

I. INTRODUCCIÓ

1. L'ADENOCARCINOMA COLORECTAL

1.1. Definició

L'adenocarcinoma colorectal és un tumor maligne que deriva de l'epiteli de revestiment del còlon o del recte. Tanmateix, cal que aquest tumor penetri a través de la *muscularis mucosae* fins a la submucosa per a poder ésser considerat com a tal: les lesions confinades a la mucosa –amb o sense invasió de la làmina pròpia–, reben la denominació de neoplàsies intraepitelials (p.e. “neoplàsia intraepitelial d'alt grau” en comptes “d'adenocarcinoma *in situ*”). La presència en el tumor de cèl·lules de Paneth disperses, de cèl·lules neuroendocrines o de petits focus cel·lulars amb diferenciació escamosa són compatibles amb el diagnòstic d'adenocarcinoma.

Pràcticament el 98% de tots els càncers que es desenvolupen en el còlon són de tipus adenocarcinoma. La resta de tumors malignes d'aquest òrgan, bé sia epitelials –carcinoides, tumors neuroendocrins o d'altres–, o no epitelials –sarcomes, lipomes, melanomes, limfomes, etc...– tenen una representació molt minoritària. A la Taula 1 podeu trobar una relació de tots els tumors epitelials que poden donar-se en aquesta localització. Val a dir que d'ací endavant utilitzarem el genèric càncer de còlon com a sinònim del tumor que és, específicament, subjecte del nostre estudi: l'adenocarcinoma colorectal.

1.2. Epidemiologia

1.2.1. Distribució geogràfica

El càncer colorectal presenta variacions importants quant a la seva distribució geogràfica a nivell mundial: és molt freqüent als Estats Units, Canadà, el Regne Unit, Nova Zelanda, Austràlia, Dinamarca i Suècia, i té una incidència relativa al Japó, l'Índia, els països de l'Àfrica del Sud, Israel, Finlàndia, Polònia i Puerto Rico (Dayal i DeLellis, 1990). Sembla haver-hi un paral·lelisme entre l'estat socioeconòmic dels països i la incidència d'aquesta patologia, en el sentit que podria dir-se que el càncer colorectal és una “malaltia del progrés” (Wynder, 1975; Parkin *et al*, 1993).

Taula 1. El carcinoma colorectal en el context d'altres tumors epitelials, segons la classificació histològica de la OMS (Jass i Sobin, 1989).

<i>Tumors epitelials</i>	<i>Codi morfològic*</i>
<u>Adenoma</u> **	8140/0
tubular	8211/0
vellós	8261/0
tubulovellós	8263/0
serrat	8213/0
<u>Neoplàsia intraepitelial (displàsia)***</u>	
neoplàsia intraepitelial glandular de baix grau	
neoplàsia intraepitelial glandular d'alt grau	
<u>Carcinoma</u>	
adenocarcinoma	8140/3
adenocarcinoma mucoide extracel·lular	8480/3
adenocarcinoma mucoide intracel·lular	8490/3
carcinoma de cèl·lula petita	8041/3
carcinoma escamós	8070/3
carcinoma adenoescamós	8560/3
carcinoma medul·lar	8510/3
carcinoma indiferenciat	8020/3
<u>Carcinoide</u>	8240/3
<u>Tumors mixtes carcinoide-adenocarcinoma</u>	8244/3
<u>Altres</u>	

* La codificació morfològica dels tumors colorectals està basada en la nomenclatura SNOMED (Systematized Nomenclature of Medicine) i en la ICD-O (International Classification of Diseases for Oncology) (Fritz *et al*, 2000).

** Els adenomes, tot i ésser precursors del carcinoma colorectal, es consideren lesions neoplàstiques benignes.

*** La ICD-O només disposa de codis per a la neoplàsia intraepitelial de grau III (8148/2) i per a l'adenocarcinoma *in situ* (8140/2).

En negreta hi ha ressaltades les variants que es descriuen a l'*Apartat 1.5.1* d'aquest mateix capítol.

L'excepció a aquesta observació la constitueix el Japó, amb una baixa incidència, malgrat pertànyer al grup dels països més desenvolupats (Stewart, 1971). En aquest sentit, alguns estudis realitzats en poblacions d'emigrants confirmen que les poblacions provinents de països amb baixa incidència adopten la tendència del país al qual emigren (Haenszel i Kurihara, 1968; Garfinkel i Mushinski, 1999).

1.2.2. Impacte en la població

- *Incidència*

El càncer colorectal és –a nivell de la població mundial, en general– el quart en freqüència entre els homes i el segon entre les dones, tal i com es desprèn de les dades que mostrem a la Taula 2. S'estima que l'any 1996, el nombre de casos apareguts arreu del món fou de 875.000, el que representa el 8,5% dels nous càncers (Potter, 1999).

Malgrat la tendència al descens que la incidència i la mortalitat per càncer colorectal varen experimentar als Estats Units d'Amèrica a partir de mitjans de la dècada dels 80 (Garfinkel i Mushinski, 1999), al nostre país l'evolució ha estat diferent. La incidència del càncer a Catalunya mostrà una tendència creixent en el període transcorregut des del 1980, tant en homes com en dones. Concretament, en analitzar la tendència del càncer colorectal en els homes, pot apreciar-se un ascens notable de llur incidència, en paral·lel a l'experimentat pels càncers de pulmó i de bufeta urinària, mentre que en les dones s'ha produït una certa estabilització (Generalitat de Catalunya, 2001). Així doncs, la millora de la supervivència observada en els darrers anys s'explica perquè, malgrat l'augment de la incidència, la mortalitat s'ha estabilitzat.

- *Mortalitat*

El càncer és la causa de mort més freqüent en els homes en els darrers anys, davant de les malalties cardiovasculars. Concretament, el càncer colorectal és el quart responsable de la mortalitat per càncer arreu del món, degut que té millor pronòstic que d'altres neoplàsies més freqüents. L'anàlisi comparativa de la supervivència a 5 anys dels pacients dels Estats Units d'Amèrica i d'Europa, demostren la superioritat de la primera, amb taxes del 61% (Parkin *et al*, 1993; Ries *et al*, 1998) i del 41% (Parkin *et al*, 1999), respectivament.

A Catalunya, l'augment de les taxes de mortalitat per càncer ajustades segons l'edat va assolir un valor màxim els anys 1991-1992, mostrant més tard una estabilització i un cert descens encara posterior. Comparant la mortalitat catalana amb l'observada a la resta de països de la Unió Europea –període 1990-1994–, tenim que la dels homes ha

Taula 2. Impacte del càncer a Catalunya (Servei de Prevenció i Control del Càncer. ICO, 1999).

Homes					
<i>Càncer</i>	<i>Incidència*</i>	<i>Mortalitat*</i>	<i>Supervivència**</i>	<i>Incidència***</i>	<i>Prevalença***</i>
Estómac	15,9	11,4	30	290	5.305
Còlon	20,7	7,7	46	1.199	9.008
Recte	13,1	4,3	49	721	5.446
Fetge	8,5	6,5	15	437	214
Pàncrees	5,5	5,3	5	299	383
Laringe	12,1	3,7	59	676	7.681
Pulmó	46,3	37,7	11	2.561	4.219
Melanoma	5,1	0,5	65	181	1.935
Pròstata	29,4	7,5	55	1.437	5.969
Bufeta urinària	29,0	4,7	74	2.167	24.970
L. Hodgkin	3,0	0,7	79	76	2.358
L. no hodgkinià	5,8	2,6	36	459	6.419
Mieloma	2,5	1,6	23	121	197
Leucèmies	8,0	2,7	36	320	2.870
Total	275,6	172,8	42	13.801	90.953

Dones					
<i>Càncer</i>	<i>Incidència*</i>	<i>Mortalitat*</i>	<i>Supervivència**</i>	<i>Incidència***</i>	<i>Prevalença***</i>
Estómac	6,0	2,9	28	535	2.876
Còlon	18,5	7,6	50	1.314	15.206
Recte	5,9	2,5	48	444	3.755
Fetge	3,3	2,3	8	176	5
Pàncrees	4,4	3,8	5	255	318
Laringe	0,5	0,2	72	11	80
Pulmó	3,9	3,1	21	293	1.343
Melanoma	4,5	0,3	89	182	3.348
Bufeta urinària	4,0	1,0	63	227	1.871
L. Hodgkin	2,1	0,2	78	47	1.459
L. no hodgkinià	4,2	1,7	47	405	5.777
Mieloma	1,6	0,6	30	104	362
Leucèmies	5,0	2,6	48	285	2.923
Mama	61,6	6,4	76	3.001	44.582
Coll uterí	10,3	1,9	68	406	7.185
Cos uterí	13,2	1,9	73	660	9.848
Ovari	8,2	2,4	36	407	3.928
Total	193,6	91,2	56	10.304	124.376

* Taxes per 100.000 persones i any ajustades a la població estàndard mundial al període 1995-1996.

** Supervivència relativa als 5 anys (%).

*** Estimació del nombre de casos nous i casos prevalents per any a Catalunya en el període 1995-1996.

augmentat de manera similar a la dels països del sud d'Europa. Tanmateix, en relació a Espanya, el creixement de Catalunya ha estat inferior (1,5% per 3,5% d'Espanya), la qual cosa pot indicar fases distintes d'evolució de la mortalitat per càncer. En les dones, però, hi ha una tendència descendent de la mortalitat que la situa entre les més baixes d'Europa, més marcada a Catalunya que al conjunt d'Espanya.

Amb tot, a Catalunya la taxa de mortalitat per càncer colorectal ocupa la segona posició, precedida únicament per la del tipus broncopulmonar (Generalitat de Catalunya, 2001).

- *Prevalença*

D'acord amb les estimacions realitzades per als anys 1995-1996, a Catalunya hi ha unes 215.000 persones (3,6% de la població) que viuen amb el diagnòstic de càncer. D'aquestes, unes 34.000 (15,8% del total d'afectats) estan diagnosticades de càncer colorectal, més de la meitat de les quals són dones; els homes estarien més representats en el grup de càncer de recte i les dones en el de còlon (Generalitat de Catalunya, 2001).

1.2.3. Localització

Existeixen, sens dubte, diferències significatives quant a la localització dels tumors dins del còlon. En els països de major incidència d'aquesta neoplàsia, hi ha un predomini important de l'afectació del còlon esquerre (considerat a partir de l'angle esplènic), mentre que en els de menor incidència és més comuna la localització a còlon dret (Morson i Dawson, 1979).

També s'han trobat diferències quant a l'afectació còlica i rectal. A tall d'exemple, mentre el càncer de recte és igualment freqüent en països com els Estats Units i el Japó, la localització còlica és molt menor en aquest darrer. Malgrat tot sembla que, avui per avui, hi ha una lleugera tendència cap a la disminució de les neoplàsies que es localitzen a recte-còlon sigmoide per afavorir l'aparició del càncer de còlon dret (Levi *et al*, 1993; Huang *et al*, 1999). Això, junt amb el fet que la supervivència a 5 anys dels pacients amb tumors de localització esquerra hagi millorat significativament en els darrers anys, és conseqüència probable de l'ús cada cop més generalitzat de sigmoidoscòpis flexibles

i de l'actitud més agressiva envers la resecció de pòlips adenomatosos (Cady *et al*, 1974; Kawazuma *et al*, 1999).

1.2.4. Edat, sexe i raça

El càncer de còlon esporàdic és, principalment, una malaltia d'edats avançades. En els països amb una elevada incidència, la mitjana d'edat en el moment del diagnòstic se situa en els 60 anys (Morson i Dawson, 1979). En els països de menor incidència i, especialment, en les poblacions de baix nivell socioeconòmic la mitjana d'edat és menor, situant-se al voltant dels 50 anys (Morson, 1967). Amb tot, és rara la incidència de càncer colorectal en individus de menys de 40 anys, exceptuant aquells amb predisposició genètica, o amb història de malaltia inflamatòria crònica intestinal (Hamilton *et al*, 2000).

Quant al sexe, la incidència de la malaltia és superior entre els homes, essent les taxes ajustades per edat i raça de 1,32 i 1,68 per als càncers proximal i distal, respectivament. La mortalitat, no obstant, és similar entre homes i dones, amb taxes relatives de 1,05:1,00 (Skibber *et al*, 2001).

Poques dades hi ha sobre la distribució del càncer de còlon entre les diferents races humanes. Amb tot, estudis realitzats en la població dels Estats Units demostren un major predomini d'aquesta patologia entre els individus de raça negra (afroamericans), malgrat a l'Àfrica el càncer de còlon és molt infreqüent (Nelson *et al*, 1997; Troisi *et al*, 1999). També s'atribueix a aquest ètnia una taxa superior de mortalitat per càncer colorectal, si bé hi ha dades que suggereixen que la diferència no es deu a una major agressivitat biològica dels tumors, sinó a un pitjor accés a l'assistència sanitària del col·lectiu de raça negra (Akerley *et al*, 1993).

1.3. Etiologia

L'etiologia del càncer de còlon ha esdevingut, en els darrers anys, més i més complexa. Al clàssic component ambiental cal afegir, com a factors de risc, els cada cop més coneguts factors genètics de susceptibilitat. Aquests darrers són, com detallarem més

endavant, una acumulació seqüencial de canvis a nivell del genoma –mutacions en no menys de cinc gens–, que constitueixen un requeriment indispensable per a la formació de tumors malignes (Wilmink, 1997). Els factors genètics de susceptibilitat o, més concretament, els gens involucrats en l'etiologia del càncer colorectal, seran tractats en major profunditat en l'*Apartat 2* d'aquest capítol.

1.3.1. Hàbits alimentaris

Entre els factors de risc ambientals implicats en la neoplàsia colorectal, el més important és la dieta. Generalment, es considera que la pauta dietètica associada a la carcinogènesi està caracteritzada per: 1) el baix contingut en fibra vegetal no absorbible; 2) l'alt contingut en hidrats de carboni refinats; i 3) l'alt contingut en greixos (Dayal i DeLellis, 1990). Aquests hàbits alimentaris són típics dels països més desenvolupats des del punt de vista socioeconòmic; corresponen a dietes on, freqüentment, hi ha un elevat consum de carns roges –proteïnes animals i greix, en definitiva–, a expenses d'una disminució del consum de fruita i verdura fresques. Nombrosos autors han intentat esbrinar els mecanismes que portarien les proteïnes i el greix a promoure la carcinogènesi. En aquesta línia, n'hi ha que suggereixen que el greix animal originaria un augment de la proporció d'anaerobis en la microflora intestinal, causant la transformació dels àcids biliars normals en carcinògens. Malgrat l'absència de consens quant als mecanismes de carcinogènesi en el còlon, semblava haver-hi unanimitat a l'hora de considerar la fibra cereal com un agent preventiu d'aquesta patologia (Hill, 1997). Recentment però, un estudi prospectiu realitzat amb 88.757 dones, portat a terme per Fuchs i col·laboradors, ha permès posar en dubte aquesta hipòtesi, ja que en el mateix no s'ha trobat associació clínica entre la ingesta de fibra i el risc de desenvolupar adenocarcinoma colorectal (Fuchs *et al*, 1999).

1.3.2. Tabaquisme i consum de begudes alcohòliques

Malgrat hi ha una creença generalitzada –i, probablement, més que fonamentada– que atribueix a l'abús del consum de substàncies com el tabac i l'alcohol un paper perjudicial per a la salut, no existeix cap evidència científica que permeti incloure aquests dos hàbits a la llista de factors de risc associats a la neoplàsia colorectal. Mentre

alguns treballs conclouen que el tabaquisme augmenta el risc de contraure aquest tipus de càncer, especialment després de llargs períodes d'inducció (Knekt *et al*, 1998), altres assenyalen el consum de tabac com un factor de baix risc (D'Avanzo *et al*, 1995). Per altra banda, cap dels estudis publicats fins l'any 1992 suggerint el consum de begudes alcohòliques com un factor de risc més, ha permès associar aquest hàbit a la patologia tumoral còlica (Wilmink, 1997). Sí s'ha establert, però, una relació positiva directa entre el consum d'alcohol i la probabilitat de desenvolupar càncer de recte (McMichael i Giles, 1994).

1.3.3. Carcinògens químics

Certs tipus de substàncies químiques, els carcinògens, són conegudes per la seva capacitat d'induir neoplàsies en animals d'experimentació. Entre les més estudiades dins de la patologia tumoral colorectal hi ha les amines aromàtiques, els derivats de la hidrazina, les alquilnitrosamides i les aflatoxines (LaMont i O'Gorman, 1978; Filipe, 1975). En concret, el procarcinogen 1,2-dimetilhidrazina (DMH) ha estat especialment utilitzat per a l'obtenció de models tumorigènics de còlon: altament potent, pot generar tumors en la majoria dels animals tractats entre els 4 i els 6 mesos posteriors a l'exposició (Shetye *et al*, 1994), i s'ha demostrat la seva capacitat d'induir mutacions primerenques a l'oncogen c-K-ras (Jacoby *et al*, 1991).

1.3.4. Altres factors de risc

Entre d'altres factors etiològics suggerits, encara que molt menys estudiat, es troba l'activitat física. En aquest sentit, un treball ha posat de manifest una relació inversa entre l'increment d'aquesta i la disminució del risc de desenvolupar tumors (Colditz *et al*, 1997).

Finalment, alguns autors han demostrat un increment de la freqüència de presentació del càncer de còlon en pacients postcirurgia per motius aliens: en dones amb història de colecistectomia, però no en homes en idèntica situació (Linos *et al*, 1982), i en homes en el lloc on es practicà una ureterosigmoidostomia (Sheldon *et al*, 1983).

1.4. Patogènesi

La transformació neoplàstica que experimenta l'epiteli del còlon per a assolir, en darrer terme, el carcinoma colorectal, és un fenomen progressiu. Constituïda per un seguit de fases, la inicial es caracteritza per la proliferació de la mucosa, seguit d'una sèrie de trastorns creixents en la diferenciació que donen lloc a entitats intermèdies anomenades adenomes. Tal i com s'ha esmentat anteriorment, els adenomes són veritables precursors del càncer de còlon, en el sentit que sobre ells es desenvolupa finalment un carcinoma invasor (O'Brien *et al*, 1992). El carcinoma, originat com a displàsia intraepitelial, progressa fins a infiltrar les capes de la paret intestinal i assolir les vies de disseminació limfàtiques i venoses. En aquest punt, se succeeixen una sèrie de canvis en el microentorn tumoral, fruit de la interacció de les cèl·lules neoplàstiques amb l'hoste: la reacció estromal i els fenòmens d'angiogènesi induïts pel tumor determinaran, finalment, la capacitat invasiva i metastatitzant tumoral (Campo, 1996).

