addicionalment, els portadors de mutacions també poden estar en major risc de càncer del pàncrees (Kastrinos, et al., 2009; Win, et al., 2012b), de pròstata (Raymond, et al., 2013), mama (Win, et al., 2012a; Win, et al., 2012b; Win, et al., 2013) i cèrvix (Dowty, et al., 2013).

Les principals característiques clíniques són: una aparició a edat primerenca (Umar, et al., 2004), el tumor sol ser mucinos, amb una localització preferent en el còlon dret i també s'ha associat a la presentació de múltiples tumors tant sincrònics com metacrònics. En contrast amb els pacients amb FAP, els pacients amb LS desenvolupen menys adenomes a una edat més avançada, però aquestes lesions precursoras evolucionen més ràpidament a través de les etapes de la carcinogènesi. En relació amb el CCR esporàdic, els adenomes i carcinomes en la LS es produeixen amb més freqüència (Pinol, et al., 2005; Poonacha i Go, 2011; Bellcross, et al., 2012; Moreira, et al., 2012; Benson, et al., 2013; Jackson, et al., 2013).

Els gens MMR funcionen generalment com a gens supressors de tumors clàssics (Imai i Yamamoto, 2008). Per tant, la persona afecte de síndrome de Lynch té una mutació en la línia germinal de pèrdua de funció en qualsevol gen MMR: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* o *PMS2* (el primer cop, *first hit*). S'han reportat mutacions *de novo* recentment amb una taxa de mutació de ~1,6% (Win, et al., 2011). També s'han identificat epimutacions en una proporció petita (1%) dels casos (Pineda, et al., 2012) En tumors de LS, la inactivació somàtica de l'al·lel de tipus WT restant, pot tenir lloc a

causa de diversos mecanismes: la pèrdua d'heterozigositat (LOH), la mutació somàtica, la conversió de gènica i la metilació del promotor (Tomlinson, et al., 2001; Imai i Yamamoto, 2008).

4.3.1. Els gens MMR

Els gens MMR estan involucrats en nombroses funcions cel·lulars, incloent la reparació d'errors de la síntesi del DNA, la seva funció principal; la reparació de trencaments de doble cadena de DNA i la regulació de l'apoptosi. En absència d'una funció correcta de MMR es produeix un increment de la taxa de mutació de 100 a 1000 vegades i una resistència a la mort cel·lular programada.

El gen *MSH2*, es localitza al cromosoma 2 (2p21), té 159.343 bases de longitud i consta de 16 exons codificants. La proteïna traduïda conté 934 aminoàcids, forma un heterodímer amb qualsevol de les proteïnes MMR, *MSH6* o *MSH3* i funciona per identificar desajustos. El gen *MSH6*, localitzat en la regió cromosòmica 2p16, té 23.871 bases de longitud i consta de 10 exons codificants. La proteïna traduïda conté 1.360 aminoàcids. S'ha proposat un model de "pinça lliscant" per descriure l'estructura de l'heterodímer que detecta els desajustos al llarg del DNA (Figura 28).

El gen *MLH1*, es localitza en el braç llarg del cromosoma 3 (3p21.3), té 72.558 bases de longitud i consta de 19 exons codificants. La proteïna traduïda conté 756 aminoàcids i dimeritza amb el producte de proteïna del gen *PMS2*. El gen *PMS2* es troba en el braç llarg del cromosoma 7 (7p22,2), té 35.887 bases de longitud i consta de 15 exons codificants. La proteïna traduïda conté 862 aminoàcids i dimeritza amb la proteïna *MLH1*. El gen *PMS2* té almenys 15 pseudogens, que tenen una alta homologia amb el gen actiu (De Vos, et al., 2004). Els heterodímers *MLH1/PMS2* coordinen la unió d'altres proteïnes implicades en el sistema MMR, incloent les helicases, la proteïna codificada per *EXO1*, antígen nuclear de cèl·lules en proliferació, la proteïna d'unió al DNA d'una sola cadena (RPA, *Replication protein A*), i polimerases de DNA (Figura 28).

Aproximadament el 50% de les mutacions es troben en el gen *MLH1* i 40% estan en el gen *MSH2*. Les mutacions en *MSH6* representen ~7-10% de les famílies amb LS, i les mutacions en *PMS2* són responsables de <5% de les famílies Lynch. Sobre 1-3% de les mutacions es troben en el gen *EpCAM*. Les proporcions de *MSH6*, *PMS2* i *EpCAM* són estimacions doncs resulten molt variables entre els diferents estudis (Nicolaidis, et al., 1994; Genuardi, et al., 1998; Lynch, 2009; Giraldez, et al., 2010; Talseth-Palmer, et al., 2010; Duraturo, et al., 2011).

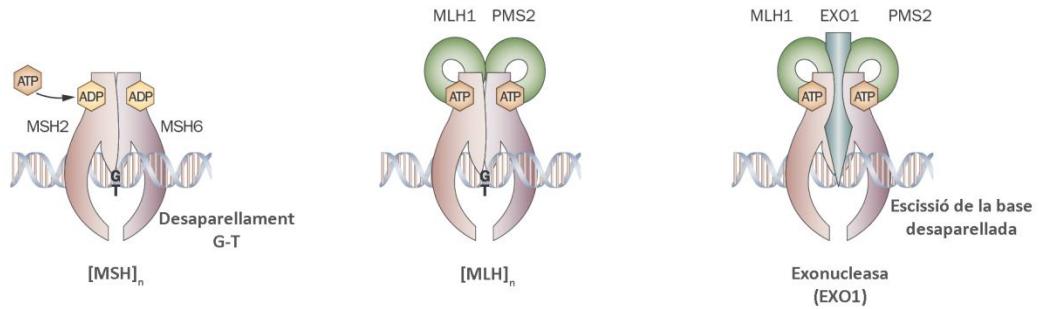


Figura 28. Model del mecanisme proposat per les proteïnes del sistema MMR, que il·lustren patrons d'heterodimerització de rellevància clínica. Quan el desparellament és detectat, MSH2 s'associa amb PMS2, PMS1 o MLH3. El reconeixement dels desparellaments i dels bucles d'inserció o deleció, es du a terme per l'acció d'un complex d'una MutS i una MutL. L'escissió del desparellament es realitza mitjançant proteïnes com l'exonucleasa 1 i l'antigen nuclear de proliferació cel·lular (PCNA). El procés de resíntesi i relligament de la cadena de DNA té lloc per l'acció de la DNA polimerasa δ i la DNA lligasa. Adaptat de Vilar i Gruber, 2010.

4.3.2. Espectre mutacional

Les mutacions en els gens MMR s'han observat en tots els grups ètnics. Més de 2.000 mutacions diferents (Base de dades del Genoma Humà Mutació, <http://www.hgmd.org>) han estat identificades en els quatre gens MMR: 875 en el gen *MLH1*, 860 en el gen *MSH2*, 290 en el gen *MSH6*, i 111 en el gen *PMS2*. Els tipus de mutacions associades als gens reparadors són molt variables, i es distribueixen al llarg de la seqüència. Hi ha pocs *hotspots* de mutació i el 80% de les mutacions reportades s'han associat a una sola família (Peltomaki i Vasen, 2004). Tot i així, també s'han identificat diverses mutacions recurrents, algunes d'elles fundadores (Borras, et al., 2010). La majoria de les mutacions germinals identificades en els gens reparadors són de tipus *nonsense*, *frameshift* o bé afecten la zona consens de *splicing* (posicions intròniques ± 1 i ± 2). Les mutacions *nonsense* i les alteracions *frameshift* es relacionen amb el truncament de la proteïna i la pèrdua de la seva funció (Peltomaki i Vasen, 2004; Woods, et al., 2007) i són considerades com a patogèniques. Les mutacions de *splicing*, per consens, es consideren patogèniques (Auclair, et al., 2006; Lastella, et al., 2006; Tournier, et al., 2008; Spurdle, 2010). Les grans deleccions semblen ser especialment comunes en el gen *MSH2*, on representen el 17-50% de les mutacions. Les grans deleccions i duplicacions són molt rares en *MSH6* o *PMS2*.

4.3.3. Síndrome del dèficit constitucional de reparació MMR (CMMR-D)

En contrast amb els individus amb LS que alberguen un al·lel heterozigot mutat del gen MMR, casos rars amb mutacions bial·lèliques deletèries en línia germinal en gens MMR, són la base genètica que explica la síndrome del dèficit constitucional de reparació MMR (CMMR-D, *Constitutional MMR-deficiency*) que s'associa a un fenotip més greu que la LS (Felton, et al., 2007b; Felton, et al., 2007a). Aquesta síndrome es caracteritza per una àmplia espectre de neoplàsies malignes d'inici precoç i un fenotip que s'assembla a la neurofibromatosi tipus 1 (NF1). L'espectre de tumors inclou leucèmies o limfomes, tumors cerebrals, la majoria dels tumors neuroepiteliais primaris, múltiples adenomes col·rectals, adenocarcinomes del tracte gastrointestinal, i altres tumors malignes, com ara tumors embrionaris i rabdomiosarcoma (Wimmer i Kratz, 2010). D'altra banda, les persones afectades solen presentar taques cafè amb llet i nòduls de Lisch, com d'altres afectacions associades amb NF1.

Una revisió de la literatura suggereix que hi ha una correlació genotip fenotip (Wimmer i Kratz, 2010). Les neoplàsies hematològiques semblen ser més freqüents en els pacients amb mutacions *MLH1* o *MSH2* i aquests solen desenvolupar-se més ràpidament que en els pacients amb mutacions de *MSH6* o *PMS2*. Per contra, aquest últim grup sembla tenir una major prevalença dels tumors cerebrals, i tumors associats a LS i són més propensos a sobreviure als seus primers tumors i desenvolupar una segona neoplàsia maligna. Totes aquestes especificacions poden emprar-se com a una eina per a facilitar el diagnòstic clínic de CMMR-D.

5. SELECCIÓ DE LES FAMÍLIES CANDIDATES PER L'ESTUDI DELS GENS MMR

La identificació dels individus amb LS és extremadament important ja que aquests individus poden beneficiar-se d'una vigilància contra el càncer intensiva i, per tant, es pot estar salvant vides (Jarvinen, et al., 2000). Donat el considerable risc de patir càncer d'aquests individus i la disponibilitat d'intervencions efectives per reduir el risc, la identificació de mutació germinals en portadors poden prevenir o minimitzar l'impacte d'un nombre substancial de càncers. Un cop identificats els portadors, els seus familiars també es poden fer proves per a identificar portadors addicionals que també poden beneficiar-se de la detecció, i els no portadors que, per una altra banda, es poden estalviar les intenses anàlisis i la cirurgia profilàctica recomanada per als seus familiars amb la mutació.

Com es requereix una prova de la línia germinal per confirmar l'estat de portador de la mutació, cal fer una selecció prèvia dels possibles candidats a ser portadors. Fer l'anàlisi a tot el gruix de candidats encara no és rentable donat el cost de la seqüenciació de la línia germinal i, per una altra banda, perquè la freqüència de portadors és baixa. S'han fet intents per desenvolupar criteris per classificar les persones i optimitzar millor aquesta selecció prèvia, i s'han desenvolupat models de predicció per estimar la probabilitat que té una persona de ser portadora d'una mutació. No obstant això, la LS està infradiagnosticada (Trano, et al., 2009).

5.1. Criteris clínics

Diversos criteris i directrius han estat desenvolupats per a la categorització de les famílies o de les persones per a seleccionar aquelles que tenen més probabilitat de ser portadores d'una mutació en els gens MMR i fer així la prova genètica en la línia germinal.

L'any 1990, els criteris d'Amsterdam es van desenvolupar inicialment com una eina de recerca per enriquir a una població més homogènia, però quan s'utilitza clínicament, aquests criteris identifiquen només ~60% dels pacients amb LS (Vasen, et al., 1991; Vasen, et al., 1994). Aquesta manca de sensibilitat va portar al desenvolupament dels criteris revisats (criteris d'Amsterdam II), que tenen en compte la presència de càncers extracolònics i tenen una sensibilitat de detecció del ~60-80% (Taula 3), (Llor, et al., 2005; Vasen, 2007).

Taula 3. Criteris d'Amsterdam I i II.

CRITERIS D'AMSTERDAM I (l'individu els ha de complir tots)
Tres o més familiars amb CCR, un d'ells ha de ser familiar de 1r grau dels altres dos
Dues generacions successives afectes
Almenys un tumor diagnosticat abans dels 50 anys
Exclusió de la Poliposi adenomatosa familiar
Els tumors han de ser confirmats mitjançant un estudi histopatològic
CRITERIS D'AMSTERDAM II (l'individu els ha de complir tots)
Tres o més familiars amb CCR o un tumor associat a LS (endometri, ovari, intestí prim, tracte biliar, tracte urinari i sistema nerviós central), un d'ells familiar de 1r grau dels altres dos
Dues generacions successives d'afectes
Almenys un tumor diagnosticat abans dels 50 anys
Exclusió de la Poliposi adenomatosa familiar
Els tumors han de ser confirmats mitjançant un estudi histopatològic

Introducció

Fruit de l'estreta associació que existeix entre la MSI i els tumors de pacients amb LS, s'origina un segon enfocament, els criteris de Bethesda (Rodríguez-Bigas, et al., 1997), i els criteris de Bethesda revisats l'any 2004 (Umar, et al., 2004), per a seleccionar possibles candidats a l'estudi dels gens MMR en la línia germinal (Taula 4). Aquests, que són cost efectius, són menys estrictes que els anteriors i permeten l'estudi de la MSI o la immunohistoquímica (IHC) de les proteïnes MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2 en els tumors dels individus seleccionats com a pas previ a la seqüenciació de la línia germinal.

Taula 4. Criteris de Bethesda i criteris de Bethesda revisats.

CRITERIS DE BETHESDA (l'individu ha de complir un dels requisits)
Individus amb CCR que pertanyen a famílies que compleixen els criteris d'Amsterdam
Individus amb dos neoplàsies associades a LS, incloent CCR sincrònic i metacrònic o càncer extracolònic (endometri, ovari, gàstric, hepatobiliar, budell prim, urèter o pelvis renal)
Individus amb CCR i un familiar de primer grau amb CCR i/o neoplàsia extracolònica associada a LS i/o adenoma colorectal; un dels càncers diagnosticat abans dels 45 anys d'edat o l'adenoma abans dels 40 anys d'edat
Individus amb CCR o càncer d'endometri diagnosticat abans dels 45 anys d'edat
Individus amb CCR localitzat al còlon dret i histològicament indiferenciat diagnosticat abans dels 45 anys d'edat
Individus amb CCR tipus cèl·lules en anell de segell (format per més del 50% de cèl·lules en anell de segell), mucinos o patró de creixement medul·lar diagnosticat abans dels 45 anys d'edat
Individus amb adenoma colorectal diagnosticat abans dels 40 anys d'edat
CRITERIS DE BETHESDA REVISATS (l'individu ha de complir un dels requisits)
CCR diagnosticat abans dels 50 anys
Presència de CCR metacrònic o un altre càncer associat a LS (endometri, ovari, gàstric, hepatobiliar, budell prim, urèter o pelvis renal), independentment de l'edat
CCR amb histologia de MSI-H (presència de limfòcits tumorals infiltrats, reacció limfocitària com la de Crohn, diferenciació mucinosa/anell de segell o patró de creixement medul·lar) diagnosticat abans dels 60 anys
CCR diagnosticat en un o més familiars de primer grau amb un tumor associat, sent un dels càncers diagnosticats abans dels 50 anys
CCR diagnosticat en dos o més familiars de primer o segon grau amb tumors associats a la LS

5.2. Cribratge molecular

5.2.1. Estudi de la MSI

Les proves de MSI es poden realitzar per a determinar l'estat del funcionament del sistema MMR en les cèl·lules tumorals. El panell que analitza el microsatèl·lits consisteix en l'anàlisi de dos repeticions de mononucleòtids (BAT25, BAT26) i de tres repeticions de dinucleòtids (D2S123, D5S346 i D17S250) (Boland i Goel, 2010; Poulogiannis, et al., 2010a). Els casos amb MSI-H es defineixen per presentar inestabilitat d'almenys dos marcadors, els que presenten MSI de baix grau (MSI-L), la presenten en un marcador, mentre que els tumors estables (MSS) són aquells que no presenten inestabilitat aparent. Posteriorment, s'ha proposat un altre panell de marcadors de repeticions de mononucleòtids (BAT25, BAT26, NR21, NR24 i NR27) amb una major sensibilitat i especificitat (Figura 29), (Suraweera, et al., 2002; Llor, et al., 2005).

Aproximadament el 90% dels CCR candidats a ser LS tindrà una MSI elevada i aquest fet fa que aquesta anàlisi sigui molt sensible. L'especificitat, però, és molt menor, doncs, com hem explicat anteriorment, entre el 7- 15% dels CCR esporàdics ho presenten també (Gonzalez-Garcia, et al., 2000; Pinol, et al., 2005).

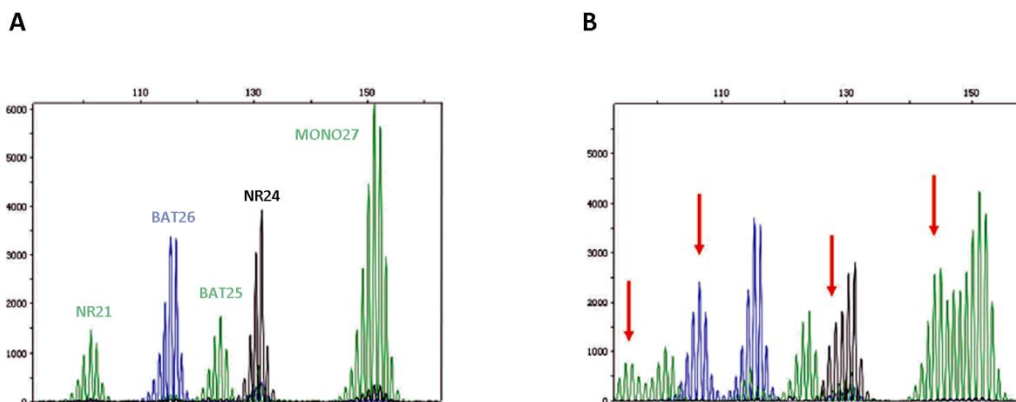


Figura 29. Estudi de la inestabilitat de microsatèl·lits en una mostra amb MSI-H. En la mostra s'observa l'anàlisi de 5 microsatèl·lits mononucleòtids en teixit normal (A) en comparació amb el teixit tumoral (B). Les fletxes vermelles indiquen delecions en 4 dels mononucleòtids analitzats. Extret de Iacopetta, et al., 2010.

5.2.2. Estudi de l'expressió de proteïnes del sistema MMR

Per estudiar la expressió de les proteïnes MMR s'utilitza la immunohistoquímica (IHC) amb quatre anticossos monoclonals específics per a les proteïnes MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2. La pèrdua d'expressió d'alguna d'aquestes proteïnes té una sensibilitat comparable a la d'anàlisi de MSI. No obstant això, l'anàlisi IHC pot dirigir les proves genètiques per al gen MMR apropiades quan s'identifica la pèrdua de l'expressió de la proteïna MMR.

Si hi ha sospita de que un cas pugui ser LS, i hi ha disponibilitat dels blocs tumorals, llavors la tinció IHC de les proteïnes MMR es pot utilitzar per a investigar si l'expressió d'aquestes és anormal. Ara bé, entre un 5% i un 10% de les IHC dels CCR amb LS poden mostrar una expressió aparentment normal de la proteïna de MMR. L'expressió de les proteïnes MMR, en general, segueixen el patró de la formació dels complexos heterodimèrics. Per tant, la pèrdua d'expressió de MSH6 s'associa significativament amb la pèrdua de MSH2, i de la mateixa manera, la pèrdua de MLH1 normalment s'associa a pèrdua d'expressió de PMS2 (Figura 30).

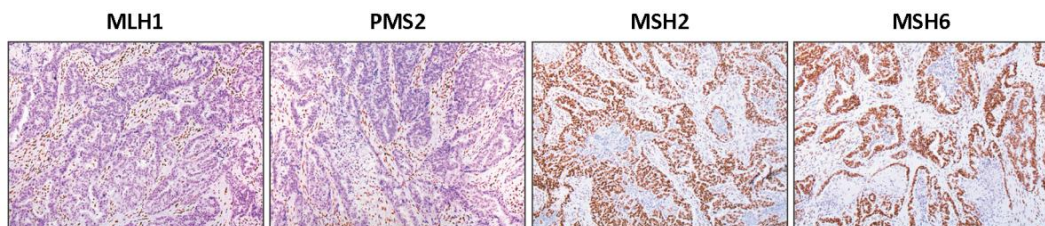


Figura 30. Immunohistoquímica en de les proteïnes reparadores en un pacient amb absència d'expressió de MLH1 i PMS2 i amb expressió de MSH2 i MSH6. El control positiu intern correspon a la tinció nuclear dels limfòcits. Adaptat de Jin, et al., 2013.

5.2.3. Cribratge Universal

Recentment diversos grups, basant-se en estudis poblacionals, han recomanat que tots els casos de CCR se'ls hi ha de fer l'estudi de la MSI i de l'expressió de les proteïnes MMR, independentment de la seva edat al moment del diagnòstic o història familiar (Hampel, et al., 2005; Pinol, et al., 2005; Hampel, et al., 2006; Hampel, et al., 2008; Teutsch, et al., 2009; Moreira, et al., 2012), atès que existeix una proporció dels càncers colorectals causada per mutacions MMR que no es produeixen en la vellesa. Aquest cribratge universal té una sensibilitat pràcticament completa (100%) donat que a tothom s'analitza el funcionament sistema MMR (Moreira, et al., 2012) amb

les limitacions pròpies de la tècnica utilitzada. Molts grups suggereixen que aquests tipus de cribatge poblacional resultaria el més cost-efectiu (Hampel, 2010; Mvundura, et al., 2010; Hampel i de la Chapelle, 2011; Hampel i de la Chapelle, 2013).

5.2.4. Refinant la selecció: hipermetilació del promotor del gen *MLH1* i la detecció de la mutació V600E en el gen *BRAF*

Aproximadament el 7-15% dels CCR presenten una funció MMR alterada. Un cop tenim identificada aquesta pèrdua de funció la persona és candidata a anàlisi en estudi germinal. De totes maneres, la gran majoria de tumors MSI sorgeixen de forma esporàdica en persones de 65 i més anys d'edat, amb una proporció de 2:1 de dones als homes, però els tumors comparteixen moltes de les característiques patològiques que els relaciona amb els tumors del tipus de la LS (Ward, et al., 2001).

Distingir entre els casos de LS dels esporàdics presenta un desafiament permanent. Com ja hem explicat en els apartats anteriors, “3.2.2. La via de la inestabilitat dels microsatèl·lits (MSI)” i “3.2.3. Via del fenotip metilador d'illes CpG (CIMP)” i com s'il·lustra a la Figura 31, els CCR amb MSI esporàdics, mostren la pèrdua d'expressió d'*MLH1* a causa de la hipermetilació adquirida d'ambdues còpies del promotor de *MLH1* (Figura 31), (Cunningham, et al., 1998). També són típicament positius per a la mutació *BRAF* V600E i pel fenotip metilador, CIMP (Herman, et al., 1998; Deng, et al., 1999; Deng, et al., 2001; Deng, et al., 2002a; Deng, et al., 2002b; Deng, et al., 2003; Deng, et al., 2004; McGivern, et al., 2004; Weisenberger, et al., 2006; Kim i Deng, 2007; Kim, et al., 2008).

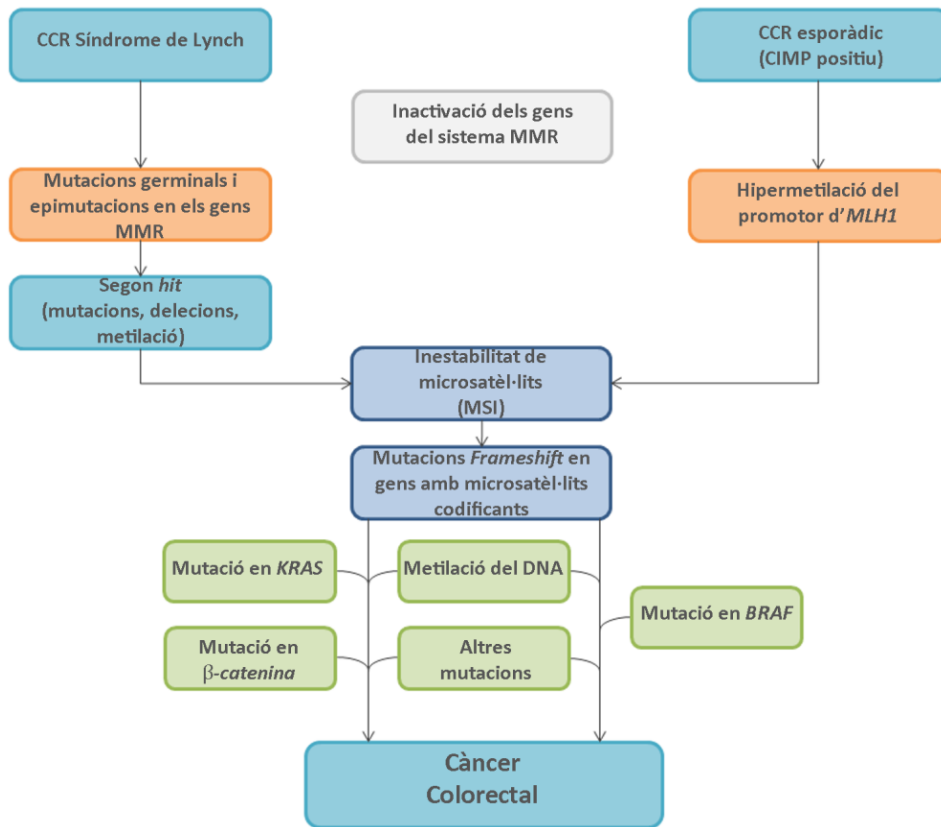


Figura 31. Esquema de les dues vies de desenvolupament del CCR amb MSI. Adaptat de Boland i Goel, 2010.

Per aquest motiu, s’ha proposat que l’absència de la hipermetilació del promotor d’*MLH1* així com de la mutació de *BRAF* V600E poden fer-se servir com a eines per a millorar la selecció dels possibles candidats a analitzar les mutacions germinals en el gen *MLH1*. No obstant això, el tema ha esta motiu de controvèrsia (Lehmann, 2008; Rahner, et al., 2008). En general l’absència de mutacions *BRAF* identifica amb una alta sensibilitat (96-100%) i una baixa especificitat (22-100%) de casos amb CCR associats a LS (Deng, et al., 2004; Domingo, et al., 2004a; Domingo, et al., 2004b; Loughrey, et al., 2007; Bessa, et al., 2008; Julie, et al., 2008; Perez-Carbonell, et al., 2010). Només es detecta aquesta mutació associada a tumors de la LS (Deng, et al., 2004; Loughrey, et al., 2007; Kim, et al., 2008; Walsh, et al., 2009). Tanmateix, la hipermetilació del promotor d’*MLH1* és una bona alternativa però la seva detecció en un nombre limitat de tumors LS ha fet que el seu ús també sigui discutit (Deng, et al., 2004; Nagasaka, et al., 2004; Alemayehu, et al., 2008; Rahner, et al., 2008). El fet de que també estiguin descrites epimutacions germinals en *MLH1* com a causa de

LS ha contribuït també a la discussió (Hitchins i Ward, 2009; Niessen, et al., 2009; Hitchins, et al., 2011; Pineda, et al., 2012; Hitchins, 2013).

5.3. Algoritme diagnòstic de la síndrome de Lynch

En la figura 32 es mostra amb detall l'algoritme diagnòstic consensuat entre la Unitat de Consell Genètic i el Programa de Diagnòstic Molecular de Càncer Hereditari del Institut Català d'Oncologia, per a la identificació dels pacients amb LS i la detecció de mutacions causants de la patologia (Figura 32). En un primer pas, es seleccionen els individus que compleixen els criteris clínics d'Amsterdam i de Bethesda. Posteriorment, el cribatge es centra en l'anàlisi molecular del tumor, amb les proves de la IHQ i de la MSI com a estudis complementaris. Segons els criteris clínics que compleixen les famílies, es recomana la realització de IHQ i/o MSI com a primer pas (Vasen, et al., 2007). Actualment, com a particularitat, cal destacar, que sempre que es detecti l'absència d'expressió de la proteïna MLH1, això implicarà l'anàlisi de la hipermetilació del promotor, per tal de descartar que es tracti d'un cas esporàdic. Si el promotor d'*MLH1* no està hipermetilat, es durà a terme l'anàlisi mutacional del gen *MLH1*. Per una altra banda, en el cas que el pacient hagi estat diagnosticat a una edat primerenca o amb múltiples tumors i, que a la vegada, presenti hipermetilació de *MLH1* pot considerar-se oportú procedir a l'anàlisi de mutacions en *MLH1* o metilació germinal de *MLH1* (Hitchins i Ward, 2009; Pineda, et al., 2012; Hitchins, 2013). En cas contrari, si la hipermetilació hi fos present, aquest individu sortiria d'estudi i es descartaria l'anàlisi mutacional del gen *MLH1* (Figura 32).

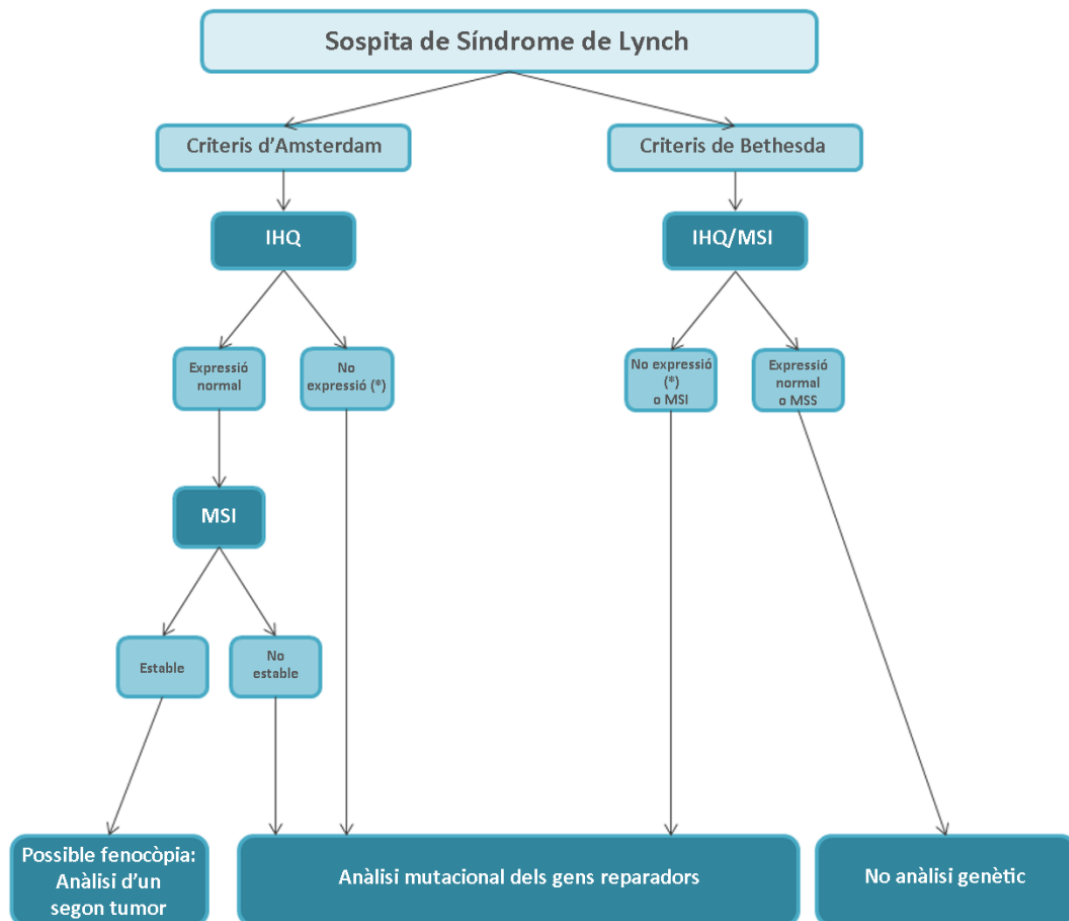


Figura 32. Algoritme diagnòstic proposat per l'estudi de la síndrome de Lynch. (*) En cas de manca d'expressió de *MLH1*, es realitza l'anàlisi d'hipermetilació de *MLH1* o de la mutació p.V600E de *BRAF*. Adaptat de Pineda, et. al., 2010.

5.4. Estudi del cost efectivitat

Tradicionalment, les decisions clíniques s'han basat en els resultats d'efectivitat dels assajos clínics. En l'actualitat i d'una manera creixent, els professionals de la salut utilitzen altres tècniques, principalment les avaluacions econòmiques, per completar i millorar el complicat procés de presa de decisions dins del sistema sanitari.

L'anàlisi de cost efectivitat és una eina utilitzada per ajudar a prendre decisions sobre el tipus d'atenció mèdica. Es tracta d'un mètode que compara el cost i l'efectivitat de dues o més alternatives clíniques. Estrictament parlant, però, l'anàlisi de cost efectivitat és una de les

tècniques d'avaluació econòmica, on l'elecció de la metodologia depèn de la naturalesa dels beneficis especificats.

L'anàlisi cost efectivitat ha estat definida pel *National Institute for Health and Clinical Excellence* (NICE) com un disseny de l'estudi econòmic en el qual les conseqüències de les diferents alternatives clíniques es mesuren usant un sol resultat, generalment en unitats "naturals" (per exemple, els anys de vida guanyats, les morts evitades, atacs cardíacs evitats o casos detectats). Els procediments alternatius es comparen llavors en termes de cost per unitat d'efectivitat.

En l'anàlisi de cost efectivitat es distingeix entre els costos directes i els costos indirectes o de productivitat associada a la alternativa clínica, així com als anomenats intangibles, els quals, tot i que poden ser difícils de quantificar, són sovint les conseqüències del propi procediment i han de ser inclosos en el perfil de costos. És indispensable precisar quines són les despeses que estan incloses en un anàlisi de cost efectivitat i quines no, per assegurar que els resultats no estiguin subjectes a una interpretació errònia.

S'ha de fer una distinció entre les alternatives clíniques que són completament independents (és a dir, en què els costos i els efectes d'una estratègia no es veuen afectats per la introducció o no d'altres estratègies) i les que s'exclouen entre sí (on la implementació d'una metodologia implica que una altra no pugui ser aplicada, o si la realització d'una estratègia provoca canvis en els costos i els efectes d'una altra).

Quan són estratègies completament independents els resultats s'expressen llavors mitjançant les ràtios cost efectivitat (l'acrònim en anglès és CER), que és el quocient entre el cost de l'alternativa i la seva efectivitat.

No obstant, en la majoria dels casos, les teràpies analitzades són mútuament excloents. En aquest cas les ràtios de cost efectivitat incremental (l'acrònim en anglès és ICER) són l'eina per proporcionar i interpretar els resultats de l'anàlisi cost efectivitat. L'ICER és una mesura més detallada de l'estratègia considerada que el CER. En una tria entre dos possibles tractaments (A i B) l'ICER proporcionaria informació sobre si els costos addicionals, originats per un canvi de pauta terapèutica de pacients d'un tractament A, a un altre tractament B, poden ser justificats a través del seu balanç amb els beneficis clínics addicionals.

En termes pràctics, les diferents alternatives terapèutiques comparades en l'anàlisi del cost efectivitat per a una determinada indicació s'ordenen respecte a la seva efectivitat de forma ascendent, amb l'objectiu d'assegurar l'efectivitat màxima en detriment de considerar el cost, i es calculen els seus ICER corresponents. S'exclouen de les anàlisis aquelles alternatives que són més cares i menys efectives. I es consideren dominades aquelles que són igual d'efectives però que són més costoses i també s'acaben exclouent de l'anàlisi comparatiu. Un cop excloses les estratègies menys efectives o més costoses es tornen a calcular els diferents índex.

L'anàlisi cost efectivitat està lluny de ser una ciència exacta, i sovint s'ha de considerar una certa incertesa associada als resultats i una àmplia variació al voltant de l'estimació generada. Per tant, és imperatiu que l'avaluació de la relació cost efectivitat sigui sotmès a una anàlisi de sensibilitat per permetre que qui prengui la decisió d'aplicar o no una estratègia conegui com varia el cost eficàcia segons la variabilitat de les variables considerades. L'anàlisi de sensibilitat implica la variació d'un o diversos paràmetres del model dins d'un rang de valors coneguts, que normalment correspon a l'interval de confiança per a aquest estimador, i el càlcul amb aquests nous valors del resultat final. Aquestes anàlisis poden ser univariants o multivariants, i ens permeten posar a prova els supòsits en què es basa el nostre model a través del càlcul de l'impacte que sobre el resultat té la variació de l'escenari del pitjor cas al millor.

HIPÒTESI

Les característiques mutacionals, genètiques i epigenètiques, que es van adquirint en un tumor durant la seva gènesi i progressió, condicionen la seva biologia i poden tenir repercussions clíniques com ara aplicacions diagnòstiques.

Dins del camp del diagnòstic clínic de la Síndrome de Lynch, nosaltres hem hipotetitzat que l'estudi de dues alteracions somàtiques, les mutacions *BRAF* i de la hipermetilació del promotor del gen *MLH1*, poden ajudar a dissenyar algoritmes de diagnòstic per l'estudi genètic de la síndrome de Lynch que siguin més cost-efectius.

Dins l'àmbit de la generació del coneixement sabem encara relativament poc sobre la dinàmica d'adquisició d'alteracions genètiques en els estadis primerencs de la transformació neoplàsica colònica. Hem hipotetitzat que el desenvolupament de noves metodologies d'alta sensibilitat per la detecció d'alteracions genètiques específiques i la seva utilització per l'estudi de criptes, unitats estructurals del teixit normal i tumorals, ens poden donar una nova visió de la dinàmica tumoral tant als carcinomes esporàdics com a les síndromes de predisposició hereditària de càncer colorectal.

OBJECTIUS

Objectiu general

L'objectiu general de la present tesi es centra en dos projectes independents basats en l'estudi de biomarcadors en càncer hereditari, amb l'objectiu translacional d'una millora en el camp del diagnòstic clínic i, per una altra part, aprofundir en el coneixement dels processos tumorogènics.

Objectius específics

1. Validació i estudi del cost efectivitat de la determinació de la hipermetilació del promotor del gen *MLH1* en l'algoritme diagnòstic de la síndrome de Lynch, secundari a mutacions en els gens reparadors.
2. Estudi de la dinàmica tumoral mitjançant l'anàlisi de mutacions primerenques en el càncer colorectal. Aquest bloc consta de dos objectius correlacionats entre si.
 - i) Disseny i posada a punt de la metodologia necessària per la detecció d'al·lels mutats diluïts en la mostra del tumor, a partir de biòpsies i de mostres de teixit amb poca concentració de DNA.
 - ii) Estudi de la dinàmica tumoral a partir de l'anàlisi de l'espectre mutacional primerenc en criptes de còlon procedents de mucosa normal, adenomes i adenocarcinomes.

RESULTATS

La secció de Resultats d'aquesta tesi consta de 2 articles publicats i un sotmès a publicació, que es descriuen breument a continuació. Per altra banda, s'adjunta a l'Annex 1 un altre article publicat en el que la doctoranda ha col·laborat i n'és coautora.

Article 1

“*MLH1* promoter hypermethylation in the analytical algorithm of Lynch syndrome: a cost-effectiveness study”

European Journal of Human Genetics, 2012

Article 2

“Nanofluidic Digital PCR for *KRAS* Mutation Detection and Quantification in Gastrointestinal Cancer”

Clinical Chemistry, 2012

Article 3

“Genetic background influences intratumoral and intracrypt heterogeneity in early colorectal tumorigenesis”

Sotmès a publicació.

ARTICLE 1***MLH1* promoter hypermethylation in the analytical algorithm of Lynch syndrome: a cost-effectiveness study**

Mireia Gausachs, Pilar Mur, Julieta Corral, Marta Pineda, Sara González, Lúcia Benito, Mireia Menéndez, Josep Alfons Espinàs, Joan Brunet, María Dolores Iniesta, Stephen B. Gruber, Conxi Lázaro, Ignacio Blanco i Gabriel Capellá

European Journal of Human Genetics; 20(7); 762-8 (2012)

Resum del treball: L'algoritme diagnòstic d'anàlisi de la síndrome de Lynch (LS) és cada vegada més complex. La mutació de *BRAF* V600E i la hipermetilació del promotor d'*MLH1* s'han proposat com una eina per seleccionar millor aquells malalts en els quals està indicada la identificació de LS. L'objectiu d'aquest estudi va ser avaluar la utilitat clínica i el cost efectivitat de les dues alteracions somàtiques per millorar el rendiment de l'algoritme diagnòstic de la LS. Es van estudiar un total de 122 tumors CCR d'individus amb antecedents familiars de càncer colorectal que mostraven MSI i/o pèrdua d'expressió de les proteïnes del sistema MMR. Es van detectar mutacions germinals MMR en 57 casos (40 *MLH1*, 15 *MSH2* i 2 *MSH6*). La mutació *BRAF* V600E es va avaluar mitjançant la metodologia de l'SNuPE (*single nucleotide primer extension*). La hipermetilació del promotor d'*MLH1* es va avaluar mitjançant l'MS-MLPA (*methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification*) en un subconjunt de 71 casos amb pèrdua d'expressió de la proteïna *MLH1*. L'anàlisi de sensibilitat de l'estudi de cost efectivitat es va realitzar variant només el valor de la probabilitat de una variable (*one-way sensitivity analysis*), i es va dur a terme per estimar els costos addicionals de les alternatives metodològiques per a la detecció de casos de portadors de mutacions *MLH1* de manera que es tenen en compte la robustesa de les estimacions. La sensibilitat de l'absència de les mutacions *BRAF* per detectar pacients de LS va ser del 96% (23/24) i l'especificitat del 28% (13/47). L'especificitat de la hipermetilació del promotor d'*MLH1* per a detectar tumors LS va ser del 66% (31/47) i la sensibilitat de 96% (23/24). El cost per mutació addicional detectat en utilitzar l'anàlisi de hipermetilació va ser menor en comparació amb l'estudi de *BRAF* i amb l'estudi germinal de la mutació *MLH1*. La hipermetilació somàtica de *MLH1* és un

Resultats

mètode de selecció prèvia precís i cost-efectiu en la selecció dels pacients que són candidats per l'anàlisi de la línia germinal d'*MLH1* quan hi ha sospita de LS i quan l'expressió de la proteïna MLH1 és absent.

ARTICLE

MLH1 promoter hypermethylation in the analytical algorithm of Lynch syndrome: a cost-effectiveness study

Míreia Gausachs¹, Pilar Mur¹, Julieta Corral¹, Marta Pineda¹, Sara González¹, Lúcia Benito¹, Míreia Menéndez¹, Josep Alfons Espinàs¹, Joan Brunet², María Dolores Iniesta³, Stephen B Gruber^{3,4,5}, Conxi Lázaro¹, Ignacio Blanco¹ and Gabriel Capellá^{1*}

The analytical algorithm of Lynch syndrome (LS) is increasingly complex. *BRAF* V600E mutation and *MLH1* promoter hypermethylation have been proposed as a screening tool for the identification of LS. The aim of this study was to assess the clinical usefulness and cost-effectiveness of both somatic alterations to improve the yield of the diagnostic algorithm of LS. A total of 122 colorectal tumors from individuals with family history of colorectal cancer that showed microsatellite instability and/or loss of mismatch repair (MMR) protein expression were studied. MMR germline mutations were detected in 57 cases (40 *MLH1*, 15 *MSH2* and 2 *MSH6*). *BRAF* V600E mutation was assessed by single-nucleotide primer extension. *MLH1* promoter hypermethylation was assessed by methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification in a subset of 71 cases with loss of *MLH1* protein. A decision model was developed to estimate the incremental costs of alternative case-finding methods for detecting *MLH1* mutation carriers. One-way sensitivity analysis was performed to assess robustness of estimations. Sensitivity of the absence of *BRAF* mutations for depiction of LS patients was 96% (23/24) and specificity was 28% (13/47). Specificity of *MLH1* promoter hypermethylation for depiction of sporadic tumors was 66% (31/47) and sensitivity of 96% (23/24). The cost per additional mutation detected when using hypermethylation analysis was lower when compared with *BRAF* study and germline *MLH1* mutation study. Somatic hypermethylation of *MLH1* is an accurate and cost-effective pre-screening method in the selection of patients that are candidates for *MLH1* germline analysis when LS is suspected and *MLH1* protein expression is absent.

European Journal of Human Genetics advance online publication, 25 January 2012; doi:10.1038/ejhg.2011.277

Keywords: Lynch Syndrome; *MLH1* promoter hypermethylation; *BRAF* V600E mutation; MS-MLPA; cost-effectiveness

INTRODUCTION

Lynch syndrome (LS) is characterized by an autosomal dominant inheritance of early-onset colorectal cancer (CRC) associated with an increased risk of other cancers.^{1,2} It is caused by germline mutations in DNA mismatch repair (*MMR*) genes being *MLH1* and *MSH2* the most commonly mutated.^{3–5} Genetic heterogeneity and the low prevalence of hereditary tumors make it expensive to test all patients in whom LS is suspected.

Microsatellite instability (MSI) is a hallmark of *MMR*-deficient cancers and is found in >90% of LS colorectal tumors.^{6,7} Immunohistochemistry staining is also used to determine the loss of expression of *MMR* proteins in tumor tissue of candidate patients. In spite of a low sensitivity, both strategies are generally accepted as prescreening procedures for genetic testing of *MMR* genes.^{8,9}

BRAF V600E mutation is present in approximately 10% of CRCs and in a higher proportion of MSI tumors. This mutation is strongly associated with *MLH1* inactivation secondary to promoter hypermethylation.^{10–15} It has been used to distinguish LS-associated from sporadic MSI-positive tumors.^{10,11,16–21} The lack of *BRAF* mutations

identifies with high sensitivity (96–100%) and lower specificity (22–100%) CRC cases associated with LS.^{10,11,16–21} Occasionally, *BRAF* mutations have been detected in LS patients.²²

Methylation of the *MLH1* promoter, leading to a loss of *MLH1* expression, is also strongly associated with sporadic MSI-positive CRCs. *MLH1* promoter hypermethylation has been also evaluated for the selection of patients that will not be tested for germline mutation.^{23–25} However, the identification of hypermethylation in a limited number of LS tumors has made its use controversial.^{10,26–28}

Issues that affect screening include the accuracy, sensitivity, and specificity of the test, the benefit to the patient, the possible negative ramifications of the results, and the cost.^{8,29–31} Before routine implementation in the clinical setting, it is critical to assess the analytical and clinical validity and the cost-effectiveness of *BRAF* mutation and *MLH1* promoter hypermethylation.

The aim of this study was to compare the diagnostic yield and cost-effectiveness of *BRAF* V600E mutation versus *MLH1* promoter hypermethylation in a large series of cases with familial aggregation for which *MMR* gene status was studied.

¹Hereditary Cancer Program, Institut Català d'Oncologia, IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Spain; ²Hereditary Cancer Program, Institut Català d'Oncologia, IDIBGI, Girona, Spain; ³Department of Internal Medicine, Ann Arbor, Michigan; ⁴Human Genetics, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, Michigan; ⁵Department of Epidemiology, University of Michigan School of Public Health, Ann Arbor, Michigan

*Correspondence: Dr G Capellá, Hereditary Cancer Program, Institut Català d'Oncologia, IDIBELL, Gran Via 199–203, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona 08908, Spain. Tel: +34932607952; Fax: +34932607466; E-mail: gcapella@iconcologia.net

Received 6 September 2011; revised 20 December 2011; accepted 22 December 2011

MATERIALS AND METHODS

Samples and patients

A total of 122 colorectal tumors with MMR deficiency (as evidenced by MSI or combined MSI and loss of MMR protein expression) were obtained from individuals with family history of CRC attended at our Cancer Genetic Counseling Unit between 1999 and 2008. A total of 43 patients met Amsterdam criteria, 48 revised Bethesda criteria and 12 cases showed other types of CRC familial aggregation. In all cases, *MMR* germline mutation status was assessed by direct sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). Overall, 57 tumors were from LS patients (40, 15 and 2 with *MLH1*, *MSH2* and *MSH6* mutations, respectively). In addition, a series of 48 (MSS) tumors from patients showing CRC familial aggregation and 73 sporadic CRC from a case-control study³² were also analyzed. Informed consent was obtained from all patients, and the ethics committee approved this study.

DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) material was done after microdissection of tumor cells using the QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). DNA from RKO colorectal tumor cell line (ATCC, Manassas, VA, USA) was used as a biallelic *MLH1* methylation control. DNA from SK-MEL-28 melanoma cell line (ATCC) and from COLO 201 colorectal cell line (kindly provided by Dr Soong) were used as controls of homozygous *BRAF* V600E mutation. To generate unmethylated DNA, peripheral blood lymphocyte (PBL) DNA was amplified using the REPLI-g kit (Qiagen).

Detection of somatic alterations

Detection of *BRAF* V600E mutation. A 196-bp region of exon 15 of the human *BRAF* spanning the hotspot mutation c.1799T>A. (V600E) was amplified by PCR and subsequently sequenced (as described in Supplementary Data Table 1). *BRAF* V600E mutation detection was also performed by Single Nucleotide Primer Extension (SNuPE) using the ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with specific primers (as described in Supplementary Data Table 1). Analytical sensitivity of *BRAF* V600E mutation analysis was assessed in serial dilutions of homozygous V600E mutated DNA from SK-MEL-28 and COLO 201 cell lines with wild-type genomic DNA from PBL.

Detection of *MLH1* promoter methylation status.

Methylation-specific MLPA (MS-MLPA) SALSA MS-MLPA ME011 kit (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands) is based on the use of probes that contain a digestion site (or occasionally two digestion sites) specific for the

methylation-sensitive HhaI enzyme. Five pair of probes target A to D regions in *MLH1* promoter and intron 1 (Figure 1). Analytical sensitivity was assessed in serial dilutions of RKO DNA and unmethylated DNA. Intra- and inter-experiment variability was assessed using a tumor sample showing methylation values close to 20%. A similar value has been proposed as a meaningful cutoff value in previous studies.^{33,34} Ten replicates in two independent experiments were analyzed.

Methylation-specific melting curve analysis (MS-MCA) MS-MCA method consists of a real-time PCR followed by temperature dissociation³⁵ on DNA previously treated with sodium bisulfite, using the EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, Orange, CA, USA). For experimental conditions and primer sequences see Supplementary Data Table 1. Analytical sensitivity of the method was assessed as described above.

Pyrosequencing Two μ l of bisulfite converted DNA were used in a PCR reaction of the regions of interest using HotStar Taq master mix (Qiagen), and biotin-labeled primers. Primers were designed using the Pyromark Assay Design Software 2.0 (Qiagen). For experimental conditions and primer sequences see Supplementary Data Table 1.

Analysis of *MLH1* loss of heterozygosity (LOH) in the *MLH1* mutation carrier. Allelic imbalances and copy number variation were analyzed using SNuPE technique and MLPA, respectively. Experimental conditions are described in Supplementary Data Table 1.

Cost-effectiveness analysis

A decision model was developed to estimate the number of mutation carriers and the incremental costs of alternative case-finding methods for detecting *MLH1* mutation carriers among individuals with a positive molecular test in tumors (MSI and/or loss of expression of MLH1). Strategy 1 (*BRAF* – *MLH1* mutation analysis) involved *BRAF* V600E testing of all individuals. If no mutation was detected, *MLH1* mutation testing followed. Strategy 2 (Hypermethylation – *MLH1* mutation analysis) involved testing for *MLH1* hypermethylation of all individuals. If hypermethylation was absent, *MLH1* mutation testing followed. Strategy 3 (*MLH1* mutation analysis) involved direct *MLH1* mutation testing of all individuals.

Pathway probabilities were attached to the decision tree (Table 1 and Supplementary Data Figure 1). For each strategy, the number of individuals tested, mutations detected and missed, false-positive results, and *MMR* mutations detected in first- and second-degree relatives were computed. Resource

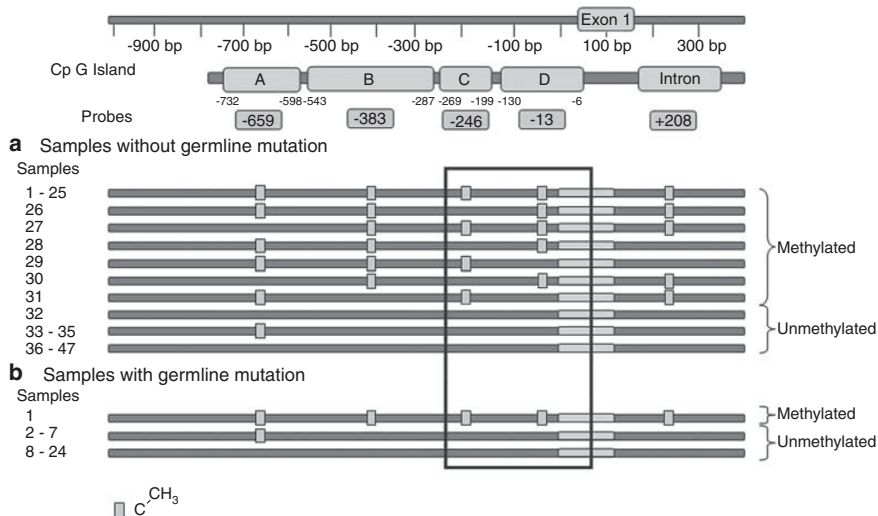


Figure 1 Detailed methylation patterns of *MLH1* gene promoter, as assessed by MS-MLPA, of the 71 familial CRC tumors showing loss of MLH1 protein expression. The five regions of the CpGs targeted by the selected probes are shown. Samples lacking or harboring germline *MLH1* gene mutations are separately described in panels a and b, respectively. Box highlights the methylation pattern of the informative C and D regions.

Table 1 Parameters and sources for the cost-effectiveness analysis

	Case-base	Sensitivity range	
<i>MLH1</i> germline mutation prevalence	0.338	0.200	0.600
Sensitivity <i>BRAF</i>	0.958	0.800	0.960
Specificity <i>BRAF</i>	0.277	0.200	0.600
Sensitivity <i>MLH1</i> hypermethylation	0.958	0.800	0.960
Specificity <i>MLH1</i> hypermethylation	0.660	0.600	0.960
Mean number of first- and second-degree relatives	5		
Proportion of mutation carriers in first- and second-degree relatives	0.5	0.4	0.6
Unit cost of a <i>MMR</i> mutation test (€)	1100	300	1100
Unit cost of a <i>BRAF</i> test (€)	110	99	121
Unit cost of a <i>MLH1</i> hypermethylation test (€)	112	101	124
Unit cost of a <i>MMR</i> mutation test in first- and second-degree relatives (€)	150	135	165

Case-base parameters were obtained from the present report. Sensitivity ranges were defined after review of the literature (see Table 3 and Supplemental Data Table 4) including the present report.

valuations were attached to each event in order to calculate a total cost for each strategy (Supplementary Data Table 2). The health outcome was defined in terms of additional *MMR* mutations detected. Two independent assessments were performed: one that considered costs and outcomes for proband only, and a second that included proband and their first- and second-degree relatives. Following a healthcare perspective, direct medical costs were used for analysis.

Finally, a one-way sensitivity analysis was performed in order to evaluate the relative impact of distinct parameters on the incremental cost per additional *MLH1* mutation carrier detected. Each parameter is individually tested over a range of values while holding all other parameters at their base-case values. Ranges for each variable were based on a literature review or on expert opinion if no range data were available.

RESULTS

Usefulness of *BRAF* V600E mutation analysis in the identification of LS tumors

SNaPshot consistently detected the *BRAF* V600E mutation when it was present in 5% of all alleles analyzed (Supplementary Data Figure 2). *BRAF* mutation was identified in 5 of 24 (20%) MSI and 2 of 49 (4%) MSS sporadic tumors. *BRAF* mutations were occasionally detected in MSS tumors of cases with familial aggregation.

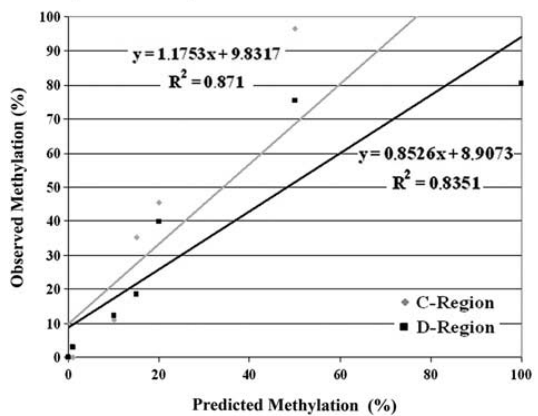
BRAF mutations were detected in 14 of 122 (11%) MSI tumors. One *BRAF* mutation was identified in a tumor from a patient with *MLH1* germline mutation. Absence of *BRAF* mutations was highly sensitive (98%; 56/57) for the identification of LS tumors. Specificity was 20% (13/65). All cases harboring *BRAF* V600E mutations were associated with loss of *MLH1* expression. Restricting the analysis to the 71 tumors with loss of *MLH1* protein expression (24 LS and 47 non-LS tumors), the absence of the mutation showed a sensitivity of 96% (23/24) and a specificity of 28% (13/47) for depiction of LS tumors (Supplementary Data Table 3).

Usefulness of *MLH1* promoter methylation analysis in the identification of LS tumors

Following Deng et al¹⁶, only positive results for C- and D-regions (Figure 1) were scored as hypermethylation, as both correlate with loss of expression. MS-MLPA analytical sensitivity was 10% (Figure 2 and data not shown). Intra- and inter-experiment variability of MS-MLPA was within the range of 1%.

The reconstituted samples were also analyzed using pyrosequencing. Its analytical sensitivity was 5% for C-region and 10% for D-region (Supplementary Data Table 4) similar to that of

a Analytical Sensitivity



b Variability

Inter-experimental Variability		
	C-Region	D-Region
Experiment 1 (n=10)	26.43 ± 0.05	25.64 ± 0.04
Experiment 2 (n=10)	22.25 ± 0.04	23.50 ± 0.01
Intra-experimental Variability		
	C-Region	D-Region
(n=5)	24.34 ± 0.05	24.57 ± 0.03

Figure 2 Analytical sensitivity and experimental variability of *MLH1* promoter hypermethylation analysis as assessed by MS-MLPA. (a) Its performance was tested by serial reconstitutions of methylated alleles in increasing amounts of unmethylated alleles ranging from 100 to 0%. A linear relationship was detected between observed and predicted methylation. (b) Intra- and inter-experimental variability values refer to those obtained in a borderline sample showing methylation close to 20%.

MS-MLPA (Supplementary Data Figure 3). Of note, the intensity of the methylation signal of MS-MLPA-targeted CpGs is average compared with the methylation for the whole region as assessed by pyrosequencing.

In the set of 71 tumors with *MLH1* loss, MS-MLPA analysis evidenced *MLH1* promoter hypermethylation in 32 cases when a cutoff value of 20% was used (Supplementary Data Table 3). Absence of hypermethylation showed a sensitivity of 96% (23 of 24) and a specificity of 66% (31 of 47) for LS identification. Two cases displayed exclusive *MLH1* C-region methylation and three tumors displayed exclusive D-region methylation (Figure 1). If we would have considered methylation in regions A or B, six additional cases would have been misclassified as false-negative cases (Figure 1). Finally, the combination of *BRAF* mutation and *MLH1* hypermethylation did not yield any additional value (Supplementary Data Table 3).

In our experience, the 20% cutoff value for MS-MLPA for *MLH1* promoter assessment proved to be useful. However, the use of distinct cutoff values affects its putative clinical usefulness (Supplementary Data Table 3). The 20% cutoff usefulness was validated in an additional set of 10 cases (4 LS and 6 non LS), where it adequately classified all cases (data not shown). Alternative methods to assess methylation status were also evaluated. A MS-MCA test was developed

that showed an analytical sensitivity of 5% (Supplementary Data Figure 3). Subsequently, a set of six tumor samples for which methylation levels were estimated between 5 and 20% by MS-MLPA were analyzed. MS-MCA scored as methylated one case previously scored as unmethylated. However, MS-MCA failed to identify as methylated a case showing 20% methylation levels (data not shown). MS-MCA did not add value in those cases with borderline values according to MS-MLPA.

In all, only one LS-associated colorectal tumor harbored somatic *MLH1* promoter hypermethylation and a *BRAF* mutation (Supplementary Data Figure 4). This tumor arose in a patient that fulfilled Bethesda criteria. His first tumor was located in the right colon and diagnosed at 23-years old. The second was diagnosed at age 43 and was located in the sigma (pT3pN2M0). The latter tumor was the one analyzed. Family history included a diagnosis of CRC of his mother, whereas his father developed a gastric cancer. Tumor tissue study revealed neither somatic copy number variation of the *MLH1* gene nor LOH was evidenced. Although the tumor displayed the typical molecular profile associated with sporadic MSI tumors, *BRAF* mutation and *MLH1* promoter hypermethylation, the patient was a carrier of the founder Spanish pathogenic *MLH1* c.1865T>A (L622H) mutation.³⁷

Cost-effectiveness analysis

Both testing strategies were compared with *MLH1* germline testing for all individuals (*BRAF-MLH1* mutation analysis (Strategy 1); Hypermethylation - *MLH1* mutation analysis (Strategy 2); DNA testing of all individuals (Strategy 3) (Supplementary Data Figure 1). Parameters, base case values and assumptions used to calculate the incremental cost per additional mutation detected are shown in Table 1.

The three strategies were analyzed in a hypothetical cohort of 1000 newly diagnosed CRC patients with loss of *MLH1* expression (Table 2). DNA testing of all probands (Strategy 3) is anticipated to identify all expected carriers ($n=338$) (Table 2). Strategies

1 and 2 identified the same number of carriers ($n=324$), but strategy 1 associated with a higher number of false-positive when compared with strategy 2 (479 vs 165). When first- and second-degree relatives were also considered, the number of identified *MLH1* mutation carriers increased up to 810, improving the clinical impact of the screening. Strategy 3 was able to identify 35 additional cases (Table 2).

Strategy 2 offered the lowest cost per additional mutation detected (Table 2). When probands were considered, the incremental cost for the identification of an additional *MLH1* mutation was 2212 for strategy 2, whereas for strategy 3, the most specific one, the incremental cost was 27 220 (Table 2). When costs and benefits were calculated including first- and second-degree relatives, the incremental cost per additional mutation detected for strategies 2 and 3 was 846 and 7991, respectively (Table 2).

The sensitivity analysis showed that the two most influential variables in the results obtained for strategies 2 and 3 were the prevalence of *MLH1* mutations and the unit cost of a *MMR* test (Figure 3). For strategy 2, the third most influential variable was the specificity of the hypermethylation, whereas for Strategy 3 was the sensitivity of the hypermethylation. Similar results were obtained when first and second-degree relatives were included in the analysis.

DISCUSSION

Lack of *BRAF* mutations and absence of *MLH1* methylation have been proposed as screening tests for the identification of candidate patients for *MLH1* germline testing. Here, we show that *MLH1* hypermethylation analysis on tumor biopsies, as assessed by MS-MLPA, outperforms *BRAF* mutation in the selection of these patients in terms of sensitivity and specificity and is more cost-effective.

The association of *BRAF* mutation with *MLH1* hypermethylation and the MSI phenotype resulted in its evaluation as a potential pre-screening tool in the LS diagnostic algorithm^{10,11,13,16,19,20,38} (Table 3 and Supplementary Data Table 5). In agreement with previous reports, the sensitivity of the absence of *BRAF* mutation is very high in

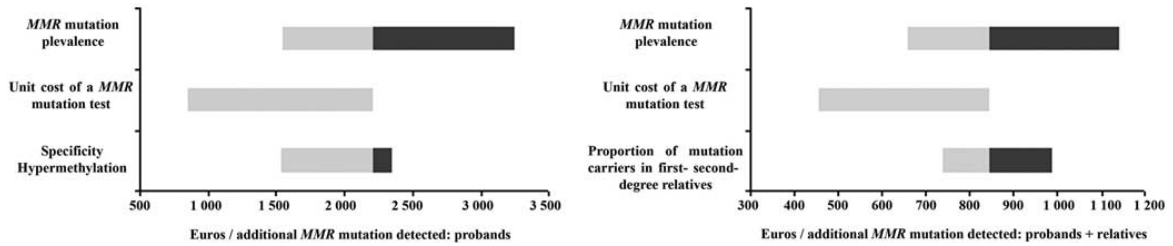
Table 2 Estimated results and costs of the distinct strategies used for LS identification in familial cancer cases

	Strategy 2 <i>MLH1</i> hypermethylation – <i>MLH1</i> mutation testing	Strategy 1 <i>BRAF-MLH1</i> mutation testing	Strategy 3 <i>MLH1</i> mutation testing
<i>Probands cohort</i>	1000	1000	1000
Individuals with <i>BRAF</i> or <i>MLH1</i> hypermethylation testing	1000	1000	—
Individuals with <i>MLH1</i> mutation testing	549	803	1000
<i>MLH1</i> mutations detected	324	324	338
<i>MLH1</i> mutations missed	14	14	—
False-positive results	165	479	—
Cost (euros)	716 619	992 657	1 100 000
Average cost per <i>MHL1</i> mutation detected (euros)	2212	3064	3254
Incremental cost per additional <i>MHL1</i> mutation detected (euros)	2212	Dominated ^a	27 220
<i>First- and second-degree relatives with MLH1 mutation testing</i>	1620	1620	1690
<i>MLH1</i> mutations detected	810	810	845
<i>MLH1</i> mutations missed	35	35	—
Cost (euros)	959 577	1 235 615	1 353 521
Mutation carriers detected (n)	1134	1134	1183
Average cost per <i>MHL1</i> mutation detected (euros)	846	1090	1144
Incremental cost per additional <i>MHL1</i> mutation detected (euros)	846	Dominated ^a	7991

Abbreviation: LS, Lynch syndrome.

^aStrategy 1 is equally effective but more costly than Strategy 2.

a Hypermethylation - *MMR* mutation testing



b *MMR* mutation testing

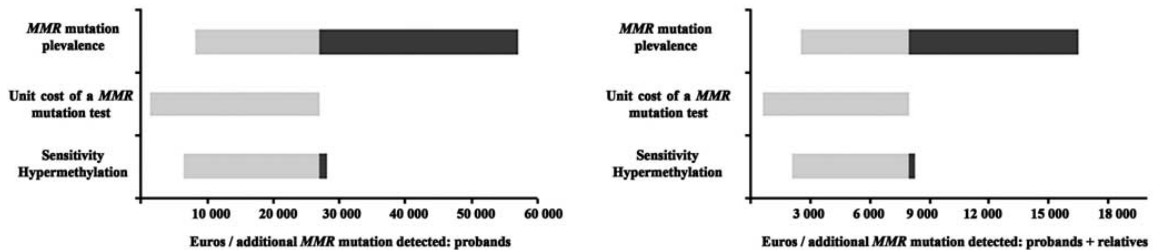


Figure 3 One-way sensitivity analysis for the incremental cost per additional *MLH1* mutation detected in probands and in probands and relatives. The three most influential variables, of descending importance, for the incremental cost per additional *MLH1* mutation detected for 2 and 3 screening strategy (Panel a and b, respectively). Each horizontal bar shows the range in cost-effectiveness given variations in each parameter value.

identifying *MLH1* mutation carriers^{16,18,21,39} (Table 3 and Supplementary Data Table 5). A single false-negative was identified adding to the increasing number of LS tumors harboring a *BRAF* mutation.²² In contrast, its specificity is low. Two factors may account for this observation. First, the low prevalence of *BRAF* mutations observed in our selected population (11% of MSI tumors and 20% of those lacking *MLH1* protein expression). This is in the lower range of reported series^{16,18,21,39} but likely to reflect the experience of referral centers.²¹ Second, the significant number of LS cases and *MLH1* germline carriers analyzed allows more accurate estimates.

Sensitivity of methylation of *MLH1* promoter was again very high with a single false-negative that also shared a *BRAF* mutation. The lack of *MLH1* promoter hypermethylation showed a sensitivity of 66% for LS depiction. Again, this is in the lower range (57–100%) of reported series^{12,18,21,39} (Table 3 and Supplementary Data Table 5) and maybe linked to the low prevalence of hypermethylation observed (42%). This low prevalence may well reflect the demographics of a Cancer Genetics Unit and/or the technique used and the conservative threshold cutoff chosen.

A number of techniques have been proposed to study the hypermethylation in tumor tissues.^{23,25,28} However, we show that MS-MLPA offers a better yield in the routine clinical diagnostic setting,²¹ since has been a robust methodology, with low variability and good analytical sensitivity when using the highly degraded DNA extracted from FFPE blocks. The definition of clinically meaningful cutoff values is crucial. The arbitrary 20% cutoff value^{33,34} has been validated in our series, whereas the 15% threshold²¹ would have resulted in an increase of false-negative results. Also, we have confirmed that considering only C- and D-regions of *MLH1* promoter,^{36,40} yields the best performance in the diagnostic setting.^{18,21,39} Quantitative assessment obtained by pyrosequencing is attractive, but its application to FFPE samples is not straightforward.

A false-negative case has been identified. The patient was a carrier of the Spanish pathogenic *MLH1* c.1865T>A (L622H) mutation.³⁷ This

case shares a *BRAF* mutation and promoter hypermethylation, the expected scenario for a non-LS tumor.^{10,11,14,15} Walsh *et al*²² reported the presence of a *BRAF* mutation in a member of a LS family that, also showed predisposition to develop colorectal serrated polyps. Interestingly, some evidence suggests that non-LS MSI-H cases may originate from sessile serrated adenoma.^{41,42} In our case, no serrated phenotype was observed. The somatic profile of this tumor suggests that hypermethylation is the second inactivating hit. The concomitant existence of *BRAF* mutations or *MLH1* promoter hypermethylation in LS patients has been extensively documented.^{10,11,13,16,18–21,26–28}

The clinical usefulness of *MLH1* hypermethylation analysis relies, in part, on the low prevalence observed. *MLH1* hypermethylation analysis does not only outperform *BRAF* mutation analysis but it is also more cost-effective, in terms of incremental cost per additional *MLH1* mutation carrier detected. Our results are in line with those by Perez-Carbonell *et al*²¹ that reached similar conclusions using a more simple cost-minimization approach. The advent of Next Generation Sequencing to the diagnostic setting will make germline mutation analysis more affordable. The one-way sensitivity analysis has been used to forecast variations in incremental cost per additional *MLH1* mutation carrier. As a token, if a germline analyses would cost 300 per sample the incremental cost per additional mutation carrier detected would be 856 when using *MLH1* hypermethylation as a pre-screening method. This still compares were direct *MLH1* germline analysis that associates with an incremental cost of 1620€.

The cost-effectiveness results are also highly sensitive to changes in the prevalence of germline mutation. Our prevalence of 47%, likely reflects the population assessed in referral centers. Also, results are quite sensitive to the operating characteristics of *MLH1* methylation detection technique further reinforcing the importance of the technique used. Of note, the recent identification and characterization of *MLH1* germline epimutations suggests an additional usefulness of the study of somatic hypermethylation in the diagnostic algorithm of LS eventually depicting those cases candidate for constitutional epigenetic analysis.

Table 3 Performance of *BRAF* and somatic *MLH1* hypemethylation analyses in the identification of LS cases in studies that use both parameters

Population	N	Inclusion criteria	LS	MLH1 analyzed in non-LS	MMR	Tissue	BRAF somatic analysis				MLH1 hypemethylation analysis			
							Method	Preval	Sensit	Specif	Method	Preval	Sensit	Specif
Deng et al (2004)	42	MSI	6	13	No	FFPE	Seq	14/42	6/6	14/29	Bisulfite Seq	13/35	2/6	13/29
Lubomierski et al (2005)	44	MSI	5	12	No	FFPE	Seq	7/44	5/5	7/32	MSP (A/C)	18/20	1/4	15/16
Julié et al (2008)	21	MSI	2	8	Yes	FFPE	Seq	6/21	2/2	6/13		90%	25%	94%
Perez-Carbonell et al (2010)	13	MLH1-	2					29%	100%	46%				
	73	MLH1-	10	10	Yes	FFPE	TaqMan	6/13	2/2	6/11	COBRA (C/D)	10/13	2/2	10/11
Bouzourene et al (2010)	27	MSI/MLH1-	16	16	Yes	FFPE	Seq	46%	100%	55%	Methylight	47/73	10/10	47/63
This study	122	MSI	57	40	Yes	FFPE	SNUPE	25/73	10/10	25/63		64%	100%	75%
								34%	100%	40%	MS-MLPA (C)	49/73	10/10	49/63
											MS-SSCA (C)	12/27	15/16	11/11
												44%	94%	100%
	71	MLH1-	24	24				8/27	16/16	8/11	MS-MLPA (C/D)	32/71	23/24	31/47
								30%	100%	73%		42%	96%	66%
								14/122	56/57	13/65				
								11%	98%	20%				
								14/122 ^a	39/40 ^a	13/65 ^a				
								11%	98%	20%				

Abbreviation: LS, Lynch syndrome.
^a*BRAF* mutation analysis taken into account only *MLH1* germline mutation carriers.
 Nagasaka study 27 has been omitted in the table as MLH1- population is not specified.
 MLH1-, loss of expression of MLH1.
 A, B, C and D, *MLH1* promoter regions according to Deng.³⁶
 Sensitivity and specificity have been analyzed based on *MLH1* germline mutation carriers.

The main strengths of our study are: (i) the inclusion of a large series of well-annotated cases with a significant number of LS cases (for a comparison with other studies see Table 3 and Supplementary Data Table 5); (ii) the evaluation of the experience of a Cancer Genetics Unit showing specific prevalence of the alterations; and (iii) the estimation of incremental costs of alternative case-finding methods for detecting *MLH1* mutation carriers combined with one-way sensitivity analysis.

