



Universitat Autònoma de Barcelona

**APORTACIONS A L'ESTUDI DE LA RELACIÓ
INFLAMACIÓ-TUMORIGÈNESI
EN EL CÒLON.**

TESI DOCTORAL

ELENA EYRE SÁNCHEZ

**Unitat de Fisiologia
Facultat de Veterinària**

Programa de Doctorat d'Immunologia

Bellaterra, Abril 2015



Universitat Autònoma de Barcelona

**APORTACIONS A L'ESTUDI DE LA RELACIÓ
INFLAMACIÓ-TUMORIGÈNESI
EN EL CÒLON.**

Elena Eyre Sánchez

Memòria presentada per optar al grau de Doctor
dins el programa del Doctorat en Immunologia

Directora
Ester Fernández Gimeno



Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Facultat de Veterinària

Bellaterra, Barcelona

2015



Universitat Autònoma de Barcelona

Na ESTER FERNÁNDEZ GIMENO, professora titular de Fisiologia del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, de la Universitat Autònoma de Barcelona,

Faig constar que la memòria titulada "Aportacions a l'estudi de la relació inflamació-tumorigènesi en el còlon." presentada per ELENA EYRE SÁNCHEZ per optar al grau de Doctor s'ha realitzat sota la meva direcció i, considerant-la concluda, autoritzo la seva presentació i defensa davant el tribunal corresponent.

I, per a que consti als efectes que s'escaigui, signo aquest document.

Dra. Ester Fernández Gimeno

Bellaterra, Abril de 2015

Aquest treball ha estat finançat a través del
projecte FIS PS09/01127 de
l'Instituto de Salud Carlos III.

"A smooth sea never made a skilled sailor." English Proverb

("Una mar en calma mai va fer expert a un mariner." Proverbi Anglès)

*"Rien dans la vie est à craindre,
il est seulement pour être compris.
C'est maintenant le temps de comprendre plus,
afin que nous puissions craindre moins."*

*("Res en la vida és de témer,
és només per ser entès.
Ara és el moment de comprendre més
perquè puguem témer menys.")*

Maria Salomea Skłodowska-Curie

Acrònims / Abreviatures

A2M	<i>Alpha-2-macroglobulin; alpha-2-M</i>
ACF	<i>Aberrant Crypt Focus; focus de criptes aberrants</i>
AJ	<i>Adherent junctions; unions adherents</i>
AKT1	<i>RAC; PKB; v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
ANG2	<i>angiopoietin-2; ANGPT2</i>
AOM	<i>Azoxymethane; azoximetà</i>
APC	<i>Adenomatous polyposi coli</i>
Atf4	<i>Activating transcription factor 4; CREB2</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Birc5	<i>Baculoviral IAP Repeat-containing 5; Survivin</i>
Brca1	<i>Breast cancer 1</i>
Brca2	<i>Breast cancer 2</i>
BTG2	<i>B-cell translocation gene 2</i>
CAC	<i>Colitis Associated Colorectal cancer; càncer colorectal associat a colitis</i>
CCND1	<i>Cyclin D1</i>
CD	<i>Crohn Disease; malaltia de Crohn</i>
cdNA	<i>Complementary DNA; DNA complementari</i>
COX-2	<i>Cycooxygenase-2; PTGS2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2)</i>
CRC	<i>Colorectal Cancer; càncer colorectal</i>
CTL	<i>Cytotoxic T Lymphocyte; limfòcits T citotòxics</i>
CTNNB	<i>β-catenin</i>
CTNND1	<i>p120; catenin δ-1</i>
CXCL12	<i>Stromal-derived factor-1; SDF-1</i>
DAB	<i>3, 3'-diaminobenzidine</i>
DAI	<i>Disease Activity Index; índex d'activitat de la malaltia</i>
DMH	<i>1,2-dimethylhydrazine</i>
Dock2	<i>Dedicator Of Cytokinesis 2</i>
DSS	<i>Dextran Sulfate Sodium; dextrasulfat sòdic</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
Eps8	<i>EGFR Pathway Substrate 8</i>
FAK2	<i>PTK2B;</i>
FAP	<i>Familial Adenomatous Polyposis; poliposi adenomatosa familiar</i>
FasL	<i>Fas ligand</i>
Fcγ1g	<i>Fc fragment of IgE I receptor gamma polypeptide</i>
GO	<i>Gene Ontology; ontologia gènica</i>
GSK3β	<i>Glycogen synthase kinase 3β</i>
H&E	<i>Hematoxylin and Eosin; hematoxilina i eosina</i>

HIF-1	<i>Hypoxia-Inducible Factor 1</i>
HNPCC	<i>Hereditary Non-Polyposic Colorectal Cancer; càncer de còlon hereditari no polipòsic (o Síndrome de Lynch)</i>
IBD	<i>Inflammatory Bowel Disease; malaltia inflamatòria intestinal</i>
IEC	<i>Intestinal Epithelial Cell; cèl·lula epitelial intestinal</i>
IgE	<i>Immunoglobulin E</i>
IL	<i>Interleukin; interleucina</i>
IRAK1	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>
IRS-1	<i>Insulin receptor substrate-1</i>
itga8	<i>Integrin alpha 8</i>
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KO	<i>Knock-out; -/-</i>
LEF	<i>Lymphocyte enhancer factor</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide; lipopolisacàrid</i>
LTA	<i>Lipoteichoic acid; àcid lipoteitoïc</i>
MAM	<i>Methylazoxymethanol acetate; acetat metil-azoximetanol</i>
miR	<i>microRNAs; miRNAs</i>
mRNA	<i>ARN missatger; àcid ribonucleic missatger</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
NBN	<i>Nibrin; NBS1; Nijmegen Breakage Syndrome Protein 1</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	<i>Natural Killer Lymphocyte</i>
NKT	<i>Natural Killer T Lymphocyte</i>
Nrp1	<i>Neuropilin-1; NRP1</i>
CTNND1	<i>CTNND1; catenin δ-1</i>
PAK4	<i>p21 activated kinase 4</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell; cèl·lules mononuclears de sang perifèrica</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PDCD4	<i>Programmed Cell Death 4</i>
PTK2B	<i>Protein Tyrosin Kinase 2 beta; FAK2 (Focal Adhesion Kinase 2)</i>
Rhou	<i>Ras Homolog Gene Family, Member U; WRCH1</i>
Smad3	<i>SMAD family member 3</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAM	<i>Tumor-Associated Macrophages; macròfags associats a tumors</i>
Tc	<i>T cytotoxic Lymphocyte</i>
TCF	<i>T cell factor</i>
TEER	<i>Transepithelial Electric Resistance; resistència elèctrica transepitelial</i>

TGFβ	<i>Transforming growth factor-beta</i>
TGFβR2	<i>Transforming growth factor-beta receptor II</i>
Th	<i>T helper Lymphocyte</i>
TIAM1	<i>T-cell lymphoma invasion and metastasis 1</i>
TICAM1	<i>TRIF; Toll-like receptor adaptor molecule 1</i>
TIR8	<i>Single immunoglobulin IL-1R-related molecule; SIGIRR</i>
TJ	<i>Tight junctions; unions estretes</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TNFα	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TRAF6	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
Treg	<i>T regulator Lymphocyte</i>
TRIF	<i>TICAM1; Toll-like receptor adaptor molecule 1</i>
UC	<i>Ulcerative Colitis; colitis ulcerosa</i>
UTR	<i>Untranslated region; regi3 sense traduir</i>
Vcl	<i>Vinculin</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Wnt1	<i>Wingless-type MMTV Integration Site Family, Member 1</i>

Índex

1 Introducció	1
1.1 Inflamació i càncer colorectal	3
1.1.1 Malaltia inflamatòria intestinal	3
1.1.2 Càncer colorectal	4
1.1.3 Càncer colorectal associat a colitis	6
1.2 Processos implicats en el CAC	8
1.2.1 Proliferació	8
1.2.2 Inflamació	10
1.2.3 Apoptosi	11
1.2.4 Adhesió cel·lular	12
1.2.5 Altres factors: els miRNAs	13
1.3 Model Experimental de CAC en rosegadors	17
1.3.1 Aspectes generals	17
1.3.2 Models de CRC	18
1.3.3 Models de UC	19
1.3.4 Models de CAC	20
1.3.5 Altres models	21
1.3.6 Selecció de la soca	22
Referències Bibliogràfiques	24
2 Hipòtesis i Objectius	35
3 Estudis en el model murí AOM/DSS	39
3.1 Materials i Mètodes	41
3.1.1 Disseny experimental	41
3.1.2 Monitorització	43
3.1.3 Eutanàsia i recollida de mostres de teixits	44
3.1.4 Anàlisi histopatològica	44
3.1.5 Estudi immunohistoquímic	46
3.1.6 Expressió gènica	47
3.1.7 Extracció i quantificació de microRNAs	49
3.1.8 Predicció de dianes dels microRNAs	50
3.1.9 Caracterització d'esplenòcits per citometria de flux	52
3.1.10 Anàlisi estadística	53

3.2 Resultats	54
3.2.1 Estudi preliminar	54
3.2.2 Estudi del procés carcinogènic	60
3.2.3 Estudi del procés inflamatori	72
3.2.4 Expressió de miRNAs	81
3.2.5 Caracterització de poblacions d'esplenòcits	90
4 Estudis amb mostres humanes	103
4.1 Materials i Mètodes	105
4.1.1 Caracterització cèl·lules mononuclears en sang perifèrica	105
4.1.2 Efectes de sobrenedants de monòcits sobre la Funció Epitelial de Barrera en cèl·lules Caco-2	107
4.1.3 Expressió gènica en biòpsies de còlon	108
4.1.4 Comparacions quantitatives	109
4.1.5 Ontologia gènica	109
4.2 Resultats	113
4.2.1 Estudi fenotípic	113
4.2.2 Estudi sobre la funció barrera	118
4.2.3 Estudi de l'expressió gènica	122
Referències Bibliogràfiques	135
5 Discussió	137
5.1 Estudis en el model murí	139
5.1.1 Evolució clínica, canvis histopatològics i d'expressió gènica	139
5.1.2 Canvis d'expressió de miRNAs	143
5.2 Estudis en mostres humanes	157
5.2.1 Ontologia gènica	157
5.2.2 Resposta secretora dels monòcits i funció barrera	162
5.2.3 Cerca de poblacions leucocitàries d'interès	163
Referències Bibliogràfiques	164
6 Conclusions	177

1 Introducció

1.1 Inflamació i càncer colorectal

1.1.1 Malaltia inflamatòria intestinal

La malaltia inflamatòria intestinal inclou diferents entitats clíniques, essent la malaltia de Crohn (CD; *Crohn Disease*) i la colitis ulcerosa (UC; *Ulcerative Colitis*) les més freqüents [1]. Són patologies d'etiologia desconeguda, tot i que es pensa que la presència d'un factor iniciador (per exemple, un antigen microbià) provocaria a l'intestí una resposta inflamatòria prolongada, greu i inapropiada, a individus predisposats genèticament [2]. Cursen amb inflamació crònica, alternant períodes d'activitat (brots) amb períodes remissió, i mostren un patró d'inflamació heterogeni a diferents nivells del tracte digestiu.

Els països industrialitzats són els que presenten major freqüència de casos, i s'ha correlacionat l'increment de la incidència amb el desenvolupament econòmic del país, aspecte que suggereix la influència de l'ambient. La incidència de la UC és major que la descrita per la CD, estimant-se als països occidentals en 1,2-20,3 persones per 100.000 habitants/any [3] [1]. La prevalència de la UC també és major que la de la CD, i se situa en 7,6-246,0 casos per 100.000 persones/any [3]. La simptomatologia associada a la IBD consisteix en diarrea, molèsties abdominals i símptomes generals com pèrdua de pes i anorèxia[1]. Ocasionalment, els pacients presenten també manifestacions extraintestinals diverses: cutànies, osteoarticulars, oftàlmiques, hematològiques o vasculares, entre d'altres.

La CD pot afectar de forma discontinua i heterogènia el tracte gastrointestinal des de la boca fins a l'anus, essent l'ili terminal i el cec les àrees que presenten afectació amb major freqüència. Es caracteritza per irregularitats a les criptes i infiltrat inflamatori format per limfòcits i cèl·lules plasmàtiques que afecta de forma transmural, de la mucosa a la serosa. Altres trets característics de la CD són la presència de granulomes i l'engruïment de la submucosa a causa de l'edema; també se sol veure afectat el sistema nerviós entèric, amb l'aparició d'hipertròfia irregular i hiperplàsia a les fibres nervioses [1].

La UC se circumscriu habitualment al còlon, amb el recte com a "zona de partida" fins a assolir el cec [4]. Histològicament, a la UC es dona un augment de la quantitat de cèl·lules inflamatòries, que poden assolir la zona més profunda de la mucosa, acumulant-se entre la base de les criptes i la capa muscular de la mucosa sense arribar a tenir caràcter transmural. Les poblacions limfocitàries se solen disposar al llarg de les criptes, en contacte amb els neutròfils, mentre que a la base de les criptes s'hi concentren cèl·lules plasmàtiques. La UC també es caracteritza per una superfície colònica irregular denominada *vellosa* o *pseudovellosa*, alteració

1. Introducció

de l'arquitectura de les criptes, metaplàsia de les cèl·lules de Paneth i disminució del moc intestinal [1].