En la seva evolució natural, l'adenocarcinoma tendeix a la disseminació, que s'inicia amb la infiltració en profunditat del tumor de les diferents capes de la paret. Les cèl·lules neoplàstiques avancen seguint els plans que ofereixen menor resistència a la penetració, i solen envair la capa muscular a través dels orificis d'entrada dels vasos. Amb la invasió de la submucosa, les cèl·lules neoplàstiques arriben als vasos limfàtics del plexe intramural seguint, a continuació, el drenatge limfàtic. En primer lloc s'afecten els ganglis regionals, però posteriorment poden afectar-se d'altres cadenes (Morson i Dawson, 1979). El trencament de la serosa peritoneal possibilita la disseminació transcelòmica intraabdominal, amb implantació de cèl·lules neoplàstiques al peritoneu. La disseminació hematògena determina metastasis principalment a fetge i pulmons i, en menor freqüència, a os i cervell. Altres localitzacions excepcionals són: melsa, ronyons, pàncrees, mama, adrenals, pell i tiroide.

El diagnòstic de la neoplàsia colorectal ha de basar-se en una rigorosa descripció patològica del tumor. Això obeeix, fonamentalment, a dos motius: l'un, que les característiques de la neoplàsia en el moment del diagnòstic permeten avaluar el pronòstic a la malaltia; i, l'altre, que en la gran majoria de casos aquest pronòstic

condiciona, de forma decisiva, el tractament que rebrà el pacient. D'aquí sorgeix la necessitat d'establir criteris per a descriure acuradament cada tumor en el moment del diagnòstic. I és així que, en l'actualitat, s'utilitzen dues classificacions de forma simultània i independent: una en base al grau de diferenciació tumoral, i l'altra, atenent a l'abast de la invasió.

1.4.1. Grau histològic

En general, per tal d'establir el grau histològic d'un tumor (Broders, 1940) s'avaluen, a l'examen microscòpic, l'arquitectura tumoral més o menys definida, el grau d'anaplàsia nuclear i l'índex mitòtic. Ara bé, l'adenocarcinoma colorectal es grada pràcticament en base al percentatge de diferenciació glandular dintre del tumor. Les lesions poden classificar-se en les següents categories:

- *Tumors de grau 1*

Són tumors ben diferenciats, formats per estructures glandulars ben definides de calibre i recorregut variable, i entapissades per cèl·lules epitelials neoplàsiques. El component glandular ha de ser >95% del tumor (Figura 1A).

- *Tumors de grau 2*

Són tumors mitjanament diferenciats, en els quals el component glandular representa entre el 50-95% de la lesió (Figura 1B).

- *Tumors de grau 3*

Aquests carcinomes són pobrement diferenciats, amb un component glandular que oscil·la entre el 5-50% (Figura 1C).

- *Tumors de grau 4*

Altament dits indiferenciats, presenten estructures glandulars en un percentatge inferior al 5%. Per la seva escassa incidència i l'elevada variabilitat histològica es consideren una variant de l'adenocarcinoma (vegeu l'*Apartat 1.5.1* d'aquest mateix capítol).

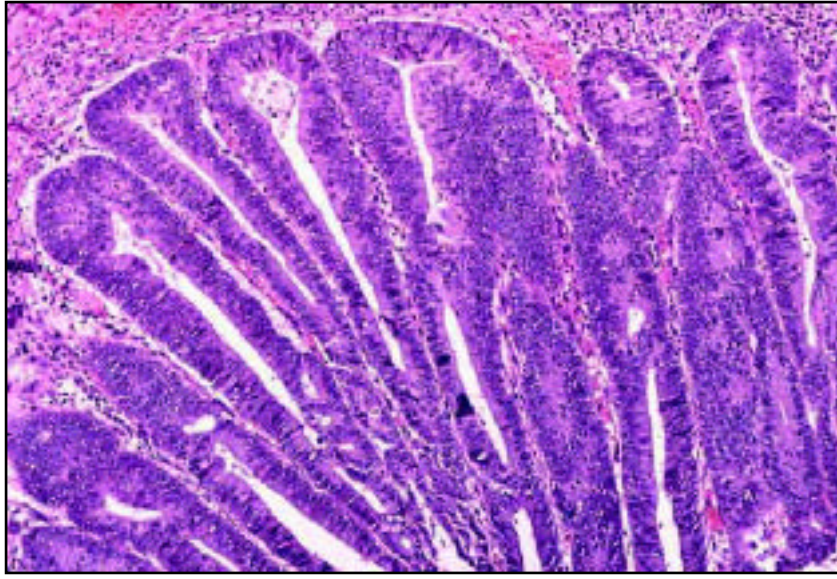
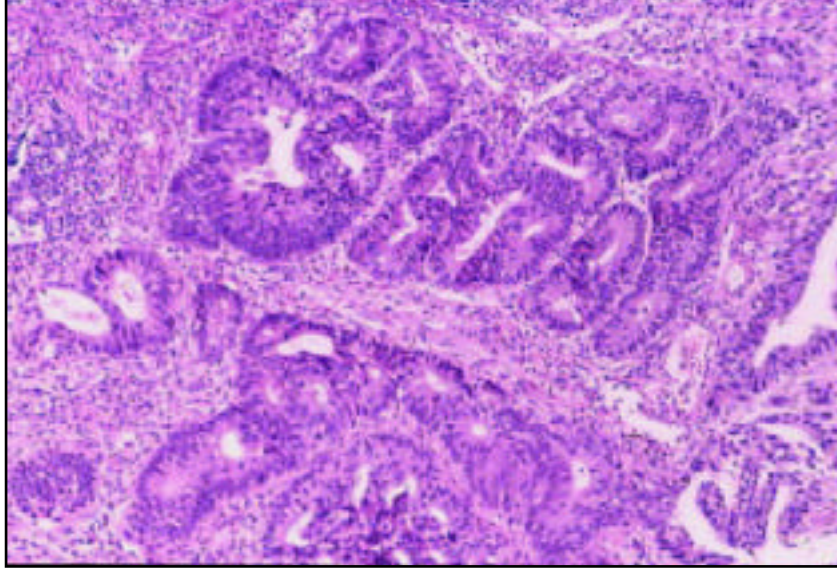
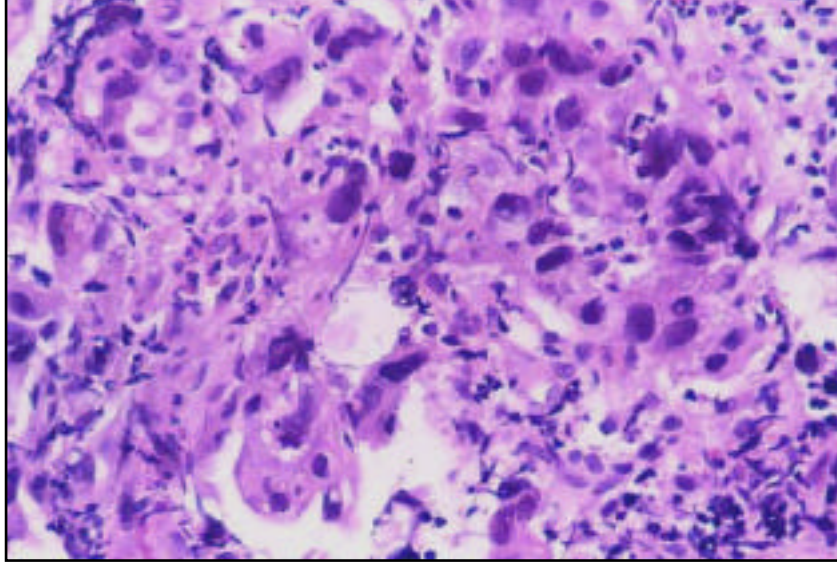
A**B****C**

Figura 1. Fotografies representatives del grau histològic dels tumors colorectals.

A) Adenocarcinoma ben diferenciat o de grau 1, amb patró glandular ben definit i criteris d'anaplàsia poc acusats (100×); B) Adenocarcinoma moderadament diferenciat o de grau 2 (100×); i C) Adenocarcinoma mal diferenciat o de grau 3, en el que pot apreciar-se una pèrdua del patró glandular i un alt grau d'anaplàsia nuclear (400×).

1.4.2. Nivell d'infiltració i estadiatge

L'any 1928 foren publicats els primers indicis de relació entre la supervivència i els diferents nivells d'invasió de la paret del còlon (Lockhart-Mummery i Dukes, 1928). La transcendència d'aquest fet ha tingut repercussió fins els nostres dies, ja que el nivell d'infiltració és, encara, un factor essencial per establir pronòstic. Així doncs, fou arrel d'aquesta observació que sorgí la necessitat de classificar els tumors colorectals atenent a la infiltració.

Passats quatre anys des del descobriment de la relació entre la supervivència i el nivell d'infiltració, Dukes efectuà la primera classificació en estadis d'una sèrie de 215 casos de localització rectal (Dukes, 1932). Els tres grups definits comprenien:

-
- A - Tumors de creixement limitat a la paret o intramurals
 - B - Tumors amb extensió a teixit adipós sense metàstasis ganglionars
 - C - Tumors amb metàstasis a ganglis regionals
-

Posteriorment, el propi autor aplicà el mateix criteri a sèries més llargues i introduí algunes modificacions al sistema de classificació original (Dukes, 1937; Gabriel *et al*, 1935). No fou, però, fins a l'any 1949 que sorgí el primer treball d'aplicació dels criteris de Dukes al carcinoma de còlon sigmoide (Kirklin, 1949). Alhora, els autors del mateix modificaren l'esmentada classificació considerablement, dotant-la de major complexitat.

Finalment, foren Astler i Coller els que introduïren la darrera modificació als estadis de Dukes, amb força implantació a la literatura americana (Astler i Coller, 1954). Els criteris d'invasió en els que es basà la classificació de Dukes i la comparació amb les diferents modificacions posteriors podeu trobar-les a la Figura 2.

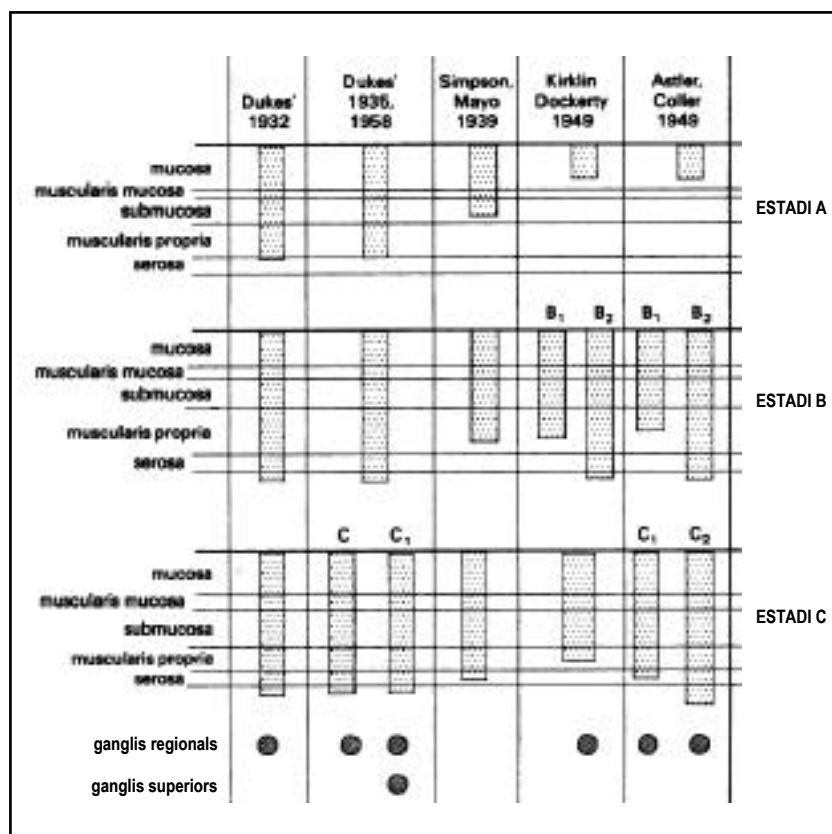


Figura 2. Diagrama comparatiu de les diferents classificacions modificades a partir de l'estadiatge de Dukes (segons Fenoglio-Preiser i Noffsinger, 1995).

La confusió creada per totes aquestes modificacions feu, però, que alguns autors proposessin una classificació diferent, que utilitzava el sistema TNM (Tumor-Node-Metastases) (Denoix, 1954) i l'aplicava al càncer colorectal (Beart *et al*, 1978). Segons aquesta, la descripció de l'extensió anatòmica de la malaltia es basa en tres components: 1) l'extensió del tumor primari; 2) l'absència o presència i extensió de les metàstasis dels ganglis limfàtics regionals; i 3) l'absència o presència de metàstasis a distància.

Quan el diagnòstic del tumor s'efectua després de l'estudi histopatològic de la lesió, la lletra "p" s'avantposa als paràmetres en qüestió: parlem així de d'una classificació de les lesions segons pT, pN i/o pM (UICC, 1997). Tenim doncs que, en base als criteris esmentats, l'extensió tumoral pot donar lloc a:

- *Tumors primaris (T)*

T _x	-	T d'extensió indeterminada
T ₀	-	Sense evidència de T
T _{is}	-	Carcinoma in situ: intraepitelial o envaint la làmina pròpia
T ₁	-	T envaint la submucosa
T ₂	-	T envaint la <i>muscularis propria</i>
T ₃	-	T envaint a través de la <i>muscularis propria</i> fins a la subserosa o d'altres teixits pericòlics o perirectals no peritonealitzats
T ₄	-	T envaint directament altres òrgans o estructures i/o perforant el peritoneu

- *Metàstasis a ganglis limfàtics regionals (N)*

N _x	-	Presència de metàstasis a ganglis regionals indeterminada
N ₀	-	Absència de metàstasis a ganglis regionals
N ₁	-	Presència de metàstasis entre 1 i 3 ganglis regionals
N ₂	-	Presència de metàstasis a 4 o més ganglis regionals

- *Metàstasis a distància (M)*

M _x	-	Presència de metàstasis a distància indeterminada
M ₀	-	Absència de metàstasis a distància
M ₁	-	Presència de metàstasis a distància

Atenent, doncs, a la descripció de l'extensió de la malaltia basada en el TNM, s'utilitza un estadiatge clínic que agrupa els tumors per categories de pronòstic, segons es mostra a continuació:

Estadi 0	-	T _{is} , N ₀ , M ₀
Estadi IA	-	T ₁ , N ₀ , M ₀
IB	-	T ₂ , N ₀ , M ₀
Estadi II	-	T ₃ , N ₀ , M ₀ ó T ₄ , N ₀ , M ₀
Estadi III	-	T _x , N ₁ , M ₀ ó T _x , N ₂ , M ₀
Estadi IV	-	T _x , N _x , M ₁

A la Figura 3 podeu trobar un diagrama de comparació entre els estadiatges de Dukes i el del sistema TNM.

1.5. Histopatologia

Allò que caracteritza l'adenocarcinoma colorectal és la invasió de la *muscularis mucosae* fins a la submucosa. La major part dels adenocarcinomes pertany al que la OMS classifica com a 8140/3. Són tumors formats per glàndules de mida i estructura molt variables. En els casos que presenten un bon o moderat grau de diferenciació, les cèl·lules epitelials solen ser amples i altes, i la llum glandular pot contenir restes cel·lulars. Però també hi ha descrites variants, com les que descrivim a continuació.

1.5.1. Variants

- *Adenocarcinoma mucinós o mucoide extracel·lular*

A aquest grup corresponen els adenocarcinomes que tenen més del 50% de la lesió composta per moc, que s'acumula formant dipòsits extracel·lulars. Aquesta variant s'associa a tumors que presenten fenotip RER (Replication Error), amb elevada inestabilitat de microsatèl·lits (MSI-H) (vegeu l'*Apartat 2.2.1* d'aquest mateix capítol).

- *Carcinoma mucoide intracel·lular (signet-ring cell carcinoma)*

Defineix aquesta variant la presència de més del 50% de cèl·lules tumorals amb moc intracel·lular (Sasaki *et al*, 1998). La cèl·lula típica té un gran vacúol mucinós que desplaça el nucli lateralment. També aquest tipus s'ha associat a MSI-H.

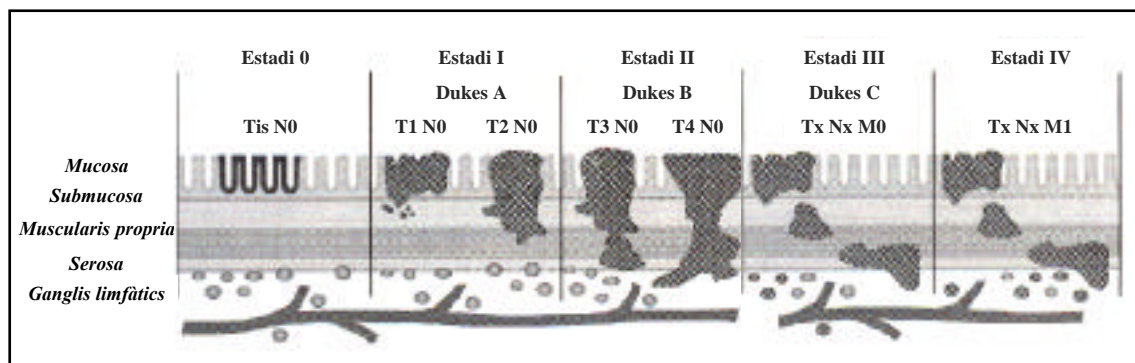


Figura 3. Diagrama comparatiu de l'estadiatge de Dukes respecte el TNM (segons Fenoglio-Preiser i Noffsinger, 1995).

- *Carcinoma adenoescamós*

És una variant molt infreqüent que presenta característiques de carcinoma escamós i d'adenocarcinoma, ja sigui en àrees separades dins del tumor o barrejades.

- *Carcinoma medul·lar*

Aquest tipus de tumor s'associa invariablement a inestabilitat de microsatèl·lits i a bon pronòstic. Està caracteritzat per cèl·lules malignes amb nuclis vesiculars que presenten nuclèols prominents i citoplasma abundant, es disposen en un patró sincitial i tenen infiltració intraepitelial per limfòcits (Jessurun *et al*, 1999).

- *Carcinoma indiferenciat*

Són tumors molt rars, amb manca absoluta de diferenciació i característiques histològiques molt variables. També està sobrerrepresentat en els tumors amb MSI-H.

1.5.2. Lesions precursors

La importància dels adenomes –vellosos, tubulars i tubulovelloso– rau que, malgrat pertànyer a la categoria de lesions benignes, són veritables precursors del càncer de còlon. Tots ells són proliferacions neoplàstiques de l'epiteli amb protrusió cap a la llum.