In conclusion, somatic hypermethylation of *MLH1* is an accurate and cost-effective pre-screening method in the selection of patients that are candidates for *MLH1* germline analysis when LS is suspected and *MLH1* protein expression is absent. Analysis of *MLH1* hypermethylation using MS-MLPA has very few false negative results, making this technique a reasonable option in the diagnostic algorithm of LS. In any case, clinicians must be aware that some LS cases may not be identified. The present study adds significant evidence supporting the introduction of the analysis of somatic hypermethylation of *MLH1* as the pre-screening method in the routine diagnostic setting of LS with *MLH1* germline mutation.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

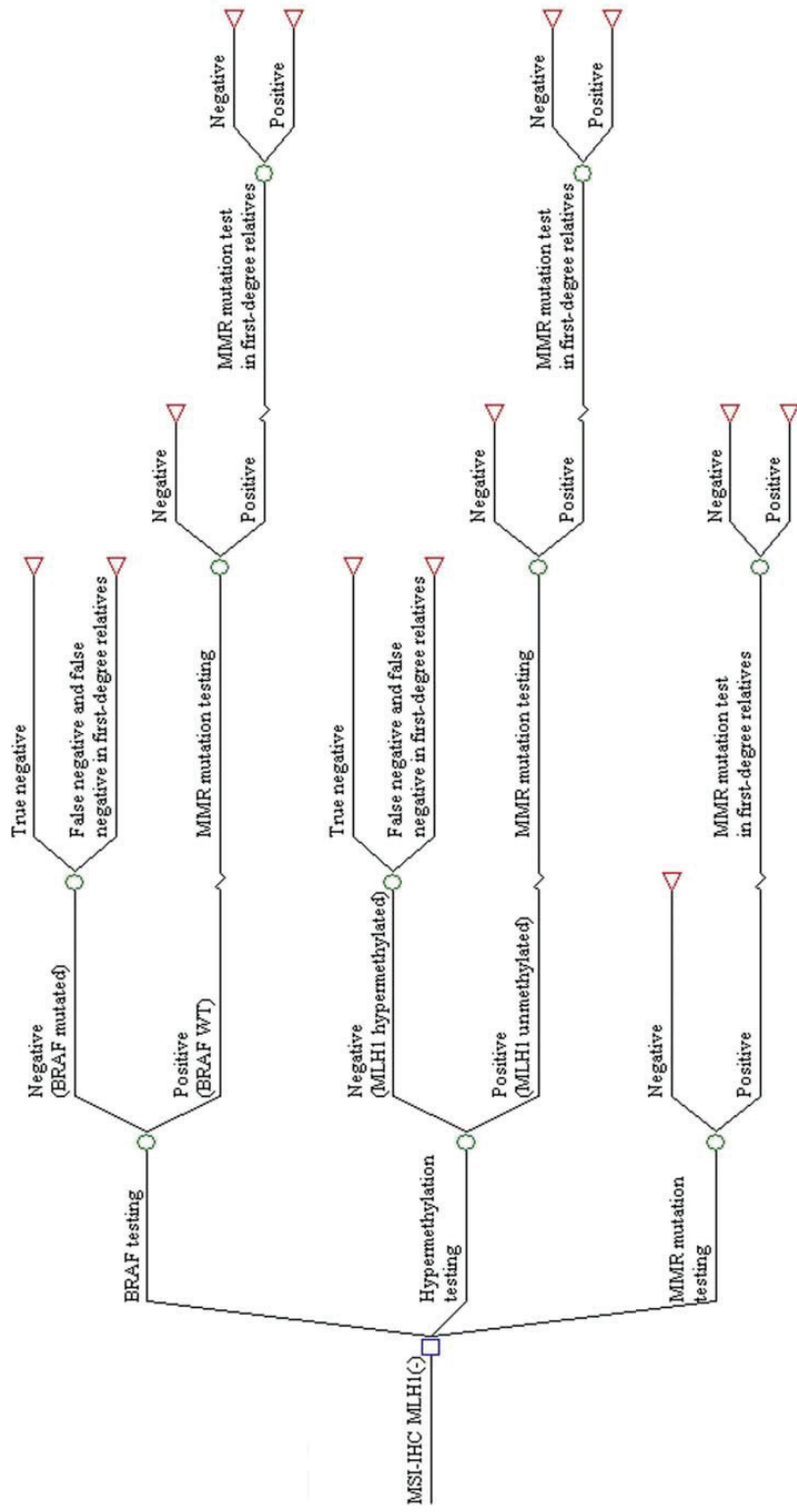
This work was supported by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF 06-06084; 09-07319), Fundació Gastroenterologia Dr Francisco Vilardell (F05-01), Ministerio de Educación y Ciencia Spanish Networks RTICCC (RD06/0020/1050, 1051), Acción en Cáncer (Instituto de Salud Carlos III) and Fundación Científica de la AECC and National Cancer Institute P30 CA46592.

- 1 Lynch HT, Krush AJ: Cancer family 'G' revisited: 1895-1970. *Cancer* 1971; **27**: 1505-1511.
- 2 Mecklin JP, Jarvinen HJ: Tumor spectrum in cancer family syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *Cancer* 1991; **68**: 1109-1112.
- 3 Marra G, Boland CR: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst* 1995; **87**: 1114-1125.
- 4 Peltomaki P, Vasen HF: Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 1997; **113**: 1146-1158.
- 5 Wu Y, Berends MJ, Sijmons RH *et al*: A role for MLH3 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 2001; **29**: 137-138.
- 6 Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P *et al*: Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998; **338**: 1481-1487.
- 7 Loukola A, Eklin K, Laiho P *et al*: Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res* 2001; **61**: 4545-4549.
- 8 Hampel H, Frankel WL, Martin E *et al*: Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005; **352**: 1851-1860.
- 9 Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O *et al*: Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2002; **20**: 1043-1048.
- 10 Deng G, Bell I, Crawley S *et al*: BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 191-195.
- 11 Domingo E, Laiho P, Ollikainen M *et al*: BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet* 2004; **41**: 664-668.
- 12 Domingo E, Niessen RC, Oliveira C *et al*: BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene* 2005; **24**: 3995-3998.
- 13 Lubomierski N, Plotz G, Wormek M *et al*: BRAF mutations in colorectal carcinoma suggest two entities of microsatellite-unstable tumors. *Cancer* 2005; **104**: 952-961.
- 14 McGivern A, Wynter CV, Whitehall VL *et al*: Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. *Fam Cancer* 2004; **3**: 101-107.

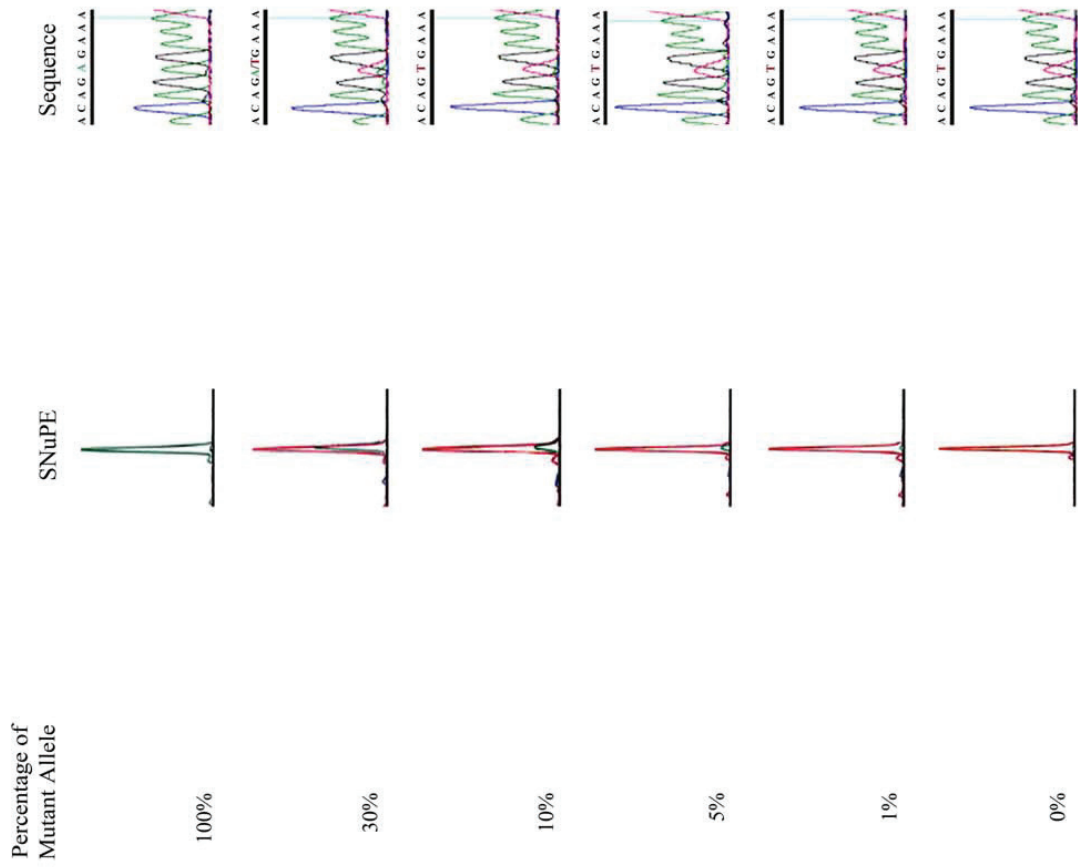
- 15 Wang L, Cunningham JM, Winters JL *et al*: BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res* 2003; **63**: 5209-5212.
- 16 Bessa X, Balleste B, Andreu M *et al*: A prospective, multicenter, population-based study of BRAF mutational analysis for Lynch syndrome screening. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; **6**: 206-214.
- 17 Domingo E, Espin E, Armengol M *et al*: Activated BRAF targets proximal colon tumors with mismatch repair deficiency and MLH1 inactivation. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; **39**: 138-142.
- 18 Julie C, Tresallet C, Brouquet A *et al*: Identification in daily practice of patients with Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer): revised Bethesda guidelines-based approach versus molecular screening. *Am J Gastroenterol* 2008; **103**: 2825-2835, quiz 2836.
- 19 Lagerstedt Robinson K, Liu T, Vandrovocva J *et al*: Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *J Natl Cancer Inst* 2007; **99**: 291-299.
- 20 Loughrey MB, Waring PM, Tan A *et al*: Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Fam Cancer* 2007; **6**: 301-310.
- 21 Perez-Carbonell L, Alenda C, Paya A *et al*: Methylation analysis of MLH1 improves the selection of patients for genetic testing in Lynch syndrome. *J Mol Diagn* 2010; **12**: 498-504.
- 22 Walsh MD, Buchanan DD, Walters R *et al*: Analysis of families with Lynch syndrome complicated by advanced serrated neoplasia: the importance of pathology review and pedigree analysis. *Fam Cancer* 2009; **8**: 313-323.
- 23 Bettstetter M, Dechant S, Ruummele P *et al*: Distinction of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic microsatellite-unstable colorectal cancer through quantification of MLH1 methylation by real-time PCR. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 3221-3228.
- 24 Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ *et al*: Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998; **58**: 3455-3460.
- 25 Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, de la Chapelle A, Peltomaki P: Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Am J Pathol* 2000; **156**: 1773-1779.
- 26 Alemany A, Sebosa K, Fridrichova I: Redundant DNA methylation in colorectal cancers of Lynch-syndrome patients. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; **47**: 906-914.
- 27 Nagasaka T, Sasamoto H, Notohara K *et al*: Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS, and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation. *J Clin Oncol* 2004; **22**: 4584-4594.
- 28 Rahner N, Friedrichs N, Steinke V *et al*: Coexisting somatic promoter hypermethylation and pathogenic MLH1 germline mutation in Lynch syndrome. *J Pathol* 2008; **214**: 10-16.
- 29 Bonis PA, Trikalinos TA, Chung M *et al*: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: diagnostic strategies and their implications. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)* 2007; **1**-180.
- 30 Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. *Genet Med* 2009; **11**: 35-41.
- 31 Motulsky AG: Screening for genetic diseases. *N Engl J Med* 1997; **336**: 1314-1316.
- 32 Landi S, Moreno V, Gioia-Patricola L *et al*: Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin (IL)6, IL8, tumor necrosis factor alpha, NFkB1, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma with colorectal cancer. *Cancer* 2003; **63**: 3560-3566.
- 33 Berkhout M, Nagtegaal ID, Cornelissen SJ *et al*: Chromosomal and methylation alterations in sporadic and familial adenomatous polyposis-related duodenal carcinomas. *Mod Pathol* 2007; **20**: 1253-1262.
- 34 Jeurken JW, Cornelissen SJ, Vriezen M *et al*: MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas. *Lab Invest* 2007; **87**: 1055-1065.
- 35 Azuara D, Rodriguez-Moranta F, de Oca J *et al*: Novel methylation panel for the early detection of colorectal tumors in stool DNA. *Clin Colorectal Cancer* 2010; **9**: 168-176.
- 36 Deng G, Chen A, Hong J, Chae HS, Kim YS: Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res* 1999; **59**: 2029-2033.
- 37 Borrás E, Pineda M, Blanco I *et al*: MLH1 founder mutations with moderate penetrance in Spanish Lynch syndrome families. *Cancer Res* 2010; **70**: 7379-7391.
- 38 Rozek LS, Herron CM, Greenson JK *et al*: Smoking, gender, and ethnicity predict somatic BRAF mutations in colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; **19**: 838-843.
- 39 Bouzourene H, Hutter P, Losi L, Martin P, Benhattar J: Selection of patients with germline MLH1 mutated Lynch syndrome by determination of MLH1 methylation and BRAF mutation. *Fam Cancer* 2010; **9**: 167-172.
- 40 Hitchens MP, Ward RL: Constitutional (germline) MLH1 epimutation as an aetiological mechanism for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 2009; **46**: 793-802.
- 41 Dong SM, Lee EJ, Jeon ES, Park CK, Kim KM: Progressive methylation during the serrated neoplasia pathway of the colorectum. *Mod Pathol* 2005; **18**: 170-178.
- 42 Kambara T, Simms LA, Whitehall VL *et al*: BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut* 2004; **53**: 1137-1144.

Supplementary Information accompanies the paper on European Journal of Human Genetics website (<http://www.nature.com/ejhg>)

Supplemental Data Figure 1. Decision tree for the three LS testing strategies (BRAF – MLH1 mutation analysis, Hypermethylation – MLH1 mutation analysis and MLH1 mutation analysis) for newly diagnosed patients with CRC and their first-degree relatives.

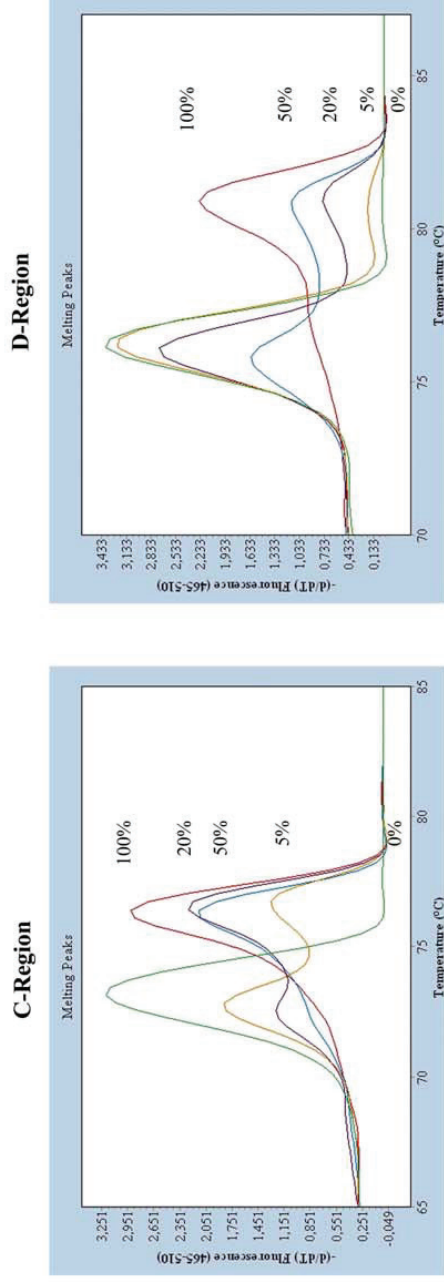


Supplemental Data Figure 2. Analytical sensitivity of *BRAF* V600E mutation detection by SNuPE assay and direct sequencing. Serial dilutions of mutant allele were analyzed (100%, 30%, 10%, 5%, 1% and 0%). The mutant allele A was detected by SNuPE when it represents 5% of all alleles analyzed.

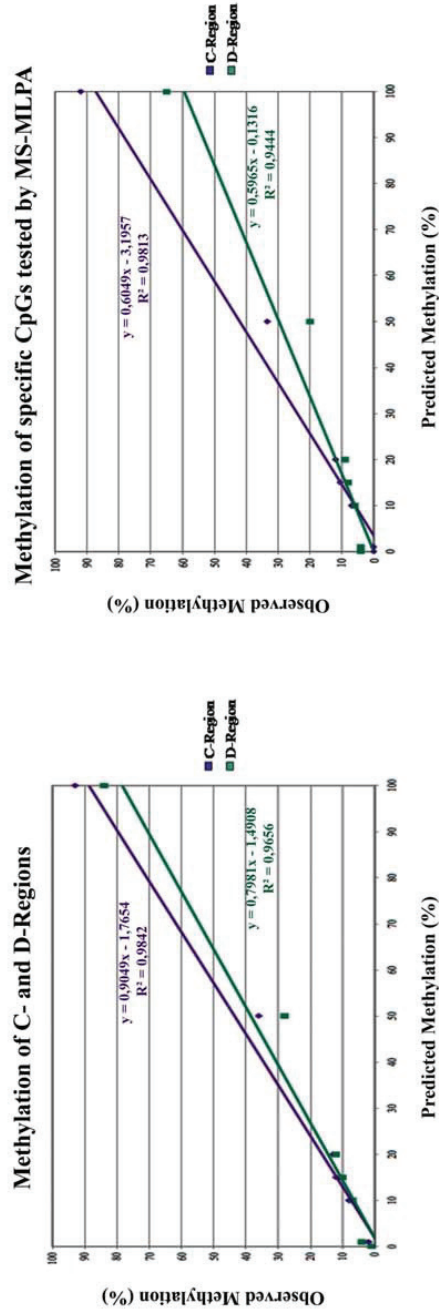


Supplemental Data Figure 3. Analytical sensitivity of MS-MCA and Pyrosequencing for the detection of *MLH1* promoter methylation in C- and D-regions. Panel A. Serial dilutions of the methylated DNA were made with an unmethylated reference DNA (100%, 50%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0%). The MS-MCA assay that analyzes the complete C- and D-region, can detect up to 5% of the methylated alleles. Panel B. Pyrosequencing assays target 5 CpGs for C-region and 8 CpGs for D-region. Each region includes the specific CpGs tested by MS-MLPA. On the left, pyrosequencing shows an excellent linear relationship between observed and predicted methylation percentages for C- (purple) and D- (green) regions. On the right this relationship is not lost when only CpGs targeted by MS-MLPA are considered.

A. Analytical sensitivity of MS-MCA



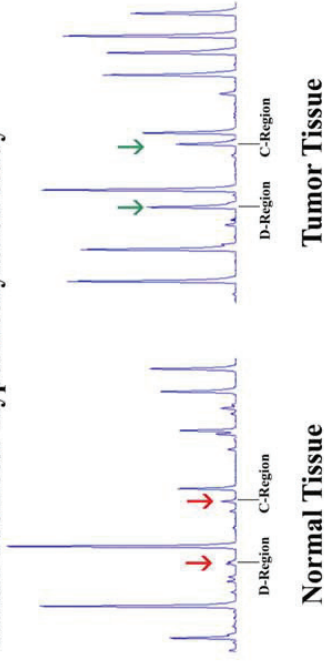
B. Analytical sensitivity of Pyrosequencing



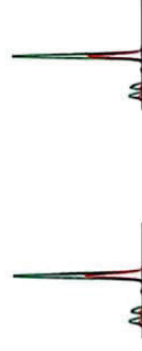
Supplemental Data Figure 4. Somatic genetic analyses of the case with *MLH1* promoter hypermethylation and *BRAF* mutation carrying an *MLH1* pathogenic mutation. Panel A. *MLH1* somatic analysis. On the left, MS-MLPA patterns of paired normal colorectal mucosa and corresponding tumor are shown. Peak heights at C- and D-regions are significantly higher in tumor tissue (green arrows) when compared to normal tissue (red arrows) after enzymatic digestion depicting the presence of methylation in the targeted CpG. On the right, no somatic allelic loss was evidenced either by SNUPE analysis targeting the germline mutation (green: L622H mutant allele; red: wild type allele) or by *MLH1* gene MLPA study of paired normal-tumor samples (green: tumor tissue; red: normal tissue). Panel B. *BRAF* mutation is exclusively detected in tumor tissue (green: V600E mutant allele; red: wild type allele).

A. SECOND HIT *MLH1* GENE ANALYSIS

MLH1 Promoter Hypermethylation study



Lack of LOH in *MLH1* germline mutation

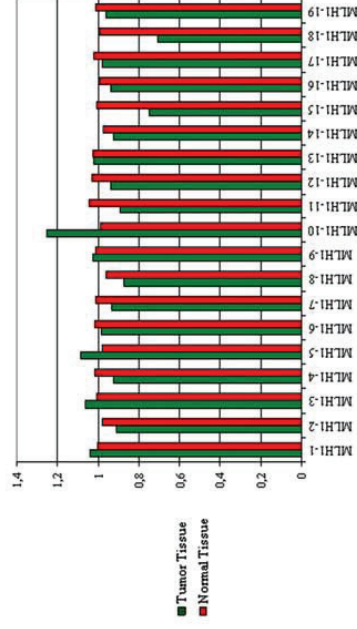


Normal Tissue

Tumor Tissue

Sample	C-Region	D-Region
RKO	97%	100%
Normal Tissue	6%	19%
Tumor Tissue	48%	53%

Copy Number Variation of the *MLH1* gene



B. *BRAF* MUTATION ANALYSIS



Normal Tissue

Tumor Tissue

PBL

Supplemental Data Table 1. Primers PCR

Technique	Fragment name	Forward primer	Reverse primer
<i>BRAF</i>	<i>BRAF_PCR</i>	5' GTAGCGGACGGCCAGTTAATGCTTGTCTGATAGGAAAAAT 3'	5' ATAGCCTCAATTCTTACCAT 3'
	<i>BRAF_SNuPE</i>	5' TAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACA 3'	
<i>MLH1-MS-MCA</i>	<i>MLHIC_ext</i>	5' TATTTTGTGTTTTTATTTGGTTGG 3'	5' TAAATACCAATCAAAATTTCTCAA 3'
	<i>MLHID_ext</i>	5' AGGTATTGAGGTGATTGGTTG 3'	5' CAATTCTCAATCATCTCTTTAATAACA 3'
	<i>MLHIC_int</i>	5' TGTTTTTATTGGTTGGGATAATTT 3'	5' CCAATCAAAATTTCTCAACTCTATA 3'
	<i>MLHID_int</i>	5' GGTGATTGGTTGAAAGGTATTTT 3'	5' ATCATCTCTTTAATAACATTAACATAACC 3'
<i>MLH1-Pyrosequencing</i>	<i>MLHIC</i>	5' GGTATTTTTGTTTTTATTGGTGGATAT 3'	5' biotin-ACTCTATAAAATTACTAAATCTCTT 3'
	<i>MLHID</i>	5' TTGAGAAATTTGATTGGTATTTAAGTTGT 3'	5' biotin-ACATTAACCTAAACCCCTAAATAACTTCCCC 3'
	<i>MLHIC_PyroS</i>	5' AAAAAAGAATTAATAGGAA 3'	
	<i>MLHID1_PyroS</i>	5' TGAAGGGTGGGGTTG 3'	
	<i>MLHID2_PyroS</i>	5' GATTGGTTGAAAGGTATTTT 3'	
	<i>MLH1_Exon16</i>	5' GGATGCTCCCGTTAAAAGCTTG 3'	5' GAAGTATAAGAAATGGGCTGTGCAC 3'
<i>MLH1-LOH</i>	<i>MLH1_SNuPE</i>	5' TATTGCAAGTGGACTGTGAAAATGTA 3'	

Supplementary Methods

Detection of *BRAF* V600E mutation

BRAF hotspot mutation c.1799T>A (V600E) was amplified by PCR with *BRAF_PCR* primers. PCR reaction was performed in 30µl of 1.5mM MgCl₂, 200µM dNTPs, 20 - 100ng genomic DNA, 0.5µM of each primer and 1U Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 35 cycles with annealing temperature of 55°C. The PCR products were purified using Illustra™ GFX™ DNA and Gel Band Purification kit (GE

Healthcare, UK). Sequencing analysis of PCR products was performed with BigDye Terminator v.3.1 Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) using amplification primers.

SNaPshot reactions were carried out in a 10 μ l final volume containing SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix (5 μ l), specific primer (0.2 μ M), and the purified PCR product (1.5 μ l). The cycling program included 25 cycles of 96 $^{\circ}$ C for 10s, 50 $^{\circ}$ C for 5s, and 60 $^{\circ}$ C for 30s. Extension products were purified with 1U of shrimp alkaline phosphatase (Amersham, UK) for 15min at 37 $^{\circ}$ C and then 15min at 80 $^{\circ}$ C. The purified products were run in an ABI Prism 3130 DNA sequencer and were analyzed by GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems).

MS-MCA

Each promoter region was preamplified using *MLH1C_ext* and *MLH1D_ext* primers. Eighty ng of bisulfite modified DNA was added to MegaMix double solution (Microzone Ltd., UK) containing 2 μ M of each primer. PCR conditions were: 95 $^{\circ}$ C at 10 min followed by 15 cycles of 30s at 95 $^{\circ}$ C, 30s at 50 $^{\circ}$ C, 30s at 72 $^{\circ}$ C and a final elongation step at 72 $^{\circ}$ C for 10min. The nested PCR was carried out in a LightCycler 480 II (Roche) using 1 μ l of amplified *MLH1* promoter fragments in 9 μ l of LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit (Roche) containing 0.5 μ M of *MLH1C_int* and *MLH1D_int* primers. The amplification protocol was: 95 $^{\circ}$ C for 10min, followed by 40 cycles of 95 $^{\circ}$ C for 10s, 50 $^{\circ}$ C for 20s, and 72 $^{\circ}$ C for 25s.

Pyrosequencing

Each promoter region was preamplified using *MLH1C* and *MLH1D* primers. The program used for amplification was: 95°C for 15min, 35 cycles of 94°C for 1min, 1min at the annealing temperature (47°C for C-region and 58°C for D-region), 72°C for 1min and a final extension at 72°C for 10min. Ten µl of PCR product were analyzed by PyroMarkMD pyrosequencer. C-region was sequenced using *MLH1C_PyroS* primers and D-region was sequenced using *MLH1D1_PyroS* and *MLH1D2_PyroS*. Purification and subsequent processing of the biotinylated single-stranded DNA was performed according to the manufacturer's recommendations. Percent methylation was calculated at 5 CpG sites for C-region and 8 CpG sites for D-region. The methylation percentage at individual CpG sites was analyzed using the Pyro Q-CpG software (Biotage, Uppsala, Sweden).

Analysis of *MLH1* loss of heterozygosity (LOH) in the *MLH1* mutation carrier

MLH1 exon 16 was amplified using *MLH1_Exon16* primers. Amplification was carried out for 40 cycles with annealing temperature of 58°C. Ten µl PCR reaction was performed on 100ng genomic DNA, 5µl of Megamix double (Microzone Ltd., UK) and 0.1µM of each primer. The PCR product was purified using Illustra™ GFX™ DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare). Allelic imbalance was assessed using the ABI PRISM® SNaPshot® Multiplex Kit (Applied Biosystems) using *MLH1_SNuPE* primer that targets the c.1865T>A *MLH1* mutation (see

below following the protocol described above). Copy number variation of *MLH1* gene was evaluated using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) P003 Kit (MRC-Holland, Amsterdam) as described Taylor et al.¹.

Reference not cited in the main text

- 1 Taylor CF, Charlton RS, Burn J, Sheridan E, Taylor GR: Genomic deletions in MSH2 or MLH1 are a frequent cause of hereditary non-polyposis colorectal cancer: identification of novel and recurrent deletions by MLPA. *Hum Mutat* 2003; **22**: 428-433.

Supplemental Data Table 2. Unit cost for each strategy

	Unit cost (€)
<i>MLHI</i> germline mutation testing	
Specialist technician	700
Material and equipment	400
Total	1 100
<i>BRAF</i> V600E testing	
Specialist technician	86
Material and equipment	23
Total	110
<i>MLHI</i> Hypermethylation testing	
Specialist technician	76
Material and equipment	36
Total	112
<i>MLHI</i> mutation testing in first- and second-degree relatives	
Specialist technician	95
Material and equipment	55
Total	150

Supplemental Data Table 3. Operating characteristics of absence of *BRAF* mutation and lack of *MLH1* promoter hypermethylation in familial cases with MSI and loss of *MLH1* expression

	Absence of <i>BRAF</i> mutation		Lack of <i>MLH1</i> hypermethylation (*)			Lack of <i>BRAF</i> and/or <i>MLH1</i> hypermethylation
	122 tumors	71 tumors	10%	15%	20% (**)	
Sensitivity (TP/TP+FN)	98% (56/57)	96% (23/24)	88% (21/24)	91% (22/24)	96% (23/24)	96% (23/24)
Specificity (TN/TN+FP)	20% (13/65)	28% (13/47)	74% (35/47)	72% (34/47)	66% (31/47)	66% (31/47)
PPV (TP/TP+FP)	52% (56/108)	40% (23/57)	63% (21/33)	62% (22/35)	59% (23/39)	59% (23/39)
NPV (TN/TN+FN)	93% (13/14)	93% (13/14)	92% (35/38)	94% (34/36)	97% (31/32)	97% (31/32)
Accuracy (TP+TN/all)	56% (69/122)	51% (36/71)	79% (56/71)	79% (56/71)	76% (54/71)	76% (54/71)

(*) Three cut-off values are considered. (**) In grey operating characteristics of the selected cut-off are shown

TP, True positive; FP, False positive; FN, False negative; TN, True negative; PPV, Positive predictive value; NPV, Negative predictive value

Supplemental Data Table 4. Comparison of methylation percentage obtained by pyrosequencing on C- and D-regions with specific CpGs that are taken into account by MS-MLPA.

Predicted Methylation (%)	C-Region		D-Region	
	Whole Region (%)	Specific CpGs tested by MS-MLPA (%)	Whole Region (%)	Specific CpG tested by MS-MLPA (%)
0	1	0	1	4
1	2	0	4	4
5	5	4	4	4
10	8	7	7	6
15	12	10.5	10	8
20	13	12	12	9
50	36	33.5	28	20
100	93	92	84	65

Supplemental Data Table 5. Performance of *BRAF* and somatic *MLH1* hypermethylation analyses in the identification of LS cases in studies assessing one parameter. Sensitivity and specificity analyses have been performed for *MLH1* germline mutation carriers only.

	Population	N	Inclusion criteria	LS	MLH1 LS	MMR analyzed in non-LS	Tissue	Method	MSI tumors only		MLH1 loss only	
									Preval	Sensit	Specif	Sensit
<i>BRAF</i> somatic analysis												
Domingo et al., 2004	Multicenter	317	MSI	111	77	No	Frozen FFPE	Seq	82/317 26%	77/77 100%	82/206 40%	
Loughrey et al., 2007	Single center	56	MSI	25	10	No	FFPE	AS - PCR Seq	17/56 30%	10/10 100%	17/29 59%	
Lagerstedt et al., 2007	Genetic Counseling Unit	25	MSI	21	14	No	FFPE	Seq	3/25 12%	14/14 100%	3/4 75%	2/2 100%
Bessa et al., 2008	Multicenter	111	MSI	8	3	Yes	FFPE	Seq	20/111 18%	3/3 100%	20/83 24%	18/60 30%
Somatic <i>MLH1</i> hypermethylation analysis												
Cunningham et al., 1998	Multicenter	21	MSI- MLH1-	8	8	Yes	Frozen FFPE	Restriction enzyme PCR (A/B)	16/21 76%	5/8 63%	13/13 100%	4/7 57%
Kuismanen et al., 2000	Multicenter	73	MSI	27	26	Yes	FFPE	Restriction enzyme PCR (B)	48/73 66%	14/26 54%	36/46 78%	30/6 83%
Rahner et al., 2008	Multicenter	123	MLH1-	98	60	Yes	FFPE	COBRA SNuPE (A/C)	9/123 7%	56/60 94%	5/25 20%	

ARTICLE 2

Nanofluidic digital PCR for *KRAS* mutation detection and quantification in gastrointestinal cancer

Daniel Azuara*, Mireia M. Ginesta*, **Mireia Gausachs**, Francisco Rodriguez-Moranta, Joan Fabregat, Juli Busquets, Nuria Pelaez, Jaume Boadas, Sara Galter, Víctor Moreno, Jose Costa, Javier de Oca, i Gabriel Capellá

(*) Aquests autors han contribuït equitativament en aquest treball.

Clinical Chemistry; 58:9; 1332–1341 (2012)

Resum del treball: La quantificació simultània de múltiples al·lells mutats en *KRAS* pot proporcionar informació addicional a la obtinguda pels procediments de sensibilitat estàndard de detecció de mutacions. Es va avaluar la viabilitat de la plataforma del sistema de nanofluids i PCR digital per detectar i quantificar simultàniament les mutacions *KRAS* en mostres clínicament rellevants. Es van avaluar 2 grups de pacients (colorectal i malaltia pancreàtica): El grup 1, va consistir en 27 pacients amb carcinomes colorectals, 14 pacients amb adenomes i 5 individus controls; el grup 2, va consistir en 42 pacients amb carcinoma de pàncrees, 4 amb adenocarcinomes d'ampul·la, i 6 amb pancreatitis crònica. La PCR digital es va realitzar amb la matriu de xip digital Fluidigm. El sistema de nanofluids i la PCR digital té una sensibilitat analítica fins a 0,05% i 0,1%, per detectar al·lells mutats i depèn de l'al·lel analitzat. Pel grup de mostres de pacients amb malaltia colorectal, la PCR convencional detectà mutacions en el gen *KRAS* en 9 de 14 (64%) adenomes, mentre que la PCR digital va augmentar el nombre de detecció fins a 11 (79%) de 14. Setze (59%) de 27 carcinomes mostraren mutació en *KRAS* amb la PCR convencional. En 5 casos (3 adenomes, 2 carcinomes), el nombre total d'al·lells mutants va canviar. Pel grup amb malaltia pancreàtica, la PCR digital va augmentar el nombre de casos positius de 26 a 34 (81%) i es van identificar més de dos al·lells mutats en 25 casos, en comparació amb la PCR convencional, que identificà múltiples al·lells mutats en *KRAS* en només 12 casos. Hi ha una bona correlació entre els resultats obtinguts amb biòpsies tumorals i els obtinguts amb el suc pancreàtic. La PCR digital proporciona una mesura robusta i quantitativa de la proporció d'al·lells mutats en *KRAS* en mostres obtingudes de rutina. Postulem que també permet una millor classificació dels tumors, amb potencial rellevància clínica.

Nanofluidic Digital PCR for *KRAS* Mutation Detection and Quantification in Gastrointestinal Cancer

Daniel Azuara,^{1†} Mireia M. Ginesta,^{1†} Mireia Gausachs,¹ Francisco Rodriguez-Moranta,² Joan Fabregat,³ Juli Busquets,³ Nuria Pelaez,³ Jaume Boadas,⁴ Sara Galter,⁴ Victor Moreno,⁵ Jose Costa,⁶ Javier de Oca,⁷ and Gabriel Capellá^{1*}

BACKGROUND: Concomitant quantification of multiple mutant *KRAS* (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) alleles may provide information in addition to that provided by standard mutation-detection procedures. We assessed the feasibility of a nanofluidic digital PCR array platform to detect and quantify *KRAS* mutations simultaneously in clinically relevant samples.

METHODS: We assessed 2 groups of patients (colorectal and pancreatic disease): Group 1 consisted of 27 patients with colorectal carcinomas, 14 patients with adenomas, and 5 control individuals; group 2 consisted of 42 patients with pancreatic carcinoma, 4 with adenocarcinomas of the ampulla, and 6 with chronic pancreatitis). Digital PCR was performed with the Digital Array Chip (Fluidigm).

RESULTS: Nanofluidic digital PCR detected mutant alleles at 0.05% to 0.1%, depending on the variant analyzed. For the colorectal disease group, conventional PCR detected 9 (64%) of 14 adenomas that were positive for *KRAS* mutants, whereas digital PCR increased this number to 11 (79%) of 14. Sixteen (59%) of 27 carcinomas showed *KRAS* mutation with conventional PCR. Two additional cases were detected with digital PCR. In 5 cases (3 adenomas, 2 carcinomas), the total number of mutant alleles changed. For the pancreatic disease group, digital PCR increased the number of positive cases from 26 to 34 (81%) and identified ≥ 2 mutant alleles in 25 cases, compared with conventional PCR, which identified multiple *KRAS* mutant alleles in only 12 cases. A good correlation was observed between

results obtained with tumor biopsies and those obtained with pancreatic juice.

CONCLUSIONS: Digital PCR provides a robust, quantitative measure of the proportion of *KRAS* mutant alleles in routinely obtained samples. It also allows a better classification of tumors, with potential clinical relevance.

© 2012 American Association for Clinical Chemistry

Mutations in the *KRAS*⁸ (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) gene, which are located primarily in codons 12 and 13 of exon 2 (1), are among the most frequently detected activating mutations in human cancers. Up to 65% to 100% of pancreatic tumors harbor codon 12 and 13 mutations, whereas this proportion decreases to 30%–50% in colorectal tumors. In pancreatic and colorectal human cancers, *KRAS* mutations appear in the early stages of tumorigenesis (2–4).

Somatic mutations can serve as biomarkers that allow tumor cells to be distinguished from their normal counterparts. Mutations within tumor cells and in DNA released by tumor cells into clinical samples—such as blood, lymph, stool, or urine—can be used to detect cancers (5). The use of *KRAS* mutations for the early detection of pancreatic and colorectal tumors has been explored with fine-needle aspirates, pancreatic juice, or stool DNA, either alone or in combination with other genetic and epigenetic markers (6–8). The usefulness of the detection of *KRAS* mutations as a prognostic marker has also been explored, but the results have been inconclusive. With the advent of ther-

¹ Translational Research Laboratory, Catalan Institute of Oncology (ICO-IDIBELL), Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ² Department of Gastroenterology, University Hospital of Bellvitge (HUB-IDIBELL), Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ³ Department of General and Digestive Surgery, Biliopancreatic Unit, University Hospital of Bellvitge (HUB-IDIBELL), Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ⁴ Department of Gastroenterology, Hospital of Terrassa, Terrassa Health Consortium (CST), Barcelona, Spain; ⁵ Biomarkers and Susceptibility Unit, Catalan Institute of Oncology (ICO-IDIBELL), CIBERESP, and University of Barcelona, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ⁶ Department of Pathology, Yale University School of Medicine, New Haven, CT; ⁷ Department of General and Digestive Surgery, Colorectal Unit, University Hospital of Bellvitge

(HUB-IDIBELL), Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

[†] These 2 authors contributed equally to the study.

* Address correspondence to this author at: Translational Research Laboratory, Catalan Institute of Oncology-IDIBELL, Av. Gran Via 199–203, Hospitalet de Llobregat, 08908 Barcelona, Spain. Fax +34-932607466; e-mail gcapella@iconologia.net.

Received March 20, 2012; accepted June 14, 2012.

Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2012.186577

⁸ Human genes: *KRAS*, v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; TP53, tumor protein 53.

apies that target the epidermal growth factor receptor in patients with metastatic colorectal cancer, *KRAS* has emerged as a major predictive marker, because tumors containing *KRAS* mutations are believed to be unresponsive to cetuximab or panitumumab treatment (9–14). Detection of *KRAS* mutations has also been clinically useful for diagnosing pancreatic tumors via analysis of tumor biopsies, pancreatic juice, serum, and stool DNA (6, 15, 16). In this setting, the lack of diagnostic specificity has precluded more-widespread use.

To use tumor-specific somatic mutations as biomarkers for clinical oncology requires that they be detected even when they present in only a small proportion of cells within the tumor or when the mutations occur in a large excess of nonmutated DNA. An increasing number of techniques are being developed to detect *KRAS* mutations, and these techniques have different levels of analytical sensitivity and specificity. Direct sequencing is capable of detecting a mutant allele at a prevalence of $\leq 20\%$ (16, 17). Such frequently used techniques as pyrosequencing and allele-specific PCR have analytical sensitivities ranging from 1% to 10% for the detection of mutant DNA diluted into a background of wild-type DNA (18–20). The TheraScreen® K-RAS Mutation Kit (DxS Limited), a test based on an amplification-refractory mutation system (ARMS)⁹ technology and possibly the most widely used CE-marked kit for diagnostic use, has a reported analytical sensitivity of approximately 1% of mutant allele (21). More-sensitive methods are available for *KRAS* analysis, such as mutant-enriched PCR (9) and COLD-PCR, which has a reported analytical sensitivity of about 0.1% (22–24) or better (25).

Digital PCR is an alternative when considering highly sensitive techniques. Whereas conventional digital PCR uses sequential limiting dilutions of target DNA followed by PCR amplification (26, 27) to perform single-molecule PCR, the digital array performs the same function by partitioning DNA molecules before the PCR. The use of multiple independent chambers facilitates the detection of rare copies of a mutated allele in a limited amount of patient sample. The digital array has previously been used for a variety of different applications, including absolute quantification (26), mutation detection (28, 29), and studies of variation in copy number (30, 31).

We previously hypothesized that the variation profiles of pathologic alleles that are eventually expanded in tumors are due to the interaction between

genetic instability and selection (32, 33). The analysis of profiles of mutation frequencies for appropriate loci selected according to the tumor type reflects the dynamics of carcinogenesis and yields a novel type of biomarker. This novel metric, “mutational load distribution analysis,” is based on precise quantification of a subset of *KRAS* and *TP53* (tumor protein 53) alleles and can effectively discriminate between normal pancreatic tissue and pancreatic tumors (34). This type of measure requires quantitative technologies capable of directly measuring the number of DNA molecules tested per assay. Recent developments have made digital PCR a feasible methodology amenable for the analysis of routine samples.

In this study, we assessed the feasibility of the nanofluidic digital PCR array (Fluidigm) platform as a quantitative and analytically sensitive approach to detect *KRAS* mutations in routinely obtained samples. We preliminarily explored the usefulness of quantifying multiple *KRAS* alleles simultaneously in colorectal and pancreatic carcinoma samples.

Materials and Methods

PATIENTS AND SAMPLES

All patients gave informed written consent to participate and to have their biological specimens analyzed. The study was cleared by the Ethical Committee of the University Hospital of Bellvitge and the Hospital of Terrassa.

We assessed 2 groups of patients (colorectal disease and pancreatic disease). The colorectal disease group included biopsies from 14 patients with sporadic adenomas, 27 patients with sporadic carcinomas, and 5 patients with a normal colonoscopy result (controls). Fresh frozen tumors or normal biopsy samples were obtained from surgical resections (partial or complete colectomy) or from endoscopy examinations carried out between 2007 and 2010 at the University Hospital of Bellvitge and the Hospital of Terrassa. In a small subset of these tumors, corresponding formalin-fixed, paraffin-embedded blocks were analyzed. The pancreatic disease group included 42 patients with carcinoma of the exocrine pancreas, 4 patients with adenocarcinomas of the ampulla of Vater, and 6 patients with chronic pancreatitis. Retrograde pancreatic juice samples were obtained from all of these patients during surgery. The corresponding biopsy sample of the tumor was also analyzed for a small set of these patients ($n = 10$). All biological samples were immediately stored at -80°C until use.

The main clinicopathologic characteristics of the patients are summarized in Table 1. Examination of sections stained with hematoxylin and eosin verified the pathologic diagnosis, and carcinomas were classi-

⁹ Nonstandard abbreviations: ARMS, amplification refractory mutation system; UICC, Union for International Cancer Control; FAM, 6-carboxyfluorescein; ROX, 6-carboxy-X-rhodamine; PanIN, pancreatic intraepithelial neoplasia.

Table 1. Clinicopathologic characteristics of the patients included in the study.

	Colonic disease			Pancreatic disease		
	Healthy controls (n = 5)	Adenomas (n = 14)	Carcinomas (n = 27)	Pancreatitis (n = 6)	ADC ^a of the ampulla (n = 4)	ADC exocrine pancreas (n = 42)
Sex, n						
Male	3 (60%)	9 (64%)	20 (74%)	5 (83%)	1 (25%)	19 (45%)
Female	2 (40%)	5 (36%)	7 (26%)	1 (17%)	3 (75%)	23 (55%)
Age, years ^b	56.21 (15.81)	63.2 (10.1)	68.9 (10.6)	45.8 (9.58)	73.75 (8.99) ^c	63.78 (11.19) ^c
Location, n						
Distal		4 (29%)	9 (33%)			
Proximal		10 (71%)	18 (67%)			
Histologic grade, n						
Low risk		1 (7%)				
Intermediate Risk		12 (86%)				
High risk		1 (7%)				
Stage of CRC, n						
I–II			15 (56%)			
III–IV			12 (44%)			
Stage of PaC						
Tis					1 (20%)	—
I					2 (40%)	1 (2%)
II					2 (40%)	38 (93%)
III					—	2 (5%)

^a ADC, adenocarcinoma; CRC, colorectal cancer; PaC, pancreatic adenocarcinoma; Tis, tumor in situ.
^b Age data are presented as the mean (SD).
^c $P < 0.05$: chronic pancreatitis vs carcinoma of the ampulla; chronic pancreatitis vs carcinoma of the exocrine pancreas.

fied according to the Union for International Cancer Control (UICC) TNM classification system.

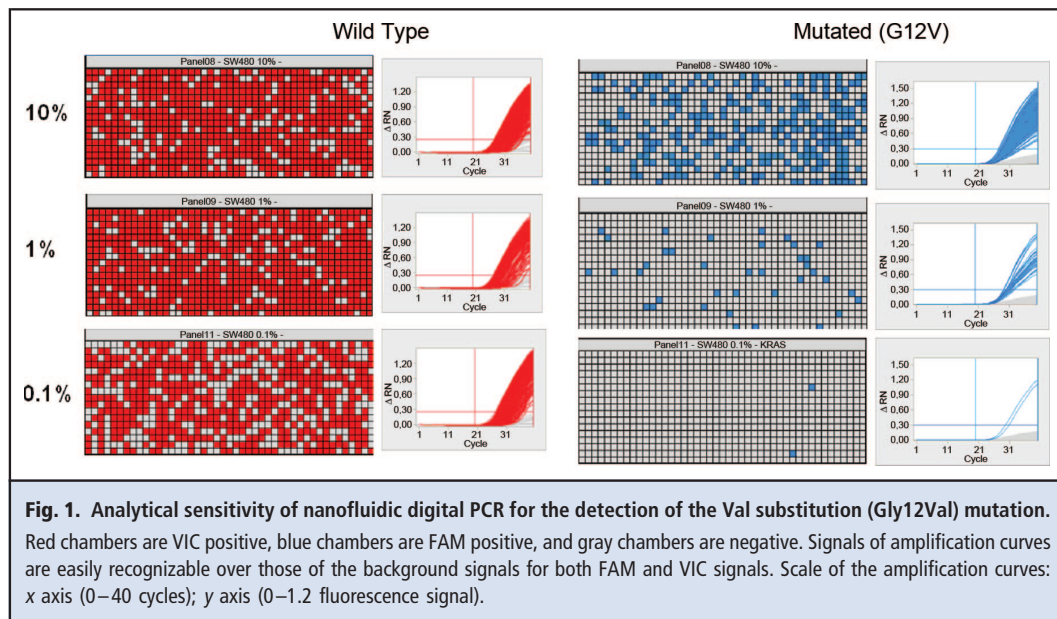
DNA EXTRACTION

DNA from fresh frozen tissues was extracted with the saline method (35). DNA from cell lines with known *KRAS* mutations (MIA PaCa-2, SW480, NP9, SW1116, A549, and CAL-62) was extracted with the FlexiGene DNA Kit (Qiagen). DNA was extracted from pancreatic juice with the phenol–chloroform method (33, 36). DNA was extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues with the QIAamp DNA Mini Kit® (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. DNA quality and concentration were measured with a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific).

NANOFLUIDIC DIGITAL PCR

Digital PCR was performed with the Digital Array (Fluidigm Europe), a nanofluidic digital array that partitions a sample premixed with PCR reagents into hundreds of individual PCR reactions, thus allowing the

absolute quantification of target sequences. The *KRAS* mutation analysis is based on allele-specific PCR. We designed external primers for complementary probe regions and TaqMan® MGB probes (Applied Biosystems/Life Technologies) to screen for the 6 common mutations in *KRAS* codon 12 (see Table 1 in the Data Supplement that accompanies the online version of this article at <http://www.clinchem.org/content/vol58/issue9>). For each allele tested, one probe targets the wild-type variant (tagged with Applied Biosystems' proprietary VIC fluorophore), and the other targets a mutant variant [tagged with the 6-carboxyfluorescein (FAM) fluorophore]. We prepared 6- μ L reaction mixes containing 3 μ L of Master Mix (Fluidigm), 0.6 μ L of the 20 \times GE Sample Loading Reagent (Fluidigm), 0.3 μ L of DNA-free water, 0.3 μ L of the 20 \times gene-specific assays (TaqMan® probes specific for mutated and wild-type *KRAS*), and 1.8 μ L (36 ng) of DNA sample. We then loaded 5 μ L of the reaction mixture onto a digital array. The reaction mixture was uniformly partitioned into a 0.65- μ L sample panel of 770 reaction chambers containing 0.84 nL each.



The digital array underwent thermocycling on the BioMark™ Real-Time PCR System (Fluidigm Europe). The thermocycling conditions were: 120 s at 50 °C, a hot start at 95 °C for 10 min, and 40 cycles of 15 s of denaturation at 95 °C and 1 min of annealing and extension at 60 °C. The FAM and VIC signals of all chambers were recorded at the beginning of each annealing step. BioMark Digital PCR Analysis Software was used to process the data, analyze PCR amplification, and count the numbers of VIC-positive chambers and FAM-positive (i.e., *KRAS* mutant positive) chambers in each panel. We used 6-carboxy-X-rhodamine (ROX) signals as an internal positive PCR control. Software was used to calculate the number of positives in each panel and to generate data as heat maps with corresponding amplification curves for each of the 770 chambers. The Fluidigm digital PCR analysis software uses a Poisson model to estimate the number of DNA molecules from the count of positive wells (estimated targets) for each allele, because positivity for a well may correspond to multiple DNA molecules. Mutant allele frequencies for a given case were calculated as the number of estimated targets for a given probe divided by the total number of alleles analyzed. The total number of alleles analyzed was the sum of the median of wild-type estimated targets after probing for each mutation and the total number of estimated mutant alleles in the sample.

CONVENTIONAL REAL-TIME PCR ANALYSIS

We used a real-time PCR machine (LightCycler® 480; Roche Applied Science) to perform real-time assays

with the same set of primers and probes. We added 20 ng genomic DNA to 2.5 μL TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.125 μL of the 40× probe mixture, and 1.375 μL water. The thermocycling parameters were the same for all of the alleles tested: 95 °C for 10 min and 40 cycles at 92 °C for 15 s and an annealing temperature of 60 °C for 1 min. A final step of allelic discrimination is necessary to differentiate between the VIC and FAM signals. The LightCycler 480 Software (version 1.5) determines the genotype of the sample by measuring the intensity distribution of dyes used after the PCR.

Results

ANALYTICAL SENSITIVITY OF THE DIGITAL PCR

To determine the analytical sensitivity of the 2 techniques (nanofluidic digital PCR and conventional real-time PCR), we performed a reconstitution experiment with all of the known *KRAS* mutations at codon 12 (Gly12Cys, Gly12Val, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Ser, and Gly12Arg; see Table 1 in the online Data Supplement). Serial reconstitutions (25%, 10%, 5%, 1%, 0.5%, 0.1%, and 0.05%) of mutant DNA (MIA PaCa-2, SW480, NP9, SW1116, A549, and CAL-62, respectively) were prepared with increasing amounts of wild-type DNA. Nanofluidic digital PCR was capable of detecting mutant alleles at a relative concentration of 0.05% to 0.1%, depending on the variant analyzed (Fig. 1; see Figs. 1–3 in the online Data Supplement). The analytical sensitivity of the conventional real-time PCR

Table 2. Cross-reactivity analysis of the probes specific for distinct *KRAS* mutations.^a

Wild type, %	Mutation, %						VIC signal (wild type)			FAM signal (mutated)			
	Gly	Val	Asp	Cys	Arg	Ser	Ala	Probe	Count	No. of estimated targets ^b	Count	No. of estimated targets ^b	Mutation detection, % ^c
GGT	GTT	GAT	TGT	CGT	AGT	GCT							
64	25	10	1	0	0	0	Cys	535	921	16	16	1.7	
64	10	25	1	0	0	0	Cys	559	1005	19	19	1.9	
64	25	10	0	1	0	0	Arg	639	1366	13	13	1	
64	10	25	0	1	0	0	Arg	610	1212	21	21	1.7	
64	25	10	0	0	1	0	Ser	633	1332	23	23	1.7	
64	10	25	0	0	1	0	Ser	632	1326	13	13	1	
64	25	10	0	0	0	1	Ala	649	1428	16	16	1.1	
64	10	25	0	0	0	1	Ala	660	1501	17	17	1.1	

^a Amino acid residues and corresponding codon 12 sequences are indicated for wild type and mutants.
^b Estimated targets, estimated number of molecules present in a given panel as calculated with the Fluidigm Digital PCR analysis software.
^c Percentage of mutant molecules in a background of wild-type DNA.

analysis was $\geq 1\%$ mutant in a background of wild-type DNA (see Fig. 4 in the online Data Supplement).

Cross-detection of distinct *KRAS* mutant alleles was analyzed. Mixtures containing a high proportion (25% and 10%) of the 2 most frequent mutations (Gly12Asp and Gly12Val) and 1% of the minor mutations were hybridized to Ser, Arg, Cys, and Ala probes (Table 2; see Fig. 5 in the online Data Supplement). No cross-reactivity was detected with any of the probes.

COLORECTAL DISEASES

Neither digital PCR nor conventional allele-specific PCR detected mutations in the control samples. Nine (64%) of the 14 patients with adenomas were positive for *KRAS* mutants by conventional PCR, whereas digital PCR was able to increase this number to 11 (79%). Two synchronous adenomas scored positive for *KRAS* mutants with both techniques. Sixteen (59%) of 27 patients with carcinomas were determined to have a *KRAS* mutant by conventional PCR. Two additional cases were detected with digital PCR (Table 3; see Fig. 6 in the online Data Supplement). In all, 4 cases were reclassified as positive when digital PCR was used.

The quantification of *KRAS* mutations with the nanofluidic digital PCR array is shown in Fig. 2 (also see Fig. 7 in the online Data Supplement). The mean *KRAS* mutational load—the sum of mutated allele frequencies for a given case—was 20.1% for the adenoma cases and was increased to 21.5% in the carcinoma cases (see Fig. 8 in the online Data Supplement). All *KRAS* mutant-positive adenomas and 16 of 18 carcinomas harbored a dominant allele. In contrast, the

proportion of adenoma cases having multiple mutant alleles was 21% (3 of 14) for adenomas and 7% (2 of 27) for the carcinomas (Fig. 2; see Fig. 7 in the online Data Supplement).

PANCREATIC DISEASES

Conventional allele-specific PCR revealed the presence of one or more *KRAS* mutant alleles in 26 (62%) of 42 samples of pancreatic juice from carcinoma cases. Digital PCR increased the number of positive cases to 34 (81%) (Table 3; see Fig. 6 in the online Data Supplement). Additionally, digital PCR was capable of depicting heterogeneity within the *KRAS* locus in 25 cases, whereas conventional PCR detected multiple *KRAS* alleles in only 12 cases. A dominant allele was present in 16 of the carcinomas of the exocrine pancreas (Fig. 2; see Fig. 7 in the online Data Supplement). A small subset of carcinomas of the ampulla was analyzed. Two of these carcinomas were positive with conventional PCR, and digital PCR detected an additional *KRAS* mutant-positive carcinoma. Of the 6 patients with chronic pancreatitis (all of whom underwent operations), conventional real-time PCR revealed the presence of *KRAS* mutations in 2 cases, and digital PCR also identified 2 cases as positive. Only 1 case (P1) was detected with both techniques, and this case was eventually diagnosed as a pancreatic adenocarcinoma (see Fig. 7B in the online Data Supplement). The mean *KRAS* mutational loads in the pancreatic juice samples from the exocrine pancreatic carcinoma cases and the ampullary carcinoma cases were similar (12.7% and 9.4%, respectively; see Fig. 8 in the online Data Supplement).

Table 3. Correlation of *KRAS* mutation detection with the nanofluidic digital PCR array with conventional real-time PCR, for colonic disease (A) and pancreatic disease (B).^a

Conventional real-time PCR	A. Colonic disease.				
	No. of mutations	Nanofluidic digital PCR			
		0	1	2	3
0	19	4	0	0	
1	0	21	4	0	
2	0	0	0	1	

Conventional real-time PCR	B. Pancreatic disease.						
	No. of mutations	Nanofluidic digital PCR					
		0	1	2	3	4	5
0	11	3	3	2	0	2	0
1	1	6	4	1	0	4	0
2	0	1	0	1	3	2	0
3	0	0	0	0	1	4	1
4	0	1	0	0	0	0	0

^a Italicized digits indicate the number of patients with the same number of mutations detected by both techniques.

In contrast, the *KRAS* mutational load in chronic pancreatitis was 6.1%.

Given that pancreatic juice does not sample only the tumor, we assessed the correlation between juice and tumor biopsies in 10 cases (5 with single mutations in pancreatic juice samples and 5 samples with multiple mutant alleles). In 5 of 5 cases with a single mutation, we observed a perfect match between the biopsy sample and the corresponding juice sample, with small differences apparent with respect to the proportion of the mutant alleles (Fig. 3). In 3 of the 5 cases with a pancreatic juice sample showing multiple mutant alleles, analysis of the corresponding biopsy sample revealed only the presence of a single mutation. In the remaining 2 cases, multiple mutations were detected in the pancreatic juice and tissue samples. Whenever a mutation was determined to be present in the biopsy sample, it was always also present in the juice sample (Fig. 3).

Discussion

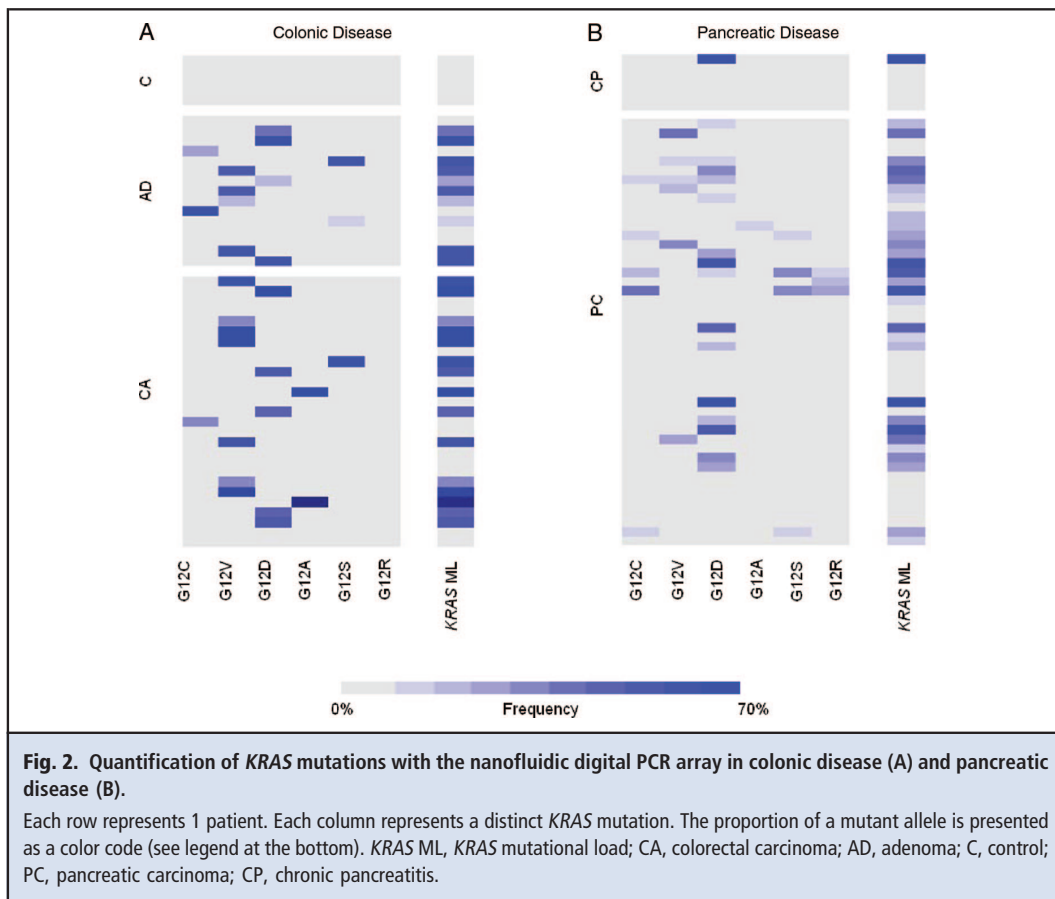
The simultaneous quantification of distinct *KRAS* mutant alleles by means of digital PCR with the nanofluidic digital PCR array platform proved to be a robust and analytically sensitive method for both identifying and quantifying mutations in clinical samples. Not

only were we able to assess the *KRAS* mutational load, we were also able to identify the presence of minor alleles consistently. This capability to detect and quantify dominant and minor alleles may provide new insights into the role of *KRAS* in colorectal and pancreatic disease.

Approximately 40% of colorectal carcinomas harbor *KRAS* mutations, mainly Asp and Val amino acid substitutions at codon 12. In our selected set of colorectal cancer biopsies partially enriched for *KRAS* mutant-positive cases, digital PCR analysis of the *KRAS* mutational load produced an 8% increase in the identification of *KRAS* mutant-positive tumors, compared with conventional PCR. Although this improvement is modest, it may represent a substantial contribution in selected clinical settings. The mutational load—the sum of frequencies of mutated alleles for a given case—in advanced adenomas and that in carcinomas are similar. Interestingly, there are apparent differences in allele distribution, however, in that minor alleles are detected more often in adenomas than in carcinomas. We interpret these findings as a reflection of the intrinsic heterogeneity of adenomas before their transformation, in contrast to carcinomas, in which clonal-selection processes are likely to occur. Of note is the fact that a large proportion of tumors are still *KRAS* mutation negative, demonstrating that the technique we have used is robust and not prone to produce false-positive results.

Pancreatic juice has been shown to harbor multiple *KRAS* mutant alleles (34). The usefulness of the digital PCR technique was also explored in pancreatic carcinomas in a completely distinct setting. Digital PCR scored the majority of pancreatic juice samples obtained from carcinomas of the exocrine pancreas as *KRAS* positive, thereby leading to reclassification of mutational status in up to 8 cases. That is a much higher number of added cases (20% of cases accurately reclassified), along with increased detection of multiple dominant or minor alleles.

The multiple mutated alleles detected reflect the intrinsic heterogeneity of the *KRAS* locus in pancreatic carcinoma, as is shown by the analysis of matched pancreatic juice and biopsy samples, where multiple alleles are often detected. Similar to the findings of a previous report (37), heterogeneity is often higher in pancreatic juice than in the corresponding biopsy sample. In our small set of analyzed samples, minor alleles were found in biopsies in some cases and only in juice samples in others. DNA obtained from pancreatic juice permits extensive sampling of the pancreatic duct epithelium and might reflect a field effect in normal pancreatic tissue adjacent to the tumor or the presence of multiple lesions that could be well away from the resected neoplasm. Of note is that *KRAS* gene mutations appear to



occur in a substantial proportion of intraductal lesions [pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) 1a, 1b, 2, and 3 lesions (38)], in 53% of adenomatous hyperplasias, and in 36% of papillary hyperplasias (39)—all of which are precancerous conditions for pancreatic cancer. In other cases, however, this heterogeneity occurs within the tumor, suggesting the presence of a polyclonal growth even in advanced stages of the disease (15).

In the clinical setting, the need exists to discriminate between chronic pancreatitis and carcinoma of the exocrine pancreas. In the small set of pancreatic masses occurring in chronic pancreatitis patients, *KRAS* mutations were identified in 2 of the masses. The presence of *KRAS* mutations has previously been reported in pancreatic juice samples obtained from patients with chronic pancreatitis (37, 40, 41), a fact that has hampered the clinical usefulness of pancreatic juice. In a case in which a carcinoma was eventually diagnosed during follow-up, a dominant, highly prevalent mu-

tant allele was detected. Thus, although the detection of a dominant allele may indicate a hidden carcinoma in some cases, the use of digital PCR does not overcome the limited analytical specificity of *KRAS* mutations for the diagnosis of pancreatic cancer.

We have shown that digital PCR is feasible with a commercially available platform. Our results show a consistently high analytical sensitivity, with no cross-reactivity among the specific probes we used to detect distinct alleles. No clear standardized procedures for *KRAS* mutational testing have been established or proposed (20, 21). The incremental clinical value offered by highly sensitive techniques needs to be established. Direct sequencing has an analytical sensitivity of approximately 20% for detecting single-base substitutions. Commercially available MALDI-TOF assays have an analytical sensitivity of 10%, whereas the ARMS (TheraScreen) assay is capable of detecting mutant alleles at frequencies as low as 1%. In some laboratories, such in-house techniques as mutant-enriched

Patient	Sample	G12C	G12V	G12D	G12A	G12S	G12R
P12	Pancreatic juice	3.7	3.4	19.2	0	2.1	1.2
	Tumor	23	0	0	0	13.9	20.2
P14	Pancreatic juice	0	9.8	0	0	0	0
	Tumor	0	10.9	0	0	0	0
P15	Pancreatic juice	0	0	4.5	0	0	0
	Tumor	0	0	5.5	0	0	0
P17	Pancreatic juice	2.2	3.6	2.6	0	1.6	2.3
	Tumor	0	9.2	0.9	0	0	0
P19	Pancreatic juice	6	3.3	2.3	0	5.4	3.5
	Tumor	0	0	0.33	0	0	0
P27	Pancreatic juice	0	0	0.61	0	0	0
	Tumor	0	0	6.3	0	0	0
P28	Pancreatic juice	0	1.2	0	0	0	0
	Tumor	0	9.6	0	0	0	0
P29	Pancreatic juice	0	0.8	24.3	0	0	0.3
	Tumor	0	0	10.5	0	0	0
P30	Pancreatic juice	1.2	0.4	1.9	0	1.6	0.4
	Tumor	0	0	27.2	0	0	0
P31	Pancreatic juice	0	0	9.3	0	0	0
	Tumor	0	0	16.9	0	0	0

Fig. 3. Correlation of *KRAS* mutational status between pancreatic juice and tumor tissue samples in pancreatic adenocarcinoma.

Percentage of *KRAS* mutant DNA (as amino acid substitutions) is indicated in each box.

PCR (9) improves the prevalence and suggests better clinical performance. Our results indicate that the clinical relevance of highly sensitive techniques may differ, depending on the tumor and the clinical setting used. Digital PCR offers a modest but definite increase in the detection of *KRAS* mutant-positive colorectal carcino-

mas, with no false positives. That may eventually produce a better tumor classification when genotyping is indicated prior to treatment with anti-epidermal growth factor receptor antibody. Finally, the costs of reagents per analyzed case are not high. We estimate that quantitatively detecting the 6 *KRAS* mutations in

codon 12 costs approximately 125 euros per case in terms of the chip and reagents, a cost within the range of other marketed tests. The eventual addition of the codon 13 Asp mutant will be of interest. In colorectal tumors, we can anticipate a gain in *KRAS* mutation-positive tumors of at least 6%. The addition of 1 probe may cost 20 euros per sample. Next-generation sequencing techniques are making their way into the clinical setting. Key issues for a robust search for minor alleles are increased read depth and inherent noise (42). In this continuously evolving scenario, the Fluidigm technology is a feasible alternative when assessing well-known hot spots.

On the other hand, the same methodology allows detection of multiple alleles, especially in distinct pancreatic samples. The proportion of pancreatic and ampullary samples harboring multiple mutant alleles is very high. Digital PCR has allowed the identification of multiple alleles in a substantial proportion of the analyzed samples. Although this finding is in line with previous observations (33, 36–38, 43), the clinical impact needs to be proved. In any case, the use of techniques of increased sensitivity provides new insights into the tumorigenesis process.

The translation of these findings to DNA obtained from paraffin blocks will be critical for expanding the technique's potential for use. In 3 of 4 cases, the profile of the DNA extracted from the paraffin block was similar to that obtained from high-quality DNA (data not shown). Our preliminary analysis suggests that dominant alleles are easily quantifiable but that minor alleles may be more difficult to detect. The performance of mutation-detection methods with DNA from routine formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples is variable. The continuous evolution in the methodologies available for DNA extraction from these stored tissues will be of help in improving the yield of the technique.

In conclusion, digital PCR provides a robust and quantitative measure of *KRAS* mutant alleles that can be used with routinely obtained samples. Our observations open the door to expand the concept of concomitant quantitative analysis of mutations to selected hot spots in other cancer genes. So far, using this methodology permits a better classification of tumors, with the potential clinical relevance depending on the tumor type analyzed. Future studies are indicated to evaluate the clinical utility of this methodology with respect to disease progression, the development of metastasis, choice of treatment, and early-detection strategies.

Author Contributions: All authors confirmed they have contributed to the intellectual content of this paper and have met the following 3 requirements: (a) significant contributions to the conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (b) drafting or revising the article for intellectual content; and (c) final approval of the published article.

Authors' Disclosures or Potential Conflicts of Interest: Upon manuscript submission, all authors completed the author disclosure form. Disclosures and/or potential conflicts of interest:

Employment or Leadership: None declared.

Consultant or Advisory Role: None declared.

Stock Ownership: None declared.

Honoraria: None declared.

Research Funding: Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 07/0475 FIS 06/0415); Fundació Gastroenterologia Dr. Francisco Vilardell (F05–01); Ministerio de Ciencia e Innovación Spanish Networks RTICC (RD06/0020/1050); Generalitat de Catalunya (2009SGR290); G. Capellá, Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer, and Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF 06–06084, 09–07319).

Expert Testimony: None declared.

Role of Sponsor: The funding organizations played no role in the design of study, choice of enrolled patients, review and interpretation of data, or preparation or approval of manuscript.

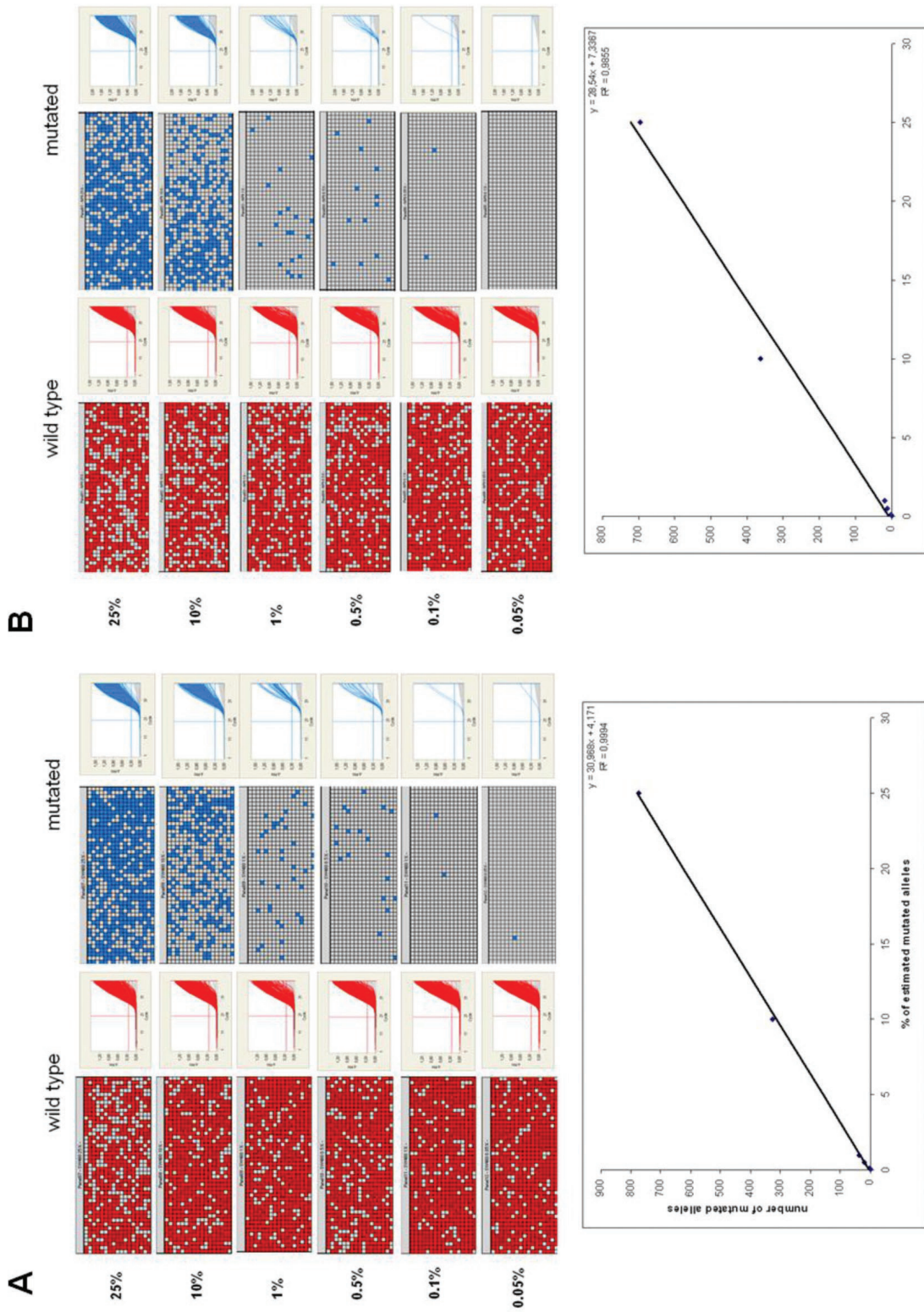
Acknowledgments: We thank Anna F. Robles for her assistance in sample processing and technical support.

