



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**TESI DOCTORAL
FACULTAT DE MEDICINA**

PROGRAMA DE DOCTORAT

ORGANOGENÈSI I ANATOMIA CLÍNICA I APLICADA
BIENNI 2002-2004

**ESTUDI DEL GEN SONIC HEDGEHOG (Shh) I DELS GENS DE
LA FAMÍLIA CEACAM DURANT L'EMBRIOGÈNESI DEL
CÒLON HUMÀ I LA SEVA IMPLICACIÓ EN EL
DESENVOLUPAMENT DEL CÀNCER COLORECTAL**

**Director Tesi
Dr. Mariano Monzó Planella**

**Rosa Artells i Prats
Barcelona, Gener de 2008**

3.- INTRODUCCIÓ

3.1. Embriologia Molecular i Descriptiva de l'Aparell Intestinal

3.1.1. Embriologia Descriptiva

La gastrulació és el procés de formació de l'intestí primitiu, de les tres capes germinatives primitives a partir de l'epiblast i el procés amb el qual s'estableix l'eix anteroposterior de l'embrió. La gastrulació comença amb la formació de la línia primitiva a la superfície de l'epiblast. Fins aquest moment, l'embrió està format per dues capes; epiblast i hipoblast. Algunes de les cèl·lules que formen l'epiblast migren per la línia primitiva; quan hi arriben s'invaginen cap a l'hipoblast i donen lloc a l'endoderma embrionari. Altres cèl·lules es situen entre l'epiblast i aquest endoderma de nova formació, constituint el mesoderma embrionari. Finalment, les cèl·lules que es mantenen a l'epiblast donen lloc a l'ectoderma embrionari.

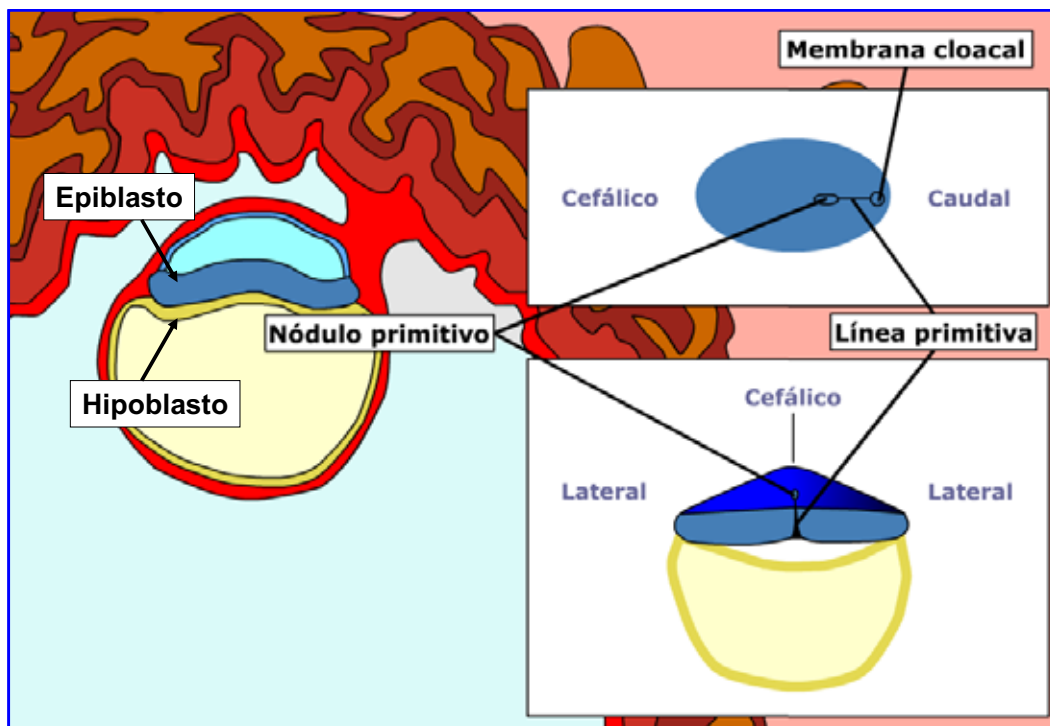


Figura 2: Inici del procés de gastrulació.