La teràpia clàssica per la IBD inclou des del tractament simptomàtic amb fàrmacs antiinflamatoris i immunosupressors, fins a la cirurgia per tractar complicacions com les estenosis o eliminar segments amb afectació severa. Els nous enfoc terapèutics com l'ús d'antibiòtics o probiòtics per manipular la flora intestinal, o l'ús d'anticossos o d'altres agents biològics per bloquejar o neutralitzar citoquines, receptors o molècules de senyalització, es basen en els avanços del coneixement de la patogènia de la IBD. La cirurgia està indicada com a última alternativa quan cap dels tractaments farmacològics és efectiu, o es donen complicacions com la perforació o l'hemorràgia massiva, que comprometen la vida del pacient [1].

El fet que les recidives siguin un fenomen freqüent (el 95% de pacients amb UC recidiven en alguna ocasió al cap de 10 anys del diagnòstic, mentre que el 40-70% dels pacients de CD ho fan durant els 2 anys posteriors al diagnòstic [1]), juntament amb la limitada eficàcia de les teràpies disponibles, comporta el deteriorament de la qualitat de vida del pacient i n'augmenta el risc de patir càncer colorectal [5]. Per això són considerades les patologies cròniques més importants que afecten el tracte gastrointestinal dels humans.

1.1.2 Càncer colorectal

El CRC és la tercera forma més comuna de càncer, amb 1,4 milions casos diagnosticats anualment al món, i és una de les principals causes de mort per càncer als països industrialitzats, amb 694.000 defuncions l'any 2012 [6]. Això no obstant, s'està reduint notablement la mortalitat per CRC gràcies a campanyes de detecció precoç i d'eliminació de pòlips adenomatosos precancerosos.

Els principals factors etiològics coneguts del CRC són la predisposició genètica, els factors dietètics i l'edat [7]. El patiment crònic de malalties inflamatòries al còlon també es considera causa de CRC, segons la Sociedad Española de Oncología Mèdica (SEOM) [8].

Amb independència de l'event iniciador, a tots els tipus de CRC, a excepció del càncer de còlon hereditari no polipòsic (HNPCC, *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*; o Síndrome de Lynch), es produeix un conjunt d'alteracions genètiques, que en l'últim terme condueixen a neoplàsia colorectal [9]. El model proposat per Fearon i Volgestein [10] és àmpliament acceptat com la seqüència fenotípica pel desenvolupament de CRC. (**Figura 1**) La gran majoria dels tumors malignes de còlon es desenvolupen on ja existeixen lesions a la mucosa, com poden ser pòlips o focus inflamatoris [10]. La transició d'un creixement benigne

(adenoma) a maligne (carcinoma) és progressiva i finalment, acaba expandint-se i derivant a CRC, essent el més freqüent l'adenocarcinoma.

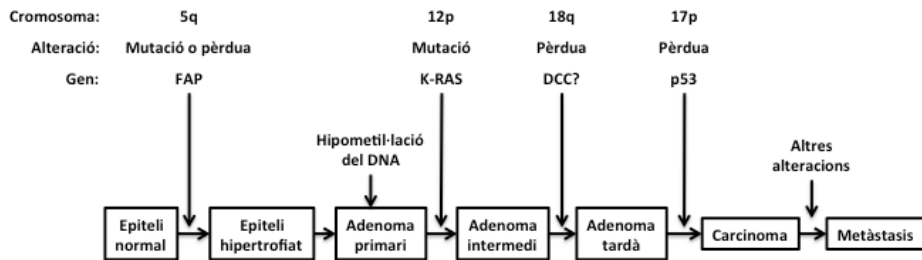


Figura 1. Representació adaptada del model proposat per Fearon i Volgesten el 1990 sobre la seqüència del desenvolupament del CRC.[10]

Pel desenvolupament de la majoria dels CRCs és necessària l'acumulació d'entre quatre i set mutacions a gens diferents. La mutació més primerenca a la progressió del CRC és al gen de la poliposi colònica adenomatosa (APC) [11]. Els resultats d'aquesta mutació seran un augment de la proliferació cel·lular i la inhibició de l'apoptosi [11]. Altres mutacions posteriors com les de l'oncogen *K-ras* es produeixen durant un estadi adenomatós més avançat, i la mutació del gen de la p53 és un event posterior a la transformació cel·lular [10].

Basant-nos en el seu origen genètic, el CRC es pot dividir en dues classes: amb poliposi i sense poliposi. Les mutacions que participen en la carcinogènesi del còlon s'han descobert mitjançant estudis genètics moleculars de síndromes amb predisposició hereditària com la poliposi adenomatosa familiar (FAP, *Familial Adenomatous Polyposis*) i el HNPCC. El 90% dels CRCs corresponen al CRC esporàdic [12], seguits dels CRCs hereditaris (FAP i HNPCC), i els CRCs associats a colitis (CACs).

La FAP és una malaltia hereditària amb herència dominant que causa nombrosos pòlips al còlon i al recte. Tot i que els pòlips són adenomes benignes, alguns d'ells esdevindran malignes si es deixen sense tractar. El risc de CRC a la poliposi no tractada és del 100%. El gen APC està identificat com un dels gens que sovint és suprimit en algunes FAP familiars [13]. L'activació de la via canònica de Wnt (*Wingless-type*), en la qual participa l'APC, a l'epiteli del còlon sembla ser un punt clau al procés d'aparició de pòlips [14] [15].

El HNPCC és una síndrome neoplàsica altament penetrant que es transmet de manera autosòmica dominant. És un càncer prevalent al món occidental i constitueix un 5% de tots els CRCs. Els pacients amb HNPCC desenvolupen tumors colorectals aviat, amb predomini al còlon dret, i un subgrup de pacients també

1. Introducció

desenvolupa tumors a altres òrgans, entre els quals l'estómac, l'intestí prim, els ovaris i l'endometri [16] [15]. Les mutacions presents als pacients amb HNPCC són mutacions heterozigòtiques d'un dels gens reparadors de DNA (entre els quals es troben típicament els gens MLH1, MSH2 i MSH6) [17] [18].

Microscòpicament, l'adenocarcinoma és el tipus histològic més freqüent (90-95%), seguit de l'adenocarcinoma col·loide o mucinós (10%). D'altres tipus, com el carcinoma epidermoide, els tumors carcinoides, els sarcomes, els melanomes o els limfomes, són menys freqüents [8].

La majoria de pacients són asimptomàtics, o bé presenten símptomes inespecífics produïts pel tumor primari o per les metàstasis. La perillositat rau en què aquests símptomes es poden relacionar inicialment amb altres malalties benignes [8]. Fins ara les opcions per tractar el càncer colorectal després d'una cirurgia són la quimioteràpia i la radioteràpia. Aquestes redueixen la progressió tumoral mitjançant efectes citostàtics i citotòxics directes en cèl·lules tumorals [19].

1.1.3 Càncer colorectal associat a colitis

El CRC és una de les complicacions més greus de la IBD, en particular de la UC, incrementant la mortalitat associada a la mateixa. Els factors de risc associats al desenvolupament de CRC en pacients amb UC són principalment l'extensió i la duració de la malaltia. De fet, pacients amb una UC extensa i de llarga evolució tenen un major risc de patir CRC que els individus normals (16.5% 30 anys després) després d'un diagnòstic inicial [20] [21]. Si bé en termes quantitius només representa el 2% dels CRCs, l'existència d'aquesta associació suggereix que l'estudi de la transició del fenomen purament inflamatori cap a la tumorigènesi pot aportar dades que permetin comprendre de quina forma intervé el sistema immunitari en el desenvolupament de processos tumorals [22].

S'ha constatat que el càncer apareix en regions amb inflamació crònica, i les cèl·lules i citocines proinflamatòries trobades en tumors poden contribuir al seu creixement i progressió [20]. La inflamació no resolta, latent, és part del microambient tumoral en tumors gastrointestinals, entre d'altres. La infiltració leucocitària i la presència de mediadors solubles, com les citocines i les quimiocines, són característiques clau de la inflamació relacionada amb el càncer [22].

A diferència del CRC esporàdic, al CAC, la carcinogènesi pot donar-se independentment de pòlips preexistents al teixit inflamat [21] [23], quan l'homeòstasi tissular es trenca per mutacions seqüencials i alteracions epigenètiques en gens relacionats amb el càncer, com ara metil·lació del DNA, o

modificació i mutació d'histones [22]. A més, existeixen diferències en l'aparició de mutacions al CAC respecte al CRC esporàdic (**Figura 2**): la freqüència és diferent, en períodes inicials del CAC es poden detectar mutacions a p53 i MSI (*microsatellite instability*) al teixit inflamat, i hi ha una acumulació de mutacions en un curt període de temps a l'inici del CAC [21] [23]. L'activació crònica de NF-κB (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) en macròfags i neutròfils contribueix a la formació de radicals oxigenats (*Reactive Oxygen Species, ROS*) i a la producció de NO (*nitric oxide*), citocines proinflamatories, prostaglandines (generades per la sobre-expressió de COX-2) i senyals antiapoptòtiques (com la família Bcl-xL) que cronifiquen, potencien i acceleren tot el procés que condueix a la carcinogènesi [21] [23]. De fet, s'ha relacionat l'estrès oxidatiu a diverses mutacions que predisposen a càncer a les cèl·lules de l'epiteli intestinal, entre les quals les del gen p53. Això altera processos clau i comporta la transformació maligna de cèl·lules. Als últims anys els estudis s'han centrat en les cèl·lules inflamatòries i els circuits que es troben actius al microambient tumoral; d'aquesta manera s'està evidenciant que tenen també un paper crucial al desenvolupament i la progressió de tumors [24] [22].

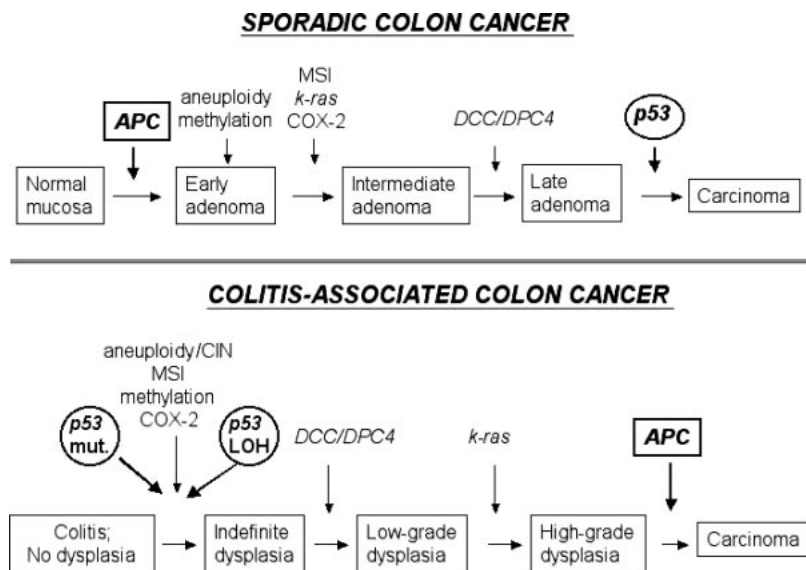


Figura 2. Diferències en la seqüència corresponent entre el CRC i el CAC segons Itzkowitz i Yio.[24]

S'ha demostrat que alguns fàrmacs antiinflamatoris redueixen el risc de CAC [25]. Un exemple serien els inhibidors de COX-2 [26]. Fins al moment, la COX-2 representa la diana més important en teràpia anti-CAC amb fàrmacs antiinflamatoris no-esteroidals (NSAIDs) que inhibeixen la COX-2 [27] [28] [29]. Uns nivells elevats de COX-2 inhibeixen l'apoptosi i promouen la metàstasi tumoral mitjançant la generació de grans quantitats de PGE₂ [30].

1.2 Processos implicats en el CAC

Per poder esbrinar els mecanismes causants del viratge d'una situació d'inflamació crònica cap al desenvolupament tumoral, molts autors s'han centrat en l'estudi dels processos que es donen a cada una d'aquestes dues situacions.