References

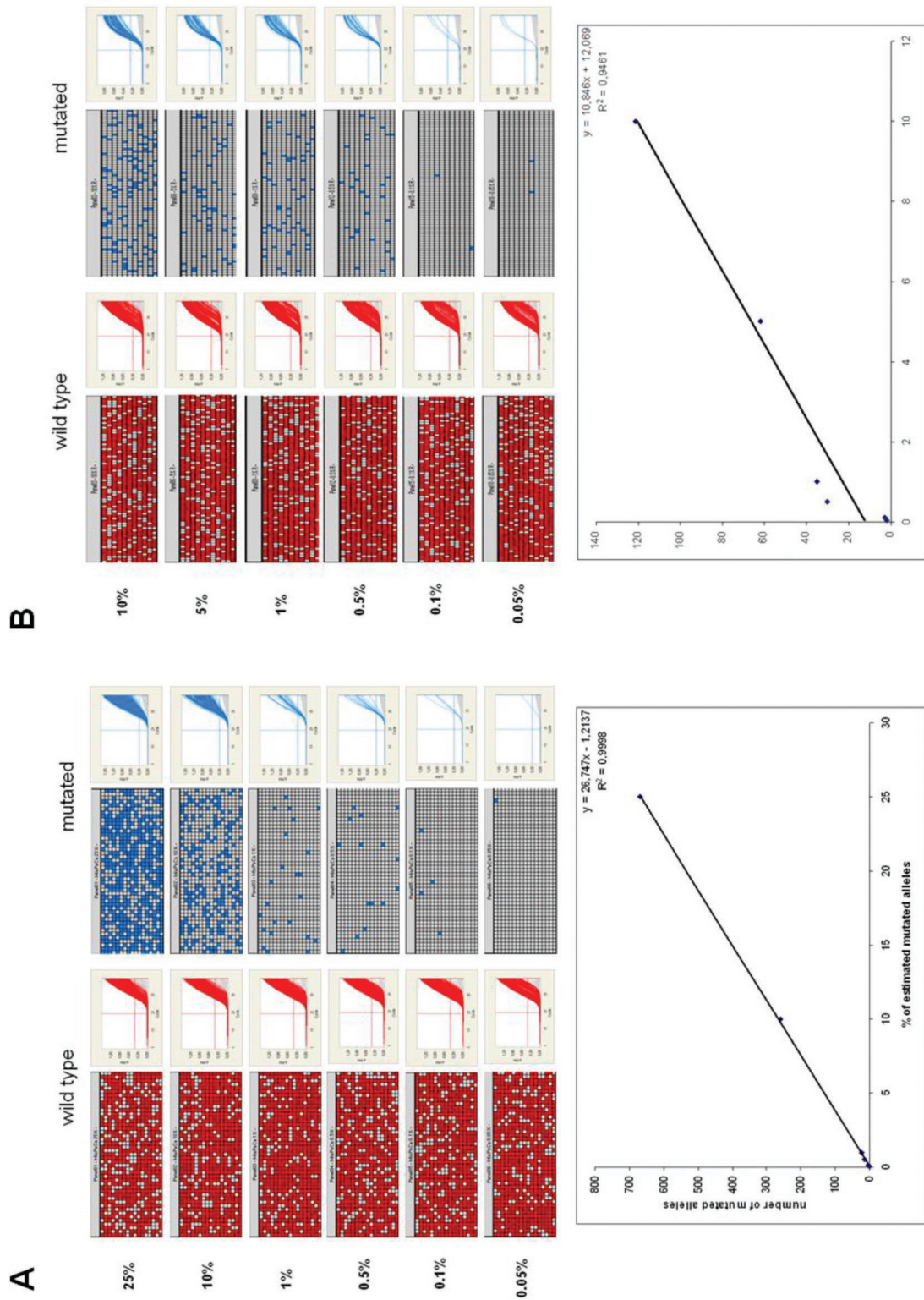
1. Russo A, Bazan V, Agnese V, Rodolico V, Gebbia N. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer: Kirsten Ras in CRC (RASCAL) and TP53CRC collaborative studies. *Ann Oncol* 2005; 16(Suppl 4):iv44–9.
2. Esteller M, González S, Risques RA, Marcuello E, Mangués R, Germà JR, et al. K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:299–304.
3. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49:4682–9.
4. Hruban RH, Wilentz RE, Kern SE. Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am J Pathol* 2000; 156:1821–5.
5. Sawyers CL. The cancer biomarker problem. *Nature* 2008;452:548–52.
6. Kisiel JB, Yab TC, Taylor WR, Chari ST, Petersen GM, Mahoney DW, Ahlquist DA. Stool DNA testing for the detection of pancreatic cancer: assessment of methylation marker candidates. *Cancer* 2012;118:2623–31.
7. Zou H, Taylor WR, Harrington JJ, Hussain FT, Cao X, Loprinzi CL, et al. High detection rates of colorectal neoplasia by stool DNA testing with a novel digital melt curve assay. *Gastroenterology* 2009;136:459–70.
8. Ahlquist DA, Zou H, Domanico M, Mahoney DW, Yab TC, Taylor WR, et al. Next-generation stool DNA test accurately detects colorectal cancer and large adenomas. *Gastroenterology* 2012;142: 248–56.
9. Molinari F, Felicioni L, Buscarino M, De Dosso S, Buttitta F, Malatesta S, et al. Increased detection sensitivity for *KRAS* mutations enhances the prediction of anti-EGFR monoclonal antibody resistance in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17:4901–14.
10. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanoni C, Moroni M, Veronesi S, et al. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res* 2007;67:2643–8.
11. Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. *KRAS* mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008;26:374–9.
12. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type *KRAS* is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:1626–34.
13. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ,

- O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008;359:1757–65.
14. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009;360:1408–17.
 15. Wang X, Gao J, Ren Y, Gu J, Du Y, Chen J, et al. Detection of *KRAS* gene mutations in endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy for improving pancreatic cancer diagnosis. *Am J Gastroenterol* 2011;106:2104–11.
 16. Bagci P, Andea AA, Basturk O, Jang KT, Erbarut I, Adsay V. Large duct type invasive adenocarcinoma of the pancreas with microcystic and papillary patterns: a potential microscopic mimic of non-invasive ductal neoplasia. *Mod Pathol* 2012; 25:439–48.
 17. Isler JA, Vesterqvist OE, Burczynski ME. Analytical validation of genotyping assays in the biomarker laboratory. *Pharmacogenomics* 2007;8:353–68.
 18. Ibrahim S, Seth R, O'Sullivan B, Fadhil W, Taniere P, Ilyas M. Comparative analysis of pyrosequencing and QMC-PCR in conjunction with high resolution melting for *KRAS/BRAF* mutation detection. *Int J Exp Pathol* 2010;91:500–5.
 19. Sundstrom M, Edlund K, Lindell M, Glimelius B, Birgisson H, Micke P, Botling J. *KRAS* analysis in colorectal carcinoma: analytical aspects of Pyrosequencing and allele-specific PCR in clinical practice. *BMC Cancer* 2010;10:660.
 20. Wang HL, Lopategui J, Amin MB, Patterson SD. *KRAS* mutation testing in human cancers: The pathologist's role in the era of personalized medicine. *Adv Anat Pathol* 2010;17:23–32.
 21. Linardou H, Briasoulis E, Dahabreh IJ, Mountzios G, Papadimitriou C, Papadopoulos S, et al. All about *KRAS* for clinical oncology practice: gene profile, clinical implications and laboratory recommendations for somatic mutational testing in colorectal cancer. *Cancer Treat Rev* 2011;37:221–33.
 22. Li J, Makrigiorgos GM. COLD-PCR: a new platform for highly improved mutation detection in cancer and genetic testing. *Biochem Soc Trans* 2009;37: 427–32.
 23. Milbury CA, Li J, Makrigiorgos GM. Ice-COLD-PCR enables rapid amplification and robust enrichment for low-abundance unknown DNA mutations. *Nucleic Acids Res* 2011;39:e2.
 24. Li J, Wang L, Mamon H, Kulke MH, Berbeco R, Makrigiorgos GM. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nature Med* 2008;14:579–84.
 25. Pekin D, Skhiri Y, Baret JC, Le Corre D, Mazutis L, Salem CB, et al. Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab Chip* 2011;11:2156–66.
 26. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:9236–41.
 27. Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ, Hughes E, Condon J, Morley AA. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques* 1992;13: 444–9.
 28. Oehler VG, Qin J, Ramakrishnan R, Facer G, Ananthnarayan S, Cummings C, et al. Absolute quantitative detection of *ABL* tyrosine kinase domain point mutations in chronic myeloid leukemia using a novel nanofluidic platform and mutation-specific PCR. *Leukemia* 2009;23:396–9.
 29. Wang J, Ramakrishnan R, Tang Z, Fan W, Kluge A, Dowlati A, et al. Quantifying *EGFR* alterations in the lung cancer genome with nanofluidic digital PCR arrays. *Clin Chem* 2010;56:623–32.
 30. Dube S, Qin J, Ramakrishnan R. Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR on a nanofluidic device. *PLoS One* 2008;3:e2876.
 31. Qin J, Jones RC, Ramakrishnan R. Studying copy number variations using a nanofluidic platform. *Nucleic Acids Res* 2008;36:e116.
 32. González-García I, Solé RV, Costa J. Metapopulation dynamics and spatial heterogeneity in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:13085–9.
 33. Puig P, Urgell E, Capellá G, Villanueva A, Grau M, Sancho FJ, et al. Improved detection of K-ras codon 12 mutations in fecal exfoliated cells. *Lab Invest* 1999;79:617–8.
 34. Tarafa G, Tuck D, Ladner D, Topazian M, Brand R, Deters C, et al. Mutational load distribution analysis yields metrics reflecting genetic instability during pancreatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:4306–11.
 35. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
 36. Puig P, Urgell E, Capellá G, Sancho FJ, Pujol J, Boadas J, et al. A highly sensitive method for K-ras mutation detection is useful in diagnosis of gastrointestinal cancer. *Int J Cancer* 2000;85: 73–7.
 37. Boadas J, Mora J, Urgell E, Puig P, Roca M, Cussó X, et al. Clinical usefulness of K-ras gene mutation detection and cytology in pancreatic juice in the diagnosis and screening of pancreatic cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:1153–9.
 38. Lohr M, Kloppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Luttges J. Frequency of K-ras mutations in pancreatic intra-ductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia* 2005;7: 17–23.
 39. Luttges J, Vogel I, Menke M, Henne-Bruns D, Kremer B, Kloppel G. Clear cell carcinoma of the pancreas: an adenocarcinoma with ductal phenotype. *Histopathology* 1998;32:444–8.
 40. Bournet B, Souque A, Senesse P, Assenat E, Barthelet M, Lesavre N, et al. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy coupled with *KRAS* mutation assay to distinguish pancreatic cancer from pseudotumoral chronic pancreatitis. *Endoscopy* 2009;41:552–7.
 41. Shi C, Fukushima N, Abe T, Bian Y, Hua L, Wendelburg BJ, et al. Sensitive and quantitative detection of *KRAS2* gene mutations in pancreatic duct juice differentiates patients with pancreatic cancer from chronic pancreatitis, potential for early detection. *Cancer Biol Ther* 2008;7:353–60.
 42. Milbury CA, Correll M, Quackenbush J, Rubio R, Makrigiorgos GM. COLD-PCR enrichment of rare cancer mutations prior to targeted amplicon resequencing. *Clin Chem* 2012;58:580–9.
 43. Mora J, Puig P, Boadas J, Urgell E, Montserrat E, Lerma E, et al. K-ras gene mutations in the diagnosis of fine-needle aspirates of pancreatic masses: prospective study using two techniques with different detection limits. *Clin Chem* 1998; 44:2243–8.

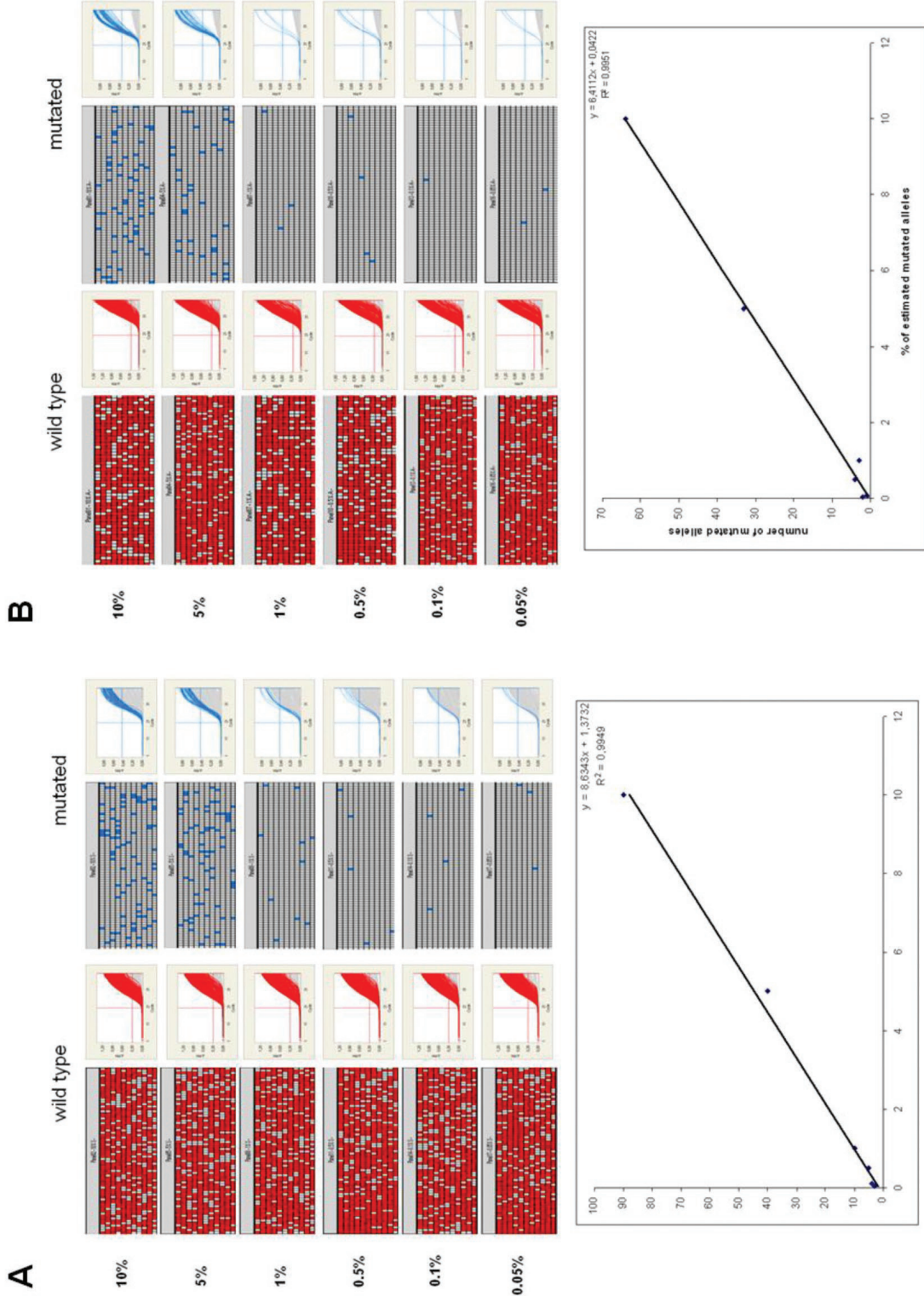
Supplemental Data Figure 1. Analytical sensitivity of nanofluidic digital PCR for the detection of G12V (A) and G12D (B) KRAS mutations. Red chambers are VIC positive, blue ones are FAM positive and grey ones are negative. Amplification curves are easily recognizable over the background signals for both FAM and VIC signals. Scale of the amplification curves: X axis (0-40 cycles), Y axis (0-1.2 Fluorescence). The correlation between theoretical alleles and detected mutant alleles for both mutant probes is shown at the bottom.



Supplemental Data Figure 2. Analytical sensitivity of nanofluidic digital PCR for the detection of G12C and G12R KRAS mutations. Red chambers are VIC positive, blue ones are FAM positive and grey ones are negative. Amplification curves are easily recognizable over the background signals for both FAM and VIC signals. Scale of the amplification curves: X axis (0-40 cycles). Y axis (0-1.2 Fluorescence). The correlation between theoretical alleles and detected mutant alleles for both mutant probes is shown at the bottom

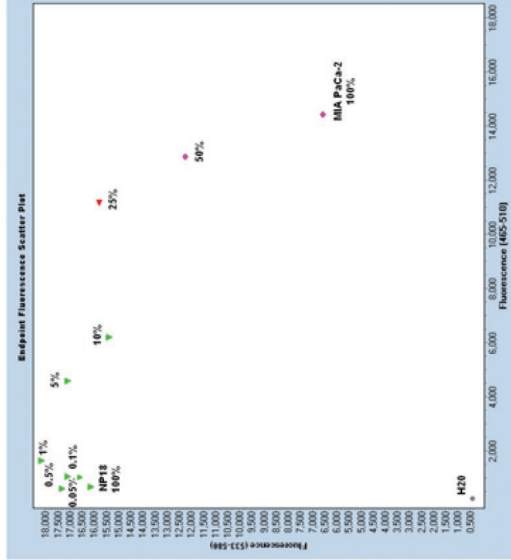


Supplemental Data Figure 3. Analytical sensitivity of nanofluidic digital PCR for the detection of G12S and G12A KRAS mutations. Red chambers are VIC positive, blue ones are FAM positive and grey ones are negative. Amplification curves are easily recognizable over the background signals for both FAM and VIC signals. Scale of the amplification curves: X axis (0-40 cycles). Y axis (0-1.2 Fluorescence). The correlation between theoretical alleles and detected mutant alleles for both mutant probes is shown at the bottom

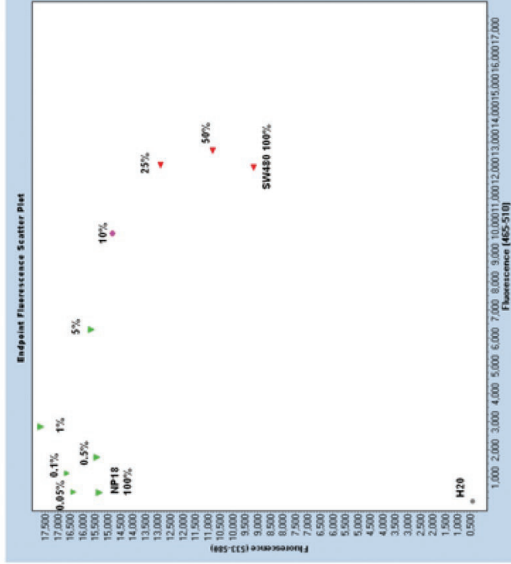


Supplemental Data Figure 4. Analytical sensitivity of conventional real-time PCR analysis. Each figure represents serial reconstitutions of mutant DNA with increasing amounts of *wild-type* DNA.

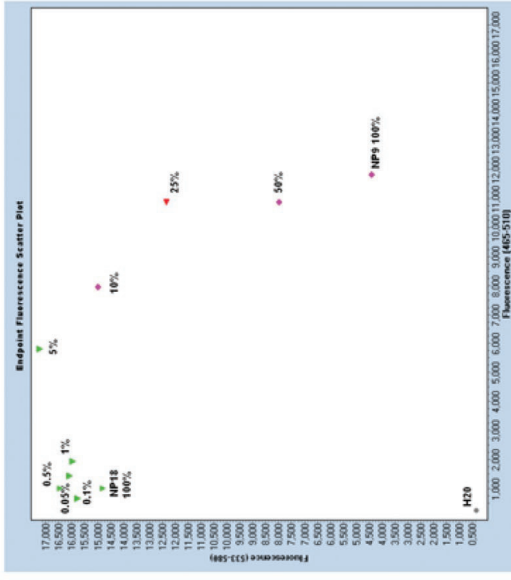
G12C probe



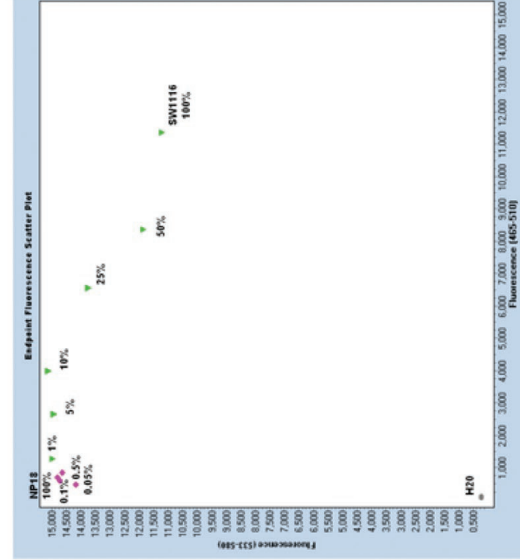
G12V probe



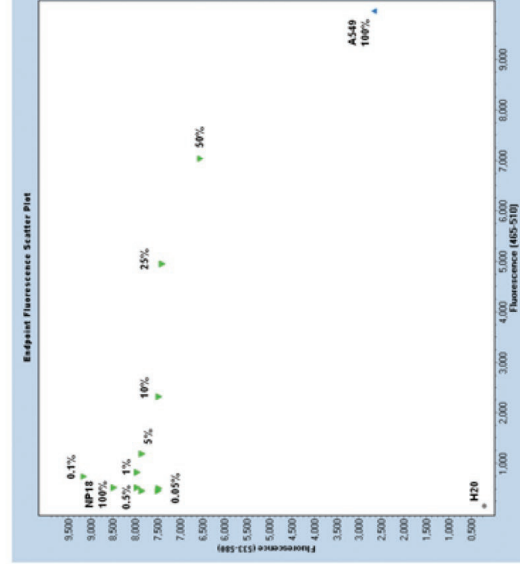
G12D probe



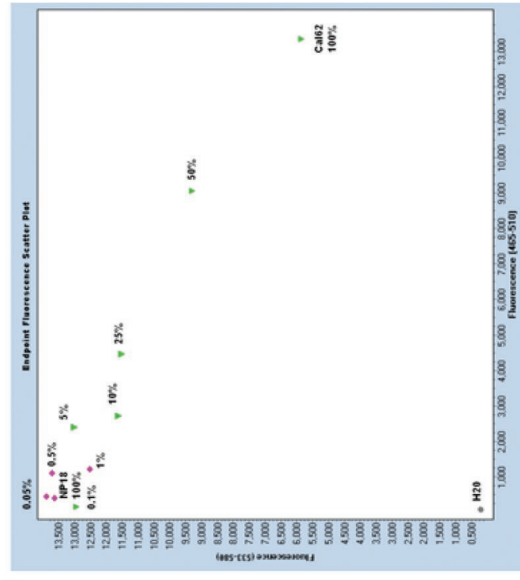
G12A probe



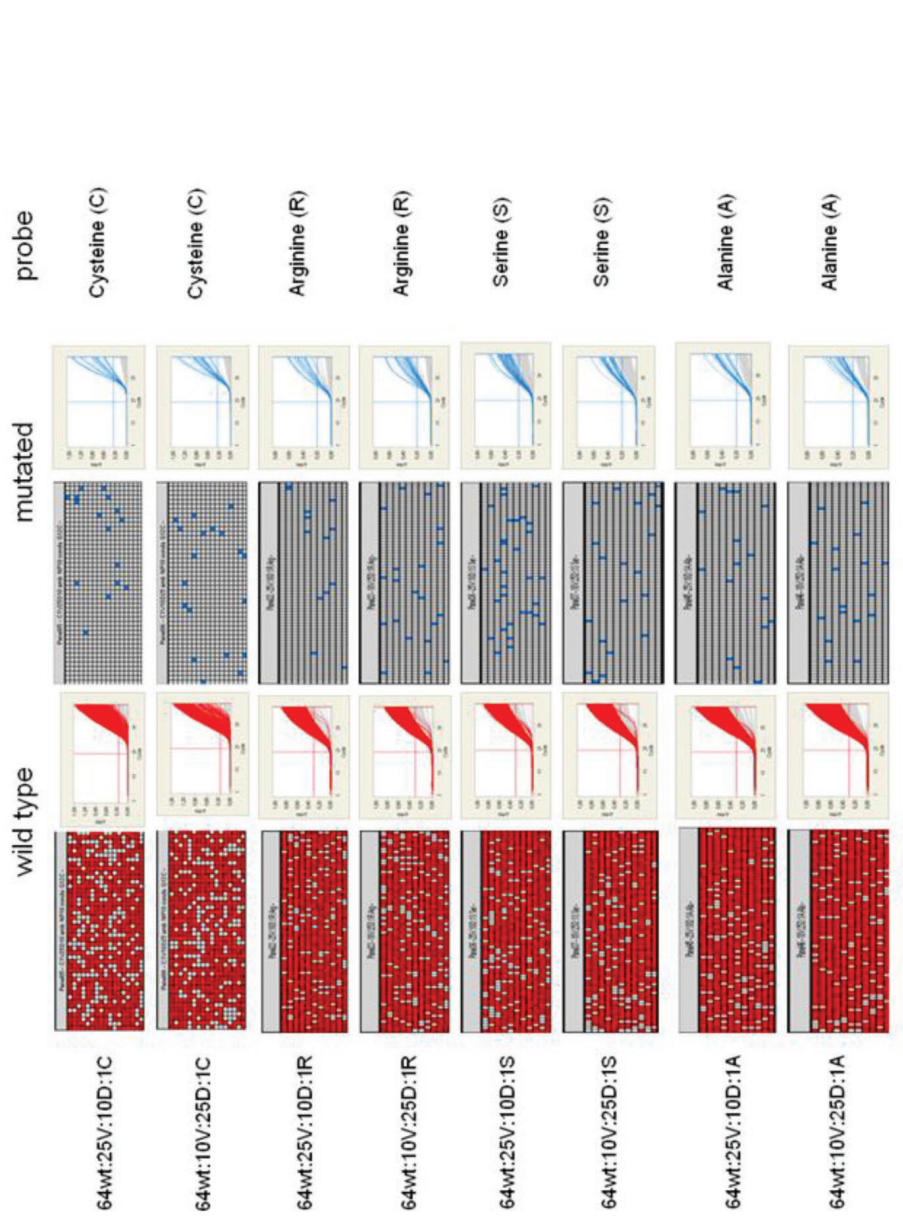
G12S probe



G12R probe



Supplemental Data Figure 5. Cross-reactivity analysis of the distinct KRAS mutation probes. Mixtures containing a high proportion (25% and 10%) of the two more frequent mutations (G12D and G12V) and 1% of the minor mutations were hybridized to cysteine, arginine, serine and alanine probes. Heat maps and amplification curves are shown. In the bottom a table containing details about the experiments is included. Counts depicts the number of wells displaying signal; Est targets or estimated number of molecules present in a given panel as calculated by the Fluidigm Digital PCR analysis Software.



Panel ID	Sample Information				All			
	Name	Count	Est. Targets	Count	Est. Targets	Intersection	Union	% of Mutation
1	64wt:25V:10D:1C probe Cysteine	535	921	16	16	10	541	1.7
2	64wt:10V:25D:1C probe Cysteine	569	1005	19	19	13	566	1.9
3	64wt:25V:10D:1R probe Arginine	639	1366	13	13	8	644	1.0
4	64wt:10V:25D:1R probe Arginine	610	1212	21	21	13	618	1.7
5	64wt:25V:10D:1S probe Serine	633	1332	23	23	19	637	1.7
6	64wt:10V:25D:1S probe Serine	632	1326	13	13	8	637	1.0
7	64wt:25V:10D:1A probe Alanine	649	1428	16	16	12	653	1.1
8	64wt:10V:25D:1A probe Alanine	660	1501	17	17	14	663	1.1

Supplemental Data Figure 6. KRAS mutation detection using the nanofluidic digital PCR array vs conventional real-time PCR in colonic (A) and pancreatic (B) disease. Each row represents one subject. Columns depict every KRAS codon 12 mutation. Positive samples are highlighted in grey.

A

Colonic Disease

patient / sample	diagnosis	G12C	G12V	G12D	G12A	G12S	G12R
C1	Control						
C2	Control						
C3	Control						
C4	Control						
C5	Control						
C6	AD						
C7	AD						
C8	AD						
C9	AD						
C10	AD						
C11	AD						
C12	AD						
C13	AD1						
C13	AD2						
C14	AD						
C15	AD						
C16	AD						
C17	AD						
C18	AD						
C19	AD						
C20	CA						
C21	CA						
C22	CA						
C23	CA						
C24	CA						
C25	CA						
C26	CA						
C27	CA						
C28	CA						
C29	CA						
C30	CA						
C31	CA						
C32	CA						
C33	CA						
C34	CA						
C35	CA						
C36	CA						
C37	CA						
C38	CA						
C39	CA						
C40	CA						
C41	CA						
C42	CA						
C43	CA						
C44	CA						
C45	CA						
C46	CA						

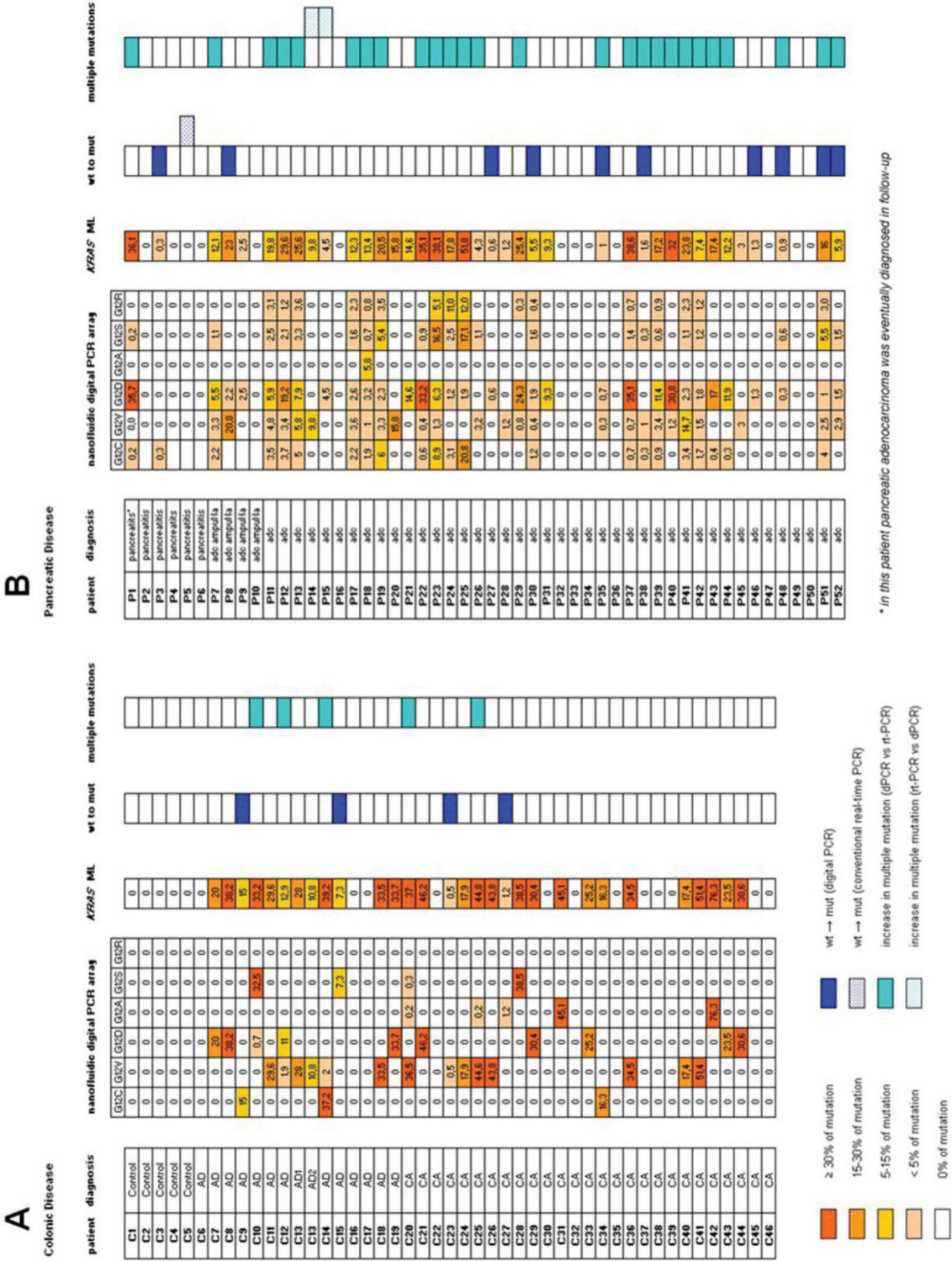
B

Pancreatic Disease

patient	diagnosis	G12C	G12V	G12D	G12A	G12S	G12R	G12C	G12V	G12D	G12A	G12S	G12R
P1	pancreatitis*												
P2	pancreatitis												
P3	pancreatitis												
P4	pancreatitis												
P5	pancreatitis												
P6	pancreatitis												
P7	pancreatitis												
P8	ado amputa												
P9	ado amputa												
P10	ado amputa												
P11	ado												
P12	ado												
P13	ado												
P14	ado												
P15	ado												
P16	ado												
P17	ado												
P18	ado												
P19	ado												
P20	ado												
P21	ado												
P22	ado												
P23	ado												
P24	ado												
P25	ado												
P26	ado												
P27	ado												
P28	ado												
P29	ado												
P30	ado												
P31	ado												
P32	ado												
P33	ado												
P34	ado												
P35	ado												
P36	ado												
P37	ado												
P38	ado												
P39	ado												
P40	ado												
P41	ado												
P42	ado												
P43	ado												
P44	ado												
P45	ado												
P46	ado												
P47	ado												
P48	ado												
P49	ado												
P50	ado												
P51	ado												
P52	ado												

* in this patient pancreatic adenocarcinoma was eventually diagnosed in follow up

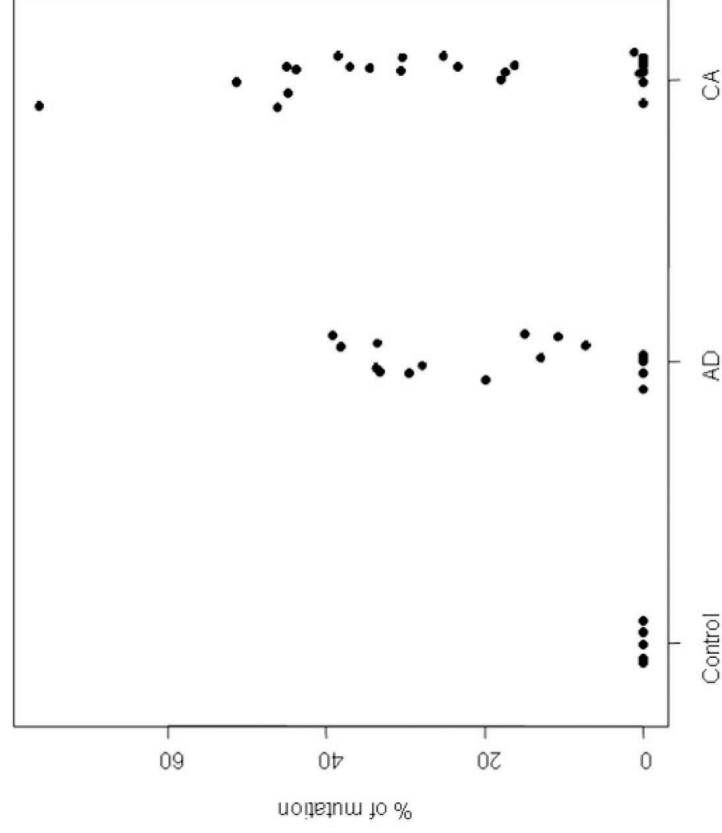
Supplemental Data Figure 7. Quantification of KRAS mutations using nanofluidic Digital PCR array in colonic (A) and pancreatic (B) disease. Each row represents one subject. Each column represents a distinct KRAS mutation. The proportion of a mutant allele is shown in a color code (see legend at the bottom). Wt to mut depicts cases were reclassified as positive when using the digital PCR or conventional PCR. Multiple mutation: shows those cases where the total number of mutant alleles increased after digital PCR analysis.



Supplemental Data Figure 8. *KRAS* mutational load (ML) of all analyzed patients in colonic and pancreatic disease.

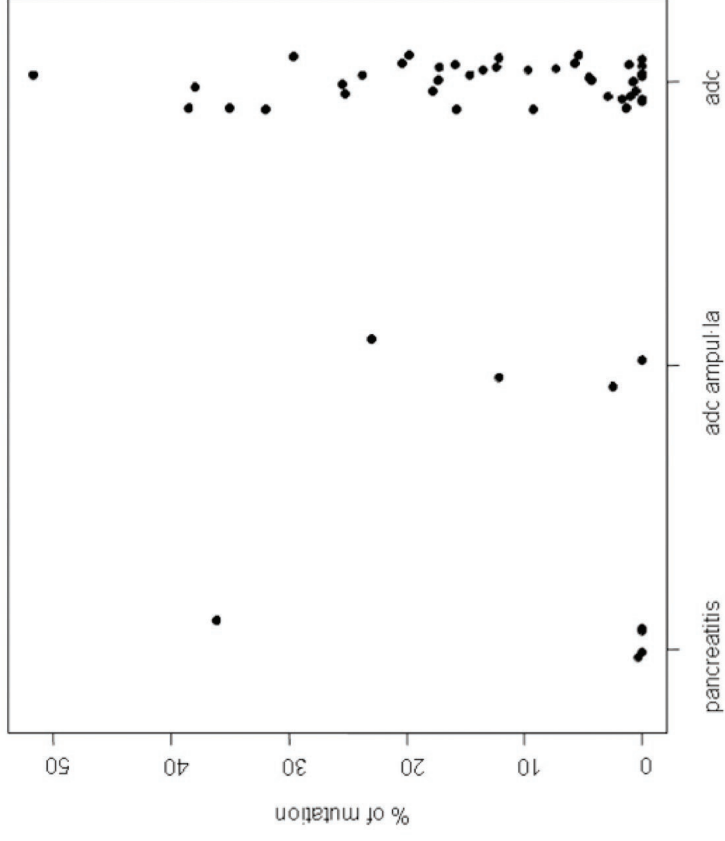
KRAS ML in Colon

KRAS Mutational Load



KRAS ML in Pancreas

KRAS Mutational Load



Supplementary Table 1. KRAS mutations analyzed, probe sequences and percentage of mutation in CRC and PaC according to COSMIC database.

										COSMIC database	
										% of mutation in CRC	% of mutation in PaC
CODON	AA CHANGE	PROT	WT	MUTATED	Control Cell-line	Probe sequence (5' → 3')					
12	wild-type		GGT		NP18	TTGGAGCTGGTGGCGTA					
12	34G>T	G12C	GGT	TGT	MiaPaCa-2	TTGGAGCTTGTGGCGTA	8.90%			3%	
12	35G>T	G12V	GGT	GTT	SW480	TTGGAGCTGTTGGCGTA	22.60%			30.80%	
12	35G>A	G12D	GGT	GAT	NP9	TTGGAGCTGATGGCGTA	35%			49.90%	
12	35G>C	G12A	GGT	GCT	SW1116	TTGGAGCTGCTGGCGTA	6.40%			2%	
12	34G>A	G12S	GGT	AGT	A549	TAGTTGGAGCTAGTGGCGTA	6.20%			2.50%	
12	34G>C	G12R	GGT	CGT	Cal-62	TTGGAGCTCGTGGCGTA	1.30%			11.90%	

Forward primer (5' → 3'): GCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACT

Reverse primer (5' → 3'): GCTGTATCGTCAAGGCACCTCTT

CRC: Colorectal Cancer; PaC: Pancreatic Adenocarcinoma

ARTICLE 3

Genetic background influences intratumoral and intracrypt heterogeneity in early colorectal tumorigenesis

Mireia Gausachs, Daniel Azuara, Sara González, Adriana Lopez-Doriga, Xavier Sanjuán, María José Paulés, Víctor Moreno, Conxi Lázaro, Ignacio Blanco i Gabriel Capellá

Manuscrit sotmès a publicació

Resum del treball: La carcinogènesi es pot considerar com un procés microevolutiu que actua sobre una metapoblació de cèl·lules. Mentre que la heterogeneïtat intratumoral és una característica clau de la neoplàsia, se sap poc sobre les seves característiques en els primers estadis de la transformació tumoral. Nosaltres hipotetitzem que la detecció, amb tècniques d'alta sensibilitat, de mutacions en gens clau del càncer, en criptes derivades tant de mucosa normal com de tumors, pot posar llum sobre la dinàmica molecular de la tumorigènesi colorectal.

Mètodes: Es van estudiar mostres de 6 càncers hereditaris (4 poliposi -1 clàssica, 1 associada a *MUTYH* i 2 sense alteració molecular identificada-, 1 síndrome de Lynch i un cas amb síndrome del dèficit constitucional de reparació MMR) i de 6 càncers esporàdics. Es van aïllar un total de 596 criptes tant de la mucosa normal, com d'adenomes i carcinomes de casos esporàdics (n=180) i dels casos hereditaris (n = 416). També es van analitzar les biòpsies dels tumors. El gen *APC* es va analitzar per seqüenciació mentre que la genotipificació dels gens *KRAS* i *BRAF* es va realitzar mitjançant la matriu del xip dinàmic (Fluidigm). L'anàlisi de l'agrupació jeràrquica (*hierarchical clustering*) es va utilitzar per aprofundir en la dinàmica mutacional de les criptes.

Resultats: En tumors esporàdics hem confirmat l'expansió clonal de les mutacions en la regió MCR del gen *APC*. Per contra, a nivell de criptes hem detectat un alt grau d'heterogeneïtat que inclou: (i) la freqüent identificació de criptes *APC* WT (fins el 31% d'elles, tenint en compte que hem analitzat el front d'invasió tumoral); (ii) la identificació de noves mutacions somàtiques en el gen *APC* que coexisteixen amb les mutacions dominants o que es poden identificar, fins i tot, en absència de la mutació *APC* dominant; i (iii) la probable pèrdua de l'al·lel normal en una proporció

significativa de les criptes. Vàries de les nostres observacions confirmen que hi ha una relació entre *KRAS* i *APC*: (i) el patró observat de múltiples mutacions dins una cripta és present tant a tumors esporàdics amb mutació al gen *APC* com en el cas de FAP; (ii) no és present ni al tumor *KRAS* WT inclòs ni a la mucosa normal aparellada dels casos esporàdics; i (iii) no s'evidencia en les lesions que s'originen en síndromes de reparació del DNA MMR deficient. L'anàlisi de *clusters* de les distribucions de mutacions al gens *KRAS/BRAF* a les criptes analitzades ha evidenciat que els patrons mutacionals de les criptes no són aleatoris i que varien segons l'alteració genètica responsable del tumor sigui esporàdic o hereditari. Aquest *background* genètic influeix tant en: (i) la distribució relativa de les mutacions en una cripta determinada; (ii) el número total de criptes que tenen una distribució determinada de les mutacions, com (iii) la distància genètica entre les diferents criptes.

Conclusions: Hi ha un grau sorprenent d'heterogeneïtat intra e intercripta en els loci *KRAS/BRAF* en les poblacions cel·lulars en les primeres etapes de la tumorigènesi del CCR, que no és aleatòria i que depèn del *background* genètic. La immensa majoria de les subpoblacions mutades identificades no són seleccionades durant la progressió del tumor. El nostre estudi aporta una nova visió a la complexa interacció entre *APC* i *KRAS* a la tumorigènesi colorectal. La identificació de criptes *APC* WT obre interrogants sobre el rol de les mutacions *APC* com a *drivers* de la progressió tumoral colorectal.

HETEROGENEITY IN EARLY COLORECTAL TUMORIGENESIS

Mireia Gausachs¹, Daniel Azuara¹, Sara González¹, Adriana Lopez-Doriga², Xavier Sanjuán³, María José Paulés³, Víctor Moreno², Conxi Lázaro¹, Ignacio Blanco¹, Gabriel Capellá^{1*}

¹Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology (ICO - IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain;

²Prevention Program, Catalan Institute of Oncology (ICO-IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ³Pathology Department, University Hospital Bellvitge (HUB – IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

* Address correspondence to this author at: Laboratori de Recerca Translacional (LRT1), Institut Català d'Oncologia, Hospital Duran i Reynals, Gran via 199-203, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain. Fax +34 93-260-74-66; e-mail: gcapella@iconcologia.net.

Abbreviations: SC, stem cell; CRC, colorectal cancer; MMR, mismatch repair; CMRD, constitutional mismatch repair deficiency; FAP, Familial adenomatous polyposis; MAP, MUTYH-associated polyposis; LOH, loss of heterozygosity; SNP, single nucleotide polymorphism; SNUPE, single-nucleotide primer extension; MCR, mutational cluster region; WGA, whole genome amplification; HCA, hierarchical clustering analysis

Genes: *APC*, adenomatous polyposis coli; *MUTYH*, mutY homolog; *MLH1*, mutL homolog 1; *PMS2*, PMS2 postmeiotic segregation increased 2 (*S. cerevisiae*); *KRAS*, Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; *BRAF*, v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B.

Author Contribution: G.C., M.G. Study design, interpretation of data and drafting of the manuscript; M.G., S.G., D.A., acquisition and analysis of data; A.L., V.M., supervised the analysis; M.G., D.A., S.G., C.L., performed technical research; X.S., M.J.P., supervised the collection of the samples at the Pathology Department; I.B., clinical advice; G.C., obtained the funding; M.G., D.A., S.G., A.L., X.S., M.J.P., V.M., C.L., I.B., and G.C reviewed the manuscript.

ABSTRACT

Background & Aims: Carcinogenesis can be regarded as a micro-evolutionary process acting on a metapopulation of cells. While intratumoral heterogeneity is a key of malignancy, little is known about their characteristics in the early stages of tumor transformation. We hypothesized that of level highly sensitive mutation detection methods using crypts from both normal mucosa and tumor can shed light on the molecular dynamics of colorectal tumorigenesis.

Methods: We studied samples from 6 hereditary cancers (one classic polyposis, one *MUTYH* associate, 2 non filiated polyposis, one Lynch syndrome, 1 case with Constitutional Deficiency syndrome repair MMR) and 6 sporadic cancers. A total of 596 crypts were isolated both from normal mucosa, adenomas and carcinomas from sporadic cases (n=180) and hereditary cases (n=416). *APC* Mutation Cluster Region was analyzed by Sanger sequencing whereas *KRAS/BRAF* genotyping was performed by Dynamic Array Chips (Fluidigm). Hierarchical clustering analysis was performed to assess crypt dynamics.

Results: Clonal expansion of mutations in the MCR region of *APC* was evident in sporadic tumors. In contrast, a high degree of heterogeneity at the crypt level was observed including: (i) the frequent identification of *APC* WT crypts (31%); the identification of novel *APC* mutations coexisting or in the absence of the dominant *APC* mutation; and (iii) the likely loss of the normal allele. A relationship between *KRAS* and *APC* is suggested by (i) the similarity of crypt mutational pattern of *KRAS*+ sporadic tumors and the *APC*-FAP case; (ii) the absence of crypt mutations in the *KRAS* WT tumor and the corresponding normal mucosa of all sporadic carcinomas; and (iii) the absence of crypt mutations in MMR deficient lesions. Mutational patterns observed in crypts are nonrandom and depend upon the genetic alteration responsible to produce a tumor sporadic or hereditary. This genetic background influences both: (i) the relative distribution of mutations in a

given crypt; (ii) the total number of crypts sharing a particular distribution of mutations, and (iii) the genetic distance among different crypts.

Conclusions: There is a striking degree of *KRAS/BRAF* mutational intra and intercrypt heterogeneity in early stages of colorectal tumorigenesis that depends upon the genetic background. The vast majority of mutated subpopulations identified are not selected during tumor progression. Our study provides novel insights on the complex interaction between *APC* and *KRAS* in colorectal tumorigenesis.

Keywords: Crypt dynamics; nanofluidic PCR; heterogeneity; clonal evolution.

INTRODUCTION

The engine of cancer, as takes place in nature, is the accumulation of variability in vulnerable cells. Peter Nowell laid the foundation for the hypothesis of clonal evolution, applying Darwinian evolutionary logic to understand tumor progression.¹ Owing to successive acquisition of generated aberrations, occasionally takes place a genetic change providing selective advantage to a tumor cell that may give rise to a dominant subpopulation. Along the adenoma–carcinoma pathway in colorectal cancer (CRC) this process is well illustrated by the progressive accumulation of mutations during the gradual transition from normal mucosa to adenocarcinoma.²

The intestinal homeostasis is based on two processes: continuous cell renovation within a crypt³ and the production of new crypts⁴. At the colon level, the most epithelial cells are replaced weekly^{5, 6} by the activity of multiple stem cells where are localized within colonic crypts. The self-renewing capacity is not a perfect process⁷⁻¹⁰ and genetic alterations occur in an age-dependent manner in crypts¹¹⁻¹³ or normal mucosa.¹⁴ The production of new crypts from stem cells is generally believed to be brought about by a process known as fission.^{4, 15-18} Crypt fission, in which a crypt bifurcates giving rise to two independent crypts, is a rare event in normal mucosa¹⁷ that is definitely increased in colorectal adenomas.¹⁹ It is the most accepted mechanism of clonal population expansion.^{20, 21} Different studies have been demonstrated

the association between *APC* and *KRAS* mutation an increased crypt fission rate.^{15, 22}

The heterogeneity of early tumorigenic changes in CRC has been described in previous works.^{14, 23-27} Thirlwell and collaborators showed that all familial adenomatous polyposis–associated adenomas and some sporadic lesions had polyclonal genetic defects. They also showed that some independent clones appeared to be maintained in advanced sporadic adenomas.²⁴ On the other hand, Humphries and collaborators, focusing in sporadic adenomas, identified a stem cell population within them, as has been observed previously in mouse.²⁸ They suggested that relative stasis and occasional rapid subclone growth may characterize colorectal tumorigenesis.²³

In general, little is known about the processes that occur in early tumorigenesis of CRC but there is a consensus that *APC* mutations initiate intestinal neoplasia and that *KRAS/BRAF* mutations play an important role in progression towards adenocarcinomas.² There is controversy, though, regarding the role of *KRAS* with inactivated *APC*, as an inducer of tumor progression by activating β -catenin translocation to the nucleus.²⁹ β -catenin has been observed in nucleus in the absence of the *KRAS* activation.³⁰ Also, *KRAS* mutation likely activates cancer stem cells (CSC) phenotype, contributing to colorectal tumorigenesis in CRC cells that harbor *APC* mutations.³¹

We hypothesized the study of early tumorigenic changes at the crypt level highly sensitive mutation detection methods using crypts was likely to offer novel insights into the dynamics of tumor cell populations in early and advanced colorectal lesions.

MATERIALS AND METHODS

Samples and Patients

Fresh samples from colectomy specimens of 23 sporadic CRC patients undergoing surgery in Hospital Bellvitge were collected. Fourteen were located in right colon, and 9 in left colon. Samples from the tumor margin sample normal distal mucosa were collected by the pathologist. Of these, 6 cases were selected after *KRAS* genotyping using digital PCR (see methods), 5 *KRAS* mutant and 1 WT. Detailed information for each included case is shown in Table S1. Samples were also collected from 6 hereditary cases i) 4 individuals with polyposis (one Familial adenomatous polyposis (FAP), one *MUTYH*-associated polyposis (MAP) and two cases with unknown germline mutation) ii) a Lynch syndrome patient, and iii) a mismatch repair (MMR) gene deficiency syndrome patient (CMRD). In all hereditary cases, germline mutation status was studied, identifying an *APC* mutation (c.1262_1263delGAG; p.Trp421X in a FAP case and a *MUTYH* mutation c.[494A>G]+[494A>G]; p.[Tyr165Cys]+[Tyr165Cys] in MAP patient, a *MLH1* mutation (c.306+5G>A) in Lynch syndrome patient and a *PMS2* biallelic mutation (c.24-2A>G) in CMRD patient. Samples included: i) normal mucosa, as well as, multiple adenomas of 3 different colon regions (ascending, transverse and descending colon) from polyposis cases ii) a tumor margin and normal distal mucosa from Lynch syndrome, and iii) an adenoma, a proximal normal mucosa and distal normal mucosa from colectomy of CMRD case. Specific detailed information of selected cases and samples collected are detailed in Supporting document, Table S2. Informed consent was

obtained from all patients, and the ethics committee approved this study.

Crypt isolation

Samples (either from normal mucosae or tumors) were cut into 3mm pieces and incubated in 30mM EDTA in HBSS for 20 min. Samples were then vigorously shaken to obtain a supernatant enriched for crypts. The EDTA incubation/shaking step was repeated twice. Individual crypts were picked up under microscope and were placed into 0.5 ml microfuge tubes. A rigorous control of this step was followed to exclude any contamination in the process. Representative crypts from hereditary and sporadic cases are illustrated in Figure S1.

DNA Extraction

DNA from fresh-frozen primary tissue sections was extracted using the saline method. DNA concentration was measured with Quant-it picogreen® dsDNA reagent (Life Technologies, Molecular Probes, Division, Eugene, OR). DNA was extracted from a total of 596 de crypts by the PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit (Applied Biosystems), following manufacturer's recommendations. DNA from cell lines MIA PaCa-2, SW480, NP9, SW1116, A549, CAL-62 and DLD1 (with known *KRAS* mutations) and RKO (with *BRAF* mutation) used as controls was extracted using the FlexiGene DNA Kit (Qiagen, Valencia, CA).

APC gene and LOH analysis

A fragment of 1650pb (EH) of the mutational cluster region (MCR) in exon 15 of *APC* was amplified and sequenced in biopsy sections. For crypt analysis a nested PCR was performed. For primer sequences experimental conditions, see the Supporting document and Table S3. Sequences were analyzed twice by two independent technicians. All detected alterations were validated. LOH at *APC* was performed as described in Supporting document.

***KRAS* and *BRAF* hotspot mutations analysis**

Digital PCR was performed using the Digital Array (Fluidigm® Corporation, South San Francisco, CA) to study *KRAS* and *BRAF* hotspot mutations by allele-specific PCR. Allele-specific PCR conditions for the seven hotspot *KRAS* mutations [p.Gly12Arg (G12A), p.Gly12Cys (G12C) p.Gly12Asp (G12D), p.Gly12Arg (G12R), p.Gly12Ser (G12S), p.Gly12Val (G12V) and p.Gly13Asp (G13D)] and *BRAF* hotspot [p.Val600Glu (V600E)] were performed as described previously.³² For experimental conditions and primer sequences see the Supporting document and Table S3. Biopsy results were validated by allele discrimination real-time PCR analysis using Light Cycler® 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The experiment was performed as described previously Azuara et al³² using the same set of primers and probes described above and detailed in the Supporting document and Table S3.

Crypt analysis required of a preamplification step of 15 cycles that was adjusted to provide a quantitative estimation of the mutant alleles studied. For details regarding technique set-up see Supporting document, Tables S3, Figures S2, S3. A total of six replicates for each of the 8 hotspots assays were performed by 48.48 Dynamic Array on the BioMark platform (Fluidigm® Corporation) in order to maximize robustness of the observations. For experimental conditions and primer sequences see the Supporting document and Table S3. In a subset of cases the genotype was replicated by conventional real-time PCR analysis and by nanofluidic digital PCR using the Digital Array (Fluidigm® Corporation) yielding comparable results. For details regarding the allele quantification analysis as well as the analytical sensitivity of the dynamic array (Fluidigm) and by conventional real-time PCR see Supporting document, Table S4 and Figure S4.

Analysis of metapopulations of crypts

The percentage of *KRAS/BRAF* mutant cells for each crypt was extrapolated from allele

frequencies assuming a 2000 cell population per crypt. Hierarchical clustering of crypt data was done to evaluate the relationship between metapopulations of crypts. Of note, crypts with missing data were excluded. Hierarchical cluster analysis (HCA) was performed using Ward linkage clustering and Euclidean distances by R statistical software (v.3.0.1). Each significant cluster was verified by calculating probability values (p-values) for each one using bootstrap resampling techniques by pvclust package.³³

RESULTS

Sporadic cases

APC gene dynamics. Six cases (5 *KRAS* mutant and 1 WT) were included (Table 1). All cases harbored *APC* gene mutations at the MCR (2 frameshift, 3 missense [two coexisting in the same tumor] and two silent changes). Only one of the six cases, harboring a silent change (SP4), showed LOH. Mutant *APC* cell populations were dominant, being detected in all selected areas (4-6 depending upon the case) analyzed. In contrast, a striking degree of heterogeneity at the *APC* gene was evident at the crypt level. In three cases, *APC* wild type and *APC* mutant crypts coexisted (Table 1. Panel A). In the remaining 3 cases, distinct *APC* mutant crypts coexisted. Only in one of the six cases analyzed (SP4) all crypts harbored the *APC* dominant mutation, although in one crypt an additional change was acquired and loss of the WT allele was apparent in 2 of them. In SP5 and SP6 cases a very significant degree of *APC* heterogeneity was observed. The *APC* heterogeneity observed in SP6 is depicted in Figure 1. Panel A.

KRAS/BRAF Dynamics. Biopsy analysis revealed that multiple *KRAS* mutant populations coexisted within the tumor albeit their relative proportion was variable (Table1. Panel B). At the crypt level heterogeneity of *KRAS* status was extremely high. Only in 1 case, all crypts analyzed were *KRAS* mutants (SP4). In 3 of 5 *KRAS* mutant cases WT and mutant *KRAS* crypts coexisted. Within the isolated crypts

distinct mutant *KRAS* subpopulations coexisted and the relative proportion of mutant alleles detected suggest that in all crypts *KRAS* WT cells exist. *BRAF* mutation analysis yielded an unexpected results: while all tumors were *BRAF* negative in the majority of crypts, *BRAF* mutant subpopulations were identified.

Hierarchical analysis of the *BRAF/KRAS* mutation proportion in crypts depicted complex but likely organized dynamics (Figure 1. Panel B ii). In three cases, SP2, SP3 and SP6 multiple *KRAS* mutations coexisted in similar proportions in carcinoma crypts (Figure S9 and S10). Sp4 is similar than previous dendrogram but in this case we detected only a *KRAS* mutation associated to adenocarcinoma crypts (Figure S8). Sp5 is the most different profile, since we only detected *BRAF* mutation in their crypts and the vast majority of mutant crypts were from normal mucosa (Figure S7). No heterogeneity was observed in the *KRAS* WT case (Figure S11).

Polyposis cases

Once evidenced the high heterogeneity of sporadic crypts, we wondered if the same pattern would be detected in hereditary crypts, focusing in a set of polyposis cases (1 FAP, 1 MAP and 2 *APC/MUTYH*(-)).

FAP case

Tissue analysis. Two of three adenomas of FAP case harbored second *APC* hits in the MCR. In one of the mutant adenomas the second hit was not present in all areas analyzed. Furthermore, at the crypt level most of the crypts harbored no MCR mutations. In the mutant crypts both dominant MCR mutations and novel ones coexisted. This pattern clearly differs from the one found in sporadic cases with MCR mutations (Table 2). The three adenomas analyzed harbored minor (low dose) *KRAS* mutant alleles, where 2 of the biopsies tested showed the same mutation. All adenomas were *BRAF* negative.

Crypt analysis. All crypts, derived from normal mucosa or adenomas, harbored one or more *KRAS* mutations and showed a similar mutational pattern. Most (n=26) of the crypts analyzed contained 3 *KRAS* mutations representing mutant cells 16%-31% of all crypt cells (Table 3). Thirteen crypts harbored two *KRAS* mutations accounting for 6%-14% of the crypt cells and two crypts with 1 *KRAS* mutation), whilst the presence of that mutation was evident in crypts of 2 premalignant of the 3 adenomas (Table 3).

Hierarchical clustering revealed 9 different crypt metapopulations, being 3 of them the most representative. Two metapopulations, representing 58% of all crypts analyzed, are phylogenetically very close. The third metapopulation is distant. There is a lower genetic distance among metapopulations than the one observed in sporadic cases. Unlike sporadic cases, mutant crypts populations were distributed throughout all tissues analyzed (Figure 2).

MAP case

Tissue analysis. No *APC* MCR mutations were detected either in the MAP adenomas or in crypts (Table 2). One of the 4 adenomas analyzed harbored 3 *KRAS* mutations. All adenomas were *BRAF* negative.

Crypt analysis. Likewise in FAP case, all adenoma crypts were *KRAS* mutant, being multiple mutations were detected in the vast majority of them, all sharing a similar mutational spectrum (Table 3). Ten contained 3 distinct *KRAS* mutations, seven crypts harbored 4 mutations and there were 3 crypts with 5 distinct mutations. Only six crypts contained one or two mutations. In contrast with FAP, most of crypts (56 of 58) from normal mucosa were *KRAS* WT. *BRAF* mutations were present in a low proportion of crypts both from normal mucosa and adenomas (Table 3).

Hierarchical Clustering depicted 13 crypts metapopulations. Five of them, representing

65% of mutant crypts, are phylogenetically close. The remaining 7 populations are composed of 1 or 2 crypts that presented mutations combined or alone. The genetic distance was 3-fold higher than in FAP (Figure 3).

APC/MUTYH(-) polyposis 3

Tissue analysis. No pathogenic mutations were detected in the MCR (Table 2). One of the 4 adenomas available harbored two minor *KRAS* mutant populations. All adenomas were *BRAF* WT.

Crypt analysis. *KRAS* mutations, either single or multiple, were depicted in 6 of 20 crypts from normal tissues. Also, *BRAF* mutations were observed in 5 of 20 crypts. Regarding adenoma crypts similar proportions were observed: 3 of 9 were *KRAS* mutant and 2 of 9 were *BRAF* mutant. Of note, the vast majority of the crypts analyzed (20 of 29) were WT (Table 3).

Hierarchical clustering revealed the presence of 11 metapopulations homogeneously distributed throughout the colon. There was not a dominant metapopulation and up to 20% of the crypts harbored transversions (G12V and *BRAF*). The proportion of crypts harboring a single mutation was higher than in the other cases analyzed. Genetic distance amongst clustering groups was similar to sporadic cases (Figure S12).

APC/MUTYH(-) polyposis 4

Tissue Analysis. Alike the FAP case, two of 3 adenomas analyzed harbored somatic *APC* MCR mutations that were homogeneously distributed in all areas analyzed. Two of the adenomas also harbored minor *KRAS* mutant populations. The only adenoma analyzed for *BRAF* was WT.

Crypt analysis. Unfortunately, only partial information is available for *APC*. In the one case with all material analyzed no correlation was evident between biopsy and

corresponding crypts. In two cases with crypts and no biopsy, novel mutations were detected (Table 2). *KRAS* mutations were observed in the majority of crypts both from normal mucosa (30 of 35) and from adenomas (19 of 36) (Table 3). Only 3 of 49 crypts (two from normal mucosa and one from tumor) were *BRAF* mutant (Table 3). However, as in the previous two polyposis cases not all crypts were mutant (21 of 71 were *KRAS/BRAF* WT).

The HCA depicted a highly fragmented scenario with up to 30 distinct metapopulations. The main cluster is composed of 19 metapopulations (the 65% of total analyzed) that follow a pattern already identified in the FAP and MAP cases. It is noteworthy the elevated mutational load associated to G12C transversion (Figure 4). Unlike sporadic cases, the mutation patterns from crypts do not correspond with the expanded populations detected in biopsy.

MMR deficient cases

Samples from one LS and one CMRD cases were studied. Detailed information of results is illustrated in Table S5.

Biopsies. There was no *APC* detected mutation in MCR associated neither biopsies nor studied crypts (Table S5, Panel A). The LS carcinoma harbored a G13D *KRAS* mutation with two minor *KRAS* mutant alleles. Both CMRD and LS lesion was *BRAF* WT.

Crypt analysis. Most of the tumor crypts of the LS case contained a G13D mutation (Table S5, Panel B Figure S13). No mutations were observed in crypts isolated from the CMRD lesion (Figure S14).

DISCUSSION

The combination of crypt analysis with highly sensitive techniques in sporadic and hereditary cases have provided with novel insights into the mutational dynamics in the early stages of colorectal tumorigenesis.

In sporadic carcinomas clonal expansion of mutations in the MCR of the *APC* gene has been confirmed. However, at the crypt level a high degree of heterogeneity has been detected including: (i) the frequent identification of *APC* WT crypts (31%); the identification of novel *APC* mutations coexisting or in the absence of the dominant *APC* mutation; and (iii) the likely loss of the normal allele. The presence of *APC* mutation heterogeneity at the crypt level is at odds with results obtained by Thirlwell et al. in 2010²⁴ in sporadic carcinoma-in-adenoma samples where *APC* mutations were detected in all isolated crypts. This may well reflect the further clonal evolution present in more advanced stages of carcinoma progression.

In the FAP case analyzed we have identified the dominant mutation only in a minority (2 of 24) of the analyzed crypts derived from adenomas being most of them WT. *APC* WT crypts were also identified by Thirlwell that attributed this challenging observation to putative methodological limitations such as limited sampling in the presence of significant heterogeneity. While technical issues should not be ruled out, the consistent identification of *APC* WT crypts both in carcinomas and adenomas challenges our current concept on *APC* mutations as early drivers of colorectal tumorigenesis

Although the heterogeneity of *KRAS* or *BRAF* has been previously documented in CCR,^{14, 23-27} the depth of the mutational analysis unveiled a striking degree of heterogeneity at the *KRAS* locus at the tumor and crypt level both in sporadic and in polyposis cases. In the set of sporadic carcinomas, *KRAS* WT and *KRAS* mutant crypts coexisted although there is some degree of correlation between *KRAS* dominant clones and mutations detected in crypts. However, distinct *KRAS* mutant populations are evident within a single tumor crypt likely reflecting the continuous emergence of mutant subpopulations that will not be selected for during tumorigenesis. Of note, a similar *KRAS* mutation pattern was

observed in the FAP case analyzed both in adenoma and mucosa crypt.

Other groups have studied *KRAS* mutation status at crypt level^{23, 24, 34, 35} by Sanger sequencing, identifying a homogeneous *KRAS* mutational pattern as well as coexistence of *KRAS* WT and *KRAS* mutant crypts or even crypts of the same lesion harboring distinct *KRAS* mutations. The multiple mutant *KRAS* clones may reflect a high mutation rate. If the new mutant clones are similarly fit within a crypt, the interference between the competing clones may occur, accounting for the lack of selection observed.³⁶

Our results provide additional insight to the complex interaction between *APC* and *KRAS* in colorectal tumorigenesis. It is assumed that initiating events such as *APC* mutation may lead to clonal expansion of colonic stem cells. Secondary events, such as *KRAS* mutation, may then further enhance WNT signaling, leading to further clonal expansion of this CSC population. Studies from Fearon and Moon emphasize that both the temporal sequence of oncogenic events may play pivotal roles in carcinogenesis.^{31, 37} Here we show that the concomitant activation of both genes may be a relatively infrequent event taking into account the frequent appearance of *KRAS* mutant clones in the presence of an *APC* mutant background either sporadic or hereditary.

Several lines of evidence point to a relationship between *KRAS* and *APC*: (i) the pattern observed is present in *APC* mutant carcinomas and the FAP case; (ii) it is absent from the *KRAS* WT tumor and from the corresponding normal mucosa of all sporadic carcinomas; and (iii) it does not occur in lesions arising in a MMR deficient context. Of note, a similar although not identical mutational pattern is present in the MAP case –restricted to adenomas– and in the two *APC/MUTYH(-)* polyposis, one of them associated with somatic *APC* mutations. These observations suggest that other somatic *APC* inactivating aberrations have been missed (only MCR region and allelic dosage have been

assessed) or that *APC* may not be the only predisposing background leading to this increased mutation rate. Altogether, it becomes apparent that the genetic background conditions the type and degree of heterogeneity at the crypt level in the *KRAS* locus.

BRAF hotspot mutations are less often detected in sporadic carcinomas (up to 10%) and are considered mutually exclusive with *KRAS* mutations. In spite of this, there is also a continuous appearance of *BRAF* mutations in the crypts of the paired normal mucosae of the sporadic carcinomas analyzed and also in a subset of the hereditary adenomas studied. This may well reflect the same instability that *KRAS* mutations reflect.

Hierarchical clustering analyses of *KRAS/BRAF* mutational analysis have revealed that mutational patterns observed in crypts are nonrandom and depend upon the genetic background. Genetic background does not only reflect the relative composition of the distinct mutant subpopulations but the total number of crypts sharing the same pattern. Of note the genetic distance among crypts clearly differs in the distinct hereditary cases. Since the presence of *APC/KRAS* mutations gene in crypts favors expansion by fission,^{5, 15} we speculate that this may be the expansion mechanism underlying the asymmetric distribution of mutant crypts.^{13, 19, 22, 38-43} However, we cannot rule out that instability rather than crypt fission account for the observed mutational patterns.

The observations made may be challenged since we have combined crypt analysis with highly sensitive methods for hotspot analysis. Mechanical isolation of crypts allows the isolation of fresh tissue structures that may be vulnerable to sampling inaccuracy. However, both in tumor margins and in adenomas this was minimized thanks to the involvement of dedicated pathologists. The use of sensitive methods was preceded by an extensive set up, testing the robustness of the methodology applied. In order to minimize uncertainty all

tests were performed in sixplicates. Apart from this, our study presents some restrictions including limited sampling and the lack of similarly sensitive techniques for *APC* mutations that may yield additional levels of complexity to results reported.

In summary, study of normal and tumor crypts we have shown that there is a striking degree of *KRAS/BRAF* intra and intercrypt heterogeneity of cell populations in early stages of colorectal tumorigenesis that is non-random and depends of the genetic background. This conclusion is akin to that proposed by Losi et al. in 2005⁴⁴ which indicated that intratumoral genetic heterogeneity was more often associated to the early stages than in advanced. This study provides with novel insights into the complex interaction between *APC* and *KRAS* in colorectal tumorigenesis. These results lay the foundations to develop new crypt dynamic mutational models in which the continuous emergence of *KRAS* mutant clones and their occasional selection are likely an engine for tumor progression at least in *APC/KRAS* mutant tumors. The challenges posed by the identification of *APC* wt crypts in carcinomas cannot be ignored and will open new fields for research.

REFERENCES

1. Nowell PC. Cancer, chromosomes, and genes. *Lab Invest* 1992;66:407-17.
2. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
3. Marshman E, Booth C, Potten CS. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 2002;24:91-8.
4. St. Clair WH, Osborne JW. Crypt fission and crypt number in the small and large bowel of postnatal rats*. *Cell Proliferation* 1985;18:255-262.
5. Humphries A, Wright NA. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2008;8:415-24.

6. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990;110:1001-20.
7. Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:776-81.
8. Araten DJ, Golde DW, Zhang RH, et al. A quantitative measurement of the human somatic mutation rate. *Cancer Res* 2005;65:8111-7.
9. DeMars R, Held KR. The spontaneous azaguanine-resistant mutants of diploid human fibroblasts. *Humangenetik* 1972;16:87-110.
10. Elmore E, Kakunaga T, Barrett JC. Comparison of spontaneous mutation rates of normal and chemically transformed human skin fibroblasts. *Cancer Res* 1983;43:1650-5.
11. Kang H, Shibata D. Direct Measurements of Human Colon Crypt Stem Cell Niche Genetic Fidelity: The Role of Chance in Non-Darwinian Mutation Selection. *Front Oncol* 2013;3:264.
12. Campbell F, Fuller CE, Williams GT, et al. Human colonic stem cell mutation frequency with and without irradiation. *J Pathol* 1994;174:175-82.
13. Greaves LC, Preston SL, Tadrous PJ, et al. Mitochondrial DNA mutations are established in human colonic stem cells, and mutated clones expand by crypt fission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:714-9.
14. Zhu D, Keohavong P, Finkelstein SD, et al. K-ras gene mutations in normal colorectal tissues from K-ras mutation-positive colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1997;57:2485-92.
15. Wasan HS, Park HS, Liu KC, et al. APC in the regulation of intestinal crypt fission. *J Pathol* 1998;185:246-55.
16. Clarke RM. The effect of growth and of fasting on the number of villi and crypts in the small intestine of the albino rat. *J Anat* 1972;112:27-33.
17. Totafurno J, Bjerknes M, Cheng H. The crypt cycle. Crypt and villus production in the adult intestinal epithelium. *Biophys J* 1987;52:279-94.
18. Tan CW, Hirokawa Y, Gardiner BS, et al. Colon cryptogenesis: asymmetric budding. *PLoS One* 2013;8:e78519.
19. Wong WM, Mandir N, Goodlad RA, et al. Histogenesis of human colorectal adenomas and hyperplastic polyps: the role of cell proliferation and crypt fission. *Gut* 2002;50:212-7.
20. Preston SL, Wong WM, Chan AO, et al. Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. *Cancer Res* 2003;63:3819-25.
21. Gutierrez-Gonzalez L, Deheragoda M, Elia G, et al. Analysis of the clonal architecture of the human small intestinal epithelium establishes a common stem cell for all lineages and reveals a mechanism for the fixation and spread of mutations. *J Pathol* 2009;217:489-96.
22. Snippert HJ, Schepers AG, van Es JH, et al. Biased competition between Lgr5 intestinal stem cells driven by oncogenic mutation induces clonal expansion. *EMBO Rep* 2014;15:62-9.
23. Humphries A, Cereser B, Gay LJ, et al. Lineage tracing reveals multipotent stem cells maintain human adenomas and the pattern of clonal expansion in tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:E2490-9.
24. Thirlwell C, Will OC, Domingo E, et al. Clonality assessment and clonal ordering of individual neoplastic crypts shows polyclonality of colorectal adenomas. *Gastroenterology* 2010;138:1441-54, 1454 e1-7.
25. Giaretti W, Monaco R, Pujic N, et al. Intratumor heterogeneity of K-ras2 mutations in colorectal adenocarcinomas: association with degree of DNA aneuploidy. *Am J Pathol* 1996;149:237-45.