Els plegaments cefalocaudals i laterals que pateix l'embrió, durant la tercera i quarta setmana de desenvolupament, fan que el disc embrionari trilaminar pla es converteixi en un cilindre allargat format per tres tubs concèntrics encaixats. El més extern és l'ectoderma, que recobreix la totalitat de la superfície externa de l'embrió exceptuant la regió umbilical, d'on surt el sac vitel·lí amb el seu pedicle de fixació. El tub central és el tub digestiu primitiu endodèrmic; i, separant aquests dos tubs, existeix el tub de mesoderma que és on trobem el celoma. Aquestes tres capes germinatives donaran lloc a òrgans i teixits específics.

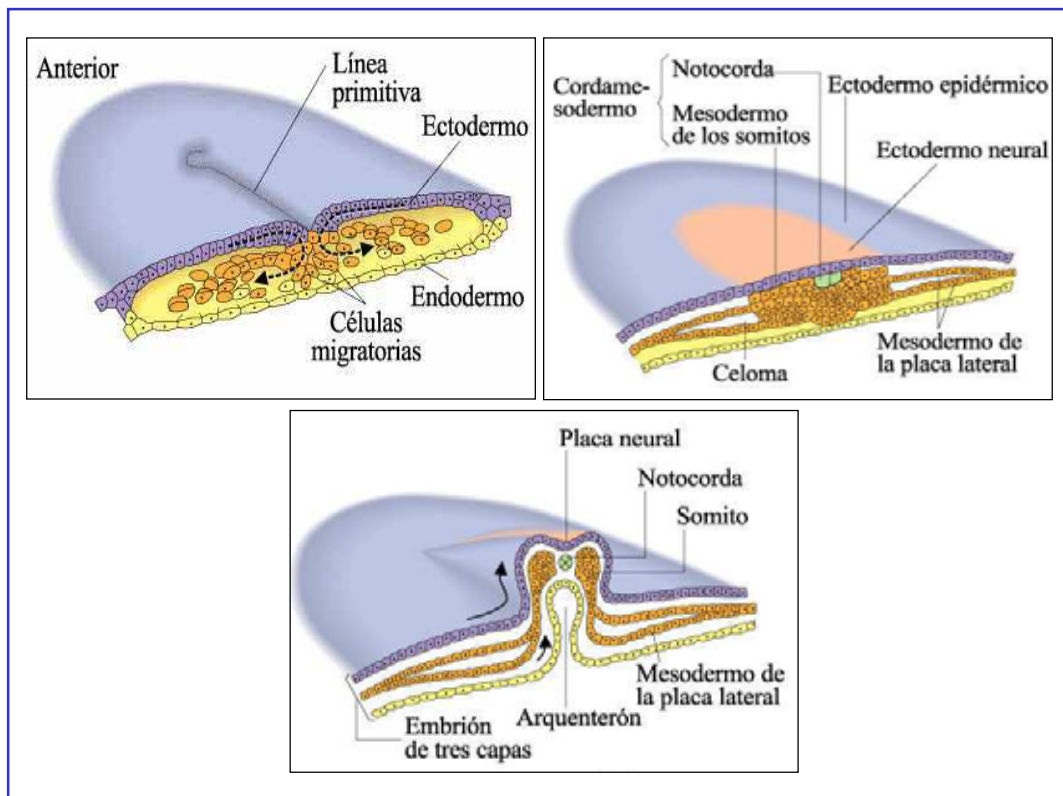


Figura 3: Procés de formació de les tres capes embrionàries.

El tracte gastrointestinal és el principal sistema orgànic derivat de la fulla germinativa endodèrmica. L'endoderma es troba recobrint la superfície ventral de l'embrió i forma el sostre del sac vitel·lí. Degut al creixement de les vesícules cerebrals, el disc embrionari comença a sobresortir a la cavitat amniòtica i a plegar-se en sentit cefalocaudal. Aquest plegament és molt més pronunciat a les regions del cap i la cua, llocs de formació del plegament cefàlic i del plegament caudal respectivament. Com a conseqüència d'aquest plegament, una porció cada vegada més gran de la cavitat revestida d'endoderma és incorporada a l'embrió pròpiament dit.