- *Adenoma tubular*

Al voltant d'un 75% dels pòlips neoplàstics són adenomes tubulars (Figura 4A). Es localitzen de forma preferent a còlon distal i a recte, i més del 50% són únics, malgrat poder ser també múltiples. Apareixen de forma esporàdica en la població general, amb una major incidència a la seixantena d'edat i predomini masculí de 2:1 (Spjut i Estrada, 1977).

La major part dels pòlips es caracteritzen per tenir la tija prima i un cap en forma de gerd, però també poden presentar altres aparences. El diàmetre del cap oscil·la entre els pocs mil·límetres i algunes desenes, i la longitud pot ser d'un centímetre o més (Kent i Mitros, 1983). La superfície al tall mostra un eix central fibrovascular, que procedeix de la submucosa i s'estén en continuïtat des del centre de la tija fins el cap. L'eix està recobert per mucosa normal, però el cap té un epitelí clarament neoplàstic format per túbuls allargats i glàndules molt properes a sí, separades per una minsa quantitat d'estroma conjuntiu fibrós. Ací, però, el component vellós no supera el 25%. L'atípia cel·lular i la manca de diferenciació cap a elements especialitzats és el que més clarament separa els pòlips neoplàstics dels hiperplàstics.

- *Adenoma vellós*

Els adenomes còlics que presenten més d'un 50% d'estructures velloses s'anomenen adenomes vellosos (Figura 4B). La gran majoria d'aquestes lesions (75%) es localitzen en el tram recte-còlon sigmoide, essent la seva distribució paral·lela a la de l'adenocarcinoma colorectal. Són els pòlips epitelials menys freqüents, i acostumen a ser els més grans (entre 1 i 10 centímetres). Solen identificar-se en pacients al voltant de la seixantena d'edat, amb igual afectació entre sexes. El símptoma més característic d'aquests pòlips és l'hemorràgia rectal i, de forma menys freqüent, la secreció de material mucoide ric en proteïnes que pot produir hipoproteïnèmia i, a cops hipopotassèmia.

Una part important d'ells són lesions sèssils o amb una àmplia base d'implantació, i lleugerament lobulats. Histològicament, no menys de la meitat de la lesió està formada per papil·les digitiformes o ramificades, recobertes d'epitelí polipoide. La resta pot tenir

estructura tubular. Cada papil·la està formada per un eix fibrovascular, recobert per epitel·li que varia d'una capa única de cèl·lules columnars altes, ben alineades, fins a cèl·lules indubtablement anaplàstiques multiseriades. S'ha descrit una correlació quasi lineal entre la mida del pòlip i la quantitat de component vellós del mateix (Day i Morson, 1978).

Donat que no hi ha dubte alhora de considerar l'adenoma vellós com una lesió precancerosa, menys encara quan un terç d'ells presenta un component d'adenocarcinoma invasor, el diagnòstic i la resecció quirúrgica dels mateixos és obligada, i cal realitzar-la de forma precoç.

- *Adenoma tubulovellós*

Aquest tipus –com el seu nom indica– comparteix característiques amb el tubular i el vellós. Per definició, el component vellós oscil·la entre el 25-50%, i té un potencial maligne directament proporcional a la quantitat d'aquesta (Dayal i DeLellis, 1990). La mida és intermèdia entre els dos tipus, amb la tija pràcticament idèntica a la de l'adenoma tubular però amb major tendència a evolucionar cap al creixement sèssil (Figura 4C). Histològicament, tenen un aspecte molt variable, podent adoptar des de les formes més benignes d'un adenoma tubular fins a alts graus d'atípia i anaplàsia.

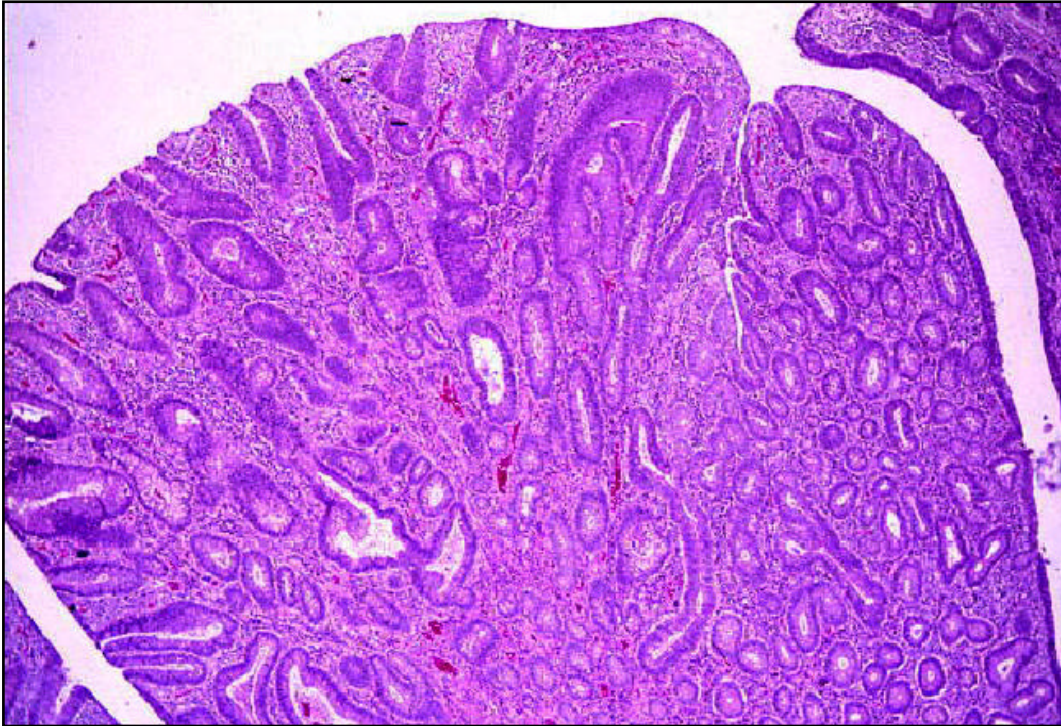
La neoplàsia colorectal com a grup estan constituïdes pels pòlips anomenats de forma genèrica adenomes, per les síndromes de poliposi familiar i pel carcinoma. En aquest apartat tractarem, però, solament adenomes i síndromes, dedicant-li al carcinoma un apartat independent en ser l'objecte específic d'aquest treball.

1.5.3. Síndromes associades

- *Poliposi adenomatosa familiar*

Aquesta síndrome familiar té transmissió autosòmica dominant (Bussey, 1978), i es caracteritza per la tendència dels individus de la família a desenvolupar pòlips adenomatosos que solen progressar cap a l'adenocarcinoma. Variants d'aquesta síndrome, encara que menys freqüents, trobem les de Gardner i Turcot.

A



B

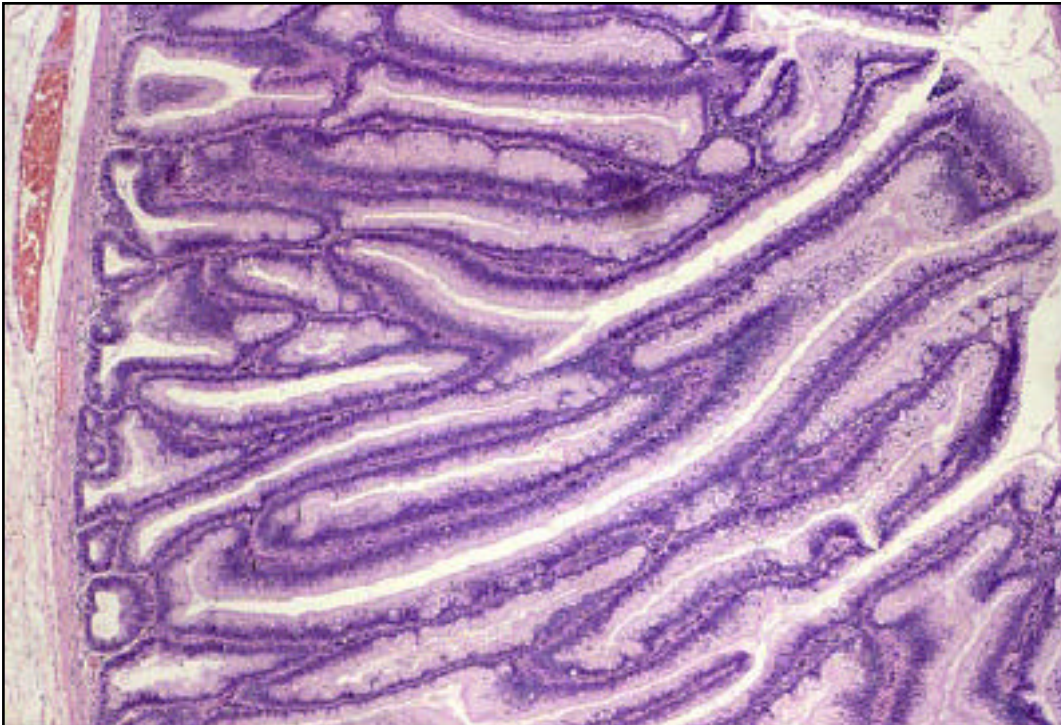


Figura 4. Fotografies il·lustratives de pòlips col·lorectals amb el seu patró característic.

A) Adenoma tubular; i B) Adenoma vellós, també dit papil·lar.

La primera, també coneguda com a FAP (Familial Adenomatous Polyposis), es caracteritza per la presència d'innombrables pòlips que entapissen tot el còlon, conferint a la mucosa un aspecte vellós. Des del punt de vista molecular (vegeu l'*Apartat 2.1* d'aquest mateix capítol), s'ha relacionat amb la deleció de la regió cromosòmica 5q21, concretament per la pèrdua al·lèlica del gen *APC* (Adenomatous Polyposis Coli) (Bodmer *et al*, 1987; Fearon i Jones, 1992). El nombre de pòlips presents pot oscil·lar entre 500 i 2500, essent la mitjana de 1000 (Dayal i DeLellis, 1990). Solen diagnosticar-se entre la segona i la tercera dècada de vida i, malgrat la majoria són adenomes tubulars, alguns pacients ja presenten aleshores càncer de còlon o recte. Es considera que el 100% dels pacients amb FAP desenvolupa adenocarcinoma de còlon si la part que s'afecta no es resseca quirúrgicament, de forma que un cop diagnosticada sol recomanar-se la colectomia o proctocolectomia profilàctica. En la mateixa línia, està indicat l'estudi familiar en germans i parents de primer grau, ja que s'estima que aquesta mesura ha reduït la incidència de càncer de còlon del 66% al 7,5% en els individus d'alt risc examinats regularment (Bussey, 1978).

La síndrome de Gardner és un tipus de FAP a la que s'hi afegixen manifestacions extracòliques, podent-se afectar teixits d'origen ectodèrmic, mesodèrmic i endodèrmic (Parks, 1990). Aquestes manifestacions són bàsicament osteomes, quists epidermoides i fibromes (Gardner, 1962). L'herència, també autosòmica dominant, té expressivitat variable. Donat que en alguns pacients s'han trobat idèntiques mutacions que en la FAP, molts autors suggereixen que ambdues malalties són en realitat la mateixa, associada al gen pleiotròpic *APC*, i que les diferents formes de presentació responen a una penetrança variable de la mutació (Okamoto *et al*, 1990; Miyaki *et al*, 1990).

Com a última d'aquestes síndromes, la de Turcot és una variant molt infreqüent. Caracteritzada per la presència de poliposi còlica múltiple, està associada a la presència d'un tumor del sistema nerviós central, el medul·loblastoma (Turcot *et al*, 1959). Tampoc, en aquest cas, no hi ha evidències que el trastorn sigui altra cosa que una forma diferent de FAP.

- *Síndrome de Lynch*

També anomenada HNPCC (Hereditary NonPoliposis Colorectal Cancer), es tracta un cop més d'una síndrome autosòmica dominant caracteritzada, a més del carcinoma colorectal, per la presència de carcinoma endometrial i càncers del budell prim, l'urèter o la pelvis renal. Els canvis genètics associats a aquesta síndrome consisteixen en mutacions en línia germinal dels gens de reparació *MMR*, i es manifesten per una inestabilitat a nivell de seqüències microsatèl·lit (vegeu l'*Apartat 2.2* d'aquest mateix capítol). Els individus portadors de famílies HNPCC tenen un risc del 70-85% de desenvolupar càncer colorectal al llarg de la vida, del 50% per al càncer d'endometri, i un 15% per als altres tipus de càncer (Watson i Lynch, 1993; Vasen *et al*, 1996; Aarnio *et al*, 1997). El 35% dels pacients cursen amb carcinomes sincrònics o metacrònics. En una variant d'aquesta síndrome, la de Muir-Torre (Cohen *et al*, 1991), els tumors anteriorment descrits s'acompanyen d'altres que afecten les glàndules sebàcies.

1.6. Manifestacions clíniques i diagnòstic

L'absència d'una simptomatologia evident és, potser, un dels trets més característics de la neoplàsia colorectal, fet que permet explicar que aquesta es desenvolupi durant anys sense ésser sospitada. Malgrat tot poden aparèixer, prèviament al diagnòstic, canvis del ritme intestinal i/o hemorràgies ocultes en la femta. El sagnat pot passar desapercebut pel fet que sol associar-se a estrenyiment i a presència d'hemorroides. S'estima que la mitja de retard en el diagnòstic per manca de consulta mèdica als primers símptomes és d'uns quatre mesos (Del Regato *et al*, 1985).

En les neoplàsies de cec i còlon ascendent, pot produir-se una estenosi important de la llum intestinal però, pel fet que el contingut del budell en aquest tram és molt líquid, no sol conduir a l'obstrucció. Les lesions de còlon dret tendeixen a ulcerar-se, causant la pèrdua crònica de sang sense alterar l'aspecte de la femta, de forma que els pacients generalment presenten símptomes d'anèmia microcítica i hipocròmica. A mesura que travessa el còlon transvers i descendent, la femta va concentrant-se, de forma que, els tumors localitzats a aquest nivell tendeixen a impedir-ne el pas. En conseqüència apareix dolor abdominal de tipus còlic i, a cops, una obstrucció que pot conduir, fins i tot, a la perforació intestinal.

Davant de la sospita de carcinoma colorectal s'ha de sotmetre el pacient a diverses proves, entre les quals s'inclou l'anàlisi de sang oculta en femta, el tacte rectal, els estudis radiològics amb contrast, el TAC i la proctocolonoscòpia. De totes, però, la més important és la darrera: en cas de confirmar-se la sospita de neoplàsia, l'endoscòpia permetrà l'obtenció d'una biòpsia, l'anàlisi anatomopatològica de la qual portarà al diagnòstic definitiu.

Alhora, aquest tipus de càncer produeix diversos antigens tumorals que poden ser detectats en sang, contribuint així al diagnòstic. D'aquests, el més abastament utilitzat és l'antigen carcinoembriogènic (CEA), els nivells del qual estan en relació directa amb la mida i l'extensió del tumor (Dayal i DeLellis, 1990). L'inconvenient d'aquest marcador tumoral és la seva poca especificitat (Go i Zamcheck, 1982) ja que també pot estar elevat en altres neoplàsies i, àdhuc, en certes patologies no neoplàsiques, com p.e. la cirrosi hepàtica. És per aquest motiu que la major utilitat del CEA és contribuir a la detecció de recidiva després de la resecció del tumor primari: quan s'ha assolit l'extirpació completa, els nivells de CEA es negativitzen totalment, mentre que la reaparició d'aquest marcador suggereix la recidiva de la neoplàsia. En aquest sentit, el CEA és també un indicador fiable de l'eficàcia de la quimioteràpia.

1.7. Tractament

1.7.1. Teràpia primària

Sens dubte l'opció terapèutica més adient pel càncer de còlon és la cirurgia radical amb finalitat curativa, que pot practicar-se en el 80-90% dels pacients, amb independència de quin hagi estat el mètode utilitzat per a detectar el tumor. Tanmateix, abans de la intervenció, s'ha de dur a terme un estudi d'extensió complet per a revelar les possibles metàstasis, si n'hi hagués. És aconsellable, també, de realitzar una colonoscòpia total per tal d'identificar altres possibles neoplàsies i/o pòlips sincrònics que poden ser presents (Winawer *et al*, 1996). En el cas de trobar metàstasis, el tractament quirúrgic segueix essent vàlid. Recuperat de la intervenció, el pacient s'ha de sotmetre a exploracions físiques de control i a les anàlisis bioquímiques pautades.

La cirurgia està també indicada, després d'haver extirpat el tumor primari, en pacients amb recurrència local o metàstasis resecables. Àdhuc en els casos en els que la curació completa no és possible, l'opció quirúrgica és practicada amb la finalitat pal·liativa de controlar els símptomes (Sigurdson, 1995).

1.7.2. Teràpia adjuvant

- *Quimioteràpia*

Que una part important dels pacients sotmesos a cirurgia amb intenció curativa morís a causa de malaltia metastàtica, fou un fet de prompte assimilació. Als anys 50, amb la finalitat de millorar el període lliure de malaltia i la taxa de supervivència global, es dugueren a terme els primers assaigs clínics utilitzant teràpia sistèmica adjuvant. Entre els agents quimioteràpics aleshores a l'abast hi destacà, per damunt de tots, el 5-fluorouracil (5-FU) (Dwight *et al*, 1969; Ben-Josef i Court, 1995). De fet, aquest continua essent ara per ara l'agent quimioteràpic més emprat, sia sol o administrat en combinació amb d'altres fàrmacs.

En els darrers anys, s'han desenvolupat nous agents quimioteràpics destinats a millorar l'eficàcia dels primers. Així, com a alternativa al 5-FU en pacients amb metàstasis refractàries, s'administra l'irinotecan, conegut també com a CPT-11 (Fukuoka *et al*, 1990). Sembla que aquest, en comparació al 5-FU, millora significativament no sols la supervivència dels pacients sinó també llur qualitat de vida, deixant de banda la diarrea que, com a efecte secundari inevitable, pugui ocasionar. També recentment s'ha experimentat amb l'oxaliplatí, un agent de tipus diamino-clorhexà que actua intercalant les cadenes de DNA (Wiseman *et al*, 1999). La seva eficàcia, en aquest cas, s'ha demostrat en pacients amb malaltia avançada, principalment associat a 5-FU i leucovorin (De Gramont *et al*, 1997; Andre *et al*, 1998).