26. Giaretti W, Rapallo A, Scitutto A, et al. Intratumor heterogeneity of k-ras and p53 mutations among human colorectal adenomas containing early cancer. *Anal Cell Pathol* 2000;21:49-57.
27. Ishii M, Sugai T, Habano W, et al. Analysis of Ki-ras gene mutations within the same tumor using a single tumor crypt in colorectal carcinomas. *J Gastroenterol* 2004;39:544-9.
28. Schepers AG, Snippert HJ, Stange DE, et al. Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science* 2012;337:730-5.
29. Phelps RA, Chidester S, Dehghanizadeh S, et al. A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. *Cell* 2009;137:623-34.
30. Obrador-Hevia A, Chin SF, Gonzalez S, et al. Oncogenic KRAS is not necessary for Wnt signalling activation in APC-associated FAP adenomas. *J Pathol* 2010;221:57-67.
31. Moon BS, Jeong WJ, Park J, et al. Role of Oncogenic K-Ras in Cancer Stem Cell Activation by Aberrant Wnt/beta-Catenin Signaling. *J Natl Cancer Inst* 2014;106:djt373.
32. Azuara D, Ginesta MM, Gausachs M, et al. Nanofluidic digital PCR for KRAS mutation detection and quantification in gastrointestinal cancer. *Clin Chem* 2012;58:1332-41.
33. Suzuki R, Shimodaira H. Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics* 2006;22:1540-2.
34. Leedham SJ, Graham TA, Oukrif D, et al. Clonality, founder mutations, and field cancerization in human ulcerative colitis-associated neoplasia. *Gastroenterology* 2009;136:542-50 e6.
35. Sakurazawa N, Tanaka N, Onda M, et al. Instability of X chromosome methylation in aberrant crypt foci of the human colon. *Cancer Res* 2000;60:3165-9.
36. Baker AM, Graham TA, Wright NA. Pre-tumour clones, periodic selection and clonal interference in the origin and progression of gastrointestinal cancer: potential for biomarker development. *J Pathol* 2013;229:502-14.
37. Feng Y, Bommer GT, Zhao J, et al. Mutant KRAS promotes hyperplasia and alters differentiation in the colon epithelium but does not expand the presumptive stem cell pool. *Gastroenterology* 2011;141:1003-1013 e1-10.
38. Park HS, Goodlad RA, Wright NA. Crypt fission in the small intestine and colon. A mechanism for the emergence of G6PD locus-mutated crypts after treatment with mutagens. *Am J Pathol* 1995;147:1416-27.
39. Araki K, Ogata T, Kobayashi M, et al. A morphological study on the histogenesis of human colorectal hyperplastic polyps. *Gastroenterology* 1995;109:1468-74.
40. Boman BM, Fields JZ. An APC:WNT Counter-Current-Like Mechanism Regulates Cell Division Along the Human Colonic Crypt Axis: A Mechanism That Explains How Mutations Induce Proliferative Abnormalities That Drive Colon Cancer Development. *Front Oncol* 2013;3:244.
41. Kim KM, Shibata D. Methylation reveals a niche: stem cell succession in human colon crypts. *Oncogene* 2002;21:5441-9.
42. Kim KM, Shibata D. Tracing ancestry with methylation patterns: most crypts appear distantly related in normal adult human colon. *BMC Gastroenterol* 2004;4:8.
43. Slorach EM, Campbell FC, Dorin JR. A mouse model of intestinal stem cell function and regeneration. *J Cell Sci* 1999;112 Pt 18:3029-38.
44. Losi L, Baisse B, Bouzourene H, et al. Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression. *Carcinogenesis* 2005;26:916-22.

Table 1. Sporadic results

A. APC results

		Biopsy		Crypts		Mutation dosage	
		Mutation spectrum	LOH	Mutated crypts	Cell populations	Mutation dosage	
SP1	N	ND	ND	ND	ND	ND	
	T	c.3927_3931del5; p.(Glu1309AspF6*4)	No	4/7 (57%)	c.3927_3931del5; p.(Glu1309AspF6*4)	Heterozygote (n=4)	
SP2	N	ND	ND	ND	ND	ND	
	T	c.4230C>A; p.(Cys1410*)	No	4/6 (67%)	c.4230C>A; p.(Cys1410*)	Homozygote (n=1) Heterozygote (n=3)	
SP3	N	ND	ND	ND	ND	ND	
	T	c.43559delT; p.(Asn1455Ilefs*18)	No	3/6 (50%)	c.43559delT; p.(Asn1455Ilefs*18)	Heterozygote (n=3)	
SP4	N	ND	ND	ND	ND	ND	
	T	c.3732A>G; p.(=)	Yes	7/7 (100%)	c.3732A>G; p.(=) - (7/7)	Homozygote (n=2) Heterozygote (n=4) Inconclusive (n=1)	
SP5	N	ND	ND	ND	ND	ND	
	T	c.4326T>A; p.(=)	No	5/7 (71%)	c.4326T>A; p.(=) - (3/7)	Homozygote (n=1) Heterozygote (n=2)	
SP6	N	ND	ND	ND	ND	ND	
	T	c.4067C>A; p.(Ser1356*)Hc4348C>T; p.(Arg1450*)	No	8/9 (89%)	c.4067C>A; p.(Ser1356*)Hc4348C>T; p.(Arg1450*) - (2/9) c.4067C>A; p.(Ser1356*) - (2/9)	Heterozygote + heterozygote (n=1) Heterozygote (n=1)	

B. KRAS/BRAF results

		Biopsy			KRAS			BRAF		
		Mutational load	Whole section	Mutated crypts	% of mutations per crypt	Crypts for mutation pattern	Spectrum of mutations	Mutational load	Mutated crypts	% of mutations in a whole tested crypt
SP1	N	ND	-	0/15	WT	-	-	ND	1/15 (13%)	3%
	T	-	WT	0/9	WT	-	-	WT	2/9 (22%)	3%
SP2	N	ND	-	0/15	WT	-	-	ND	2/15 (13%)	12-19%
	T	91.5%	G12A (28%), G12D (32%), G12V (30%) G12S (0.13%), G13D (0.8%)	8/10 (80%)	34-72%	4	19-34%, 10-20%, 6-18%, 13%, 3%	WT	2/10 (20%)	8-20%
SP3	N	ND	-	0/17	WT	-	-	ND	4/17 (23%)	17-32%
	T	77%	G12C (36%), G12S (37%), G12R (0.2%) G12V (0.2%), G13D (4%)	6/9 (67%)	43%	2	23%, 14%, 6%, 8%	WT	1/9 (11%)	19%
SP4	N	ND	-	0/13	WT	-	-	ND	1/13 (8%)	36%
	T	44%	G12D (44%) G12S (0.4%)	10/10 (100%)	5-18%	10	G12D	WT	0/10	WT
SP5	N	ND	-	0/18	WT	-	-	ND	17/18 (94%)	10-43%
	T	29%	G12D (29%) G12C (0.18%)	0/8	WT	-	-	WT	2/8 (25%)	15-26%
SP6	N	ND	-	0/12	WT	-	-	ND	8/12 (67%)	14-31%
	T	51%	G12V (50%), G12A (0.1%), G12D (0.9%) G12C (0.2%), G12S (0.2%)	7/10 (70%)	38-51%	6	28-33%, 7-11%, 3-7%, 11%, 3%	WT	10/10 (100%)	6-20%

LOH as assessed by mutation dosage of/and intragenic markers analysis

Table 2. APC results in Hereditary cases

		Biopsy			Crypts		
FAP	N3	Mutation spectrum	Number of mutated areas	LOH	Mutated crypts	Cell populations	Mutation dosage
	Ad1.1	ND c.4216C>T; p.(Gln1406*)	ND 2/3 (67%)	ND No	ND 1/8 (12.5%)	ND c.4285C>T; p.(Gln1429*)	ND Heterozygote (n=1)
	Ad2.1	WT	0/2	No	0/10	WT	WT
	Ad3.1	c.4222_4241del20; p.(Glu1408Lysis*8)	3/3 (100%)	No	1/6 (17%)	c.4222_4241del20; p.(Glu1408Lysis*8)	Heterozygote (n=1)
MAP	N1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	N2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	N3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Ad1.1	WT	0/2	No	0/6	WT	WT
	Ad2.1	ND	ND	ND	0/9	WT	WT
	Ad3.1	ND	ND	ND	0/8	WT	WT
POLY3	N1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Unknown	N2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	N3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Ad1.1	WT	0/4	Non informative	ND	ND	ND
	Ad2.1	ND	ND	ND	0/1	WT	WT
	Ad3.1	ND	ND	ND	1/1 (100%)	c.3729T>C; p.(=)	Heterozygote (n=1)
	Ad3.2	ND	ND	ND	0/2	WT	WT
POLY4	N1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Unknown	N2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	N3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Ad1.1	c.4222G>T; p.(Glu1408*)	4/4 (100%)	NO	2/2 (100%)	c.4348C>T; p.(Arg1450*)	Homozygote (n=1)
	Ad1.2	ND	ND	ND	0/1	WT	Heterozygote (n=1)
	Ad1.3	ND	ND	ND	0/1	WT	WT
	Ad2.1	WT	0/2	Non informative	1/4 (25%)	c.3894T>A; p.(=)	Heterozygote (n=1)
	Ad3.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Ad3.2	c.4281delT; p.(Gly1428Aspfs*45)	4/4 (100%)	No	ND	ND	ND
	Ad3.3	ND	ND	ND	1/3 (33%)	c.3615C>T; p.(=) + c.3695A>G; p.(His1232Arg)	Heterozygote + heterozygote (n=1)

LOH as assessed by mutation dosage or/and intragenic markers analysis

Table 3. KRAS/ BRAF results in Hereditary cases

	KRAS			BRAF		
	Mutational load	Whole section	Crypts	Mutational load	Crypts	% of mutations in a whole tested crypt
FAP						
N3	ND	ND	19-21%	ND	WT	WT
Ad1.1	0.3%	G12D	14%	10/10 (100%)	WT	6%
Ad2.1	0.1%	G12S	21%	10/10 (100%)	WT	WT
Ad3.1	8%	G12S	16-31%	10/10 (100%)	WT	5-14%
			6-14%	10/10 (100%)	WT	
			10%	10/10 (100%)	WT	
MAP						
N1	ND	ND	WT	0/20	ND	WT
N2	ND	ND	WT	0/20	ND	WT
N3	ND	ND	5%	1/10 (5%)	ND	4%
Ad1.1	20%	G12S (9.5%), G12C (9%), G13D (1.1%)	34%	8/8 (100%)	ND	4%
			31%		WT	27%
			22-23%			
			23%			
			6%			
			5%			
Ad2.1	ND	ND	34%	8/8 (100%)	ND	3%
			31%			
			22%			
			14%			
Ad3.1	ND	ND	29%	10/10 (100%)	ND	3-6%
			23%			
			23%			
			22%			
			14%			
POLY3						
Unknown	ND	ND	54%	4/8 (50%)	ND	14-22%
			40%			
N2	ND	ND	10%	1/6 (17%)	ND	WT
			37%			
N3	ND	ND	20%	1/6 (17%)	ND	19-28%
Ad1.1	0.2%	G12D (0.1%), G12S (0.1%)	WT	0/1	ND	5%
Ad2.1	ND	ND	11%	1/3 (33%)	WT	WT
Ad3.1	ND	ND	24%	2/3 (67%)	ND	6%
			12%			
Ad3.2	ND	ND	53%	0/2	ND	WT
POLY4						
Unknown	ND	ND	32%	8/10 (80%)	ND	WT
			6-21%			
N2	ND	ND	96%	10/13 (77%)	ND	3-23%
			77%			
			46-63%			
			55%			
			6-21%			
			46%			
			22-42%			
			14%			
			21-28%			
			4-9%			
Ad1.1	92%	G12A(32%), G12D(31%), G12V(29%)	45-60%	4/7 (57%)	WT	9%
			24%			
			21%			
Ad1.2	ND	ND	60%	7/10 (70%)	ND	WT
			26%			
			24%			
			10-38%			
Ad1.3	ND	ND	65%	3/6 (50%)	ND	WT
Ad2.1	0.5%	G12C (0.1%), G12D (0.1%), G13D (0.3%)	12-25%	1/7 (14%)	WT	WT
			8%			
Ad3.1	0.7%	G13D (0.4%), G12S (0.1%), G12D(0.1%), G12V (0.1%)	5%	1/2 (50%)	WT	WT
Ad3.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ad3.3	ND	ND	55%	3/4 (75%)	ND	ND
			30%			
			6%			

LEGENDS

Figure 1. Sporadic-6 case. (A) APC MCR study. Two *APC* mutations were selected in the adenocarcinoma. These mutations were observed in different proportions in the crypts analyzed; either alone or in combination. In one crypt no mutation was identified. Each independent mutation is depicted with a specific color. **(B) KRAS/BRAF study. (i)** Represented data indicate the percentage of each *KRAS/BRAF* mutation obtained by digital PCR. In the biopsy *G12V KRAS* was detected. **(ii)** Hierarchical Cluster Analysis (HCA) identified 9 crypt metapopulations. Wild type crypts (4) were restricted to normal mucosa. The remaining crypts isolated from normal mucosa harbored the *BRAF* mutation. Tumor crypts were classified into 6 metapopulations. *KRAS* mutations identified in the biopsies correlated with those in crypts. The color code at the bottom box represents each *KRAS/BRAF* mutation. N, normal mucosa, T, adenocarcinoma.

Figure 2. FAP case. (A) APC MCR study. The results of MCR analysis of the biopsies (left) depicted two independent dominant mutations in two different adenomas, whilst crypt analysis (right) shows only one of the dominant mutations. In one crypt a novel mutation was identified. Each independent mutation is depicted with a specific color. **(B) KRAS/BRAF study. (i)** Digital PCR did not identify any *KRAS/BRAF* mutation. **(ii)** The HCA study of the crypts identified 9 metapopulations that share common features. The widespread heterogeneity observed in crypts did not correlate with the lack of selected mutations in biopsies. The color code at the bottom box represents each *KRAS/BRAF* mutation. N, normal mucosa, T, adenocarcinoma.

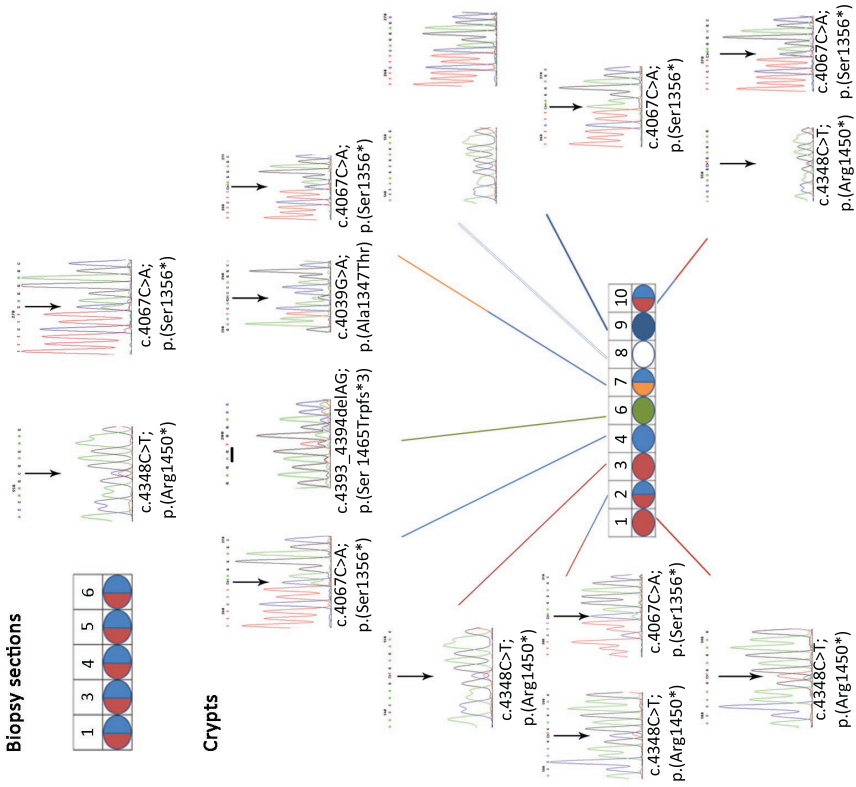
Figure 3. MAP case. (A) APC MCR study. No mutation was detected. **(B) KRAS/BRAF study. (i)** In adenoma biopsies, three *KRAS* mutations were identified by digital PCR. **(ii)** HCA identified 13 crypt metapopulations. The majority of normal mucosa crypts harbored no mutation, while adenomas

crypts displayed two different patterns: one harboring multiple mutations within a crypt and a second one with single mutation. No correlation was evident between the widespread heterogeneity observed in crypts and studied biopsies. The color code at the bottom box represents each *KRAS/BRAF* mutation. N, normal mucosa, T, adenocarcinoma.

Figure 4. Polyposis of unknown origin (POLY4). (A) APC MCR study. Mutations were detected in the biopsy of 2 of the 3 adenomas analyzed (2 mutations in two different adenoma regions). In the crypts 4 mutations, 2 of them coexisting in the same crypt were detected but none was selected for. **(B) *KRAS/BRAF* study. (i).** Up to three independent *KRAS* mutations were detected in the biopsies of the 3 adenomas analyzed from the ascending colon. **(ii)** HCA depicted 30 crypt metapopulations; most of them composed by a single crypt. There is no correlation between the widespread heterogeneity observed in crypts and the corresponding biopsies. The color code at the bottom box represents each *KRAS/BRAF* mutation. N, normal mucosa, T, adenocarcinoma.

Figure 1. Sporadic case

A. APC MCR study



B. KRAS/BRAF study

i. Biopsy analysis by digital PCR

G12A **G12C** **G12D** **G12R** **G12S** **G12V** **G13D** **V600E**

Tumor	0.12	0.23	0.93	0	0.23	49.60	0	0
-------	------	------	------	---	------	-------	---	---

ii. Metapopulation study by HCA

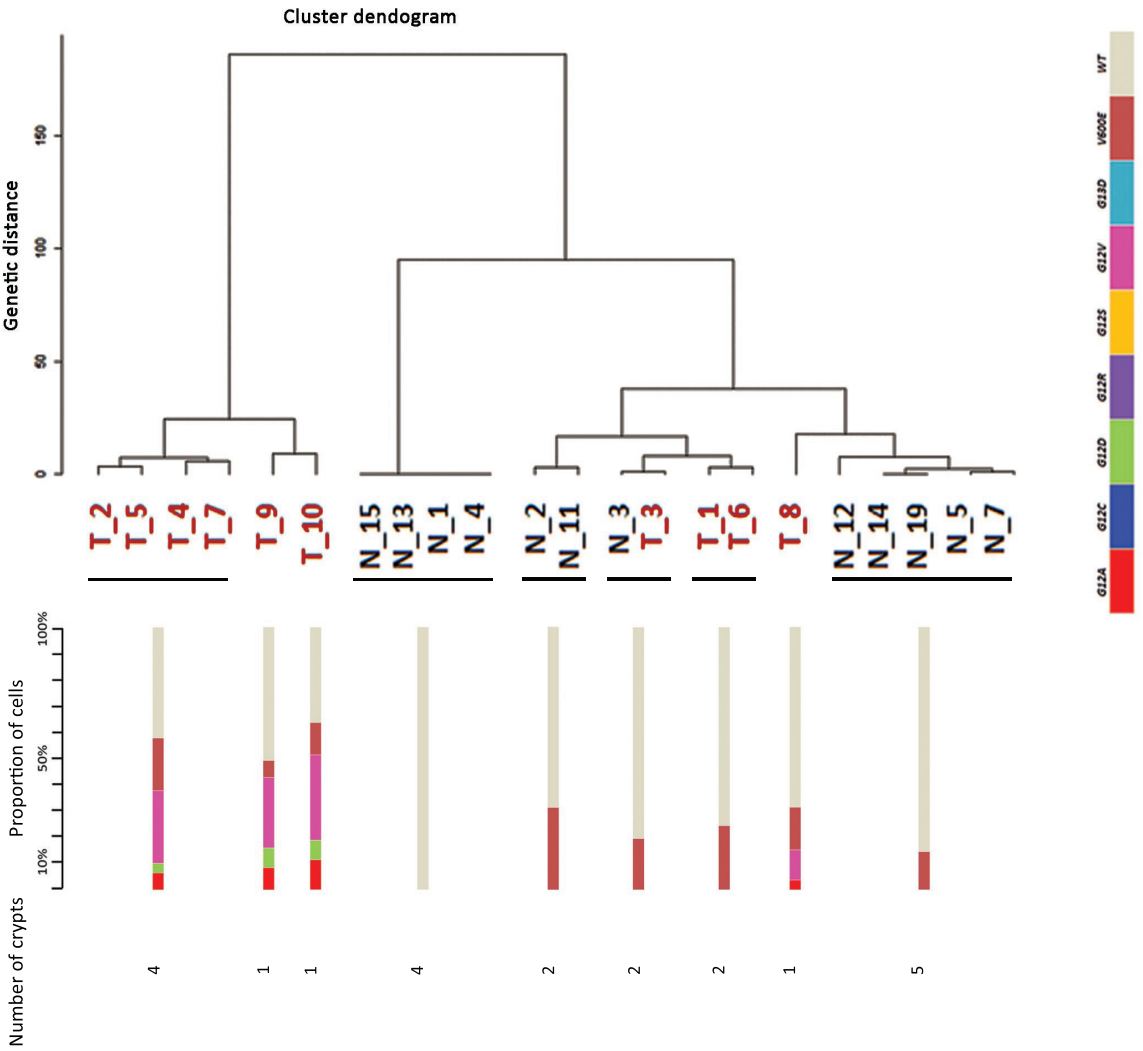
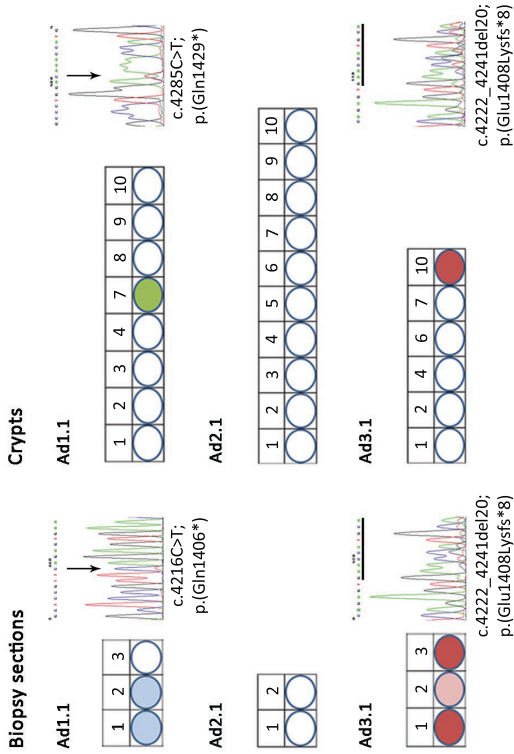
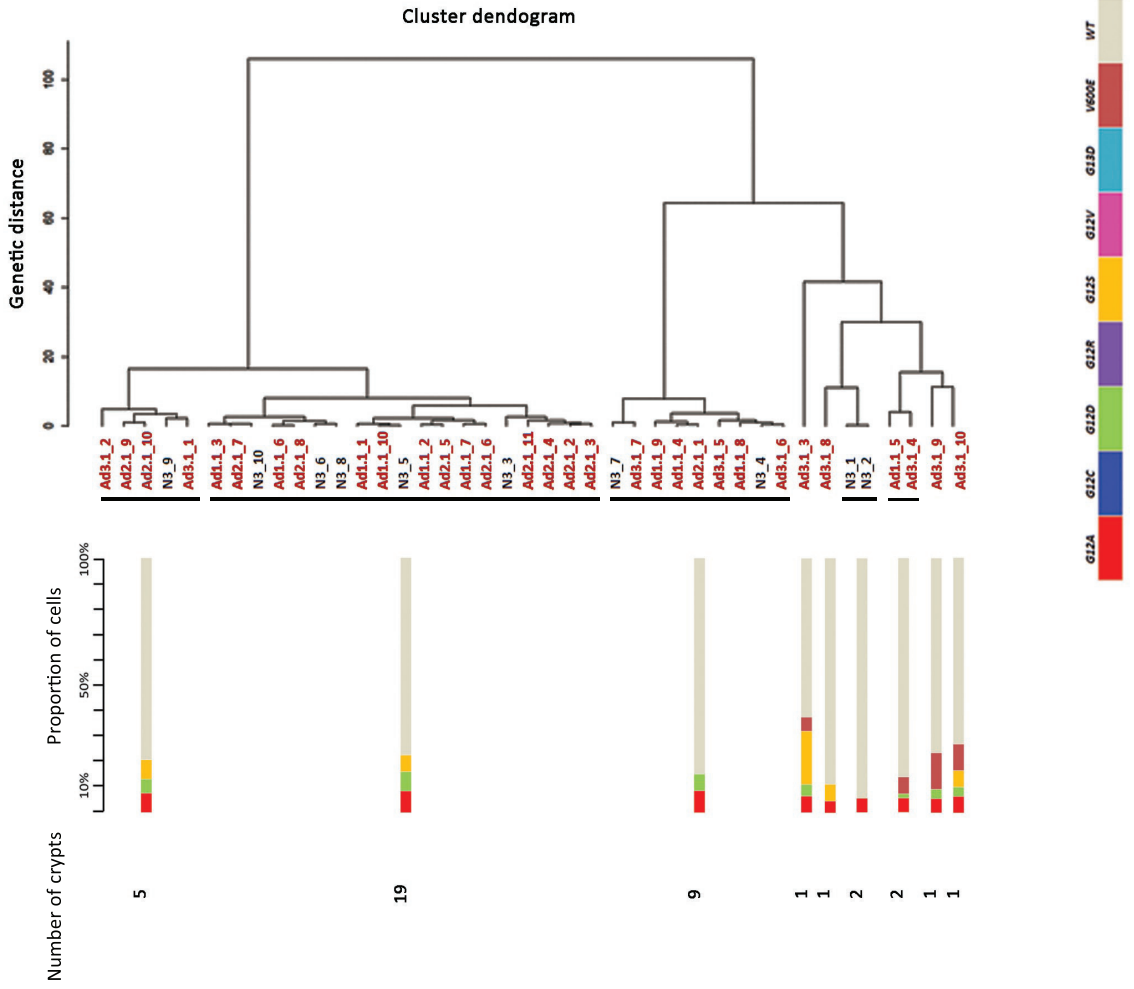


Figure 2. FAP case

A. APC/MCR study



ii. Metapopulation crypt study by HCA



B. KRAS/BRAF study

i. Biopsy analysis by digital PCR

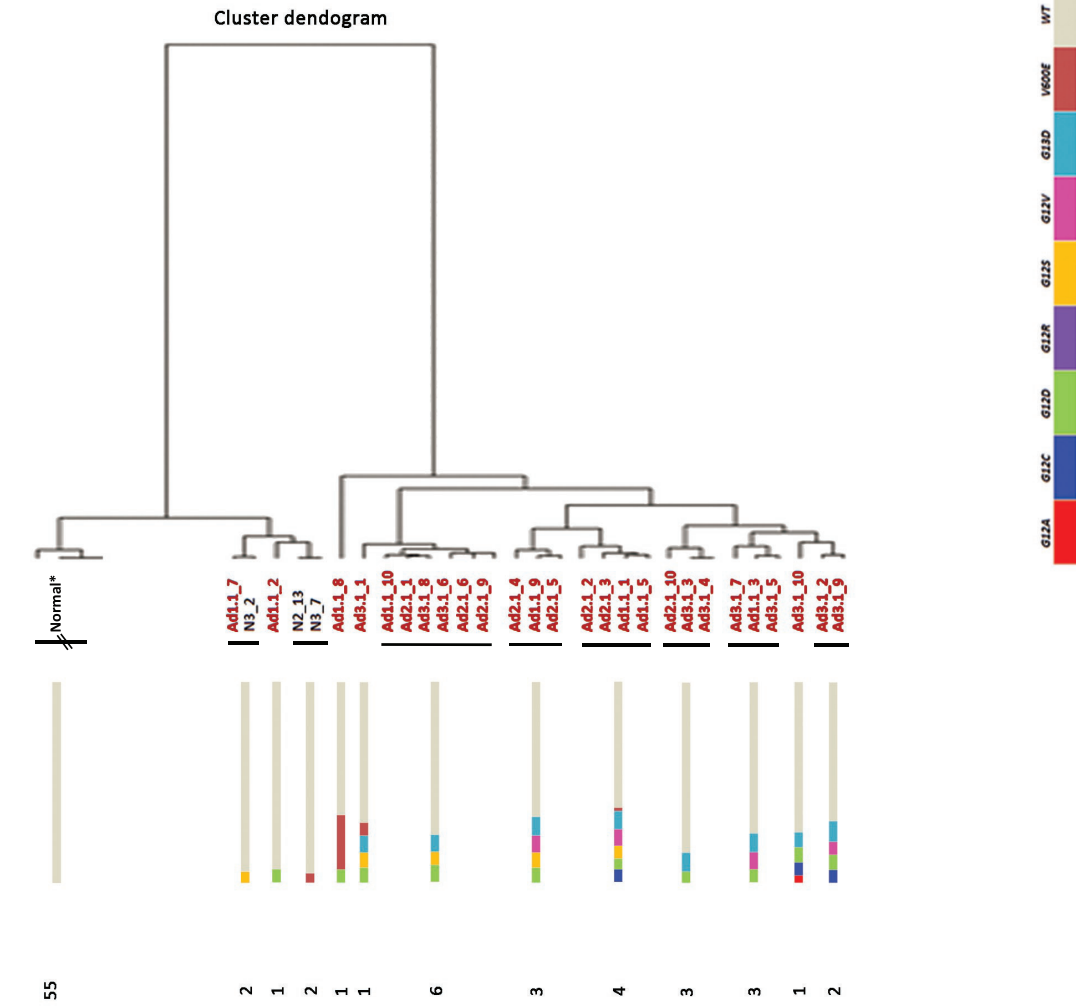
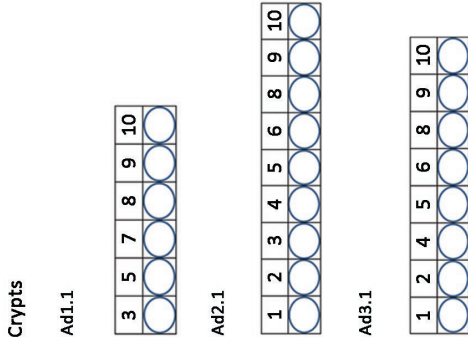
	G12A	G12C	G12D	G12R	G12S	G12V	G13D	V600E	WT
Ad1.1	0	0	0.28	0	0	0	0	0	0
Ad2.1	0	0	0	0	0.14	0	0	0	0
Ad3.1	0	0	0	0	8.48	0	0	0	0

Figure 3. MAP case

A. APC MCR study

ii. Metapopulation study by HCA

Number of crypts
Proportion of cells



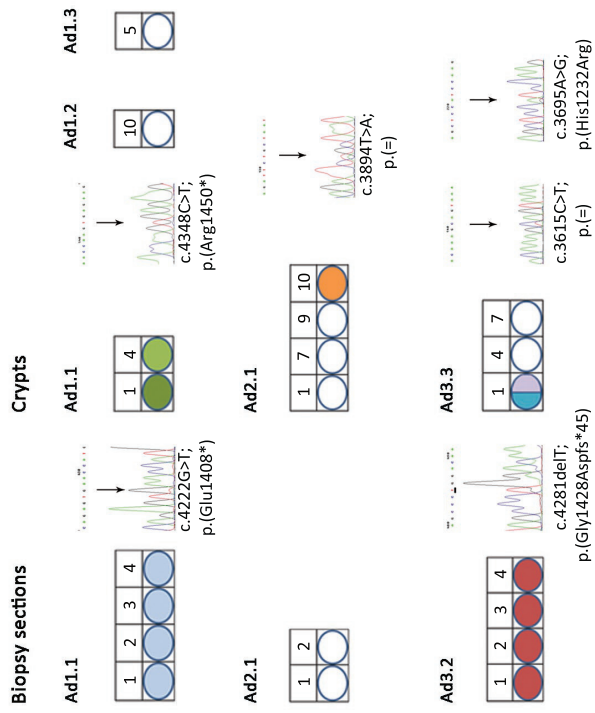
B. KRAS/BRAF study

i. Biopsy analysis by digital PCR

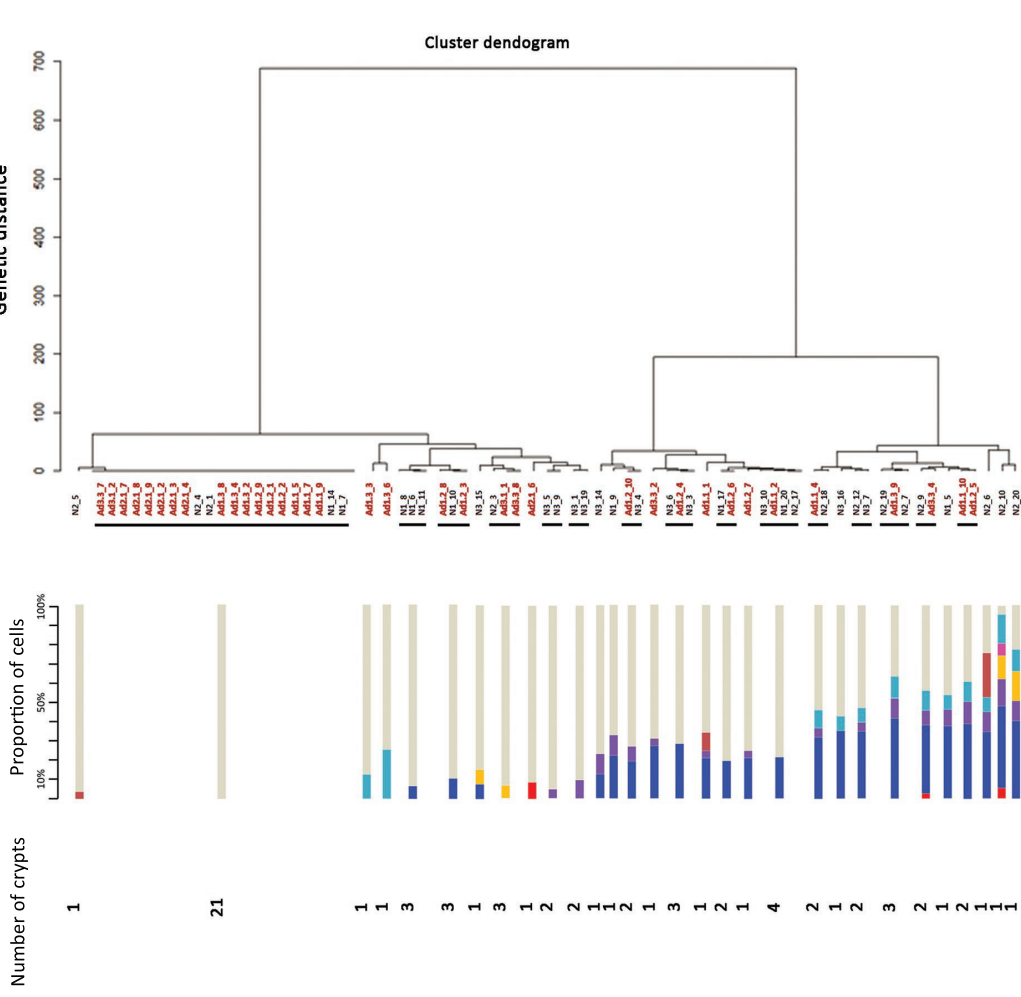
	G12A	G12C	G12D	G12R	G12S	G12V	G13D	V600E	WT
Ad1.1	0	8.91	0	0	9.41	0	1.14	0	0

Figure 4. Polyposis of unknown origin

A. APC/MCR study



ii. Metapopulation study by HCA



B. KRAS/BRAF study

i. Biopsy analysis by digital PCR

	G12A	G12C	G12D	G12R	G12S	G12V	G13D	V600E	WT
Ad1.1	31.18	0	31.08	0	0	29.34	0	0	0
Ad2.1	0	0.07	0.14	0	0	0	0.3	0	0
Ad3.1	0	0	0.08	0	0.08	0.10	0	0	0

G12A G12C G12D G12R G12S G12V G13D V600E

SUPPORTING MATERIAL

Nomenclature of samples

Each sample was collected at the Pathological Department, and called following the premises described below: Samples were from normal mucosae (N), proximal normal mucosae (PN), distant normal mucosae (DN), adenoma (ad) or adenocarcinoma (T). When the sample was collected from total colectomy the identification code include one or two numbers. The first number corresponds to the colon region: ascending (1), transverse (2) and descending (3). When multiple biopsies were collected from the same colon region, a second number identified each one of them.

Methodological conditions

APC gene and LOH analysis

Analysis of MCR APC

A MCR fragment of 1650 bp (EH fragment) of *APC* were studied in biopsy sections. Primers are detailed in Table S3. PCR reaction was performed in 30 μ L of 0.1 μ mol/L specific primers of each region, 0.2 mmol/L dNTPs, 20 – 100 ng genomic DNA, 1.5 mol/L magnesium chloride, 1 \times PCR buffer, 1 U of Immolase DNA polymerase (Bioline, London, England) for 35 cycles with annealing temperature of 59 $^{\circ}$ C for lesion biopsies.

The strategy to analyzed crypts was characterized by an external PCR of 15 cycles to amplified EH APC fragment following the same steps described above. Secondly, 2 independent fragments (F2 and GH) were obtained from each external product. PCR internal reactions were performed as is described above but with specific annealing temperature for each fragment: 60 $^{\circ}$ C and 57 $^{\circ}$ C for F2 and GH, respectively. The efficiency of this step was not perfect thus only a set of crypts was able to analyze by this methodology.

The PCR products were purified using IllustraTM GFXTM DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Sequencing analysis of PCR products was performed with BigDye Terminator v.3.1 Kit (Applied Biosystems).

LOH of APC

LOH at APC was assessed using three microsatellite markers on chromosome 5q (D5S82, D5S46, and D5S299) to study primary biopsies. External microsatellites were amplified using D5S299, D5S82, D5S346 primers. Primers information is detailed in Table S3. Amplification was carried out for 35 cycles with annealing temperature of 55 $^{\circ}$ C. Ten μ L PCR reaction was performed on 100ng genomic DNA, 5 μ L of Megamix double (Microzone Ltd., UK) and 0.1 μ M of each primer. The PCR product was purified using IllustraTM GFXTM DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare). Products were run in an ABI Prism 3130 DNA sequencer and were analyzed by GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). In informative cases, the values given for the peak area of the two alleles in the paired normal and tumor samples were used to define allele loss as described by Cawkwell et al ¹. A ratio of less than or equal to 0.30 was assigned to be indicative of loss on the basis that some tumors in the series contained up to 30% of normal cells contamination.

Cases with LOH were confirmed by the analysis of the rs2229992 frequent coding single nucleotide polymorphism (SNP) in exon 11 of the *APC* gene by Single Nucleotide Primer Extension (SNUPE) using the ABI PRISM[®] SNaPshot[®] Multiplex Kit (Applied Biosystems) with specific primers (as described in Table S3). To specifically analyzed exon 11, 25 ng of genomic DNA from pairs of normal and tumors/premalignant lesion samples were amplified in a final volume of 25 μ L including 0.13 μ mol/L exon 11 primers, 0.2 mmol/L dNTPs, 2.5 mmol/L MgCl₂, and 1.25 U Taq polymerase (Thermoprime Plus DNA Polymerase; ABgene). After an initial denaturing step, samples underwent 5 initial cycles (1 min at 94 $^{\circ}$ C, 30 s at 65 $^{\circ}$ C, 30 s at 72 $^{\circ}$ C), 20 cycles (1 min at 94 $^{\circ}$ C, 30 s at 65 $^{\circ}$ C decreasing 0.5 $^{\circ}$ C/cycle, 30 s at 72 $^{\circ}$ C), and 10 final cycles (1 min at 94 $^{\circ}$ C, 30 s at 55 $^{\circ}$ C, 30 s at 72 $^{\circ}$ C). To remove unincorporated primers and dNTPs, PCR fragments were purified

using illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). For the single nucleotide primer extension reaction, specific primer extension (rs2229992 SNP) was carried out with the SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems) according to manufacturers instructions. Briefly, reactions were performed in a total volume of 10 µL containing 1.5 µL treated PCR product, 4.5 µL SNaPshot Ready Reaction Mix, and 0.2 µmol/L extension primer. Primer extension thermocycling conditions consisted of 25 cycles of 96°C for 10 s, 50°C for 5 s, and 60°C for 30 s. SNaPshot reaction products were treated with 1 U shrimp alkaline phosphatase (usb) for 60 min at 37°C and then 15 min at 75°C. Products were run in an ABI Prism 3130 DNA sequencer and analyzed by GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems). Only heterozygous samples were informative (showed a profile with two peaks, a black one and a red one representing C and T alleles, respectively). SNaPshot reactions were carried out in a 10µl final volume containing SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix (5µl), specific primer (0.2µM), and the purified PCR product (1.5µl). The cycling program included 25 cycles of 96°C for 10s, 50°C for 5s, and 60°C for 30s. Extension products were purified with 1U of shrimp alkaline phosphatase (Amersham, UK) for 15min at 37°C and then 15min at 80°C. The purified products were run in an ABI Prism 3130 DNA sequencer and were analyzed by GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems). The comparison of peak intensities between normal and tumors/premalignant lesion in heterozygous samples were analyzed to establish LOH in APC. The criteria to determine LOH was the same as described above for microsatellite markers on chromosome 5q. A ratio of less than or equal to 0.30 was assigned to be indicative of loss on the basis that some tumors in the series contained up to 30% of normal cells contamination.

KRAS and BRAF hotspot mutations analysis

Nanofluidic digital PCR

BioMark™ Digital PCR Analysis Software (Fluidigm® Corporation) was used to calculate the number of positives in each panel, and generated data as heat maps with corresponding amplification curves for each of 770 chambers. Mutated allele frequencies for a given case were calculated using the formula: number of mutant alleles detected by a given probe/total number of alleles analyzed. The total number of alleles analyzed was the sum of the median of wild type alleles detected after probing for each mutation plus the total number of mutant alleles detected in the sample.

Conventional real-time PCR analysis

Twenty ng of genomic DNA were added in 2.5 µL TaqMan® universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.125 µL of 40X probes mix and 1.375 µL of H₂O. The thermal cycling parameters are the same for all alleles tested: 95°C for 10 minutes, 40 cycles at 92°C for 15 seconds and annealing temperature at 60°C for 1 minute. A final step of allelic discrimination is necessary to differentiate between VIC and FAM signals. The Light Cycler® 480 Software v1.5 (Roche) determines the genotype of the sample by measuring the intensity distribution of used dyes after PCR.

The technical setting up to crypt study

Crypts study required a DNA enrichment step. Serial dilutions of homozygous G12V, G12D, G12C mutated DNA (from SW480, NP9 and MIA PaCa-2 cell lines, respectively) with wild type DNA (from NP18 cell line) were studied to determine the best strategy to increase the input of DNA. The choice of the best option was based on a comparative study of two DNA pre-amplification techniques: WGA and an external PCR of 15 cycles.

DNA from each serial dilution was amplified using the REPLI-g kit (Qiagen) and then were genotyped using specific TaqMan® probes by the Light Cycler® 480 (Roche). The obtained results were compared with the previously published ².

DNA from serial dilutions of *KRAS* (codon 12 and 13) and *BRAF* [hotspot mutation c.1799T>A (V600E)] mutations were pre-amplified 15 cycles using external primers (information is detailed in the Table S3). *KRAS* and *BRAF* PCR reactions were performed as is described in section “External

KRAS and BRAF amplification from DNA". Two set of amplicons were genotyping by the Light Cycler® 480 (Roche) and the results were compared with previously published².

The comparative study of WGA products showed that the mutational proportion was lost respect those observed in the non-pre-amplified samples. In contrast, pre-amplified products by PCR of 15 cycles showed a comparable distribution regarding the original genotyping of the serial dilutions (Figure S2). In order to go further into the quantification topic, we made an assessment of amplification curves for tested probe and for each serial dilution, which enabled to establish a relationship between expected proportion of mutant allele and the ratio between fluorescence of two probes of each sample. This relationship was also observed when the serial dilutions were genotyped by nanofluidic PCR using digital array (Figure S3).

External KRAS and BRAF amplification from DNA

An external pre-amplification of KRAS and BRAF fragment of 15 cycles was required to analyze molecular alterations from crypts. For primer sequences see Table S3. *KRAS*-PCR reaction was performed in 15 μ l of 1.5mol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 20 ng genomic DNA, 0.1 μ mol/L of each primer and 1U of Immolase DNA polymerase (Bioline) for 15 with annealing temperature of 52°C. *BRAF* hotspot mutation c.1799T>A (V600E) was amplified by PCR with *BRAF*_PCR primers. PCR reaction was performed in 30 μ l of 1.5mol/L MgCl₂, 0.2mmol/L dNTPs, 20 ng genomic DNA, 0.5 μ mol/L of each primer and 1U Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 15 cycles with annealing temperature of 55°C. Contamination of this step was discarded by an independent genotyping process by Light Cycler® 480 (Roche) device that analyzed waters of external amplification (Figure S5 and Figure S6). A strict analysis of the negative controls was performed in each assay, thus excluding any possibility of contamination. A set of pre-amplified product from crypts was also tested in this assay to determine if pre-amplification has occurred.

Genotyping by Nanofluidic Dynamic PCR

The 48.48 Dynamic Array used in the present study is able to analyze 48 samples with 48 assays on the BioMark platform (Fluidigm® Corporation). The array is mounted on a plastic interface containing 48 samples and 48 assay inlets. In the present study, each array was loaded with 47 samples and one nontemplate control. Eight hotspot assays (7 for *KRAS* and one for *BRAF*) were loaded in 6 replicates into the 48 assay inlets. The array contains a network of fluid lines (integrated fluidic circuit, IFC) and chambers that are controlled by elastomeric valves. These valves deflect under pressure to create a tight seal, thereby regulating the flow of liquids into the IFC. Before reagents are loaded, the array is primed using the IFC Controller MX, which pressurizes the control lines and closes the interface valves. The same genotyping assay reagents and enzyme master mixes used for conventional genotyping were used for the nanofluidic array. Each assay (5 μ l) comprised 2.5 μ l of Assay Loading Reagent (2x) (Fluidigm® Corporation, PN 85000736), 1.25 μ l SNP genotyping assay mix (40x) (Applied Biosystems), 0.25 μ l ROX (50x) (Invitrogen, Carlsbad, CA), and 1 μ l DNA-free water. Each sample (6 μ l) comprised 3 μ l TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X), 0.06 μ l AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems), 0.3 μ l GT sample loading reagent (20x) (Fluidigm® Corporation), 0.12 μ l DNA-free water, and 2.52 μ l PCR product. Each of the assays (4 μ l) and samples (5 μ l) was pipetted into separate inlets on the frame of the chip according to the manufacturer's instructions. The assays and samples were loaded into the reaction chambers and mixed using the IFC Controller MX. Arrays should be run immediately after assays, with samples pipetted into wells. The arrays were processed using the BioMark System (Fluidigm® Corporation), which performs the thermal cycling and fluorescent image acquisition. The raw data for each reaction was extracted using the genotyping analysis software (BioMark™ SNP Genotyping Analysis Software). Intra-experimental and inter-experimental variability were studied based on this wild-type variant fluorescence/mutant variant fluorescence ratio. Negative controls excluded contamination in the process.

Quantification of results from genotyping technology

Serial dilutions of mutations of *KRAS* (*G12V*, *G12D*, *G12C*, *G12S*, *G12R*, *G12A* and *G13D*) and *BRAF* (*V600E*) were genotyped by conventional real-time PCR analysis probes using the real-time PCR machine Light Cycler® 480, and, on the other hand, by Dynamic PCR using the BioMark System (Fluidigm® Corporation). The raw data for each reaction was extracted from analysis software. A pair of fluorescence value was obtained for each allele to test, one probe targets the wild-type variant (tagged with VIC fluorophore) and the other targets to mutant variant (tagged with FAM fluorophore) and a ratio between them was established. A standard curves for each genotyping methodology used (Light Cycler® 480, as well as, for real-time PCR using dynamic array) were obtained to estimate the mutant allele frequency (see an example in Figure S4). The analytical sensitivity of each probe is detailed in Table S4.

References

1. Cawkwell L, Bell SM, Lewis FA, et al. Rapid detection of allele loss in colorectal tumours using microsatellites and fluorescent DNA technology. *Br J Cancer* 1993;67:1262-7.
2. Azuara D, Ginesta MM, Gausachs M, et al. Nanofluidic digital PCR for *KRAS* mutation detection and quantification in gastrointestinal cancer. *Clin Chem* 2012;58:1332-41.

Table S1. Spectrum of *KRAS* mutations in primary lesions by digital PCR

	<i>G12A</i>	<i>G12C</i>	<i>G12D</i>	<i>G12R</i>	<i>G12S</i>	<i>G12V</i>
POLY1 Ad1	0	0	0.28	0	0	0
POLY1 Ad2	0	0	0	0	0.14	0
POLY1 Ad3	0	0	0	0	8.48	0
POLY2 Ad1	0	8.91	0	0	9.41	0
POLY3 Ad1	0	0	0.08	0	0.08	0
POLY4 Ad1	31.18	0	31.08	0	0	29.34
POLY4 Ad2	0	0.07	0.14	0	0	0
POLY4 Ad3	0	0	0.08	0	0.08	0.10
CMRD	0	0	0	0	0.09	0
Lynch	0	0	0.29	0	0.13	0
SP1	0	0	0	0	0.06	0
SP2	28.52	0	32.10	0	0.13	29.73
SP3	0	35.90	0.19	0.18	36.76	0
SP4	0	0	43.98	0	0.41	0
SP5	0	0.18	29.34	0	0	0
SP6	0.12	0.23	0.93	0	0.23	49.60
SP7	0	0.07	0.08	0	0	0
SP8	0	0	0.17	0	0.18	0
SP9	0	0.10	0.12	0	0.23	0
SP10	0	0	0.09	0.10	1.55	0
SP11	0	0	0	0	0.55	0
SP12	0	0.07	0.05	0	0.72	0
SP13	0	0	0	0	0	0
SP14	0	0.11	0.31	0	1.66	0
SP15	0	0	0	0	0	0
SP16	0	0	0.07	0	0.12	0
SP17	0	0	0.71	0	0	0
SP18	0	0	0	0	0.10	0
SP19	0	0.10	0	0	0	0
SP20	0	0.15	0	0	0.09	0
SP21	0	0	0	0	0	0
SP22	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SP23	0	0.08	0	0	0.08	16.74

In blue: Polyposis selected cases; In grey background: the rest of hereditary selected cases; in red: sporadic selected cases, (dark) without *KRAS* mutation; (light) with a *KRAS* mutation enrichment.

TableS2. Description of samples

A. Polyposis samples

	Patient		Colectomy				Collected samples			Collected crypts											
	Sex	Age	Sample	Tumor	Local.	Grade	Size (cm)	TNM	Ad	Samples	Crypts	Region 1		Region 2		Region 3					
												Ad1	Ad2	Ad3	N	Ad1	N	Ad1	N	Ad2	Ad3
POLY1 (FAP)	M	19	total	No	-	-	-	>150	3 Ad	40	40	10	10	10	10	10	10				
POLY2 (MAP)	F	46	subtotal	No	-	-	-	80-90	3 Ad	90	90	10	10	20	20	10	20				
POLY3	M	54	total	Yes	Transv.	low	2.6	pT2 pN0	4 ad	107	107	10	10	20	12	20	10	11	20		
POLY4	M	48	total	No	-	-	-	120	6 ad	122	122	10	10	10	10	20	10	4	10	8	20
Total isolated crypts										359											

B. The rest of hereditary samples

	Patient		Colectomy				Crypts collected					
	Sex	Age	Sample	Local	Grade	Size (cm)	TNM	Lesion	Crypts	Lesion	Proximal normal	Distal normal
Lynch	F	51	Total	left	high	5.5	pT2 N0 mx/R0	Adenocarcinoma	30	10		20
CMRD	F	44	Total	-	-	-	-	Polyp	26	10	8	8
Total isolated crypts									56			

C Mutations of hereditary cases

Cases	Germline mutation detected	Pathogenicity	Description of molecular alterations
POLY1	<i>APC</i>	Pathogenic mutation	c.1262_1263deGGInsAA; p.Trp421X
POLY2	<i>MUTYH</i>	Pathogenic mutation	Mutation c.[494A>G]_[494A>G]; p.[Tyr165Cys]+[Tyr165Cys]
POLY3	<i>APC</i> and <i>MUTYH</i>	Non pathogenic mutation	Alteracions detected at the same allele: c.[1145G>A;c.248G>A]; p.[Gly382Asp;Arg83Gln]. G382D is a variant with functional effects since increases the transversions G:C->T:A frequency. R83Q variant is conserved in primates (Leiden)
POLY4	<i>APC</i> and <i>MUTYH</i>	Non pathogenic mutation	There was no alteration detected
Lynch	<i>MLH1</i>	Pathogenic mutation	<i>MLH1</i> Spanish founder mutation (c.306+5G>A)
CMRD	<i>PMS2</i>	Pathogenic mutation	Biallelic <i>PMS2</i> mutation [c.24-2A>G];[c.24-2A>G] and a VSD [c.1688G>T];[c.1688G>T]

A. Sporadic samples

Patient	Colectomy				Crypts collected				
	Sex	Age	Localization	Adenocarcinoma grade	Size (cm)	PTN	Adenocarcinoma	Normal mucosa	Total
SP1	F	67	left	low	3.5	pT3ab N1	10	20	30
SP2	M	73	right	low	5	pT3ab N2 Mx/RO	10	20	30
SP3	M	72	right	high	6	pT3cd (2) NO Mx/RO	10	20	30
SP4	F	83	right	low	6	pT2 NO Mx/RO	10	20	30
SP5	M	75	right	high	9.5	pT2 NO Mx/RO	10	20	30
SP6	M	75	right	low	6.5	pT3 NO Mx/RO	10	20	30
SP7	F	73	left	low	-	pT3ab pN0	10	20	30
SP8	M	86	right	high	5	pT4b pN0	10	20	30
SP9	M	77	left	low	-	pT3cd N1	10	20	30
SP10	M	57	right	high	7.5	pT3cd N2	10	20	30
SP11	M	77	right	low	-	pT3 PNO	10	20	30
SP12	M	46	right	high	5.5	pT3cd N2 M1	10	20	30
SP13	M	57	left	low	3.7	pT2 NO	10	20	30
SP14	M	63	left	low	4.2	pT2 NO	10	20	30
SP15	M	77	left	low	3.1	pT3ab pN0	10	20	30
SP16	M	59	right	low	5	pT2 (2) NO Mx/RO	10	20	30
SP17	F	86	right	high	7	pT4b pNO Mx/RO	10	20	30
SP18	F	51	left	low	4.2	pT3 NO Mx/RO	10	20	30
SP19	M	79	left	low	6.5	pT4b pNO Mx/RO	10	20	30
SP20	F	61	right	low	3.6	pT2 NO Mx/RO	10	20	30
SP21	F	74	right	low	4	pT4b pN1 Mx/RO	10	20	30
SP22	F	55	left	low	4	pT3cd N2 M1/RO	10	20	30
SP23	M	73	right	low	4.5	pT4b pNO Mx/RO	10	20	30
Total isolated crypts									690

Selected cases are highlighted in grey

Table S3. Primers and probes

	Forward	Reverse	Probe
MCR APC study			
APC 15 E-H	5'-AGT CTT AAA TAT TCA GAT GAG CAG-3'	5'-TAT CAG CAT CTG GAA GAA CCT-3'	
APC 15 F2	5'-ATT CCT TCA TCA CAG AAA CAG T-3'	5'-AGC TGA TGA CAA AGA TGA TAA TG-3'	
APC 15 GH	5'-AAG AAA CAA TAC AGA CTT ATT GT-3'	5'-TAT CAG CAT CTG GAA GAA CCT-3'	
APC 15 H	5'-ATC TCC CTC CAA AAG TGG TGC-3'	5'-TAT CAG CAT CTG GAA GAA CCT-3'	
LOH study			
D5S299	5'-GTAAGCAGGACAA GATGACAG-3'	5'-GCTATTCTCTCAGGATCTTG-3'	
D5S82	5'-CCCAATTGTATAGATTTAGAAAGTC-3'	5'-ATCAGAGTATCAGAATTTCT-3'	
D5S346	5'-ACTCACTTAGTGATAAATCGGG-3'	5'-AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT-3'	
Exon 11	5'-GGGACTACAGGCCATTGCA-3'	5'-CAAGTTTGTCAAGGCCATTCAGC-3'	
rs2229992 SNP	5'-ATTGCAAGTGGACTGTGAAATGTA-3'		
KRAS study			
KRAS Exon2 ext.	5'-GGTGGAGTATTTGATAGTGA-3'	5'-ATGGTCCTGCACCAGTAATATGCA-3'	
TaqMan KRAS primers	5'-GCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACT-3'	5'-GCTGTATCGTCAAGGCACTCTT-3'	
wt KRAS probe			5'-TTGGAGCTGGTGGCGTA-3'
G12A probe			5'-TTGGAGCTGCTGGCGTA-3'
G12C probe			5'-TTGGAGCTTGTGGCGTA-3'
G12D probe			5'-TTGGAGCTGATGGCGTA-3'
G12R probe			5'-TTGGAGCTCGTGGCGTA-3'
G12S probe			5'-TTGGAGCTAGTGGCGTA-3'
G12V probe			5'-TTGGAGCTGTTGGCGTA-3'
G13D probe			5'-CTGGT GAC GTAGGCAAG-3'
BRAF study			
BRAF V600E ext	5'-TAATGCTTGCTCTGATAGAAAAAT-3'	5'-ATAGCCTCAATTTACCAT-3'	
TaqMan BRAF primers	5'-CATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGAT-3'	5'-TGGACCCACTCCATCGA-3'	
wt BRAF probe			5'-CTAGCTACAGT G AAATC-3'
BRAF Probe			5'-TAGCTACA GAG AAATC-3'

Table S4. Analytical sensibility to detect *KRAS* and *BRAF* mutations by Light Cycler® 480 (Roche) and dynamic array (Fluidigm)

	<i>G12A</i>	<i>G12C</i>	<i>G12D</i>	<i>G12R</i>	<i>G12S</i>	<i>G12V</i>	<i>G13D</i>	<i>BRAF</i>
Light Cycler® 480	5	10	5	10	10	10	5	5
Dynamic array	5	10	5	5	5	10	12.5	5

Table S5. The remaining hereditary cases results

A. APC results

	Biopsy			Crypts		
	Mutation spectrum	Number of mutated areas	LOH	Mutated crypts	Cell populations	Mutation dosage
LS	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>MLH1</i>	WT	0/1	Non informative	0/10	WT	WT
CMRD	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>PMS2</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ad	WT	0/1	Non informative	0/10	WT	WT

B. KRAF/BRAF results

		KRAS					BRAF			
		Biopsy		Crypts			Biopsy		Crypts	
		Mutational load	Whole section	Mutated crypts	% of mutations per crypt	Crypts for mutation pattern	Spectrum of mutations	Mutational load	Mutated crypts	% of mutations in a whole tested crypt
LS	N	ND	ND	0/20	WT	-	-	ND	0/20	WT
MLH1	T	23%	G13D(23%), G12D(0.3%), G12S(0.1%)	8/10 (80%)	8-16%	7	G13D	WT	0/20	WT
CMRD	Distal N	ND	ND	0/8	WT	-	-	ND	0/8	WT
PMS2	Proximal N	ND	ND	0/8	WT	-	-	ND	0/8	WT
	Ad	0.1%	G12S	1/10 (10%)	19%	1	10%S, 9%V	WT	0/10	WT

LEGENDS OF SUPPORTING FIGURES

Figure S1. Isolated crypts from hereditary and sporadic cases. (A) Four crypts from FAP case are shown; three from adenomas and two from normal mucosa. (B) Six crypts from MAP; three from adenomas and three from normal mucosa. (C) One crypt from adenoma and one from mucosa of SP4-case are depicted. (D) Two crypts, each one from adenoma and normal mucosa, of SP6 case are depicted. Ad, Adenoma; N, normal mucosa; T, adenocarcinoma.

Figure S2. Quantitative genotyping of KRAS mutations using Whole genome amplification (WGA) DNA or pre-amplification using a nested PCR strategy. (A) Reconstitution experiment of genotyping by allelic discrimination using TaQman probes in serial dilutions of G12V KRAS mutation. (B) Genotyping using WGA DNA and (C) after 15 cycles of external amplification. Quantitative analysis is only possible using 15 cycles of external PCR. WT, wild type sample.

Figure S3. Analytical sensitivity of KRAS genotyping by Light Cycler® 480 and by digital array (Fluidigm) using pre-amplified products. (A) The amplification curves of each serial dilution for the wild type probe (top) or by G12V KRAS mutant probe (bottom). (B) Analysis by digital array displaying a total of 770 amplification curves for wild type (on the left) and mutant (on the right) probes. Accurate quantitation of the mutant alleles is possible the pre-amplification process. *0.5%, 0.1%, 0.05%, 0.01%.

Figure S4. Standard curve for quantitative mutation analysis for (A) Light Cycler® 480 (Roche) and (B) nanofluidic PCR using dynamic array (Fluidigm). On the left, the genotyping scatter plot. In the middle standard curves for the depicted probe. On the right, the expected and obtained mutant frequencies for each serial dilution are shown.

Figure S5. Analysis of KRAS/BRAF amplicons of hereditary cases using external PCR. Study of amplicons from (A) FAP case, (B) MAP case, (C) POLY3, (D) POLY4 and (E) the MMR deficient cases. C+, positive control of mutation; C-, negative control; H2Os/NA, different waters and non-amplified products.

Figure S6. Analysis of KRAS/BRAF amplicons of sporadic cases using external PCR. Study of amplicons from (A) SP-1 case, (B) SP-2 case, (C) SP-3 case, (D) SP-4 case, (E) SP-5 case and (F) SP-6 case. C+, positive control of mutation; C-, negative control; H2Os/NA, different waters and non-amplified products.

Figure S7. Analysis of SP-5 case. (A) APC MCR study. The dominant mutation was detected in all sections analyzed as well as in 4 tumor crypts. Mutation dosage varied among crypts and in one crypt was accompanied with an additional mutation. Furthermore, in one crypt was detected an additional mutation. (B) KRAS/BRAF study. (i) G12D KRAS mutation was selected. The percentage of each KRAS/BRAF mutation as assessed by digital PCR is shown. (ii) HCA study revealed 6 metapopulations, associated to the presence of BRAF mutation in normal colon. The color code at the bottom box represents each KRAS/BRAF mutation. N, normal mucosa, T, adenocarcinoma.

Figure S8. Analysis of SP-4 case. (A) APC MCR study. The MCR analysis displayed the presence of a selected mutation in the biopsy sections, and this mutation was observed in all crypts in different dosages. An additional mutation was observed in a crypt. Of note, the selected alteration was observed in different dosages. (B) KRAS/BRAF study. (i) G12D KRAS mutation was selected. The

percentage of each *KRAS/BRAF* mutation as assessed by digital PCR is shown. **(ii)** HCA identified 5 metapopulations: 1 WT, 1 *BRAF* mutant and 3 sharing a similar *KRAS* mutational pattern. The color code at the bottom box represents each *KRAS/BRAF* mutation. N, normal mucosa, T, adenocarcinoma.

Figure S9. Analysis of SP-2 case. (A) APC MCR study. In the biopsy sections, a dominant *APC* mutation was selected for in all areas analyzed and in 4 crypts in different dosages. **(B) KRAS/BRAF study. (i)** Three *KRAS* mutations (G12A, G12D, G12V) were detected in the biopsy. The percentage of each *KRAS/BRAF* mutation as assessed by digital PCR is shown. **(ii)** HCA identified 5 metapopulations; 1 WT, 1 *BRAF* mutant and 3 sharing a similar *KRAS* mutational pattern. The color code at the bottom box represents each *KRAS/BRAF* mutation. N, normal mucosa, T, adenocarcinoma.

Figure S10. Analysis of SP-3 case. (A) APC MCR study. The MCR analysis displayed the presence of a selected mutation in the biopsy sections, and was also observed in 3 crypts in different dosages. **(B) KRAS/BRAF study. (i)** In the biopsy, three *KRAS* mutations (G12C, G12S, G13D) were detected. The percentage of each *KRAS/BRAF* mutation as assessed by digital PCR is shown. **(ii)** The HCA study showed 8 metapopulations sharing a common *KRAS* mutant pattern associated to adenocarcinoma crypts. *BRAF* mutation was also observed in normal and adenocarcinoma crypts. The color code at the bottom box represents each *KRAS/BRAF* mutation. N, normal mucosa, T, adenocarcinoma.

Figure S11. SP-1 case. (A) APC MCR study. The MCR analysis displayed the presence of a selected mutation in biopsy sections, and was also observed in 4 crypts in different dosages. **(B) KRAS/BRAF study. (i)** No *KRAS* mutation was selected. The percentage of each *KRAS/BRAF* mutation as assessed by digital PCR is shown. **(ii)** The HCA study showed 2 metapopulations that correspond with wild type crypts and population (3 crypts) with very low *BRAF* mutation. The color code at the bottom box represents each *KRAS/BRAF* mutation. N, normal mucosa, T, adenocarcinoma.

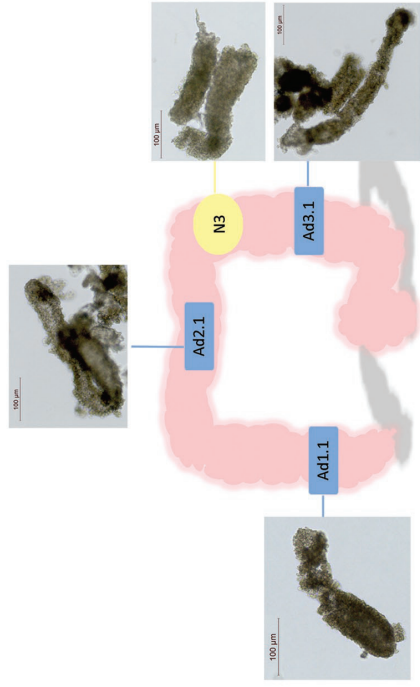
Figure S12. APC/MUTYH(-) polyposis 3 case. (A) APC MCR study. No pathogenic mutations were detected in the MCR in the biopsy. Only one *APC* silent mutation was observed in another crypt. **(B) KRAS/BRAF study. (i)** The results showed the absence of the selected mutation in the biopsy. The percentage of each *KRAS/BRAF* mutation as assessed by digital PCR is shown. **(ii)** HCA showed 11 metapopulations homogeneously distributed throughout the colon. Up to 20% of the crypts harbored transversions (G12V and *BRAF*). The color code at the bottom box represents each *KRAS/BRAF* mutation. N, normal mucosa, T, adenocarcinoma.

Figure S13. LS case. (A) APC MCR study. No pathogenic mutations were detected in the MCR. **(B) KRAS/BRAF study. (i)** G13D *KRAS* mutation was detected in the biopsy. The percentage of each *KRAS/BRAF* mutation as assessed by digital PCR is shown. **(ii)** HCA depicted 5 metapopulations; 4 of them mutant crypts from adenocarcinoma. The color code at the bottom box represents each *KRAS/BRAF* mutation. N, normal mucosa, T, adenocarcinoma.

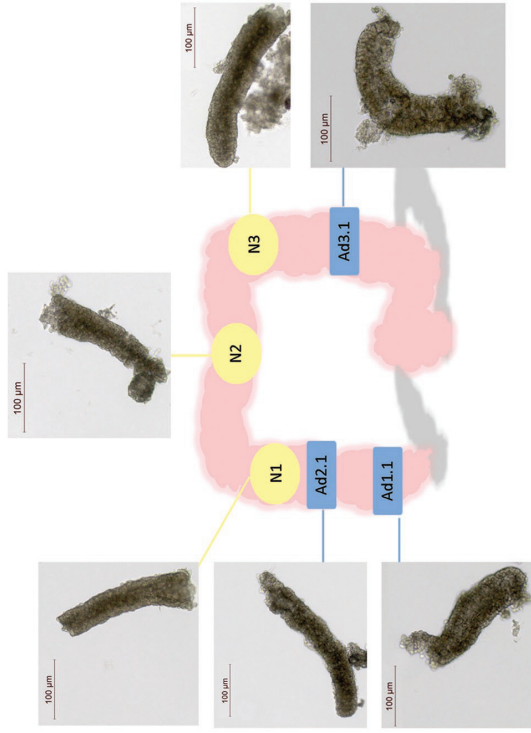
Figure S14. CMRD case. (A) APC MCR study. No pathogenic mutations were detected in the MCR. **(B) KRAS/BRAF study. (i)** G13D *KRAS* mutation was detected in the biopsy. The percentage of each *KRAS/BRAF* mutation as assessed by digital PCR is shown. **(ii)** The HCA study showed the presence of one *KRAS* mutant crypt from the adenoma. The color code at the bottom box represents each *KRAS/BRAF* mutation. N, normal mucosa, T, adenocarcinoma.