Hanahan i Weinberg van descriure sis alteracions que van considerar essencials en el creixement tumoral: senyals d'autosuficiència pel creixement (proliferatives), senyals d'evasió de la mort cel·lular programada (apoptosis), potencial replicatiu sense límits, angiogènesi sostinguda, i metàstasi i invasió cel·lular [33]. Més tard, hi van afegir noves capacitats: inestabilitat genòmica i mutació, inflamació promotora de tumors, reprogramació del metabolisme energètic i evasió de la resposta immune [34]. **(Figura 3)**

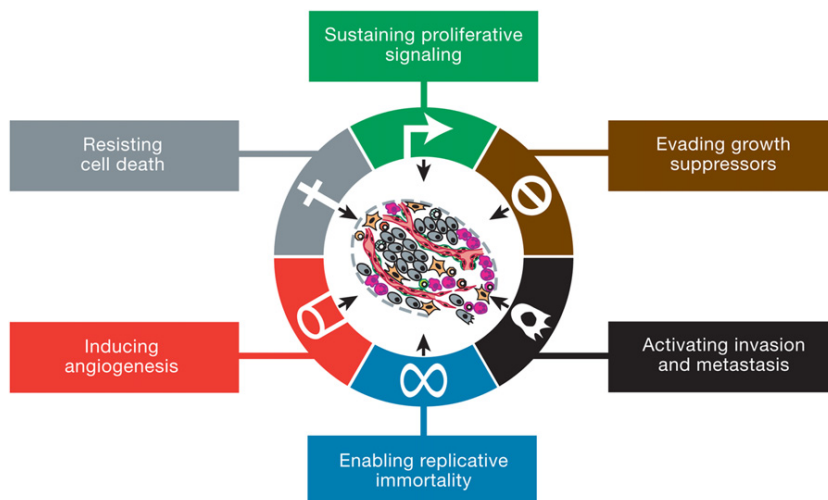


Figura 3. Capacitats adquirides pels tumors. Model suggerit per Hanahan *et al.* el 2000 sobre les diferents capacitats que adquireixen els tumors en el seu desenvolupament.[33] [34]

1.2.1 Proliferació

Les cèl·lules normals requereixen senyals mitogènics per passar d'un estat quiescent a un estat proliferatiu. Aquests senyals provenen de factors de creixement, components de la matriu extracel·lular i molècules d'adhesió/interacció intercel·lulars, sense els quals cap tipus de cèl·lula normal pot proliferar. Molts oncogenes imiten aquests senyals normals de creixement d'una manera o d'una altra: els tumors generen molts dels seus propis senyals de creixement, reduint així la dependència de l'estimulació procedent del seu entorn. Moltes cèl·lules cancerígenes també adquireixen l'habilitat de sintetitzar factors de

creixement que actuen de forma autocrina. La regulació ascendent de determinats receptors de membrana poden fer que la cèl·lula es torni hiperreactiva en alguns casos, i en d'altres hi ha canvis en els receptors de les integrines que afavoreixen la transmissió de senyals de proliferació. Però també cal tenir en compte que els tumors no són estructures simples, sinó que contenen diferents tipus cel·lulars, i els que més evolucionen són aquells en què aquestes interaccions són més robustes. I les cèl·lules inflamatòries que infiltrin els tumors poden promoure (més que no pas eliminar) les cèl·lules cancerígenes [33].

En un teixit normal, hi ha molts senyals antiproliferatius que mantenen la quiescència cel·lular i l'homeòstasi tissular; aquests senyals inclouen inhibidors de creixement citosòlics i de la matriu extracel·lular. Els senyals antiproliferatius poden bloquejar el creixement tumoral a través de varis mecanismes, com la inactivació de la via Wnt/ β -catenina als enteròcits de les criptes del còlon [33]. De fet, la via Wnt/ β -catenina juga un paper central en el desenvolupament inicial dels tumors colorectals [35]. Un altre cas àmpliament documentat és el dels senyals activats per TGF β (*transforming growth factor-beta*), que són reguladors importants del creixement cel·lular, de forma bifuncional. TGF β pot actuar positiva o negativament sobre la divisió cel·lular, augmentant la proliferació de cèl·lules mesenquimals i inhibint la de les cèl·lules epitelials. Això l'assenyala com a un element clau en manteniment de la integritat de l'epiteli [36]. Però un cop una cèl·lula epitelial s'ha transformat en adenocarcinoma, TGF β promou el creixement tumoral, la migració, la invasió, i la metastasi a un estadi avançat de CAC [37]. També s'ha suggerit que el TGF β serviria de factor immunosupressor en l'evasió del tumor enfront dels limfòcits T citotòxics CD8+ (CTL) o limfòcits NK (*Natural Killer*) [34].

L'angiogènesi és una altra característica vital per la proliferació tumoral: els tumors semblen activar el biaix angiogènic mitjançant el canvi d'equilibri entre inductors angiogènics i els seus respectius inhibidors. D'entre els factors angiogènics, el més potent és el VEGF (factor de creixement de l'endoteli vascular; *vascular endothelial growth factor*), responsable del creixement i la permeabilitat de les cèl·lules endotelials, la vascularització i l'angiogènesi tumoral [38] [39]. El HIF-1 (factor 1 induïble per la hipòxia; *hypoxia-inducible factor 1*) és el major regulador de VEGF, en resposta a la hipòxia, per l'enllaç amb el promotor VEGF [40] [41].

L'evolució dels tumors finalitza a l'etapa de la invasió tissular i metastasi, on les cèl·lules cancerígenes serien capaces de separar-se de la massa tumoral i colonitzar noves zones on inicialment tindrien nous nutrients i més espai per reproduir-se. Les proteïnes implicades en aquesta fase inclouen molècules d'adhesió, integrines, i MMPs (metal·loproteïnases de la matriu; *matrix metalloproteinase*), entre d'altres.

1.2.2 Inflamació

En condicions normals, en el tub digestiu existeix una inflamació controlada, fisiològica, la desregulació de la qual pot conduir a una situació d'inflamació descontrolada, patològica, en què es perd la tolerància a antígens de la microbiota comensal. En aquesta situació s'activen les respostes de la immunitat innata (cèl·lules epitelials intestinals o IECs, macròfags, neutròfils, etc.) i successivament, la immunitat adaptativa (limfòcits T i B). La interacció d'ambdós sistemes mira de resoldre l'agressió.

La inducció, regulació, i resolució de la resposta immunitària innata implica un ampli espectre de reaccions inflamatòries. El dany cel·lular o els patògens són detectats inicialment per PRRs (receptors de reconeixement de patrons; *Pattern Recognition Receptors*) i sensors d'estrès en cèl·lules *scavenger* (encarregades d'eliminar *debris* cel·lular), com els macròfags de teixit, i les cèl·lules dendrítiques. La secreció de citocines proinflamatòries, les quimiocines, i altres mediadors estimulen la vasodilatació, l'extravasació de neutròfils, i l'arribada de components del plasma com el complement i els anticossos, per destruir patògens i cèl·lules danyades. Després que una primera línia de fagòcits elimini els agents iniciadors, la inflamació canvia per donar lloc a la reparació tissular, i la homeòstasi immune. Aquesta transició es caracteritza per un viratge depenent de quimiocines de neutròfils cap al reclutament de monòcits, i la subsegüent aparició de macròfags activats alternativament que secreten factors antiinflamatoris, remodeladors de teixit, i angiogènics. Aquestes respostes poden ser polaritzades cap a un estat proinflamatori, que promogui un perfil concret d'immunitat adaptativa, com els limfòcits Th1/Th2/Th17. La persistència d'una resposta innata inadequada podria conduir a malaltia inflamatòria. Si els activadors inflamatoris no poden ser aturats i eliminats, o si persisteix l'estat proinflamatori, la inflamació es cronifica donant lloc a dany tissular, i a llarg termini mutació i neoplàsia, creixement tumoral, angiogènesi, i metàstasi [42] [43]. **(Figura 4)**

La família de receptors Toll-like (*Toll-like receptor*; TLR) està integrada per diversos elements que actuen com sensors de patrons moleculars conservats evolutivament i associats a patògens. Els TLRs reconeixen els microbis invasors i activen vies de senyalització per a l'eliminació del patogen, i en vertebrats superiors, defineixen la resposta del sistema immune adaptatiu [44] [45]. Per això són dianes putatives per interrompre les vies oncogèniques associades a la IBD [22].

A la IBD, la resposta immunitària es troba alterada, tant la innata com l'adaptativa. S'ha demostrat que els limfòcits de mucosa intestinal de pacients amb CD o UC actives proliferen quan s'exposen a la seva flora intestinal autòloga, fet que no passa en individus sans[46]; això suggereix que la pèrdua de tolerància a la microbiota pot ser un factor iniciador d'IBD que acaba desencadenant una resposta

exagerada davant microbiota comensal. En concret, la UC es caracteritza per una resposta Th2 [47].

Pel que fa a la seqüència inflamació-càncer, diverses molècules poden ser factors d'enllaç entre IBD i CAC. Entre aquestes s'inclouen (**Figura 4**) reguladors positius de la inflamació tals com el TNF α (factor de necrosi tumoral- α ; *tumor necrosis factor alpha*), IL-1 (interleucina-1; *interleukin-1*), IL-6 i quimiocines proinflamatòries; reguladors negatius com el TGF β , IL-10, TIR8 (també conegut com a *single immunoglobulin IL-1R-related molecule*, o SIGIRR); elements de la via COX-2; i receptors i molècules de senyalització de la immunitat innata com el TLR4 i MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*); i el NF- κ B [22].

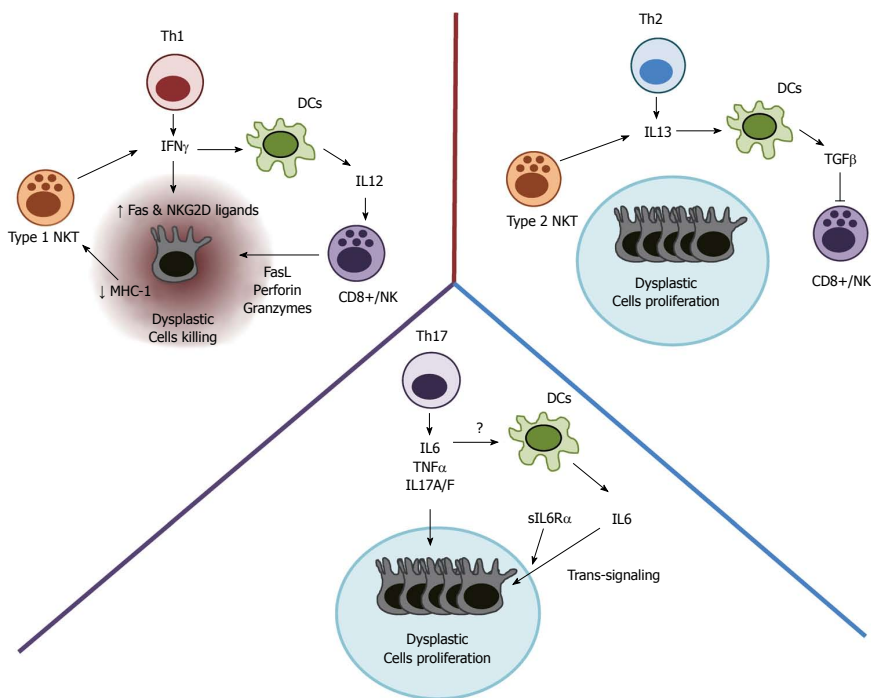


Figura 4. Diferents possibles respostes immunitàries en la tumorigènesi que, segons Danese i Mantovani el 2010, es consideren senyals de la regulació positiva i negativa.[22]

1.2.3 Apoptosi

L'apoptosi (mort cel·lular programada) és un procés important que contraresta la proliferació sobredimensionada i regula fenòmens comuns que, com la regeneració tissular, passen per una fase d'activació de la proliferació cel·lular [48] [49].

L'apoptosi es caracteritza per la fragmentació citoplasmàtica i la condensació

1. Introducció

nuclear, i està regulada per una varietat de gens entre els quals hi ha oncogens i gens supressors de tumors. Entre els oncogens destaca el *bcl-2*, que codifica en una proteïna que es localitza principalment a la membrana mitocondrial i que suprimeix l'apoptosi [33] [49]. El supressor tumoral més conegut és el p53, el qual es troba mutat a més del 50% dels tumors humans i juga un paper important a l'estrès genotòxic i a la hipòxia [50]. El factor p53 activa la transcripció de gens que bloquegen el cicle cel·lular, reparen el DNA, i afavoreixen l'apoptosi. L'espectre de gens diana induïts depèn del tipus de senyal activador i del teixit analitzat. A més de la seva activitat transcripcional, p53 també induïx apoptosi a través de mecanismes no-transcripcionals, com la inhibició del Bcl-2 i Bcl-XL a la membrana mitocondrial [10] [51] [50] [52].

La detecció de cèl·lules apoptòtiques generalment promou una resposta antiinflamatòria a nivell tissular i una tolerància immunològica gràcies a la seva ràpida eliminació per fagòcits. En canvi, l'eliminació de cèl·lules tumorals apoptòtiques pot promoure una resposta immunitària antitumoral [53].

L'apoptosi és, per tant, un procés que convé estudiar, ja que controlar el seu funcionament té un gran potencial per combatre el càncer.

1.2.4 Adhesió cel·lular

La integritat estructural de l'epiteli intestinal es manté gràcies a quatre sistemes d'adhesió: unió estreta (*Tight Junction*; TJ), unió adherent (*Adherens Junction*; AJ), unió oberta (*Gap Junction*; GJ) i desmosoma. D'entre ells, la TJ és el component més apical de la membrana basolateral, responsable de formar una barrera a la difusió paracel·lular de molècules d'elevat pes molecular. La barrera es manté gràcies a l'expressió de les AJs i TJs que permeten la unió entre cèl·lules adjacents mitjançant un ancoratge al citoesquelet [54] [55].