A la part anterior, l'endoderma forma l'intestí anterior; a la regió de la cua, l'intestí posterior; i la zona compresa entre l'un i l'altre rep el nom d'intestí mig.

A l'extrem cefàlic, l'intestí anterior està temporalment limitat per una membrana ectodèrmica i endodèrmica que rep el nom de membrana bucofàríngea. Durant la quarta setmana de desenvolupament, aquesta membrana es trenca i s'estableix una comunicació oberta entre la cavitat amniòtica i l'intestí primitiu. De la mateixa manera, l'intestí posterior també acaba en una membrana ectodèrmica i endodèrmica anomenada membrana cloacal. Aquesta membrana es trenca durant la setena setmana de desenvolupament creant l'obertura anal.

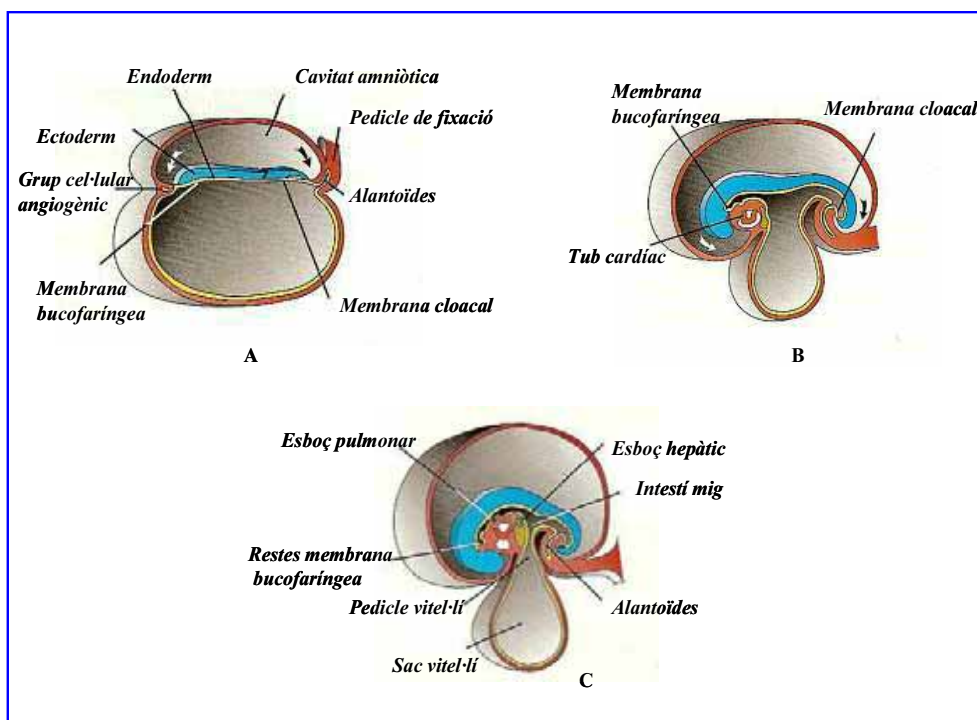


Figura 4: Talls sagitals d'embrions que il·lustren l'efecte del plegament cefalocaudal i lateral. A: embrió en període presomita. B: embrió de 14 somites. C: final del primer mes.

Els límits de l'intestí anterior, mig i posterior, coincideixen amb els territoris de les tres artèries que irriguen el tub digestiu abdominal; el tronc celíac aporta sang cap a l'intestí anterior abdominal i els seus derivats; el tronc mesentèric superior irriga l'intestí mig; i l'artèria mesentèrica inferior irriga a l'intestí posterior.