Figure S1

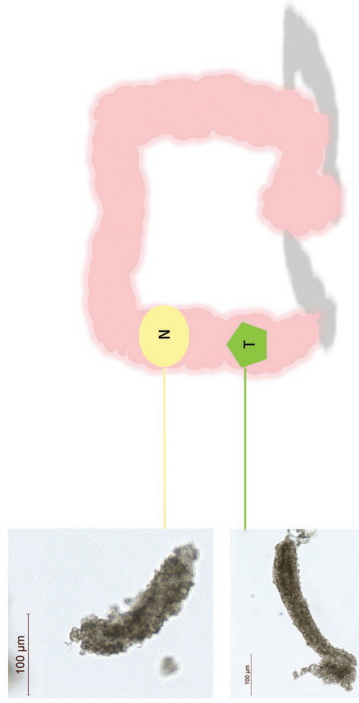
A



B



C



D

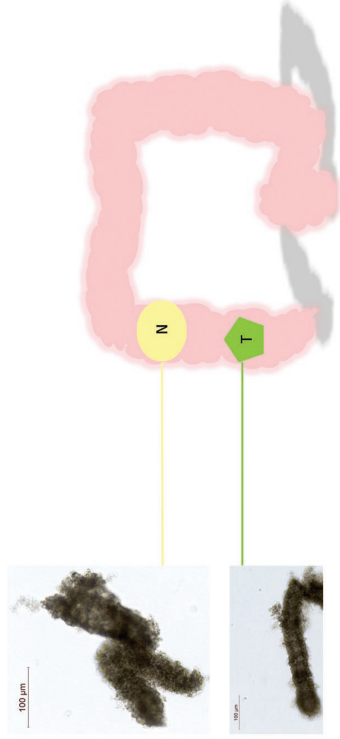
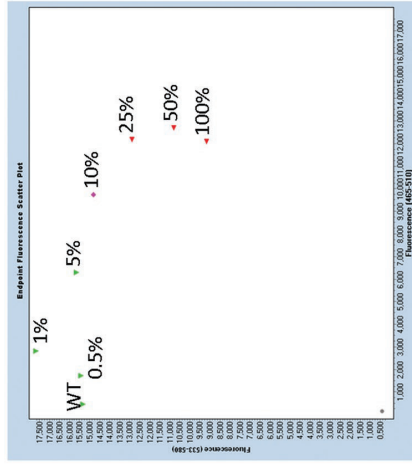
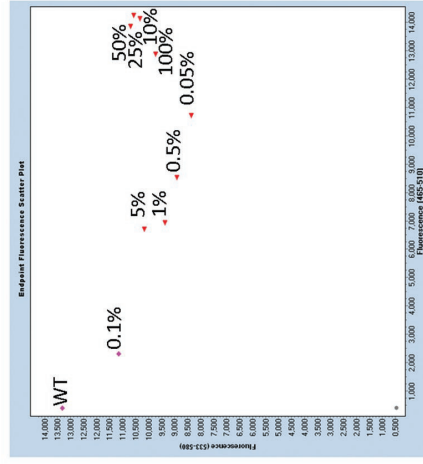


Figure S2

A



B



C

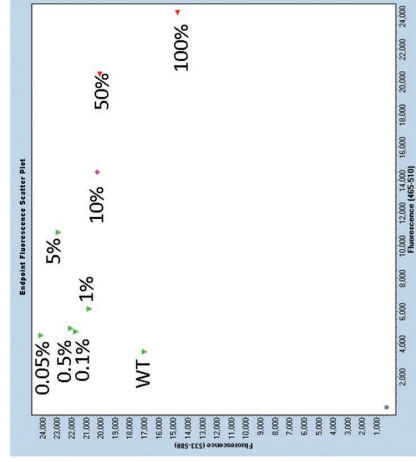
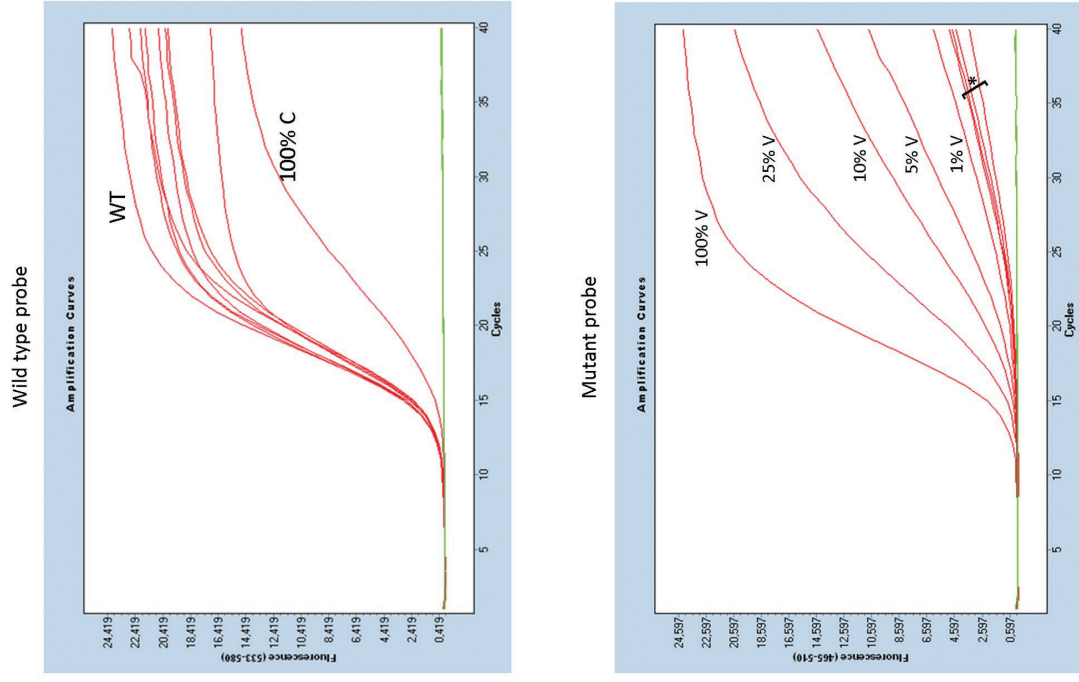


Figure S3

A



B

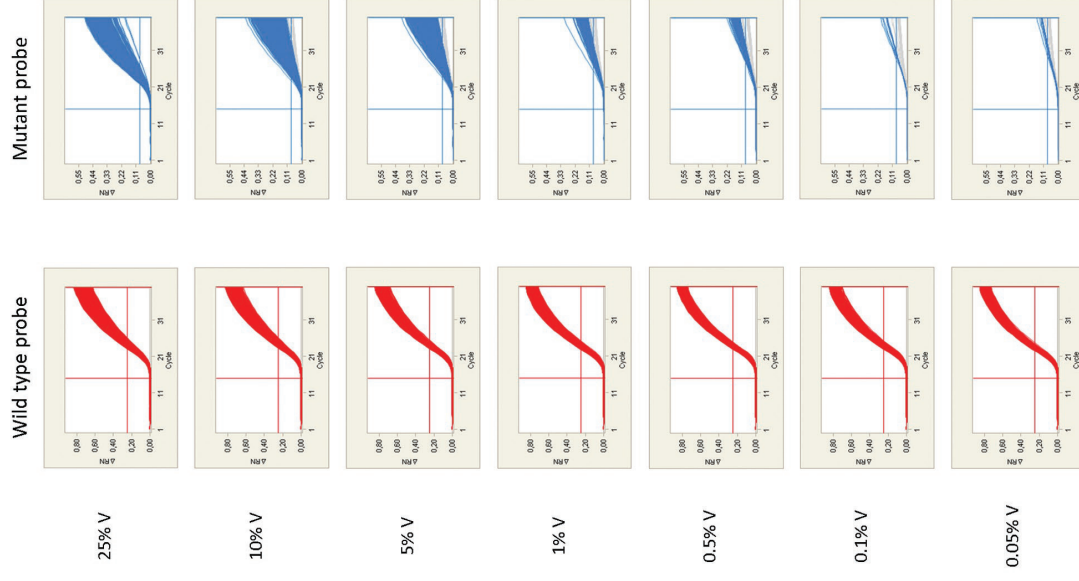
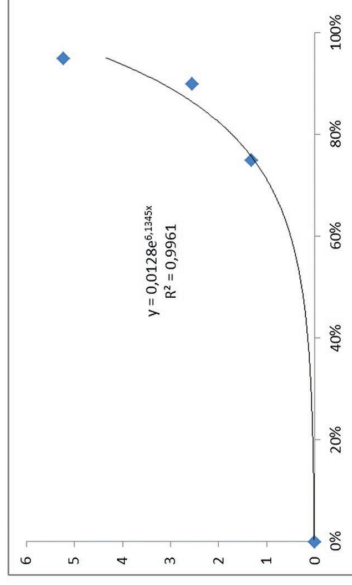
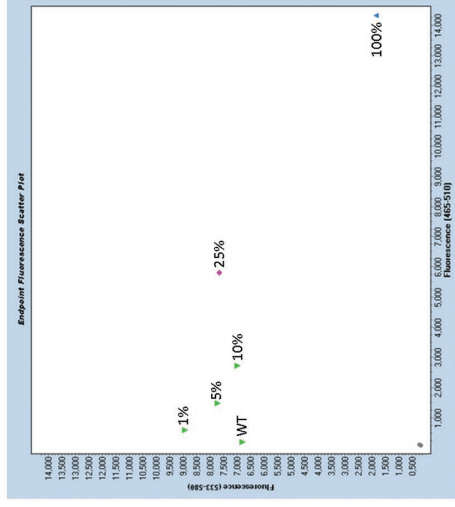


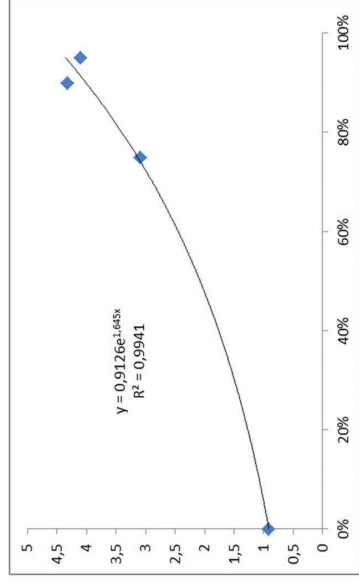
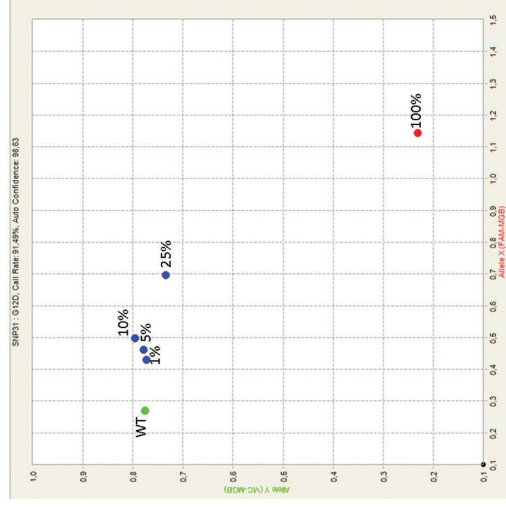
Figure S4

A



Mutant Frequency (%)	
Expected	Obtained
0	0
1	0
5	2
10	13.7
25	24.5
100	100

B



Mutant Frequency (%)	
Expected	Obtained
0	0
1	3.2
5	8.7
10	5.5
25	25.8
100	100

Figure S5



Figure S6

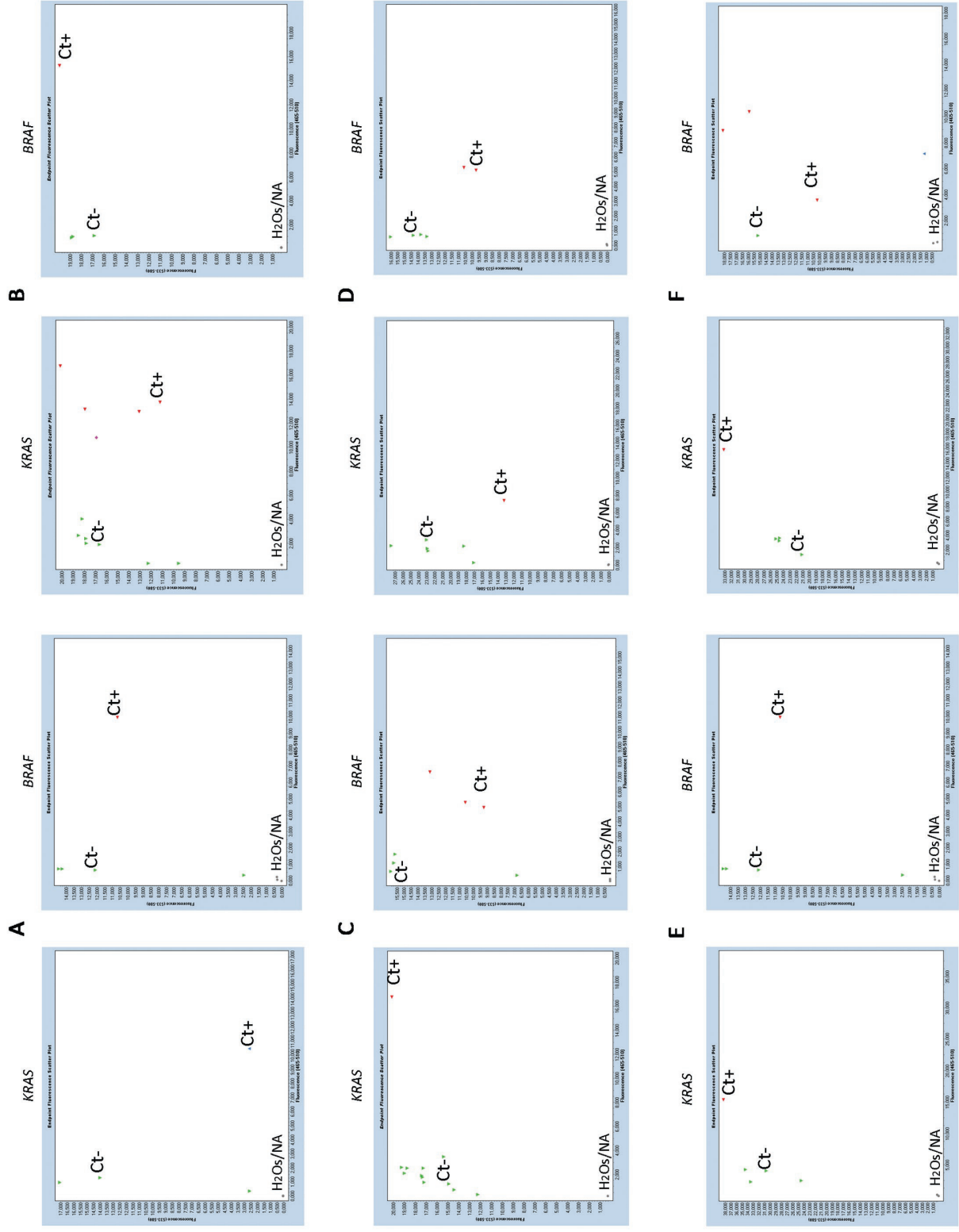
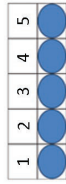


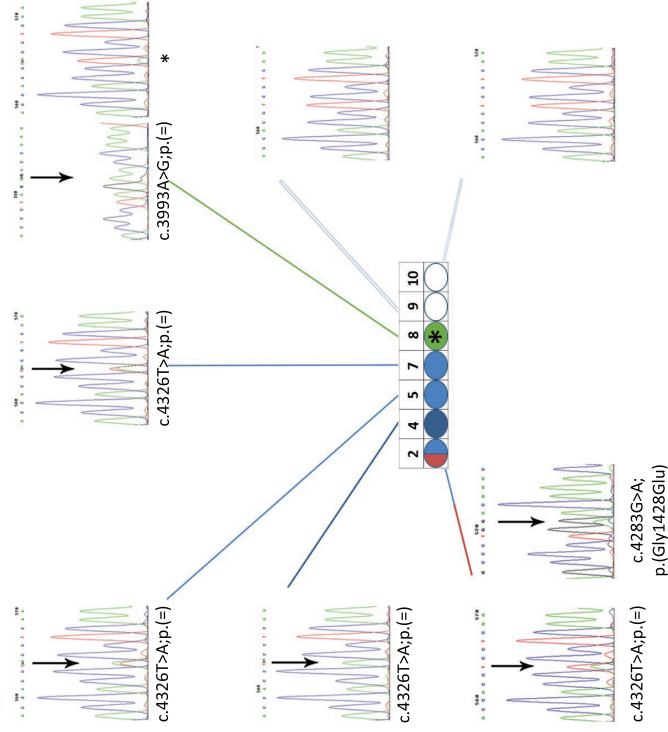
Figure S7. SP5

A. APC study

Biopsy sections

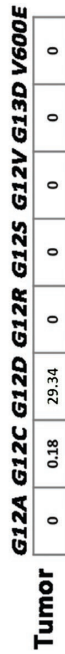


Crypts



B. KRAS/BRAF study

i. Biopsy analysis by digital PCR



ii. Metapopulation study by HCA

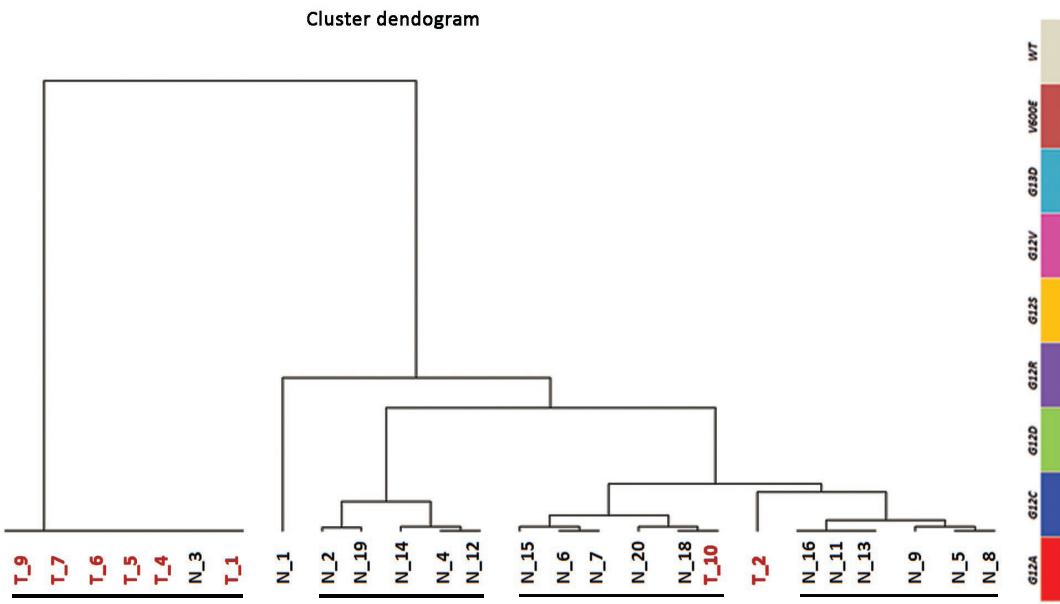
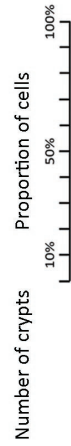
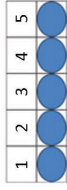


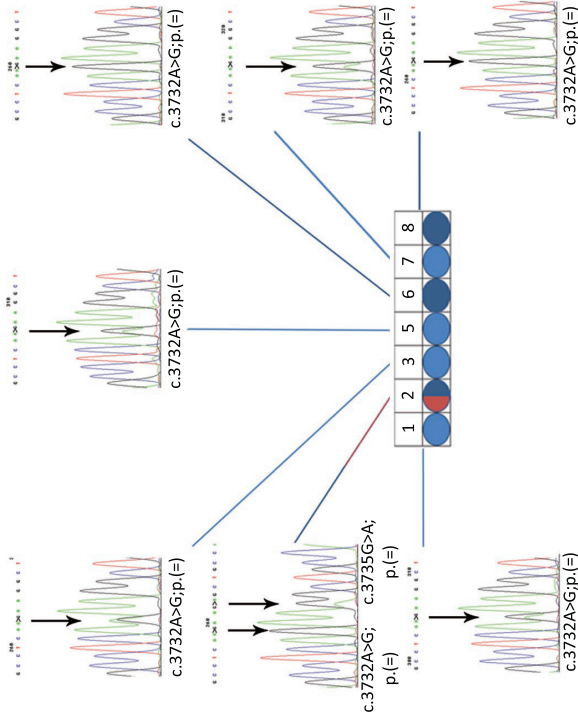
Figure S8. SP4

A. APC MCR study

Biopsy sections



Crypts



B. KRAS/BRAF study

i. Biopsy analysis by digital PCR

G12A G12C G12D G12R G12S G12V G13D V600E

Tumor	0	0	0	43.98	0	0.41	0	0	0	0
--------------	---	---	---	-------	---	------	---	---	---	---

ii. Metapopulation study by HCA

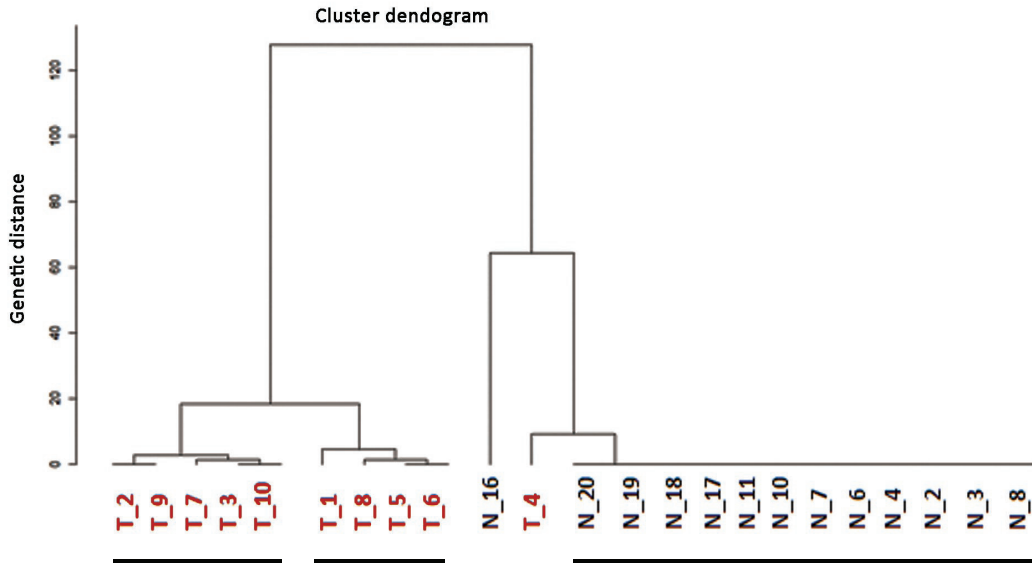
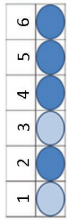


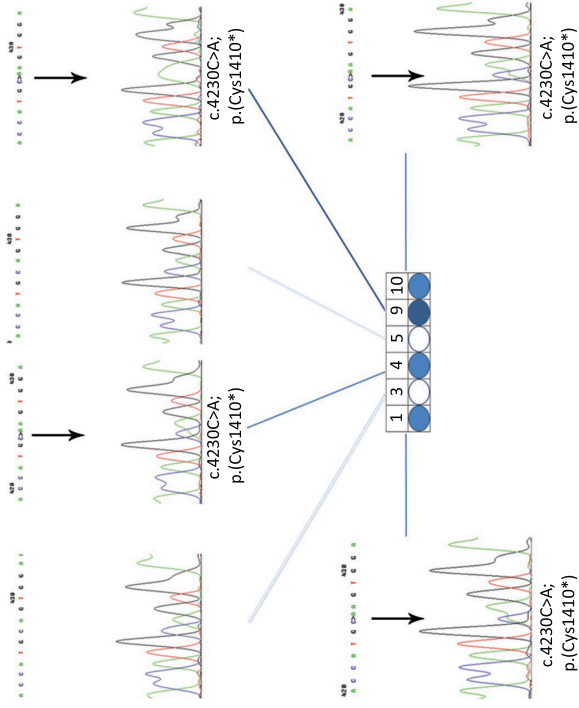
Figure S9. SP2

A. APC MCR study

Biopsy sections



Crypts



B. KRAS/BRAF study

i. Biopsy analysis by digital PCR

G12A G12C G12D G12R G12S G12V G13D V600E

Tumor	28.52	0	32.10	0	0.13	29.73	0.79	0
--------------	-------	---	-------	---	------	-------	------	---

ii. Metapopulation study by HCA

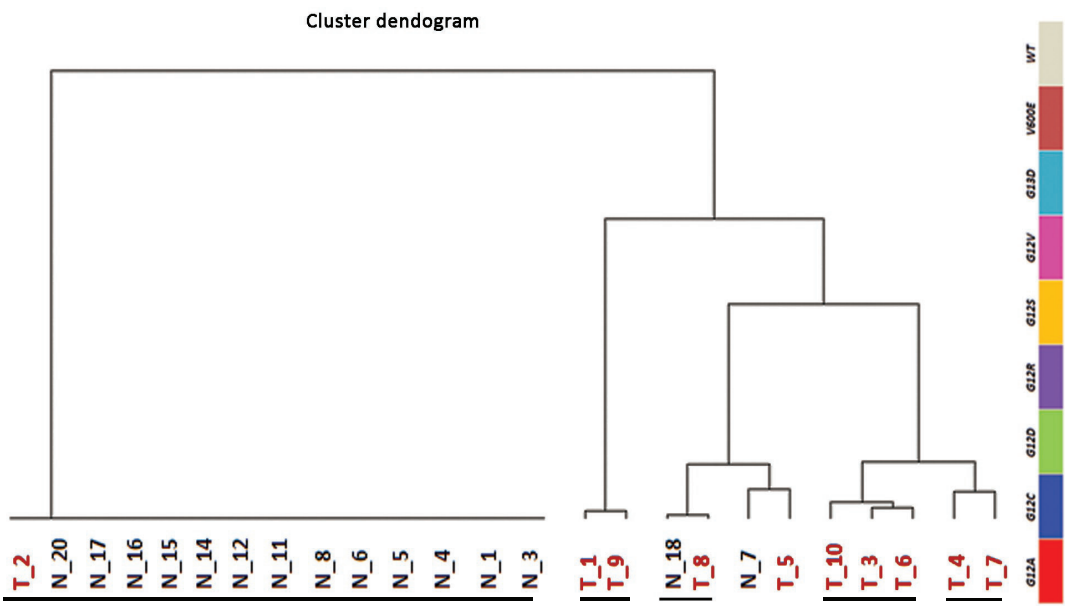
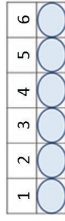
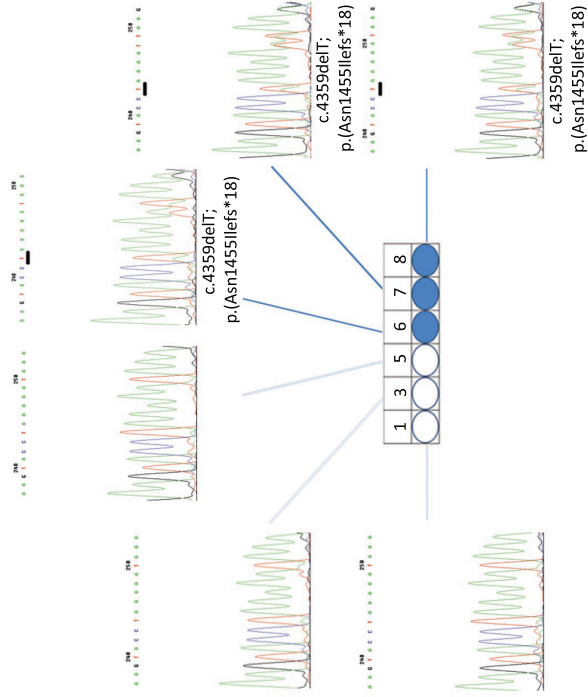


Figure S10. SP3
A. APC MCR study

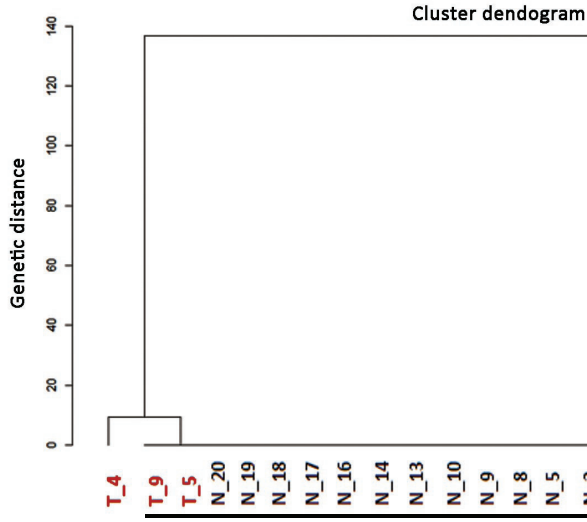
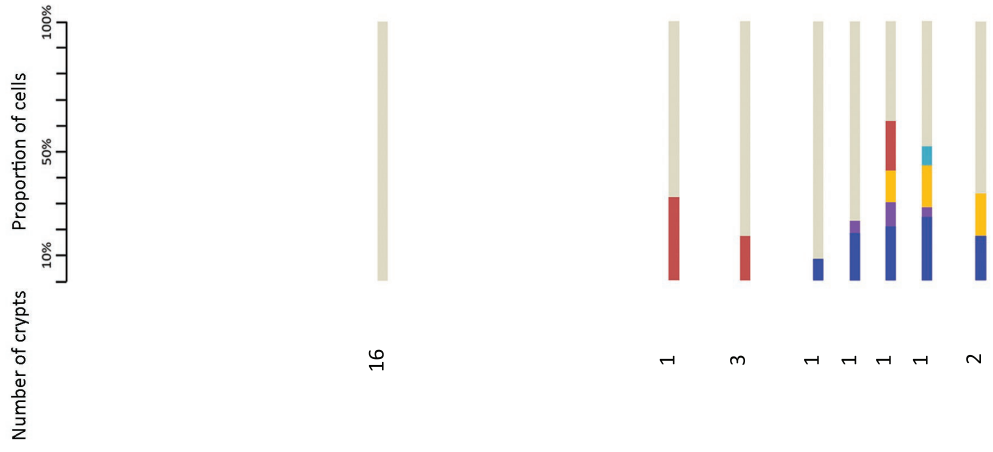
Biopsy sections



Crypts



ii. Metapopulation study by HCA



B. KRAS/BRAF study

i. Biopsy analysis by digital PCR

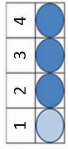
G12A G12C G12D G12R G12S G12V G13D V600E

Tumor	0	35.90	0.19	0.18	36.76	0	4.01	0
--------------	---	-------	------	------	-------	---	------	---

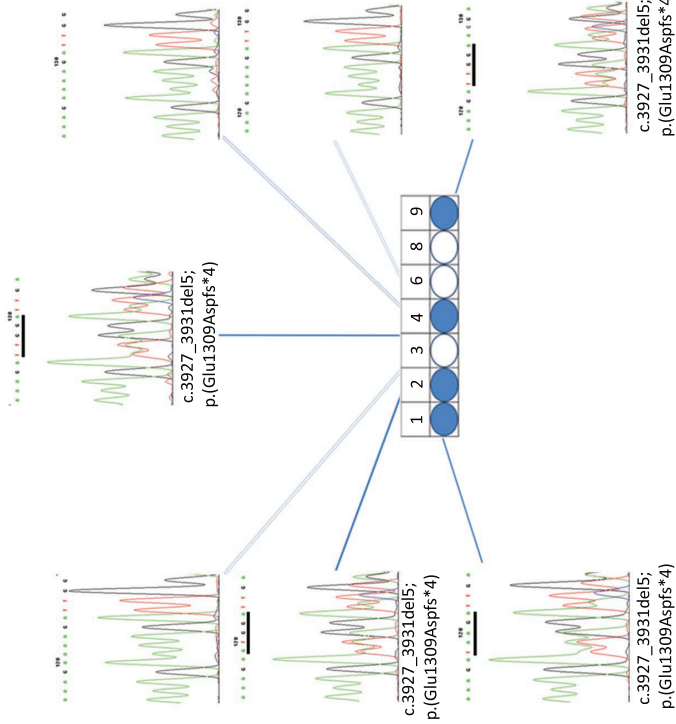
Figure S11. SP1

A. APC MCR study

Biopsy sections



Crypts



B. KRAS/BRAF study

i. Biopsy analysis by digital PCR

G12A G12C G12D G12R G12S G12V G13D G13D V600E

Tumor	0	0	0	0	0	0	0.06	0	0.09	0

ii. Metapopulation study by HCA



21

3

Cluster dendrogram

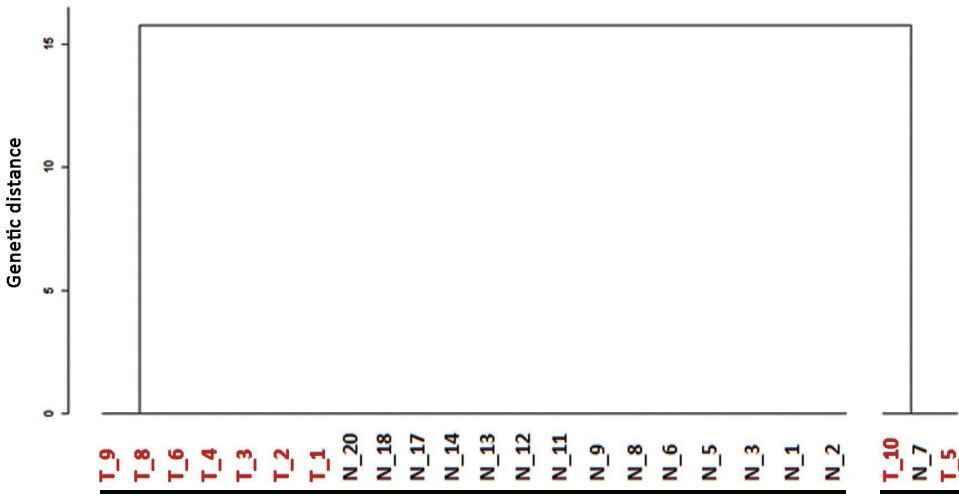
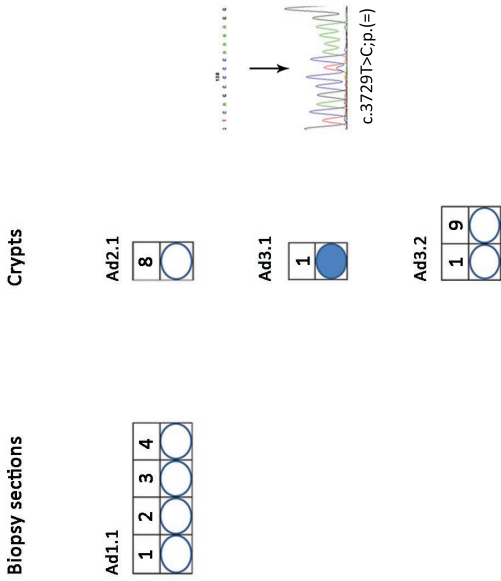
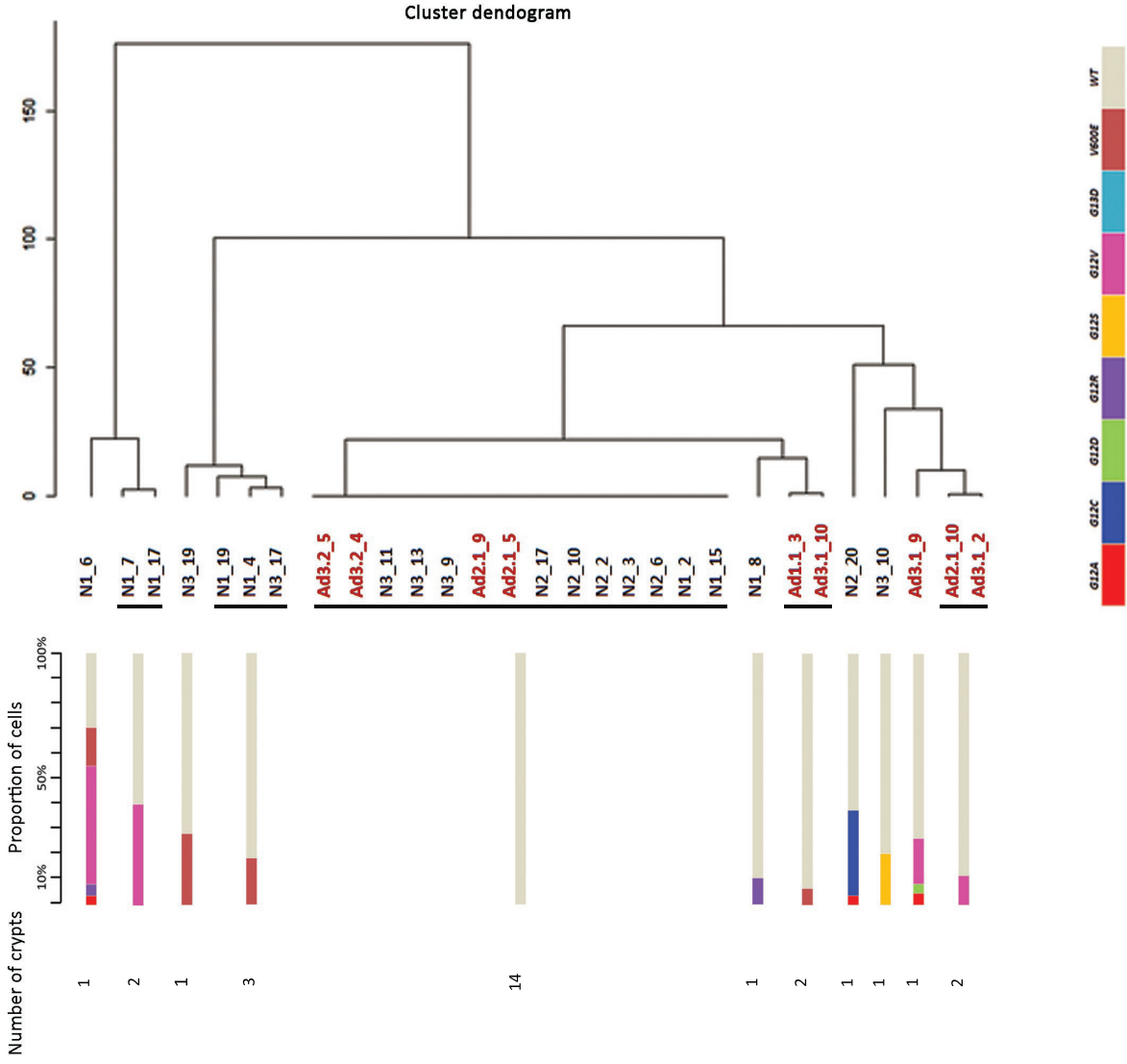


Figure S12. POLY3

A. APC/MCR study



ii. Metapopulation study by HCA



B. KRAS/BRAF study

i. Biopsy analysis by digital PCR

	G12A	G12C	G12D	G12R	G12S	G12V	G13D	V600E	WT
Ad1.1	0	0	0.08	0	0.08	0	0	0	0

Figure S13. Lynch case

A. APC MCR study



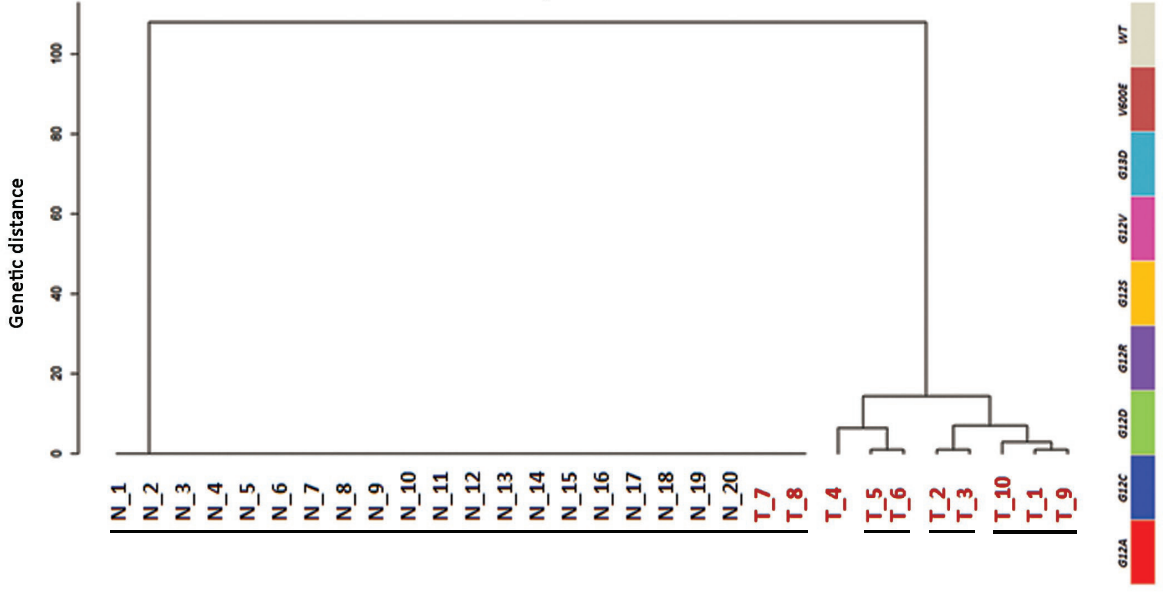
Biopsy sections



Crypts



ii. Metapopulation study by HCA



22

1
2
2
3

B. KRAS/BRAF study

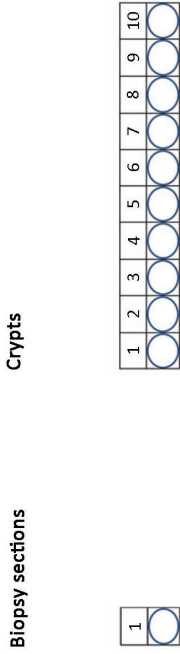
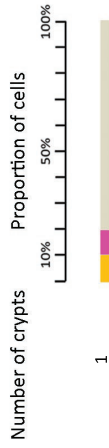
i. Biopsy analysis by digital PCR

	G12A	G12C	G12D	G12R	G12S	G12V	G13D	V600E	WT
Tumor	0	0	0.29	0	0.13	0	22.60	0	0

G12A G12C G12D G12R G12S G12V G13D V600E

Figure S14. CMRD case

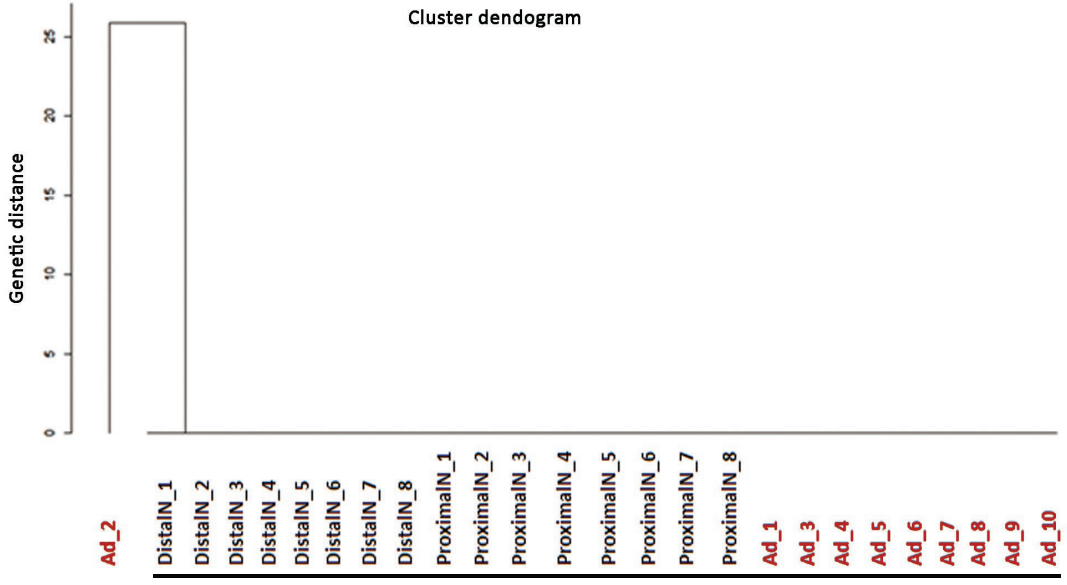
A. APC MCR study



B. KRAS/BRAF study

i. Biopsy analysis by digital PCR

	G12A	G12C	G12D	G12R	G12S	G12V	G13D	V600E
Adenoma	0	0	0	0	0.09	0	0	0



DISCUSSIÓ

VALIDACIÓ I ESTUDI DEL COST-EFECTIVITAT DE LA DETERMINACIÓ DE LA HIPERMETILACIÓ DEL PROMOTOR DEL GEN *MLH1*

En iniciar aquesta tesi el primer projecte en el que vaig treballar va ser la comparació de l'article de la mutació de *BRAF* V600E i de la hipermetilació del promotor d'*MLH1* per a millorar l'algoritme del diagnòstic molecular de la LS.

L'heterogeneïtat genètica i la baixa prevalença de les alteracions hereditàries ha fet, fins la irrupció del NGS, que sigui altament costós estudiar de forma universal l'estat mutacional dels gens MMR a nivell germinal, en tots els casos on hi ha una sospita de patir LS, basat en la determinació de la presència de MSI o de pèrdua d'expressió de proteïnes reparadores en mostres tumorals. El fet de que no siguin tests altament sensibles per la identificació de la LS ha implicat que s'hagin proposat altres estratègies alternatives, com són l'estudi de la mutació de *BRAF* V600E i la hipermetilació del promotor d'*MLH1*, que permetin delimitar millor la població candidata a estudi dels gens en línia germinal. Aquestes dues alteracions moleculars s'han associat íntimament amb l'origen esporàdic del subgrup de tumors pendents i teòricament permetrien delimitar millor els candidats a estudi en línia germinal.

Amb l'objectiu de determinar quina de les dues tècniques era la més adient per a la seva implementació en l'algoritme diagnòstic era indispensable conèixer la variabilitat, sensibilitat, especificitat i fer un estudi de cost-efectivitat de cada variable considerada. Si restringim l'anàlisi als casos de la sèrie amb sospita de ser LS que presenten MSI i pèrdua d'expressió d'*MLH1* (n=71), s'observa que la manca de mutació de *BRAF* té una sensibilitat analítica de 96% (23/24) i una especificitat de 28% (13/47) en detectar casos amb mutació germinal a *MLH1*. Fent la comparació amb les sèries descrites fins el moment de la publicació, el valor de la sensibilitat està en la línia del descrit, mentre que, la especificitat era significativament més baixa (Bessa, et al., 2008; Julie, et al., 2008; Bouzourene, et al., 2010; Perez-Carbonell, et al., 2010) (article 1, taula 3 i taula del material suplementari 5). Aquesta diferència en la especificitat, es pot explicar per dos motius. En primer lloc, la prevalença de la mutació de *BRAF* en la nostra sèrie és baixa comparada amb la majoria de les reportades, detectant-se en un 11% del casos amb MSI i en un 20% dels casos amb pèrdua d'expressió d'*MLH1* (Bessa, et al., 2008; Julie, et al., 2008; Bouzourene, et al., 2010; Perez-Carbonell, et al., 2010). Aquest fet, probablement, és un reflex de la pròpia experiència dels centres de referència (Perez-Carbonell, et al., 2010). Per una altra banda, en la nostra sèrie hi ha una proporció equilibrada del nombre de LS amb mutació germinal d'*MLH1* que afavoreix un millor

ajust de les estimacions. S'han reportat altres sèries *a posteriori* que han servit per avaluar concretament la contribució de l'anàlisi de la mutació de *BRAF* (Jin, et al., 2013; Thiel, et al., 2013) i també per validar la implementació de l'anàlisi de la IHC com a marcador indirecte de mutació *BRAF* (Thiel, et al., 2013; Toon, et al., 2013). Cal destacar però, que en aquests estudis no es va dur a terme l'anàlisi a nivell germinal de totes les mostres considerades independentment del resultat. Aquest fet, per tant, ens impossibilita l'anàlisi comparatiu de la sensibilitat i especificitat de les noves dades reportades.

Quan considerem l'estratègia de l'estudi de la manca d'hipermetilació somàtica del promotor d'*MHL1* per a seleccionar casos LS, tot i que la sensibilitat és la mateixa que en el cas anterior, l'especificitat incrementa fins al 66% (31/47). Una altra vegada s'observa una disminució en l'especificitat respecte el reportat (Domingo, et al., 2005; Julie, et al., 2008; Bouzourene, et al., 2010; Perez-Carbonell, et al., 2010) que es pot explicar també per la baixa prevalença de la hipermetilació en la nostra sèrie (42%), (article 1, taula 3 i taula del material suplementari 5). La variabilitat en el nombre de casos esporàdics amb hipermetilació en *MLH1* ve determinada per les diferències demogràfiques de les Unitats de Consell Genètic, per la tècnica utilitzada per l'estudi, i pel llindar analític establert per a determinar la presència o absència d'epimutació. Com en el cas anterior, en les sèries estudiades *a posteriori*, no s'analitzaren totes les mostres a nivell germinal, i, per tant, no es poden comparar els paràmetres analítics de sensibilitat i especificitat amb els de la nostra sèrie (Jin, et al., 2013; Thiel, et al., 2013; Toon, et al., 2013).

És important entendre com s'originen les alteracions moleculars. La literatura suggereix que la inactivació de l'expressió d'*MLH1* condueix cap a la fallida del sistema MMR, implicant la MSI que precedeix en el temps les alteracions moleculars subseqüents, com és la mutació en el gen *BRAF* (Imai i Yamamoto, 2008). Els nostres resultats recolzen aquesta afirmació doncs, totes les mostres que presenten *BRAF* mutat estan hipermetilades, fet que no succeeix a la inversa. Aquesta característica que també és comuna en la majoria de sèries (Julie, et al., 2008; Bouzourene, et al., 2010; Perez-Carbonell, et al., 2010; Jin, et al., 2013; Thiel, et al., 2013), reafirma l'estudi de la hipermetilació com a alternativa diagnòstica més precisa, reduint el nombre de falsos positius que es poden escapar quan *BRAF* és considerat com a mecanisme de preselecció en l'algoritme diagnòstic.

METODOLOGIA, SENSIBILITAT ANALÍTICA, VALIDACIÓ I ROBUSTESA

En el context del diagnòstic molecular la mostra de rutina de tumor d'un pacient que és sospita de patir LS és el teixit fixat en formol i inclòs en parafina (FFPE). Després de la inclusió en parafina, el DNA genòmic de la mostra es pot fragmentar, i aquest fet s'ha de tenir en compte en la implementació de les metodologies d'anàlisi. Per una altra banda, també cal considerar que les mutacions i epimutacions, poden estar diluïdes per la contaminació de cèl·lules no tumorals, i que, per aquesta raó, és important treballar amb metodologies amb una sensibilitat analítica elevada.

Metodologia per l'estudi de la mutació de *BRAF*

En el cas de l'estudi de la mutació V600E es va posar a punt la tècnica de l'SNuPE (single nucleotide primer extension analysis) usant el kit SNaPshot i es va comparar amb la més emprada en la bibliografia (*gold standard*), la seqüenciació convencional. La metodologia de l'SNuPE consisteix en un mètode basat en l'extensió d'un nucleòtid de primers específics, dissenyats de tal manera que acaben exactament en la posició 5' del la base que determina l'absència o presència de la mutació *BRAF* V600E. Aquesta tècnica ens permet discriminar a través de fluoròfors entre l'al·lel WT i el mutat. Mentre la seqüenciació només era capaç de detectar al·lells mutats a partir d'una proporció d'aproximadament el 20%, amb l'SNaPshot aconseguíem una sensibilitat analítica del 5%. Fent una revisió bibliogràfica, també s'han emprat altres metodologies altament sensibles, com la *Allele-specific PCR* (Loughrey, 2007) o bé la genotipació amb sondes TaqMan en la PCR quantitativa (Benlloch, et al., 2006; Perez-Carbonell, et al., 2010). En una sèrie consecutiva de CCR esporàdics, es va detectar la mutació de *BRAF* en proporcions comparables a les d'altres sèries. Mentre que la freqüència de la mutació de *BRAF* V600E a tumors MSS està per sota del 10% (Samowitz, et al., 2005; Roskoski, 2010; Thiel, et al., 2013; Toon, et al., 2013), el rang entre els tumors amb MSI varia de 13 a 78% (Samowitz, et al., 2005; Capper, et al., 2013; Thiel, et al., 2013; Toon, et al., 2013). Nosaltres ho hem detectat en el 20% dels tumors MSI analitzats.

Metodologia per l'estudi de la hipermetilació d'*MLH1*

Històricament, l'estudi epigenètic del promotor d'*MLH1* s'ha dut a terme per múltiples estratègies, però encara no hi ha cap que pugui ser considerada com la *gold standard*. No obstant això, s'han de tenir en compte certes consideracions clau per la tria d'una determinada metodologia. Primerament, el mètode molecular utilitzat necessita ser altament sensible, com hem comentat anteriorment i, en segon lloc, ha d'anar dirigit a l'estudi de les CpG de les regions C i D del

promotor d'*MLH1*, descrites per en Deng, que correlacionen directament amb el silenci transcripcional de l'expressió de la proteïna i que són menys susceptibles a la metilació associada amb l'edat o a la metilació inespecífica (Deng, et al., 2002b).

La majoria dels mètodes de detecció de metilació es basen en el tractament amb bisulfit sòdic del DNA genòmic, el qual després servirà com a mostra per les anàlisis basades en assajos de PCR. El bisulfit sòdic converteix les citosines sense metilar en uracils, i durant el procés d'amplificació de la PCR, aquestes es converteixen en timines, mentre que les citosines es mantenen com a tal. La seqüenciació de bisulfit identifica la metilació per la retenció de les citosines en els dinucleòtids CpG de les illes CpG del promotor. La PCR específica per metilació (MSP, *Methylation-specific PCR*) és l'estratègia més àmpliament utilitzada basada en el tractament amb bisulfit del DNA per a l'estudi d'un determinat locus. Breument, el DNA modificat amb bisulfit serveix com a motlle per a la amplificació amb PCR mitjançant l'ús de dos jocs diferents de primers específics per la seqüència metilada (MSP) i per la no metilada. Existeixen variacions quantitatives d'aquesta tècnica que es basen en la PCR en temps real i entre elles destaquem l'anàlisi de corbes de fusió sensible a la metilació (MS-MCA, *Methylation-specific melting curve analysis*). El MS-MCA és un mètode que empra un colorant fluorescent (normalment, el SYBR Green) que s'intercala en l'estructura secundària de la doble hèlix del DNA i que ens permet controlar les propietats de fusió dels productes amplificats per la PCR durant la MSP quan s'augmenta la temperatura. El DNA metilat subseqüent a la modificació amb bisulfit conté un major contingut de GC, pel que és més resistent a la fusió. L'estat de metilació d'una mostra desconeguda es determina llavors mitjançant la comparació del seu perfil de fusió amb els perfils de fusió dels controls, obtinguts de l'amplificació de molècules completament metilades i no metilades. Un altre exemple de metodologia basada en el DNA pretractat amb bisulfit és la piroseqüenciació, que és una tècnica de "seqüenciació per síntesi" en què el DNA modificat pel bisulfit s'amplifica usant el *primer* biotinitat i que mesura la relació de citosines i timines en un determinat nombre de llocs CpG dins d'un curt tram de la seqüència (Tost i Gut, 2007). Aquest mètode té l'avantatge de ser quantitatiu, el que permet mesurar directament els nivells de metilació, i s'ha emprat amb èxit per a la detecció de metilació en *MLH1* (Goel, et al., 2011; Hitchins, et al., 2011; Pineda, et al., 2012).

Per una altra banda, existeixen metodologies que no requereixen la conversió prèvia del DNA genòmic amb bisulfit sòdic, i entre totes elles destaquem el MLPA específic per l'estudi de la metilació (MS-MLPA, *methylation-specific MLPA*) i que també ha demostrat ser fiable per a la

detecció de la hipermetilació en el promotor d'*MLH1* (Gylling, et al., 2009). La tècnica MS-MLPA utilitza endonucleases de restricció que són sensibles als llocs de metilació, com ara HhaI, i que deixa d'escindir si en el lloc de reconeixement que conté una CpG hi ha qualsevol citosina metilada. En MS-MLPA, les sondes estan dissenyades de tal forma que comprenen els llocs d'hibridació de HhaI amb el DNA genòmic de cadena senzilla. El DNA no metilat es digereix i, per tant, no es pot amplificar, mentre que el producte de la hibridació entre el DNA genòmic metilat i la sonda roman sense digerir i s'amplifica. Les mostres amb metilació produiran un pic, l'alçada del qual és relatiu al nivell de metilació, com es determina al comparar la reacció de l'amplificació de les mostres quan no hi ha digestió. L'absència de pics es produeix quan la mostra no està metilada o quan s'ha produït una deleció en la seqüència interrogada. El kit específic utilitzat en aquesta tesi (MRC Holland, Amsterdam, the Netherlands) analitza alhora la presència de metilació en múltiples llocs per l'endonucleasa, tant pel gen *MLH1* com per *MSH2*, incloent en els estudis dos o més regions dels promotors.

En el nostre estudi es conclou que la metodologia més adient per l'estudi de la hipermetilació en tumors és el MS-MLPA. Utilitzant aquesta tècnica podem arribar a detectar hipermetilació quan a la mostra de DNA hi ha més del 10% dels al·lels metilats. Paral·lelament, es destaca que la variabilitat intra i interexperimental és inferior a l'1%.

En un estudi comparatiu entre l'MS-MLPA i la piroseqüenciació que es va fer a la Universitat de Michigan es va observar que eren tècniques amb un rendiment semblant. El nostre estudi, demostra que aquesta metodologia ofereix un gran rendiment en la rutina del diagnòstic clínic de mostres de DNA procedents de parafines sent robusta, reproduïble i sensible. D'acord amb els resultats obtinguts, el llindar que determina la presència o absència de la hipermetilació té un gran significat i condiona la seva utilitat diagnòstica. En la nostra experiència un punt de tall del 20% de hipermetilació d'*MLH1* era el més adient per l'estudi de mostres de parafina. Quant al MS-MCA tot i proporcionar una millor sensibilitat analítica, no tenia capacitat de discriminació en el casos *borderline* pel MS-MLPA.

En relació amb aquest fet, una revisió de la literatura recent, ha calculat que aproximadament l'1,4% dels CCR que són LS, són portadors de la mutació *BRAF V600E* (Parsons, et al., 2012; Capper, et al., 2013) i que un 5% dels tumors dels portadors de mutacions *MLH1* tenen metilació en la regió C del promotor d'*MLH1* (Crepin, et al., 2012; Parsons, et al., 2012).

Es va detectar en la sèrie un cas fals negatiu que es suma als descrits fins ara (22, Toon 2013). El pacient era portador d'una mutació patogènica en *MLH1* c.1865T>A; p.(Lis622Hys) que ha estat descrita com a fundadora espanyola (Borras, et al., 2010). Aquest cas té, tant la mutació *BRAF* V600E com la hipermetilació del promotor d'*MLH1*, mostrant, per tant, un perfil esperable al d'un tumor esporàdic (Wang, et al., 2003; Deng, et al., 2004; Domingo, et al., 2004b; McGivern, et al., 2004). Walsh i col·laboradors (Walsh, et al., 2009), van reportar la presència de mutacions *BRAF* en un membre d'una família amb LS que mostrava predisposició per a desenvolupar pòlips colorectals de la via serrada. Hi ha evidències que indiquen que els tumors amb MSI-H poden originar adenomes de la via serrada (Kambara, et al., 2004; Dong, et al., 2005). En el nostre cas, no es va observar cap fenotip serrat. L'anàlisi comparatiu mostra com en el tumor, la hipermetilació correspon a la inactivació d'*MLH1* (*second hit*), doncs no es detectà aquesta alteració en el teixit de mucosa normal del pacient. El fet que la hipermetilació es trobi en més freqüència que la mutació de *BRAF* en casos LS es pot explicar perquè la metilació del promotor d'*MLH1* és el *second hit* que desencadena la resta d'alteracions i per tant, precedeix en el temps a la mutació de *BRAF* i també, perquè molt probablement en els estudis va haver una sobreestimació d'hipermetilació somàtica al no descartar l'origen germinal d'aquesta. Aquest tipus de mecanisme constitucional es comentarà en l'últim apartat de la discussió de l'article 1.

COST-EFICÀCIA

Tot i que els resultats indicaven que l'estudi de la hipermetilació podia ser la millor alternativa per la seva aplicació en el camp diagnòstic de la LS, es va voler anar més enllà. Amb la col·laboració del Pla Director de l'Institut Català d'Oncologia, es va dur a terme un estudi del cost-eficàcia de les possibles alternatives diagnòstiques per a seleccionar millor els casos que són sospita de ser LS, i que el seu tumor presenta MSI i pèrdua d'expressió d'*MLH1*.

La utilitat clínica de l'estudi de la hipermetilació d'*MLH1* es basa en la poca prevalença observada. En línies generals, i tal i com es mostra en l'apartat de resultats de l'article 1, l'estudi de l'alteració epigenètica somàtica en el promotor d'*MLH1* no supera l'anàlisi de la mutació de *BRAF* però s'observa que la seva aplicació en l'algoritme diagnòstic és més cost-efectiva, si ens centrem en el cost incrementat per cada portador de mutació en *MLH1* detectat de forma addicional. Les nostres conclusions van en la línia de les de Pérez-Carbonell i col·laboradors (Perez-Carbonell, et al., 2010), tot i que ells utilitzaren un mètode menys complex d'anàlisi: el del cost-minimitzat.

Aquest estudi coincidí amb una etapa primerenca d'implantació a laboratoris clínics dels sistemes d'ultraseqüenciació de nova generació. Amb l'objectiu de poder considerar aquesta alternativa diagnòstica es va incloure el cost d'un anàlisi genètic a nivell germinal i també, la situació en un futur en què els costos d'aquestes anàlisis siguin més assequibles, considerant una hipotètica situació en el que el preu per mostra analitzada fos de 300€. El cost incrementat per cada portador de mutació addicional detectada seria de 865€ quan el mètode de preselecció fos la hipermetilació d'*MLH1*. Aquest cost seria més accentuat en comparar-se amb l'anàlisi directe de la línia germinal d'*MLH1* arribant a costar fins a 1620€.

L'anàlisi de sensibilitat que es va realitzar variant només el valor de la probabilitat d'una variable (*one-way analysis*), va demostrar que entre els factors que condicionen més els resultats de l'estudi de cost-eficàcia trobem els canvis en la prevalença de la mutació en la línia germinal. La nostra prevalença és del 47%, és un reflex del mètode de selecció de les mostres analitzades i que molt probablement ve condicionat pel tipus de població avaluada en centres de referència. Així mateix, els resultats són molt sensibles a les característiques del funcionament de la tècnica de detecció de la metilació reforçant encara més la importància de la tècnica utilitzada *MLH1* i la sensibilitat analítica establerta.

Els principals punts forts del nostre estudi són : (i) la inclusió d'una àmplia sèrie de casos ben anotats amb un nombre significatiu de casos de LS (per a una comparació amb altres estudis veure taula 3 i la taula de dades complementària 5), (ii) la avaluació de l'experiència de la Unitat de Genètica del Càncer; i (iii) l'estimació dels costos addicionals dels mètodes de detecció de casos alternatius per a la detecció de portadors de mutacions *MLH1* combinats amb anàlisi de sensibilitat (*one-way analysis*).

En conclusió, la hipermetilació somàtica de *MLH1* és un mètode de selecció prèvia precís i rendible per la selecció dels pacients que són candidats per l'anàlisi de la línia germinal d'*MLH1* quan és sospita de LS i quan l'expressió d'*MLH1* és absent. L'anàlisi de la hipermetilació d'*MLH1* utilitzant MS-MLPA té molt pocs resultats falsos negatius, el que reafirmaria aquesta tècnica en l'algoritme diagnòstic de LS. En qualsevol cas, els metges han de ser conscients que alguns casos LS poden no ser identificats. Aquest estudi afegeix evidència significativa de suport a la introducció de l'anàlisi de la hipermetilació somàtica de *MLH1* com el mètode de preselecció en l'ajust de rutina de diagnòstic de LS amb mutació a línia germinal d'*MLH1*.

AVALUACIÓ DE LA IMPLEMENTACIÓ DE L'ESTUDI DE LA HIPERMETILACIÓ EN L'ALGORITME CLÍNIC DE LA LS

Com a conseqüència d'aquest estudi, el cribratge d'hipermetilació del promotor d'*MLH1* ha estat incorporat en la rutina del diagnòstic molecular del Programa de Diagnòstic Molecular de Càncer Hereditari del Institut Català d'Oncologia com a estudi molecular dels tumors que presenten pèrdua d'expressió de la proteïna MLH1 en aquells pacients sospita de ser Lynch. Tant és així, que entre els anys 1998 i 2012, 108 casos ja han estat estudiats i inclouen els casos antics més els introduïts posteriorment.

Del total de 108 casos amb sospita de LS, 49 no presentaven hipermetilació del promotor i d'aquests 26 van ser finalment catalogats com a LS. En 4 dels 49 casos amb hipermetilació somàtica finalment es va detectar LS: dos eren falsos negatius i 2 van ser finalment catalogats com epimutacions germinals, casuística que confirma els resultats publicats anteriorment (Taula 5).

Taula 5. Casos amb estudi finalitzat que han estat estudiats per metilació somàtica d'*MLH1*.

Casos	LS confirmat	Sospita de LS	Total
No metilats	26	23	49
Metilats	4	45	49
No valorables	0	10	10

Si fem un càlcul de l'estalvi en euros que ha representat la implementació d'aquesta tècnica veiem que aquest fet suposa un estalvi del 35% (41.405€) respecte del cost d'estudiar tots els casos a nivell germinal. Paral·lelament, si considerem l'estudi de les mutacions directes en els familiars de primer i de segon grau, observem que l'estalvi suposa un 29% (42.546€), el que reforça la implementació d'aquesta estratègia diagnòstica.

EPIMUTACIÓ GERMINAL

És de destacar que la recent identificació i caracterització d'epimutacions en *MLH1* en línia germinal suggereix una utilitat addicional de l'estudi de la hipermetilació somàtica en l'algoritme diagnòstic de LS però en un sentit invers. Actualment, han estat reportats prop de 50 casos índex sense una mutació de reparació de gens de la línia germinal patogènica convencional i confirmats com a portadors d'una epimutació constitucional en *MLH1*. Aquests casos han estat detectats

arreu de tot el món sent present en diversos grups ètnics (Miyakura, et al., 2004; Suter, et al., 2004; Valle, et al., 2007; Morak, et al., 2008; Zhou, et al., 2008; Gylling, et al., 2009; Goel, et al., 2011; Hitchins, et al., 2011; Pineda, et al., 2012; Ward, et al., 2013). Sembla ser que entre aquest grup de pacients el càncer es produeix a una edat primerenca (mitjana d'edat de 39 anys) el que representa uns 5 anys més jove que en els casos amb mutacions germinal en la seqüència d'*MLH1* (aproximadament 44 anys) (Peltomaki, et al., 2001; Hendriks, et al., 2003). Per tant, aquest pot ser un criteri indicador per a fer un estudi de metilació germinal. Basant-se en la localització del tumor, l'edat de l'aparició del càncer, així com en la patologia molecular dels tumors; ara és evident que les epimutacions constitucionals d'*MLH1* confereixen un fenotip més sever de càncer que els de LS. No obstant això, els tumors de tipus Lynch que s'associen amb una epimutació constitucional d'*MLH1*, com succeeix en els càncers colorectals esporàdics MSI, també mostren la presència de metilació del promotor d'*MLH1* i, en ocasions també tenen mutacions al gen *BRAF* (Morak, et al., 2008; Goel, et al., 2011; Pineda, et al., 2012).

D'epimutacions germinals d'*MLH1* podem diferenciar dos tipus: (1) aquelles que tendeixen a sorgir de manera espontània i que són reversibles entre les generacions, encara que ocasionalment transmeses a la següent generació en un patró no mendelià (epimutació primària d'*MLH1*), i (2) epimutacions mendelianes que s'ajusten a un patró d'herència clàssica autosòmica dominant. La naturalesa i l'heretabilitat d'aquestes formes diferents de les epimutacions d'*MLH1* presumiblement reflecteixen la seva base mecànica. Les epimutacions constitucionals són poc freqüents i és probable que no coneguem la seva freqüència real fins que analitzem sèries amplies amb mètodes sensibles.

Quan davant la sospita de què un tumor sigui LS, el resultat de l'estudi de la mutació germinal dels tres gens més freqüentment mutats (*MLH1*, *MSH2* i *MSH6*) resulta negatiu, i amb l'absència d'estudi de l'estat d'expressió de proteïnes i MSI, la taxa de detecció d'epimutacions *MLH1* oscil·len entre el 0 fins al 1,6% (Miyakura, et al., 2004; Hitchins, et al., 2005; Hitchins, et al., 2011; Crepin, et al., 2012). Per contra, quan es sospita de pacients amb síndrome de Lynch que han estat seleccionats per a la prova d'hipermetilació del promotor d'*MLH1*, a partir d'obtenir una prova negativa en l'estudi en la línia germinal, i que addicionalment, el seu tumor CCR o d'endometri que és diagnòstica de forma primerenca presenta MSI i la pèrdua d'immunohistoquímica de *MLH1*, la taxa de detecció varia de 3 a 9% (Hitchins, et al., 2005; Hitchins, et al., 2007; Valle, et al., 2007; Gylling, et al., 2009; Niessen, et al., 2009).

Segons la bibliografia i l'experiència diagnòstica del Programa de Diagnòstic Molecular de Càncer Hereditari del Institut Català d'Oncologia en el cas que un pacient sigui sospita de ser LS i que el pacient hagi estat diagnosticat a una edat primerenca o amb múltiples tumors i, que a la vegada, presenti hipermetilació de *MLH1* pot considerar-se oportú procedir a l'anàlisi de la metilació germinal de *MLH1* (Hitchins i Ward, 2009; Pineda, et al., 2012; Hitchins, 2013).

De fet, gràcies a la implementació d'aquest pas en l'algoritme clínic s'ha pogut classificar millor pacients que havien estat classificats com a esporàdics. Tant és així, que els 2 casos Lynch amb epimutació descrits en l'apartat anterior, en un primer moment, van ser classificats com a esporàdics en la sèrie descrita en aquest treball.

HETEROGENEÏTAT I DINÀMICA TUMORAL

El segon bloc d'aquesta tesi es va centrar en l'aprofundiment del coneixement de la dinàmica tumoral primerenca. L'objectiu va ser estudiar l'heterogeneïtat i la dinàmica de les subpoblacions cel·lulars presents en el còlon, considerant, tant el context amb predisposició hereditària com el que engloba casos d'adenocarcinomes esporàdics.

Actualment, en la nova era de la genòmica, es pot afirmar que l'heterogeneïtat cel·lular és un fet associat directament al càncer. És evident que aquesta troballa coincideix en el temps amb l'adveniment en Ciència de tècniques altament sensibles a nivell analític que han fet possible arribar a caracteritzar amb més detall els tumors. Tot i que s'estan donant passes de gegant en aquest camp del coneixement, encara resten per descobrir quins mecanismes subjacents al càncer impulsen tant la variabilitat genètica, com les pròpies interaccions entre les diferents subpoblacions cel·lulars que hi són presents. Sens dubte, el fet de conèixer en detall aquests trets tumorogènics afavoriran tant la medicina personalitzada contra el càncer, com la millora en el disseny dels tractaments específics.

La nostra hipòtesi de treball es basa en què l'anàlisi dels perfils de les freqüències de mutació per uns gens associats directament amb els estadis primerencs del càncer, poden reflectir la dinàmica de la carcinogènesi i ens pot ajudar a entendre millor el procés evolutiu de la tumorogènesi. Aquest estudi es subdividí en dues parts.

Per tal de dur a terme aquest objectiu, en una primera etapa ens vam centrar en la tria i posada a punt d'una metodologia específica per tal de permetre la detecció d'al·lels mutats diluïts en mostres de tumor pròpies de la rutina diagnòstica. Aquest estudi es va dur a terme en l'article 2 de l'apartat de resultats.

En una segona part de l'estudi, es va realitzar l'anàlisi de les mutacions associades als estadis inicials del càncer en diferents criptes aïllades de casos hereditaris i esporàdics. Aquests perfils mutacionals posteriorment van ser utilitzats per tal d'establir correlacions entre la heterogeneïtat present en aquest microambient, comparant les diferents metapoblacions observades en estadis primerencs de la tumorigènesi per tal d'analitzar la dinàmica tumoral. Els resultats d'aquest treball que engloben aquesta part de la tesi es descriuen en l'article 3.

PRIMERA PART: TRIA I POSADA A PUNT DE L'ESTUDI DE MUTACIONS DILUÏDES EN TUMORS

Les mutacions més freqüents de *KRAS* (codó 12 i 13) s'associen directament a les primeres etapes de la tumorigènesi en múltiples càncers (Bos, 1989; Esteller, et al., 2001), entre els quals està el còlon. En general, aquestes mutacions s'han detectat entre el 40% i el 45%, tant del total d'adenomes com dels carcinomes colorectals (Barbacid, 1987). Concretament, les mutacions en aquest oncogen s'han associat directament amb el creixement tridimensional de l'adenoma (Capella, et al., 1991), detectant-les en el 40-50% dels adenomes més grans d'1 cm. D'altra banda, cal considerar que en el tumor, les mutacions somàtiques específiques poden ser presents, fins i tot, en només una petita proporció de cèl·lules, o bé, tot i que les mutacions existeixen, aquest senyal es pot veure emmascarat per l'excés de DNA no mutat. Aquestes dues premisses van ser tingudes en compte quan es van estudiar i comparar les múltiples metodologies disponibles.

S'han utilitzat diverses tècniques per tal de poder analitzar aquests *hotspots*. Des de la dècada de 1970, el mètode de Sanger (Sanger, et al., 1977) és l'estàndard (*gold standard*) per a l'anàlisi de les mutacions en el diagnòstic del càncer. Està entre les metodologies més àmpliament reportades, tot i que el seu baix rendiment, l'elevat cost econòmic, la despesa en temps, i, sobretot, el fet que comprèn una sensibilitat analítica limitada, doncs és capaç de detectar al·lels mutats en una proporció $\geq 20\%$ (Isler, et al., 2007; Bagci, et al., 2012), no la fan especialment atractiva. També és comú l'ús d'altres metodologies com la piroseqüenciació o la PCR específica d'al·lel (*allele-specific*

PCR) les quals són capaces d'arribar a detectar entre un 10% i un 1% d'al·lels mutats (Ibrahem, et al., 2010; Sundstrom, et al., 2010; Wang, et al., 2010a).

L'estudi d'aquesta mutació en el camp diagnòstic ha adquirit rellevància en els últims anys, doncs la identificació d'aquestes mutacions en pacients amb CCR metastàtic es relaciona amb la manca de resposta enfront determinades teràpies contra el càncer per inhibició del receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) (com el Panitumumab o Cetuximab) (Lievre, et al., 2006; Benvenuti, et al., 2007; Cappuzzo, et al., 2007; Di Fiore, et al., 2007; Khambata-Ford, et al., 2007; De Roock, et al., 2008). Aquest fet ha impulsat l'aparició de kits comercials enfocats al camp diagnòstic i centrats específicament en la detecció de tot el ventall de *hotspots* de *KRAS*, com és el cas del Kit de mutacions del gen *KRAS* de TheraScreen® (DxS Limited). Aquesta tècnica combina un tipus de PCR específica d'al·lel (ARMS) amb l'ús de sondes fluorescents de tipus Scorpion per a la detecció de les mutacions mitjançant assajos de PCR en temps real, oferint una sensibilitat analítica de l'1% (Linardou, et al., 2011). També s'han emprat d'altres mètodes altament sensibles com la PCR enriquida en al·lel mutat (Molinari, et al., 2011) i la COLD-PCR, amb una sensibilitat analítica descrita de prop del 0,1% (Li, et al., 2008; Li i Makrigiorgos, 2009; Milbury, et al., 2011; Pekin, et al., 2011).

Nosaltres buscàvem la manera de quantificar de forma precisa mutacions específiques en mostres amb poca quantitat de DNA. En un primer moment, es varen considerar diferents metodologies d'alta sensibilitat analítica (SLM, la COLD-PCR, etc.) que no van funcionar a les nostres mans. Després vam considerar tant metodologies basades en sistemes de microfluids, com en tècniques de seqüenciació de nova generació i finalment, donada la naturalesa de la mostra i coincidint amb la implantació al nostre centre de l'equip BioMark™ HD System (de la plataforma Fluidigm), es va decidir utilitzar l'estratègia de la PCR digital mitjançant l'ús de sistemes de nanofluids.

Tecnologia de microfluids/nanofluids

Els dispositius de microfluids de Fluidigm utilitzen uns canals integrats i unes vàlvules que reparteixen les diferents mesclures de mostres i reactius en diferents cambres de reacció que tenen un volum a escala de nanolitres. El xip permet gestionar milers de microquantitats de mostres biològiques que han de ser capaces d'emmagatzemar-se i barrejar-se amb els diferents reactius per després proporcionar la mesura d'alguna variable concreta d'interès. Les interseccions dels canals formen vàlvules deflectores per dirigir als fluids. Rere la pressurització dels canals de

control, una membrana fina entre las capes tanca els canals de les mostres per aïllar les càmeres de divisió individuals (Figura 1). Al xip els canals de microfluids, les cambres i les vàlvules s'acoblen automàticament durant les reaccions de PCR individuals, disminuint exponencialment el pipeteig lligat a aquestes reaccions. .

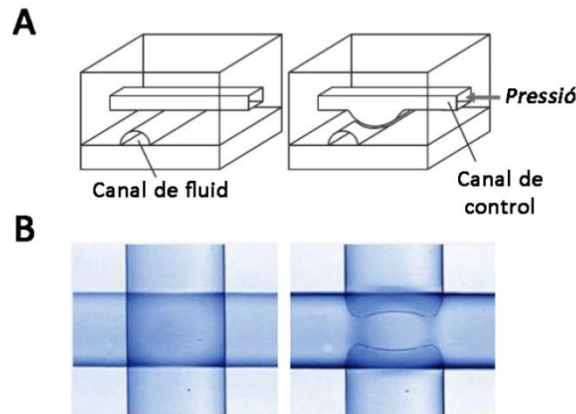


Figura 33. Funcionament de les microvàlvules del dispositiu de microfluid, quan estan obertes (esquerra) i quan es tanquen per pressió (dreta). **A.** Esquema del funcionament de les vàlvules en la intersecció dels canals de fluid i els de control. **B.** Micrografia òptica d'una microvàlvula feta per litografia tova multicapa inactivada (esquerra) i accionada (dreta).

Estratègia de la PCR digital en una matriu de microfluids

La PCR digital va ser l'alternativa triada entre les tècniques d'alta sensibilitat. És capaç de dur a terme l'anàlisi d'una sola molècula de DNA i l'ús de múltiples cambres independents facilita la detecció de les còpies rares de l'al·lel mutat en una mostra limitada. Fluidigm permet utilitzar dos tipus de format de xips, el 12.765 Digital Array IFC que realitza un total de 9.180 reaccions i el 48.770 Digital Array IFC que du a terme 36.960 reaccions (Fluidigm, South San Francisco) (Figura 2). El rendiment d'aquest tipus de metodologia està àmpliament demostrat, doncs el xip digital s'ha utilitzat anteriorment per a una varietat de diferents aplicacions, incloent la quantificació absoluta (Vogelstein i Kinzler, 1999), la detecció de mutacions (Oehler, et al., 2009; Wang, et al., 2010b), i els estudis de variació en el nombre de còpies (Dube, et al., 2008; Qin, et al., 2008).

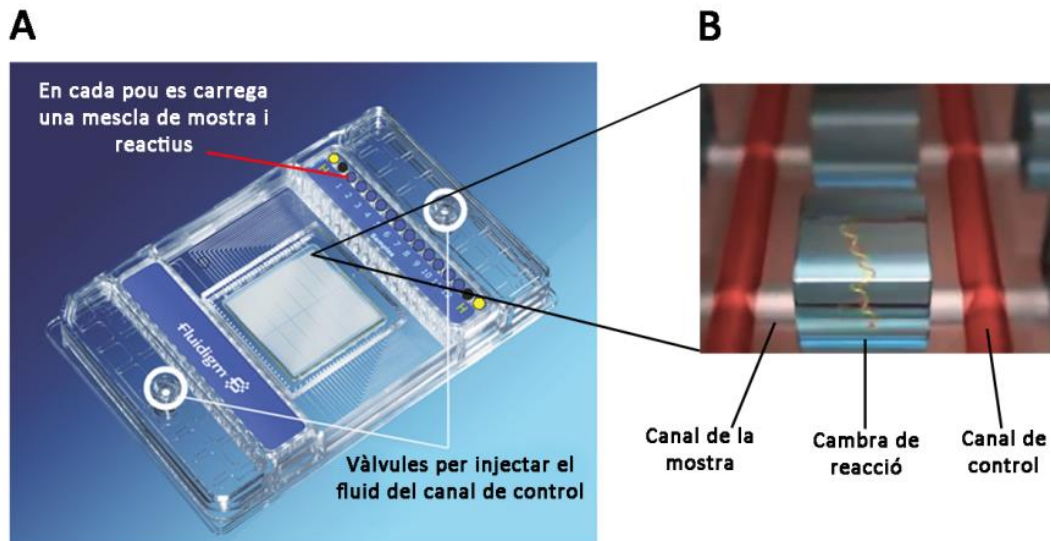


Figura 34. Representació esquemàtica d'un xip digital de Fluidigm. **A.** Imatge real d'un xip digital de Fluidigm. Concretament, es tracta d'un 12.765 Digital Array IFC, en el qual es carreguen 12 mostres amb la mescla de reactius a cada pou. Posteriorment, cada mostra es reparteix en 765 cambres de reacció, determinant que una molècula de DNA sigui analitzada en cada cambra. **B.** Recreació de la cambra de reacció on una única molècula de DNA i els reactius arriben mitjançant els canals de les mostres. En perpendicular (vermell), estan els Canals de control que aïllen cada cambra de reacció.