Després de quatre dècades d'experiència, però, tot sembla indicar que el tractament quimioteràpic més eficaç per al càncer colorectal és encara el 5-FU. Amb tot, se segueixen desenvolupant nous fàrmacs que constitueixen futures opcions terapèutiques. Així, els assaigs clínics vigents permetran, a mig termini, determinar quins d'aquests

agents o combinacions d'ells seran considerats els millors candidats pel tractament del càncer de còlon avançat. L'increment de les taxes de resposta i la prolongació dels intervals lliures de malaltia semblen excitants pel que fa, p.e. a l'administració de 5-FU juntament amb leucovorin i, fins i tot, irinotecan o oxaliplatí. Aquests còctels semblen mantenir l'eficàcia dels antics règims alhora que disminueixen la toxicitat, millorant la qualitat de vida dels pacients així tractats. Caldrà, però, demostrar l'increment de les taxes de supervivència per a poder considerar aquestes opcions terapèutiques com a veritables alternatives.

- *Radioteràpia*

Malgrat la radioteràpia no és eficaç com a tractament primari del càncer de còlon, si està indicada en casos específics d'afectació local. De forma preoperatoria, ho està en neoplàsies grosses de recte, potencialment no resecables, ja que poden reduir-se el suficient per a permetre llur extirpació quirúrgica (Gastrointestinal Tumor Study Group, 1984). A propòsit cal esmentar, com a avenç remarcable dins d'aquesta modalitat de tractament, la radioteràpia tridimensional, que disminueix l'exposició a la radiació dels teixits no afectats per la neoplàsia (Tait *et al*, 1997). També, pel que fa al tractament postoperatori de recidives locals, pot emprar-se la radioteràpia adjuvant locoregional (Willett *et al*, 1993).

Una altra modalitat de radioteràpia és la pèlvica pre-, intra- o postquirúrgica, indicada en pacients amb tumors irreseccables i/o en estadi avançat, ja que sembla disminuir la probabilitat de recidiva local, tot i no millorant la supervivència. La seva limitació, però, és l'elevada dosi de radiació necessària per a garantir el control local, que excedeix en molts casos els nivells màxims de tolerància dels teixits adjacents. En aquests casos, el tractament combinat amb quimioteràpia sistèmica (p.e. 5-FU) n'augmenta l'efectivitat, doncs aquest afavoreixen l'efecte biològic de la radiació (Skibber *et al*, 2001).

1.7.3. Teràpia gènica

La teràpia gènica ha esdevingut, en els darrers anys, una veritable modalitat de tractament d'alguns càncers. Pel que fa a la neoplàsia colorectal, als Estats Units, des de

mitjans de l'any 1998, es duen a terme cinc assaigs clínics basats en teràpia gènica. A grans trets, les estratègies emprades poden dividir-se en tres categories: 1) els sistemes dissenyats per a l'administració d'enzims i profàrmacs; 2) la teràpia gènica de substitució del supressor tumoral *TP53*; i 3) la teràpia immunogènica, basada en l'expressió d'antigenes tumorals o citoquines que indueixen immunitat tumoral (Zwacka i Dunlop, 1998). Tot i ser d'hora encara per a conèixer els resultats, cal esperar que en els propers deu anys es desenvolupin tractaments eficaços contra el càncer de còlon.

1.8. Pronòstic

1.8.1. Factors clinicopatològics

Tal i com ja hem assenyalat en anteriors apartats, el pronòstic dels pacients amb càncer colorectal està estretament relacionat amb el grau d'infiltració del tumor a la paret intestinal, l'afectació dels ganglis limfàtics regionals i la presència de metàstasis a distància. Així, en absència de signes evidents de malaltia metastàtica, no és possible donar prognosi en cap sentit abans de la resecció i de l'anàlisi anatomopatològica de la peça operatòria.

Donat que la majoria de les recidives postquirúrgiques succeeixen dintre dels quatre anys subsegüents, l'interval de cinc anys lliures de malaltia sembla un indicador fiable de curació. La probabilitat de supervivència dels pacients amb càncer colorectal als 5 anys està relacionada amb l'estadiatge (Taula 3). Quant al pronòstic per disseminació a ganglis regionals, depèn del nombre d'aquests que s'afecti, diferenciant-se clarament l'extensió de 1 a 4 ganglis de la de 5 o més, amb millor i pitjor pronòstic, respectivament. Altres factors de mal pronòstic són la mala diferenciació histològica (tumors de grau III), la perforació o adherència del tumor a òrgans adjacents, i la invasió de venes.

1.8.2. Factors biològics

A banda dels esmentats factors clinicopatològics, també n'hi ha d'altres que poden confegir pronòstic a la neoplàsia colorectal. Són els marcadors moleculars, sorgits de la

Taula 3. Taxes de supervivència per al càncer colorectal en relació a l'extensió anatòmica de la malaltia, segons el sistema de classificació TNM (Wood *et al*, 1979).

Càncer de còlon				Càncer de recte			
<i>Estadi</i>	<i>No casos</i>	<i>% Total</i>	<i>Supervivència*</i>	<i>Estadi</i>	<i>No casos</i>	<i>% Total</i>	<i>Supervivència*</i>
0	37	3,0	75	0	50	4,6	75
I (A+B)	347	28,1	69	I (A+B)	285	26,3	71
IA	57	4,6	77	IA	66	6,1	76
IB	290	23,5	67	IB	219	20,2	69
II	180	14,6	58	II	146	13,5	57
III	196	15,9	33	III	262	24,2	25
IV	126	10,2	4	IV	56	5,2	7
Total	1.233		55,1	Total	1.084		54,8

* Supervivència relativa als 5 anys (%)

dobles necessitat de: 1) identificar el grup de pacients d'alt risc que cursarà amb recidiva postquirúrgica o progressió de la malaltia –candidat, per tant, a beneficiar-se dels tractaments complementaris a la cirurgia–; i 2) seleccionar el tipus de teràpia adjuvant que requereixen els pacients amb malaltia avançada. Entre els marcadors susceptibles de formar part d'un hipotètic pannel de pronòstic de la neoplàsia colorectal, en tant que capaços de predir l'evolució de la neoplàsia i la resposta al tractament, hi destaquem: la proliferació, la timidilat-sintasa, l'antigen carcinoembrionari, la p53, les alteracions a cromosoma 18q i la inestabilitat de microsatèl·lits.

- *Ploïdia i proliferació*

L'aneuploïdia, o descompensació anòmala del contingut cromosòmic cel·lular, ha estat recentment assenyalada com a fenomen causant d'inestabilitat genètica, i associada per tant, a l'heterogeneïtat cariotípica del fenotip cancerós (Duesberg *et al*, 1998) (vegeu també l'*Apartat 2.2.1* d'aquest mateix capítol). És més, un seguit d'evidències permet afirmar que la major part dels tumors en estadi avançat és aneuploide, tendint a taxes de creixement superiors i a menor supervivència que els tumors diploides (Armitage *et al*, 1985; Quirke *et al*, 1987; Crissman *et al*, 1989). Pel que fa al càncer colorectal, però,

desgraciadament al voltant del 90% dels tumors és aneuploide, resultant la significació pronòstica d'aquest fenomen qüestionable (Steinbeck *et al*, 1993).

Passem ara a l'activitat proliferativa, l'alt índex de la qual s'associa –en general, a totes les neoplàsies– a una major agressivitat biològica (Riley, 1992; Elies, 1997). El seu estudi pot abordar-se amb distintes metodologies. D'una banda, mitjançant tècniques com la citometria –i, en especial, la de flux– que permet determinar l'índex proliferatiu com a percentatge de cèl·lules tumorals amb contingut de DNA que correspon a la fase S de síntesi del cicle cel·lular (Koss *et al*, 1989). Més vigents, però, trobem les aproximacions immunohistoquímiques, basades en el marcatge passiu amb anticossos específics contra proteïnes que intervenen en el cicle cel·lular. De totes elles, la de major impacte ha estat la Ki-67, un antigen nuclear humà de naturalesa no histònica, present en totes les cèl·lules amb activitat proliferativa i absent en les que no ho estan (Gerdes *et al*, 1984). Amb l'aparició de l'anticòs monoclonal MIB-1, capaç de detectar l'antigen en teixit fixat en formol i inclòs en parafina, la Ki-67 ha esdevingut una eina de gran utilitat pràctica, permetent d'efectuar nombrosos estudis retrospectius (McCormick *et al*, 1993). L'expressió de Ki-67 a la neoplàsia colorectal és variable, considerant-se les positivitats iguals o superiors al 20% indicatives d'alta activitat proliferativa i, conseqüentment, de mal pronòstic.

No podem obviar, però, que hi ha certa tendència a restar importància a Ki-67 com a marcador pronòstic dels tumors colorectals primaris (Sahin *et al*, 1994; Jansson i Sun, 1997) Això no obstant, treballs recents suggereixen que, en aquesta neoplàsia, l'alta activitat proliferativa de les metàstasis hepàtiques s'associa a una major supervivència dels pacients hepatectomitzats (Petrowsky *et al*, 2001; Weber *et al*, 2001).

- *Timidilat-sintasa (TS)*

La timidilat-sintasa és un enzim imprescindible per a la síntesi de DNA, ja que constitueix l'única font de subministrament cel·lular de timidilat. Té activitat màxima en els estadis avançats de la fase G₁ y al principi de la fase S del cicle cel·lular, i superior

en les cèl·lules de proliferació ràpida que en les que no es divideixen. S'ha descrit que la TS és capaç de mediar l'efecte citotòxic d'alguns agents quimioteràpics com les fluoropirimidines i, en especial, el del 5-FU. Aquest –com a inhibidor competitiu de la TS que és, i en condicions normals–, regula negativament la producció de timidilat i, per això, redueix la síntesi de DNA (Santi *et al*, 1974). Resulta, però, que l'augment d'expressió de la TS, esdevingut a conseqüència de l'amplificació del propi gen, s'ha relacionat amb la resistència al tractament amb 5-FU (Clark *et al*, 1987; Copur *et al*, 1995). Hi ha estudis que suggereixen que els pacients amb tumors que expressen nivells baixos de TS poden beneficiar-se de la teràpia convencional amb fluoropirimidines, mentre que per a aquells amb tumors d'elevada expressió de la mateixa, hi ha opcions terapèutiques més adients, com p.e., l'irinotecan (Leichman, 1998).

Així doncs, tot sembla indicar que la TS intratumoral constitueix un bon marcador predictiu de resposta al 5-FU. La quantificació enzimàtica pot realitzar-se mitjançant RT-PCR quantitativa (transcripció inversa seguida de reacció en cadena de la polimerasa), si es disposa de material congelat (Lenz *et al*, 1998), o bé per immunohistoquímica, aplicable a teixit fixat en formol i inclòs en parafina (Aschele *et al*, 1999).

- *Antigen carcinoembriogènic (CEA)*

Estudis realitzats mitjançant immunohistoquímica revelen que, de vegades, ganglis procedents de resecció colorectal, en aparença negatius, contenen petites quantitats de tumor (Cutait *et al*, 1991; Greenson *et al*, 1994). Tot i així, no queda clar quina és la transcendència d'aquest fet. Avui dia, però, hi ha avenços tècnics que permeten de realitzar la detecció de micrometàstasis a nivell molecular. I el CEA pot considerar-se, en aquest sentit, un bon marcador ja que està present en la majoria dels tumors colorectals i no en el teixit normal (Shively i Beatty, 1985). S'han desenvolupats assaigs de RT-PCR per a detectar el seu mRNA, que resulten eficaços per a localitzar micrometàstasis en ganglis de pacients amb càncer colorectal (Mori *et al*, 1995). Així, donat que sabem que els tumors d'estadi II amb micrometàstasis tenen major tendència a recidivar que els que no les tenen, la troballa de CEA en aquests casos permet definir el subgrup de pacients que pot beneficiar-se de teràpia adjuvant (Liefers *et al*, 1998).

- *Altres marcadors moleculars*

La resta de marcadors –entre les quals hem inclòs la p53, les alteracions a cromosoma 18q i la inestabilitat de microsatèl·lits– són, a més de factors de pronòstic, factors claus en el procés de la carcinogènesi colorectal. Per aquest motiu seran tractats apart i en profunditat, àdhuc en llur vessant pronòstica, al llarg de l'*Apartat 2* d'aquest mateix capítol.

2. CARACTERITZACIÓ MOLECULAR DEL CARCINOMA COLORECTAL

Tots els indicis dels que disposem permeten afirmar que la gran majoria de càncers de còlon sorgeixen de pòlips neoplàstics preexistents. El risc de desenvolupar un adenocarcinoma, però, no es deu a l'existència dels pòlips en sí, sinó a la probabilitat que aquests es transformin. També hem assenyalat que el procés de progressió tumoral és multifàsic, i que calen anys o, fins i tot, dècades per a completar-lo (Gryfe *et al*, 1997). És lògic doncs pensar que existeixin una sèrie de mecanismes moleculars associats a la progressió morfològica tumoral.

En els darrers anys s'han produït importants avenços en el coneixement d'aquests mecanismes moleculars, fruit de l'anàlisi dels dos tipus fonamentals de càncer de còlon i recte heredofamiliars: la poliposi còlica familiar (FAP) i la síndrome de Lynch o càncer colorectal hereditari no associat a poliposi (HNPCC). Per a cadascun d'ells s'ha postulat un model de progressió tumoral diferent, responent alhora, entre tots dos, al desenvolupament de la majoria de carcinomes colorectals esporàdics.

2.1. Model de progressió de la síndrome hereditària de FAP

El model de carcinogènesi colorectal de la FAP respon al desenvolupament del càncer sobre un pòlip, i en ell estan implicats dos tipus de gens: els protooncogens i els gens supressors tumorals. Les mutacions en aquests gens confereixen les cèl·lules portadores un avantatge proliferatiu que contribueix a l'esdeveniment del fenotip maligne. En

concret, les mutacions involucrades en aquesta via de progressió són responsables de l'activació d'un oncogen dominant (*c-K-RAS*), i la inactivació de diversos gens supressors (*APC*, *DCC* i *TP53*, com a mínim) (Vogelstein *et al*, 1988), fets que comporten l'alteració progressiva dels mecanismes que normalment regulen el creixement i la diferenciació cel·lulars (Weinberg, 1989). També segueixen aquesta via –a més dels tumors de la síndrome hereditària FAP– el 80% dels carcinomes esporàdics colorectals (Fearon i Vogelstein, 1990). A la Figura 5 es mostra un esquema amb els principals gens que participen de l'esmentada via.

2.1.1. Oncogens

- *El gen c-K-RAS*

De tots els oncogens coneguts, el *K-RAS* és el més freqüentment alterat en la neoplàsia colorectal, amb una prevalença de mutació del 40-50% en els carcinomes (Bos *et al*, 1987; Forrester *et al*, 1987). Però la presència de mutacions del mateix no es manifesta solament en lesions malignes, sinó també en adenomes i, fins i tot, en la mucosa còlica adjacent d'alguns carcinomes, evidenciant que aquestes alteracions constitueixen un fenomen primerenc en la tumorigènesi del còlon (Burmer i Loeb, 1989; Shivapurkar *et al*, 1997). El fet de trobar-se tant en carcinomes esporàdics com en els sorgits en el context de la FAP, suggereix que ambdós tipus de càncer comparteixen la mateixa via de progressió tumoral (Fearon i Jones, 1992). Com la resta dels gens de la família *RAS* –*H-RAS* i *N-RAS*– el *K-RAS* codifica un producte de membrana de 21 kDa, la proteïna *K-ras*, amb activitat GTPasa intrínseca, i presumptivament involucrada en els mecanismes d'activació transcripcional induïts per factors de creixement. Aquest sistema de transducció de senyals és fonamental per a la regulació de la proliferació i la diferenciació cel·lular (Barbacid, 1987; Sato i Kazino, 1992).

Les proteïnes *ras* tenen propietats intercanviadores de nucleòtids GDP/GTP, i són funcionalment actives unides a GTP, i inactives quan ho estan al GDP. L'adquisició del potencial oncogènic de *c-K-RAS* es deu a la presència de mutacions puntuals a la regió codificant, afectant de forma específica els codons 12, 13 i 61. Les mutacions, de sentit erroni, provoquen l'activació constitutiva de la proteïna (McCormick, 1989).

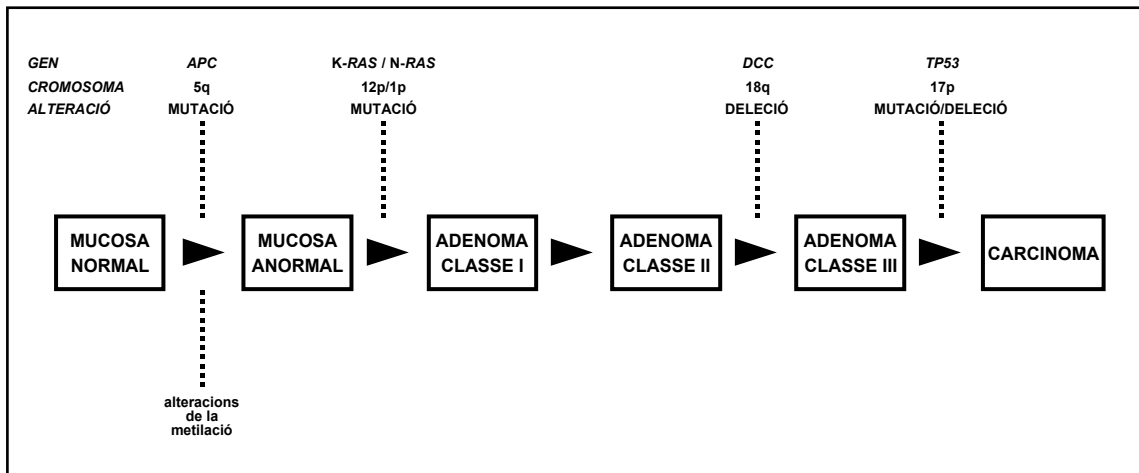


Figura 5. “Vogelgrama” o esquema de progressió dels canvis genètics associats al carcinoma tipus FAP (segons Hamilton, 1992).

- *Altres oncogens*

A més del K-RAS, altres productes oncogènics –com *c-myc* i *neu*– han estat relacionats amb la carcinogènesi colorectal. Tot i així, la presència d’alteracions en els seus gens es limita a un 5% de carcinomes, i el significat de les mateixes és encara incert.

2.1.2. Gens supressors

- *Alteracions al cromosoma 5q: els gens APC i MCC*

El gen *APC*, responsable de la síndrome de FAP –incloent-hi les síndromes de Gardner i Turcot –, està localitzat al braç llarg del cromosoma 5, concretament a la regió 5q21-22 (Bodmer *et al*, 1987; Leppert *et al*, 1987). Gràcies al coneixement de llur ubicació, els individus a risc de famílies afectades pogueren ésser identificats mitjançant estudis de lligament. D’altra banda, aproximadament un 20% dels càncers de còlon esporàdics presenten pèrdua d’heterozigositat en aquest locus, fet que suggereix que l’*APC* està involucrat també en la progressió neoplàstica colorectal no-FAP (Solomon *et al*, 1987).