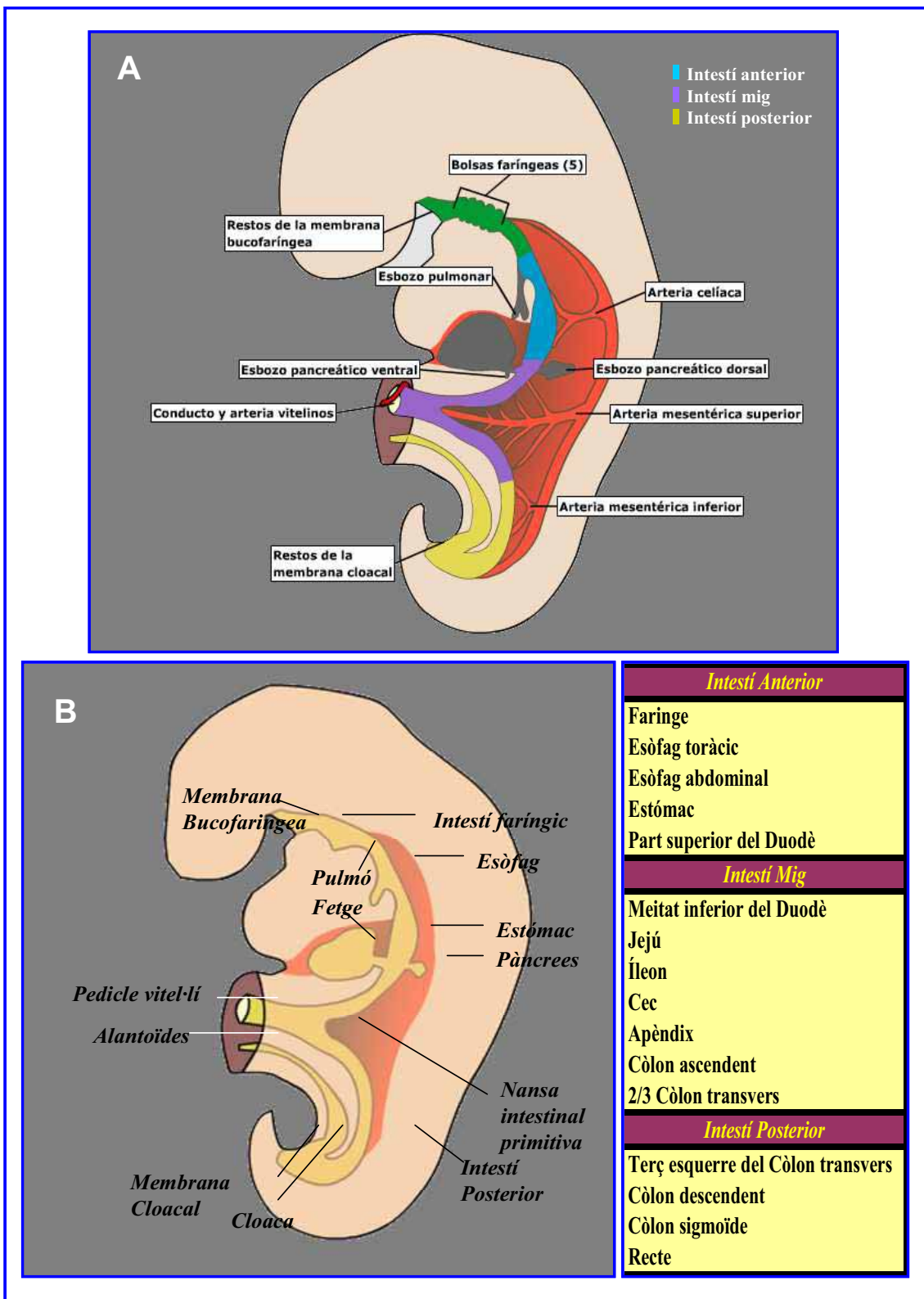


Figura 5: A: Límits dels intestins anterior, mig i posterior segons la irrigació arterial.

B: Derivats del tub digestiu primitiu.