Diversos estudis sobre la IBD suggereixen una afectació de la barrera intestinal [56], caracteritzada per un augment de la permeabilitat paracel·lular de l'epiteli intestinal i la formació de noves unions cel·lulars associades a la regeneració de la barrera intestinal. L'increment de la permeabilitat de la barrera intestinal suposa una major exposició de la mucosa als antígens luminals, fet que comporta una resposta immune que pot perpetuar la inflamació i, a llarga, el desenvolupament de tumors. (Figura 5)

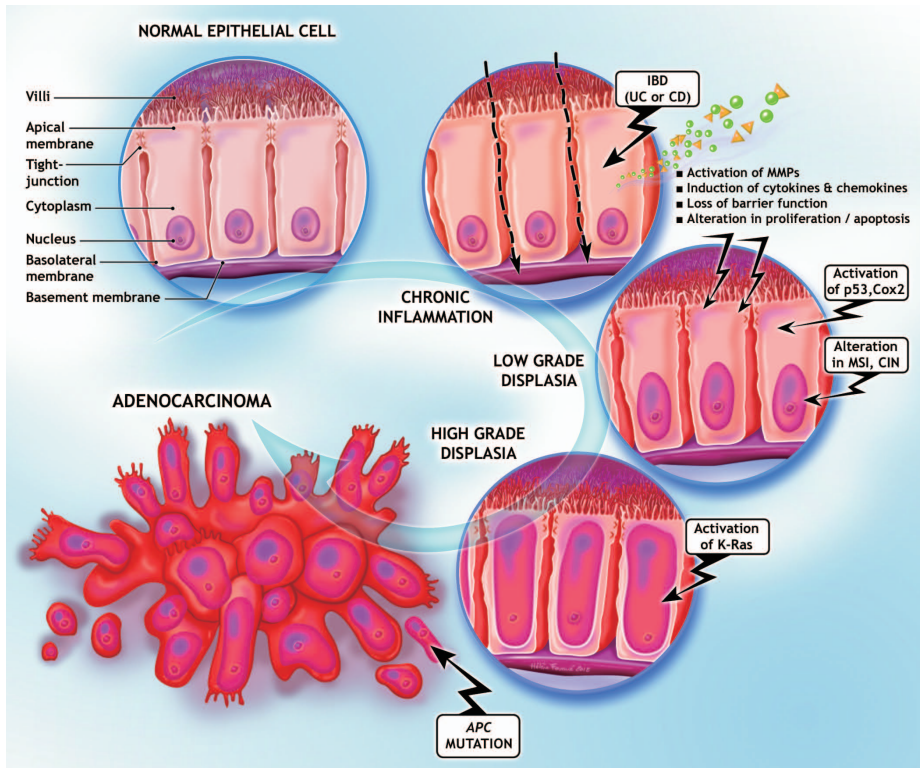


Figura 5. Esquema resum, de Walter *et al.*, dels processos que es donen en el desenvolupament del CAC.[57]

En les cèl·lules cancerígenes pot alterar-se l'expressió de molècules d'adhesió cel·lular (integrines) que podrien frenar la proliferació cel·lular i mantenir l'arquitectura tissular [33].

1.2.5 Altres factors: els miRNAs

Els microRNAs (miRNAs) són petites seqüències no codificants de RNA endogen de cadena simple capaces de modular l'expressió gènica post-transcripcionalment a través de mecanismes de silenciament. Tenen de 18–25 nucleòtids de llargada, estan altament conservats i actuen sobre la regió sense traduir 3' (*3'-untranslated region*; 3'-UTR) del mRNA diana [58] [59]. (Figura 6). Els microRNAs van ser descoberts durant estudis del gen *lin-4* a l'hel·mint *C. elegans*, el 1993 [62]. Després es va veure que molts organismes multicel·lulars expressen centenars de miRNAs, els quals presenten un patró d'expressió dependent de tipus cel·lular i de teixit [35].

1. Introducció

Els miRNAs poden regular negativament l'expressió gènica a través de dos mecanismes principals: la degradació del mRNA diana o la repressió traduccional. Els miRNAs que utilitzen aquest mecanisme redueixen els nivells de proteïna dels seus gens diana, però els nivells de mRNA d'aquests gens es veuen poc afectats. La utilització d'un mecanisme o un altre dependrà del mRNA diana [60] [61].

El fet que els miRNAs presentin seqüències altament conservades entre espècies suggereix que intervenen en processos biològics essencials, com ara els relacionats amb el desenvolupament, la diferenciació cel·lular, la proliferació i l'apoptosi [63] [35]. Com d'altres sistemes regulats per miRNAs, el sistema immunitari utilitza múltiples miRNAs per equilibrar adequadament la seva capacitat funcional, a través d'una modulació molt precisa de l'activació i la repressió [64]. Cada miRNA de mamífer probablement actua en diversos centenars de mRNAs diferents [65]; per tant és probable que d'alguna manera la majoria dels mRNAs estiguin controlats per altres miRNAs [66].

En humans, segons l'últim recompte de la base de dades mirBase al juny de 2014 [69], hi ha més de 28645 miRNAs madurs registrats. El nombre de miRNAs humans verificats continua expandint-se.

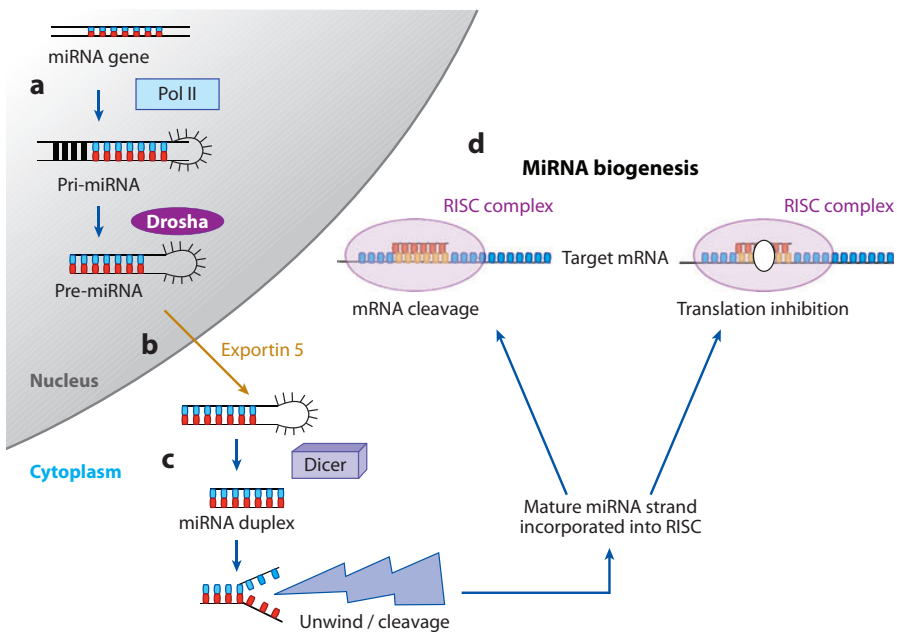


Figura 6. Biogènesi dels miRNAs (segons Garzon *et al.*).[58]

Estimacions basades en estudis bioinformàtics i en anàlisi amb microarrays suggereixen que un 30% de tots els gens estarien sotmesos a regulació per

múltiples miRNAs [70] [71]. A nivell molecular, s'ha vist que els miRNAs influeixen a l'expressió del gen diana entre 1,2 i 4 vegades, indicant que no funcionen com a interruptors dels gens, sinó que modulen finament els nivells d'expressió de les proteïnes reguladores clau [64].

Per tot això, els miRNAs poden tenir un paper clau en la carcinogènesi i es perfilen com a nous biomarcadors i com a indicadors de dianes terapèutiques per a aquestes malalties [64] [72]. Alguns investigadors sostenen també que el perfil de l'expressió dels miRNA podria predir l'evolució i el desenllaç d'una malaltia [73]. El model genètic del desenvolupament de tumor colorectal proposat per Fearon i Vogelstein el 1990 [10] aporta un marc per l'estudi dels estadis independents implicats a una malaltia humana complexa com el càncer de còlon associat a colitis. I és que la identificació d'alteracions genètiques presents en tumors podria aportar una eina molecular amb valor pronòstic en pacients amb CRC [10]. Una possible detecció seria mitjançant l'anàlisi dels nivells de miRNAs o de les seves dianes.

Regulació dels miRNAs

Hi ha dos tipus majoritaris de regulació dels miRNAs: o bé un model clàssic per part de proteïnes activadores o inhibidores, o bé una coregulació del miRNA i el gen hoste [58] [35].

Hi ha nombrosos estudis que corroboren el model de regulació clàssic. Per exemple, la via de senyalització LIN-12/Notch regula l'expressió del gen miR-16. Un altre exemple és el cas de miR-146, que conté en la seva regió 5'-UTR tres seqüències consens d'unió de NF- κ B, cosa que indica que miR-146 és un gen dependent de NF- κ B [58] [74] [35] [75]. La senyalització de receptors TLRs participa en la regulació dels miRNAs, ja que indueix l'expressió de factors de transcripció que, com NF- κ B, regulen l'expressió de certs miRNAs [64]. S'ha demostrat un paper modulador del supressor tumoral p53, en la maduració post-transcripcional de miR-16-1, miR-143 i miR-145 [76].

MicroRNAs i inflamació

Se sap que els miRNAs estan implicats en la regulació de la maduració, proliferació, diferenciació i activació de cèl·lules del sistema immunitari innat i adaptatiu. El desenvolupament de cèl·lules de la línia mieloide i la diferenciació de les cèl·lules B i T estan sota control dels miRNAs [45], i la seva desregulació pot tenir un paper en la patogènia de malalties inflamatòries. Un exemple de miRNA relacionat amb inflamació és el miR-155, que regula els nivells de les seves dianes per promoure la resposta immune [64]. També hi ha una regulació negativa dels miRNAs, exemplificada per miR-146, que regula la senyalització dels TLRs perquè té dianes com TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*), IRAK1 (*interleukin-1 receptor-*

1. Introducció

associated kinase 1) i NF- κ B, i miR-21, atenuant la resposta immune [64]. En els últims anys s'ha començat a esbrinar també la importància de l'expressió dels miRNAs en monòcits i macròfags [77].

MicroRNAs i càncer

Els miRNAs s'han estudiat molt intensament en el camp de la recerca oncològica. Hi ha evidències que suggereixen que la regulació de miRNAs alterats està implicada en la patogènesi del càncer [58] [35] [78] [79], i s'ha observat una alteració als seus nivells associada a processos malignes, inclòs el càncer de còlon [80].

La disminució de l'expressió de miR-15 i miR-16 a la leucèmia limfocítica crònica com a conseqüència de la deleció cromosòmica 13q14.3 va ser la primera evidència que relacionava la desregulació dels miRNA i el càncer [78]. Més endavant es va observar una consistent disminució de miR-143 i miR-145 en el CRC [81]. En els darrers anys aquests estudis s'han estès a altres tumors sòlids [35] [82]. L'ús de *microarrays* de miRNAs ha confirmat que alguns miRNAs s'expressen de forma diferent en mostres normals i tumorals [83] [84].

Els miRNAs poden promoure el càncer a través de diversos mecanismes, com la desregulació transcripcional, l'alteració del nombre de còpies, i la inducció d'alteracions epigenètiques [35] [61] [82]. Aquells miRNAs la mutació o pèrdua d'expressió dels quals es correlaciona amb càncers humans es denominen *oncomirs*. Una sobreexpressió o bé una infraexpressió de l'oncomir causaria respectivament la inhibició de gens supressors tumorals o l'activació d'oncogens [58] [61] [74] [82] [85]. També hi ha evidències que determinats miRNAs controlen les propietats invasives i metastàtiques de les cèl·lules cancerígenes [77] [78] [86].

Les mutacions que alteren dràsticament el silenciament dels mRNAs no són habituals a la natura, però es poden donar en els polimorfismes (*single nucleotide polymorphisms*; SNP) que afecten les seqüències dels miRNAs i a les regions d'enllaç amb 3'-UTRs dels seus mRNAs diana, amb efectes aparentment subtils però que poden tenir importants repercussions quant al risc de desenvolupar CRC [35] [59].

1.3 Model Experimental de CAC en rosegadors

1.3.1 Aspectes generals

Fins ara es coneixia molt poc de la relació entre inflamació intestinal i càncer de còlon, però els models animals han portat informació clau per comprendre millor la progressió del CAC. Tot i no reproduir de forma precisa la complexitat de l'etiopatogènia i el curs clínic de la malaltia humana, són valuosos a l'hora d'estudiar aspectes difícils d'abordar en humans, com els mecanismes fisiopatològics en fases inicials de colitis, l'efecte de determinades teràpies i la influència de factors ambientals en el desenvolupament de càncer [87] [88].

Molts estudis sobre càncer es basen en la introducció de cèl·lules canceroses humanes en animals immunodeficients. Aquests estudis tenen els desavantatges que en general les cèl·lules es trasplanten de forma no ortotòpica (generalment subcutàniament) i que no és possible estudiar la resposta immune de l'animal, aspecte particularment rellevant si parlem de càncer colorectal associat a colitis. Com a excepció al primer desavantatge cal mencionar estudis en els quals, malgrat l'ús d'animals immunodeficients, almenys les cèl·lules tumorals s'implanten al còlon, i així tenen un microambient més semblant als tumors que es produeixen en la clínica humana [89].