El gen, identificat l’any 1991 (Kinzler *et al*, 1991a; Groden *et al*, 1991), està constituït per 16 exons, un d’ells no codificant. Els altres codifiquen una proteïna citoplasmàtica

que s'expressa en diversos teixits, amb una seqüència similar a la de les proteïnes intermèdies dels filaments, com ara la miosina i la queratina (Grodén *et al*, 1991). Estudis més recents, han permès identificar la proteïna que coprecipita amb el producte de l'APC com a β -catenina, una molècula intracel·lular que es lliga a l'extrem citoplasmàtic de la E-cadherina (Rubinfeld *et al*, 1993). La funció de la E-cadherina és la de mantenir en estreta unió les cèl·lules epitelials, involucrant-se en les interaccions intercel·lulars i el citosquelet (Su *et al*, 1993).

L'estudi complet del gen *APC* en pacients amb neoplàsia colorectal esporàdica ha permès detectar mutacions somàtiques en un 60% de carcinomes i un 63% d'adenomes (Powell *et al*, 1992). Aquestes mutacions estan concentrades a l'exó 15, concretament, en la regió compresa entre els codons 1286 i 1513 anomenada MCR (Mutation Cluster Region). Això no obstant, aquesta regió només està mutada en línia germinal en el 23% dels pacients pertanyents a famílies de FAP (Miyoshi *et al*, 1992).

D'altra banda, el gen *MCC* (Mutated in Colorectal Carcinoma), identificat pocs mesos abans que l'*APC*, colocalitza amb ell al cromosoma 5q21 (Kinzler *et al*, 1991b). Mentre que el 6% de carcinomes colorectals esporàdics presenten mutació somàtica a *MCC*, no sembla haver-hi mutacions en els individus afectes de FAP (Nishisho *et al*, 1991). La proteïna citoplasmàtica MCC que codifica aquest gen presenta homologia amb el receptor muscarínic m3 de l'acetilcolina (Kinzler *et al*, 1991b). Estudis recents demostren que, malgrat la quantitat de la mateixa roman constant al llarg del cicle cel·lular, la seva fosforilació augmenta durant la transició de la fase G₁ a S i, alhora, posen de manifest que la inducció de la sobreexpressió de MCC bloqueja l'esmentada transició. Les proteïnes resultants de la mutació del gen *MCC* semblen perdre la seva capacitat de bloqueig, la qual cosa suggereix que MCC juga un paper important en la regulació negativa de la progressió del cicle cel·lular (Matsumine *et al*, 1996).

- *Alteracions al cromosoma 18q: els gens DCC, SMAD4 i SMAD2*

Daten de l'any 1985 els estudis citogenètics que, per primer cop, posaren de manifest l'existència de delecions del braç llarg del cromosoma 18 en el càncer de còlon (Muleris *et al*, 1985). Posteriorment, el treball de Vogelstein i col·laboradors (Vogelstein *et al*,

1988) detectant pèrdua al·lèlica en aquesta regió en un 73% de carcinomes colorectals, en comparació amb l'11% dels adenomes i el 43% dels adenomes amb àrees de carcinoma microinvasiu, suggerí que l'alteració d'aquesta regió era un fet tardà en la progressió d'aquest tipus de neoplàsia (Fearon *et al*, 1987).

L'estudi de la zona cromosòmica delecionada en aquests tumors ha portat a la identificació del gen *DCC* (Deleted in Colorectal Carcinoma), la pèrdua al·lèlica del qual s'associa a una disminució de la seva expressió (Itoh *et al*, 1993). Malgrat la controvèrsia sorgida a l'inici quant a si l'esmentada pèrdua estava o no relacionada amb una conducta més agressiva dels carcinomes en estadi II, les darreres tendències semblen decantar-se en favor de la hipòtesi afirmativa (Jen *et al*, 1994; Ogunbiyi *et al*, 1998; Lanza *et al*, 1998; Martinez-Lopez *et al*, 1998; Jernvall *et al*, 1999; Watanabe *et al*, 2001). Tot sembla indicar que l'absència de *DCC* identifica un subgrup de pacients amb lesions que es comporten com càncers d'estadi III (Shibata *et al*, 1996). Actualment hom pot considerar que, en pacients en estadi II, l'estat del cromosoma 18q té veritable valor pronòstic en relació a l'interval lliure de malaltia i a la supervivència global. Les implicacions terapèutiques que aquesta afirmació suposa són rellevants, ja que permet seleccionar un grup de pacients que pot beneficiar-se de la teràpia adjuvant.

La proteïna que codifica el gen *DCC*, del mateix nom, té 190 kDa i homologia amb les glucoproteïnes de la superfície cel·lular, particularment amb la molècula d'adhesió neuronal N-CAM. S'hipotetitza que la seva manca en els tumors té com a conseqüència la pèrdua del contacte cèl·lula-cèl·lula, la qual cosa afavoreix l'aparició de metàstasis (Fearon *et al*, 1990). Actualment se sap la proteïna correspon a un receptor, o part d'ell, que media l'efecte de la netrina-1, responsable de la migració dels axons neuronals (Keino-Masu *et al*, 1996). Malauradament, la magnitud del gen i la complexitat de la seva estructura fan difícilment abordable el seu estudi mutacional.

L'estudi d'aquesta regió del cromosoma 18 ha dut, a més, a la identificació d'altres dos gens candidats a supressors, la inactivació dels quals està implicada en la carcinogènesi colorectal (Eppert *et al*, 1996; Hahn *et al*, 1996; Riggins *et al*, 1996): *SMAD4* –anteriorment anomenat *DPC4* (Deleted in Pancreatic Carcinoma)– i *SMAD2* –conegut

també com a *MADR2*. Ambdós gens pertanyen a la família dels gens *SMAD* (Derynck *et al*, 1996) que participen en la via de transducció de senyals activada pels receptors de la família del TGF- (Massagué *et al*, 1997).

La funció de la proteïna que codifica *SMAD4* es deduí inicialment de la similitud de seqüència entre aquest gen i els gens *MAD* de *Drosophila melanogaster* i *SMA2*, 3 i 4 de *Caenorhabditis elegans* (Sekelsky *et al*, 1995; Savage *et al*, 1996). Aquesta similitud de seqüències, juntament amb estudis funcionals recents han permès deduir que el gen *SMAD4* codifica un producte que té un paper central en la via de transmissió del TGF- . En síntesi, els receptors del TGF- (proteïnes transmembrana de tipus I i II), en reconèixer el seu efector, s'uneixen i fosforilen la proteïna citoplasmàtica SMAD2. Aquesta proteïna fosforilada pot translocar-se al nucli unida a la proteïna SMAD4, permetent l'activació de la cascada de senyals induïda pel TGF- (Lagna *et al*, 1996). En tots dos gens ha estat descrita la presència de mutacions en homozigosi que, en el cas de *SMAD4* poden afectar un 30% dels càncers colorectals (Thiagalingam *et al*, 1996; Moskaluk i Kern, 1996), mentre que el *SMAD2* solament s'afecta en un 6% de casos (Eppert *et al*, 1996).

- *Alteracions al cromosoma 17p: el gen TP53*

La pèrdua al·lèlica de la regió 17p13 és un dels fenòmens genètics més freqüents en el carcinoma de còlon i recte. Succeeix en el 70-80% dels casos, però només en el 10-30% dels adenomes (Fearon *et al*, 1987; Vogelstein *et al*, 1988), fet que suggereix que aquesta alteració pot estar relacionada amb la transició d'adenoma a carcinoma (Vogelstein *et al*, 1989).

La regió susceptible de deleció conté el gen supressor *TP53* (McBride *et al*, 1986; Isobe *et al*, 1986), l'estudi mutacional del qual, en carcinomes colorectals, demostra la presència de mutacions puntuals a l'al·lel no delecionat (Baker *et al*, 1989). Les alteracions descrites en aquest gen són responsables de la seva inactivació, essent el fenomen determinant de la mateixa la mutació puntual. Un cop aquesta s'ha produït, l'al·lel normal restant es perd ràpidament (Baker *et al*, 1990a). Les mutacions a *TP53*, que comporten l'alteració de la proteïna p53 nadiua, incideixen de forma tardana en el

procés de la carcinogènesi colorectal. La proteïna anòmala resultant permet que tumors que fins aleshores creixien a expenses d'un cúmul d'alteracions genètiques eludeixin l'aturada del cicle cel·lular i el fenomen d'apoptosi (Gryfe *et al*, 1997).

Alguns autors han atribuït a la p53 un paper rellevant com a factor pronòstic en el carcinoma colorectal. S'ha arribat a suggerir que la mutació de *TP53* en càncers d'estadi II i III és, per ella mateixa, el factor de risc més important associat a una menor supervivència; la presència de mutació incrementaria el risc de mortalitat en 2,82 i 2,39 cops, en pacients en estadi II i III respectivament (Pricolo *et al*, 1997).

Donat que el gen *TP53* i la seva proteïna constitueixen l'eix principal d'aquest treball, els detalls de la seva estructura i funció, així com les alteracions i repercussió de les mateixes en la neoplàsia colorectal, seran tractades més a fons a l'*Apartat 3* d'aquest capítol.

2.2. Model de progressió de la síndrome HNPCC (síndrome de Lynch)

Més recentment, i a banda del model de progressió de la FAP, s'ha proposat un nou mecanisme de progressió pel càncer colorectal, caracteritzat per una alteració dels mecanismes de reparació dels errors de replicació del DNA, que dóna lloc a la inestabilitat genètica progressiva. En aquest model s'inclouen les síndromes hereditàries de carcinoma colorectal no associat a poliposi (Lynch *et al*, 1993), i gairebé la resta –aproximadament un 15%– dels carcinomes colorectals esporàdics (Ionov *et al*, 1993; Thibodeau *et al*, 1993).

2.2.1. Inestabilitat genètica

La inestabilitat genètica, descrita en la majoria de les neoplàsies humanes, reflecteix la susceptibilitat i tendència de les cèl·lules a adquirir múltiples alteracions. Aquest mecanisme ha estat postulat com a base de l'heterogeneïtat tumoral i de la natura multifàsica de la carcinogènesi (Nowell, 1976). S'han descrit diversos tipus d'inestabilitat: 1) les grans aberracions cromosòmiques, que inclouen l'aneuploidia, les translocacions i les delecions (Lengauer *et al*, 1997); 2) el desequilibri al·lèlic,

representat per amplificacions i delecions gèniques (Peinado *et al*, 1992; Arribas *et al*, 1997); i 3) la inestabilitat en seqüències microsatèl·lits, que posa de manifest l'existència d'errors en la replicació del DNA (Ionov *et al*, 1993; Loeb, 1994).

- *Les aberracions cromosòmiques*

La major part dels càncers humans manifesta una forma d'inestabilitat que implica la pèrdua o guany de cromosomes complets (Mitelman, 1994). De vegades aquest fenomen de desequilibri cromosòmic comporta, a més, pèrdua d'heterozigositat, doncs la pèrdua d'un dels al·lels parentals s'acompanya del guany de l'al·lel concomitant (Lengauer *et al*, 1997). En aquest cas, malgrat les cèl·lules tumorals que experimenten l'aberració poden ser cariotípicament normals –la seva dotació cromosòmica, quant a nombre, és invariable–, el seu “al·lelotip” resulta anòmal (Vogelstein *et al*, 1989). Actualment, la hipòtesi que millor explica la causa d'aquesta forma d'inestabilitat genètica és l'aneuploïdia (Duesberg *et al*, 1998): degut que la segregació cromosòmica solament pot ser simètrica si la cèl·lula posseeix exactament dues còpies dels gens mitòtics, les cèl·lules aneuploides desestabilitzarien el cariotip de les seves descendents en la propagació clonal. Partint de la definició del factor de ploïdia (FP) com el quocient entre la dotació cromosòmica real i l'esperada en una determinada espècie, aquests autors observen que com més elevat és el FP d'una cèl·lula tumoral, major és la taxa de canvi en el cariotip de la mateixa. En síntesi, sembla que la inestabilitat genètica és una conseqüència inherent a l'aneuploïdia, la qual cosa permet explicar la natura heterogènia de les cèl·lules clonals resultant de la progressió tumoral.

A banda de l'aneuploïdia, la majoria dels tumors sòlids –inclòs l'adenocarcinoma colorectal– presenten translocacions cromosòmiques que, a diferència de les observades en altres tumors que comparteixen un subtipus histològic, són inespecífiques i s'originen a l'atzar (Mitelman, 1994; Johansson *et al*, 1996). Paral·lelament als processos de recombinació que precedeixen les translocacions, solen deleccionar-se grans fragments dels braços cromosòmics que, a nivell molecular, es manifesten com a pèrdues d'heterozigositat. Fins al moment, les bases moleculars de la translocació en les neoplàsies són desconegudes. Amb tot, una possible explicació és que la translocació es produeix en les cèl·lules que assoleixen la mitosi abans de reparar els trencaments de la

doble cadena de DNA que succeeixen durant el procés de recombinació (Elledge, 1996; Paulovich *et al*, 1997). En aquest cas, bons candidats a mediadors de la “inestabilitat per translocació” serien els gens involucrats en el procés de reparació dels esmentats trencaments i/o de la detecció de danys en el DNA (entre ells *BRCA1*, *BRCA2* i *TP53*).

- *El desequilibri al·lèlic*

Deixant de banda el guany i la pèrdua de cromosomes complets ja esmentats, els tumors poden presentar altres tipus de guanys i/o pèrdues que afecten regions cromosòmiques específiques: les també dites, amplificacions i delecions. Les últimes solen afectar gens supressors inhibidors del creixement cel·lular (Murphree i Benedict, 1984; Knudson, 1985). En el càncer colorectal, els loci preferentment deleccionats se situen a 17p i 18q (75%), i a 5q (35%) (Kern *et al*, 1989), tal i com hem explicat a l'*Apartat 2.1.2* d'aquest mateix capítol. Concretament, en un treball sobre l'abast de les pèrdues al·lèliques que afecten la totalitat del genoma de tumors colorectals, s'arribà a la conclusió que el 20% dels braços cromosòmics patia algun tipus de delecio (Vogelstein *et al*, 1989).

Pel que fa a les amplificacions, succeeixen en estadis avançats de diferents càncers, i solen involucrar gens relacionats amb el metabolisme de certes drogues. D'aquesta manera, alguns tumors adquiririen resistència a determinats agents quimioteràpics (Lengauer *et al*, 1998). Tot i ser desconegut, el procés que duu a l'amplificació gènica sembla relacionat amb la inactivació de *TP53*, doncs és més freqüent en aquells tumors que la presenten (Livingston *et al*, 1992; Yin *et al*, 1992). L'explicació d'això és que, malgrat la taxa d'amplificació de les cèl·lules normals és presumiblement igual a la de les tumorals, aquelles en les que manca una p53 funcional són incapaces d'endegar el procés apoptòtic (Oren, 1994).

Anys enrere, basades en la PCR, alguns autors desenvoluparen tècniques com la identificació de l'empremta genètica (de l'anglosaxó *DNA fingerprinting*) que permeten d'obtenir una mesura relativa del dany genètic o GDF (Genetic Damage Fragment) causat per amplificacions i delecions (Smit *et al*, 1988; Wainscoat i Fey, 1990). Recentment, però, l'aplicació millorada d'aquestes tècniques al càncer colorectal ha

permès atorgar al GDF un paper important com a factor pronòstic independent de l'estadiatge (Arribas *et al*, 1997).

- *La inestabilitat de microsatèl·lits*

Els microsatèl·lits són petits arranjaments de nucleòtids disposats en tàndem, unitats de repetició que solen contenir entre un i cinc parells de bases, distribuïdes al llarg de tot el genoma. Són sovint polimòrfics, havent-hi diverses formes al·lèliques per a un mateix locus en funció del nombre d'unitats repetitives que els constitueixen. Així, un individu –que posseeix dos al·lèls per cèl·lula, pertanyent cadascun a un dels seus progenitors–, té més probabilitat de ser heterozigot per a un determinat locus com major és el nombre de polimorfismes que aquest pot presentar.

Característicament, la taxa basal de mutació dels microsatèl·lits polimòrfics és superior a la de la mitjana de seqüències de DNA. Si bé l'aparició de noves mutacions en teixits normals és rara, l'estabilitat genòmica es perd a nivell dels individus que hereten mutacions dels gens de reparació d'errors en l'aparellament de nucleòtids o *MMR* (Marra i Boland, 1995). De fet, s'han identificat individus de famílies amb la síndrome HNPCC els tumors dels quals presenten alteracions de la longitud de microsatèl·lits, dient-se d'ells que posseeixen un fenotip RER+. L'esmentat fenotip es desenvolupa com a conseqüència de la pèrdua de funcionalitat de l'al·lel romanent, essent aquest esdeveniment el primer del procés de la carcinogènesi colorectal (Ionov *et al*, 1993; Shibata *et al*, 1994). La inestabilitat és, doncs, conseqüència de la inactivació de les dues còpies d'algun dels gens *MMR*, i s'adquireix per la manca d'esmena dels petits errors que la DNA polimerasa comet en llur procés de síntesi del DNA de les seqüències repetitives, fenomen conegut amb el nom de lliscament (del terme anglosaxó *slippage*) (Schlötterer i Tautz, 1992).

Des del punt de vista histològic, les biòpsies de còlon de dos pacients amb un tumor HNPCC i un altre esporàdic, respectivament, són indistingibles. Fora necessari seqüenciar els gens *MMR* de cadascun d'ells per a cercar-hi mutacions, i trobar-les en el primer tumor, per a poder suggerir-ne l'origen heredofamiliar. Donat que la major part dels pacients amb tumors que posseeixen mutacions en algun d'aquests gens presenten

fenotip RER+, l'absència d'aquest fenotip pot utilitzar-se com a indicadora de neoplàsia esporàdica. Recentment, alguns autors han apuntat que els tumors esporàdics d'etiologia HNPCC, tenen un comportament menys agressiu vers als que segueixen la via de progressió de la FAP (Jernvall *et al*, 1999; McLeod i Murray, 1999; Gryfe *et al*, 2000). El fenomen podria explicar-se pel fet que aquests tumors solen tenir una menor incidència de mutació de *TP53* (Offit, 2000).