L'objectiu concret de l'estudi, va ser avaluar la viabilitat de la PCR digital en nanofluids com a enfocament quantitatiu i analíticament sensible per detectar al·lels minoritaris de mutacions en *KRAS* i també valorar la possible heterogeneïtat present en mostres obtingudes de forma rutinària.

La PCR digital mitjançant el xip de nanofluids va ser capaç de detectar al·lels mutats a una concentració relativa de 0,05% a 0,1%, depenent de la sonda analitzada, sense interferències significatives entre sondes. El conjunt de resultats que il·lustren la sensibilitat analítica obtinguda de cada joc de sondes TaqMan mitjançant la PCR digital. Els mateixos assajos amb la PCR a temps real convencional van revelar que la sensibilitat analítica era $\geq 1\%$ de senyal del DNA mutat sobre la del *wild type*. Aquests resultats estan en concordança amb experiències ja publicades (Whale, et al., 2012). La PCR digital mostra una menor variabilitat entre experiments (Bhat, et al., 2009; Sanders, et al., 2011), el que ofereix la possibilitat d'obtenir resultats reproduïbles més precisos.

Tot i que no va formar part de l'estudi d'aquest article, *a posteriori*, es va realitzar una comparació d'eficàcia de les sondes utilitzades en aquest treball i un joc de sondes de la casa comercial KASPar

que va mostrar que aquestes darreres no eren tan sensibles com les TaqMan. Per tant, per tal de poder assolir la sensibilitat analítica requerida pel nostre objectiu és important ajustar al màxim el disseny dels experiments. També s'ha de destacar que quan es consideraren mostres de teixit procedent de parafines, la PCR digital té un bon rendiment pels al·lels majoritaris però que aquest disminueix en analitzar els minoritaris.

L'estudi de dues sèries petites de tumors independents a aquesta tesi analitzades en aquest article (una de CCR i una altra de càncer de pàncrees) per la tècnica de la PCR digital en nanofluids, va validar l'ús d'aquesta metodologia. Els resultats van revelar que aquesta tècnica no només era capaç de detectar al·lels majoritaris en la mostra de tumor sinó que també els que hi són presents en baixa proporció. Aquest estudi també va permetre identificar múltiples al·lels mutats pel gen *KRAS* en una proporció substancial dels casos estudiats. Aquest estudi reforça el concepte de que l'heterogeneïtat, lluny de ser un fet aïllat, és un tret característic que es pot trobar en elevada freqüència en l'estudi dels tumors, tan a nivell de la pròpia biòpsia (Giaretti, et al., 1996; Visani, et al., 2013), com d'adenomes (Zhu, et al., 1997), de mucosa normal (Zhu, et al., 1997), de cèl·lules tumorals circulants en plasma (Taly, et al., 2013), o de les metàstasis (Goranova, et al., 2011; Molinari, et al., 2011). Aquests resultats es podrien explicar per un possible origen clonal múltiple, que possibilitaria la presència concomitant de diferents mutacions al mateix nivell genètic. (Novelli, et al., 1996; Parsons, 2008; Improta, et al., 2013). En aquest sentit, és important destacar que la PCR digital ens ha permès la identificació d'al·lels múltiples d'un mateix gen i la seva alta sensibilitat analítica ens ajuda comprendre millor l'evolució tumoral (Visani, et al., 2013).

El fet que només puguem detectar múltiples mutacions d'un mateix gen en un tumor quan treballem amb metodologies sensibles, suggereix que, molt probablement, ha d'haver un control basal que impedeixi l'explosió de múltiples subpoblacions predominants en un mateix tumor. Aquest fet, podria ser degut a la pròpia competència entre les diferents subpoblacions que eviten que en un tumor hi hagi més de dos o tres genotips predominants. Humphries i col·laboradors ja van suggerir, que com a resultat de la competència clonal, el creixement (o expansió) d'un clon és més lent simplement per haver de competir amb els seus clons veïns (Humphries, et al., 2013).

No queda clar, però, quin pot ser l'impacte clínic de la presència d'aquestes subpoblacions cel·lulars, hi ha certes controvèrsies en la literatura. Per una banda, s'ha afirmat que les proporcions de les subpoblacions són tan petites que la seva rellevància diagnòstica pot ser

obviada (Farber, et al., 2011) i que les decisions clíniques s'han de basar en les característiques genètiques de la majoria de les cèl·lules tumorals. Paral·lelament, hi ha d'altres grups que afirmen que l'heterogeneïtat intratumoral pot conduir a una subestimació del paisatge genòmic tumoral (*tumor genomics landscape*) a partir de l'estudi d'una mostra individual de la biòpsia del tumor (Gerlinger, et al., 2012) i, fins i tot, s'ha relacionat el concepte concret de l'heterogeneïtat en teixit de CCR amb la probable resistència als tractaments (Perez, et al., 2013). Així, que s'ha afirmat que per estudiar la possible heterogeneïtat de *KRAS* en tumors caldria analitzar múltiples blocs o múltiples àrees dins d'un bloc de teixit de la biòpsia del tumor, particularment si els resultats poden dictar el tractament subsegüent (Farhangfar, et al., 2013; Perez, et al., 2013). Una pregunta que caldria resoldre és saber quines de les poblacions cel·lulars detectades seran les realment seleccionades i, per tant, les responsables d'una eventual progressió tumoral.

L'expansió de la metodologia de la PCR digital arriba en un moment en què el camp del diagnòstic molecular està avançant a un ritme frenètic. El desenvolupament de la seqüenciació de nova generació (NGS, *Next generation sequencing*) que coexisteix en el temps amb la PCR digital, fan que existeixi una potencial complementaritat entre aquestes dues tecnologies. Tot sembla indicar que la seqüenciació de nova generació es convertirà en una eina imprescindible en el diagnòstic clínic i per la presa de decisions terapèutiques en oncologia, doncs és un mètode relativament ràpid, té el potencial de seqüenciar un gran nombre de gens associats al càncer al mateix temps i amb una sensibilitat variable depenent del número de lectures en cada exoma (McCourt, et al., 2013; Zhou, et al., 2014). Estudis recents han empès a fons l'accelerador de la seqüenciació d'alt rendiment i d'alta profunditat (*deep sequencing*) amb l'objectiu de detectar mutacions somàtiques rares a partir de mostres heterogènies (Ding et al. , 2012; Shah et al , 2012). En aquest context són fonamentals els algorismes que evitin, en la mesura del possible, l'aparició de falsos positius doncs aquests tipus d'estudis poden conduir a biaixos no menyspreables que requereixen mètodes de correcció (Zhou, et al., 2014). No és agosarat dir que les tècniques de seqüenciació de nova generació acabaran reemplaçant tècniques com la PCR digital però no podem dir quan. La seqüenciació d'una única cèl·lula ja és possible i obrirà la porta a estudiar la heterogeneïtat d'una manera totalment nova (Mazutis, et al., 2013). Mentre aquests avenços arriben a la clínica nosaltres hem demostrat que el que és segur és que la PCR digital és un mètode robust per la detecció de variants minoritàries que ens ajudarà a conèixer millor la progressió tumoral i que té potencial per refinar la classificació dels tumors (Beck, et al., 2013; Huggett i Whale, 2013; Taly, et al., 2013).

Tot i això, encara queda molt camí per recórrer per tal d'ajustar l'error i la profunditat necessària per poder definir totes les subpoblacions cel·lulars del tumor.

SEGONA PART: ESTUDI D'HETEROGENEÏTAT I DINÀMICA DE SUBPOBLACIONS TUMORALS

Una cop definida, en l'apartat anterior, la robustesa de la metodologia necessària per la detecció de mutacions diluïdes en mostres tumorals, vàrem voler aprofundir el coneixement sobre l'heterogeneïtat intratumoral.

L'heterogeneïtat intratumoral, sorgeix a través de l'acumulació de canvis moleculars que, a nivell del tumor, dona com a resultat la coexistència de diverses poblacions cel·lulars caracteritzades per presentar diferències biològiques significatives, tant mutacionals (Thirlwell, et al., 2010) com fenotípiques (Kreso, et al., 2013). S'ha proposat com a explicació a la coexistència de les diferents subpoblacions dins d'un tumor, la acumulació de mutacions a diferents temps; també que poden existir diferents taxes de mutacions per a diferents loci o que les mutacions siguin neutres o irrelevantes (Gonzalez-Garcia, et al., 2002). Entendre millor aquesta diversitat cel·lular intratumoral segueix sent un repte important en la nostra comprensió tant del procés cancerós com de cara als processos de la resistència terapèutica, doncs tot sembla indicar que aquesta variabilitat hi juga un paper important i pot condicionar el disseny de possibles tractaments. En el CCR l'adquisició de variabilitat en les cèl·lules s'il·lustra molt bé al llarg de la seqüència adenoma-carcinoma en què hi ha una acumulació progressiva de mutacions durant la transició gradual de la mucosa normal fins a l'adenocarcinoma (Fearon i Vogelstein, 1990).

L'homeòstasi intestinal es basa en dos processos responsables del manteniment de la mucosa: la renovació cel·lular contínua dins d'una cripta (Marshman, et al., 2002) i la producció de noves criptes (St. Clair i Osborne, 1985). La capacitat d'auto-renovació no és un procés perfecte (DeMars i Held, 1972; Elmore, et al., 1983; Loeb, et al., 2003; Araten, et al., 2005) i diversos estudis han demostrat un increment d'alteracions en les criptes amb l'edat (Greaves, et al., 2006; Campbell i Polyak, 2007; Kang i Shibata, 2013) o han detectat mutacions en la mucosa normal (Zhu, et al., 1997). La producció de noves criptes a partir de cèl·lules mare es creu que generalment es produeix per un procés conegut com fissió (Clarke, 1972; St. Clair i Osborne, 1985; Totafurno, et al., 1987; Wasan, et al., 1998; Tan, et al., 2013) i seria la responsable de l'expansió clonal (Preston, et al., 2003; Gutierrez-Gonzalez, et al., 2009).

Tot i la importància de la heterogeneïtat en la progressió tumoral es coneix relativament poc al respecte. En tumors colorectals s'ha avaluat mitjançant el mostreig múltiple en teixit tumoral (Shibata, et al., 1993; Baisse, et al., 2001; Gonzalez-Garcia, et al., 2002; Losi, et al., 2005) o mitjançant l'aïllament de criptes (Sugai, et al., 2005).

En l'estudi presentat en l'article 3 de l'apartat de resultats es van estudiar els canvis tumorogènics primerencs a nivell de criptes de tumors esporàdics i hereditaris. La nostra hipòtesi d'estudi és que l'anàlisi de les criptes mitjançant mètodes d'alta sensibilitat de detecció de mutacions pot ser determinant per entendre millor la tumorogènesi. L'objectiu d'aquest estudi va ser obtenir una visió en la dinàmica de les poblacions de cèl·lules tumorals en el CCR en la lesió inicial i avançada.

Aïllament de les criptes

Un dels factors limitants que impedeix una anàlisi precisa de les mostres de teixits humans tumorals és la baixa sensibilitat que resulta en la contaminació de cèl·lules normals. Si el teixit tumoral conté només una petita proporció de les cèl·lules tumorals, o cap en absolut, l'anàlisi de les mostres no detectarà cap alteració genètica en el tumor. L'aïllament de criptes s'ha descrit com un mètode útil per l'anàlisi de cèl·lules procedents purament del teixit tumoral (Nakamura, et al., 1994; Habano, et al., 1996). Aquesta tècnica senzilla permet aïllar criptes o estructures pseudoglandulars de la mucosa intestinal (de la mucosa normal, d'adenomes o del tumor) separant-les de la làmina pròpia o de l'estroma fibrós. Els mètodes més comunament utilitzats per l'aïllament de l'epiteli colònic humà a partir de mostres de mucosa de còlon poden ser caracteritzats com aquells que fan servir principalment la dissociació mecànica (Moyer, 1983; Moyer i Aust, 1984; Gibson, et al., 1989), i els que utilitzen la quelació amb una agitació mecànica mínima (Cheng, et al., 1984; Whitehead, et al., 1987). Aquest últim és el que vam aplicar en aquest treball, en col·laboració de la Dra. Mar Iglesias del grup del Dr. Eduard Batlle (del laboratori de Càncer Colorrectal del Parc Científic de Barcelona). Nosaltres vam aplicar aquesta metodologia en cada una de les biòpsies recollides tant de teixit de mucosa normal, com dels adenomes i adenocarcinomes. En total es van estudiar 596 criptes, 180 dels casos esporàdics i 416 dels casos hereditaris.

Estudi de mutacions en el MCR d'APC

En tumors esporàdics hem confirmat la expansió clonal de les mutacions en la regió MCR del gen *APC*. Per contra, a nivell de criptes hem detectat un alt grau d'heterogeneïtat que inclou: (i) la freqüent identificació de criptes WT (fins el 31% d'elles tenint en compte que hem analitzat el front d'invasió tumoral); (ii) la identificació de noves mutacions somàtiques en el gen *APC* que coexisteixen amb les mutacions dominants o que es poden identificar, fins i tot, en absència de la mutació *APC* dominant; i (iii) la probable pèrdua de l'al·lel normal en una proporció significativa de les criptes. Aquest grau d'heterogeneïtat no va ser detectat per Thirlwell i col·laboradors in 2010 (Thirlwell, et al., 2010). Aquests autors van analitzar àrees de carcinoma dins d'adenomes i en criptes derivades d'aquests carcinomes *in situ* van trobar una homogeneïtat clara en les mutacions. Considerem que aquesta discrepància reflexa la diferent taxa d'heterogeneïtat segons les fases del tumor i podria ser que el carcinoma *in situ* hagi estat el resultat d'una selecció clonal significativa que després torna a passar per una fase de divergència clonal en els estadis més avançats de la progressió tumoral.

En el cas de FAP estudiat només hem detectat les mutacions dominants en el gen *APC* en una minoria (2 de 24) de les criptes extrems d'adenomes. De fet, la majoria de les criptes son *wild type* (WT) per la regió MCR del gen *APC*. La identificació de criptes *APC* WT no és nova, i Thirlwell i col·laboradors ja l'havien reportat (Thirlwell, et al., 2010). Donada la dificultat per interpretar aquests resultats, aquests autors van discutir a la baixa els seus resultats apuntant que possibles limitacions metodològiques com ara un mostreig esbiaixat en entorns altament heterogenis podrien donar lloc a falsos negatius. Ells també plantegen un escenari hipotètic on la pèrdua de les possibles mutacions que no es detecten en les criptes WT es deu a escombrades selectives que podrien haver fet perdre aquesta mutació en el passat. Creiem que els nostres resultats fan poc plausible aquesta interpretació.

Si bé la prudència obliga a no descartar aquestes limitacions, el fet de que hàgim identificat criptes *APC* WT tant en adenomas com en carcinomes, qüestiona la idea de què *APC* sigui l'autèntica mutació *driver* per tumors *APC* mutats. No és senzill imaginar-se quin ha de ser el model que permeti coexistir subpoblacions WT i subpoblacions *APC* mutades sense assumir que les WT són les autèntiques cèl·lules iniciadores de tumor o cèl·lules mare tumorals.

Estudi dels hotspots de *KRAS*/*BRAF*

Mentre que la heterogeneïtat en els locus *KRAS* o *BRAF* ha estat prèviament descrita en CCR (Giaretti, et al., 1996; Zhu, et al., 1997; Giaretti, et al., 2000; Ishii, et al., 2004; Thirlwell, et al., 2010; Humphries, et al., 2013), la profunditat de la nostra anàlisi mutacional ha mostrat un grau molt elevat d'heterogeneïtat al locus *KRAS* tant a nivell tumoral com a nivell de criptes i que implica tant a tumors esporàdics com a tumors hereditaris. Als carcinomes esporàdics coexisteixen tant les poblacions *KRAS* WT i *KRAS* mutades, si bé es manté un cert grau de correlació entre el clon dominant de *KRAS* al tumor i les mutacions detectades a les criptes. És més rellevant, però, la identificació de diferents poblacions cel·lulars *KRAS* mutades dins una cripta, entenent la cripta com aquesta estructura pseudoglandular que queda aïllada després d'un procés d'agitació mecànica. Aquestes observacions han de ser interpretades com l'aparició continuada de subpoblacions mutades que, en la seva immensa majoria, no seran seleccionades. El fet que aquesta observació sigui coherent tant en casos esporàdics que contenen mutacions en *APC* i *KRAS* com en el cas de FAP estudiat confirmen la solidesa de l'observació.

Utilitzant tècniques de seqüenciació convencional, es van identificar tant patrons homogenis a totes les criptes analitzades com la coexistència de criptes amb diferents mutacions de *KRAS* derivades del mateix tumor o amb criptes que son *KRAS* WT. Nosaltres hem identificat en moltes de les criptes analitzades múltiples mutacions de *KRAS* el que podria reflectir una inestabilitat basal que afavoreixi l'aparició d'aquests clons. No és intuïtiu imaginar com pot ser la dinàmica d'aquestes subpoblacions en estructures tancades. Es pot especular en el fet de que si tots els nous clons tenen les mateixes propietats cel·lulars i, per tant, són competidors igualats, la interferència entre ells podria explicar perquè no es seleccionen (Baker, et al., 2013).

Relació entre les mutacions d'*APC* i *KRAS*

Malgrat que fa molts anys que sabem que tant *KRAS* com *APC* són alteracions clau en el desenvolupament dels tumors colorectals (Fearon i Vogelstein, 1990) la seva interacció és encara motiu de debat. Existeix una controvèrsia sobre el paper de *KRAS* mutat quan *APC* és inactivat, doncs s'ha proposat com a inductor de la progressió del tumor mitjançant l'activació de la translocació de β -catenina al nucli (Phelps, et al., 2009b). No obstant això, aquesta relació no és sempre necessària, ja que β -catenina s'ha observat també en el nucli en absència de *KRAS* activada (Obrador-Hevia, et al., 2010). Es considera que alteracions inicials, com ara les mutacions al gen

APC, poden comportar una expansió clonal de les cèl·lules mare tumorals. Alteracions més tardanes, com ara les mutacions al gen *KRAS*, contribueixen a la progressió tumoral induint una més gran activació de la via de transmissió de senyals de WNT, afavorint encara més la expansió clonal d'aquestes cèl·lules mare. Els estudis de Feng i col·laboradors, i de Moon i col·laboradors (Feng, et al., 2011; Moon, et al., 2014) han posat l'èmfasi en la importància de la temporalitat en l'adquisició d'aquestes alteracions quant al seu impacte funcional.

Vàries de les nostres observacions confirmen que hi ha una relació entre *KRAS* i *APC*: (i) el patró observat de múltiples mutacions dins una cripta és present tant a tumors esporàdics amb mutació al gen *APC* com en el cas de FAP; (ii) no és present ni al tumor *KRAS* WT inclòs ni a la mucosa normal aparellada dels casos esporàdics; (iii) només 2 casos (SP9 i SP14) dels 17 carcinomas *KRAS* WT que no hem analitzat en detall presentaven mutacions *frameshift* en el MCR d'*APC* (dades no publicades) mentre que la prevalença de mutacions en el gen *APC* és superior en tumors *KRAS* mutats; i (iv) no s'evidencia en les lesions que s'originen en síndromes de reparació del DNA MMR deficient.

Creiem que els nostres resultats també aporten noves perspectives a la complexa interacció entre *APC* i *KRAS* en mostrar que l'activació concomitant dels dos gens pot ser una situació relativament infreqüent assumint que dins les criptes *APC* mutades o *APC* WT en tumors mutats estan apareixent contínuament noves subpoblacions cel·lulars mutades.

Ja hem comentat que les mutacions de *KRAS* poden detectar-se en criptes que són aparentment WT per *APC*. En *Drosophila* s'ha vist recentment, que un clon amb sobreexpressió de la proteïna mutant *Ras* és capaç d'un creixement moderat de la hiperplàsia, mentre que un clon amb una pèrdua de funció del gen supressor de tumor *scribbled* mor. Ara bé, quan hi ha coexpressió dels mutants de *Ras* i d'*scribbled* el resultat és la formació de grans tumors metastàtics (Pagliarini i Xu, 2003). No obstant això, el que va resultar encara més interessant, va ser que les dues mutacions no tenien perquè estar en la mateixa cèl·lula necessàriament per activar el creixement tumoral (Wu, et al., 2010). Tot plegat porta a considerar que depenent de la presència d'altres alteracions també pot representar un avantatge a la cèl·lula *APC* WT adquirir eventualment una mutació al gen *KRAS*.

Cal dir, però, que un patró similar, que no idèntic, de mutacions és evident en el cas de la MAP – aquí restringit a les lesions tumorals– i en les dues poliposis no filiades *APC/MYH(-)* polyposes, una

d'elles amb adenomes amb mutacions somàtiques al gen *APC*. Si ho considerem en conjunt podem assumir que en aquests casos existeixen mecanismes alternatius d'inactivació del gen *APC* que no hem esbrinat (cal recordar que només hem seqüenciat la regió MCR i que hem analitzat de manera indirecta la dosi al·lèlica). Alternativament, podria ser que les alteracions al gen *APC* no fossin les úniques que podrien causar la inestabilitat lligada a la emergència d'aquests clons. Interpretem que la càrrega genètica inicial condiona de manera clara el grau i la naturalesa de la inestabilitat en el locus *KRAS* en la cripta tumoral.

Les mutacions al gen *BRAF*, principalment les del *hotspot* V600E, es detecten en un 10% dels tumors esporàdics i estan lligades a la presència de MSI i la hipermetilació del promotor del gen *MLH1*. Es consideren mútuament excloents amb les mutacions *KRAS* probablement lligat a una forta equivalència funcional de les dues alteracions. Malgrat això també hem detectat la contínua aparició de clons *BRAF* en criptes de mucosa normal aparellada de tumors i també en una part de les mostres hereditàries analitzades. L'aparició de les poblacions amb *BRAF* mutat probablement reflecteixen la mateixa inestabilitat que condueix a l'aparició de les poblacions *KRAS* mutades. En aquest cas és evident que la selecció dels clons tampoc és freqüent.

Metapoblacions de criptes

L'anàlisi de *clusters* de les distribucions de mutacions al gens *KRAS/BRAF* a les criptes analitzades ha evidenciat que els patrons mutacionals de les criptes no són aleatoris i que varien segons l'alteració genètica responsable que el tumor sigui esporàdic o hereditari. Aquest *background* genètic influeix tant en: (i) la distribució relativa de les mutacions en una cripta determinada; (ii) el número total de criptes que tenen una distribució determinada de les mutacions, com (iii) la distància genètica entre les diferents criptes.

Ja que la presència de mutacions al gen *APC* com al gen *KRAS* afavoreix la expansió clonal per fissió (Wasan, et al., 1998; Humphries i Wright, 2008), podem assumir que és la fissió el mecanisme probable que explicaria la distribució no aleatòria de les criptes mutades, (Araki, et al., 1995; Park, et al., 1995; Slorach, et al., 1999; Kim i Shibata, 2002; Wong, et al., 2002; Kim i Shibata, 2004; Greaves, et al., 2006). Cal reconèixer que no podem descartar altres causes. Es difícil pensar que simplement la inestabilitat genètica pugui ser la responsable d'aquestes observacions, doncs no només l'atzar hi juga un paper en la generació de mutacions en aquest nivell. També podria existir un mecanisme *Top-down* on les cèl·lules mutades de criptes envairien altres criptes colonitzant-les

(Shih, et al., 2001). Fins i tot s'ha postulat la fusió de varies criptes amb alteracions diferents, però aquesta teoria mai no ha estat demostrada (Araki, et al., 1995; Slorach, et al., 1999; Kim i Shibata, 2002; Kim i Shibata, 2004). Finalment, també cal considerar la fissió asimètrica de les criptes lligada a mutacions al gen *APC*, on una cripta no es divideix per la base com una altra possible mecanisme d'expansió de criptes amb patrons determinats (Boman i Fields, 2013).

La metodologia

Aquests resultats poden ser qüestionats metodològicament ja que hem combinat l'estudi de criptes amb tècniques d'anàlisi mutacional de sensibilitat relativament elevada. L'aïllament mecànic de criptes comporta la identificació d'estructures pseudoglandulars i és un procediment vulnerable a biaix de selecció. De totes maneres la possible contaminació per mucosa normal queda minimitzada en tumors per la selecció del marge invasors i en adenomes per la identificació de les lesions per un patòleg expert que només va proporcionar lesions prou grans per ser identificades de manera inequívoca.

La metodologia utilitzada per la detecció de mutacions va passar per un procés exhaustiu de posada a punt i avaluació de reproduïbilitat i sensibilitat analítica. Tot i això, vam optar per fer sixtuplicats dels resultats un cop vam obtenir els primers resultats que clarament qüestionaven els paradigmes vigents. En aquest sentit, val a dir que vam treballar abastament la selecció dels punts de tall dels resultats que vam lligar als estudis de sensibilitat analítica. Finalment vam optar per un nivell de talls robust que es situava en la interpretació conservadora dels resultats. Aquesta solidesa ha quedat demostrada per la manca de detecció d'instabilitat en les lesions derivades de tumors amb deficiència en el sistema MMR, així com el patró diferencial observat a les criptes derivades de tumors esporàdics respecte a les derivades de la mucosa normal aparellada. Som conscients que un mostreig més exhaustiu ens hagués proporcionat observacions més sòlides i que més casos amb mutació germinal al gen *APC* també haguessin estat d'interès. Malgrat això, l'estudi de diferents casos de càncer hereditari reforcen la fiabilitat de les nostres observacions. En aquest sentit ens hem quedat amb ganes d'analitzar el gen *APC* amb tècniques més sensibles ja que estem convençuts de que el grau d'heterogeneïtat també seria molt alt.

En resum, hi ha un grau sorprenent d'heterogeneïtat intra e intercripta en los loci *KRAS/BRAF* en les poblacions cel·lulars en les primeres etapes de la tumorigènesi del CCR, que no és aleatòria i que depèn del *background* genètic. La immensa majoria de les subpoblacions mutades identificades no són seleccionades durant la progressió del tumor. Aquesta conclusió és similar a la proposada per Losi i col·laboradors (Losi, et al., 2005), indicant que l'heterogeneïtat genètica intratumoral s'associa més sovint amb les primeres etapes que a l'estat avançat.

El nostre estudi aporta una nova visió a la complexa interacció entre *APC* i *KRAS* a la tumorigènesi colorectal. Els resultats proporcionen la base per establir nous models de dinàmica poblacional de les criptes tumorals on la contínua aparició de clons mutats *KRAS* i la seva selecció ocasional són el probable motor de la progressió tumoral en els tumors *KRAS/APC* mutats. Els reptes que representa interpretar la identificació de criptes *APC* WT en aquest context no és menor i obre noves hipòtesis a testar.

SUMARI

- L'anàlisi de la hipermetilació del promotor d'*MLH1* utilitzant el mètode de l'MS-MLPA ha demostrat ser un mètode de selecció precís, i més rendible que l'estudi de la mutació *BRAF* en la selecció dels pacients que són candidats a ser estudiats a nivell germinal en el gen *MLH1*, quan hi ha sospita de ser síndrome de Lynch i quan no hi ha expressió de la proteïna MLH1 en el tumor.
- Alguns casos de síndrome de Lynch poden no ser detectats amb aquesta estratègia, el que posa de relleu la importància del criteri clínic en l'estudi de casos par tal de minimitzar els falsos negatius.
- La PCR digital proporciona una mesura robusta i quantitativa de la proporció d'al·lels de *KRAS* mutats en mostres de tumors sent capaç de detectar al·lels mutats minoritaris. L'ús d'aquesta metodologia dona una nova visió de l'heterogeneïtat intratumoral en *hotspots* seleccionats durant la tumorogènesi.
- L'estudi de la dinàmica de les metapoblacions mostra com el càncer és un procés evolutiu on la càrrega mutacional sembla estar augmentada en les primeres etapes de la tumorogènesi, tot i que, en general, aquesta variabilitat no es tradueix en selecció d'aquestes mutacions.
- L'anàlisi de l'heterogeneïtat basada en el doble enfoc de l'estudi de criptes amb tècniques d'alta sensibilitat analítica contribueix a comprendre els mecanismes mutacionals, destacant l'augment de la càrrega mutacional present en etapes primerenques de la tumorogènesi.
- L'heterogeneïtat observada reflecteix els antecedents genètics de predisposició al càncer.
- L'estudi de les metapoblacions tumorals basat en l'aparició de mutacions i la seva comparació, ens pot ajudar a entendre millor el procés d'expansió en les primeres etapes de la tumorogènesi.

CONCLUSIONS

- Aquest estudi aporta una evidència significativa que dóna suport a la introducció de l'anàlisi de la hipermetilació somàtica d'*MLH1* com a mètode de preselecció en la rutina de la configuració del diagnòstic de casos amb síndrome de Lynch portadors de mutacions germinals en *MLH1*.
- Hi ha un grau sorprenent d'heterogeneïtat intra e intercripta en els *loci KRAS/BRAF* en les poblacions cel·lulars en les primeres etapes de la tumorigènesi del CCR, que no és aleatòria i que depèn del *background* genètic. La immensa majoria de les subpoblacions mutades identificades no són seleccionades durant la progressió del tumor.
- El nostre estudi aporta una nova visió a la complexa interacció entre *APC* i *KRAS* a la tumorigènesi colorectal .

BIBLIOGRAFIA

A

- Aaltonen, L. A., Peltomaki, P., Leach, F. S., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J. P., Jarvinen, H., Powell, S. M., Jen, J., Hamilton, S. R. & Et Al. 1993. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, 260, 812-6.
- Aaltonen, L. A., Sankila, R., Mecklin, J. P., Jarvinen, H., Pukkala, E., Peltomaki, P. & De La Chapelle, A. 1994. A novel approach to estimate the proportion of hereditary nonpolyposis colorectal cancer of total colorectal cancer burden. *Cancer Detect Prev*, 18, 57-63.
- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. & Kemler, R. 1997. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J*, 16, 3797-804.
- Adam, R., Haller, D. G., Poston, G., Raoul, J. L., Spano, J. P., Tabernero, J. & Van Cutsem, E. 2010. Toward optimized front-line therapeutic strategies in patients with metastatic colorectal cancer--an expert review from the International Congress on Anti-Cancer Treatment (ICACT) 2009. *Ann Oncol*, 21, 1579-84.
- Akiyama, Y., Sato, H., Yamada, T., Nagasaki, H., Tsuchiya, A., Abe, R. & Yuasa, Y. 1997. Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Res*, 57, 3920-3.
- Al-Mulla, F., Milner-White, E. J., Going, J. J. & Birnie, G. D. 1999. Structural differences between valine-12 and aspartate-12 Ras proteins may modify carcinoma aggression. *J Pathol*, 187, 433-8.
- Al-Tassan, N., Chmiel, N. H., Maynard, J., Fleming, N., Livingston, A. L., Williams, G. T., Hodges, A. K., Davies, D. R., David, S. S., Sampson, J. R. & Cheadle, J. P. 2002. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet*, 30, 227-32.
- Alemayehu, A., Sebova, K. & Fridrichova, I. 2008. Redundant DNA methylation in colorectal cancers of Lynch-syndrome patients. *Genes Chromosomes Cancer*, 47, 906-14.
- Alison, M. R., Murphy, G. & Leedham, S. 2008. Stem cells and cancer: a deadly mix. *Cell Tissue Res*, 331, 109-24.
- Altmann, G. G. 1983. Morphological observations on mucus-secreting nongoblet cells in the deep crypts of the rat ascending colon. *Am J Anat*, 167, 95-117.
- Amado, R. G., Wolf, M., Peeters, M., Van Cutsem, E., Siena, S., Freeman, D. J., Juan, T., Sikorski, R., Suggs, S., Radinsky, R., Patterson, S. D. & Chang, D. D. 2008. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 26, 1626-34.
- Andreu, P., Peignon, G., Slomianny, C., Taketo, M. M., Colnot, S., Robine, S., Lamarque, D., Laurent-Puig, P., Perret, C. & Romagnolo, B. 2008. A genetic study of the role of the Wnt/beta-catenin signalling in Paneth cell differentiation. *Dev Biol*, 324, 288-96.
- Araki, K., Ogata, T., Kobayashi, M. & Yatani, R. 1995. A morphological study on the histogenesis of human colorectal hyperplastic polyps. *Gastroenterology*, 109, 1468-74.

- Araten, D. J., Golde, D. W., Zhang, R. H., Thaler, H. T., Gargiulo, L., Notaro, R. & Luzzatto, L. 2005. A quantitative measurement of the human somatic mutation rate. *Cancer Res*, 65, 8111-7.
- Arends, M. J. 2013. Pathways of colorectal carcinogenesis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 21, 97-102.
- Aretz, S., Uhlhaas, S., Goergens, H., Siberg, K., Vogel, M., Pagenstecher, C., Mangold, E., Caspari, R., Propping, P. & Friedl, W. 2006. MUTYH-associated polyposis: 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype. *Int J Cancer*, 119, 807-14.
- Aretz, S., Uhlhaas, S., Sun, Y., Pagenstecher, C., Mangold, E., Caspari, R., Moslein, G., Schulmann, K., Propping, P. & Friedl, W. 2004. Familial adenomatous polyposis: aberrant splicing due to missense or silent mutations in the APC gene. *Hum Mutat*, 24, 370-80.
- Armitage, P. & Doll, R. 1954. The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *Br J Cancer*, 8, 1-12.
- Astler, V. B. & Coller, F. A. 1954. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg*, 139, 846-52.
- Auclair, B. A., Benoit, Y. D., Rivard, N., Mishina, Y. & Perreault, N. 2007. Bone morphogenetic protein signaling is essential for terminal differentiation of the intestinal secretory cell lineage. *Gastroenterology*, 133, 887-96.
- Auclair, J., Busine, M. P., Navarro, C., Ruano, E., Montmain, G., Desseigne, F., Saurin, J. C., Lasset, C., Bonadona, V., Giraud, S., Puisieux, A. & Wang, Q. 2006. Systematic mRNA analysis for the effect of MLH1 and MSH2 missense and silent mutations on aberrant splicing. *Hum Mutat*, 27, 145-54.

B

- Bagci, P., Andea, A. A., Basturk, O., Jang, K. T., Erbarut, I. & Adsay, V. 2012. Large duct type invasive adenocarcinoma of the pancreas with microcystic and papillary patterns: a potential microscopic mimic of non-invasive ductal neoplasia. *Mod Pathol*, 25, 439-48.
- Bagnardi, V., Blangiardo, M., La Vecchia, C. & Corrao, G. 2001. A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *Br J Cancer*, 85, 1700-5.
- Baisse, B., Bouzourene, H., Saraga, E. P., Bosman, F. T. & Benhattar, J. 2001. Intratumor genetic heterogeneity in advanced human colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer*, 93, 346-52.
- Baker, A. M., Graham, T. A. & Wright, N. A. 2013. Pre-tumour clones, periodic selection and clonal interference in the origin and progression of gastrointestinal cancer: potential for biomarker development. *J Pathol*, 229, 502-14.
- Baldus, S. E., Schaefer, K. L., Engers, R., Hartleb, D., Stoecklein, N. H. & Gabbert, H. E. 2010. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res*, 16, 790-9.
- Bando, H., Yoshino, T., Tsuchihara, K., Ogasawara, N., Fuse, N., Kojima, T., Tahara, M., Kojima, M., Kaneko, K., Doi, T., Ochiai, A., Esumi, H. & Ohtsu, A. 2011. KRAS mutations detected by the

- amplification refractory mutation system-Scorpion assays strongly correlate with therapeutic effect of cetuximab. *Br J Cancer*, 105, 403-6.
- Barbacid, M. 1987. ras genes. *Annu Rev Biochem*, 56, 779-827.
- Barker, N. 2014. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 19-33.
- Barker, N., Huch, M., Kujala, P., Van De Wetering, M., Snippert, H. J., Van Es, J. H., Sato, T., Stange, D. E., Begthel, H., Van Den Born, M., Danenberg, E., Van Den Brink, S., Korving, J., Abo, A., Peters, P. J., Wright, N., Poulsom, R. & Clevers, H. 2010. Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell*, 6, 25-36.
- Barker, N., Van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., Van Den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J. & Clevers, H. 2007. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, 449, 1003-7.
- Battle, E., Henderson, J. T., Begthel, H., Van Den Born, M. M., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., Van De Wetering, M., Pawson, T. & Clevers, H. 2002. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell*, 111, 251-63.
- Baylin, S. B. & Ohm, J. E. 2006. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*, 6, 107-16.
- Beal, M. A., Glenn, T. C. & Somers, C. M. 2012. Whole genome sequencing for quantifying germline mutation frequency in humans and model species: cautious optimism. *Mutat Res*, 750, 96-106.
- Beck, B. & Blanpain, C. 2013. Unravelling cancer stem cell potential. *Nat Rev Cancer*, 13, 727-38.
- Beck, J., Bierau, S., Balzer, S., Andag, R., Kanzow, P., Schmitz, J., Gaedcke, J., Moerer, O., Slotta, J. E., Walson, P., Kollmar, O., Oellerich, M. & Schutz, E. 2013. Digital droplet PCR for rapid quantification of donor DNA in the circulation of transplant recipients as a potential universal biomarker of graft injury. *Clin Chem*, 59, 1732-41.
- Bedeir, A. & Krasinskas, A. M. 2011. Molecular diagnostics of colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med*, 135, 578-87.
- Behrens, J. & Lustig, B. 2004. The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol*, 48, 477-87.
- Bellcross, C. A., Bedrosian, S. R., Daniels, E., Duquette, D., Hampel, H., Jasperson, K., Joseph, D. A., Kaye, C., Lubin, I., Meyer, L. J., Reyes, M., Scheuner, M. T., Schully, S. D., Senter, L., Stewart, S. L., St Pierre, J., Westman, J., Wise, P., Yang, V. W. & Khoury, M. J. 2012. Implementing screening for Lynch syndrome among patients with newly diagnosed colorectal cancer: summary of a public health/clinical collaborative meeting. *Genet Med*, 14, 152-62.
- Benlloch, S., Paya, A., Alenda, C., Bessa, X., Andreu, M., Jover, R., Castells, A., Llor, X., Aranda, F. I. & Massuti, B. 2006. Detection of BRAF V600E mutation in colorectal cancer: comparison of automatic sequencing and real-time chemistry methodology. *J Mol Diagn*, 8, 540-3.
- Benson, A. B., 3rd, Bekaii-Saab, T., Chan, E., Chen, Y. J., Choti, M. A., Cooper, H. S., Engstrom, P. F., Enzinger, P. C., Fakih, M. G., Fenton, M. J., Fuchs, C. S., Grem, J. L., Hunt, S., Kamel, A., Leong, L. A., Lin, E., May, K. S., Mulcahy, M. F., Murphy, K., Rohren, E., Ryan, D. P., Saltz, L., Sharma, S., Shibata, D., Skibber, J. M., Small, W., Jr., Sofocleous, C. T., Venook, A. P.,

- Willett, C. G., Gregory, K. M. & Freedman-Cass, D. A. 2013. Metastatic colon cancer, version 3.2013: featured updates to the NCCN Guidelines. *J Natl Compr Canc Netw*, 11, 141-52; quiz 152.
- Benvenuti, S., Sartore-Bianchi, A., Di Nicolantonio, F., Zanon, C., Moroni, M., Veronese, S., Siena, S. & Bardelli, A. 2007. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res*, 67, 2643-8.
- Bessa, X., Balleste, B., Andreu, M., Castells, A., Bellosillo, B., Balaguer, F., Castellvi-Bel, S., Paya, A., Jover, R., Alenda, C., Tito, L., Martinez-Villacampa, M., Vilella, A., Xicola, R. M., Pons, E. & Llor, X. 2008. A prospective, multicenter, population-based study of BRAF mutational analysis for Lynch syndrome screening. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 6, 206-14.
- Bhat, S., Herrmann, J., Armishaw, P., Corbisier, P. & Emslie, K. R. 2009. Single molecule detection in nanofluidic digital array enables accurate measurement of DNA copy number. *Anal Bioanal Chem*, 394, 457-67.
- Bienz, M. & Clevers, H. 2000. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*, 103, 311-20.
- Bjerknes, M. & Cheng, H. 1981a. The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. I. Evidence from Paneth cells in the adult mouse. *Am J Anat*, 160, 51-63.
- Bjerknes, M. & Cheng, H. 1981b. The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. III. Evidence from columnar, enteroendocrine, and mucous cells in the adult mouse. *Am J Anat*, 160, 77-91.
- Bodmer, W. F., Bailey, C. J., Bodmer, J., Bussey, H. J., Ellis, A., Gorman, P., Lucibello, F. C., Murday, V. A., Rider, S. H., Scambler, P. & Et Al. 1987. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature*, 328, 614-6.
- Boland, C. R. & Goel, A. 2010. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138, 2073-2087 e3.
- Boland, C. R. & Shike, M. 2010. Report from the Jerusalem workshop on Lynch syndrome-hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138, 2197 e1-7.
- Boman, B. M. & Fields, J. Z. 2013. An APC:WNT Counter-Current-Like Mechanism Regulates Cell Division Along the Human Colonic Crypt Axis: A Mechanism That Explains How Mutations Induce Proliferative Abnormalities That Drive Colon Cancer Development. *Front Oncol*, 3, 244.
- Boparai, K. S., Dekker, E., Van Eeden, S., Polak, M. M., Bartelsman, J. F., Mathus-Vliegen, E. M., Keller, J. J. & Van Noesel, C. J. 2008. Hyperplastic polyps and sessile serrated adenomas as a phenotypic expression of MYH-associated polyposis. *Gastroenterology*, 135, 2014-8.
- Boparai, K. S., Mathus-Vliegen, E. M., Koornstra, J. J., Nagengast, F. M., Van Leerdam, M., Van Noesel, C. J., Houben, M., Cats, A., Van Hest, L. P., Fockens, P. & Dekker, E. 2010. Increased colorectal cancer risk during follow-up in patients with hyperplastic polyposis syndrome: a multicentre cohort study. *Gut*, 59, 1094-100.
- Borras, E., Pineda, M., Blanco, I., Jewett, E. M., Wang, F., Teule, A., Caldes, T., Urioste, M., Martinez-Bouzas, C., Brunet, J., Balmana, J., Torres, A., Ramon Y Cajal, T., Sanz, J., Perez-Cabornero, L., Castellvi-Bel, S., Alonso, A., Lanás, A., Gonzalez, S., Moreno, V., Gruber, S. B., Rosenberg, N. A., Mukherjee, B., Lazaro, C. & Capella, G. 2010. MLH1 founder

- mutations with moderate penetrance in Spanish Lynch syndrome families. *Cancer Res*, 70, 7379-91.
- Bos, J. L. 1989. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*, 49, 4682-9.
- Bottcher, R., Amberg, R., Ruzius, F. P., Guryev, V., Verhaegh, W. F., Beyerlein, P. & Van Der Zaag, P. J. 2012. Using a priori knowledge to align sequencing reads to their exact genomic position. *Nucleic Acids Res*, 40, e125.
- Bouzourene, H., Hutter, P., Losi, L., Martin, P. & Benhattar, J. 2010. Selection of patients with germline MLH1 mutated Lynch syndrome by determination of MLH1 methylation and BRAF mutation. *Fam Cancer*, 9, 167-72.
- Brocardo, M., Nathke, I. S. & Henderson, B. R. 2005. Redefining the subcellular location and transport of APC: new insights using a panel of antibodies. *EMBO Rep*, 6, 184-90.
- Bronner, C. E., Baker, S. M., Morrison, P. T., Warren, G., Smith, L. G., Lescoe, M. K., Kane, M., Earabino, C., Lipford, J., Lindblom, A. & Et Al. 1994. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*, 368, 258-61.
- Buczacki, S. J., Zecchini, H. I., Nicholson, A. M., Russell, R., Vermeulen, L., Kemp, R. & Winton, D. J. 2013. Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature*, 495, 65-9.
- Burt, R. W. 2000. Colon cancer screening. *Gastroenterology*, 119, 837-53.
- Burt, R. W., Disario, J. A. & Cannon-Albright, L. 1995. Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. *Annu Rev Med*, 46, 371-9.
- Burt, R. W., Leppert, M. F., Slattery, M. L., Samowitz, W. S., Spirio, L. N., Kerber, R. A., Kuwada, S. K., Neklason, D. W., Disario, J. A., Lyon, E., Hughes, J. P., Chey, W. Y. & White, R. L. 2004. Genetic testing and phenotype in a large kindred with attenuated familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*, 127, 444-51.

C

- Caldas, C. 2012. Cancer sequencing unravels clonal evolution. *Nat Biotechnol*, 30, 408-10.
- Campbell, L. L. & Polyak, K. 2007. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle*, 6, 2332-8.
- Cantwell-Dorris, E. R., O'leary, J. J. & Sheils, O. M. 2011. BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Mol Cancer Ther*, 10, 385-94.
- Capella, G., Cronauer-Mitra, S., Pienado, M. A. & Perucho, M. 1991. Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors. *Environ Health Perspect*, 93, 125-31.
- Capper, D., Voigt, A., Bozukova, G., Ahadova, A., Kickingereeder, P., Von Deimling, A., Von Knebel Doeberitz, M. & Kloor, M. 2013. BRAF V600E-specific immunohistochemistry for the exclusion of Lynch syndrome in MSI-H colorectal cancer. *Int J Cancer*, 133, 1624-30.
- Cappuzzo, F., Ligorio, C., Janne, P. A., Toschi, L., Rossi, E., Trisolini, R., Paioli, D., Holmes, A. J., Magrini, E., Finocchiaro, G., Bartolini, S., Cancellieri, A., Ciardiello, F., Patelli, M., Crino, L. & Varella-Garcia, M. 2007. Prospective study of gefitinib in epidermal growth factor

- receptor fluorescence in situ hybridization-positive/phospho-Akt-positive or never smoker patients with advanced non-small-cell lung cancer: the ONCOBELL trial. *J Clin Oncol*, 25, 2248-55.
- Carmon, K. S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A. & Liu, Q. 2011. R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 11452-7.
- Cartwright, T. H. 2012. Treatment decisions after diagnosis of metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 11, 155-66.
- Castellsague, E., Gonzalez, S., Nadal, M., Campos, O., Guino, E., Urioste, M., Blanco, I., Frebourg, T. & Capella, G. 2008. Detection of APC gene deletions using quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments. *Clin Chem*, 54, 1132-40.
- Center, M. M., Jemal, A. & Ward, E. 2009. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18, 1688-94.
- Cespedes, M. V., Sancho, F. J., Guerrero, S., Parreno, M., Casanova, I., Pavon, M. A., Marcuello, E., Trias, M., Cascante, M., Capella, G. & Manges, R. 2006. K-ras Asp12 mutant neither interacts with Raf, nor signals through Erk and is less tumorigenic than K-ras Val12. *Carcinogenesis*, 27, 2190-200.
- Ciampi, R. & Nikiforov, Y. E. 2005. Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors. *Endocr Pathol*, 16, 163-72.
- Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H., Jones, D. L., Visvader, J., Weissman, I. L. & Wahl, G. M. 2006. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, 66, 9339-44.
- Clarke, R. M. 1972. The effect of growth and of fasting on the number of villi and crypts in the small intestine of the albino rat. *J Anat*, 112, 27-33.
- Cleary, S. P., Cotterchio, M., Jenkins, M. A., Kim, H., Bristow, R., Green, R., Haile, R., Hopper, J. L., Lemarchand, L., Lindor, N., Parfrey, P., Potter, J., Younghusband, B. & Gallinger, S. 2009. Germline MutY human homologue mutations and colorectal cancer: a multisite case-control study. *Gastroenterology*, 136, 1251-60.
- Cleary, S. P., Zhang, W., Di Nicola, N., Aronson, M., Aube, J., Steinman, A., Haddad, R., Redston, M., Gallinger, S., Narod, S. A. & Gryfe, R. 2003. Heterozygosity for the BLM(Ash) mutation and cancer risk. *Cancer Res*, 63, 1769-71.
- Clevers, H. 2013. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell*, 154, 274-84.
- Clevers, H. & Batlle, E. 2013. SnapShot: the intestinal crypt. *Cell*, 152, 1198-1198 e2.
- Cottrell, S., Bicknell, D., Kaklamanis, L. & Bodmer, W. F. 1992. Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet*, 340, 626-30.
- Crepin, M., Dieu, M. C., Lejeune, S., Escande, F., Boidin, D., Porchet, N., Morin, G., Manouvrier, S., Mathieu, M. & Buisine, M. P. 2012. Evidence of constitutional MLH1 epimutation associated to transgenerational inheritance of cancer susceptibility. *Hum Mutat*, 33, 180-8.

- Cunningham, J. M., Christensen, E. R., Tester, D. J., Kim, C. Y., Roche, P. C., Burgart, L. J. & Thibodeau, S. N. 1998. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res*, 58, 3455-60.
- Cheadle, J. P. & Sampson, J. R. 2003. Exposing the MYTH about base excision repair and human inherited disease. *Hum Mol Genet*, 12 Spec No 2, R159-65.
- Chen, J., Li, Y., Yu, T. S., Mckay, R. M., Burns, D. K., Kernie, S. G. & Parada, L. F. 2012. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*, 488, 522-6.
- Cheng, H., Bjerknes, M. & Amar, J. 1984. Methods for the determination of epithelial cell kinetic parameters of human colonic epithelium isolated from surgical and biopsy specimens. *Gastroenterology*, 86, 78-85.
- Cheng, H., Bjerknes, M., Amar, J. & Gardiner, G. 1986. Crypt production in normal and diseased human colonic epithelium. *Anat Rec*, 216, 44-8.
- Chu, K. C., Tarone, R. E., Chow, W. H., Hankey, B. F. & Ries, L. A. 1994. Temporal patterns in colorectal cancer incidence, survival, and mortality from 1950 through 1990. *J Natl Cancer Inst*, 86, 997-1006.

D

- Davies, R. J., Miller, R. & Coleman, N. 2005. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nat Rev Cancer*, 5, 199-209.
- Day, E., Poulogiannis, G., Mccaughan, F., Mulholland, S., Arends, M. J., Ibrahim, A. E. & Dear, P. H. 2013. IRS2 is a candidate driver oncogene on 13q34 in colorectal cancer. *Int J Exp Pathol*, 94, 203-11.
- De La Chapelle, A. 2004. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, 4, 769-80.
- De La Chapelle, A. 2005. The incidence of Lynch syndrome. *Fam Cancer*, 4, 233-7.
- De Lau, W., Barker, N., Low, T. Y., Koo, B. K., Li, V. S., Teunissen, H., Kujala, P., Haegebarth, A., Peters, P. J., Van De Wetering, M., Stange, D. E., Van Es, J. E., Guardavaccaro, D., Schasfoort, R. B., Mohri, Y., Nishimori, K., Mohammed, S., Heck, A. J. & Clevers, H. 2011. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature*, 476, 293-7.
- De Roock, W., Claes, B., Bernasconi, D., De Schutter, J., Biesmans, B., Fountzilias, G., Kalogeras, K. T., Kotoula, V., Papamichael, D., Laurent-Puig, P., Penault-Llorca, F., Rougier, P., Vincenzi, B., Santini, D., Tonini, G., Cappuzzo, F., Frattini, M., Molinari, F., Saletti, P., De Dosso, S., Martini, M., Bardelli, A., Siena, S., Sartore-Bianchi, A., Tabernero, J., Macarulla, T., Di Fiore, F., Gangloff, A. O., Ciardiello, F., Pfeiffer, P., Qvortrup, C., Hansen, T. P., Van Cutsem, E., Piessevaux, H., Lambrechts, D., Delorenzi, M. & Tejpar, S. 2010. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol*, 11, 753-62.
- De Roock, W., Piessevaux, H., De Schutter, J., Janssens, M., De Hertogh, G., Personeni, N., Biesmans, B., Van Laethem, J. L., Peeters, M., Humblet, Y., Van Cutsem, E. & Tejpar, S. 2008. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol*, 19, 508-15.

- De Sousa, E. M. F., Vermeulen, L., Fessler, E. & Medema, J. P. 2013a. Cancer heterogeneity--a multifaceted view. *EMBO Rep*, 14, 686-95.
- De Sousa, E. M. F., Wang, X., Jansen, M., Fessler, E., Trinh, A., De Rooij, L. P., De Jong, J. H., De Boer, O. J., Van Leersum, R., Bijlsma, M. F., Rodermond, H., Van Der Heijden, M., Van Noesel, C. J., Tuynman, J. B., Dekker, E., Markowitz, F., Medema, J. P. & Vermeulen, L. 2013b. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med*, 19, 614-8.
- De Vos, M., Hayward, B. E., Picton, S., Sheridan, E. & Bonthron, D. T. 2004. Novel PMS2 pseudogenes can conceal recessive mutations causing a distinctive childhood cancer syndrome. *Am J Hum Genet*, 74, 954-64.
- Demars, R. & Held, K. R. 1972. The spontaneous azaguanine-resistant mutants of diploid human fibroblasts. *Humangenetik*, 16, 87-110.
- Deng, D., Deng, G., Smith, M. F., Zhou, J., Xin, H., Powell, S. M. & Lu, Y. 2002a. Simultaneous detection of CpG methylation and single nucleotide polymorphism by denaturing high performance liquid chromatography. *Nucleic Acids Res*, 30, E13.
- Deng, D. J., Zhou, J., Zhu, B. D., Ji, J. F., Harper, J. C. & Powell, S. M. 2003. Silencing-specific methylation and single nucleotide polymorphism of hMLH1 promoter in gastric carcinomas. *World J Gastroenterol*, 9, 26-9.
- Deng, G., Bell, I., Crawley, S., Gum, J., Terdiman, J. P., Allen, B. A., Truta, B., Sleisenger, M. H. & Kim, Y. S. 2004. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 10, 191-5.
- Deng, G., Chen, A., Hong, J., Chae, H. S. & Kim, Y. S. 1999. Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res*, 59, 2029-33.
- Deng, G., Chen, A., Pong, E. & Kim, Y. S. 2001. Methylation in hMLH1 promoter interferes with its binding to transcription factor CBF and inhibits gene expression. *Oncogene*, 20, 7120-7.
- Deng, G., Peng, E., Gum, J., Terdiman, J., Sleisenger, M. & Kim, Y. S. 2002b. Methylation of hMLH1 promoter correlates with the gene silencing with a region-specific manner in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 86, 574-9.
- Di Fiore, F., Blanchard, F., Charbonnier, F., Le Pessot, F., Lamy, A., Galais, M. P., Bastit, L., Killian, A., Sesboue, R., Tuech, J. J., Queuniet, A. M., Paillot, B., Sabourin, J. C., Michot, F., Michel, P. & Frebourg, T. 2007. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer*, 96, 1166-9.
- Ding, J., Bashashati, A., Roth, A., Oloumi, A., Tse, K., Zeng, T., Haffari, G., Hirst, M., Marra, M. A., Condon, A., Aparicio, S. & Shah, S. P. 2012. Feature-based classifiers for somatic mutation detection in tumour-normal paired sequencing data. *Bioinformatics*, 28, 167-75.
- Ding, L., Getz, G., Wheeler, D. A., Mardis, E. R., McLellan, M. D., Cibulskis, K., Sougnez, C., Greulich, H., Muzny, D. M., Morgan, M. B., Fulton, L., Fulton, R. S., Zhang, Q., Wendl, M. C., Lawrence, M. S., Larson, D. E., Chen, K., Dooling, D. J., Sabo, A., Hawes, A. C., Shen, H., Jhangiani, S. N., Lewis, L. R., Hall, O., Zhu, Y., Mathew, T., Ren, Y., Yao, J., Scherer, S. E., Clerc, K., Metcalf, G. A., Ng, B., Milosavljevic, A., Gonzalez-Garay, M. L., Osborne, J. R., Meyer, R., Shi, X., Tang, Y., Koboldt, D. C., Lin, L., Abbott, R., Miner, T. L., Pohl, C., Fewell,

- G., Haipek, C., Schmidt, H., Dunford-Shore, B. H., Kraja, A., Crosby, S. D., Sawyer, C. S., Vickery, T., Sander, S., Robinson, J., Winckler, W., Baldwin, J., Chirieac, L. R., Dutt, A., Fennell, T., Hanna, M., Johnson, B. E., Onofrio, R. C., Thomas, R. K., Tonon, G., Weir, B. A., Zhao, X., Ziaugra, L., Zody, M. C., Giordano, T., Orringer, M. B., Roth, J. A., Spitz, M. R., Wistuba, I., Ozenberger, B., Good, P. J., Chang, A. C., Beer, D. G., Watson, M. A., Ladanyi, M., Broderick, S., Yoshizawa, A., Travis, W. D., Pao, W., Province, M. A., Weinstock, G. M., Varmus, H. E., Gabriel, S. B., Lander, E. S., Gibbs, R. A., Meyerson, M. & Wilson, R. K. 2008. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*, 455, 1069-75.
- Domingo, E., Espin, E., Armengol, M., Oliveira, C., Pinto, M., Duval, A., Brennetot, C., Seruca, R., Hamelin, R., Yamamoto, H. & Schwartz, S., Jr. 2004a. Activated BRAF targets proximal colon tumors with mismatch repair deficiency and MLH1 inactivation. *Genes Chromosomes Cancer*, 39, 138-42.
- Domingo, E., Laiho, P., Ollikainen, M., Pinto, M., Wang, L., French, A. J., Westra, J., Frebourg, T., Espin, E., Armengol, M., Hamelin, R., Yamamoto, H., Hofstra, R. M., Seruca, R., Lindblom, A., Peltomaki, P., Thibodeau, S. N., Aaltonen, L. A. & Schwartz, S., Jr. 2004b. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet*, 41, 664-8.
- Domingo, E., Niessen, R. C., Oliveira, C., Alhopuro, P., Moutinho, C., Espin, E., Armengol, M., Sijmons, R. H., Kleibeuker, J. H., Seruca, R., Aaltonen, L. A., Imai, K., Yamamoto, H., Schwartz, S., Jr. & Hofstra, R. M. 2005. BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene*, 24, 3995-8.
- Donehower, L. A., Creighton, C. J., Schultz, N., Shinbrot, E., Chang, K., Gunaratne, P. H., Muzny, D., Sander, C., Hamilton, S. R., Gibbs, R. A. & Wheeler, D. 2013. MLH1-silenced and non-silenced subgroups of hypermutated colorectal carcinomas have distinct mutational landscapes. *J Pathol*, 229, 99-110.
- Dong, S. M., Lee, E. J., Jeon, E. S., Park, C. K. & Kim, K. M. 2005. Progressive methylation during the serrated neoplasia pathway of the colorectum. *Mod Pathol*, 18, 170-8.
- Downward, J. 2003. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3, 11-22.
- Dowty, J. G., Win, A. K., Buchanan, D. D., Lindor, N. M., Macrae, F. A., Clendenning, M., Antill, Y. C., Thibodeau, S. N., Casey, G., Gallinger, S., Marchand, L. L., Newcomb, P. A., Haile, R. W., Young, G. P., James, P. A., Giles, G. G., Gunawardena, S. R., Leggett, B. A., Gattas, M., Boussioutas, A., Ahnen, D. J., Baron, J. A., Parry, S., Goldblatt, J., Young, J. P., Hopper, J. L. & Jenkins, M. A. 2013. Cancer risks for MLH1 and MSH2 mutation carriers. *Hum Mutat*, 34, 490-7.
- Driessens, G., Beck, B., Caauwe, A., Simons, B. D. & Blanpain, C. 2012. Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. *Nature*, 488, 527-30.
- Dube, S., Qin, J. & Ramakrishnan, R. 2008. Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR on a nanofluidic device. *PLoS One*, 3, e2876.
- Dukes, C. E. 1932. The classification of cancer of the rectum. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 35, 323-332.
- Dunlop, M. G., Dobbins, S. E., Farrington, S. M., Jones, A. M., Palles, C., Whiffin, N., Tenesa, A., Spain, S., Broderick, P., Ooi, L. Y., Domingo, E., Smillie, C., Henrion, M., Frampton, M.,

- Martin, L., Grimes, G., Gorman, M., Semple, C., Ma, Y. P., Barclay, E., Prendergast, J., Cazier, J. B., Olver, B., Penegar, S., Lubbe, S., Chander, I., Carvajal-Carmona, L. G., Ballereau, S., Lloyd, A., Vijayakrishnan, J., Zgaga, L., Rudan, I., Theodoratou, E., Starr, J. M., Deary, I., Kirac, I., Kovacevic, D., Aaltonen, L. A., Renkonen-Sinisalo, L., Mecklin, J. P., Matsuda, K., Nakamura, Y., Okada, Y., Gallinger, S., Duggan, D. J., Conti, D., Newcomb, P., Hopper, J., Jenkins, M. A., Schumacher, F., Casey, G., Easton, D., Shah, M., Pharoah, P., Lindblom, A., Liu, T., Smith, C. G., West, H., Cheadle, J. P., Midgley, R., Kerr, D. J., Campbell, H., Tomlinson, I. P. & Houlston, R. S. 2012. Common variation near CDKN1A, POLD3 and SHROOM2 influences colorectal cancer risk. *Nat Genet*, 44, 770-6.
- Dunlop, M. G., Farrington, S. M., Nicholl, I., Aaltonen, L., Petersen, G., Porteous, M. & Carothers, A. 2000. Population carrier frequency of hMSH2 and hMLH1 mutations. *Br J Cancer*, 83, 1643-5.
- Dunlop, M. G., Tenesa, A., Farrington, S. M., Ballereau, S., Brewster, D. H., Koessler, T., Pharoah, P., Schafmayer, C., Hampe, J., Volzke, H., Chang-Claude, J., Hoffmeister, M., Brenner, H., Von Holst, S., Picelli, S., Lindblom, A., Jenkins, M. A., Hopper, J. L., Casey, G., Duggan, D., Newcomb, P. A., Abuli, A., Bessa, X., Ruiz-Ponte, C., Castellvi-Bel, S., Niittymaki, I., Tuupanen, S., Karhu, A., Aaltonen, L., Zanke, B., Hudson, T., Gallinger, S., Barclay, E., Martin, L., Gorman, M., Carvajal-Carmona, L., Walther, A., Kerr, D., Lubbe, S., Broderick, P., Chandler, I., Pittman, A., Penegar, S., Campbell, H., Tomlinson, I. & Houlston, R. S. 2013. Cumulative impact of common genetic variants and other risk factors on colorectal cancer risk in 42,103 individuals. *Gut*, 62, 871-81.
- Durauto, F., Liccardo, R., Cavallo, A., De Rosa, M., Grosso, M. & Izzo, P. 2011. Association of low-risk MSH3 and MSH2 variant alleles with Lynch syndrome: probability of synergistic effects. *Int J Cancer*, 129, 1643-50.

E

- East, J. E., Saunders, B. P. & Jass, J. R. 2008. Sporadic and syndromic hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colon: classification, molecular genetics, natural history, and clinical management. *Gastroenterol Clin North Am*, 37, 25-46, v.
- Edwards, B. K., Ward, E., Kohler, B. A., Ehemann, C., Zauber, A. G., Anderson, R. N., Jemal, A., Schymura, M. J., Lansdorp-Vogelaar, I., Seeff, L. C., Van Ballegooijen, M., Goede, S. L. & Ries, L. A. 2010. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer*, 116, 544-73.
- Eisenhoffer, G. T., Loftus, P. D., Yoshigi, M., Otsuna, H., Chien, C. B., Morcos, P. A. & Rosenblatt, J. 2012. Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia. *Nature*, 484, 546-9.
- Elmore, E., Kakunaga, T. & Barrett, J. C. 1983. Comparison of spontaneous mutation rates of normal and chemically transformed human skin fibroblasts. *Cancer Res*, 43, 1650-5.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet*, 5, 435-45.

- Escobar, M., Nicolas, P., Sangar, F., Laurent-Chabalier, S., Clair, P., Joubert, D., Jay, P. & Legraverend, C. 2011. Intestinal epithelial stem cells do not protect their genome by asymmetric chromosome segregation. *Nat Commun*, 2, 258.
- Esteller, M., Gonzalez, S., Risques, R. A., Marcuello, E., Mangués, R., Germa, J. R., Herman, J. G., Capella, G. & Peinado, M. A. 2001. K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 19, 299-304.
- Esteller, M., Sparks, A., Toyota, M., Sanchez-Cespedes, M., Capella, G., Peinado, M. A., Gonzalez, S., Tarafa, G., Sidransky, D., Meltzer, S. J., Baylin, S. B. & Herman, J. G. 2000. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res*, 60, 4366-71.

F

- Farber, L., Efrati, E., Elkin, H., Peerless, Y., Sabo, E., Ben-Izhak, O. & Hershkovitz, D. 2011. Molecular morphometric analysis shows relative intra-tumoural homogeneity for KRAS mutations in colorectal cancer. *Virchows Arch*, 459, 487-93.
- Farhangfar, C. J., Meric-Bernstam, F., Mendelsohn, J., Mills, G. B. & Lucio-Eterovic, A. K. 2013. The impact of tumor heterogeneity on patient treatment decisions. *Clin Chem*, 59, 38-40.
- Farin, H. F., Van Es, J. H. & Clevers, H. 2012. Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells. *Gastroenterology*, 143, 1518-1529 e7.
- Fearnhead, N. S., Britton, M. P. & Bodmer, W. F. 2001. The ABC of APC. *Hum Mol Genet*, 10, 721-33.
- Fearon, E. R. & Vogelstein, B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-67.
- Feinberg, A. P., Ohlsson, R. & Henikoff, S. 2006. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet*, 7, 21-33.
- Felton, K. E., Gilchrist, D. M. & Andrew, S. E. 2007a. Constitutive deficiency in DNA mismatch repair. *Clin Genet*, 71, 483-98.
- Felton, K. E., Gilchrist, D. M. & Andrew, S. E. 2007b. Constitutive deficiency in DNA mismatch repair: is it time for Lynch III? *Clin Genet*, 71, 499-500.
- Feng, Y., Bommer, G. T., Zhao, J., Green, M., Sands, E., Zhai, Y., Brown, K., Burberry, A., Cho, K. R. & Fearon, E. R. 2011. Mutant KRAS promotes hyperplasia and alters differentiation in the colon epithelium but does not expand the presumptive stem cell pool. *Gastroenterology*, 141, 1003-1013 e1-10.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W., Comber, H., Forman, D. & Bray, F. 2013. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, 49, 1374-403.
- Forster, M., Forster, P., Elsharawy, A., Hemmrich, G., Kreck, B., Wittig, M., Thomsen, I., Stade, B., Barann, M., Ellinghaus, D., Petersen, B. S., May, S., Melum, E., Schilabel, M. B., Keller, A., Schreiber, S., Rosenstiel, P. & Franke, A. 2013. From next-generation sequencing alignments to accurate comparison and validation of single-nucleotide variants: the pibase software. *Nucleic Acids Res*, 41, e16.
- Foulds, L. 1954. The Experimental Study of Tumor Progression: A Review. *Cancer Res*, 14, 327-339.

Bibliografia

- Fox, E. J., Salk, J. J. & Loeb, L. A. 2009. Cancer genome sequencing--an interim analysis. *Cancer Res*, 69, 4948-50.
- Fransen, K., Klintenas, M., Osterstrom, A., Dimberg, J., Monstein, H. J. & Soderkvist, P. 2004. Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas. *Carcinogenesis*, 25, 527-33.
- Freeman, D. J., Juan, T., Reiner, M., Hecht, J. R., Meropol, N. J., Berlin, J., Mitchell, E., Sarosi, I., Radinsky, R. & Amado, R. G. 2008. Association of K-ras mutational status and clinical outcomes in patients with metastatic colorectal cancer receiving panitumumab alone. *Clin Colorectal Cancer*, 7, 184-90.
- Friedberg, E. C. 2003. DNA damage and repair. *Nature*, 421, 436-40.
- Friedenreich, C. M., Brant, R. F. & Riboli, E. 1994. Influence of methodologic factors in a pooled analysis of 13 case-control studies of colorectal cancer and dietary fiber. *Epidemiology*, 5, 66-79.
- Friedl, W. & Aretz, S. 2005. Familial adenomatous polyposis: experience from a study of 1164 unrelated german polyposis patients. *Hered Cancer Clin Pract*, 3, 95-114.
- Friedl, W., Caspari, R., Sengteller, M., Uhlhaas, S., Lamberti, C., Jungck, M., Kadmon, M., Wolf, M., Fahnenstich, J., Gebert, J., Moslein, G., Mangold, E. & Propping, P. 2001. Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families. *Gut*, 48, 515-21.
- Fuchs, E. & Chen, T. 2013. A matter of life and death: self-renewal in stem cells. *EMBO Rep*, 14, 39-48.

G

- Galandiuk, S., Rodriguez-Justo, M., Jeffery, R., Nicholson, A. M., Cheng, Y., Oukrif, D., Elia, G., Leedham, S. J., Mcdonald, S. A., Wright, N. A. & Graham, T. A. 2012. Field cancerization in the intestinal epithelium of patients with Crohn's ileocolitis. *Gastroenterology*, 142, 855-864 e8.
- Galiatsatos, P. & Foulkes, W. D. 2006. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol*, 101, 385-98.
- Gatta, G., Trama, A. & Capocaccia, R. 2013. Variations in cancer survival and patterns of care across Europe: roles of wealth and health-care organization. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2013, 79-87.
- Genuardi, M., Anti, M., Capozzi, E., Leonardi, F., Fornasarig, M., Novella, E., Bellacosa, A., Valenti, A., Gasbarrini, G. B., Roncucci, L., Benatti, P., Percesepe, A., Ponz De Leon, M., Coco, C., De Paoli, A., Valentini, M., Boiocchi, M., Neri, G. & Viel, A. 1998. MLH1 and MSH2 constitutional mutations in colorectal cancer families not meeting the standard criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Cancer*, 75, 835-9.
- Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., Varela, I., Phillimore, B., Begum, S., Mcdonald, N. Q., Butler, A., Jones, D., Raine, K., Latimer, C., Santos, C. R., Nohadani, M., Eklund, A. C., Spencer-Dene, B., Clark, G., Pickering, L., Stamp, G., Gore, M., Szallasi, Z., Downward, J.,

- Futreal, P. A. & Swanton, C. 2012. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*, 366, 883-92.
- Giaretti, W., Monaco, R., Pujic, N., Rapallo, A., Nigro, S. & Geido, E. 1996. Intratumor heterogeneity of K-ras2 mutations in colorectal adenocarcinomas: association with degree of DNA aneuploidy. *Am J Pathol*, 149, 237-45.
- Giaretti, W., Rapallo, A., Sciotto, A., Macciocu, B., Geido, E., Hermsen, M. A., Postma, C., Baak, J. P., Williams, R. A. & Meijer, G. A. 2000. Intratumor heterogeneity of k-ras and p53 mutations among human colorectal adenomas containing early cancer. *Anal Cell Pathol*, 21, 49-57.
- Gibson, P. R., Van De Pol, E., Maxwell, L. E., Gabriel, A. & Doe, W. F. 1989. Isolation of colonic crypts that maintain structural and metabolic viability in vitro. *Gastroenterology*, 96, 283-91.
- Giovannucci, E. 2001. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10, 725-31.
- Giraldez, M. D., Balaguer, F., Bujanda, L., Cuatrecasas, M., Munoz, J., Alonso-Espinaco, V., Larzabal, M., Petit, A., Gonzalo, V., Ocana, T., Moreira, L., Enriquez-Navascues, J. M., Boland, C. R., Goel, A., Castells, A. & Castellvi-Bel, S. 2010. MSH6 and MUTYH deficiency is a frequent event in early-onset colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 16, 5402-13.
- Gismondi, V., Meta, M., Bonelli, L., Radice, P., Sala, P., Bertario, L., Viel, A., Fornasarig, M., Arrigoni, A., Gentile, M., Ponz De Leon, M., Anselmi, L., Mareni, C., Bruzzi, P. & Varesco, L. 2004. Prevalence of the Y165C, G382D and 1395delGGA germline mutations of the MYH gene in Italian patients with adenomatous polyposis coli and colorectal adenomas. *Int J Cancer*, 109, 680-4.
- Glinka, A., Dolde, C., Kirsch, N., Huang, Y. L., Kazanskaya, O., Ingelfinger, D., Boutros, M., Cruciat, C. M. & Niehrs, C. 2011. LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/beta-catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Rep*, 12, 1055-61.
- Goel, A., Nguyen, T. P., Leung, H. C., Nagasaka, T., Rhee, J., Hotchkiss, E., Arnold, M., Banerji, P., Koi, M., Kwok, C. T., Packham, D., Lipton, L., Boland, C. R., Ward, R. L. & Hitchins, M. P. 2011. De novo constitutional MLH1 epimutations confer early-onset colorectal cancer in two new sporadic Lynch syndrome cases, with derivation of the epimutation on the paternal allele in one. *Int J Cancer*, 128, 869-78.
- Gonzalez-Garcia, I., Moreno, V., Navarro, M., Marti-Rague, J., Marcuello, E., Benasco, C., Campos, O., Capella, G. & Peinado, M. A. 2000. Standardized approach for microsatellite instability detection in colorectal carcinomas. *J Natl Cancer Inst*, 92, 544-9.
- Gonzalez-Garcia, I., Sole, R. V. & Costa, J. 2002. Metapopulation dynamics and spatial heterogeneity in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 13085-9.
- Goranova, T. E., Ohue, M., Shimoharu, Y. & Kato, K. 2011. Dynamics of cancer cell subpopulations in primary and metastatic colorectal tumors. *Clin Exp Metastasis*, 28, 427-35.
- Grady, W. M. & Markowitz, S. D. 2002. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 3, 101-28.
- Greaves, L. C., Preston, S. L., Tadrous, P. J., Taylor, R. W., Barron, M. J., Oukrif, D., Leedham, S. J., Deheragoda, M., Sasieni, P., Novelli, M. R., Jankowski, J. A., Turnbull, D. M., Wright, N. A. & McDonald, S. A. 2006. Mitochondrial DNA mutations are established in human colonic

- stem cells, and mutated clones expand by crypt fission. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 714-9.
- Greaves, M. 2007. Darwinian medicine: a case for cancer. *Nat Rev Cancer*, 7, 213-21.
- Greaves, M. & Maley, C. C. 2012. Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481, 306-13.
- Griffiths, D. F., Davies, S. J., Williams, D., Williams, G. T. & Williams, E. D. 1988. Demonstration of somatic mutation and colonic crypt clonality by X-linked enzyme histochemistry. *Nature*, 333, 461-3.
- Groen, E. J., Roos, A., Muntinghe, F. L., Enting, R. H., De Vries, J., Kleibeuker, J. H., Witjes, M. J., Links, T. P. & Van Beek, A. P. 2008. Extra-intestinal manifestations of familial adenomatous polyposis. *Ann Surg Oncol*, 15, 2439-50.
- Gruber, S. B. & Mukherjee, B. 2009. Anticipation in lynch syndrome: still waiting for the answer. *J Clin Oncol*, 27, 326-7.
- Guerrero, S., Casanova, I., Farre, L., Mazo, A., Capella, G. & Mangués, R. 2000. K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression. *Cancer Res*, 60, 6750-6.
- Gundry, M. & Vijg, J. 2012. Direct mutation analysis by high-throughput sequencing: from germline to low-abundant, somatic variants. *Mutat Res*, 729, 1-15.
- Gunter, M. J., Probst-Hensch, N. M., Cortessis, V. K., Kulldorff, M., Haile, R. W. & Sinha, R. 2005. Meat intake, cooking-related mutagens and risk of colorectal adenoma in a sigmoidoscopy-based case-control study. *Carcinogenesis*, 26, 637-42.
- Gutierrez-Gonzalez, L., Deheragoda, M., Elia, G., Leedham, S. J., Shankar, A., Imber, C., Jankowski, J. A., Turnbull, D. M., Novelli, M., Wright, N. A. & McDonald, S. A. 2009. Analysis of the clonal architecture of the human small intestinal epithelium establishes a common stem cell for all lineages and reveals a mechanism for the fixation and spread of mutations. *J Pathol*, 217, 489-96.
- Gylling, A., Ridanpaa, M., Vierimaa, O., Aittomaki, K., Avela, K., Kaariainen, H., Laivuori, H., Poyhonen, M., Sallinen, S. L., Wallgren-Pettersson, C., Jarvinen, H. J., Mecklin, J. P. & Peltomaki, P. 2009. Large genomic rearrangements and germline epimutations in Lynch syndrome. *Int J Cancer*, 124, 2333-40.