La disponibilitat de soques de ratolins amb una genètica ben definida, a la que es poden incorporar mutacions, sobreexpressió o delecció de gens concrets, permet estudiar la influència de gens concrets en el desenvolupament del càncer [90]. Donada la importància del factor immunològic en la malaltia, en l'estudi de la progressió del càncer colorectal associat a colitis convé utilitzar animals immunocompetents [91] [92].

El càncer colorectal associat a colitis, però, només apareix sense manipulacions exògenes en uns pocs models, així que normalment es fan servir models d'animals als quals s'indueix la malaltia. Els models de càncer colorectal associat a colitis en animals es poden classificar en quatre categories: models induïts químicament, models deguts a canvis genètics, models de malaltia espontània i models de transferència cel·lular [93] [94] [95] [96].

Com a la població humana, la base genètica dels animals de laboratori és un component significatiu de la carcinogènesi específica d'òrgan [97] [90]. Les soques de ratolí definides genèticament com a salvatges, que difereixen en la seva sensibilitat als carcinògens de còlon, ofereixen diferents avantatges per l'estudi de la carcinogènesi específica d'òrgan però, sovint, són variables i depenen de les condicions ambientals sota les quals els animals són mantinguts [90]. Hi ha molts

1. Introducció

mecanismes moleculars que poden contribuir a la sensibilitat diferencial al càncer com ara la velocitat d'activació i desactivació del carcinogen, el grau d'alquilació del DNA i l'eficiència dels processos de reparació [98].

1.3.2 Models de CRC

Els models en rosegadors són altament reproduïbles, poden ser fàcilment aplicat en animals amb característiques genètiques específiques i la patogènesi és semblant al CRC humà, almenys als estadis inicials. Històricament, la majoria dels estudis de carcinogènesi de còlon s'han dut a terme en rates [101] [102]. Però l'elevada freqüència de tumors generada al còlon distal dels ratolins, així com la histogènesi de múltiples adenomes amb subsegüent desenvolupament d'adenocarcinomes, també validen la importància d'aquestes espècies per a l'estudi de la patogènesi del càncer de còlon [103] [104]. Un avantatge dels models murins és la disponibilitat de l'extensa informació genètica, de soques consanguínies, ratolins transgènics, *knockout* (KO) i *knockin* (KI) disponibles per l'estudi. Un notable desavantatge d'aquests models és que en general no s'arriba a desenvolupar un fenotip invasiu i metastàtic [90] [105] [106]. Un important avantatge, en canvi, és que els models en rosegadors mimetitzen la seqüència adenoma-carcinoma que es troba al CRC humà [90].

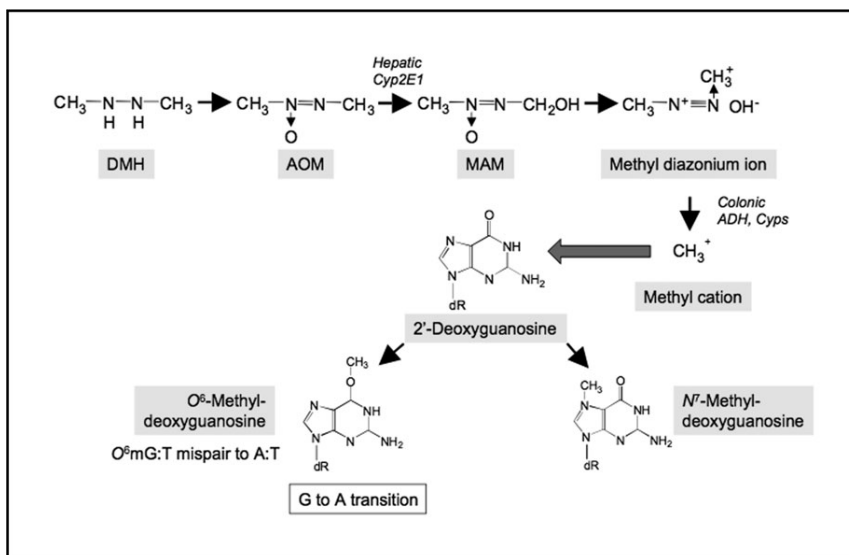


Figura7. Metabolització de la dimetil-hidrazina, extret de Rosenberg et al., 2009.[90]

De fet, el model més utilitzat de CRC es basa en administrar DMH (1,2-dimethylhidrazina) o el seu metabolite directe AOM (azoximetà; metil-metilimino-òxid-azani)[90], que tenen un marcat tropisme colònic. Aquests compostos són

carcinògens metilants que realitzen una activació *in situ* d'electròfils reactius amb el DNA [94] [97] [109] [110]. (**Figura 7**). El metabòlit reactiu MAM (acetat metilazoximetà) fàcilment produeix un ió metildiazoni, que pot alquilar macromolècules al fetge i al còlon [111] [112] [113], i metilar la guanina a les posicions O^6 o N^7 (O^6 -metil-desoxiguanosina i N^7 -metil-desoxiguanosina)[90] [114]. (**Figura 7**). La relativa estabilitat del MAM[107] amb una semivida d'unes 12 hores, és suficient perquè MAM accedeixi al còlon per via sanguínia [108]. Les lesions apareixen al còlon distal i al recte dels animals d'experimentació, una distribució semblant a la que s'ha trobat al CRC humà [97].

Els primers estudis amb aquests agents carcinògens van mostrar alteracions histològiques, com canvis mucínics i alteracions a la velocitat de proliferació a les criptes [115] [116] [117], o formació d'ACFs (focus de criptes aberrants)[118] [119] [120] [121]. S'ha comprovat que les ACFs humanes comparteixen una morfologia similar i estan presents al teixit de còlon aparentment normal dels pacients amb CRC [122] [123]. La naturalesa i l'ordre dels canvis genètics afecta la morfologia dels ACFs i la progressió tumoral [10] [124] [125]. L'AOM s'ha utilitzat extensament per generar gran nombre de lesions epitelials precancerígenes que són el referent de les ACFs [97]. La gravetat de les lesions pot veure's incrementada per la presència de promotors tumorals com l'àcid còlic o amb dietes riques en ferro, i comporten alteracions a la via de senyalització de Wnt, com ara mutacions a la β -catenina [126]. Tant a la rata com al ratolí, les ACFs planes creixen més ràpidament que les clàssiques ACFs elevades, possiblement com a resultat de l'activació del Wnt i de la multiplicació accelerada de les criptes [127]. Les lesions caracteritzades en aquests models podrien esdevenir útils per la predicció del risc de càncer en humans [90].

La promoció del tumor s'ha relacionat amb la sensibilitat diferencial de cada soca a AOM o DMH [98] [90] [128]. Altres grups destaquen que no han trobat diferències dependents del sexe i l'exposició prenatal a AOM [129].

1.3.3 Models de UC

La colitis induïda per dextrasulfat sòdic (DSS) és el model més utilitzat per a l'estudi de la UC. La resposta al DSS presenta una certa variabilitat que ve donada per la soca, el proveïdor i el gènere dels animals, així com la concentració i el pes molecular del DSS, la duració de l'exposició i la càrrega ingerida del mateix. Tot i això, és un model força reproduïble sota les mateixes condicions experimentals [130] [131] [132] [133] [134]. El tipus de colitis que es produeix es considera adequat per estudis que pretenguin provar nous conceptes d'intervenció terapèutica i per a estudiar aspectes particulars de la inflamació intestinal. Es considera que el model té un alt valor predictiu [135].

1. Introducció

Els animals colítics mostren canvis clínics com ara: una significativa pèrdua de pes, aparició de diarrea sanguinolenta, canvi de comportament (disminució de la ingesta, reducció de les conductes d'empolainament, estupor, lordosi, etc.). Els canvis histològics inclouen: engruiximent de la paret intestinal i escurçament colònic, lesions que afecten la mucosa i submucosa amb presència d'ulceracions, més evidents en còlon distal, edema i infiltració de cèl·lules mononuclears, lesió de criptes i pèrdua de l'arquitectura normal de la mucosa. Mentre que els immunològics consisteixen en: una moderada però sostinguda producció de citocines IL-18, IFN γ , IL-1 β , IL-12, TNF α , IL-17, etc. [100] [136] [137]. Quan l'administració de DSS es produeix de forma cíclica (o en un únic cicle en la soca C57BL/6) els ratolins arriben a desenvolupar lesions cròniques que es poden allargar durant setmanes després del període d'exposició. Aquestes lesions es caracteritzen per la presència de prominents fol·licles limfoides i displàsia epitelial [138].

La colitis induïda per DSS és mediada per mecanismes diferents segons la fase de la malaltia [139]. A la fase aguda es considera que la immunitat innata realitza un paper fonamental i les lesions observades es correlacionen amb l'augment de citocines proinflamàtòries derivades de macròfags (TNF α , IL-1 β , IL-6). Les cèl·lules B i T (immunitat adaptativa) no semblen necessàries per a la inducció de la inflamació en aquest model, ja que és reproduïble en ratolins SCID (*severe combined immunodeficiency*, immunodeficiència severa combinada) [139]. La fase crònica es caracteritza per una lenta reparació de la mucosa després de l'extens dany inicial. Aquesta fase es considera mediada per limfòcits que han estat activats per citocines proinflamàtòries de la fase anterior [140]. Aquests limfòcits secreten elevades quantitats de IFN γ i IL-4, suggerint que tant les cèl·lules Th1 com les Th2 juguen un paper patogènic en aquesta fase. A més, estudis més recents suggereixen la implicació també de les cèl·lules Th17 en aquesta etapa, tal com succeeix a la CD [141] [142] [143].

El DSS pot actuar com un carcinògen colònic no-genotòxic, fet pel qual aquest model permet estudiar també la seqüència inflamació-càncer, ja que en fases més avançades i de forma semblant al que succeeix en humans, apareixen amb elevada incidència fenòmens neoplàsics en còlon, com a resultat dels mecanismes propis de regeneració tissular.

1.3.4 Models de CAC

Per intentar reproduir el CAC s'ha utilitzat la inducció d'inflamació en animals tractats amb carcinògens com l'AOM o bé que presenten mutacions heretables que predisposen al desenvolupament tumoral [138]. Així es van desenvolupar diversos

models experimentals, com el tractament amb DSS d'animals $l'APC^{min}$ i o d'animals que havien estat tractats amb AOM. Aquest últim representa un model murí molt valuós per l'estudi del CAC, perquè és una variant d'un model estàndard de colitis en el qual l'administració oral de DSS cíclica als ratolins provoca situacions similars als brots que s'observen a la colitis [22] [144]. En aquest model, els ratolins desenvolupen tumors després d'un temps d'exposició a DSS relativament curt, en comparació amb els que només reben DSS; l'efecte s'incrementa mitjançant administrant AOM abans de la primera administració de DSS, cosa que causa la formació de O^6 -metilguanina i promou de forma consistent el desenvolupament de càncer colorectal [22].

Hi ha molts estudis que han utilitzat diverses variacions d'aquest model i que han estudiat diversos aspectes com ara l'anàlisi seqüencial de les alteracions patològiques durant la carcinogènesi. Aquests estudis han permès confirmar que la inflamació provocada pel DSS té un efecte potenciador de la tumorigènesi. Alguns suggereixen una participació de l'estrès nitrosatiu causats pel DSS en el procés tumorigènic [145]. Els canvis en l'expressió gènica ocasionats per la mutagènesi i també pel propi procés inflamatori tenen un fort impacte en el desenvolupament del càncer [146] [147]. Tot i que la tumorigènesi subministrant únicament cicles repetitius de DSS en l'aigua de beguda és factible, l'exposició requerida és molt llarga i la incidència i/o multiplicitat dels tumors induïts són relativament baixes [138].

El model experimental de CAC més estès en rosegadors és doncs l'administració d'AOM en combinació amb l'exposició cíclica a DSS. D'aquesta manera s'incrementa la incidència de lesions displàsiques en relació a les produïdes per la simple administració cíclica de DSS durant períodes perllongats [22]. S'ha comprovat que el model animal d'azoximetà amb dextrasulfat sòdic (AOM/DSS) és una eina molt útil per la recerca dins la patogènesi i la quimioprevenció de la carcinogènesi de còlon relacionada amb la colitis [90].

1.3.5 Altres models

Tot i que no existeix un model animal que reproduïx totes les característiques clíniques i patogèniques del CAC, cada un d'ells permet explorar diferents aspectes dels mecanismes responsables de la iniciació i perpetuació de la malaltia.

La deleció o sobreexpressió de determinats gens ha permès identificar factors genètics implicats en la patogènesi del càncer de còlon [93] [94]. La deleció gènica (*knock-out*, KO, $\bar{\prime}$) o la sobreexpressió d'un gen permet identificar com i perquè els defectes immunològics produeixen inflamació intestinal. Per exemple, amb els models de ratolins IL-10 KO es pot estudiar la colitis i el càncer de còlon associat a

1. Introducció

colitis. Els canvis inflamatoris comencen al còlon distal cap a les 3 setmanes d'edat i progressa pel còlon proximal sense administrar patògens externs addicionals, i cap als sis mesos d'edat el 60% desenvolupa adenocarcinomes. A més, es poden tractar addicionalment amb AOM i DSS [148] [149] [150]. Actualment, amb el desenvolupament de la tecnologia de RNA d'interferència, els ratolins KO no són l'única possibilitat experimental de bloquejar un determinat gen [94].