2.2.2. Gens del fenotip mutador

La coincidència que llevats i bacteris amb mutacions als gens *MMR* també acumulessin alteracions genètiques similars a les observades en la carcinogènesi colorectal, conduí a l'estudi mutacional exhaustiu dels gens homòlegs humans anomenats *hMSH2*, *hMLH1*, *hPML1* i *hPML2*. Els productes d'aquests gens són factors que reconeixen i col·laboren en l'escissió dels nucleòtids incorporats erròniament durant el procés de síntesi del DNA per les polimerases específiques. En absència dels mateixos, la mala incorporació d'un nucleòtid en una determinada posició de la seqüència comporta una deficiència de l'aparellament de bases que provoca mutació en la següent ronda d'amplificació.

En general, es considera que el 50% de les famílies amb síndrome HNPCC presenten mutacions en línia germinal al gen *hMSH2*, el 30% al *hMLH1*, i el 10% repartit entre els gens *hPML1* i *hPML2*, mentre que el 10% restant no s'explica per mutacions als gens *MMR* (Howe i Guillem, 1997).

- *El gen hMSH2*

Aquest gen, homòleg del *MSH2* de llevats i del *MutS* de bacteris, es localitza al cromosoma 2, concretament a la regió 2p22.2 (Fishel *et al*, 1993). En algunes famílies amb la síndrome de Lynch, els pacients afectats presenten mutacions puntuals en la línia germinal d'aquest gen, la qual cosa suggereix que el *hMSH2* és responsable de la síndrome HNPCC (Leach *et al*, 1993a). En aquests casos, però, la mutació en línia germinal per ella mateixa no és capaç de produir el fenotip RER+, i cal una segona alteració –bé sigui per mutació somàtica o pèrdua al·lèlica completa– que produeixi la inactivació de l'al·lel concomitant (Howe i Guillem, 1997). Un cop inactivat el segon

al·lel, la cèl·lula esdevé susceptible a d'altres mutacions involucrades en la carcinogènesi colorectal (Fishel *et al*, 1993; Knudson *et al*, 1975). Curiosament, però, aquests tumors solen presentar una molt menor incidència de mutació en els gens *APC*, *c-K-RAS* i *TP53* que la dels tumors que segueixen la via de progressió de la FAP (Konishi *et al*, 1996; Losi *et al*, 1997). En la neoplàsia colorectal esporàdica solament es detecten mutacions somàtiques de *hMSH2* en els tumors amb fenotip RER+, mentre que en els tumors RER- sembla no haver-n'hi (Smith, 1994).

- *El gen hMLH1*

Juntament amb el *hMSH2*, presenta la major part de les mutacions responsables del carcinoma colorectal en famílies HNPCC. Localitzat a la regió 3p21 (Lindblom *et al*, 1993), té homologia amb el gen *MutL* dels llevats (Papadopoulus *et al*, 1994), i en estudis de lligament s'ha demostrat que la seva mutació cosegrega amb la malaltia de forma independent (Bronner *et al*, 1994). Com succeeix amb el *hMSH2*, tampoc la mutació en un sol al·lel no és suficient per produir el fenotip RER+ (Parsons *et al*, 1993), justificant això el qualificatiu de supressor que rep aquest gen (Hemminki *et al*, 1994). Alguns tumors esporàdics RER+ presenten també mutacions del *hMLH1*, acompanyades sempre de la pèrdua de l'al·lel concomitant (Konishi *et al*, 1996).

- *Els gens hPMS1 i hPMS2*

Com el propi *hMLH1*, també els gens *hPMS1* i *hPMS2* –mapats respectivament a les regions 2q31-33 i 7p22– són homòlegs del supressor procariota *MutL*, permetent la seva caracterització equiparar llurs productes a les proteïnes yPMS1 i yPMS2 dels llevats (Nicolaidis *et al*, 1994). Hores d'ara ningú dubta del paper clau que aquestes proteïnes juguen en el procés de reparació de l'aparellament de nucleòtids (Howe i Guillem, 1997). Malgrat tot, aproximadament el 70% de les famílies de HNPCC són portadores d'alteracions als gens *hMHS2* i *hMHL1* (Liu *et al*, 1996) y, per tant, no més del 30% restant pot atribuir-se mutacions en altres gens de reparació; de fet, però, solament s'han descrit alteracions en línia germinal dels gens *hPMS1* i *hPMS2* en el 10% de famílies de HNPCC. Aquests casos segueixen el model de tumorigènesi de Knudson (Nicolaidis *et al*, 1994), donant lloc a proteïnes truncades en absència de proteïna normal.

- *El gen hMSH6*

El darrer membre descrit de la família *MMR*, també se situa al cromosoma 2, a 1 Mb de distància del *hMSH2*. Codifica un producte conegut amb el nom de GTBP (G/T Binding Protein), crucial per a mantenir la integritat genòmica (Papadopoulus *et al*, 1995). S'ha descrit que el GTBP pot formar heterodímers de 160 kDa amb el producte de *hMSH2* i que, sense ell, la cèl·lula no és capaç d'efectuar el correcte aparellament de les bases durant el procés de replicació (Palombo *et al*, 1995).

3. EL GEN SUPRESSOR *TP53* I LA SEVA PROTEÏNA

El gen *TP53* codifica una fosfoproteïna nuclear de 53 kDa, que rep el mateix nom: p53. Aquesta proteïna és capaç de formar homodímers que, alhora, donen lloc a tetràmers que lliguen seqüències específiques de DNA de cadena doble. La seva funció està relacionada amb la inhibició de la progressió del cicle cel·lular en fase G₁ i amb el fenomen de mort cel·lular programada, conegut com apoptosi (Lane, 1992). Les mutacions puntuals en el gen *TP53* poden donar lloc a proteïnes alterades que, unides a la proteïna normal codificada per l'al·lel no mutant, la inactiven (Hollstein *et al*, 1991; Vogelstein i Kinzler, 1992). Aquest efecte, anomenat efecte dominant negatiu, confereix a la clona cel·lular derivada un avantatge proliferatiu. D'altres vegades la p53 actua com a veritable supressor, doncs la mutació s'acompanya de la pèrdua de l'al·lel concomitant i, en aquest cas, el tumor progressa per la manca de funció supressora del creixement cel·lular.

3.1. Característiques estructurals

3.1.1. El gen *TP53*

El gen *TP53* humà, localitzat a la regió 17p13.1 del braç curt del cromosoma 17, compren una porció de DNA de 16-20 kb (McBride *et al*, 1986; Miller *et al*, 1986; Isobe *et al*, 1986). Està format per 11 exons, el primer dels quals –no codificant– es troba a unes 8-10 kb dels exons 2-11 (Figura 6). El mRNA que es transcriu de *TP53* té

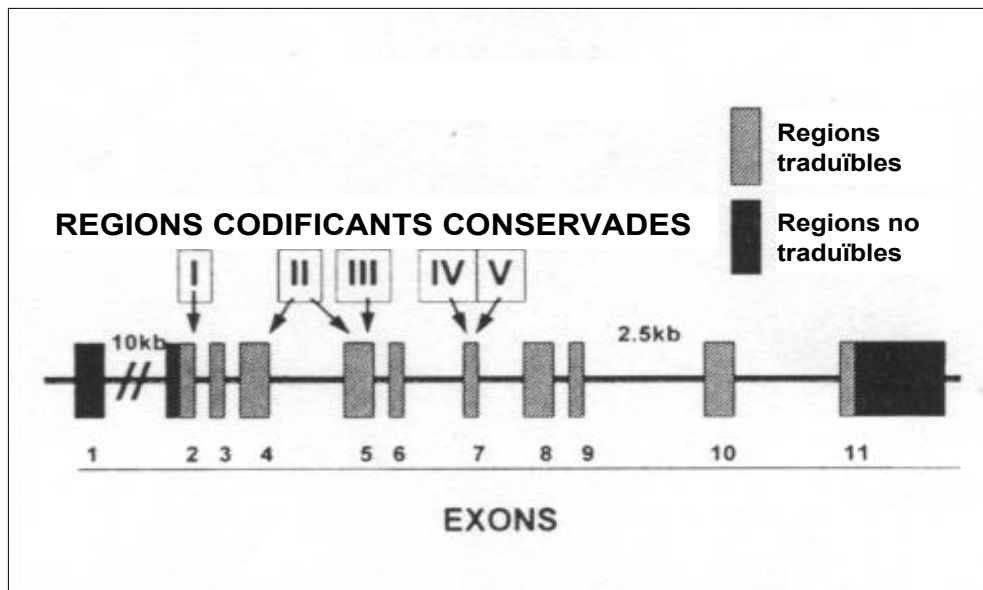


Figura 6. Esquema il·lustratiu de l'estructura del gen *TP53*. Els rectangles numerats a sota (en aràbics) corresponen als exons, diferenciant-se alhora aquells codificants dels que no ho són. També hi ha representades les 5 regions més conservades des del punt de vista evolutiu (dominis I-V) (segons Robbins, 1996).

aproximadament 2,5 kb, i comprèn una seqüència que codifica el polipèptid de 393 aminoàcids producte del gen (Harlow *et al*, 1985; Zakut-Houri *et al*, 1985). En estudis recents s'ha demostrat que la regió corresponent a l'exó 1 és capaç de formar una estructura tipus *stem-loop* suficientment estable que lliga la proteïna p53 nadiua però no la mutant; així, aquesta unió inhibeix específicament la traducció del mRNA de p53, produint-se el control dels nivells cel·lulars de proteïna funcionant (Mosner *et al*, 1995).

3.1.2. La proteïna p53

Com a proteïna, la p53 té determinades les estructures primària, secundària i terciària.

- *Estructura primària: tres regions*

El producte del gen *TP53* és una fosfoproteïna nuclear que, com ja s'ha esmentat, està constituïda per 393 aminoàcids i té un pes molecular aproximat de 53 kDa. En comú

amb les homòlogues d'altres espècies, la p53 té tres regions: 1) la regió N-terminal, amb molts residus àcids en absència de residus bàsics, i gran profusió de prolines –incloent-hi parells Pro-Pro–, que conté el domini d'activació transcripcional que permet la p53 induir la transcripció de nous mRNAs activant, així, l'expressió de determinats gens (Fields i Jang, 1990; Raycroft *et al.*, 1990); 2) la regió central, que conté tres zones altament hidrofíliques i molt pocs residus carregats, i inclou el domini d'unió a seqüències específiques de DNA (Wang *et al.*, 1993); i 3) la regió C-terminal, molt hidrofílica i amb forta presència de residus bàsics, que té propietats claus per a la regulació –doncs conté els dominis de localització nuclear, de tetramerització i d'unió a seqüències de DNA inespecífiques pel reconeixement del dany primari (Soussi i May, 1996)– i pot estar sotmesa a un gran nombre de modificacions posttranscripcionals, el significat fisiològic de les quals roman encara desconegut (Prives i Hall, 1999).

- *Estructura secundària: cinc blocs*

Els models obtinguts mitjançant cristal·lografia de raigs X han permès clarificar l'estat tridimensional de la proteïna p53. Gràcies a l'esmentada tècnica coneixem l'estructura del nucli (Cho *et al.*, 1994), producte del plegament de la regió central (residus 102 a 292), que dóna lloc a un domini amb capacitat de lligar seqüències de DNA de forma específica (El-Deiry *et al.*, 1992; Bourdon *et al.*, 1997). Formant el complex DNA-proteïna, el nucli conté els següents motius estructurals: 1) una superposició de dos fulls antiparal·lels, format per 4 i 5 cadenes, respectivament; 2) un motiu llaç-full-hèlix (LSH), format per 3 cadenes, una hèlix i el llaç L1; 3) el llaç L2, que conté una petita hèlix; i 4) el llaç L3, constituït per diversos girs. Els motius estructurals LSH i L3 estan directament involucrats en la interacció amb el DNA –solcs major i menor, respectivament–, mentre que l'L2 col·labora amb l'L3 a estabilitzar l'estructura (Soussi i May, 1996). És important destacar que els residus proteïcs més freqüentment alterats per mutació a p53 tenen una col·locació estratègica dins d'aquests motius (Figura 7). Cal notar que els quatre motius estructurals presents a la regió central han estat evolutivament molt conservats, corresponent als blocs II-V (residus 117-142, 171-181, 234-258 i 270-286) descrits també en proteïnes homòlogues de la p53 humana d'altres espècies. Restaria citar un cinquè bloc –l'I–, igualment conservat, i situat en la regió N-terminal (residus 13-19). Un esquema de la proteïna podeu trobar-lo a la Figura 8.

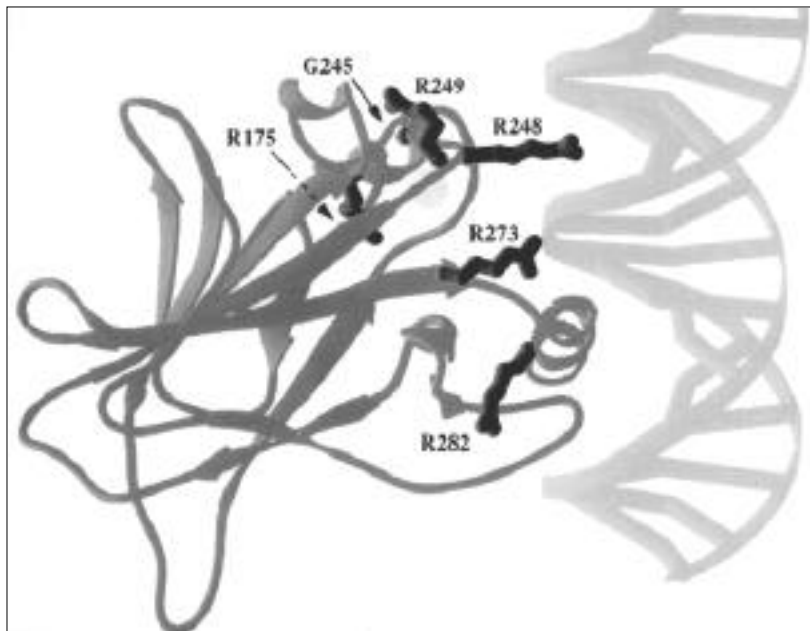


Figura 7. Representació en cinta del domini nuclear de p53, on s'aprecia que els residus més freqüentment afectats per mutacions són els involucrats, directament o indirecta, en la unió de la proteïna al DNA (Cho *et al*, 1994).

- *Estructura terciària: un tetràmer*

Tot i que la p53, com a monòmer, és capaç de dur a terme llurs funcions d'activació de la transcripció i de supressió del creixement cel·lular (Arrowsmith i Morin, 1996), la proteïna nadiua es troba majoritàriament en forma tetramèrica (Wang *et al*, 1994). Aquest oligòmer és producte de la interacció dels dominis de tetramerització de la regió C-terminal de quatre monòmers independents, dominis constituïts essencialment pels residus 325-356. La formació d'un tetràmer respón, en realitat, a la unió de dos dímers; així es desprèn del fet que la diana consens de reconeixement de la p53 –present en els gens induïbles per la mateixa– tingui dues parelles de repeticions. Format l'oligòmer és tan estable que difícilment pot desfer-se, fins el punt que solament els mutants que tenen afectada la regió de tetramerització amb dobles o triples mutacions veuen abolida llur activitat proteica (Waterman *et al*, 1995). La interacció proteïna-DNA succeeix òptimament quan la proteïna es troba oligomeritzada (Jeffrey *et al*, 1995). Resulta curiós, doncs, que la incidència de mutacions en aquest domini sigui, com és, tan baixa. L'explicació del fenomen pot ser, d'una banda, que la integritat del domini de tetramerització se seleccionés a favor durant el procés de la gènesi tumoral i/o, d'una altra,

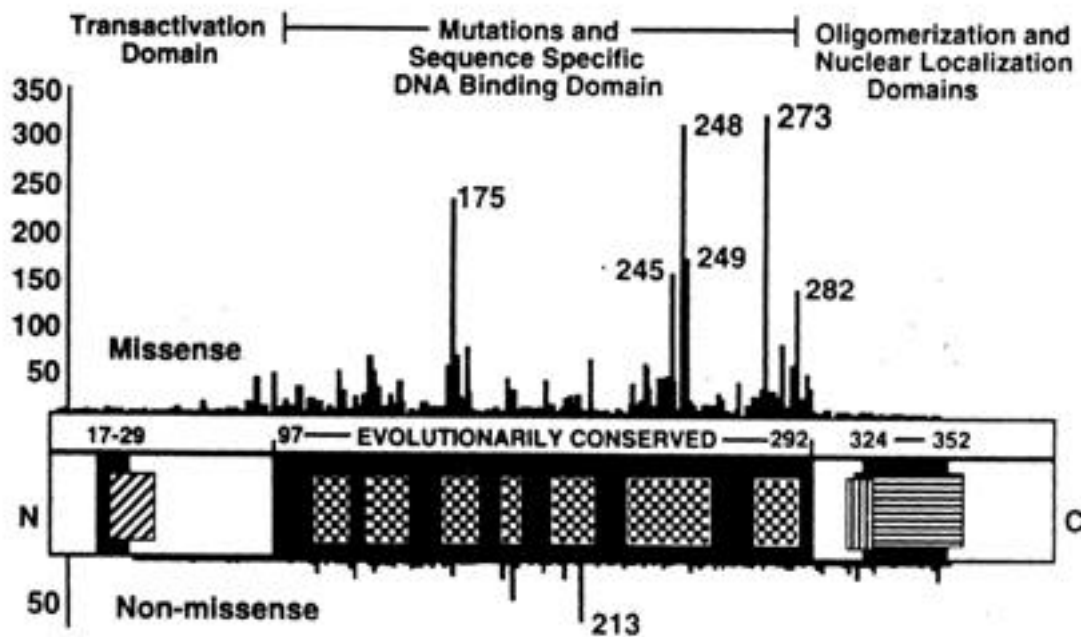


Figura 8. Representació esquemàtica de la molècula de p53, formada per 393 aminoàcids. Els dominis funcionals proteics inclouen la regió de transactivació (aa 20-42, a ratlles diagonals), la d'unió específica a seqüències de DNA (aa 100-293, a quadres), la seqüència de localització nuclear (aa 316-325, a ratlles verticals) i la regió d'oligomerització (aa 319-360, a ratlles horitzontals). Les barres verticals representen els principals punts calents de mutació: les superiors, de sentit erroni, y les inferiors, de la resta de tipus (sense sentit, d'alteració de la pauta de lectura, d'alteració de l'escissió intrònica i silents) (Harris, 1996).

que l'estructura de l'esmentada regió sigui insensible a la mutació simple (Arrowsmith i Morin, 1996).