Referent al desenvolupament embrionari de l'intestí i del còlon, que són els derivats del tub digestiu primitiu objecte del nostre estudi, s'observa que:

- A la cinquena setmana del desenvolupament, l'intestí mig està fixat a la paret abdominal dorsal per un mesenteri curt i es comunica amb el sac vitel·lí mitjançant el pedicle vitel·lí. El desenvolupament de l'intestí mig es caracteritza perquè l'intestí i el seu mesenteri s'allarguen molt ràpidament formant la nansa intestinal primitiva. Aquesta nansa presenta comunicació amb el sac vitel·lí a través del pedicle vitel·lí que te situat en el seu vèrtex. La branca cefàlica de la nansa es converteix en la porció distal de duodè, jejú i part de l'ileon. La branca més caudal es converteix en la part inferior de l'ileon, cec i apèndix, còlon ascendent i els 2/3 proximals de còlon transvers.
- A principis de la sisena setmana, l'elongació de l'intestí mig combinada amb la presió que exerceixen els òrgans abdominals a mida que van creixent, fan que la nansa intestinal primitiva s'hernii a nivell del melic. A la vegada que es produeix aquesta herniació, la nansa va rotant 90° en sentit contrari a les agulles del rellotge al voltant de l'eix de l'artèria mesentèrica superior (figura 6 A i B). La principal conseqüència d'aquesta rotació serà que el futur còlon creuarà per davant de l'intestí prim i adquirirà la seva conformació en forma de "C" per tot el llarg de la paret abdominal ventral. A la vegada que es dóna tot aquest procés, l'intestí s'allarga i quedarà empaquetat a dins la cavitat abdominal. Aquesta rotació acaba al voltant de la vuitena setmana de desenvolupament i, mentrestant, l'intestí mig continua amb la seva diferenciació. L'allargament del jejú i de l'ileon provoca l'aparició d'uns plecs coneguts amb el nom de nanses jejunoileals mentre que del cec en surt l'apèndix vermiforme (figura 6 C).
- A la novena setmana de gestació, la cavitat abdominal ha augmentat suficientment de tamany com per acollir a tot l'intestí i les hèrnies que s'han anat formant comencen a desplaçar-se en sentit contrari a les agulles del rellotge uns 180°; el cec es desplaça fins una posició immediatament per sota del fetge a la zona de la fosa ilíaca dreta.

- A la onzena setmana de desenvolupament els intestins ja estan completament integrats a la cavitat abdominal. Un cop l'intestí gruixut ha retornat a la cavitat peritoneal, els mesenteris dorsals del còlon ascendent i descendent es fan més curts i es pleguen, entrant en contacte amb la paret dorsal del cos a la qual s'adhereixen tornant-se secundàriament retroperitoneals. El còlon transvers no queda fixat a la paret del cos sinó que queda com a òrgan intraperitoneal penjant del mesenteri. El sigma, la part més inferior del còlon, també queda suspès del mesenteri (figura 6 D i E).