L'inconvenient dels models transgènics o genèticament modificats és que la majoria depenen de factors ambientals (flora entèrica) i la seva manifestació i severitat poden arribar a ser altament variables per aquest motiu o, fins i tot, necessitar varis mesos fins a assolir la colitis (per exemple, els IL-10 KO) [95]. S'ha comprovat que l'absència de bacteris en diversos models murins de càncer de còlon associat a colitis ha resultat en la desaparició de la displàsia o el càncer [152], així que la presència i el reconeixement de bacteris intestinals sembla ser necessari per a la carcinogènesi associada a inflamació [153]. És per aquests i d'altres motius (cost, temps, reproductibilitat, etc.) pel que s'utilitzen més comunament models animals com els induïbles (DSS, AOM) que, tot i que tenen limitacions, són assequibles i reproduïbles, pel que resulten molt adequats per provar noves estratègies terapèutiques [95].

1.3.6 Selecció de la soca

Considerat com un reactiu biològic, l'animal de laboratori ha de poder garantir un nivell òptim de qualitat, el qual ve determinat per les seves característiques fenotípiques. Donat que en un estabulari l'ambient és una variable relativament controlada, la genètica de l'animal juga un paper clau a l'hora de definir el seu fenotip. Dins de l'ampli ventall de soques disponibles (consanguínies o no), destaquen les següents:

1. Soca CD-1 (no consanguínia). Malgrat que presenta una elevada variabilitat genètica entre individus del mateix grup i una resposta immunitària variable davant proteïnes alienes, s'utilitza força en estudis de toxicologia, ja que es considera que precisament per la seva variabilitat genètica els resultats obtinguts en aquesta soca poden reflectir les respostes de la població general [154] [155] [156]
2. Soques BALB/c i C57BL/6 (consanguínies). Aquesta darrera és la més freqüentment utilitzada com a base per a obtenir línies genèticament modificades. Actualment és la soca consanguínia més utilitzada i va ser escollida pel *International Mouse Sequencing Consortium* per la seqüenciació del genoma murí. Cal destacar que BALB/c i C57BL/6 presenten importants diferències en la resposta immunitària: s'ha descrit que els ratolins C57BL/6 són més susceptibles a la colitis i tendeixen a cronificar fins i tot després d'un

sol cicle de DSS [20] [157] [158]. Aquesta soca ha estat, doncs, l'escollida en els nostres estudis sobre models animals, precisament per aquestes característiques, que fan que sigui més fàcil aproximar-se a les condicions en què es desenvolupa el CAC en humans [159] [160] [161].

Referències Bibliogràfiques

- [1] M. À. Gassull, F. Gomollón, and J. Hinojosa, "Enfermedad Inflamatoria Intestinal", 3rd ed. Madrid, Spain: Arán Ediciones, S.L., 2007.
- [2] G. Roda, A. Sartini, E. Zambon, et al., "Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases" *World J. Gastroenterol.*, vol. 16, no. 34, pp. 4264–4271, Sep. 2010.
- [3] S. Danese and C. Fiocchi, "Ulcerative colitis." *N. Engl. J. Med.*, vol. 365, no. 18, pp. 1713–25, Nov. 2011.
- [4] D. C. Baumgart and W. J. Sandborn, "Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies." *Lancet*, vol. 369, no. 9573, pp. 1641–57, May 2007.
- [5] A. Rizzo, F. Pallone, G. Monteleone, et al., "Intestinal inflammation and colorectal cancer: a double-edged sword?" *World J. Gastroenterol.*, vol. 17, no. 26, pp. 3092–100, Jul. 2011.
- [6] J. Ferlay, I. Soerjomataram I, R. Dikshit, et al., "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." *Int. J. Cancer*, Sep. 2014.
- [7] C. L. Sawyers, C. Abate-Shen, K. C. Anderson, et al., "AACR Cancer Progress Report 2013." *Clin. Cancer Res.*, vol. 19, no. 20 Suppl, pp. S1–S98, Oct. 2013.
- [8] S. Sociedad Española de Oncología Médica, "Cáncer de colon y recto" *Sociedad Española de Oncología Médica, SEOM*. Available: <http://www.seom.org/es/informacion-sobre-el-cancer/info-tipos-cancer/digestivo/colon-recto?start=4>
- [9] J. W. Arends, "Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma." *J. Pathol.*, vol. 190, no. 4, pp. 412–6, Mar. 2000.
- [10] E. R. F. R. Fearon and B. Vogelstein, "A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis" *Cell*, vol. 61, no. 5, pp. 759–67, Jun. 1990.
- [11] N. Gavert and A. Ben-Ze'ev, "beta-Catenin signaling in biological control and cancer." *J. Cell. Biochem.*, vol. 102, no. 4, pp. 820–8, Nov. 2007.
- [12] M. S. Cappell, "Pathophysiology, clinical presentation, and management of colon cancer." *Gastroenterol. Clin. North Am.*, vol. 37, no. 1, pp. 1–24, v, Mar. 2008.
- [13] J. Groden, A. Thliveris, W. Samowitz, et al., "Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene." *Cell*, vol. 66, no. 3, pp. 589–600, Aug. 1991.
- [14] H. Oshima, M. Oshima, M. Kobayashi, et al., "Morphological and molecular processes of polyp formation in Apc(delta716) knockout mice." *Cancer Res.*, vol. 57, no. 9, pp. 1644–9, May 1997.
- [15] M. M. Taketo and W. Edelmann, "Mouse Models of Colon Cancer" *Gastroenterology*, vol. 136, no. 3, pp. 780–798, Mar. 2009.
- [16] H. T. Lynch and T. Smyrk, "Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review." *Cancer*, vol. 78, no. 6, pp. 1149–67, Sep. 1996.

- [17] P. Peltomäki and B. O. F. Neoplasia, "Role of DNA Mismatch Repair Defects in the Pathogenesis of Human Cancer" *J. Clin Oncol*, vol. 21, no. 6, pp. 1174–1179, Mar. 2003.
- [18] A. K. Rustgi, "The genetics of hereditary colon cancer." *Genes Dev.*, vol. 21, no. 20, pp. 2525–38, Oct. 2007.
- [19] A. Tesniere, F. Schlemmer, V. Boige, et al., "Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin" *Oncogene*, vol. 29, no. 4, pp. 482–91, Nov. 2009.
- [20] K. Yoshioka, Y. Ueno, S. Tanaka, et al., "Role of natural killer T cells in the mouse colitis-associated colon cancer model." *Scand. J. Immunol.*, vol. 75, no. 1, pp. 16–26, Jan. 2012.
- [21] C. R. Boland, M. G. Luciani, C. Gasche, et al., "Infection, inflammation, and gastrointestinal cancer" *Gut*, vol. 54, no. 9, pp. 1321–31, Sep. 2005.
- [22] S. Danese and A. Mantovani, "Inflammatory bowel disease and intestinal cancer: a paradigm of the Yin-Yang interplay between inflammation and cancer." *Oncogene*, vol. 29, no. 23, pp. 3313–23, Jun. 2010.
- [23] D. T. Rubin, M. R. Cruz-Correa, C. Gasche, et al., "Colorectal cancer prevention in inflammatory bowel disease and the role of 5-aminosalicylic acid: a clinical review and update." *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 14, no. 2, pp. 265–74, Feb. 2008.
- [24] S. H. Itzkowitz and X. Yio, "Inflammation and Cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease : the role of inflammation" vol. 10029, 2004.
- [25] E. Hawk and J. L. Viner, "The adenoma prevention with celecoxib and prevention of colorectal sporadic adenomatous polyps trials: stepping stones to progress." *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 16, no. 2, pp. 185–7, Feb. 2007.
- [26] M. Oshima, N. M. Hata, S. Kargman, et al., "Chemoprevention of Intestinal Polyposis in the Apc Δ 716 Mouse by Rofecoxib, a Specific Cyclooxygenase-2 Inhibitor" *Cancer Res.*, vol. 61, pp. 1733–1740, 2001.
- [27] K. Subbaramaiah, D. Zakim, B. B. Weksler, et al., "Inhibition of cyclooxygenase: a novel approach to cancer prevention." *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, vol. 216, no. 2, pp. 201–10, Nov. 1997.
- [28] R. F. Jacoby, K. Seibert, C. E. Cole, et al., "The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the min mouse model of adenomatous polyposis." *Cancer Res.*, vol. 60, no. 18, pp. 5040–4, Sep. 2000.
- [29] R. S. Sandler, S. Halabi, J. A. Baron, et al., "A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer." *N. Engl. J. Med.*, vol. 348, no. 10, pp. 883–90, Mar. 2003.
- [30] K. Mukawa, S. Fujii, K. Tominaga, et al., "Inhibitory effects of the cyclooxygenase-2 inhibitor, etodolac, on colitis-associated tumorigenesis in p53-deficient mice treated with dextran sulfate sodium." *Oncol. Rep.*, vol. 19, no. 2, pp. 393–9, Feb. 2008.
- [31] R. Matuk, J. Crawford, M. T. Abreu, et al., "The spectrum of gastrointestinal toxicity and effect on disease activity of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in patients

1. Introducció

- with inflammatory bowel disease." *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 10, no. 4, pp. 352–6, Jul. 2004.
- [32] S. D. Solomon, J. Wittes, P. V Finn, et al., "Cardiovascular risk of celecoxib in 6 randomized placebo-controlled trials: the cross trial safety analysis." *Circulation*, vol. 117, no. 16, pp. 2104–13, Apr. 2008.
- [33] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The Hallmarks of Cancer" *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, 2000.
- [34] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–74, Mar. 2011.
- [35] O. Slaby, M. Svoboda, J. Michalek, et al., "MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application." *Mol. Cancer*, vol. 8, p. 102, Jan. 2009.
- [36] I. Thorup, "Histomorphological and immunohistochemical characterization of colonic aberrant crypt foci in rats: relationship to growth factor expression." *Carcinogenesis*, vol. 18, no. 3, pp. 465–72, Mar. 1997.
- [37] G. C. Blobe, W. P. Schiemann, and H. F. Lodish, "Role of transforming growth factor beta in human disease." *N. Engl. J. Med.*, vol. 342, no. 18, pp. 1350–8, May 2000.
- [38] D. W. Leung, G. Cachianes, W. J. Kuang, et al., "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen." *Science*, vol. 246, no. 4935, pp. 1306–9, Dec. 1989.
- [39] K. H. Plate, G. Breier, H. A. Weich, et al., "Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo." *Nature*, vol. 359, no. 6398, pp. 845–8, Oct. 1992.
- [40] G. L. Wang, B. H. Jiang, E. A. Rue, et al., "Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 12, pp. 5510–4, Jun. 1995.
- [41] J. A. Forsythe, B. H. Jiang, N. V Iyer, et al., "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1." *Mol. Cell. Biol.*, vol. 16, no. 9, pp. 4604–13, Sep. 1996.
- [42] Geetha Srikrishna and Hudson H. Freeze, "Endogenous Damage-Associated Molecular Pattern Molecules at the Crossroads of Inflammation" *Neoplasia*, vol. 11, no. 7, pp. 615–628, 2009.
- [43] A. Yiakouvakaki, M. Dimitriou, I. Karakasiliotis, et al., "Myeloid cell expression of the RNA-binding protein HuR protects mice from pathologic inflammation and colorectal carcinogenesis." *J. Clin. Invest.*, vol. 122, no. 1, pp. 48–61, Jan. 2012.
- [44] R. Medzhitov and C. A. Janeway, "Innate immunity: impact on the adaptive immune response." *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 9, no. 1, pp. 4–9, Feb. 1997.
- [45] S. R. Quinn and L. a O'Neill, "A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling." *Int. Immunol.*, vol. 23, no. 7, pp. 421–5, Jul. 2011.