3.2. Característiques funcionals

La funció que desenvolupa la p53, en condicions normals, és la de regular la proliferació cel·lular. La proteïna nadiua, en la seva forma tetramèrica, és capaç d'unir-se a seqüències específiques de DNA, estimulant així l'expressió de gens distals del cicle cel·lular que inhibeixen el creixement (Stenger *et al*, 1992; Vogelstein i Kinzler, 1992). Ara bé, en presència de dany cel·lular, la p53 exerceix el control del cicle: les cèl·lules augmenten la seva expressió, i l'acumulació de la proteïna provoca l'aturada del mateix en un intent de guanyar el temps necessari per a reparar les lesions. Com a

recurs si fracassa la reparació, la p53 pot conduir la cèl·lula danyada cap a l'apoptosi (Lane, 1992; Vogelstein i Kinzler, 1992). La finalitat d'això és mantenir la integritat del genoma (Zambetti *et al*, 1992).

3.2.1. Activitat biològica en situació normal

La proteïna p53 nadiua, sota condicions normals –entenent per normalitat l'absència de dany genòmic–, juga un paper minoritari en el control del cicle cel·lular, mentre que en situació d'estrès resulta ésser un factor clau de la regulació del creixement cel·lular (Kastan *et al*, 1992; Lane, 1992). Així, en absència de dany cel·lular, la seva activitat principal és la transactivació de la transcripció de diversos gens, als quals s'uneix mitjançant el reconeixement de seqüències específiques de DNA. La llista dels gens induïbles per la p53 creix dia a dia, estimant-se avui en varis centenars el nombre d'ells que conté les esmentades seqüències d'unió. Entre els noms que la integren cal destacar, per ser els més estudiats i coneguts, el *WAF1*, el *MDM2* i el *GADD45*, gens que tractarem tot seguit per separat.

No obstant, a més d'exercir aquesta funció inductora de la transcripció, també hi ha una faceta de la p53 repressora, regulant en aquest cas gens cel·lulars i virals. Així, s'ha descrit que la mateixa proteïna pot inhibir l'expressió del PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Mercer *et al*, 1991), i les dels gens *c-fos*, *MDR-1* i *HSV-1*, entre d'altres (Ginsberg *et al*, 1991; Subler *et al*, 1992). Un resum dels processos en els quals la proteïna p53 està directament involucrada, podeu trobar-lo a la Figura 9.

- *WAF1/p21*

Localitzat al cromosoma 6p, *WAF1* és un dels gens sota el control transcripcional de la p53 (El-Deiry *et al*, 1993). El seu producte de 21 kDa, –conegut com a p21– és un dels membres de la família d'inhibidors de les cinases ciclina-dependents o CKIs. Aquesta proteïna pot complexar-se amb una cinasa ciclina-dependent (cdk2), inhibint així la fosforilació de la proteïna del gen retinoblastoma (Rb) i blocant, en conseqüència, la progressió del cicle cel·lular de la fase G₁ a la fase S (Harper *et al*, 1993).

El *MDM2*, sota control transcripcional de la p53, codifica una proteïna en dit de zinc de 90 kDa –també anomenada *mdm2*–, que posseeix un lloc d'unió per a la p53 nadiua (Oliner *et al*, 1992). En interaccionar ambdues proteïnes, el complex format esdevé un regulador negatiu que inhibeix la capacitat d'unió de la p53 a seqüències de DNA específiques (Oliner *et al*, 1992; Momand *et al*, 1992). En presència de nivells cel·lulars elevats de *mdm2*, aquesta proteïna mimetitzava l'efecte de les oncoproteïnes virals, ja que és capaç de blocar el procés apoptòtic dependent de la p53, lligant-se a la mateixa (Chen *et al*, 1994). Així doncs, el mecanisme de retroalimentació que *mdm2* exerceix sobre la p53 representa un potent sistema de regulació de la seva funció (Barak *et al*, 1993; Wu *et al*, 1993a). En aquest sentit es diu que el *MDM2* funciona més com a oncogen que com a gen supressor de tumors (Finlay, 1993).

- *GADD45*

El *GADD45* (Growth Arrest and DNA Damage 45) fou inicialment descrit com a gen capaç de ser induït ràpidament per l'acció de la radiació ionitzant sobre limfoblasts i fibroblasts (Papathanasiou *et al*, 1991; Kastan *et al*, 1992). La seva proteïna –la *gadd45*– pot exercir diverses activitats, com interaccionar directament amb el factor de replicació PCNA –essencial per a la DNA polimerasa–, blocar la replicació del DNA, i coordinar l'activació de la reparació del DNA danyat en l'escissió de nucleòtids (Cox i Lane, 1995). Recentment ha estat suggerit però que el *GADD45*, a diferència dels dos gens abans esmentats, requeriria quelcom més que l'acumulació de p53 per a ser transactivat. De fet, podria respondre a algun tipus de senyal generada com a conseqüència del dany genòmic, quedant la fosforilació convencional en un segon terme (Xiao *et al*, 2000).

3.2.2. Activitat biològica en resposta al dany cel·lular

Les activitats més característiques de la proteïna p53 són, sens dubte, les que la relacionen amb el control del cicle cel·lular i la inducció del procés apoptòtic. Com a paradoxa, però, són funcions que s'exerceixen solament en ocasions excepcionals, en veure's la cèl·lula sotmesa a un procés d'estrès. És aleshores que, amb l'aparició del dany genètic, la p53 actua provocant l'aturada del cicle cel·lular en fase G₁, permetent la

posta en marxa dels mecanismes de reparació cel·lular (Kastan *et al*, 1991). Per aconseguir-ho ha d'induir un cop més l'expressió de gens, com ara *GADD45*, *WAF1* o *MDM2* (Kern *et al*, 1992).

També ha estat descrit que la p53 és capaç d'induir la reparació de dany al DNA o l'apoptosi en resposta a grans lesions en el DNA generades per agents genotòxics, tals com la llum ultraviolada o la radiació gamma (Zhan *et al*, 1994).

3.3. Regulació

A l'hora d'abordar el control de la funció de la p53, creiem convenient tractar per separat els mecanismes que permeten el desenvolupament de l'activitat de la proteïna nadiua en situació normal, d'aquells que ocorren durant el procés tumorigènic. Així com els primers sotmeten la proteïna nadiua a alteracions reversibles, els mecanismes que condueixen a la inactivació de la funció en els tumors són fruit de processos que difícilment tornaran enrera. Parlarem doncs, per una banda, del model conformacional de regulació al·lostèrica (Milner, 1991), i per una altra dels mecanismes d'inactivació funcional de la p53.

3.3.1. Model d'equilibri conformacional

Treballs previs demostrant l'existència de dues formes diferents de proteïna p53 nadiua amb reactivitat mútua excloent a dos anticossos monoclonals (Milner i McCormick, 1980), portaren Milner a postular el seu model de regulació conformacional per a l'activitat de la p53. Segons aquest autor, la proteïna nadiua podria adquirir almenys dues conformacions alternatives: una supressora, que inhibiria la divisió cel·lular (PAb240–/PAb1620+), i una altra promotora, que inactivaria llur capacitat anti-proliferativa, permetent el creixement cel·lular (PAb240+/PAb1620–). Seria l'equilibri entre les dues formes el responsable de la regulació de la funció de la p53 durant el cicle cel·lular.

Ha estat descrit que, en una gran part dels càncers humans que posseeixen la p53 mutada, aquesta presenta reactivitat del tipus PAb240+/PAb1620- (Gannon *et al*, 1990). Això ha portat a denominar amb el qualificatiu de “mutada” la conformació de la proteïna responsable de la proliferació cel·lular. No obstant, la coincidència d’antigeneïtats no pot atribuir-se a una identitat de conformació entre els propis mutants i una forma de p53 nadiua; difícilment es produiria una única conformació alternativa estable, amb un espectre tan ampli de residus mutants (Arrowsmith i Morin, 1996). L’explicació d’aquest fenomen es resol amb els models cristal·logràfics de la p53, en el sentit que les conformacions promotora i “mutada” corresponen a proteïnes desplegadas totalment o parcial (Cho *et al*, 1994) (Figura 10). Aquesta hipòtesi es basa en el fet que l’anticòs PAb240 fou generat originalment a partir d’una p53 desnaturalitzada (Gannon *et al*, 1990), mentre que l’epítot del PAb1620 no és lineal, i té l’estructura de la p53 nadiua (Milner *et al*, 1987). Cal afegir que en condicions fisiològiques restrictives del creixement, l’equilibri es decantaria cap a una majoria de molècules plegades o en conformació supressora, podent-se invertir la proporció entre les formes per l’efecte de la temperatura, l’exposició a factors de creixement i/o per alteracions de la seqüència proteica de la p53 (Oren 1992; Arrowsmith i Morin, 1996).

3.3.2. Mecanismes d’activació “al·lostèrica”

Des del punt de vista de l’activitat, sembla que la p53 nadiua no sempre posseeix la capacitat d’unir-se a seqüències específiques de DNA. Hi ha estudis en els quals es demostra que, *in vivo*, existeixen dues conformacions de la proteïna lliure –amb i sense activitat– anomenades activa i latent, respectivament (Ullrich *et al*, 1992; Hupp i Lane, 1994). Ambdues tenen diferent antigeneïtat, reaccionant amb anticossos específics contra les regions N- i C- terminals (Halazonetis *et al*, 1993; Hupp i Lane, 1994).

La forma latent manté la seva estructura gràcies a la fracció de residus bàsics de la regió C-terminal, doncs les alteracions d’aquest domini (p.e. delecions, fosforilació o unió d’anticossos) permeten l’activació constitutiva de la unió al DNA (Hupp *et al*, 1992; Halazonetis i Kandil, 1993). La transició entre ambdues formes estaria modulada per fosforilació de la regió C-terminal (Hupp i Lane, 1994; Wang i Prives, 1995), per escissió intrònica alternativa de l’extrem C-terminal (Han i Kulesz-Martin, 1992; Milner

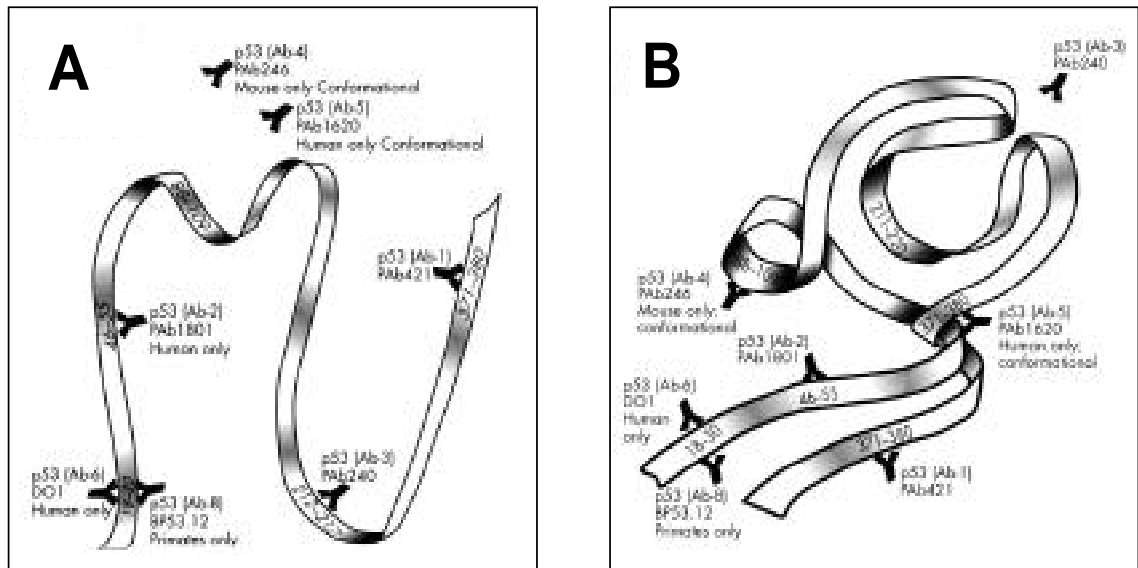


Figura 10. Representació de les dues formes de proteïna p53 segons el model d'equilibri conformacional de Milner. A) Conformació promotora o “mutant”, en què la proteïna es troba desnaturalitzada, té activitat proliferativa i reactivitat del tipus PAb240+/PAb1620-; B) Conformació supressora o nadiua, inhibidora de la divisió cel·lular i amb reactivitat PAb240-/PAb1620+.

et al, 1993; Wolkowicz *et al*, 1995), i/o com a resposta al dany genètic (Jayaraman i Prives, 1995), essent aquest el mecanisme de regulació de l'activitat *in vivo*. Al procés necessari per a l'activació de la p53 nadiua se l'anomena mecanisme “al·lostèric” (Halazonetis i Kandil, 1993; Hupp i Lane, 1994), tot i no ser-ho en realitat segons el concepte original de Monod, que requereix l'existència d'un lligand que indueixi un canvi conformacional reversible, a distància del lloc d'unió (Monod *et al*, 1963). De moment, aquest efector no ha estat descrit per a la p53.

3.3.3. Mecanismes d'inactivació durant el procés tumorigènic

Deixant de banda el control normal de la funció de la p53 nadiua, durant el procés tumorigènic poden desenvolupar-se mecanismes alternatius, la finalitat dels quals és la d'inhibir irreversiblement aquella. Entre ells, cal fer esment de: la mutació, la unió a productes oncogènics virals o a d'altres reguladors cel·lulars, i l'alteració de la localització subcel·lular.

- *Mutació*

La mutació és el principal mecanisme d'inactivació de la funció de p53, havent-se'n trobat en la majoria de càncers humans (Hollstein *et al*, 1991; Caron de Fromentel i Soussi, 1992). S'estima que de l'ordre del 45-50% dels càncers contenen mutacions de la p53 (Greenblatt *et al*, 1994) i, en el cas concret de l'adenocarcinoma colorectal, el percentatge s'eleva al 50-70% dels casos (Harris, 1996).

De totes les mutacions de p53, les més freqüents són les puntuals, i poden adquirir-se per múltiples causes, participant-hi a més d'agents carcinogènics exògens, processos endògens com ara la deaminació de citosina i 5-metilcitosina, la infidelitat de la DNA polimerasa, la depurinització, i l'oxidació de radicals lliures generats a partir d'altres processos biològics (Greenblatt *et al*, 1994). Independentment del seu origen, les mutacions de p53 solen estar associades a la pèrdua de l'al·lel concomitant del mateix gen. A més, no es troben disseminades a l'atzar, sinó localitzades a la regió central de la proteïna, on se situen quatre dels cinc blocs altament conservats esmentats a l'*Apartat 3.1.2* (blocs II-V). L'anàlisi de l'estructura tridimensional de la regió d'unió al DNA, obtinguda mitjançant cristal·lografia, ha portat a definir dos tipus de mutacions: 1) les de classe I o funcionals, que afecten residus implicats en el contacte directe amb el DNA –dins dels motius L3 i LSH–; i 2) les de classe II o estructurals, provocant l'alteració de residus crucials per a l'estabilitat de l'estructura del domini d'unió –a L2– (Cho *et al*, 1994).

Quant al tipus de mutacions que solen afectar el gen, són les de sentit erroni (“missense”) les més abundants, amb una freqüència del 79% a la regió central *vs.* el 23% que afecta la regió C-terminal, on hi ha un predomini de les mutacions d'altres tipus (“no missense”), entre les que s'inclouen les de manca de sentit (“nonsense”), les d'alteració de la pauta de lectura (“frameshift”), les d'alteració de l'escissió intrònica (“splicing”) i les silents (Greenblatt *et al*, 1994). La baixa incidència de mutacions de sentit erroni a la regió C-terminal podria atribuir-se al fet que aquests tipus de canvis no confereixen cap avantatge proliferatiu a la cèl·lula afectada, doncs probablement no comprometen ni la funció ni la conformació de la p53.

Característicament, alguns codons del gen *TP53* es veuen més afectats que d'altres. Dels sis sobre els quals recau el 23% de les mutacions, n'hi ha cinc que contenen dinucleòtids CpG, i són els codons 175, 245, 248, 273 i 282, però no el 249. Tots 5 semblen compartir el mateix mecanisme de mutació, que és la deaminació espontània de la 5-metilcitosina que porta a la transició G:C a A:T (Ehrlich *et al*, 1990). De fet sembla que el 42% de les mutacions que afecten la p53 són transicions C → T, el 60% de les quals afecta dinucleòtids CpG (Soussi, 1997).

- *Unió a productes oncogènics virals*

Aquest mecanisme passa per la formació de complexos de la pròpia proteïna p53 amb distintes oncoproteïnes virals, com ara són el gran antigen T del SV40 (Lane i Crawford, 1979; Linzer i Levine, 1979), la proteïna E1B de l'adenovirus 5 (Sarnow *et al*, 1992), o el producte del gen E6 dels papil·lomavirus humans de tipus 16 i 18 (Werness *et al*, 1990). En el cas de les dues primeres, la unió amb la p53 provoca un increment de la vida mitja d'aquesta, impedit alhora el desenvolupament de la seva funció normal a causa de l'estabilització dels complexos (Chang *et al*, 1993). La proteïna E6, per la seva part, actuaria facilitant la degradació de la p53 nadiua (Scheffner *et al*, 1990).

- *Unió a reguladors cel·lulars*

De forma similar al que succeeix amb les oncoproteïnes virals, hi ha productes gènics cel·lulars capaços de blocar l'acció de la p53. Així succeeix amb la proteïna mdm2; aquesta, no solament pot revertir les propietats inhibidores del creixement cel·lular de la p53 nadiua, sinó que sobreexpressada pot produir la immortalització i transformació de cultius primaris de fibroblasts d'embrió de rata (Finlay, 1993).

És del tot conegut que, en les cèl·lules normals, el control del creixement es produeix gràcies a la correcta regulació de la taxa producció/degradació de la p53. Ara bé, en situació d'estrès, la modulació de la degradació de la proteïna, conduint a la seva acumulació, esdevé crucial per activar la resposta cel·lular (Ashcroft i Vousden, 1999). L'oncoproteïna mdm2 és responsable d'exportar la p53 al citoplasma, on el complex format per p53-mdm2 és degradat per l'acció del proteosoma mediat per ubiquïtines

(Prives i Hall, 1999). En suport d'aquesta hipòtesi hi ha les observacions que: 1) la degradació de la p53 és blocada per inhibidors del proteosoma (Haupt *et al*, 1997; Kubbutat *et al*, 1997); 2) la proteïna mdm2 pot lligar-se a la ubiquitina E3 (Honda *et al*, 1997); 3) el trencament de la interacció p53-mdm2 *in vivo* provoca l'acumulació de p53 (Bottger *et al*, 1997); i 4) un dels productes del gen *INK4a*, la p19^{ARF}, en interaccionar físicament amb mdm2 impedeix aquest de neutralitzar la p53 (Pomerantz *et al*, 1998).

Ha estat descrit, a més, que molts sarcomes presenten aberracions cromosòmiques a nivell del gen *MDM2*, provocant aquestes llur amplifcació i consegüent sobreexpressió (Oliner *et al*, 1992). Però de fet, qualsevol que presenti deficiències alhora d'estabilitzar la proteïna p53 és procliu al desenvolupament maligne.