H

- Habano, W., Sugai, T., Nakamura, S. & Yoshida, T. 1996. A novel method for gene analysis of colorectal carcinomas using a crypt isolation technique. *Lab Invest*, 74, 933-40.
- Hampel, H. 2010. Point: justification for Lynch syndrome screening among all patients with newly diagnosed colorectal cancer. *J Natl Compr Canc Netw*, 8, 597-601.
- Hampel, H. & De La Chapelle, A. 2011. The search for unaffected individuals with Lynch syndrome: do the ends justify the means? *Cancer Prev Res (Phila)*, 4, 1-5.
- Hampel, H. & De La Chapelle, A. 2013. How do we approach the goal of identifying everybody with Lynch syndrome? *Fam Cancer*, 12, 313-7.

- Hampel, H., Frankel, W., Panescu, J., Lockman, J., Sotamaa, K., Fix, D., Comeras, I., La Jeunesse, J., Nakagawa, H., Westman, J. A., Prior, T. W., Clendenning, M., Penzone, P., Lombardi, J., Dunn, P., Cohn, D. E., Copeland, L., Eaton, L., Fowler, J., Lewandowski, G., Vaccarello, L., Bell, J., Reid, G. & De La Chapelle, A. 2006. Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer Res*, 66, 7810-7.
- Hampel, H., Frankel, W. L., Martin, E., Arnold, M., Khanduja, K., Kuebler, P., Clendenning, M., Sotamaa, K., Prior, T., Westman, J. A., Panescu, J., Fix, D., Lockman, J., Lajeunesse, J., Comeras, I. & De La Chapelle, A. 2008. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 26, 5783-8.
- Hampel, H., Frankel, W. L., Martin, E., Arnold, M., Khanduja, K., Kuebler, P., Nakagawa, H., Sotamaa, K., Prior, T. W., Westman, J., Panescu, J., Fix, D., Lockman, J., Comeras, I. & De La Chapelle, A. 2005. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med*, 352, 1851-60.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- Haramis, A. P., Begthel, H., Van Den Born, M., Van Es, J., Jonkheer, S., Offerhaus, G. J. & Clevers, H. 2004. De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science*, 303, 1684-6.
- Heath, J. P. 1996. Epithelial cell migration in the intestine. *Cell Biol Int*, 20, 139-46.
- Hegde, M., Ferber, M., Mao, R., Samowitz, W. & Ganguly, A. 2013. ACMG technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and MYH-associated polyposis). *Genet Med*.
- Heinemann, V., Douillard, J. Y., Ducreux, M. & Peeters, M. 2013. Targeted therapy in metastatic colorectal cancer -- an example of personalised medicine in action. *Cancer Treat Rev*, 39, 592-601.
- Heinemann, V., Stintzing, S., Kirchner, T., Boeck, S. & Jung, A. 2009. Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treat Rev*, 35, 262-71.
- Hendriks, Y., Franken, P., Dierssen, J. W., De Leeuw, W., Wijnen, J., Dreef, E., Tops, C., Breuning, M., Brocker-Vriends, A., Vasen, H., Fodde, R. & Morreau, H. 2003. Conventional and tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair in hereditary colorectal tumors. *Am J Pathol*, 162, 469-77.
- Herman, J. G., Umar, A., Polyak, K., Graff, J. R., Ahuja, N., Issa, J. P., Markowitz, S., Willson, J. K., Hamilton, S. R., Kinzler, K. W., Kane, M. F., Kolodner, R. D., Vogelstein, B., Kunkel, T. A. & Baylin, S. B. 1998. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6870-5.
- Hermsen, M., Postma, C., Baak, J., Weiss, M., Rapallo, A., Sciotto, A., Roemen, G., Arends, J. W., Williams, R., Giaretti, W., De Goeij, A. & Meijer, G. 2002. Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology*, 123, 1109-19.

- Hiraoka, S., Kato, J., Fujiki, S., Kaji, E., Morikawa, T., Murakami, T., Nawa, T., Kuriyama, M., Uraoka, T., Ohara, N. & Yamamoto, K. 2010. The presence of large serrated polyps increases risk for colorectal cancer. *Gastroenterology*, 139, 1503-10, 1510 e1-3.
- Hitchins, M., Williams, R., Cheong, K., Halani, N., Lin, V. A., Packham, D., Ku, S., Buckle, A., Hawkins, N., Burn, J., Gallinger, S., Goldblatt, J., Kirk, J., Tomlinson, I., Scott, R., Spigelman, A., Suter, C., Martin, D., Suthers, G. & Ward, R. 2005. MLH1 germline epimutations as a factor in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology*, 129, 1392-9.
- Hitchins, M. P. 2013. The role of epigenetics in Lynch syndrome. *Fam Cancer*, 12, 189-205.
- Hitchins, M. P., Owens, S. E., Kwok, C. T., Godsmark, G., Algar, U. F. & Ramesar, R. S. 2011. Identification of new cases of early-onset colorectal cancer with an MLH1 epimutation in an ethnically diverse South African cohort. *Clin Genet*, 80, 428-34.
- Hitchins, M. P. & Ward, R. L. 2009. Constitutional (germline) MLH1 epimutation as an aetiological mechanism for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet*, 46, 793-802.
- Hitchins, M. P., Wong, J. J., Suthers, G., Suter, C. M., Martin, D. I., Hawkins, N. J. & Ward, R. L. 2007. Inheritance of a cancer-associated MLH1 germ-line epimutation. *N Engl J Med*, 356, 697-705.
- Hopper, J. L. 2005. Application of genetics to the prevention of colorectal cancer. *Recent Results Cancer Res*, 166, 17-33.
- Houlston, R., Crabtree, M., Phillips, R. & Tomlinson, I. 2001. Explaining differences in the severity of familial adenomatous polyposis and the search for modifier genes. *Gut*, 48, 1-5.
- Howe, G. R., Benito, E., Castelletto, R., Cornee, J., Esteve, J., Gallagher, R. P., Iscovich, J. M., Deng-Ao, J., Kaaks, R., Kune, G. A. & Et Al. 1992. Dietary intake of fiber and decreased risk of cancers of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. *J Natl Cancer Inst*, 84, 1887-96.
- Huggett, J. F. & Whale, A. 2013. Digital PCR as a novel technology and its potential implications for molecular diagnostics. *Clin Chem*, 59, 1691-3.
- Hughes, L. A., Khalid-De Bakker, C. A., Smits, K. M., Van Den Brandt, P. A., Jonkers, D., Ahuja, N., Herman, J. G., Weijenberg, M. P. & Van Engeland, M. 2012. The CpG island methylator phenotype in colorectal cancer: progress and problems. *Biochim Biophys Acta*, 1825, 77-85.
- Humphries, A., Cereser, B., Gay, L. J., Miller, D. S., Das, B., Gutteridge, A., Elia, G., Nye, E., Jeffery, R., Poulson, R., Novelli, M. R., Rodriguez-Justo, M., McDonald, S. A., Wright, N. A. & Graham, T. A. 2013. Lineage tracing reveals multipotent stem cells maintain human adenomas and the pattern of clonal expansion in tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, E2490-9.
- Humphries, A. & Wright, N. A. 2008. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 8, 415-24.
- Hutter, R. V. & Sobin, L. H. 1986. A universal staging system for cancer of the colon and rectum. Let there be light. *Arch Pathol Lab Med*, 110, 367-8.
- Huxley, R. R., Ansary-Moghaddam, A., Clifton, P., Czernichow, S., Parr, C. L. & Woodward, M. 2009. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer*, 125, 171-80.

- Iacopetta, B., Grieu, F. & Amanuel, B. 2010. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Asia Pac J Clin Oncol*, 6, 260-9.
- Iacopetta, B., Li, W. Q., Grieu, F., Ruszkiewicz, A. & Kawakami, K. 2006. BRAF mutation and gene methylation frequencies of colorectal tumours with microsatellite instability increase markedly with patient age. *Gut*, 55, 1213-4.
- Ibrahem, S., Seth, R., O'sullivan, B., Fadhil, W., Taniere, P. & Ilyas, M. 2010. Comparative analysis of pyrosequencing and QMC-PCR in conjunction with high resolution melting for KRAS/BRAF mutation detection. *Int J Exp Pathol*, 91, 500-5.
- Imai, K. & Yamamoto, H. 2008. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis*, 29, 673-80.
- Improta, G., Zupa, A., Possidente, L., Tartarone, A., Pedicini, P., Nappi, A., Molinari, S., Fraggetta, F. & Vita, G. 2013. Coexistence of two different mutations in codon 12 of the Kras gene in colorectal cancer: Report of a case supporting the concept of tumoral heterogeneity. *Oncol Lett*, 5, 1741-1743.
- Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D. & Perucho, M. 1993. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*, 363, 558-61.
- Ireland, H., Houghton, C., Howard, L. & Winton, D. J. 2005. Cellular inheritance of a Cre-activated reporter gene to determine Paneth cell longevity in the murine small intestine. *Dev Dyn*, 233, 1332-6.
- Ishii, M., Sugai, T., Habano, W. & Nakamura, S. 2004. Analysis of Ki-ras gene mutations within the same tumor using a single tumor crypt in colorectal carcinomas. *J Gastroenterol*, 39, 544-9.
- Isidro, G., Laranjeira, F., Pires, A., Leite, J., Regateiro, F., Castro E Sousa, F., Soares, J., Castro, C., Giria, J., Brito, M. J., Medeira, A., Teixeira, R., Morna, H., Gaspar, I., Marinho, C., Jorge, R., Brehm, A., Ramos, J. S. & Boavida, M. G. 2004. Germline MUTYH (MYH) mutations in Portuguese individuals with multiple colorectal adenomas. *Hum Mutat*, 24, 353-4.
- Isler, J. A., Vesterqvist, O. E. & Burczynski, M. E. 2007. Analytical validation of genotyping assays in the biomarker laboratory. *Pharmacogenomics*, 8, 353-68.

- Jackson, G. L., Zullig, L. L., Zafar, S. Y., Powell, A. A., Ordin, D. L., Gellad, Z. F., Abbott, D., Schlosser, J. M., Hersh, J. & Provenzale, D. 2013. Using NCCN clinical practice guidelines in oncology to measure the quality of colorectal cancer care in the veterans health administration. *J Natl Compr Canc Netw*, 11, 431-41.
- Jarvinen, H. J., Aarnio, M., Mustonen, H., Aktan-Collan, K., Aaltonen, L. A., Peltomaki, P., De La Chapelle, A. & Mecklin, J. P. 2000. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology*, 118, 829-34.

- Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W. & Burt, R. W. 2010. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*, 138, 2044-58.
- Jass, J. R. 2006. Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: the rise and fall of a confusing term. *World J Gastroenterol*, 12, 4943-50.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. & Forman, D. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61, 69-90.
- Jin, M., Hampel, H., Zhou, X., Schunemann, L., Yearsley, M. & Frankel, W. L. 2013. BRAF V600E mutation analysis simplifies the testing algorithm for Lynch syndrome. *Am J Clin Pathol*, 140, 177-83.
- Johnson, I. T. 2004. New approaches to the role of diet in the prevention of cancers of the alimentary tract. *Mutat Res*, 551, 9-28.
- Johnson, I. T. & Lund, E. K. 2007. Review article: nutrition, obesity and colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther*, 26, 161-81.
- Jones, S., Emmerson, P., Maynard, J., Best, J. M., Jordan, S., Williams, G. T., Sampson, J. R. & Cheadle, J. P. 2002. Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C->T:A mutations. *Hum Mol Genet*, 11, 2961-7.
- Julie, C., Tresallet, C., Brouquet, A., Vallot, C., Zimmermann, U., Mitry, E., Radvanyi, F., Rouleau, E., Lidereau, R., Coulet, F., Olschwang, S., Frebourg, T., Rougier, P., Nordlinger, B., Laurent-Puig, P., Penna, C., Boileau, C., Franc, B., Muti, C. & Hofmann-Radvanyi, H. 2008. Identification in daily practice of patients with Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer): revised Bethesda guidelines-based approach versus molecular screening. *Am J Gastroenterol*, 103, 2825-35; quiz 2836.

K

- Kambara, T., Simms, L. A., Whitehall, V. L., Spring, K. J., Wynter, C. V., Walsh, M. D., Barker, M. A., Arnold, S., MCGivern, A., Matsubara, N., Tanaka, N., Higuchi, T., Young, J., Jass, J. R. & Leggett, B. A. 2004. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut*, 53, 1137-44.
- Kaneda, A. & Feinberg, A. P. 2005. Loss of imprinting of IGF2: a common epigenetic modifier of intestinal tumor risk. *Cancer Res*, 65, 11236-40.
- Kaneda, A. & Yagi, K. 2011. Two groups of DNA methylation markers to classify colorectal cancer into three epigenotypes. *Cancer Sci*, 102, 18-24.
- Kang, H. & Shibata, D. 2013. Direct Measurements of Human Colon Crypt Stem Cell Niche Genetic Fidelity: The Role of Chance in Non-Darwinian Mutation Selection. *Front Oncol*, 3, 264.
- Karsa, L. V., Lignini, T. A., Patnick, J., Lambert, R. & Sauvaget, C. 2010. The dimensions of the CRC problem. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 24, 381-96.
- Kastrinos, F., Mukherjee, B., Tayob, N., Wang, F., Sparr, J., Raymond, V. M., Bandipalliam, P., Stoffel, E. M., Gruber, S. B. & Syngal, S. 2009. Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. *JAMA*, 302, 1790-5.
- Khambata-Ford, S., Garrett, C. R., Meropol, N. J., Basik, M., Harbison, C. T., Wu, S., Wong, T. W., Huang, X., Takimoto, C. H., Godwin, A. K., Tan, B. R., Krishnamurthi, S. S., Burris, H. A., 3rd,

- Poplin, E. A., Hidalgo, M., Baselga, J., Clark, E. A. & Mauro, D. J. 2007. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol*, 25, 3230-7.
- Kim, K. A., Kakitani, M., Zhao, J., Oshima, T., Tang, T., Binnerts, M., Liu, Y., Boyle, B., Park, E., Emtage, P., Funk, W. D. & Tomizuka, K. 2005. Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science*, 309, 1256-9.
- Kim, K. M. & Shibata, D. 2002. Methylation reveals a niche: stem cell succession in human colon crypts. *Oncogene*, 21, 5441-9.
- Kim, K. M. & Shibata, D. 2004. Tracing ancestry with methylation patterns: most crypts appear distantly related in normal adult human colon. *BMC Gastroenterol*, 4, 8.
- Kim, Y. H., Kakar, S., Cun, L., Deng, G. & Kim, Y. S. 2008. Distinct CpG island methylation profiles and BRAF mutation status in serrated and adenomatous colorectal polyps. *Int J Cancer*, 123, 2587-93.
- Kim, Y. I. 2000. AGA technical review: impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. *Gastroenterology*, 118, 1235-57.
- Kim, Y. S. & Deng, G. 2007. Epigenetic changes (aberrant DNA methylation) in colorectal neoplasia. *Gut Liver*, 1, 1-11.
- Kinzler K. W., V. B. 1998. *Colorectal tumors. The genetic basis of human cancer.*, New York, McGraw-Hill.
- Kinzler, K. W., Nilbert, M. C., Su, L. K., Vogelstein, B., Bryan, T. M., Levy, D. B., Smith, K. J., Preisinger, A. C., Hedge, P., Mckechnie, D. & Et Al. 1991. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*, 253, 661-5.
- Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87, 159-70.
- Klaus, A. & Birchmeier, W. 2008. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer*, 8, 387-98.
- Knudsen, A. L., Bulow, S., Tomlinson, I., Moslein, G., Heinimann, K. & Christensen, I. J. 2010. Attenuated familial adenomatous polyposis: results from an international collaborative study. *Colorectal Dis*, 12, e243-9.
- Knudson, A. G. 1993. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 10914-21.
- Knudson, A. G., Jr. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68, 820-3.
- Kosinski, C., Stange, D. E., Xu, C., Chan, A. S., Ho, C., Yuen, S. T., Mifflin, R. C., Powell, D. W., Clevers, H., Leung, S. Y. & Chen, X. 2010. Indian hedgehog regulates intestinal stem cell fate through epithelial-mesenchymal interactions during development. *Gastroenterology*, 139, 893-903.
- Kovacs, M. E., Papp, J., Szentirmay, Z., Otto, S. & Olah, E. 2009. Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum Mutat*, 30, 197-203.
- Kreso, A., O'brien, C. A., Van Galen, P., Gan, O. I., Notta, F., Brown, A. M., Ng, K., Ma, J., Wienholds, E., Dunant, C., Pollett, A., Gallinger, S., Mcpherson, J., Mullighan, C. G., Shibata, D. & Dick,

J. E. 2013. Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science*, 339, 543-8.

L

Laird, P. W. 2005. Cancer epigenetics. *Hum Mol Genet*, 14 Spec No 1, R65-76.

Laken, S. J., Petersen, G. M., Gruber, S. B., Oddoux, C., Ostrer, H., Giardiello, F. M., Hamilton, S. R., Hampel, H., Markowitz, A., Klimstra, D., Jhanwar, S., Winawer, S., Offit, K., Luce, M. C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. 1997. Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nat Genet*, 17, 79-83.

Lamlum, H., Ilyas, M., Rowan, A., Clark, S., Johnson, V., Bell, J., Frayling, I., Efstathiou, J., Pack, K., Payne, S., Roylance, R., Gorman, P., Sheer, D., Neale, K., Phillips, R., Talbot, I., Bodmer, W. & Tomlinson, I. 1999. The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis. *Nat Med*, 5, 1071-5.

Lastella, P., Surdo, N. C., Resta, N., Guanti, G. & Stella, A. 2006. In silico and in vivo splicing analysis of MLH1 and MSH2 missense mutations shows exon- and tissue-specific effects. *BMC Genomics*, 7, 243.

Leach, F. S., Nicolaides, N. C., Papadopoulos, N., Liu, B., Jen, J., Parsons, R., Peltomaki, P., Sistonen, P., Aaltonen, L. A., Nystrom-Lahti, M. & Et Al. 1993. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell*, 75, 1215-25.

Leblond, C. P. & Stevens, C. E. 1948. The constant renewal of the intestinal epithelium in the albino rat. *Anat Rec*, 100, 357-77.

Leblond, C. P. & Walker, B. E. 1956. Renewal of cell populations. *Physiol Rev*, 36, 255-76.

Leggett, B. & Whitehall, V. 2010. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, 138, 2088-100.

Lehmann, U. 2008. Re: Rahner et al. Coexisting somatic promoter hypermethylation and pathogenic MLH1 germline mutation in Lynch syndrome. *J Pathol* 2008; 214: 10-16. *J Pathol*, 215, 97; author reply 98.

Leppert, M., Dobbs, M., Scambler, P., O'connell, P., Nakamura, Y., Stauffer, D., Woodward, S., Burt, R., Hughes, J., Gardner, E. & Et Al. 1987. The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5. *Science*, 238, 1411-3.

Li, J. & Makrigiorgos, G. M. 2009. COLD-PCR: a new platform for highly improved mutation detection in cancer and genetic testing. *Biochem Soc Trans*, 37, 427-32.

Li, J., Wang, L., Mamon, H., Kulke, M. H., Berbeco, R. & Makrigiorgos, G. M. 2008. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nat Med*, 14, 579-84.

Li, L. & Clevers, H. 2010. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science*, 327, 542-5.

Li, V. S., Ng, S. S., Boersema, P. J., Low, T. Y., Karthaus, W. R., Gerlach, J. P., Mohammed, S., Heck, A. J., Maurice, M. M., Mahmoudi, T. & Clevers, H. 2012. Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell*, 149, 1245-56.

- Lievre, A., Bachet, J. B., Le Corre, D., Boige, V., Landi, B., Emile, J. F., Cote, J. F., Tomasic, G., Penna, C., Ducreux, M., Rougier, P., Penault-Llorca, F. & Laurent-Puig, P. 2006. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res*, 66, 3992-5.
- Ligtenberg, M. J., Kuiper, R. P., Chan, T. L., Goossens, M., Hebeda, K. M., Voorendt, M., Lee, T. Y., Bodmer, D., Hoenselaar, E., Hendriks-Cornelissen, S. J., Tsui, W. Y., Kong, C. K., Brunner, H. G., Van Kessel, A. G., Yuen, S. T., Van Krieken, J. H., Leung, S. Y. & Hoogerbrugge, N. 2009. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet*, 41, 112-7.
- Linardou, H., Briasoulis, E., Dahabreh, I. J., Mountzios, G., Papadimitriou, C., Papadopoulos, S., Bafaloukos, D., Kosmidis, P. & Murray, S. 2011. All about KRAS for clinical oncology practice: gene profile, clinical implications and laboratory recommendations for somatic mutational testing in colorectal cancer. *Cancer Treat Rev*, 37, 221-33.
- Lipton, L., Halford, S. E., Johnson, V., Novelli, M. R., Jones, A., Cummings, C., Barclay, E., Sieber, O., Sadat, A., Bisgaard, M. L., Hodgson, S. V., Aaltonen, L. A., Thomas, H. J. & Tomlinson, I. P. 2003. Carcinogenesis in MYH-associated polyposis follows a distinct genetic pathway. *Cancer Res*, 63, 7595-9.
- Loeb, L. A., Loeb, K. R. & Anderson, J. P. 2003. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 776-81.
- Loeb, L. A., Springgate, C. F. & Battula, N. 1974. Errors in DNA replication as a basis of malignant changes. *Cancer Res*, 34, 2311-21.
- Lopez-Garcia, C., Klein, A. M., Simons, B. D. & Winton, D. J. 2010. Intestinal stem cell replacement follows a pattern of neutral drift. *Science*, 330, 822-5.
- Losi, L., Baisse, B., Bouzourene, H. & Benhattar, J. 2005. Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression. *Carcinogenesis*, 26, 916-22.
- Loughrey, M. B., Waring, P. M., Tan, A., Trivett, M., Kovalenko, S., Beshay, V., Young, M. A., McArthur, G., Boussioutas, A. & Dobrovic, A. 2007. Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Fam Cancer*, 6, 301-10.
- Lubbe, S. J., Di Bernardo, M. C., Broderick, P., Chandler, I. & Houlston, R. S. 2012. Comprehensive evaluation of the impact of 14 genetic variants on colorectal cancer phenotype and risk. *Am J Epidemiol*, 175, 1-10.
- Luchtenborg, M., Weijenberg, M. P., Wark, P. A., Saritas, A. M., Roemen, G. M., Van Muijen, G. N., De Bruine, A. P., Van Den Brandt, P. A. & De Goeij, A. F. 2005. Mutations in APC, CTNNB1 and K-ras genes and expression of hMLH1 in sporadic colorectal carcinomas from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer*, 5, 160.
- Lynch, H. T. & De La Chapelle, A. 2003. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*, 348, 919-32.
- Lynch, H. T., Lynch, J. F. & Attard, T. A. 2009. Diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes: Lynch syndrome as a model. *CMAJ*, 181, 273-80.
- Lynch, P. M. 2009. The hMSH2 and hMLH1 genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Surg Oncol Clin N Am*, 18, 611-24.

Llor, X., Pons, E., Xicola, R. M., Castells, A., Alenda, C., Pinol, V., Andreu, M., Castellvi-Bel, S., Paya, A., Jover, R., Bessa, X., Giros, A., Roca, A. & Gassull, M. A. 2005. Differential features of colorectal cancers fulfilling Amsterdam criteria without involvement of the mutator pathway. *Clin Cancer Res*, 11, 7304-10.

M

Madison, B. B., Braunstein, K., Kuizon, E., Portman, K., Qiao, X. T. & Gumucio, D. L. 2005. Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development*, 132, 279-89.

Malumbres, M. & Barbacid, M. 2003. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*, 3, 459-65.

Marinari, E., Mehonic, A., Curran, S., Gale, J., Duke, T. & Baum, B. 2012. Live-cell delamination counterbalances epithelial growth to limit tissue overcrowding. *Nature*, 484, 542-5.

Marshman, E., Booth, C. & Potten, C. S. 2002. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays*, 24, 91-8.

Mas, A., Lopez-Galindez, C., Cacho, I., Gomez, J. & Martinez, M. A. 2010. Unfinished stories on viral quasispecies and Darwinian views of evolution. *J Mol Biol*, 397, 865-77.

Mazutis, L., Gilbert, J., Ung, W. L., Weitz, D. A., Griffiths, A. D. & Heyman, J. A. 2013. Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nat Protoc*, 8, 870-91.

Mccourt, C. M., Mcart, D. G., Mills, K., Catherwood, M. A., Maxwell, P., Waugh, D. J., Hamilton, P., O'sullivan, J. M. & Salto-Tellez, M. 2013. Validation of next generation sequencing technologies in comparison to current diagnostic gold standards for BRAF, EGFR and KRAS mutational analysis. *PLoS One*, 8, e69604.

Mcgovern, A., Wynter, C. V., Whitehall, V. L., Kambara, T., Spring, K. J., Walsh, M. D., Barker, M. A., Arnold, S., Simms, L. A., Leggett, B. A., Young, J. & Jass, J. R. 2004. Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. *Fam Cancer*, 3, 101-7.

Mclellan, E. A. & Bird, R. P. 1988. Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the murine colon. *Cancer Res*, 48, 6187-92.

Medema, J. P. 2013. Cancer stem cells: the challenges ahead. *Nat Cell Biol*, 15, 338-44.

Medema, J. P. & Vermeulen, L. 2011. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*, 474, 318-26.

Merlo, L. M., Pepper, J. W., Reid, B. J. & Maley, C. C. 2006. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*, 6, 924-35.

Mertes, F., Elsharawy, A., Sauer, S., Van Helvoort, J. M., Van Der Zaag, P. J., Franke, A., Nilsson, M., Lehrach, H. & Brookes, A. J. 2011. Targeted enrichment of genomic DNA regions for next-generation sequencing. *Brief Funct Genomics*, 10, 374-86.

Michor, F., Frank, S. A., May, R. M., Iwasa, Y. & Nowak, M. A. 2003. Somatic selection for and against cancer. *J Theor Biol*, 225, 377-82.

Milano, J., Mckay, J., Dagenais, C., Foster-Brown, L., Pognan, F., Gadiant, R., Jacobs, R. T., Zacco, A., Greenberg, B. & Ciaccio, P. J. 2004. Modulation of notch processing by gamma-secretase

- inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation. *Toxicol Sci*, 82, 341-58.
- Milbury, C. A., Li, J. & Makrigiorgos, G. M. 2011. Ice-COLD-PCR enables rapid amplification and robust enrichment for low-abundance unknown DNA mutations. *Nucleic Acids Res*, 39, e2.
- Misale, S., Yaeger, R., Hobor, S., Scala, E., Janakiraman, M., Liska, D., Valtorta, E., Schiavo, R., Buscarino, M., Siravegna, G., Bencardino, K., Cercek, A., Chen, C. T., Veronese, S., Zanon, C., Sartore-Bianchi, A., Gambacorta, M., Gallicchio, M., Vakiani, E., Boscaro, V., Medico, E., Weiser, M., Siena, S., Di Nicolantonio, F., Solit, D. & Bardelli, A. 2012. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*, 486, 532-6.
- Mitry, E., Bouvier, A. M., Esteve, J. & Faivre, J. 2002. Benefit of operative mortality reduction on colorectal cancer survival. *Br J Surg*, 89, 1557-62.
- Miyaki, M., Konishi, M., Kikuchi-Yanoshita, R., Enomoto, M., Igari, T., Tanaka, K., Muraoka, M., Takahashi, H., Amada, Y., Fukayama, M. & Et Al. 1994. Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer Res*, 54, 3011-20.
- Miyaki, M., Konishi, M., Tanaka, K., Kikuchi-Yanoshita, R., Muraoka, M., Yasuno, M., Igari, T., Koike, M., Chiba, M. & Mori, T. 1997. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet*, 17, 271-2.
- Miyakura, Y., Sugano, K., Akasu, T., Yoshida, T., Maekawa, M., Saitoh, S., Sasaki, H., Nomizu, T., Konishi, F., Fujita, S., Moriya, Y. & Nagai, H. 2004. Extensive but hemiallelic methylation of the hMLH1 promoter region in early-onset sporadic colon cancers with microsatellite instability. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2, 147-56.
- Miyoshi, Y., Nagase, H., Ando, H., Horii, A., Ichii, S., Nakatsuru, S., Aoki, T., Miki, Y., Mori, T. & Nakamura, Y. 1992. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet*, 1, 229-33.
- Molenaar, J. J., Koster, J., Zwiijnenburg, D. A., Van Sluis, P., Valentijn, L. J., Van Der Ploeg, I., Hamdi, M., Van Nes, J., Westerman, B. A., Van Arkel, J., Ebus, M. E., Haneveld, F., Lakeman, A., Schild, L., Molenaar, P., Stroeken, P., Van Noesel, M. M., Ora, I., Santo, E. E., Caron, H. N., Westerhout, E. M. & Versteeg, R. 2012. Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. *Nature*, 483, 589-93.
- Molinari, F., Felicioni, L., Buscarino, M., De Dosso, S., Buttitta, F., Malatesta, S., Movilia, A., Luoni, M., Boldorini, R., Alabiso, O., Girlando, S., Soini, B., Spitale, A., Di Nicolantonio, F., Saletti, P., Crippa, S., Mazzucchelli, L., Marchetti, A., Bardelli, A. & Frattini, M. 2011. Increased detection sensitivity for KRAS mutations enhances the prediction of anti-EGFR monoclonal antibody resistance in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 17, 4901-14.
- Montera, M., Piaggio, F., Marchese, C., Gismondi, V., Stella, A., Resta, N., Varesco, L., Guanti, G. & Mareni, C. 2001. A silent mutation in exon 14 of the APC gene is associated with exon skipping in a FAP family. *J Med Genet*, 38, 863-7.
- Montgomery, R. K., Carlone, D. L., Richmond, C. A., Farilla, L., Kranendonk, M. E., Henderson, D. E., Baffour-Awuah, N. Y., Ambruzs, D. M., Fogli, L. K., Algra, S. & Breault, D. T. 2011. Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 179-84.

Bibliografia

- Moon, B. S., Jeong, W. J., Park, J., Kim, T. I., Min Do, S. & Choi, K. Y. 2014. Role of Oncogenic K-Ras in Cancer Stem Cell Activation by Aberrant Wnt/beta-Catenin Signaling. *J Natl Cancer Inst*, 106, djt373.
- Morak, M., Laner, A., Bacher, U., Keiling, C. & Holinski-Feder, E. 2010. MUTYH-associated polyposis - variability of the clinical phenotype in patients with biallelic and monoallelic MUTYH mutations and report on novel mutations. *Clin Genet*, 78, 353-63.
- Morak, M., Schackert, H. K., Rahner, N., Betz, B., Ebert, M., Walldorf, C., Royer-Pokora, B., Schulmann, K., Von Knebel-Doeberitz, M., Dietmaier, W., Keller, G., Kerker, B., Leitner, G. & Holinski-Feder, E. 2008. Further evidence for heritability of an epimutation in one of 12 cases with MLH1 promoter methylation in blood cells clinically displaying HNPCC. *Eur J Hum Genet*, 16, 804-11.
- Moreira, L. 2011. [Serrated polyps: detection, risk of colorectal cancer and treatment and surveillance strategies]. *Gastroenterol Hepatol*, 34 Suppl 2, 73-7.
- Moreira, L., Balaguer, F., Lindor, N., De La Chapelle, A., Hampel, H., Aaltonen, L. A., Hopper, J. L., Le Marchand, L., Gallinger, S., Newcomb, P. A., Haile, R., Thibodeau, S. N., Gunawardena, S., Jenkins, M. A., Buchanan, D. D., Potter, J. D., Baron, J. A., Ahnen, D. J., Moreno, V., Andreu, M., Ponz De Leon, M., Rustgi, A. K. & Castells, A. 2012. Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *JAMA*, 308, 1555-65.
- Moyer, M. P. 1983. Culture of human gastrointestinal epithelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med*, 174, 12-5.
- Moyer, M. P. & Aust, J. B. 1984. Human colon cells: culture and in vitro transformation. *Science*, 224, 1445-7.
- Mvundura, M., Grosse, S. D., Hampel, H. & Palomaki, G. E. 2010. The cost-effectiveness of genetic testing strategies for Lynch syndrome among newly diagnosed patients with colorectal cancer. *Genet Med*, 12, 93-104.
- Myers, E. A., Feingold, D. L., Forde, K. A., Arnell, T., Jang, J. H. & Whelan, R. L. 2013. Colorectal cancer in patients under 50 years of age: a retrospective analysis of two institutions' experience. *World J Gastroenterol*, 19, 5651-7.

N

- Nadauld, L. D., Phelps, R., Moore, B. C., Eisinger, A., Sandoval, I. T., Chidester, S., Peterson, P. W., Manos, E. J., Sklow, B., Burt, R. W. & Jones, D. A. 2006. Adenomatous polyposis coli control of C-terminal binding protein-1 stability regulates expression of intestinal retinol dehydrogenases. *J Biol Chem*, 281, 37828-35.
- Nagasaka, T., Sasamoto, H., Notohara, K., Cullings, H. M., Takeda, M., Kimura, K., Kambara, T., Macphee, D. G., Young, J., Leggett, B. A., Jass, J. R., Tanaka, N. & Matsubara, N. 2004. Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS, and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation. *J Clin Oncol*, 22, 4584-94.
- Nagase, H., Miyoshi, Y., Horii, A., Aoki, T., Ogawa, M., Utsunomiya, J., Baba, S., Sasazuki, T. & Nakamura, Y. 1992. Correlation between the location of germ-line mutations in the APC gene and the number of colorectal polyps in familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res*, 52, 4055-7.

- Nakamura, S., Goto, J., Kitayama, M. & Kino, I. 1994. Application of the crypt-isolation technique to flow-cytometric analysis of DNA content in colorectal neoplasms. *Gastroenterology*, 106, 100-7.
- Nakamura, S. & Kino, I. 1984. Morphogenesis of minute adenomas in familial polyposis coli. *J Natl Cancer Inst*, 73, 41-9.
- Nathke, I. S. 2004. The adenomatous polyposis coli protein: the Achilles heel of the gut epithelium. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, 337-66.
- Navin, N., Kendall, J., Troge, J., Andrews, P., Rodgers, L., Mcindoo, J., Cook, K., Stepansky, A., Levy, D., Esposito, D., Muthuswamy, L., Krasnitz, A., Mccombie, W. R., Hicks, J. & Wigler, M. 2011. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*, 472, 90-4.
- Nicolaides, N. C., Papadopoulos, N., Liu, B., Wei, Y. F., Carter, K. C., Ruben, S. M., Rosen, C. A., Haseltine, W. A., Fleischmann, R. D., Fraser, C. M. & Et Al. 1994. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*, 371, 75-80.
- Nielsen, M., Joerink-Van De Beld, M. C., Jones, N., Vogt, S., Tops, C. M., Vasen, H. F., Sampson, J. R., Aretz, S. & Hes, F. J. 2009. Analysis of MUTYH genotypes and colorectal phenotypes in patients With MUTYH-associated polyposis. *Gastroenterology*, 136, 471-6.
- Nielsen, M., Poley, J. W., Verhoef, S., Van Puijenbroek, M., Weiss, M. M., Burger, G. T., Dommering, C. J., Vasen, H. F., Kuipers, E. J., Wagner, A., Morreau, H. & Hes, F. J. 2006. Duodenal carcinoma in MUTYH-associated polyposis. *J Clin Pathol*, 59, 1212-5.
- Niessen, R. C., Hofstra, R. M., Westers, H., Ligtenberg, M. J., Kooi, K., Jager, P. O., De Groote, M. L., Dijkhuizen, T., Olderde-Berends, M. J., Hollema, H., Kleibeuker, J. H. & Sijmons, R. H. 2009. Germline hypermethylation of MLH1 and EPCAM deletions are a frequent cause of Lynch syndrome. *Genes Chromosomes Cancer*, 48, 737-44.
- Nieuwenhuis, M. H. & Vasen, H. F. 2007. Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol*, 61, 153-61.
- Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H., Horii, A., Koyama, K., Utsunomiya, J., Baba, S. & Hedge, P. 1991. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*, 253, 665-9.
- Noffsinger, A. E. 2009. Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. *Annu Rev Pathol*, 4, 343-64.
- Norat, T., Lukanova, A., Ferrari, P. & Riboli, E. 2002. Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer*, 98, 241-56.
- Nordling, C. O. 1953. A new theory on cancer-inducing mechanism. *Br J Cancer*, 7, 68-72.
- Novelli, M. R., Williamson, J. A., Tomlinson, I. P., Elia, G., Hodgson, S. V., Talbot, I. C., Bodmer, W. F. & Wright, N. A. 1996. Polyclonal origin of colonic adenomas in an XO/XY patient with FAP. *Science*, 272, 1187-90.
- Nowell, P. C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194, 23-8.

O

- Obrador-Hevia, A., Chin, S. F., Gonzalez, S., Rees, J., Vilardell, F., Greenson, J. K., Cordero, D., Moreno, V., Caldas, C. & Capella, G. 2010. Oncogenic KRAS is not necessary for Wnt signalling activation in APC-associated FAP adenomas. *J Pathol*, 221, 57-67.
- Oehler, V. G., Qin, J., Ramakrishnan, R., Facer, G., Ananthnarayan, S., Cummings, C., Deininger, M., Shah, N., McCormick, F., Willis, S., Daridon, A., Unger, M. & Radich, J. P. 2009. Absolute quantitative detection of ABL tyrosine kinase domain point mutations in chronic myeloid leukemia using a novel nanofluidic platform and mutation-specific PCR. *Leukemia*, 23, 396-9.
- Ogino, S., Odze, R. D., Kawasaki, T., Brahmandam, M., Kirkner, G. J., Laird, P. W., Loda, M. & Fuchs, C. S. 2006. Correlation of pathologic features with CpG island methylator phenotype (CIMP) by quantitative DNA methylation analysis in colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 30, 1175-83.
- Ohtsubo, T., Nishioka, K., Imaiso, Y., Iwai, S., Shimokawa, H., Oda, H., Fujiwara, T. & Nakabeppu, Y. 2000. Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. *Nucleic Acids Res*, 28, 1355-64.
- Oka, S. & Nakabeppu, Y. 2011. DNA glycosylase encoded by MUTYH functions as a molecular switch for programmed cell death under oxidative stress to suppress tumorigenesis. *Cancer Sci*, 102, 677-82.
- Otori, K., Konishi, M., Sugiyama, K., Hasebe, T., Shimoda, T., Kikuchi-Yanoshita, R., Mukai, K., Fukushima, S., Miyaki, M. & Esumi, H. 1998. Infrequent somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in aberrant crypt foci of human colon tissue. *Cancer*, 83, 896-900.
- Out, A. A., Tops, C. M., Nielsen, M., Weiss, M. M., Van Minderhout, I. J., Fokkema, I. F., Buisine, M. P., Claes, K., Colas, C., Fodde, R., Fostira, F., Franken, P. F., Gaustadnes, M., Heinemann, K., Hodgson, S. V., Hogervorst, F. B., Holinski-Feder, E., Lagerstedt-Robinson, K., Olschwang, S., Van Den Ouweland, A. M., Redeker, E. J., Scott, R. J., Vankeirsbilck, B., Gronlund, R. V., Wijnen, J. T., Wikman, F. P., Aretz, S., Sampson, J. R., Devilee, P., Den Dunnen, J. T. & Hes, F. J. 2010. Leiden Open Variation Database of the MUTYH gene. *Hum Mutat*, 31, 1205-15.

P

- Pagliarini, R. A. & Xu, T. 2003. A genetic screen in Drosophila for metastatic behavior. *Science*, 302, 1227-31.
- Park, H. S., Goodlad, R. A. & Wright, N. A. 1995. Crypt fission in the small intestine and colon. A mechanism for the emergence of G6PD locus-mutated crypts after treatment with mutagens. *Am J Pathol*, 147, 1416-27.
- Parsons, B. L. 2008. Many different tumor types have polyclonal tumor origin: evidence and implications. *Mutat Res*, 659, 232-47.
- Parsons, B. L. & Myers, M. B. 2013. Personalized cancer treatment and the myth of KRAS wild-type colon tumors. *Discov Med*, 15, 259-67.

- Parsons, D. W., Li, M., Zhang, X., Jones, S., Leary, R. J., Lin, J. C., Boca, S. M., Carter, H., Samayoa, J., Bettegowda, C., Gallia, G. L., Jallo, G. I., Binder, Z. A., Nikolsky, Y., Hartigan, J., Smith, D. R., Gerhard, D. S., Fults, D. W., Vandenberg, S., Berger, M. S., Marie, S. K., Shinjo, S. M., Clara, C., Phillips, P. C., Minturn, J. E., Biegel, J. A., Judkins, A. R., Resnick, A. C., Storm, P. B., Curran, T., He, Y., Rasheed, B. A., Friedman, H. S., Keir, S. T., Mclendon, R., Northcott, P. A., Taylor, M. D., Burger, P. C., Riggins, G. J., Karchin, R., Parmigiani, G., Bigner, D. D., Yan, H., Papadopoulos, N., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. & Velculescu, V. E. 2011. The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma. *Science*, 331, 435-9.
- Parsons, M. T., Buchanan, D. D., Thompson, B., Young, J. P. & Spurdle, A. B. 2012. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet*, 49, 151-7.
- Parsons, R., Li, G. M., Longley, M. J., Fang, W. H., Papadopoulos, N., Jen, J., De La Chapelle, A., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. & Modrich, P. 1993. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell*, 75, 1227-36.
- Pedroni, M., Tamassia, M. G., Percesepe, A., Roncucci, L., Benatti, P., Lanza, G., Jr., Gafa, R., Di Gregorio, C., Fante, R., Losi, L., Gallinari, L., Scorcioni, F., Vaccina, F., Rossi, G., Cesinaro, A. M. & Ponz De Leon, M. 1999. Microsatellite instability in multiple colorectal tumors. *Int J Cancer*, 81, 1-5.
- Peifer, M., Mccrea, P. D., Green, K. J., Wieschaus, E. & Gumbiner, B. M. 1992. The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J Cell Biol*, 118, 681-91.
- Pekin, D., Skhiri, Y., Baret, J. C., Le Corre, D., Mazutis, L., Salem, C. B., Millot, F., El Harrak, A., Hutchison, J. B., Larson, J. W., Link, D. R., Laurent-Puig, P., Griffiths, A. D. & Taly, V. 2011. Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab Chip*, 11, 2156-66.
- Peltomaki, P. 2005. Lynch syndrome genes. *Fam Cancer*, 4, 227-32.
- Peltomaki, P., Gao, X. & Mecklin, J. P. 2001. Genotype and phenotype in hereditary nonpolyposis colon cancer: a study of families with different vs. shared predisposing mutations. *Fam Cancer*, 1, 9-15.
- Peltomaki, P. & Vasen, H. 2004. Mutations associated with HNPCC predisposition -- Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis Markers*, 20, 269-76.
- Pena-Diaz, J. & Jiricny, J. 2012. Mammalian mismatch repair: error-free or error-prone? *Trends Biochem Sci*, 37, 206-14.
- Pentheroudakis, G., Kotoula, V., De Roock, W., Kouvatseas, G., Papakostas, P., Makatsoris, T., Papamichael, D., Xanthakis, I., Sgouros, J., Televantou, D., Kafiri, G., Tsamandas, A. C., Razis, E., Galani, E., Bafaloukos, D., Efstratiou, I., Bompolaki, I., Pectasides, D., Pavlidis, N., Tejpar, S. & Fountzilias, G. 2013. Biomarkers of benefit from cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer: interaction of EGFR ligand expression with RAS/RAF, PIK3CA genotypes. *BMC Cancer*, 13, 49.
- Perez-Carbonell, L., Alenda, C., Paya, A., Castillejo, A., Barbera, V. M., Guillen, C., Rojas, E., Acame, N., Gutierrez-Avino, F. J., Castells, A., Llor, X., Andreu, M., Soto, J. L. & Jover, R. 2010.

- Methylation analysis of MLH1 improves the selection of patients for genetic testing in Lynch syndrome. *J Mol Diagn*, 12, 498-504.
- Perez, K., Walsh, R., Brilliant, K., Noble, L., Yakirevich, E., Breese, V., Jackson, C., Chatterjee, D., Pricolo, V., Roth, L., Shah, N., Cataldo, T., Safran, H., Hixson, D. & Quesenberry, P. 2013. Heterogeneity of colorectal cancer (CRC) in reference to KRAS proto-oncogene utilizing WAVE technology. *Exp Mol Pathol*, 95, 74-82.
- Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A. L., Brown, P. O. & Botstein, D. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406, 747-52.
- Phelps, R. A., Broadbent, T. J., Stafforini, D. M. & Jones, D. A. 2009a. New perspectives on APC control of cell fate and proliferation in colorectal cancer. *Cell Cycle*, 8, 2549-56.
- Phelps, R. A., Chidester, S., Dehghanizadeh, S., Phelps, J., Sandoval, I. T., Rai, K., Broadbent, T., Sarkar, S., Burt, R. W. & Jones, D. A. 2009b. A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. *Cell*, 137, 623-34.
- Pierce, G. B. & Dixon, F. J., Jr. 1959. Testicular teratomas. I. Demonstration of teratogenesis by metamorphosis of multipotential cells. *Cancer*, 12, 573-83.
- Pineda, M., Mur, P., Iniesta, M. D., Borrás, E., Campos, O., Vargas, G., Iglesias, S., Fernández, A., Gruber, S. B., Lázaro, C., Brunet, J., Navarro, M., Blanco, I. & Capella, G. 2012. MLH1 methylation screening is effective in identifying epimutation carriers. *Eur J Hum Genet*, 20, 1256-64.
- Pinol, V., Castells, A., Andreu, M., Castellvi-Bel, S., Alenda, C., Llor, X., Xicola, R. M., Rodríguez-Moranta, F., Paya, A., Jover, R. & Bessa, X. 2005. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA*, 293, 1986-94.
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H. & Clevers, H. 2003. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev*, 17, 1709-13.
- Poonacha, T. K. & Go, R. S. 2011. Level of scientific evidence underlying recommendations arising from the National Comprehensive Cancer Network clinical practice guidelines. *J Clin Oncol*, 29, 186-91.
- Potten, C. S. 1977. Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and gamma irradiation. *Nature*, 269, 518-21.
- Potten, C. S., Gandara, R., Mahida, Y. R., Loeffler, M. & Wright, N. A. 2009. The stem cells of small intestinal crypts: where are they? *Cell Prolif*, 42, 731-50.
- Potten, C. S., Hume, W. J., Reid, P. & Cairns, J. 1978. The segregation of DNA in epithelial stem cells. *Cell*, 15, 899-906.
- Potten, C. S., Kovacs, L. & Hamilton, E. 1974. Continuous labelling studies on mouse skin and intestine. *Cell Tissue Kinet*, 7, 271-83.
- Potten, C. S. & Loeffler, M. 1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*, 110, 1001-20.

- Potten, C. S., Owen, G. & Booth, D. 2002. Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J Cell Sci*, 115, 2381-8.
- Poulogiannis, G., Frayling, I. M. & Arends, M. J. 2010a. DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Histopathology*, 56, 167-79.
- Poulogiannis, G., Ichimura, K., Hamoudi, R. A., Luo, F., Leung, S. Y., Yuen, S. T., Harrison, D. J., Wyllie, A. H. & Arends, M. J. 2010b. Prognostic relevance of DNA copy number changes in colorectal cancer. *J Pathol*, 220, 338-47.
- Poulogiannis, G., Mcintyre, R. E., Dimitriadi, M., Apps, J. R., Wilson, C. H., Ichimura, K., Luo, F., Cantley, L. C., Wyllie, A. H., Adams, D. J. & Arends, M. J. 2010c. PARK2 deletions occur frequently in sporadic colorectal cancer and accelerate adenoma development in Apc mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 15145-50.
- Preston, S. L., Wong, W. M., Chan, A. O., Poulson, R., Jeffery, R., Goodlad, R. A., Mandir, N., Elia, G., Novelli, M., Bodmer, W. F., Tomlinson, I. P. & Wright, N. A. 2003. Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. *Cancer Res*, 63, 3819-25.
- Pretlow, T. P. & Pretlow, T. G. 2005. Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): initiation of colorectal cancer? *Biochim Biophys Acta*, 1756, 83-96.

Q

- Qin, J., Jones, R. C. & Ramakrishnan, R. 2008. Studying copy number variations using a nanofluidic platform. *Nucleic Acids Res*, 36, e116.
- Quyn, A. J., Appleton, P. L., Carey, F. A., Steele, R. J., Barker, N., Clevers, H., Ridgway, R. A., Sansom, O. J. & Nathke, I. S. 2010. Spindle orientation bias in gut epithelial stem cell compartments is lost in precancerous tissue. *Cell Stem Cell*, 6, 175-81.

R

- Radtke, F. & Clevers, H. 2005. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science*, 307, 1904-9.
- Rahner, N., Friedrichs, N., Steinke, V., Aretz, S., Friedl, W., Buettner, R., Mangold, E., Propping, P. & Walldorf, C. 2008. Coexisting somatic promoter hypermethylation and pathogenic MLH1 germline mutation in Lynch syndrome. *J Pathol*, 214, 10-6.
- Rai, K., Sarkar, S., Broadbent, T. J., Voas, M., Grossmann, K. F., Nadauld, L. D., Dehghanizadeh, S., Hagos, F. T., Li, Y., Toth, R. K., Chidester, S., Bahr, T. M., Johnson, W. E., Sklow, B., Burt, R., Cairns, B. R. & Jones, D. A. 2010. DNA demethylase activity maintains intestinal cells in an undifferentiated state following loss of APC. *Cell*, 142, 930-42.
- Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. & Velculescu, V. E. 2002. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*, 418, 934.
- Raymond, V. M., Mukherjee, B., Wang, F., Huang, S. C., Stoffel, E. M., Kastrinos, F., Syngal, S., Cooney, K. A. & Gruber, S. B. 2013. Elevated risk of prostate cancer among men with Lynch syndrome. *J Clin Oncol*, 31, 1713-8.

Bibliografia

- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414, 105-11.
- Ries, L. A., Wingo, P. A., Miller, D. S., Howe, H. L., Weir, H. K., Rosenberg, H. M., Vernon, S. W., Cronin, K. & Edwards, B. K. 2000. The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer. *Cancer*, 88, 2398-424.
- Rodriguez-Bigas, M. A., Boland, C. R., Hamilton, S. R., Henson, D. E., Jass, J. R., Khan, P. M., Lynch, H., Perucho, M., Smyrk, T., Sobin, L. & Srivastava, S. 1997. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst*, 89, 1758-62.
- Roncucci, L., Medline, A. & Bruce, W. R. 1991. Classification of aberrant crypt foci and microadenomas in human colon. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1, 57-60.
- Roskoski, R., Jr. 2010. RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 399, 313-7.
- Roth, S., Franken, P., Sacchetti, A., Kremer, A., Anderson, K., Sansom, O. & Fodde, R. 2012. Paneth cells in intestinal homeostasis and tissue injury. *PLoS One*, 7, e38965.
- Rothenberg, M. E., Nusse, Y., Kalisky, T., Lee, J. J., Dalerba, P., Scheeren, F., Lobo, N., Kulkarni, S., Sim, S., Qian, D., Beachy, P. A., Pasricha, P. J., Quake, S. R. & Clarke, M. F. 2012. Identification of a cKit(+) colonic crypt base secretory cell that supports Lgr5(+) stem cells in mice. *Gastroenterology*, 142, 1195-1205 e6.
- Rowan, A. J., Lamlum, H., Ilyas, M., Wheeler, J., Straub, J., Papadopolou, A., Bicknell, D., Bodmer, W. F. & Tomlinson, I. P. 2000. APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 3352-7.
- Rustgi, A. K. 2007. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev*, 21, 2525-38.

S

- Sakatani, T., Kaneda, A., Iacobuzio-Donahue, C. A., Carter, M. G., De Boom Witzel, S., Okano, H., Ko, M. S., Ohlsson, R., Longo, D. L. & Feinberg, A. P. 2005. Loss of imprinting of Igf2 alters intestinal maturation and tumorigenesis in mice. *Science*, 307, 1976-8.
- Salovaara, R., Loukola, A., Kristo, P., Kaariainen, H., Ahtola, H., Eskelinen, M., Harkonen, N., Julkunen, R., Kangas, E., Ojala, S., Tulikoura, J., Valkamo, E., Jarvinen, H., Mecklin, J. P., Aaltonen, L. A. & De La Chapelle, A. 2000. Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 18, 2193-200.
- Samowitz, W. S., Sweeney, C., Herrick, J., Albertsen, H., Levin, T. R., Murtaugh, M. A., Wolff, R. K. & Slattery, M. L. 2005. Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. *Cancer Res*, 65, 6063-9.
- Sampson, J. R., Dolwani, S., Jones, S., Eccles, D., Ellis, A., Evans, D. G., Frayling, I., Jordan, S., Maher, E. R., Mak, T., Maynard, J., Pigatto, F., Shaw, J. & Cheadle, J. P. 2003. Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet*, 362, 39-41.
- Sanders, R., Huggett, J. F., Bushell, C. A., Cowen, S., Scott, D. J. & Foy, C. A. 2011. Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. *Anal Chem*, 83, 6474-84.

- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- Sangiorgi, E. & Capecchi, M. R. 2008. Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet*, 40, 915-20.
- Sant, M., Capocaccia, R., Coleman, M. P., Berrino, F., Gatta, G., Micheli, A., Verdecchia, A., Faivre, J., Hakulinen, T., Coebergh, J. W., Martinez-Garcia, C., Forman, D. & Zappone, A. 2001. Cancer survival increases in Europe, but international differences remain wide. *Eur J Cancer*, 37, 1659-67.
- Santarosa, M. & Ashworth, A. 2004. Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim Biophys Acta*, 1654, 105-22.
- Santini, D., Loupakis, F., Vincenzi, B., Floriani, I., Stasi, I., Canestrari, E., Rulli, E., Maltese, P. E., Andreoni, F., Masi, G., Graziano, F., Baldi, G. G., Salvatore, L., Russo, A., Perrone, G., Tommasino, M. R., Magnani, M., Falcone, A., Tonini, G. & Ruzzo, A. 2008. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *Oncologist*, 13, 1270-5.
- Sato, T., Stange, D. E., Ferrante, M., Vries, R. G., Van Es, J. H., Van Den Brink, S., Van Houdt, W. J., Pronk, A., Van Gorp, J., Siersema, P. D. & Clevers, H. 2011. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*, 141, 1762-72.
- Schepers, A. G., Snippert, H. J., Stange, D. E., Van Den Born, M., Van Es, J. H., Van De Wetering, M. & Clevers, H. 2012. Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science*, 337, 730-5.
- Schepers, A. G., Vries, R., Van Den Born, M., Van De Wetering, M. & Clevers, H. 2011. Lgr5 intestinal stem cells have high telomerase activity and randomly segregate their chromosomes. *EMBO J*, 30, 1104-9.
- Schneikert, J. & Behrens, J. 2007. The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development. *Gut*, 56, 417-25.
- Schreiner, M. A., Weiss, D. G. & Lieberman, D. A. 2010. Proximal and large hyperplastic and nondysplastic serrated polyps detected by colonoscopy are associated with neoplasia. *Gastroenterology*, 139, 1497-502.
- Schuijers, J. & Clevers, H. 2012. Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. *EMBO J*, 31, 2685-96.
- Segditsas, S. & Tomlinson, I. 2006. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene*, 25, 7531-7.
- Shibata, D., Schaeffer, J., Li, Z. H., Capella, G. & Perucho, M. 1993. Genetic heterogeneity of the c-K-ras locus in colorectal adenomas but not in adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst*, 85, 1058-63.
- Shibutani, S., Takeshita, M. & Grollman, A. P. 1991. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, 349, 431-4.
- Shih, I. M., Wang, T. L., Traverso, G., Romans, K., Hamilton, S. R., Ben-Sasson, S., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. 2001. Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 2640-5.

- Sieber, O., Heinimann, K. & Tomlinson, I. 2005. Genomic stability and tumorigenesis. *Semin Cancer Biol*, 15, 61-6.
- Sieber, O. M., Lamlum, H., Crabtree, M. D., Rowan, A. J., Barclay, E., Lipton, L., Hodgson, S., Thomas, H. J., Neale, K., Phillips, R. K., Farrington, S. M., Dunlop, M. G., Mueller, H. J., Bisgaard, M. L., Bulow, S., Fidalgo, P., Albuquerque, C., Scarano, M. I., Bodmer, W., Tomlinson, I. P. & Heinimann, K. 2002. Whole-gene APC deletions cause classical familial adenomatous polyposis, but not attenuated polyposis or "multiple" colorectal adenomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 2954-8.
- Sieber, O. M., Segditsas, S., Knudsen, A. L., Zhang, J., Luz, J., Rowan, A. J., Spain, S. L., Thirlwell, C., Howarth, K. M., Jaeger, E. E., Robinson, J., Volikos, E., Silver, A., Kelly, G., Aretz, S., Frayling, I., Hutter, P., Dunlop, M., Guenther, T., Neale, K., Phillips, R., Heinimann, K. & Tomlinson, I. P. 2006. Disease severity and genetic pathways in attenuated familial adenomatous polyposis vary greatly but depend on the site of the germline mutation. *Gut*, 55, 1440-8.
- Sjoblom, T., Jones, S., Wood, L. D., Parsons, D. W., Lin, J., Barber, T. D., Mandelker, D., Leary, R. J., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Buckhaults, P., Farrell, C., Meeh, P., Markowitz, S. D., Willis, J., Dawson, D., Willson, J. K., Gazdar, A. F., Hartigan, J., Wu, L., Liu, C., Parmigiani, G., Park, B. H., Bachman, K. E., Papadopoulos, N., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. & Velculescu, V. E. 2006. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*, 314, 268-74.
- Slorach, E. M., Campbell, F. C. & Dorin, J. R. 1999. A mouse model of intestinal stem cell function and regeneration. *J Cell Sci*, 112 Pt 18, 3029-38.
- Slupska, M. M., Baikalov, C., Luther, W. M., Chiang, J. H., Wei, Y. F. & Miller, J. H. 1996. Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the Escherichia coli mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J Bacteriol*, 178, 3885-92.
- Snippert, H. J., Van Der Flier, L. G., Sato, T., Van Es, J. H., Van Den Born, M., Kroon-Veenboer, C., Barker, N., Klein, A. M., Van Rheenen, J., Simons, B. D. & Clevers, H. 2010. Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell*, 143, 134-44.
- Snover, D. C. 2005. Serrated polyps of the large intestine. *Semin Diagn Pathol*, 22, 301-8.
- Snover, D. C. 2011. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum Pathol*, 42, 1-10.
- Snover, D. C., Jass, J. R., Fenoglio-Preiser, C. & Batts, K. P. 2005. Serrated polyps of the large intestine: a morphologic and molecular review of an evolving concept. *Am J Clin Pathol*, 124, 380-91.
- Soerjomataram, I., Lortet-Tieulent, J., Parkin, D. M., Ferlay, J., Mathers, C., Forman, D. & Bray, F. 2012. Global burden of cancer in 2008: a systematic analysis of disability-adjusted life-years in 12 world regions. *Lancet*, 380, 1840-50.
- Soravia, C., Berk, T., Madlensky, L., Mitri, A., Cheng, H., Gallinger, S., Cohen, Z. & Bapat, B. 1998. Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. *Am J Hum Genet*, 62, 1290-301.
- Soreide, K., Nedrebo, B. S., Knapp, J. C., Glomsaker, T. B., Soreide, J. A. & Korner, H. 2009. Evolving molecular classification by genomic and proteomic biomarkers in colorectal cancer: potential implications for the surgical oncologist. *Surg Oncol*, 18, 31-50.

- Spirio, L., Olschwang, S., Groden, J., Robertson, M., Samowitz, W., Joslyn, G., Gelbert, L., Thliveris, A., Carlson, M., Otterud, B. & Et Al. 1993. Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell*, 75, 951-7.
- Spurdle, A. B. 2010. Clinical relevance of rare germline sequence variants in cancer genes: evolution and application of classification models. *Curr Opin Genet Dev*, 20, 315-23.
- St. Clair, W. H. & Osborne, J. W. 1985. Crypt fission and crypt number in the small and large bowel of postnatal rats*. *Cell Proliferation*, 18, 255-262.
- Stange, D. E. & Clevers, H. 2013. Concise review: the yin and yang of intestinal (cancer) stem cells and their progenitors. *Stem Cells*, 31, 2287-95.
- Steinhauser, M. L., Bailey, A. P., Senyo, S. E., Guillemier, C., Perlstein, T. S., Gould, A. P., Lee, R. T. & Lechene, C. P. 2012. Multi-isotope imaging mass spectrometry quantifies stem cell division and metabolism. *Nature*, 481, 516-9.
- Stephens, P. J., Tarpey, P. S., Davies, H., Van Loo, P., Greenman, C., Wedge, D. C., Nik-Zainal, S., Martin, S., Varela, I., Bignell, G. R., Yates, L. R., Papaemmanuil, E., Beare, D., Butler, A., Cheverton, A., Gamble, J., Hinton, J., Jia, M., Jayakumar, A., Jones, D., Latimer, C., Lau, K. W., McLaren, S., McBride, D. J., Menzies, A., Mudie, L., Raine, K., Rad, R., Chapman, M. S., Teague, J., Easton, D., Langerod, A., Lee, M. T., Shen, C. Y., Tee, B. T., Huimin, B. W., Broeks, A., Vargas, A. C., Turashvili, G., Martens, J., Fatima, A., Miron, P., Chin, S. F., Thomas, G., Boyault, S., Mariani, O., Lakhani, S. R., Van De Vijver, M., Van 'T Veer, L., Foekens, J., Desmedt, C., Sotiriou, C., Tutt, A., Caldas, C., Reis-Filho, J. S., Aparicio, S. A., Salomon, A. V., Borresen-Dale, A. L., Richardson, A. L., Campbell, P. J., Futreal, P. A. & Stratton, M. R. 2012. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*, 486, 400-4.
- Stryker, S. J., Wolff, B. G., Culp, C. E., Libbe, S. D., Ilstrup, D. M. & Maccarty, R. L. 1987. Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology*, 93, 1009-13.
- Sugai, T., Habano, W., Jiao, Y. F., Suzuki, M., Takagi, R., Otsuka, K., Higuchi, T. & Nakamura, S. 2005. Analysis of allelic imbalances at multiple cancer-related chromosomal loci and microsatellite instability within the same tumor using a single tumor gland from colorectal carcinomas. *Int J Cancer*, 114, 337-45.
- Sundstrom, M., Edlund, K., Lindell, M., Glimelius, B., Birgisson, H., Micke, P. & Botling, J. 2010. KRAS analysis in colorectal carcinoma: analytical aspects of Pyrosequencing and allele-specific PCR in clinical practice. *BMC Cancer*, 10, 660.
- Suraweera, N., Duval, A., Reperant, M., Vaury, C., Furlan, D., Leroy, K., Seruca, R., Iacopetta, B. & Hamelin, R. 2002. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology*, 123, 1804-11.
- Suter, C. M., Martin, D. I. & Ward, R. L. 2004. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat Genet*, 36, 497-501.

T

- Takayama, T., Katsuki, S., Takahashi, Y., Ohi, M., Nojiri, S., Sakamaki, S., Kato, J., Kogawa, K., Miyake, H. & Niitsu, Y. 1998. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med*, 339, 1277-84.

Bibliografia

- Takayama, T., Ohi, M., Hayashi, T., Miyanishi, K., Nobuoka, A., Nakajima, T., Satoh, T., Takimoto, R., Kato, J., Sakamaki, S. & Niitsu, Y. 2001. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*, 121, 599-611.
- Takeda, N., Jain, R., Leboeuf, M. R., Wang, Q., Lu, M. M. & Epstein, J. A. 2011. Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science*, 334, 1420-4.
- Talseth-Palmer, B. A., McPhillips, M., Groombridge, C., Spigelman, A. & Scott, R. J. 2010. MSH6 and PMS2 mutation positive Australian Lynch syndrome families: novel mutations, cancer risk and age of diagnosis of colorectal cancer. *Hered Cancer Clin Pract*, 8, 5.
- Taly, V., Pekin, D., Benhaim, L., Kotsopoulos, S. K., Le Corre, D., Li, X., Atochin, I., Link, D. R., Griffiths, A. D., Pallier, K., Blons, H., Bouche, O., Landi, B., Hutchison, J. B. & Laurent-Puig, P. 2013. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clin Chem*, 59, 1722-31.
- Tan, C. W., Hirokawa, Y., Gardiner, B. S., Smith, D. W. & Burgess, A. W. 2013. Colon cryptogenesis: asymmetric budding. *PLoS One*, 8, e78519.
- Tchou, J., Kasai, H., Shibutani, S., Chung, M. H., Laval, J., Grollman, A. P. & Nishimura, S. 1991. 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 4690-4.
- Tejpar, S., Celik, I., Schlichting, M., Sartorius, U., Bokemeyer, C. & Van Cutsem, E. 2012. Association of KRAS G13D tumor mutations with outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *J Clin Oncol*, 30, 3570-7.
- Terdiman, J. P. 2001. HNPCC: an uncommon but important diagnosis. *Gastroenterology*, 121, 1005-8.
- Teutsch, S. M., Bradley, L. A., Palomaki, G. E., Haddow, J. E., Piper, M., Calonge, N., Dotson, W. D., Douglas, M. P. & Berg, A. O. 2009. The Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Initiative: methods of the EGAPP Working Group. *Genet Med*, 11, 3-14.
- The Cancer Genome Atlas Network 2012. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487, 330-7.
- Theodoratou, E., Campbell, H., Tenesa, A., Houlston, R., Webb, E., Lubbe, S., Broderick, P., Gallinger, S., Croitoru, E. M., Jenkins, M. A., Win, A. K., Cleary, S. P., Koessler, T., Pharoah, P. D., Kury, S., Bezieau, S., Buecher, B., Ellis, N. A., Peterlongo, P., Offit, K., Aaltonen, L. A., Enholm, S., Lindblom, A., Zhou, X. L., Tomlinson, I. P., Moreno, V., Blanco, I., Capella, G., Barnetson, R., Porteous, M. E., Dunlop, M. G. & Farrington, S. M. 2010. A large-scale meta-analysis to refine colorectal cancer risk estimates associated with MUTYH variants. *Br J Cancer*, 103, 1875-84.
- Thiel, A., Heinonen, M., Kantonen, J., Gylling, A., Lahtinen, L., Korhonen, M., Kytola, S., Mecklin, J. P., Orpana, A., Peltomaki, P. & Ristimaki, A. 2013. BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Virchows Arch*, 463, 613-21.
- Thirlwell, C., Will, O. C., Domingo, E., Graham, T. A., McDonald, S. A., Oukrif, D., Jeffrey, R., Gorman, M., Rodriguez-Justo, M., Chin-Aleong, J., Clark, S. K., Novelli, M. R., Jankowski, J. A., Wright, N. A., Tomlinson, I. P. & Leedham, S. J. 2010. Clonality assessment and clonal

- ordering of individual neoplastic crypts shows polyclonality of colorectal adenomas. *Gastroenterology*, 138, 1441-54, 1454 e1-7.
- Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K. G., Rangell, L., Klein, O. D. & De Sauvage, F. J. 2011. A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature*, 478, 255-9.
- Tomlinson, I. P., Roylance, R. & Houlston, R. S. 2001. Two hits revisited again. *J Med Genet*, 38, 81-5.
- Toon, C. W., Walsh, M. D., Chou, A., Capper, D., Clarkson, A., Sioson, L., Clarke, S., Mead, S., Walters, R. J., Clendenning, M., Rosty, C., Young, J. P., Win, A. K., Hopper, J. L., Crook, A., Von Deimling, A., Jenkins, M. A., Buchanan, D. D. & Gill, A. J. 2013. BRAFV600E immunohistochemistry facilitates universal screening of colorectal cancers for Lynch syndrome. *Am J Surg Pathol*, 37, 1592-602.
- Torlakovic, E., Skovlund, E., Snover, D. C., Torlakovic, G. & Nesland, J. M. 2003. Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. *Am J Surg Pathol*, 27, 65-81.
- Tortola, S., Marcuello, E., Gonzalez, I., Reyes, G., Arribas, R., Aiza, G., Sancho, F. J., Peinado, M. A. & Capella, G. 1999. p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 17, 1375-81.
- Tost, J. & Gut, I. G. 2007. Analysis of gene-specific DNA methylation patterns by pyrosequencing technology. *Methods Mol Biol*, 373, 89-102.
- Totafurno, J., Bjerknes, M. & Cheng, H. 1987. The crypt cycle. Crypt and villus production in the adult intestinal epithelium. *Biophys J*, 52, 279-94.
- Tournier, I., Vezain, M., Martins, A., Charbonnier, F., Baert-Desurmont, S., Olschwang, S., Wang, Q., Buisine, M. P., Soret, J., Tazi, J., Frebourg, T. & Tosi, M. 2008. A large fraction of unclassified variants of the mismatch repair genes MLH1 and MSH2 is associated with splicing defects. *Hum Mutat*, 29, 1412-24.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G., Baylin, S. B. & Issa, J. P. 1999. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 8681-6.
- Trano, G., Wasmuth, H. H., Sjursen, W., Hofslie, E. & Vatten, L. J. 2009. Awareness of heredity in colorectal cancer patients is insufficient among clinicians: a Norwegian population-based study. *Colorectal Dis*, 11, 456-61.
- Trock, B., Lanza, E. & Greenwald, P. 1990. Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: critical review and meta-analyses of the epidemiologic evidence. *J Natl Cancer Inst*, 82, 650-61.

U

- Umar, A., Boland, C. R., Terdiman, J. P., Syngal, S., De La Chapelle, A., Ruschoff, J., Fishel, R., Lindor, N. M., Burgart, L. J., Hamelin, R., Hamilton, S. R., Hiatt, R. A., Jass, J., Lindblom, A., Lynch, H. T., Peltomaki, P., Ramsey, S. D., Rodriguez-Bigas, M. A., Vasen, H. F., Hawk, E. T., Barrett, J. C., Freedman, A. N. & Srivastava, S. 2004. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*, 96, 261-8.