- [46] R. Duchmann, I. Kaiser, E. Hermann, et al., "Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD)" *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 102, no. 3, pp. 448–55, Dec. 1995.
- [47] I. Fuss, F. Heller, and M. Boirivant, "Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis" *J. Clin. ...*, vol. 113, no. 10, 2004.
- [48] U. Gaur and B. B. Aggarwal, "Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily." *Biochem. Pharmacol.*, vol. 66, no. 8, pp. 1403–8, Oct. 2003.
- [49] J. M. Adams and S. Cory, "The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy." *Oncogene*, vol. 26, no. 9, pp. 1324–37, Feb. 2007.
- [50] M. D. Kaeser, S. Pebernard, and R. D. Iggo, "Regulation of p53 Stability and Function in HCT116 Colon Cancer Cells" vol. 279, no. 9, pp. 7598–7605, 2004.
- [51] M. Oren, "Decision making by p53: life, death and cancer." *Cell Death Differ.*, vol. 10, no. 4, pp. 431–42, Apr. 2003.
- [52] K. H. Vousden and C. Prives, "Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53." *Cell*, vol. 137, no. 3, pp. 413–31, May 2009.
- [53] I. K. H. Poon, C. D. Lucas, A. G. Rossi, et al., "Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential." *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, no. 3, pp. 166–80, Mar. 2014.
- [54] K. R. Groschwitz and S. P. Hogan, "Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis." *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 124, no. 1, pp. 3–20; quiz 21–2, Jul. 2009.
- [55] K. Matter and M. S. Balda, "Signalling to and from tight junctions." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 4, no. 3, pp. 225–36, Mar. 2003.
- [56] T. Suzuki, "Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions." *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 70, no. 4, pp. 631–59, Feb. 2013.
- [57] L. Walter, "Role of Matrix Metalloproteinases in Inflammation/Colitis-Associated Colon Cancer" *ImmunoGastroenterology*, vol. 2, no. 1, p. 22, 2013.
- [58] R. Garzon, M. Fabbri, A. Cimmino, et al., "MicroRNA expression and function in cancer." *Trends Mol. Med.*, vol. 12, no. 12, pp. 580–7, Dec. 2006.
- [59] O. Slaby, J. Bienertova-Vasku, M. Svoboda, et al., "Genetic polymorphisms and microRNAs: new direction in molecular epidemiology of solid cancer." *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 16, no. 1, pp. 8–21, Jan. 2012.
- [60] V. N. Kim and J.-W. Nam, "Genomics of microRNA." *Trends Genet.*, vol. 22, no. 3, pp. 165–73, Mar. 2006.
- [61] A. Esquela-Kerscher and F. J. Slack, "Oncomirs - microRNAs with a role in cancer." *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, no. 4, pp. 259–69, Apr. 2006.

1. Introducció

- [62] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, and V. Ambros, "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*" *Cell*, vol. 75, no. 5, pp. 843–854, Dec. 1993.
- [63] A. Esquela-Kerscher and F. J. Slack, "Oncomirs-microRNAs with a role in cancer" *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, pp. 259–269, 2006.
- [64] R. M. O'Connell, D. S. Rao, and D. Baltimore, "microRNA regulation of inflammatory responses." *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 30, pp. 295–312, Jan. 2012.
- [65] D. Baek, J. Villén, C. Shin, et al., "The impact of microRNAs on protein output." *Nature*, vol. 455, no. 7209, pp. 64–71, Sep. 2008.
- [66] L. A. O'Neill, F. J. Sheedy, C. E. McCoy, et al., "MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling." *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 3, pp. 163–75, Mar. 2011.
- [67] H. Guo, N. T. Ingolia, J. S. Weissman, et al., "Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels." *Nature*, vol. 466, no. 7308, pp. 835–40, Aug. 2010.
- [68] J. Krol, I. Loedige, and W. Filipowicz, "The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay." *Nat. Rev. Genet.*, vol. 11, no. 9, pp. 597–610, Sep. 2010.
- [69] "miRBase." Available: <http://www.mirbase.org/>
- [70] L. P. Lim, N. C. Lau, P. Garrett-Engele, et al., "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs." *Nature*, vol. 433, no. 7027, pp. 769–73, Feb. 2005.
- [71] H. Hermeking, "p53 enters the microRNA world." *Cancer Cell*, vol. 12, no. 5, pp. 414–8, Nov. 2007.
- [72] C. Cui, G. Liu, Y. Huang, et al., "MicroRNA profiling in great saphenous vein tissues of patients with chronic venous insufficiency." *Tohoku J. Exp. Med.*, vol. 228, no. 4, pp. 341–50, Jan. 2012.
- [73] Y. Akao, Y. Nakagawa, Y. Kitade, et al., "Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies." *Cancer Sci.*, vol. 98, no. 12, pp. 1914–20, Dec. 2007.
- [74] R. Garzon, G. A. Calin, and C. M. Croce, "MicroRNAs in Cancer." *Annu. Rev. Med.*, vol. 60, pp. 167–79, Jan. 2009.
- [75] X. Ma, L. E. Becker Buscaglia, J. R. Barker, et al., "MicroRNAs in NF-kappaB signaling." *J. Mol. Cell Biol.*, vol. 3, no. 3, pp. 159–66, Jun. 2011.
- [76] H. I. Suzuki, K. Yamagata, K. Sugimoto, et al., "Modulation of microRNA processing by p53." *Nature*, vol. 460, no. 7254, pp. 529–33, Jul. 2009.
- [77] M. L. Squadrito, M. Etzrodt, M. De Palma, et al., "MicroRNA-mediated control of macrophages and its implications for cancer." *Trends Immunol.*, pp. 1–10, Mar. 2013.
- [78] C. M. Croce, "Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer." *Nat. Rev. Genet.*, vol. 10, no. 10, pp. 704–14, Oct. 2009.

- [79] R. Garzon, G. Marcucci, and C. M. Croce, "Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges." *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 9, no. 10, pp. 775–89, Oct. 2010.
- [80] C. Faber, T. Kirchner, and F. Hlubek, "The impact of microRNAs on colorectal cancer." *Virchows Arch.*, vol. 454, no. 4, pp. 359–67, Apr. 2009.
- [81] M. Z. Michael, S. M. O' Connor, N. G. van Holst Pellekaan, et al., "Reduced Accumulation of Specific MicroRNAs in Colorectal Neoplasia" *Mol. Cancer Res.*, vol. 1, no. 12, pp. 882–891, Oct. 2003.
- [82] G. A. Calin and C. M. Croce, "MicroRNA signatures in human cancers" *Nat Rev Cancer*, vol. 6, no. 11, pp. 857–866, Nov. 2006.
- [83] S. Volinia, G. a Calin, C. Liu, et al., "MicroRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets" *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, vol. 103, no. 7, pp. 2257–2261, Feb. 2006.
- [84] G. A. Calin and C. M. Croce, "MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale." *Cancer Res.*, vol. 66, no. 15, pp. 7390–4, Aug. 2006.
- [85] H. Zhu, U. Dougherty, V. Robinson, et al., "EGFR signals downregulate tumor suppressors miR-143 and miR-145 in Western diet-promoted murine colon cancer: role of G1 regulators." *Mol. Cancer Res.*, vol. 9, no. 7, pp. 960–75, Jul. 2011.
- [86] B. M. Ryan, A. I. Robles, and C. C. Harris, "Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research." *Nat. Rev. Cancer*, vol. 10, no. 6, pp. 389–402, Jun. 2010.
- [87] R. P. Bird and C. K. Good, "The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer." *Toxicol. Lett.*, vol. 112–113, pp. 395–402, Mar. 2000.
- [88] S. J. Brown and L. Mayer, "The immune response in inflammatory bowel disease." *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 102, no. 9, pp. 2058–69, Sep. 2007.
- [89] M. V. Céspedes, C. Espina, M. A. García-Cabezas, et al., "Orthotopic microinjection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites." *Am. J. Pathol.*, vol. 170, no. 3, pp. 1077–85, Mar. 2007.
- [90] D. W. Rosenberg, C. Giardina, and T. Tanaka, "Mouse models for the study of colon carcinogenesis." *Carcinogenesis*, vol. 30, no. 2, pp. 183–96, Feb. 2009.
- [91] S. Rakoff-Nahoum and R. Medzhitov, "Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88." *Science*, vol. 317, no. 5834, pp. 124–7, Jul. 2007.
- [92] M. Fukata, A. Chen, A. S. Vamadevan, et al., "Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors." *Gastroenterology*, vol. 133, no. 6, pp. 1869–81, Dec. 2007.
- [93] H. S. Cooper, S. Murthy, K. Kido, et al., "Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation." *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 4, pp. 757–68, Apr. 2000.

1. Introducció

- [94] M. Kanneganti, M. Mino-Kenudson, and E. Mizoguchi, "Animal models of colitis-associated carcinogenesis." *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2011, p. 342637, Jan. 2011.
- [95] S. Wirtz and M. F. Neurath, "Mouse models of inflammatory bowel disease." *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, no. 11, pp. 1073–1083, Sep. 2007.
- [96] M. Yamamoto, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, et al., "IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis." *J. Immunol.*, vol. 164, no. 9, pp. 4878–82, May 2000.
- [97] D. A. Delker, Q. S. Wang, a Papanikolaou, et al., "Quantitative assessment of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in inbred mice." *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 65, no. 3, pp. 141–9, Feb. 1999.
- [98] A. Papanikolaou, R. C. Shank, D. A. Delker, et al., "Initial levels of azoxymethane-induced DNA methyl adducts are not predictive of tumor susceptibility in inbred mice." *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 150, no. 1, pp. 196–203, May 1998.
- [99] K. H. Kwon, A. Murakami, T. Tanaka, et al., "Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of proinflammatory gene expression." *Biochem. Pharmacol.*, vol. 69, no. 3, pp. 395–406, Feb. 2005.
- [100] P. Alex, N. C. Zachos, T. Nguyen, et al., "Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis." *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 15, no. 3, pp. 341–52, Mar. 2009.
- [101] J. L. Madara, P. Harte, J. Deasy, et al., "Evidence for an adenoma-carcinoma sequence in dimethylhydrazine-induced neoplasms of rat intestinal epithelium." *Am. J. Pathol.*, vol. 110, no. 2, pp. 230–5, Feb. 1983.
- [102] J. H. Weisburger, B. S. Reddy, and E. L. Wynder, "Colon cancer: its epidemiology and experimental production." *Cancer*, vol. 40, no. 5 Suppl, pp. 2414–20, Nov. 1977.
- [103] W. W. Chang, "Histogenesis of symmetrical 1,2-dimethylhydrazine-induced neoplasms of the colon in the mouse." *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 60, no. 6, pp. 1405–18, Jun. 1978.
- [104] P. R. Nambiar, G. Girnun, N. A. Lillo, et al., "Preliminary analysis of azoxymethane induced colon tumors in inbred mice commonly used as transgenic/knockout progenitors." *Int. J. Oncol.*, vol. 22, no. 1, pp. 145–50, Jan. 2003.
- [105] M. W. Heijstek, O. Kranenburg, I. H. M. Borel Rinkes, et al., "Mouse Models of Colorectal Cancer and Liver Metastases" *Dig. Surg.*, vol. 22, no. 1–2, pp. 16–25, Jan. 2005.
- [106] D. E. Corpet and F. Pierre, "Point: From animal models to prevention of colon cancer. Systematic review of chemoprevention in min mice and choice of the model system." *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 12, no. 5, pp. 391–400, May 2003.
- [107] H. T. Nagasawa, F. N. Shirota, and H. Matsumoto, "Decomposition of methylazoxymethanol, the aglycone of cycasin, in D 2 O." *Nature*, vol. 236, no. 5344, pp. 234–5, Mar. 1972.

- [108] A. Feinberg and M. S. Zedeck, "Production of a highly reactive alkylating agent from the organospecific carcinogen methylazoxymethanol by alcohol dehydrogenase." *Cancer Res.*, vol. 40, no. 12, pp. 4446–50, Dec. 1980.
- [109] E. S. Fiala, C. Joseph, O. S. Sohn, et al., "Mechanism of benzylselenocyanate inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats." *Cancer Res.*, vol. 51, no. 11, pp. 2826–30, Jun. 1991.
- [110] J. H. Weisburger, "Colon carcinogens: their metabolism and mode of action." *Cancer*, vol. 28, no. 1, pp. 60–70, Jul. 1971.
- [111] E. S. Fiala, "Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane." *Cancer*, vol. 40, no. 5 Suppl, pp. 2436–45, Nov. 1977.
- [112] E. S. Fiala, N. Caswell, O. S. Sohn, et al., "Non-alcohol dehydrogenase-mediated metabolism of methylazoxymethanol in the deer mouse, *Peromyscus maniculatus*." *Cancer Res.*, vol. 44, no. 7, pp. 2885–91, Jul. 1984.
- [113] E. S. Fiala, C. Kulakis, G. Christiansen, et al., "Inhibition of the metabolism of the colon carcinogen, azoxymethane, by pyrazole." *Cancer Res.*, vol. 38, no. 12, pp. 4515–21, Dec. 1978.
- [114] M. S. Zedeck, N. Frank, and M. Wiessler, "Metabolism of the colon carcinogen methylazoxymethanol acetate." *Front. Gastrointest. Res.*, vol. 4, pp. 32–7, Jan. 1979.
- [115] N. Thurnherr, E. E. Deschner, E. H. Stonehill, et al., "Induction of adenocarcinomas of the colon in mice by weekly injections of 1,2-dimethylhydrazine." *Cancer Res.*, vol. 33, no. 5, pp. 940–5, May 1973.
- [116] M. Lipkin and E. Deschner, "Early proliferative changes in intestinal cells." *Cancer Res.*, vol. 36, no. 7 PT 2, pp. 2665–8, Jul. 1976.
- [117] M. J. Wargovich, A. Medline, and W. R. Bruce, "Early histopathologic events to evolution of colon cancer in C57BL/6 and CF1 mice treated with 1,2-dimethylhydrazine." *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 71, no. 1, pp. 125–31, Jul. 1983.
- [118] R. P. Bird, "Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings." *Cancer Lett.*, vol. 37, no. 2, pp. 147–51, Oct. 1987.
- [119] E. A. McLellan, A. Medline, and R. P. Bird, "Sequential analyses of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions." *Cancer Res.*, vol. 51, no. 19, pp. 5270–4, Oct. 1991.
- [120] E. A. McLellan and R. P. Bird, "Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the murine colon." *Cancer Res.*, vol. 48, no. 21, pp. 6187–92, Nov. 1988.
- [121] L. O. Whiteley, L. Hudson, and T. P. Pretlow, "Aberrant crypt foci in the colonic mucosa of rats treated with a genotoxic and nongenotoxic colon carcinogen." *Toxicol. Pathol.*, vol. 24, no. 6, pp. 681–689, Nov. 1996.