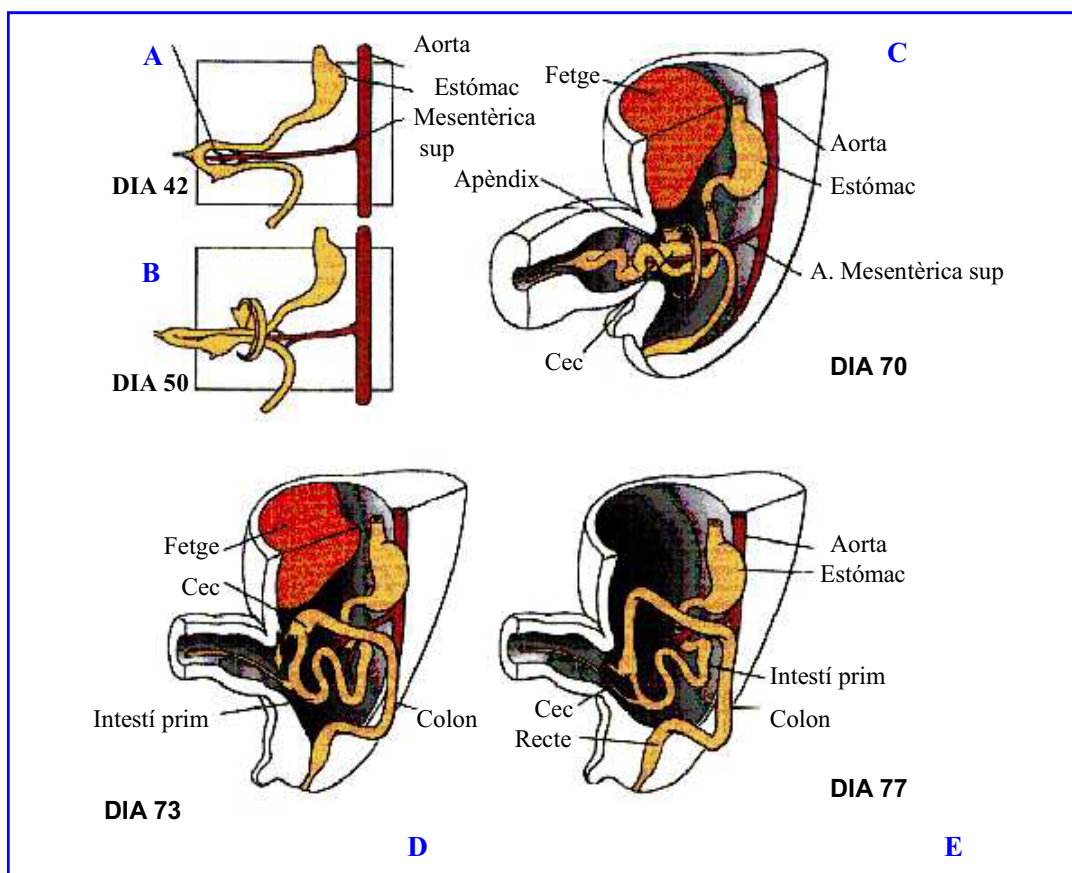


Figura 6: Herniació i rotacions intestinals.

| PERÍODE | PROCESSOS |
|--------------------|---|
| 3 setmanes | → s'inicia la formació de l'intestí tubular |
| 4 setmanes | → gran part de l'intestí ja és tubular |
| 5 setmanes | → expansió i rotació inicial de l'estómac → comença la formació de la nansa intestinal → s'intueixen el cec i conducte biliar |
| 6 setmanes | → acaba la rotació de l'estómac → nansa intestinal prominent → aparició d'apèndix i alantoïdes → el tabic urorectal comença a dividir la cloaca en recte i sinus urogenital |
| 7 setmanes | → herniació de la nansa intestinal → creixement ràpid del fetge → fusió dels pàncrees dorsal i ventral → separació cloacal complerta |
| 8 setmanes | → rotació en sentit antihorari de la nansa intestinal → recanalització de l'intestí → inici de la penetració dels precursors de les neurones parasimpàtiques des de la cresta neural fins l'intestí |
| 9 setmanes | → retorn de l'intestí herniat a la cavitat corporal → comença la diferenciació dels tipus epitelials del revestiment intestinal |
| 11 setmanes | → aparició de vellositats a l'intestí prim → diferenciació de les cèl·lules caliciformes |
| 16 setmanes | → intestí i còlon recoberts de vellositats |
| 20 setmanes | → Plaques de Peyer a intestí prim |

Taula 1: Etapes del desenvolupament de l'aparell digestiu.

3.1.2. Embriologia Molecular

En la formació de l'endoderma durant la gastrulació, aquest rep informació sobre les característiques anteriors i posteriors de les regions del tub digestiu. El factor FGF-4, segregat al mesoderma, li dona a l'endoderma un caràcter posterior. L'especificació regional del tub digestiu en diferents components, es produeix quan els plecs laterals del cos s'aproximen a banda i banda del tub. Aquesta especificació és iniciada per factors de transcripció que s'expressen a diferents regions del tub digestiu. Així, SOX2 especifica a esòfag i estómac; PDX1 a duodè; CDXC a intestí prim i CDXA a còlon i recte. Aquest patró inicial s'estabilitza per interaccions recíproques entre l'endoderma i el mesoderma esplàncnic adjacent al tub digestiu. La interacció epitelimesenquimatosa

comença per l'expressió de Shh al llarg de tot el tub digestiu. Shh regula favorablement a factors del mesoderma que determinen el tipus d'estructura que es forma (estómac, duodè, intestí...). Per exemple, els punts de transició entre l'intestí mig obert i les regions anterior i posterior de l'intestí reben el nom d'obertura intestinal anterior i obertura intestinal posterior, respectivament. Les vores endodèrmiques d'aquestes obertures, són zones d'expressió de la molècula Shh. A l'obertura posterior, Shh permetrà l'expressió de BMP-4, una altra molècula senyalitzadora, que dóna lloc a un gradient d'expressió mesodèrmica dels grups paralèls 9-13 dels gens HoxD, tal i com podem veure a la figura 7. Hoxd 9 s'expressa en una localització més cranial, mentre que Hoxd13 es troba expressat a la zona més caudal. Segurament, aquest gradient en l'expressió té una funció important en els processos de diferenciació regional de l'intestí.