V

- Valle, L., Carbonell, P., Fernandez, V., Dotor, A. M., Sanz, M., Benitez, J. & Urioste, M. 2007. MLH1 germline epimutations in selected patients with early-onset non-polyposis colorectal cancer. *Clin Genet*, 71, 232-7.
- Van Breda, S. G., Van Agen, E., Engels, L. G., Moonen, E. J., Kleinjans, J. C. & Van Delft, J. H. 2004. Altered vegetable intake affects pivotal carcinogenesis pathways in colon mucosa from adenoma patients and controls. *Carcinogenesis*, 25, 2207-16.
- Van De Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., De Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., Van Der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A. P., Tjon-Pon-Fong, M., Moerer, P., Van Den Born, M., Soete, G., Pals, S., Eilers, M., Medema, R. & Clevers, H. 2002. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*, 111, 241-50.
- Van Es, J. H., Jay, P., Gregorieff, A., Van Gijn, M. E., Jonkheer, S., Hatzis, P., Thiele, A., Van Den Born, M., Begthel, H., Brabletz, T., Taketo, M. M. & Clevers, H. 2005a. Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat Cell Biol*, 7, 381-6.
- Van Es, J. H., Sato, T., Van De Wetering, M., Lyubimova, A., Nee, A. N., Gregorieff, A., Sasaki, N., Zeinstra, L., Van Den Born, M., Korving, J., Martens, A. C., Barker, N., Van Oudenaarden, A. & Clevers, H. 2012. Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nat Cell Biol*, 14, 1099-104.
- Van Es, J. H., Van Gijn, M. E., Riccio, O., Van Den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D. J., Radtke, F. & Clevers, H. 2005b. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature*, 435, 959-63.
- Vasen, H. F. 2007. Review article: The Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *Aliment Pharmacol Ther*, 26 Suppl 2, 113-26.
- Vasen, H. F., Blanco, I., Aktan-Collan, K., Gopie, J. P., Alonso, A., Aretz, S., Bernstein, I., Bertario, L., Burn, J., Capella, G., Colas, C., Engel, C., Frayling, I. M., Genuardi, M., Heinimann, K., Hes, F. J., Hodgson, S. V., Karagiannis, J. A., Laloo, F., Lindblom, A., Mecklin, J. P., Moller, P., Myrhoj, T., Nagengast, F. M., Parc, Y., Ponz De Leon, M., Renkonen-Sinisalo, L., Sampson, J. R., Stormorken, A., Sijmons, R. H., Tejpar, S., Thomas, H. J., Rahner, N., Wijnen, J. T., Jarvinen, H. J. & Moslein, G. 2013. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut*, 62, 812-23.
- Vasen, H. F., Mecklin, J. P., Khan, P. M. & Lynch, H. T. 1991. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum*, 34, 424-5.
- Vasen, H. F., Mecklin, J. P., Khan, P. M. & Lynch, H. T. 1994. The International Collaborative Group on HNPCC. *Anticancer Res*, 14, 1661-4.
- Vasen, H. F., Moslein, G., Alonso, A., Aretz, S., Bernstein, I., Bertario, L., Blanco, I., Bulow, S., Burn, J., Capella, G., Colas, C., Engel, C., Frayling, I., Friedl, W., Hes, F. J., Hodgson, S., Jarvinen, H., Mecklin, J. P., Moller, P., Myrhoj, T., Nagengast, F. M., Parc, Y., Phillips, R., Clark, S. K., De Leon, M. P., Renkonen-Sinisalo, L., Sampson, J. R., Stormorken, A., Tejpar, S., Thomas,

- H. J. & Wijnen, J. 2008. Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP). *Gut*, 57, 704-13.
- Vasen, H. F., Moslein, G., Alonso, A., Aretz, S., Bernstein, I., Bertario, L., Blanco, I., Bulow, S., Burn, J., Capella, G., Colas, C., Engel, C., Frayling, I., Rahner, N., Hes, F. J., Hodgson, S., Mecklin, J. P., Moller, P., Myrhoj, T., Nagengast, F. M., Parc, Y., Ponz De Leon, M., Renkonen-Sinisalo, L., Sampson, J. R., Stormorken, A., Tejpar, S., Thomas, H. J., Wijnen, J., Lubinski, J., Jarvinen, H., Claes, E., Heinimann, K., Karagiannis, J. A., Lindblom, A., Dove-Edwin, I. & Muller, H. 2010. Recommendations to improve identification of hereditary and familial colorectal cancer in Europe. *Fam Cancer*, 9, 109-15.
- Vasen, H. F., Moslein, G., Alonso, A., Bernstein, I., Bertario, L., Blanco, I., Burn, J., Capella, G., Engel, C., Frayling, I., Friedl, W., Hes, F. J., Hodgson, S., Mecklin, J. P., Moller, P., Nagengast, F., Parc, Y., Renkonen-Sinisalo, L., Sampson, J. R., Stormorken, A. & Wijnen, J. 2007. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J Med Genet*, 44, 353-62.
- Velho, S., Moutinho, C., Cirnes, L., Albuquerque, C., Hamelin, R., Schmitt, F., Carneiro, F., Oliveira, C. & Seruca, R. 2008. BRAF, KRAS and PIK3CA mutations in colorectal serrated polyps and cancer: primary or secondary genetic events in colorectal carcinogenesis? *BMC Cancer*, 8, 255.
- Venesio, T., Molatore, S., Cattaneo, F., Arrigoni, A., Risio, M. & Ranzani, G. N. 2004. High frequency of MYH gene mutations in a subset of patients with familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*, 126, 1681-5.
- Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J. P., Alexe, G., Lawrence, M., O'Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B. A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., Feiler, H. S., Hodgson, J. G., James, C. D., Sarkaria, J. N., Brennan, C., Kahn, A., Spellman, P. T., Wilson, R. K., Speed, T. P., Gray, J. W., Meyerson, M., Getz, G., Perou, C. M. & Hayes, D. N. 2010. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17, 98-110.
- Vermeulen, L., De Sousa E Melo, F., Richel, D. J. & Medema, J. P. 2012. The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. *Lancet Oncol*, 13, e83-9.
- Vermeulen, L., Sprick, M. R., Kemper, K., Stassi, G. & Medema, J. P. 2008. Cancer stem cells--old concepts, new insights. *Cell Death Differ*, 15, 947-58.
- Vilar, E. & Gruber, S. B. 2010. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol*, 7, 153-62.
- Visani, M., De Biase, D., Baccharini, P., Fabbri, C., Polifemo, A. M., Zanini, N., Pession, A. & Tallini, G. 2013. Multiple KRAS mutations in pancreatic adenocarcinoma: molecular features of neoplastic clones indicate the selection of divergent populations of tumor cells. *Int J Surg Pathol*, 21, 546-52.
- Vizan, P., Boros, L. G., Figueras, A., Capella, G., Manges, R., Bassilian, S., Lim, S., Lee, W. N. & Cascante, M. 2005. K-ras codon-specific mutations produce distinctive metabolic phenotypes in NIH3T3 mice [corrected] fibroblasts. *Cancer Res*, 65, 5512-5.
- Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. 1999. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 9236-41.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., Jr. & Kinzler, K. W. 2013. Cancer genome landscapes. *Science*, 339, 1546-58.

W

Walsh, M. D., Buchanan, D. D., Walters, R., Roberts, A., Arnold, S., Mckeone, D., Clendenning, M., Ruzskiewicz, A. R., Jenkins, M. A., Hopper, J. L., Goldblatt, J., George, J., Suthers, G. K., Phillips, K., Young, G. P., Macrae, F., Drini, M., Woods, M. O., Parry, S., Jass, J. R. & Young, J. P. 2009. Analysis of families with Lynch syndrome complicated by advanced serrated neoplasia: the importance of pathology review and pedigree analysis. *Fam Cancer*, 8, 313-23.

Wallis, Y. L., Morton, D. G., Mckeown, C. M. & Macdonald, F. 1999. Molecular analysis of the APC gene in 205 families: extended genotype-phenotype correlations in FAP and evidence for the role of APC amino acid changes in colorectal cancer predisposition. *J Med Genet*, 36, 14-20.

Wan, P. T., Garnett, M. J., Roe, S. M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V. M., Jones, C. M., Marshall, C. J., Springer, C. J., Barford, D. & Marais, R. 2004. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, 116, 855-67.

Wang, H. L., Lopategui, J., Amin, M. B. & Patterson, S. D. 2010a. KRAS mutation testing in human cancers: The pathologist's role in the era of personalized medicine. *Adv Anat Pathol*, 17, 23-32.

Wang, J., Ramakrishnan, R., Tang, Z., Fan, W., Kluge, A., Dowlati, A., Jones, R. C. & Ma, P. C. 2010b. Quantifying EGFR alterations in the lung cancer genome with nanofluidic digital PCR arrays. *Clin Chem*, 56, 623-32.

Wang, L., Cunningham, J. M., Winters, J. L., Guenther, J. C., French, A. J., Boardman, L. A., Burgart, L. J., McDonnell, S. K., Schaid, D. J. & Thibodeau, S. N. 2003. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res*, 63, 5209-12.

Ward, R., Meagher, A., Tomlinson, I., O'connor, T., Norrie, M., Wu, R. & Hawkins, N. 2001. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut*, 48, 821-9.

Ward, R. L., Dobbins, T., Lindor, N. M., Rapkins, R. W. & Hitchins, M. P. 2013. Identification of constitutional MLH1 epimutations and promoter variants in colorectal cancer patients from the Colon Cancer Family Registry. *Genet Med*, 15, 25-35.

Wasan, H. S., Park, H. S., Liu, K. C., Mandir, N. K., Winnett, A., Sasieni, P., Bodmer, W. F., Goodlad, R. A. & Wright, N. A. 1998. APC in the regulation of intestinal crypt fission. *J Pathol*, 185, 246-55.

Weisenberger, D. J., Siegmund, K. D., Campan, M., Young, J., Long, T. I., Faasse, M. A., Kang, G. H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D., Koh, H., Simms, L., Barker, M., Leggett, B., Levine, J., Kim, M., French, A. J., Thibodeau, S. N., Jass, J., Haile, R. & Laird, P. W. 2006. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet*, 38, 787-93.

- Whale, A. S., Huggett, J. F., Cowen, S., Speirs, V., Shaw, J., Ellison, S., Foy, C. A. & Scott, D. J. 2012. Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation. *Nucleic Acids Res*, 40, e82.
- Whitehead, R. H., Brown, A. & Bhathal, P. S. 1987. A method for the isolation and culture of human colonic crypts in collagen gels. *In Vitro Cell Dev Biol*, 23, 436-42.
- Wimmer, K. & Kratz, C. P. 2010. Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome. *Haematologica*, 95, 699-701.
- Win, A. K., Jenkins, M. A., Buchanan, D. D., Clendenning, M., Young, J. P., Giles, G. G., Goldblatt, J., Leggett, B. A., Hopper, J. L., Thibodeau, S. N. & Lindor, N. M. 2011. Determining the frequency of de novo germline mutations in DNA mismatch repair genes. *J Med Genet*, 48, 530-4.
- Win, A. K., Lindor, N. M. & Jenkins, M. A. 2013. Risk of breast cancer in Lynch syndrome: a systematic review. *Breast Cancer Res*, 15, R27.
- Win, A. K., Lindor, N. M., Young, J. P., Macrae, F. A., Young, G. P., Williamson, E., Parry, S., Goldblatt, J., Lipton, L., Winship, I., Leggett, B., Tucker, K. M., Giles, G. G., Buchanan, D. D., Clendenning, M., Rosty, C., Arnold, J., Levine, A. J., Haile, R. W., Gallinger, S., Le Marchand, L., Newcomb, P. A., Hopper, J. L. & Jenkins, M. A. 2012a. Risks of primary extracolonic cancers following colorectal cancer in lynch syndrome. *J Natl Cancer Inst*, 104, 1363-72.
- Win, A. K., Young, J. P., Lindor, N. M., Tucker, K. M., Ahnen, D. J., Young, G. P., Buchanan, D. D., Clendenning, M., Giles, G. G., Winship, I., Macrae, F. A., Goldblatt, J., Southey, M. C., Arnold, J., Thibodeau, S. N., Gunawardena, S. R., Bapat, B., Baron, J. A., Casey, G., Gallinger, S., Le Marchand, L., Newcomb, P. A., Haile, R. W., Hopper, J. L. & Jenkins, M. A. 2012b. Colorectal and other cancer risks for carriers and noncarriers from families with a DNA mismatch repair gene mutation: a prospective cohort study. *J Clin Oncol*, 30, 958-64.
- Winawer, S., Fletcher, R., Rex, D., Bond, J., Burt, R., Ferrucci, J., Ganiats, T., Levin, T., Woolf, S., Johnson, D., Kirk, L., Litin, S. & Simmgang, C. 2003. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology*, 124, 544-60.
- Winawer, S. J., Fletcher, R. H., Miller, L., Godlee, F., Stolar, M. H., Mulrow, C. D., Woolf, S. H., Glick, S. N., Ganiats, T. G., Bond, J. H., Rosen, L., Zapka, J. G., Olsen, S. J., Giardiello, F. M., Sisk, J. E., Van Antwerp, R., Brown-Davis, C., Marciniak, D. A. & Mayer, R. J. 1997. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology*, 112, 594-642.
- Winawer, S. J., Zauber, A. G., Ho, M. N., O'Brien, M. J., Gottlieb, L. S., Sternberg, S. S., Waye, J. D., Schapiro, M., Bond, J. H., Panish, J. F. & Et Al. 1993. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med*, 329, 1977-81.
- Winton, D. J., Blount, M. A. & Ponder, B. A. 1988. A clonal marker induced by mutation in mouse intestinal epithelium. *Nature*, 333, 463-6.
- Woda, B. A., Forde, K. & Lane, N. 1977. A unicryptal colonic adenoma, the smallest colonic neoplasm yet observed in a non-polyposis individual. *Am J Clin Pathol*, 68, 631-2.
- Woerner, S. M., Kloor, M., Mueller, A., Rueschoff, J., Friedrichs, N., Buettner, R., Buzello, M., Kienle, P., Knaebel, H. P., Kunstmann, E., Pagenstecher, C., Schackert, H. K., Moslein, G.,

- Vogelsang, H., Von Knebel Doeberitz, M. & Gebert, J. F. 2005. Microsatellite instability of selective target genes in HNPCC-associated colon adenomas. *Oncogene*, 24, 2525-35.
- Wong, J. J., Hawkins, N. J. & Ward, R. L. 2007. Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis. *Gut*, 56, 140-8.
- Wong, V. W., Stange, D. E., Page, M. E., Buczacki, S., Wabik, A., Itami, S., Van De Wetering, M., Poulson, R., Wright, N. A., Trotter, M. W., Watt, F. M., Winton, D. J., Clevers, H. & Jensen, K. B. 2012. Lrig1 controls intestinal stem-cell homeostasis by negative regulation of ErbB signalling. *Nat Cell Biol*, 14, 401-8.
- Wong, W. M., Mandir, N., Goodlad, R. A., Wong, B. C., Garcia, S. B., Lam, S. K. & Wright, N. A. 2002. Histogenesis of human colorectal adenomas and hyperplastic polyps: the role of cell proliferation and crypt fission. *Gut*, 50, 212-7.
- Woods, M. O., Williams, P., Careen, A., Edwards, L., Bartlett, S., McLaughlin, J. R. & Younghusband, H. B. 2007. A new variant database for mismatch repair genes associated with Lynch syndrome. *Hum Mutat*, 28, 669-73.
- Wu, M., Pastor-Pareja, J. C. & Xu, T. 2010. Interaction between Ras(V12) and scribbled clones induces tumour growth and invasion. *Nature*, 463, 545-8.

Y

- Yan, K. S., Chia, L. A., Li, X., Ootani, A., Su, J., Lee, J. Y., Su, N., Luo, Y., Heilshorn, S. C., Amieva, M. R., Sangiorgi, E., Capecchi, M. R. & Kuo, C. J. 2012. The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 466-71.
- Yanaru-Fujisawa, R., Matsumoto, T., Ushijima, Y., Esaki, M., Hirahashi, M., Gushima, M., Yao, T., Nakabeppu, Y. & Iida, M. 2008. Genomic and functional analyses of MUTYH in Japanese patients with adenomatous polyposis. *Clin Genet*, 73, 545-53.
- Yatabe, Y., Tavare, S. & Shibata, D. 2001. Investigating stem cells in human colon by using methylation patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 10839-44.

Z

- Zeki, S. S., Graham, T. A. & Wright, N. A. 2011. Stem cells and their implications for colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 8, 90-100.
- Zhou, H. H., Yan, S. Y., Zhou, X. Y., Du, X., Zhang, T. M., Cai, X., Lu, Y. M., Cai, S. J. & Shi, D. R. 2008. MLH1 promoter germline-methylation in selected probands of Chinese hereditary non-polyposis colorectal cancer families. *World J Gastroenterol*, 14, 7329-34.
- Zhou, W., Chen, T., Zhao, H., Eterovic, A. K., Meric-Bernstam, F., Mills, G. B. & Chen, K. 2014. Bias from removing read duplication in ultra-deep sequencing experiments. *Bioinformatics*.
- Zhu, D., Keohavong, P., Finkelstein, S. D., Swalsky, P., Bakker, A., Weissfeld, J., Srivastava, S. & Whiteside, T. L. 1997. K-ras gene mutations in normal colorectal tissues from K-ras mutation-positive colorectal cancer patients. *Cancer Res*, 57, 2485-92.

ANNEXES

ANNEX I: PUBLICACIÓ ADDICIONAL

PUBLICACIÓ ADDICIONAL

The ADAMTS12 metalloprotease gene is epigenetically silenced in tumor cells and transcriptionally activated in the stroma during progression of colon cancer

Angela Moncada-Pazos, Álvaro J. Obaya, Mario F. Fraga, Cristina G. Vilorio, Gabriel Capellá, **Mireia Gausachs**, Manel Esteller, Carlos López-Otín i Santiago Cal

Journal of Cell Science: 122; 2906-2913

Resum del treball: Les proteases s'han associat amb la progressió del tumor, donada la seva capacitat per degradar components de la matriu extracel·lular i facilitar la invasió i la metàstasi. No obstant això, les recents troballes indiquen que diferents proteases també poden actuar com enzims supressors de tumors. Se sap que les cèl·lules de carcinoma de pulmó que expressen la metal·loproteasa ADAMTS-12 mostren un notable deteriorament del creixement en ratolins immunodeficients si ho compararem amb cèl·lules parentals. Aquí, mostrem que el promotor d'ADAMTS12 es troba hipermetilat en línies cel·lulars de càncer i teixits tumorals. Curiosament, l'expressió d'ADAMTS12 en les cèl·lules de l'estroma que envolten les cèl·lules malignes epitelials és més gran que en els teixits normals aparellats. D'altra banda, l'expressió d'aquesta metal·loproteasa en fibroblasts de còlon cultivats amb línies cel·lulars de càncer de còlon és més alt que quan són cultivats sols. A més, l'expressió d'ADAMTS-12 per aquests fibroblasts es vincula amb un efecte antiproliferatiu sobre les cèl·lules tumorals. Basant-se en aquests resultats, postulem que ADAMTS-12 és una proteasa antitumoral que pot reduir les propietats proliferatives de les cèl·lules tumorals. Aquesta funció es perd per la inactivació epigenètica en les cèl·lules tumorals, però al mateix temps indueix a les cèl·lules de l'estroma, probablement com a part d'una resposta del teixit normal destinat a controlar la progressió del càncer.

The *ADAMTS12* metalloprotease gene is epigenetically silenced in tumor cells and transcriptionally activated in the stroma during progression of colon cancer

Angela Moncada-Pazos¹, Alvaro J. Obaya², Mario F. Fraga³, Cristina G. Viloria¹, Gabriel Capellá⁴, Mireia Gausachs⁴, Manel Esteller³, Carlos López-Otín¹ and Santiago Cal^{1,*}

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular and ²Biología Funcional, Area de Fisiología, Facultad de Medicina, Instituto Universitario de Oncología, Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo, Spain

³Cancer Epigenetic Laboratory, Spanish National Cancer Centre (CNIO), 28029 Madrid, Spain

⁴Laboratori de Recerca Translacional, IDIBELL, Institut Català d'Oncologia, L'Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, Spain

*Author for correspondence (santical@uniovi.es)

Accepted 5 June 2009

Journal of Cell Science 122, 2906-2913 Published by The Company of Biologists 2009
doi:10.1242/jcs.050468

Summary

Proteases have long been associated with tumor progression, given their ability to degrade extracellular matrix components and facilitate invasion and metastasis. However, recent findings indicate that different proteases can also act as tumor-suppressor enzymes. We have recently reported that lung carcinoma cells expressing the *ADAMTS-12* metalloprotease show a remarkable impairment of growth in immunodeficient mice as compared with parental cells. Here, we show that *ADAMTS12* promoter is hypermethylated in cancer cell lines and tumor tissues. Interestingly, *ADAMTS12* expression in the stromal cells surrounding epithelial malignant cells is higher than in the paired normal tissues. Moreover, the expression of this metalloprotease in colon fibroblasts co-cultured with colon

cancer cell lines is higher than in those cultured alone. Furthermore, the expression of *ADAMTS-12* by these fibroblasts is linked with an anti-proliferative effect on tumor cells. Based on these findings, we hypothesize that *ADAMTS-12* is a novel anti-tumor protease that can reduce the proliferative properties of tumor cells. This function is lost by epigenetic silencing in tumor cells, but concurrently induced in stromal cells, probably as part of a response of the normal tissue aimed at controlling the progression of cancer.

Key words: Metalloprotease, Thrombospondin, Methylation, Degradome

Introduction

Proteases perform fundamental processing events in multiple biological processes in all living organisms (Lopez-Otin and Bond, 2008). To date, more than 560 proteolytic enzymes and homologs have been cataloged in the human genome (Puente et al., 2003), which reflects their relevance to physiological and pathological conditions, including cancer. In fact, proteolytic activity facilitates spreading of tumor cells and formation of distant metastasis through degradation of protein components of the extracellular matrix (Overall and Lopez-Otin, 2002). However, the relationship between proteolytic enzymes and cancer is much more complex because these enzymes target a variety of substrates distinct from extracellular matrix components and influence all stages of tumor development (Egeblad and Werb, 2002; Freije et al., 2003). Recent functional studies have also revealed that some proteases exhibit potent anti-tumor functions (Lopez-Otin and Matrisian, 2007). An illustrative example is that of MMP-8, a matrix metalloprotease showing a protective role in cancer through its ability to regulate the inflammatory response induced by carcinogens (Balbin et al., 2003). Furthermore, MMP-8 expression by breast tumors correlates with a lower incidence of lymph node metastasis and confers good prognosis to breast cancer patients (Gutierrez-Fernandez et al., 2008). These findings have contributed to extend the known functions of cancer-associated proteases and emphasize the

importance of targeting specific proteases for cancer treatment (Lopez-Otin and Overall, 2002; Martin and Matrisian, 2007).

The *ADAMTS* (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin domains) family comprises 19 extracellular metalloproteases closely related to MMPs and ADAMs (Cal et al., 2002; Apte, 2004; Porter et al., 2005). Gain or loss of function of different *ADAMTS*s are involved in serious human diseases such as osteoarthritis (Bondeson et al., 2008) and thrombotic thrombocytopenic purpura (Sadler, 2008). In relation to tumorigenesis, some *ADAMTS*s are overexpressed in tumors of different sources (Porter et al., 2005; Rocks et al., 2008), whereas other family members have been cataloged as tumor-protective enzymes (Lopez-Otin and Matrisian, 2007). Thus, different reports point out the angio-inhibitory properties of *ADAMTS-1* (Iruela-Arispe et al., 2003; Kuno et al., 2004; Lee et al., 2006). Moreover, *ADAMTS1* expression has been found epigenetically silenced in colorectal tumors (Lind et al., 2006). Furthermore, *ADAMTS8*, *ADAMTS9* and *ADAMTS18* gene promoters are also hypermethylated in several carcinomas (Dunn et al., 2004; Jin et al., 2007; Lo et al., 2007). *ADAMTS-12* is another member of this family and was originally identified and cloned in our laboratory (Cal et al., 2001). We have recently described that this enzyme can modulate the Ras-dependent ERK (extracellular signal-regulated kinase) signalling pathway in MDCK (Madin-Darby canine kidney)

cells, and that subcutaneous tumors induced by A549 lung carcinoma cells expressing *ADAMTS12* display a considerable growth deficiency as compared with those induced by parental cells (Llamazares et al., 2007). To further examine the relevance of *ADAMTS-12* as a putative tumor-suppressor enzyme, we have analyzed the mechanisms controlling its expression in cancer cells and tissues with the finding that *ADAMTS12* is epigenetically silenced in tumor cell lines from multiple sources, whereas it is transcriptionally activated in stroma cells. Our data strongly suggest that *ADAMTS-12* is part of a protective host response against tumor progression derived from the intimate crosstalk between tumor cells and the surrounding stroma.

Results

ADAMTS12 gene promoter is hypermethylated in colorectal carcinomas and colon cancer cell lines

Analysis of 2.0 kb upstream and 0.5 kb downstream of the first ATG codon allowed the identification of a CpG island in this region, suggesting the potential influence of CpG methylation in the transcription of the *ADAMTS12* gene. Methylation-specific PCR (MSP) amplification of a 138 bp promoter within the CpG island (Fig. 1A) was performed on a set of paired normal and tumor colon samples. As can be seen in Fig. 1B, the methylation level of *ADAMTS12* promoter was higher in 12 out of 19 (63.2%) biopsies of primary colorectal tumors than in the corresponding normal

tissue. Similarly, MSP amplification using genomic DNA from the microsatellite-stable (MSS) SW620, SW480, COLO 205 and HT29 colon carcinoma cell lines, and the microsatellite-unstable (MSI) DLD-1, HCT 15, HCT-116, LoVo and RKO cell lines showed that *ADAMTS12* promoter is hypermethylated in all of them, with the exception of LoVo cells (Fig. 1B; Table 1).

We next performed high-resolution bisulfite genome sequencing of 26 CpG sites within the CpG island identified (Fig. 1A). Eleven colon carcinoma samples were selected for this assay, attending to the different intensities of PCR products in previous MSP amplifications. Seven of these samples were more methylated in the tumor than in their paired normal tissues (Fig. 1C; Table 1). Among them, tumor samples 426, 467 and 557 were highly methylated in most of the 26 CpG sites examined (70-90%). By contrast, their paired normal tissues were much less methylated (20-40%). Four additional tumor samples, 340, 401, 478 and 566, showed percentages of methylation ranging between 20 and 60%, but their paired normal tissues were scarcely methylated (below 10%). Samples 404 and 496 showed similar levels of methylation in both tumor and normal tissues, whereas samples 397 and 555 were more methylated in normal tissues. Parallel analysis carried out in colon carcinoma cell lines revealed the high frequency of methylation at these CpG sites, independently of the microsatellite instability status. Thus, percentages of 80-90% were determined for SW620, SW480 and COLO 205 (MSS cell lines), and for

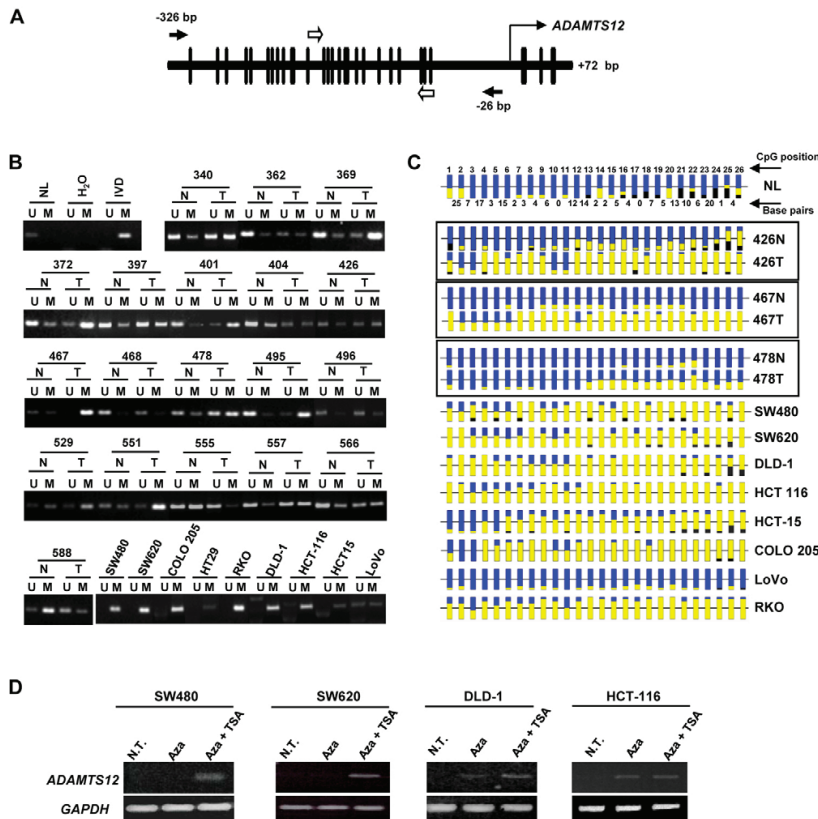


Fig. 1. Epigenetic silencing of *ADAMTS12* in colon cancer. (A) Schematic representation of the *ADAMTS12* CpG island. An interval of 2.0 kb upstream and 0.5 kb downstream from the first ATG codon of *ADAMTS12* was analyzed for CpG islands. Thin black arrow indicates the transcription start site; white arrows indicate MSP primers and thick black arrow BSP primers. (B) Methylation status of *ADAMTS12* in primary colon carcinomas and colon cancer cell lines. PCR-methylation analysis was carried out in paired normal (N) and tumor tissues (T), using the specific primers for either methylated (M) or modified unmethylated DNA (U). Genomic DNA from human lymphocytes was used as a control for unmethylated DNA (NL), and the CpGenome Universal Methylated DNA as control for methylated DNA (IVD). (C) Methylation density of *ADAMTS12* in colon cancer. Primary tumor samples and colon cancer cells were subjected to bisulfite treatment, and PCR amplification was performed using BSP primers. Relative positions of each CpG analyzed and the distance in bp are indicated in the control for unmethylated DNA (NL). Methylation percentages for the rest of the tumor samples examined are indicated in Table 1. Colors show the methylation density of each CpG: yellow, methylated; blue, not methylated; grey, not present. (D) Activation of *ADAMTS12* expression in colon cancer cell lines. Indicated cell lines were treated with 5'-aza-2'-deoxycytidine (Aza), or Aza + TSA. *ADAMTS12* expression was assayed by RT-PCR. N.T., no treatment. *GAPDH* mRNA was amplified as an internal control.

Table 1. Hypermethylation of the *ADAMTS12* promoter

Cell lines	Patient sample number	Microsatellite instability	Mean CpG site methylation (%)		Methylation status
			Normal	Tumor	
	340	MSS	9.80	25.80	M
	362	ND	ND	ND	M
	369	MSS	ND	ND	M
	372	MSI	ND	ND	M
	397	ND	49.33	13.75	U
	401	MSI	0.64	20.33	M
	404	MSS	17.39	22.05	U/M
	426	MSS	21.42	82.25	M
	467	MSS	9.23	84.07	M
	468	MSS	ND	ND	U/M
	478	MSS	4.33	25.96	M
	495	MSS	ND	ND	M
	496	MSS	11.11	19.61	U/M
	529	ND	ND	ND	U/M
	551	MSS	ND	ND	M
	555	MSS	35.34	20.07	U
	557	MSS	31.61	70.76	M
	566	MSS	7.40	59.24	M
	588	ND	ND	ND	U
DLD-1		MSI		85.74	M
COLO 205		MSS		82.21	M
HCT-116		MSI		86.51	M
HCT 15		MSI		66.79	M
HT29		MSS		ND	M
LoVo		MSI		9.58	U
RKO		MSI		80.76	M
SW480		MSS		82.14	M
SW620		MSS		84.10	M

MSP amplification using genomic DNA from the microsatellite-stable COLO 205, HT29, SW620 and SW480 colon carcinoma cell lines, and the microsatellite-unstable DLD-1, HCT 15, HCT-116, LoVo and RKO cell lines was used to measure methylation of the *ADAMTS12* promoter. Samples were also analyzed from paired normal and primary colorectal tumor tissue from 19 patients.

U, unmethylated; M, methylated; MSS, microsatellite-stable; MSI, microsatellite-unstable; ND, not determined.

DLD-1, HCT-116 and RKO (MSI cell lines) (Fig. 1C; Table 1). The percentage of methylation for HCT 15 cells was 66.8% and, consistent with the above MSP analysis, *ADAMTS12* gene promoter was found barely methylated in LoVo cells (Table 1).

The above results strongly suggested that promoter methylation could silence *ADAMTS12* gene expression. To examine this possibility, we selected the MSS cell lines SW480 and SW620, and the MSI cell lines DLD-1 and HCT-116 to perform RT-PCR amplification. As illustrated in Fig. 1D, none of these cell lines expressed *ADAMTS12*. It is also remarkable that none of the additional cells employed in the methylation analysis showed appreciable levels of *ADAMTS12* expression (not shown). Then, we investigated whether *ADAMTS12* expression could be restored by treatment with the demethylating agent 5'-aza-2'-deoxycytidine (Aza). This treatment was carried out with or without the histone deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA), which has also been used to examine the methylation status of *ADAMTS18* (Jin et al., 2007). As shown in Fig. 1D, *ADAMTS12* expression could be reinstated following drug treatment. Moreover, this activation was observed in DLD-1 and HCT-116 cells even in the absence of TSA. Taken together, these results provide evidence for the epigenetic silencing of *ADAMTS12* expression in colon carcinomas.

Expression of *ADAMTS12* in colon carcinomas

Next, we used RT-PCR to study expression levels of *ADAMTS12* in the set of colon cancer samples previously used to examine their methylation status (Table 1). Interestingly, and in contrast to what could be expected from the previous results, *ADAMTS12* expression

levels were higher in tumor samples than in normal tissues (Fig. 2). These tumor biopsies contained at least 50% tumor cell content but no attempt at tumor-cell enrichment was made. A similar result was obtained when PCR amplification was performed using a set of five commercially available paired normal and tumor cDNA samples from colon carcinomas (Fig. 2). As a positive control for this analysis, we performed PCR amplification of *SFRP1*, a gene known to be silenced by methylation in colon cancer (Aguilera et al., 2006).

Induction of *ADAMTS12* expression in stromal cells

A possible explanation for above unexpected result is that *ADAMTS12* is produced by stromal cells in the immediate vicinity of neoplastic epithelial cells and not by the tumor cells themselves. To evaluate this possibility, we performed an immunofluorescence study using 20 colon carcinoma tissue sections. As can be seen in Fig. 3A, double immunofluorescent staining for ADAMTS-12 and alpha smooth muscle actin (α -SMA) showed a close approximation of ADAMTS-12 immunoreactivity to α -SMA-positive cells. By contrast, there was no staining in epithelial cells. Moreover, detailed examination of 55 tissue areas revealed that 60% of areas of well-differentiated and moderately differentiated carcinomas showed a strong immunoreactivity for ADAMTS-12 (Table 2), and only two areas of the moderately differentiated carcinomas lacked staining for ADAMTS-12. However, only 36% of areas of advanced poorly differentiated carcinomas showed strong immunostaining for the enzyme, whereas 48% of these areas lacked staining, which is consistent with the relative low proportion of myofibroblasts in these

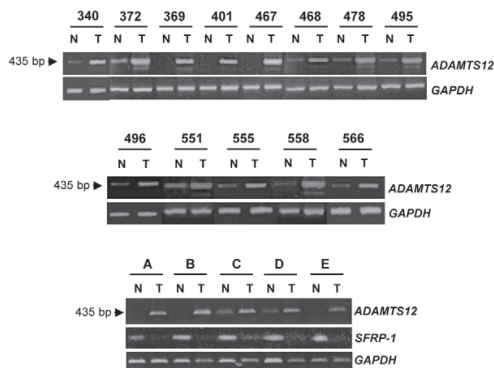


Fig. 2. *ADAMTS12* expression in human colon carcinomas. Top and middle panels: total RNA from the indicated colon carcinoma samples was isolated and *ADAMTS12* expression was assayed by RT-PCR (N, normal; T, tumor). The remaining colon carcinoma samples employed in this work were discarded for this analysis because of RNA quality. Bottom panel: amplification of *ADAMTS12* from a set of five (A-E) commercially available paired normal and tumor first-strand cDNA samples from colon carcinomas. Amplification of *SFRP1* was used as positive control. In all experiments, RT-PCR of *GAPDH* mRNA was used as an internal control.

undifferentiated tumours. Expression in normal mucosa or adenomatous polyps was not or hardly detectable. These data indicate that the expression of *ADAMTS12* is due to fibroblastic-like cells present in the stroma surrounding malignant cells. Moreover, these results point to a correlation between the expression of this metalloprotease and the histopathologic grade of tumours.

To examine whether colon fibroblasts could express the metalloprotease gene, we carried out co-cultures of CCD-18Co colon fibroblasts with colon cancer cells, and used quantitative RT-PCR to compare the differences in *ADAMTS12* expression levels with those detected in fibroblasts cultured alone. To discard any possible presence of tumor cells mixed with the fibroblasts following co-culture, absence of RT-PCR amplification of the carcinoma marker *EpCAM* (Trzpis et al., 2007) was also assayed (not shown). As illustrated in Fig. 3B, fibroblasts showed about twofold higher *ADAMTS12* expression when co-cultured with SW620 and DLD-1 cells, and fivefold higher levels in the case of co-culture with SW480 colon cancer cells. Additionally, we found that TGF- α (4.5-fold), TGF- β 1 (3.3-fold), and IL-6 (twofold) also raised *ADAMTS12* expression in these fibroblasts. By contrast, treatment with IL-10 did not modify the expression levels of this metalloproteinase. Next, we examined whether the enhanced expression of *ADAMTS12* observed in fibroblasts co-cultured with tumor cells could be promoted by any of the analyzed cytokines. To this end, we employed different blocking antibodies and found that a considerable reduction of the metalloprotease expression was observed when blocking antibodies against TGF- β 1 were added to the co-cultures, but not in the presence of blocking antibodies against TGF- α (Fig. 3C). *ADAMTS12* expression was not detected in tumor cells in the course of these experiments (not shown).

Then, we asked whether this induced expression of *ADAMTS12* in colon fibroblasts could be associated with any functional effect. To evaluate this possibility, we selected SW620 (MSS) and DLD-1 (MSI) cells because of the similar enhancement of *ADAMTS12* expression caused in CCD-18Co fibroblasts (Fig. 3B). Growth rates

for the colon cancer cells were calculated during the exponential growth phases in co-culture with colon fibroblasts. Cancer cells cultured alone on the inserts were used as control. Results indicated that both cell lines had growth defects. The doubling time for DLD-1 cells in co-culture with fibroblasts was 16.9 hours, whereas it was 13.9 hours when the cell line was cultured alone. This difference was even more significant in the case of SW620 cells: the doubling times were 31.5 hours in co-culture and 25.7 hours in the absence of fibroblasts. We also determined the percentage of apoptotic cells in the assayed conditions after 96 hours of incubation (Fig. 3D). Analysis of DLD-1 revealed that the apoptotic cell population was 34% in co-culture with colon fibroblasts, and 25.5% when the tumor cell line was cultured alone. Potency of apoptosis induction by the fibroblasts was higher in case of SW620 cells: 36.5% of tumor cells were apoptotic in co-culture, but only 12.5% in the absence of fibroblasts. This study indicates the occurrence of a decrease in tumor cell proliferation concomitant with enhanced *ADAMTS12* expression.

Taken together, these findings indicate that *ADAMTS-12* is mainly secreted by the stromal cells surrounding cancer cells in colon carcinomas. This stromal expression of *ADAMTS12* might suggest the occurrence of a protective response, which tries to compensate for the epigenetic silencing of this gene in malignant cells.

ADAMTS12 expression is epigenetically silenced in tumors of different origin

The above results obtained in colon cancer tissues and cell lines prompted us to extend our study on *ADAMTS12* expression to tumors of different origins through methylation analysis of additional tissues and cell lines. We employed the Illumina GoldenGate methylation platform to study the DNA methylation status of two CpG positions within the *ADAMTS12* CpG island in a panel of normal tissues and cancer cell lines. As shown in Fig. 4, *ADAMTS12* was found to be highly hypermethylated in most of the analyzed tumor cell lines (21 out of 29 for probe P250, and 26 out of 29 for probe E52). By contrast, methylation was scarcely detected or not detected in the normal tissues examined. Overall, these results provide additional evidence to indicate that *ADAMTS12* is an epigenetically silenced gene in tumor cells of diverse origin and to support its potential role as a tumor suppressor gene. Interestingly, this study also showed that the promoter region of *ADAMTS12* is not methylated in LoVo cells (probe P250), which perfectly agrees with the results obtained from MSP and bisulfite-sequencing PCR (BSP) analysis (Fig. 1). However, this gene is highly methylated in these cell lines in a region contained within its first exon (E52). Thus, it could not be ruled out that methylation in positions other than those previously examined by BSP in this work could control the silencing of *ADAMTS12* expression.

Discussion

In this work, we have found that the *ADAMTS12* gene is subjected to a generalized methylation process in colorectal tumors and in a variety of tumor cells from different origins, a mechanism of growing relevance in the inactivation of tumor-suppressor genes (Esteller, 2007). We have also proven that *ADAMTS12* expression can be induced in CCD-18Co fibroblasts and is associated with a decrease in proliferation and an increase in apoptosis of the adjacent tumor epithelial cells. Finally, histopathologic analysis has revealed that *ADAMTS-12* is detected in stromal cells from well-differentiated and moderately differentiated tumors rather than in

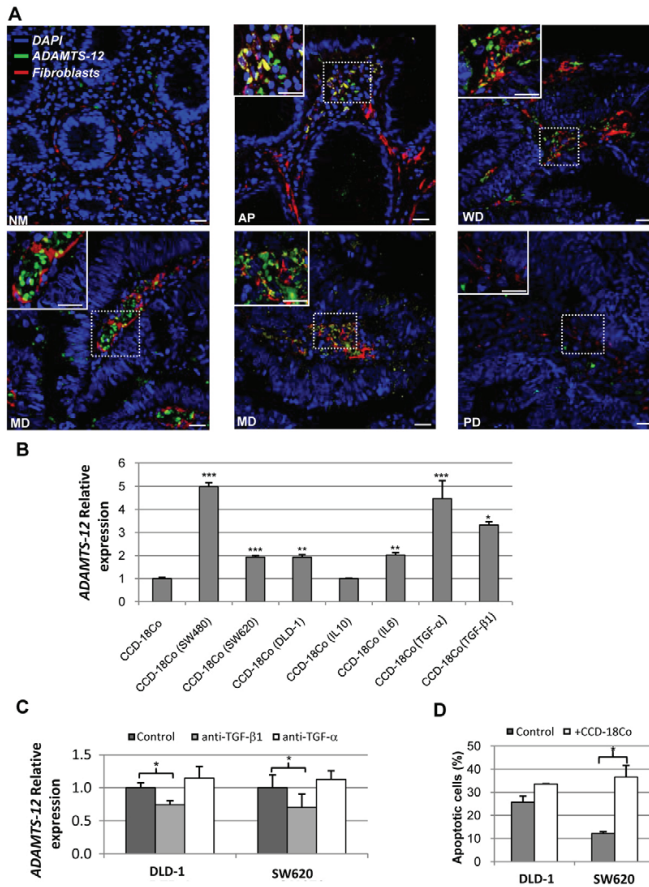


Fig. 3. Induction of *ADAMTS12* expression in stromal cells. (A) Immunofluorescence detection of ADAMTS-12 in colon carcinoma tissue sections. Detection of activated fibroblasts was performed using an anti-SM α -actin monoclonal antibody. ADAMTS-12 was detected using the H-142 antibody from Santa Cruz Biotechnology. Representative tissue sections corresponding to normal mucosa (NM), adenomatous polyp (AP), and well-differentiated (WD), moderately differentiated (MD) and poorly differentiated (PD) carcinomas are shown. Insets show higher magnifications of sections marked with a square. Scale bars: 50 μ m. (B) Induction of *ADAMTS12* expression was assayed by co-culture of CCD-18Co fibroblasts with the indicated colon cancer cells, or through treatment with the indicated cytokines. After 36 hours, *ADAMTS12* expression was determined by quantitative PCR. Actin expression was simultaneously analyzed as internal control. (C) Anti-TGF- β 1 blocking antibodies reduce *ADAMTS12* expression by fibroblasts co-cultured with tumor cells. A remarkable reduction of *ADAMTS12* expression was detected when anti-TGF- β 1 blocking antibodies were added to the co-cultures, whereas the presence of these antibodies did not show any direct effect on the metalloprotease expression. (D) Induction of apoptosis in colon cancer cells. DLD-1 and SW620 cells were co-cultured with CCD-18Co fibroblasts or cultured alone, and the percentage of apoptotic tumor cells was determined after 96 hours. (B,C,D) Data are means \pm s.e.m. Statistical significance was determined using a Student's *t*-test (*** P <0.001, ** P <0.01, * P <0.05).

those from advanced poorly differentiated carcinomas. Taken together, these results reinforce the proposal that ADAMTS-12 is a novel protease that can be included in the growing category of proteolytic enzymes with tumor-defying properties (Lopez-Otin and Matrisian, 2007).

ADAMTS-12 belongs to a family of metalloproteases that has been commonly associated with cancer (Rocks et al., 2008). Nevertheless, the functional relevance of these enzymes in tumor progression is still unclear and in some cases contradictory. On the one hand, ADAMTS-4 and ADAMTS-5 contribute to

invasiveness of glioblastoma cells through their ability to cleave brevican (Held-Feindt et al., 2006), therefore acting as pro-tumor proteases. On the other hand, and similar to our findings on ADAMTS-12, ADAMTS-8, ADAMTS-9 and ADAMTS-18 have been proposed to act as anti-tumor enzymes because the genes encoding these proteases have been found hypermethylated in tumors of different origins (Dunn et al., 2004; Jin et al., 2007; Lo et al., 2007). Interestingly, ADAMTS-1 plays a dual role in cancer because it exhibits both pro- and anti-tumor properties (Vazquez et al., 1999; Masui et al., 2001; Iruela-Arispe et al., 2003; Kuno

Table 2. *ADAMTS12* expression and histopathologic grade in colorectal carcinoma

Sample type	Number of areas examined	Degree of staining			
		-	+/-	+	
Adenomatous polyp	5	3 (60%)	2 (40%)	0 (0%)	
Adenocarcinoma	Well-differentiated	5	0 (0%)	2 (40%)	3 (60%)
	Moderately differentiated	20	2 (10%)	6 (30%)	12 (60%)
	Poorly differentiated	25	12 (48%)	4 (16%)	9 (36%)
All types	55	17 (31%)	14 (25.4%)	24 (43.6%)	

Twenty samples of adenomatous polyps and different grades of carcinomas were immunostained for ADAMTS-12, and 55 tissue areas examined in detail. The number and percentage of areas stained were calculated for each different group. - indicates no staining, +/- moderate staining, + intense staining. Staining resulted negative in the case of normal mucosa.

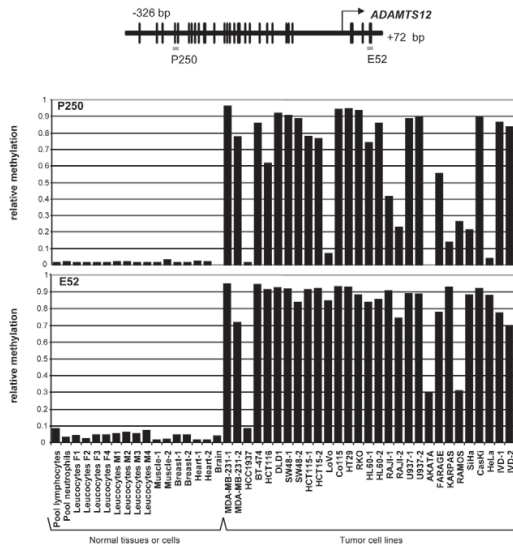


Fig. 4. DNA methylation analysis of the *ADAMTS12* promoter in a panel of normal tissues and cancer cell lines using bead arrays. Methylation was assessed at two CpG sites within the *ADAMTS12* CpG island using Illumina GoldenGate Methylation Arrays. The first CpG site was located 250 bp upstream of the transcriptional start site (P250) and the second CpG site was located 52 bp downstream the transcriptional start point (E52). The amount of bisulfite-modified target DNA that hybridizes to each spot of the Illumina chip was quantified and standardized over a scale from 0.0 to 1.0 (effectively 0% and 100% likelihood of gene promoter hypermethylation, respectively).

et al., 2004; Lee et al., 2006; Lind et al., 2006). An explanation for these controversial effects might derive from the fact that this metalloprotease undergoes proteolytic processing events and the generated forms display tumor-protective or tumor-promoting properties depending on the cleavage site (Liu et al., 2006). It has been reported that the ADAMTS-1 thrombospondin domains are responsible for this protective role through their ability to sequester growth factors like vascular endothelial growth factor (Luque et al., 2003; Kuno et al., 2004). The capacity of thrombospondin domains to inhibit the function of growth factors, together with their pro-apoptotic actions (Mirochnik et al., 2008), could also help to explain the effects herein described in colon cancer cells in the presence of ADAMTS-12.

Histopathologic analysis has revealed that ADAMTS-12 is detected in the stroma of well-differentiated tumors rather than in advanced carcinomas. It is noteworthy that immunofluorescent double-staining analysis for ADAMTS-12 and α -SMA resembles that shown for periostin, which is expressed by stromal cells in colon carcinoma (Kikuchi et al., 2008). Periostin is a secreted extracellular matrix protein found in close proximity to the cells responsible for its expression, the α -SMA-positive cancer-associated fibroblasts. The roles of periostin in cancer appear to be quite diverse, but studies with periostin-deficient mice have shown that this protein negatively regulates tumor growth by promoting capsule formation. This suggests that, similar to our proposal for ADAMTS-12, periostin can also function as an anti-tumor protein (Shimazaki and Kudo, 2008).

In this work, we also found that *ADAMTS12* expression is enhanced in colon fibroblasts co-cultured with colon cancer, which is linked to an anti-tumor effect on cancer cells. On this basis, we speculate that the expression of this metalloprotease could form part of a stromal response promoted by cancer-associated fibroblasts to control the pro-angiogenic properties induced by different soluble growth factors. These fibroblasts, also termed myofibroblasts, are the predominant cell type in the stroma of most carcinomas (Ronnov-Jessen et al., 1996) and constitute a heterogeneous population of cells that cannot always be identified as α -SMA-positive (Sugimoto et al., 2006). These cells are phenotypically different from fibroblasts present in normal tissue, but similar to those found in wounds during the healing process (Gabbiani, 2003). Myofibroblasts are intricately interwoven with the epithelial tumor cells (Micke and Ostman, 2004) and, therefore, different pro-tumor or anti-tumor responses can be elicited by the stroma as a consequence of its interaction with the malignant cells (Mueller and Fusenig, 2004).

Among the cytokines assayed in this study, TGF- α and TGF- β 1 induced the highest levels of *ADAMTS12* expression when the human colon fibroblasts were cultured alone. However, the use of blocking antibodies in co-cultured assays suggests that TGF- β 1 could be one of the factors responsible for expression of the metalloprotease as a consequence of the crosstalk between tumor and stromal cells. This finding perfectly agrees with previous studies showing that TGF- β 1 is one of the main inducers of *ADAMTS* gene expression, including that of *ADAMTS12*, in different conditions (Cal et al., 2001; Wang et al., 2003). Moreover, Porter et al. have also reported that *ADAMTS12* mRNA levels are higher in stromal fibroblasts than in epithelial tumor cells from breast cancer (Porter et al., 2004), a type of tumor that commonly expresses high levels of TGF- β 1 (Chang et al., 2007). Altogether, these findings indicate that, following its induction in stromal fibroblasts through the action of factors such as TGF- β 1, ADAMTS-12 might act as a tumor-protective protease in colon cancer and also in tumors of different origin such as breast cancer. Finally, the fact that other members of this metalloprotease family have also been found in stromal cells but not in the corresponding cancer cells (Cross et al., 2005), leads us to propose that stromal expression of different *ADAMTS*s could be a common feature in tumor development or progression.

In summary, we provide new data indicating a dual regulation of *ADAMTS-12* expression in colon carcinoma: epigenetic inactivation in epithelial malignant cells and induction in myofibroblasts, suggesting that this metalloprotease could form part of a protective stromal response aimed at limiting tumor progression. Our data also suggest that ADAMTS-12 might have potential clinical applications because this enzyme could be a prognosis marker not only in colon cancer but also in other tumors in which ADAMTS-12 is detected (Cal et al., 2002). However, further studies will be necessary to determine the precise role of *ADAMTS12* expression during progression of colon cancer. Likewise, analysis of susceptibility to colon cancer in *Adams12*-null mice, currently ongoing in our laboratory, will help to clarify the precise role of this enzyme in the context of the growing number of tumor-defying proteases that are known to be produced by human cells.

Materials and Methods

DNA samples

Genomic DNAs from paired normal and tumor colon samples were obtained from 19 patients undergoing surgery at the Catalan Institute of Oncology (Barcelona, Spain). Genomic DNA from human lymphocytes was used as a control for unmethylated DNA, and the CpGenome Universal Methylated DNA (Chemicon), for methylated

DNA. A set of five paired normal and tumor colon cDNA samples to evaluate *ADAMTS2* expression was purchased from Clontech.

Cell culture

Colon cancer cell lines and CCD-18Co fibroblasts were from the American Type Culture Collection. Cells were routinely maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin.

CpG island identification and DNA methylation analysis

An interval of 2.0 kb upstream and 0.5 kb downstream from the first *ADAMTS2* ATG codon was analyzed for CpG island identification using the Methyl Primer Express Software v1.0, (<https://products.appliedbiosystems.com>). This program was also used to design MSP primers. Primers for the unmethylated reaction were 5'-GAGTTTGGGAGGAAGATGTATT-3' and 5'-CTAACAAATCCACTTCA-ACAAA-3', and for the methylated reaction 5'-GAGTTCGGGAGGAAGATGTATC-3' and 5'-ACAATATCCGCTTTCGACG-3'. To analyze methylation density of genomic DNA, two BSP primers, 5'-TGGTTTGGGGTTTTTATT-3' and 5'-AACTAAACACCTTTTCCCTC-3', were designed using the indicated program. Bisulfite-modified genomic DNA from paired normal and tumor tissues and cell lines was used as template.

RT-PCR amplification

Total RNA from tissue samples and cell lines was isolated by guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction and reverse-transcription reactions were carried out with 300 ng of RNA, using the ThermoScript RT-PCR system with Platinum Taq polymerase (Invitrogen). The *ADAMTS2*-specific primers used were 5'-CAGAAAGGACATCTTGCTGG-3' and 5'-TCCTGGCAGAAAGTGCATTC-3'. PCR amplifications were performed under the following conditions: one cycle at 95°C for 1 minute, and 35 cycles at 95°C for 15 seconds, 55°C for 15 seconds and 72°C for 30 seconds. *GAPDH* was amplified as an internal control.

Treatment of colon cancer cell lines with demethylating agents

Colon cancer cells were seeded in 10 mm dishes and incubated in culture media with 10 µM Aza for 3 days. For the combined treatment, cells were treated for 3 days with Aza and subsequently with 10 ng/ml TSA for 24 hours. *ADAMTS2* expression before and after treatment was determined by RT-PCR.

Co-culture assays and cytokine treatment

Induction of *ADAMTS2* expression in colon fibroblasts was examined through their co-culture with colon cancer cell lines or by cytokine treatment. For co-cultures, subconfluent CCD-18Co fibroblasts in six-well dishes were cultured with cell-culture inserts (8.0 µm pore size; BD Biosciences) overlaid with the indicated colon cancer cell lines and incubated for 36 hours in DMEM medium containing 0.25% FBS. Cytokines were added to CCD-18Co fibroblasts cultured in six-well dishes at 2 ng/ml final concentration (except TGF-α, which was used at 25 ng/ml). Then, 9 µl of a 1:5 dilution of cDNA was employed in quantitative PCR using TaqMan probe HS00917112_m1, TaqMan Master Mix and AbiPrism 7900HT (Applied Biosystems). When indicated, anti-TGF-α or anti-TGF-β1 blocking antibodies (Calbiochem) were added to the co-cultures at 1.5 µg/µl. Actin expression was analyzed as an internal control. Statistical significance was determined using a Student's *t*-test. For determination of cell growth, overlaid colon cancer cell lines (SW620 and DLD-1) were trypsinized and counted directly in a hemocytometer. After plotting total cell number against time, data were adjusted to exponential curves from where doubling-time and regression values were calculated. For apoptosis analysis, 5 × 10⁵ cells were evaluated using the Annexin V-FITC/IP kit from Sigma-Aldrich. Each cell population was identified in a Cytomics FC500 (Beckman-Coulter).

Tissue immunofluorescence analysis

Paraffin-embedded colon tissues from 20 different tumors were cut into 5-micron sections and mounted onto glass slides. The sections were deparaffinized in xylene followed by ethanol hydration. Samples were permeabilized for 30 minutes with 0.1% Triton X-100 and incubated for 15 minutes in PBS with 0.1 M glycine. Nonspecific labeling was blocked with 5% BSA in PBS for 30 minutes. Sections were incubated overnight at 4°C with an anti alpha smooth muscle primary antibody (α-SMA, dilution 1:50; DakoCytometry) to detect activated fibroblasts. After incubation, sections were washed with PBS and PBS-Tween 20 (0.5% v/v), and then incubated with Alexa Fluor 546-conjugated goat anti-mouse antibody (dilution 1:500; Invitrogen) for 45 minutes at room temperature. After washing with PBS and PBS-Tween, sections were then incubated with a second primary antibody against ADAMTS-12 (H-142, dilution 1:25; Santa Cruz Biotechnology) overnight at 4°C and washed. H-142 is a polyclonal antibody raised against amino acids 1441-1582 of the human ADAMTS-12. Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit antibody (dilution 1:200; Invitrogen) was added and incubated for 45 minutes at room temperature. The corresponding negative controls were set by omitting the anti-ADAMTS-12 antibody. We then washed the slides and stained nuclei with 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich) at 1 µg/ml in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories). Images were obtained using a confocal microscope, Leica TCS-SP2-AOBS.

Analysis of DNA methylation status using bead arrays

Methylation analysis of *ADAMTS2* promoter in a panel of normal tissues and cancer cell lines was assessed using Illumina Goldengate Methylation Arrays (Bibikova et al., 2006). The two CpG sites analyzed were located 250 bp upstream and 52 bp downstream of the *ADAMTS2* transcriptional start point (E52). The amount of bisulfite-modified target DNA that hybridizes to each spot of the Illumina chip was quantified and standardized over a scale from 0.0 (0% likelihood of gene promoter methylation) to 1.0 (100% likelihood of gene promoter hypermethylation).

We thank Aurora Astudillo for advice and Marta S. Pitiot and Olivia García for excellent technical assistance. This work was supported by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación-Spain, Fundación Marcelino Botín and the European Union Framework Programme projects. The Instituto Universitario de Oncología is supported by Obra Social Cajastur, Spain.

References

- Aguilera, O., Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Herranz, M., Espada, J., Garcia, J. M., Munoz, A., Esteller, M. and Gonzalez-Sancho, J. M. (2006). Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene* **25**, 4116-4121.
- Apte, S. S. (2004). A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 981-985.
- Balbin, M., Fueyo, A., Tester, A. M., Pendas, A. M., Pitiot, A. S., Astudillo, A., Overall, C. M., Shapiro, S. D. and Lopez-Otin, C. (2003). Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nat. Genet.* **35**, 252-257.
- Bibikova, M., Lin, Z., Zhou, L., Chudin, E., Garcia, E. W., Wu, B., Doucet, D., Thomas, N. J., Wang, Y., Vollmer, E. et al. (2006). High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Genome Res.* **16**, 383-393.
- Bondeson, J., Wainwright, S., Hughes, C. and Caterson, B. (2008). The regulation of the ADAMTS4 and ADAMTS5 aggrecanases in osteoarthritis: a review. *Clin. Exp. Rheumatol.* **26**, 139-145.
- Cal, S., Arguelles, J. M., Fernandez, P. L. and Lopez-Otin, C. (2001). Identification, characterization, and intracellular processing of ADAM-TS12, a novel human disintegrin with a complex structural organization involving multiple thrombospondin-1 repeats. *J. Biol. Chem.* **276**, 17932-17940.
- Cal, S., Obaya, A. J., Llamazares, M., Garabaya, C., Quesada, V. and Lopez-Otin, C. (2002). Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene* **283**, 49-62.
- Chang, C. F., Westbrook, R., Ma, J. and Cao, D. (2007). Transforming growth factor-beta signaling in breast cancer. *Front. Biosci.* **12**, 4393-4401.
- Cross, N. A., Chandrasekharan, S., Jokonya, N., Fowles, A., Hamdy, F. C., Buttler, D. J. and Eaton, C. L. (2005). The expression and regulation of ADAMTS-1, -4, -5, -9, and -15, and TIMP-3 by TGFβ1 in prostate cells: relevance to the accumulation of versican. *Prostate* **63**, 269-275.
- Dunn, J. R., Panutopoulos, D., Shaw, M. W., Heighway, J., Dormer, R., Salmo, E. N., Watson, S. G., Field, J. K. and Liloglou, T. (2004). METH-2 silencing and promoter hypermethylation in NSCLC. *Br. J. Cancer* **91**, 1149-1154.
- Egeblad, M. and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 161-174.
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 286-298.
- Freije, J. M., Balbin, M., Pendas, A. M., Sanchez, L. M., Puente, X. S. and Lopez-Otin, C. (2003). Matrix metalloproteinases and tumor progression. *Adv. Exp. Med. Biol.* **532**, 91-107.
- Gabbiani, G. (2003). The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J. Pathol.* **200**, 500-503.
- Gutierrez-Fernandez, A., Fueyo, A., Folgueras, A. R., Garabaya, C., Pennington, C. J., Pilgrim, S., Edwards, D. R., Holliday, D. L., Jones, J. L., Span, P. N. et al. (2008). Matrix metalloproteinase-8 functions as a metastasis suppressor through modulation of tumor cell adhesion and invasion. *Cancer Res.* **68**, 2755-2763.
- Held-Feindt, J., Paredes, E. B., Blomer, U., Seidenbecher, C., Stark, A. M., Mehdorn, H. M. and Mentlein, R. (2006). Matrix-degrading proteases ADAMTS4 and ADAMTS5 (disintegrins and metalloproteinases with thrombospondin motifs 4 and 5) are expressed in human glioblastomas. *Int. J. Cancer* **118**, 55-61.
- Iruela-Arispe, M. L., Carpizo, D. and Luque, A. (2003). ADAMTS1: a matrix metalloprotease with angioinhibitory properties. *Ann. NY Acad. Sci.* **995**, 183-190.
- Jin, H., Wang, X., Ying, J., Wong, A. H., Li, H., Lee, K. Y., Srivastava, G., Chan, A. T., Yeo, W., Ma, B. B. et al. (2007). Epigenetic identification of ADAMTS18 as a novel 16q23.1 tumor suppressor frequently silenced in esophageal, nasopharyngeal and multiple other carcinomas. *Oncogene* **26**, 7490-7498.
- Kikuchi, Y., Kashima, T. G., Nishiyama, T., Shimazu, K., Morishita, Y., Shimazaki, M., Kii, I., Horie, H., Nagai, H., Kudo, A. et al. (2008). Perlestin is expressed in pericyptal fibroblasts and cancer-associated fibroblasts in the colon. *J. Histochem. Cytochem.* **56**, 753-764.
- Kuno, K., Bannai, K., Hakozaki, M., Matsushima, K. and Hirose, K. (2004). The carboxyl-terminal half region of ADAMTS-1 suppresses both tumorigenicity and experimental tumor metastatic potential. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 1327-1333.

- Lee, N. V., Sato, M., Annis, D. S., Loo, J. A., Wu, L., Mosher, D. F. and Iruela-Arispe, M. L. (2006). ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2. *EMBO J.* **25**, 5270-5283.
- Lind, G. E., Kleivi, K., Meling, G. I., Teixeira, M. R., Thiis-Evensen, E., Rognum, T. O. and Lothe, R. A. (2006). ADAMTS1, CRABP1, and NR3C1 identified as epigenetically deregulated genes in colorectal tumorigenesis. *Cell Oncol.* **28**, 259-272.
- Liu, Y. J., Xu, Y. and Yu, Q. (2006). Full-length ADAMTS-1 and the ADAMTS-1 fragments display pro- and antimetastatic activity, respectively. *Oncogene* **25**, 2452-2467.
- Llamazares, M., Obaya, A. J., Moncada-Pazos, A., Heljasvaara, R., Espada, J., Lopez-Otin, C. and Cal, S. (2007). The ADAMTS12 metalloproteinase exhibits anti-tumorigenic properties through modulation of the Ras-dependent ERK signalling pathway. *J. Cell Sci.* **120**, 3544-3552.
- Lo, P. H., Leung, A. C., Kwok, C. Y., Cheung, W. S., Ko, J. M., Yang, L. C., Law, S., Wang, L. D., Li, J., Stanbridge, E. J. et al. (2007). Identification of a tumor suppressive critical region mapping to 3p14.2 in esophageal squamous cell carcinoma and studies of a candidate tumor suppressor gene, ADAMTS9. *Oncogene* **26**, 148-157.
- Lopez-Otin, C. and Overall, C. M. (2002). Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 509-519.
- Lopez-Otin, C. and Matrisian, L. M. (2007). Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 800-808.
- Lopez-Otin, C. and Bond, J. S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol. Chem.* **283**, 30433-30437.
- Luque, A., Carpizo, D. R. and Iruela-Arispe, M. L. (2003). ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165. *J. Biol. Chem.* **278**, 23656-23665.
- Martin, M. D. and Matrisian, L. M. (2007). The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 717-724.
- Masui, T., Hosotani, R., Tsuji, S., Miyamoto, Y., Yasuda, S., Ida, J., Nakajima, S., Kawaguchi, M., Kobayashi, H., Koizumi, M. et al. (2001). Expression of METH-1 and METH-2 in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **7**, 3437-3443.
- Micke, P. and Ostman, A. (2004). Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer* **45 Suppl. 2**, S163-S175.
- Mirochnik, Y., Kwiatek, A. and Volpert, O. V. (2008). Thrombospondin and apoptosis: molecular mechanisms and use for design of complementation treatments. *Curr. Drug Targets* **9**, 851-862.
- Mueller, M. M. and Fusenig, N. E. (2004). Friends or foes-bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 839-849.
- Overall, C. M. and Lopez-Otin, C. (2002). Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 657-672.
- Porter, S., Scott, S. D., Sasso, E. M., Williams, M. R., Jones, J. L., Girling, A. C., Ball, R. Y. and Edwards, D. R. (2004). Dysregulated expression of adamalysin-thrombospondin genes in human breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **10**, 2429-2440.
- Porter, S., Clark, I. M., Kevorkian, L. and Edwards, D. R. (2005). The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem. J.* **386**, 15-27.
- Puente, X. S., Sanchez, L. M., Overall, C. M. and Lopez-Otin, C. (2003). Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 544-558.
- Rocks, N., Paulissen, G., El Hour, M., Quesada, F., Crahay, C., Gueders, M., Foidart, J. M., Noel, A. and Cataldo, D. (2008). Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer. *Biochimie* **90**, 369-379.
- Ronnov-Jessen, L., Petersen, O. W. and Bissell, M. J. (1996). Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol. Rev.* **76**, 69-125.
- Sadler, J. E. (2008). Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **112**, 11-18.
- Shimazaki, M. and Kudo, A. (2008). Impaired capsule formation of tumors in periestnull mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **367**, 736-742.
- Sugimoto, H., Mundel, T. M., Kieran, M. W. and Kalluri, R. (2006). Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol. Ther.* **5**, 1640-1646.
- Trzpis, M., McLaughlin, P. M., de Leij, L. M. and Harsmen, M. C. (2007). Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am. J. Pathol.* **171**, 386-395.
- Vazquez, F., Hastings, G., Ortega, M. A., Lane, T. F., Oikemus, S., Lombardo, M. and Iruela-Arispe, M. L. (1999). METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 23349-23357.
- Wang, W. M., Lee, S., Steigltz, B. M., Scott, I. C., Lebares, C. C., Allen, M. L., Brenner, M. C., Takahara, K. and Greenspan, D. S. (2003). Transforming growth factor-beta induces secretion of activated ADAMTS-2. A procollagen III N-proteinase. *J. Biol. Chem.* **278**, 19549-19557.

ANNEX II: INFORME DEL DIRECTOR

INFORME DEL DIRECTOR SOBRE EL FACTOR D'IMPACTE DELS ARTICLES PUBLICATS

Gabriel Capellá, en qualitat de director de la tesi doctoral de la Mireia Gausachs Romero, titulada “**Biomarcadors en càncer colorectal hereditari: aplicacions clíniques i estudi de la dinàmica tumoral**”, faig constar que la doctoranda ha participat activament en el disseny i realització experimental dels treballs que s’inclouen en aquesta tesi, l'anàlisi de resultats, la seva discussió i en la preparació dels manuscrits finals. Les contribucions concretes de cada treball s’especifiquen a continuació, així com el factor d’impacte dels articles a la data de la seva publicació.

ARTICLES PUBLICATS

ARTICLE 1:

***MLH1* promoter hypermethylation in the analytical algorithm of Lynch syndrome: a cost-effectiveness study**

Mireia Gausachs, Pilar Mur, Julieta Corral, Marta Pineda, Sara González, Llúcia Benito, Mireia Menéndez, Josep Alfons Espinàs, Joan Brunet, María Dolores Iniesta, Stephen B. Gruber, Conxi Lázaro, Ignacio Blanco i Gabriel Capellá

European Journal of Human Genetics; 20(7); 762-8 (2012)

Factor d’impacte (2012 JCR Science Edition): 4.4

Contribució de la doctoranda: Cultiu de línies cel·lulars emprades en aquest estudi com a controls i posterior extracció del DNA. Generació de controls a partir de cèl·lules englobades en parafina per poder realitzar una posterior extracció de DNA i reproduir els assajos amb controls similars a la mostra de rutina del marc diagnòstic. Realització de controls negatius per l’estudi de la hipermetilació a partir de l’amplificació de DNA de limfòcits amb whole genome amplification. Posada a punt de les metodologies comparades en l’estudi, l’SNUPE i l’MS-MLPA, participant en el disseny i en la execució dels experiments. Anàlisi de l’estudi de les sensibilitats analítiques associades a cada metodologia, l’estudi de la robustesa i variabilitat experimental. Estudi de la mutació de *BRAF* en la sèrie de casos de tumors CCR consecutius. Estudi i anàlisi de la majoria de

casos de la sèrie sospita de ser LS mitjançant SNuPE i MS-MLPA, participant en la validació de resultats. Estudi de les característiques diagnòstiques de cada estratègia per tal de veure quina era més sensible i específica en la detecció de casos LS. En l'estada de la doctoranda a la Universitat de Michigan, va col·laborar juntament amb la Dra. M^a Dolores Iniesta en el disseny de l'experiment de l'estudi de la piroseqüenciació, i va dur a terme l'estudi de la sensibilitat analítica de la hipermetilació del promotor d'*MLH1* mitjançant piroseqüenciació. Tot i que l'estudi de cost efectivitat va ser dut a terme per la Julieta Corral del Pla Director de l'Institut Català d'Oncologia, la doctoranda va participar activament en l'anàlisi i interpretació dels resultats. Finalment, va participar activament sent molt activa en l'escriptura i maduració del manuscrit fins la versió final.

ARTICLE 2:

Com a director de la tesi doctoral de la Mireia Gausachs Romero, titulada "Biomarcadors en càncer colorectal hereditari: aplicacions clíniques i estudi de la dinàmica tumoral", faig constar que ni el Dr. Daniel Azuara, ni la Dra. Mireia Morell, primers autors de l'article "Nanofluidic digital PCR for *KRAS* mutation detection and quantification in gastrointestinal cancer" presentat en aquesta tesi, no n'ha utilitzat, ni implícitament ni explícitament, els resultats per a la realització d'una tesi doctoral. Seguidament confirmo la participació de la doctoranda en el treball

Nanofluidic digital PCR for *KRAS* mutation detection and quantification in gastrointestinal cancer

Daniel Azuara*, Mireia M. Ginesta*, **Mireia Gausachs**, Francisco Rodriguez-Moranta, Joan Fabregat, Juli Busquets, Nuria Pelaez, Jaume Boadas, Sara Galter, Victor Moreno, Jose Costa, Javier de Oca i Gabriel Capellá

(*) Aquests autors han contribuït equitativament en aquest treball.

Clinical Chemistry; 58:9; 1332–1341 (2012)

Factor d'impacte (2012 JCR Science Edition): 7.905

Contribució de la doctoranda: Selecció de les línies cel·lulars per usar-les com a controls dels *hotspots* estudiats en aquest article. Cultiu d'aquestes i extracció del DNA. Participació en la cerca, i posada a punt de possibles metodologies alternatives, com la COLD-PCR, abans de la implantació

de la PCR digital. Participació activa en la tria de la metodologia emprada, en la seva posada a punt i en l'estratègia d'anàlisi. Juntament amb el Dr. Azuara va realitzar experiments de PCR digital amb reconstitucions per a l'estudi de la sensibilitat analítica i també va estudiar un conjunt de mostres parafinades amb PCR en temps real convencional mitjançant l'ús del Lightcycler 480. Quant a la posada a punt de la tècnica, va fer una part de l'experiment per analitzar el possible creuament de senyal entre les sondes i va repetir els experiments de reconstitucions considerant un baix input de DNA tot demostrant que era possible tenir una tècnica quantitativa fent una preamplificació de pocs cicles. L'ús de la PCR digital per l'anàlisi directe de les biòpsies de la sèrie de les criptes colòniques s'ha inclòs en l'article 3 d'aquesta tesi. Finalment, va participar en la revisió crítica del manuscrit.

MANUSCRIT EN PREPARACIÓ

ARTICLE 3:

Genetic background influences intratumoral and intracrypt heterogeneity in early colorectal tumorigenesis

Mireia Gausachs, Daniel Azuara, Sara González, Adriana Lopez-Doriga, Xavier Sanjuán, María José Paulés, Víctor Moreno, Conxi Lázaro, Ignacio Blanco i Gabriel Capellá

Article sotmès a publicació

Contribució de la doctoranda: Participació en la recollida de les mostres amb la col·laboració del Departament d'Anatomia Patològica de l'Hospital Bellvitge i aïllament de les criptes de tots els casos de la sèrie. Extracció del DNA de les biòpsies i de les criptes. Tot i que no forma part dels resultats de l'article, en col·laboració amb el Dr. Villanueva, va implantar tumors subcutanis i ortotòpics en ratolins atòmics per tal d'establir la sèrie dels tumors i poder obtenir criptes d'aquests tumors. Participació activa en el disseny de l'estudi, buscant les millors metodologies per a treballar amb un input tan limitat de DNA. Posada a punt la metodologia més adient per treballar amb les criptes. Realització de l'estudi de LOH i del MCR d'APC, tant en biòpsies com en criptes, analitzant els resultats. També va dur a terme la PCR digital en les mostres de les biòpsies per l'estudi dels *hotspots* de *KRAS*. Va realitzar les PCR en temps real mitjançant chips dinàmics de Fluidigm i amb Lightcycler 480 per tal d'estudiar els *hotspots* de *KRAS* i *BRAF* en la sèrie de les criptes. Va participar en l'anàlisi i interpretació de tots els resultats inclòs l'estudi de hierarchical

clustering de les metapoblacions de les criptes de cada cas. Finalment, ha participat en l'escriptura i maduració del manuscrit fins la versió final.

ARTICLE ADDICIONAL (ANNEX)

ARTICLE 4:

The *ADAMTS12* metalloprotease gene is epigenetically silenced in tumor cells and transcriptionally activated in the stroma during progression of colon cancer

Angela Moncada-Pazos, Álvaro J. Obaya, Mario F. Fraga, Cristina G. Vilorio, Gabriel Capellá, **Mireia Gausachs**, Manel Esteller, Carlos López-Otín i Santiago Cal

Journal of Cell Science: 122; 2906-2913 (2009)

Factor d'impacte (2009 JCR Science Edition): 6.144

Contribució de la doctoranda: Participació en la realització de microdissecció làser i captura de teixit d'una sèrie de casos aparellats normal i tumor de càncer colorectal. Va participar en la realització de la posterior extracció del RNA.

Dr. Gabriel Capellá Munar

Director Programa de Càncer Hereditari ICO
Laboratori de Recerca Translacional (LRT)
Institut Català d'Oncologia (ICO)-IDIBELL
gcapella@iconcologia.net