1. Introducció

- [122] T. P. Pretlow, B. J. Barrow, W. S. Ashton, et al., "Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa." *Cancer Res.*, vol. 51, no. 5, pp. 1564–7, Mar. 1991.
- [123] L. Roncucci, D. Stamp, A. Medline, et al., "Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon." *Hum. Pathol.*, vol. 22, no. 3, pp. 287–94, Mar. 1991.
- [124] J. Jen, S. M. Powell, N. Papadopoulos, et al., "Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions." *Cancer Res.*, vol. 54, no. 21, pp. 5523–6, Nov. 1994.
- [125] K. W. Kinzler and B. Vogelstein, "Lessons from hereditary colorectal cancer." *Cell*, vol. 87, no. 2, pp. 159–70, Oct. 1996.
- [126] A. Pietro Femia, B. Bendinelli, A. Giannini, et al., "Mucin-depleted foci have beta-catenin gene mutations, altered expression of its protein, and are dose- and time-dependent in the colon of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats." *Int. J. Cancer*, vol. 116, no. 1, pp. 9–15, Aug. 2005.
- [127] J. E. Paulsen, H. Knutsen, H. B. Ølstørn, et al., "Identification of flat dysplastic aberrant crypt foci in the colon of azoxymethane-treated A/J mice." *Int. J. Cancer*, vol. 118, no. 3, pp. 540–6, Feb. 2006.
- [128] H. K. Cooper, J. Buecheler, and P. Kleihues, "DNA alkylation in mice with genetically different susceptibility to 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis." *Cancer Res.*, vol. 38, no. 9, pp. 3063–5, Sep. 1978.
- [129] A. Bissahoyo, R. S. Pearsall, K. Hanlon, et al., "Azoxymethane is a genetic background-dependent colorectal tumor initiator and promoter in mice: effects of dose, route, and diet." *Toxicol. Sci.*, vol. 88, no. 2, pp. 340–5, Dec. 2005.
- [130] H. S. Cooper, S. N. Murthy, R. S. Shah, et al., "Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis." *Lab. Invest.*, vol. 69, no. 2, pp. 238–49, Aug. 1993.
- [131] M. Mähler, I. J. Bristol, E. H. Leiter, et al., "Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis." *Am. J. Physiol.*, vol. 274, no. 3 Pt 1, pp. G544–51, Mar. 1998.
- [132] B. Egger, M. Bajaj-Elliott, T. T. MacDonald, et al., "Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency." *Digestion*, vol. 62, no. 4, pp. 240–8, Jan. 2000.
- [133] S. Kitajima, S. Takuma, and M. Morimoto, "Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights." *Exp. Anim.*, vol. 49, no. 1, pp. 9–15, Jan. 2000.
- [134] T. Vowinkel, T. J. Kalogeris, M. Mori, et al., "Impact of dextran sulfate sodium load on the severity of inflammation in experimental colitis." *Dig. Dis. Sci.*, vol. 49, no. 4, pp. 556–64, Apr. 2004.
- [135] S. Melgar, L. Karlsson, E. Rehnström, et al., "Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease." *Int. Immunopharmacol.*, vol. 8, no. 6, pp. 836–44, Jun. 2008.

- [136] P. V Sivakumar, G. M. Westrich, S. Kanaly, et al., "Interleukin 18 is a primary mediator of the inflammation associated with dextran sulphate sodium induced colitis: blocking interleukin 18 attenuates intestinal damage." *Gut*, vol. 50, no. 6, pp. 812–20, Jun. 2002.
- [137] Y. Yan, V. Kolachala, G. Dalmasso, et al., "Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis." *PLoS One*, vol. 4, no. 6, p. e6073, Jan. 2009.
- [138] I. Okayasu, M. Yamada, T. Mikami, et al., "Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulfate sodium-induced colitis model." *J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 17, no. 10, pp. 1078–83, Oct. 2002.
- [139] K. Yoshihara, T. Yajima, C. Kubo, et al., "Role of interleukin 15 in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice." *Gut*, vol. 55, no. 3, pp. 334–41, Mar. 2006.
- [140] I. Okayasu, S. Hatakeyama, M. Yamada, et al., "A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice." *Gastroenterology*, vol. 98, no. 3, pp. 694–702, Mar. 1990.
- [141] L. G. Axelsson, E. Landström, T. J. Goldschmidt, et al., "Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4(+) -cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice." *Inflamm. Res.*, vol. 45, no. 4, pp. 181–91, Apr. 1996.
- [142] H. Takedatsu, K. S. Michelsen, B. Wei, et al., "TL1A (TNFSF15) regulates the development of chronic colitis by modulating both T-helper 1 and T-helper 17 activation." *Gastroenterology*, vol. 135, no. 2, pp. 552–67, Aug. 2008.
- [143] Y. S. Hyun, D. S. Han, A. R. Lee, et al., "Role of IL-17A in the development of colitis-associated cancer." *Carcinogenesis*, vol. 33, no. 4, pp. 931–6, Apr. 2012.
- [144] T. Tanaka, H. Kohno, R. Suzuki, et al., "A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate." *Cancer Sci.*, vol. 94, no. 11, pp. 965–73, Nov. 2003.
- [145] R. Suzuki, H. Kohno, S. Sugie, et al., "Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice." *Carcinogenesis*, vol. 27, no. 1, pp. 162–9, Jan. 2006.
- [146] M. Takahashi, S. Nakatsugi, T. Sugimura, et al., "Frequent mutations of the beta-catenin gene in mouse colon tumors induced by azoxymethane." *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 6, pp. 1117–20, Jun. 2000.
- [147] R. Suzuki, S. Miyamoto, Y. Yasui, et al., "Global gene expression analysis of the mouse colonic mucosa treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate." *BMC Cancer*, vol. 7, p. 84, Jan. 2007.
- [148] D. J. Berg, N. Davidson, R. Kühn, et al., "Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses." *J. Clin. Invest.*, vol. 98, no. 4, pp. 1010–20, Aug. 1996.

1. Introducció

- [149] M. Gerling, R. Glauben, J. K. Habermann, et al., "Characterization of chromosomal instability in murine colitis-associated colorectal cancer." *PLoS One*, vol. 6, no. 7, p. e22114, Jan. 2011.
- [150] J. M. Uronis, M. Mühlbauer, H. H. Herfarth, et al., "Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility." *PLoS One*, vol. 4, no. 6, p. e6026, Jan. 2009.
- [151] A. R. Moser, C. Luongo, K. A. Gould, et al., "ApcMin: a mouse model for intestinal and mammary tumorigenesis." *Eur. J. Cancer*, vol. 31A, no. 7–8, pp. 1061–4, 1995.
- [152] M. Fukata and M. T. Abreu, "Role of Toll-like receptors in gastrointestinal malignancies." *Oncogene*, vol. 27, no. 2, pp. 234–43, Jan. 2008.
- [153] B. Huang, J. Zhao, H. Li, et al., "Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance." *Cancer Res.*, vol. 65, no. 12, pp. 5009–14, Jun. 2005.
- [154] T. Tanaka, R. Suzuki, H. Kohno, et al., "Colonic adenocarcinomas rapidly induced by the combined treatment with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and dextran sodium sulfate in male ICR mice possess beta-catenin gene mutations and increases immunoreactivity for beta-catenin, cycloo" *Carcinogenesis*, vol. 26, no. 1, pp. 229–38, Jan. 2005.
- [155] H. Kohno, R. Suzuki, S. Sugie, et al., "Suppression of colitis-related mouse colon carcinogenesis by a COX-2 inhibitor and PPAR ligands." *BMC Cancer*, vol. 5, p. 46, Jan. 2005.
- [156] "Charles River Laboratories | Every Step of the Way." Available: <http://www.criver.com/>
- [157] S. Melgar, A. Karlsson, and E. Michaëlsson, "Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation." *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 288, no. 6, pp. G1328–38, Jun. 2005.
- [158] S. Melgar, M. Drmotova, E. Rehnström, et al., "Local production of chemokines and prostaglandin E2 in the acute, chronic and recovery phase of murine experimental colitis." *Cytokine*, vol. 35, no. 5–6, pp. 275–83, Sep. 2006.
- [159] "JAX Mice Database - 000651 BALB/cJ." Available: <http://jaxmice.jax.org/strain/000651.html>
- [160] "JAX Mice Database - 000664 C57BL/6J." Available: <http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>
- [161] "Harlan Laboratories - Animal Research Laboratory - Contract Research Services." Available: <http://www.harlan.com/>

2 Hipòtesis i Objectius

2. Hipòtesis i Objectius

Hipòtesis i Objectius

L'associació entre la inflamació crònica de l'intestí i el risc de desenvolupar càncer colorectal ha estat establerta en estudis epidemiològics. Els mecanismes implicats en aquesta associació són múltiples i molts d'ells són encara desconeguts. La inflamació intestinal crònica pot ser, en part, el reflex de deficiències innates o adquirides en la funció barrera i en la reparació epitelial. Els receptors TLR poden modificar la integritat de la barrera intestinal i tenen una important funció a l'hora de dimensionar qualitativament i quantitativament la resposta immune adaptativa i de posar en marxa mecanismes reparadors. A més la senyalització dels TLRs pot alterar la regulació de fenòmens de proliferació i apoptosi, que poden afectar al desenvolupament i progressió del càncer i esbiaixar les poblacions leucocitàries responsables de la resposta antitumoral. L'estudi d'aquestes complexes interaccions és difícil partint de mostres clíniques, donat que en l'actualitat els pacients d'IBD reben tractaments pal·liatius de diversos tipus, capaços d'interferir en els processos d'interès.

Per a obtenir dades que permetin aprofundir en la relació inflamació-càncer és imprescindible la utilització de models animals en els quals es pugui provocar una inflamació intestinal crònica i monitoritzar la seva deriva tumorigènica sense la interferència d'agents terapèutics. Aquest treball s'adreça a investigar la correlació inflamació-càncer en el context intestinal, partint de models animals i de mostres de teixit humà, amb els següents objectius:

1: *Estudiar com afecta la persistència d'inflamació al desenvolupament tumoral en ratolins, tractats o no amb un agent mutagen (AOM) pel que fa a curs clínic, alteracions histològiques i a nivell de perfils d'expressió gènica.*

La resposta inflamatòria pot conduir a modificacions importants en l'expressió de microRNAs. L'expressió d'alguns d'ells està alterada en diversos tipus de càncers i podrien afavorir la tumorigènesi.

2: *Estudiar els canvis d'expressió de microRNAs en teixit tumoral i no tumoral amb i sense inflamació obtingut de models murins AOM/DSSS, i analitzar "in silico" com poden afectar aquests canvis d'expressió a processos relacionats amb la tumorigènesi.*

2. Hipòtesis i Objectius

L'estudi de l'expressió gènica en biòpsies de còlon humana, inflamada i amb adenomes pot aportar informació rellevant sobre els processos que connecten inflamació i càncer.

3: *Valorar els canvis d'expressió gènica en mostres de teixit sa, tumoral (adenomes) i procedent de pacients de colitis ulcerosa utilitzant micromatrius, i analitzar "in silico" l'impacte que aquests canvis pot representar en els processos relacionats amb el CAC.*

La alteració de la funció barrera és un dels trets més importants amb que cursa la IBD. Entre les causes que determinen la persistència de la inflamació intestinal destaquen les respostes alterades a lligands de TLR, en particular a les cèl·lules de la línia monocítica-macrofàgica. L'alteració de la seva resposta a lligands de TLRs pot donar lloc a perfils secretors anòmals, amb efectes deleters sobre la funció barrera.

4: *Valorar in vitro l'impacte d'un entorn inflamatori generat per estimulació de monòcits de pacients de UC amb lligands de TLRs sobre la funció epitelial barrera.*

Finalment, és probable que hi hagi diferències en les poblacions leucocitàries dels pacients amb UC en funció del grau de la malaltia, la presència d'un brot o el tipus de tractament. En models murins aquestes poblacions leucocitàries també han estat descrites, i en ells és factible analitzar l'evolució de les poblacions de cara a contrastar el seu valor com a biomarcadors en absència de modificacions induïdes per la farmacoteràpia.

5: *Estudiar com es modifiquen les poblacions leucocitàries en models murins AOM/DSS, i comparar els resultats amb els de diferents grups de pacients. Analitzar si alguna de les poblacions estudiades pot tenir valor com a biomarcador de progressió inflamació-càncer.*

Per abordar aquests objectius, hem realitzat diversos estudis distribuïts en els següents apartats:

- **Objectiu 1:** als apartats 3.2.1, 3.2.2, i 3.2.3.
- **Objectiu 2:** al apartat 3.2.4.
- **Objectiu 3:** al apartat 4.2.3.
- **Objectiu 4:** al apartat 4.2.2.
- **Objectiu 5:** als apartats 3.2.5 i 4.2.1.