3.4. La proteïna p53 mutant

La idea que la p53 actua com a un veritable supressor tumoral se sustenta en l'observació que en la majoria dels càncers, la disfunció de la mateixa s'assoleix per inactivació dels dos al·lells del seu gen (Knudson *et al*, 1975). Com ja hem esmentat anteriorment, el mecanisme més comú és la mutació puntual en un d'ells seguida de la pèrdua total o parcial de l'al·lel concomitant (Chang *et al*, 1993). També sabem, però, que la mateixa proteïna posseeix una certa capacitat transformadora, una propietat que unida a les propietats supressores anteriorment esmentades confereixen la p53 una dualitat de gen supressor i oncogen alhora. L'explicació d'aquesta paradoxa la tenim en el fet que no podem parlar d'una sola p53: cal distingir entre proteïna nadiua i proteïna mutant, ja que ambdues posseeixen activitats biològiques marcadament diferents (Zambetti i Levine, 1993).

3.4.1. Propietats oncogèniques: el model dominant negatiu

El *TP53* fou inicialment descrit com a un oncogen dominant, atenent sobre tot a la constatació de dos fets: 1) d'una part, la sobreexpressió d'aquest gen conduïa a la immortalització de cèl·lules de rosegador en cultiu; i 2) juntament amb formes activades del gen *RAS*, el *TP53* podia transformar fibroblasts de rata embrionaris (Jenkins *et al*, 1984; Parada *et al*, 1984; Rovinski i Benchimol, 1988). Posteriorment, però, es posà de

manifest que la majoria dels clons originats del procés de transformació contenien formes mutants de p53, les propietats de les quals diferien en tot de les de la p53 nadiua (Lane i Benchimol, 1990). Així, en repetir els experiments de transformació ja esmentats utilitzant al·lels de *TP53* normals, s'observà que es produïa la supressió del creixement propiciat per alguns oncogens virals o cel·lulars (Eliyahu *et al*, 1989; Finlay *et al*, 1989; Hinds *et al*, 1989). També es posà de manifest que el *TP53* murí era capaç d'inhibir la transformació de fibroblasts de rata embrionaris induïda per l'oncogen *RAS* i l'adenovirus E1B (Eliyahu *et al*, 1989; Finlay *et al*, 1989). Finalment, alguns autors demostraren que la p53 nadiua *in vitro* era capaç de revertir el fenotip tumoral de línies cel·lulars humanes de còlon (Baker *et al*, 1990b), bufeta (Chen *et al*, 1990), cervell (Mercer *et al*, 1990) i os (Diller *et al*, 1990).

A les observacions esmentades fins ara caldria afegir que la capacitat de transformació dels al·lels mutants de *TP53*, *in vitro*, era independent de la presència de p53 nadiua endògena. Més encara, en els casos en els que és pogué reportar l'estat dels al·lels endògens, aquests resultaren no ésser mutants (Martínez *et al*, 1991). Un fenomen tal solament pot explicar-se per l'existència d'un mecanisme d'acció dominant negatiu de la p53 mutant sobre la nadiua. En aquest sentit, sembla que la proteïna mutant, malgrat mancada de tota activitat bioquímica, té la capacitat d'interferir la funció de la proteïna nadiua coexpressada, privant-la d'efectivitat.

Es postula així que l'acció dominant de la p53 mutant pot ser exercida de diverses formes, una d'elles mitjançant la competència per les dianes específiques, però també per la interacció directe entre formes mutants i nadiues de la proteïna (Michalovitz *et al*, 1991), essent la darrera especialment rellevant. L'observació que, en cèl·lules immortalitzades per transformació, hi ha una forta tendència cap a la formació de complexes mixtes entre molècules de p53 mutants i molècules nadiues endògenes, recolza aquesta hipòtesi (Levine *et al*, 1991). Com també ho suggereix el fet que, en sistemes de traducció *in vitro*, sorgeixen complexes similars en els quals els polipèptids nadius es veuen obligats a adoptar la conformació aberrant dels seus companys mutants (Milner i Medcalf, 1991). Així, suposant que les formes nadiues i mutants es trobessin en concentracions equimolars, la formació de dímers donaria lloc a una activitat de p53

disminuïda en un 75%. Amb més motiu, doncs, les formes tetramèriques quedarien relegades a una activitat residual (Oren, 1992).

Però potser el més interessant d'aquest model sigui la hipòtesi que la presència de mutació en un sol al·lel de *TP53* és suficient per a conferir a la cèl·lula un avantatge de creixement, contribuint per tant directament a la progressió tumoral. El motiu d'això és la notable reducció de l'activitat que sofreix la p53, conseqüència de l'efecte dominant negatiu de les formes mutants sobre les nadiues. Si a més succeeix que una de les cèl·lules provinents del clon seleccionat perd l'al·lel nadiu concomitant, això suposa l'addició d'un altre avantatge que potencia la selecció de les cèl·lules derivades d'aquesta (Oren, 1992).

3.4.2. Activitat biològica de la p53 mutant

Les formes mutants de p53, a diferència de les nadiues, són responsables de la manca de capacitat d'unió al DNA de la pròpia proteïna, de la pèrdua de la funció transactivadora de la transcripció, i de l'alteració de l'inici de replicació del DNA cel·lular (Lane i Benchimol, 1990; Friedman *et al*, 1990; Farmer *et al*, 1992; Hupp *et al*, 1992; Kern *et al*, 1992). Com a conseqüència de la seva presència hi ha una inhibició de l'aturada del cicle cel·lular en fase G₁, que provoca l'acumulació de múltiples mutacions que acceleren el procés de transformació neoplàstica de les cèl·lules afectades (Kastan *et al*, 1991; Kuerbitz *et al*, 1992). Però, a banda del que és estrictament la funció de la p53 mutant, hi ha també una sèrie de característiques que la diferencien de la proteïna nadiua i que són importants, p.e., per al seu reconeixement *in vivo*. A la Taula 4 es reflecteixen les diferents propietats de la p53 mutant en comparació a la nadiua.

3.5. Aproximacions a l'estat de p53 en el càncer

El rol cada cop menys discutible de la p53 com a marcador de pronòstic i d'orientació terapèutica en diferents tipus de tumors, ha impulsat molts laboratoris d'arreu del món a la posta a punt de metodologies per a conèixer el seu estat. Així, en els darrers anys hem assistit al desenvolupament de tècniques enfocades cap a la detecció d'alteracions d'aquest marcador, tant a nivell de proteïna com del seu gen codificant. La gran oferta

Taula 4. Característiques de la p53 nadiua vs. la mutant (Zambetti i Levine, 1993).

<i>Propietats</i>	<i>p53 nadiua</i>	<i>p53 mutant*</i>
freqüència de transformació	31	32-22
supressió del creixement cel·lular	si	no
vida mitja	minuts	hores
unió a l'anticòs PAb240	no	si/no
unió a la proteïna hsc70	no	si/no
unió al gran antigen T del SV40	si	si/no
unió inespecífica al DNA	si	no
unió específica al DNA	si	no
transactivació	si	si/no
supressió de la transcripció	si	no

* Amb denominació de mutants hi ha englobades diferents formes de la proteïna p53 i, per aquest motiu, algunes propietats poden presentar més d'una opció.

d'estratègies en aquest sentit fa difícil l'elecció, doncs a banda que cadascuna té els seus propis avantatges i limitacions, les dades publicades al respecte són francament controvertides, fins el punt de no existir una tècnica consensuada reconeguda universalment com a estàndard d'or. A continuació farem una revisió dels mètodes més freqüentment utilitzats per a conèixer l'estat de la p53.

3.5.1. Estudi de la proteïna p53

Un possible abordatge de l'estat de la p53 és l'estudi de la pròpia proteïna. Hi ha dos tipus de proves dissenyades amb aquest finalitat: 1) les d'immunohistoquímica, que utilitzen anticossos tot aprofitant les propietats antigèniques de la p53 per a diferenciar formes nadiues de mutants; i 2) els assaigs funcionals, que permeten saber fins a quin punt retenen la capacitat de transactivació algunes formes mutants de p53.

- *Immunohistoquímica (IHQ)*

El gruix dels treballs experimentals publicats a propòsit, reporta la utilització de la immunohistoquímica per a detectar la presència de mutacions de p53 sobre teixit. El motiu d'això és que la proteïna nadiua rarament s'acumula a nivell del nucli en quantitats suficients per a permetre llur detecció mitjançant aquesta tècnica. Com ja hem apuntat anteriorment a la Taula 4, la majoria de les proteïnes mutants tenen una vida mitja superior a la nadiua, romanent de 4 a 12 hores en el nucli en comptes dels 5-20 minuts habituals (Soussi, 1997). Aquesta propietat facilita l'acumulació de les formes mutants, motiu pel qual la immunopositivitat nuclear de la p53 es considera un marcador indirecte de mutació (Chang et al, 1993).

Això, no obstant, no impedeix que la correlació entre l'acumulació de la proteïna p53 i la presència de mutacions al seu gen estigui lluny de ser perfecte. Coneixem, almenys, dues causes que explicarien aquesta discrepància. Per una banda, els anticossos utilitzats només permeten la detecció de proteïnes alterades per mutacions de sentit erroni, fracassant del tot davant de proteïnes truncades o delecionades, com les resultants de les mutacions sense sentit i les d'alteració de la pauta de lectura (Jego *et al*, 1993; Cripps *et al*, 1994). Però també ha estat descrita la immunopositivitat en alguns tumors testiculars i en el melanoma, en absència de mutacions de p53 (Greenblatt *et al*, 1994). Sembla que l'estabilització de la proteïna deguda a la complexació amb proteïnes virals o cel·lulars, o bé l'exposició cel·lular al dany genètic causat per diversos agents genotòxics –com ara la llum UV i les drogues que la mimetitzen, o la radiació – podrien ser la font d'aquesta acumulació, amb la consegüent immunopositivitat (Chang *et al*, 1993). Existeixen, doncs, motius suficients per a recomanar la prudència alhora d'interpretar els resultats de la immunohistoquímica aïlladament (Wynford-Thomas, 1992).

Tot i així, també hi ha raons que fan de la mateixa una tècnica atractiva per a l'estudi rutinari de la p53. El desenvolupament de nous anticossos monoclonals, capaços de reaccionar específicament contra la proteïna humana sobre seccions de material parafinat prèviament fixat en formalina n'és una, ja que permet de realitzar estudis retrospectius. Com ho són, sens dubte, la rapidesa i el preu respecte a d'altres tècniques factibles. No s'ha de perdre de vista que, a més, pel fet de ser una tècnica que s'avalua

per microscopia òptica sobre teixit permet la correlació amb la morfologia. Amb tot, però, les limitacions esmentades fan dubtar cada cop més de la utilitat de la immunohistoquímica com a mètode de referència per a la predicció de l'estat de p53.

- *Assaigs funcionals*

Aquest tipus d'assaigs, ben al contrari que la immunohistoquímica, estan envoltats d'una complexitat que els invalida per a l'estudi rutinari de la p53. Lluny d'utilitzar-se com a sistemes de cribratge, els assaigs funcionals serveixen per a determinar l'abast funcional d'una mutació coneguda. Estan basats en la propietat que tenen la majoria de formes mutants de p53 de conservar llur capacitat transactivadora de gens específics. Conèixer la funcionalitat dels mutants representa tenir la possibilitat d'inserir el cDNA complet de la p53 dels mateixos en un vector d'expressió, per a la qual cosa es requereix mRNA provinent de material fresc o congelat. La quimera resultant podrà utilitzar-se per a transformar soques de llevats que continguin gens reportadors induïbles per promotors de gens transactivats per la p53 (p.e. *WAF1* i *MDM2*). Serà el creixement de colònies el que finalment ens indicarà que la proteïna mutada conserva la capacitat transactivadora original (Isioka *et al*, 1993; Flaman *et al*, 1995; Tada *et al*, 1996).

3.5.2. Estudi del gen *TP53*

En els darrers anys, un abordatge alternatiu a l'estudi de la proteïna ha estat l'estudi del seu gen, ja sia per a conèixer-ne l'estat mutacional o bé per a detectar pèrdues al·lèliques (LOH). La contribució que representà la descoberta de la reacció en cadena de la polimerasa o PCR (Mullis i Faloona, 1987) –considerada l'avenç metodològic més important per a la detecció de mutacions, després de la seqüenciació– ha estat, sens dubte, la causa d'aquest canvi estratègic. Basades en la PCR, s'han desenvolupat tècniques suficientment robustes, que han permès també la realització d'estudis retrospectius. Però aquestes tècniques tenen, ara per ara, i respecte a d'altres com la pròpia immunohistoquímica, molta menys implantació en l'àmbit assistencial. A banda de ser igualment sensibles i específiques, requereixen utilitatges especials, personal qualificat amb experiència prolongada, rigorosos sistemes de validació de processos i

control de qualitat sistemàtic, que garanteixin resultats fiables. Tot això inclina la majoria dels laboratoris cap a metodologies menys complexes.

Com a tècniques d'estudi d'alteracions de *TP53*, les que gaudeixen d'una major acceptació són els assaigs de mobilitat, la seqüenciació directa i la detecció de LOH. A continuació, fem un resum de les principals característiques de les mateixes.

- *Assaigs de mobilitat en gel*

La magnitud del gen i l'heterogeneïtat en la localització de les seves alteracions fan poc pràctic l'abordatge de l'estudi mutacional de *TP53* mitjançant la seqüenciació directa de tots els exons. Això, ha impulsat el desenvolupament d'alternatives metodològiques adreçades al cribratge de mutacions, conegudes de forma genèrica sota el nom d'assaigs de la mobilitat. Entre elles podem esmentar la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Børresen *et al*, 1991), la CDGE (Constant Denaturant Gel Electrophoresis) (Fischer i Lerman, 1983) i el SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) (Orita *et al*, 1989). Les tres comparteixen moltes característiques però, probablement, sigui la darrera la que gaudeixi de major popularitat. En qualsevol cas, bé sia per aquest motiu o perquè en el nostre estudi fou utilitzat el SSCP, solament aprofundirem en les característiques del mateix.

El SSCP, descrit per primer cop per Orita i col·laboradors el 1989, consisteix en la separació electroforètica de parells de productes (normal i tumoral) obtinguts per PCR i prèviament desnaturalitzats. Les cadenes senzilles dels fragments amplificats i desnaturalitzats adquireixen una conformació tridimensional que depèn de la seva estructura primària o, el que és el mateix, de la seva seqüència. De la diferència entre la seqüència de DNA del producte normal i del tumoral, n'esdevé una migració electroforètica diferencial entre ambdues mostres, que es tradueix en un patró de mobilitat anòmal en el gel.

Així, aquest tipus d'anàlisi permet la detecció de mutacions, però no la seva localització ni identificació dins del fragment. El mètode, especialment adient per a l'anàlisi de teixits té, però, algunes limitacions com ara la mida dels fragments que es poden

analitzar. Si bé alguns autors estimen que l'eficàcia en la detecció de mutacions pot arribar al 95% en productes d'aproximadament 200 pb, aquesta disminueix dràsticament fins al 50% en fragments de més de 400 pb (Hayashi i Yandell, 1993). Una altra limitació seria la quantitat de cèl·lules tumorals que contingui un teixit constituït per una població cel·lular mixta. En aquest sentit, alguns treballs estimen que la sensibilitat del SSCP permet la detecció de mutacions en poblacions representades com a mínim entre el 5-15% (Wu *et al*, 1993b).

En concret, per a l'estudi mutacional de *TP53*, tot i no haver-se determinat un mètode de referència –estàndard d'or–, hi ha qui considera la PCR-SSCP combinada amb la seqüenciació directa la millor estratègia de les que es disposa actualment (Cordon-Cardo *et al*, 1994).

- *Seqüenciació*

Les estratègies dissenyades per a conèixer l'estat del gen *TP53*, com ja hem comentat anteriorment, solen abordar la seqüenciació com a la segona fase d'un estudi que s'inicia amb el cribratge de mutacions mitjançant tècniques menys complexes, com ara són els assaigs de mobilitat en gel. Això no obstant, la tecnologia de la que disposem avui compta amb equips automàtics que han simplificat i abaratit la seqüenciació, fins a l'extrem que alguns grups han optat per aquesta tècnica com a mètode de cribratge. Tanmateix, independentment de constituir la primera o la segona opció, la seqüenciació ha permès estimar que les mutacions al gen *TP53* poden afectar 90 dels 393 codons requerits per a la síntesi de la proteïna p53 (Soussi, 2000).

- *Detecció de pèrdua d'heterozigositat*

La detecció de pèrdua d'heterozigositat –o LOH– constitueix una aproximació indirecta al coneixement de l'estat del gen supressor *TP53*. El motiu d'això és que, com ja hem esmentat a l'*Apartat 2.1.2* d'aquest mateix capítol, la deleció parcial o total del locus *TP53* és un fenomen que sol acompanyar-se de mutació a l'al·lel concomitant no delecionat: s'atribueix, doncs, a la detecció de LOH un valor confirmatori de la presència de dany genètic al locus en qüestió.

Des del punt de vista metodològic, malgrat existeixen diverses opcions que permeten abordar l'estudi de les pèrdues al·lèliques, les tècniques que se serveixen de polimorfismes intragènics –altament informatius– han anat guanyant en popularitat. Els avantatges que suposa la utilització de les mateixes respecte a d'altres descrites, bé sigui les basades en el Southern blot (Hoyheim *et al*, 1989) o en la PCR (McDaniel *et al*, 1991), són que poden aplicar-se a l'anàlisi retrospectiva de material fixat i parafinat, i que no requereixen la digestió amb endonucleases de restricció. En definitiva, per les seves característiques de baixa complexitat i cost, la detecció de LOH resulta, avui per avui, una forma temptadora d'abordar l'estudi mutacional. Fins al moment, però, l'esmentada aproximació ha resultat ésser menys específica i sensible que la seqüenciació.

- *Microxips*

És ara, però, que assistim al naixement d'una nova metodologia per a la detecció de mutacions, força prometedora com a alternativa a la seqüenciació convencional. Ens referim a l'ús de microxips que, com a tècnica basada en els arranjaments de DNA, permet l'estudi simultani d'un gran nombre de mostres, a més de ser ràpida i barata. Daten de l'any 2000 els primers resultats publicats a propòsit de l'aplicació d'un microxip comercial, dissenyat per a la detecció de mutacions al gen *TP53* (Wikman *et al*, 2000). Tot i que els resultats semblen favorables, cal encara introduir millores en el sistema que permetin detectar insercions i delecions amb la suficient sensibilitat.