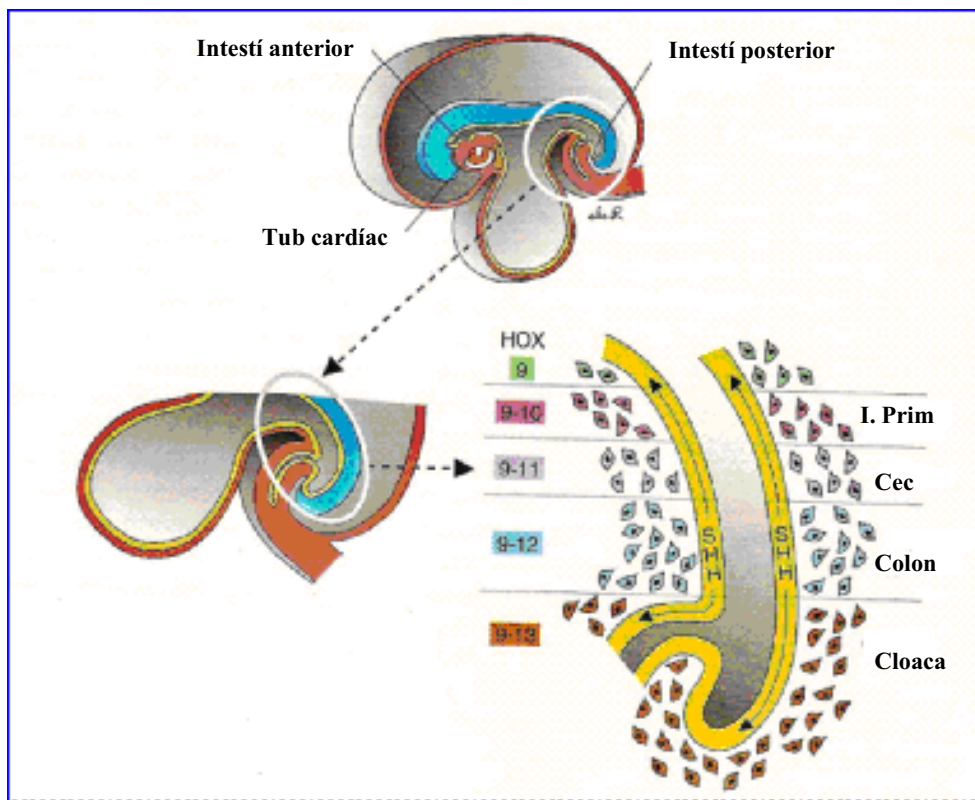


Figura 7: Regulació molecular de la formació de l'intestí posterior.

Per entendre els mecanismes moleculars amb els quals les cèl·lules mare multipotencials del tracte gastrointestinal donen lloc a tipus cel·lulars diferenciats entre ells, hem d'entendre primer el concepte de cèl·lula mare, ja que les cèl·lules mare adultes ens ofereixen una alternativa única perquè poden ser aïllades, estudiades i manipulades sense que el donant pateixi cap dany. Tot i així existeixen encara molts obstacles en la manipulació d'aquests tipus cel·lulars.

Els sistemes *in vitro* de manipulació de cèl·lules mare adultes no estan ben definits per a tots els teixits. L'habilitat per reconstruir la funció de les cèl·lules mare *in vivo* no s'ha pogut demostrar encara en molts dels òrgans, i entendre com les cèl·lules mare adultes estan regulades dins el seu microambient comença ara a ser conegut.

Juntament amb les cèl·lules mare hematopoètiques, les cèl·lules mare més ben estudiades han estat les epitelials, però la gran diversitat de funcions d'aquestes cèl·lules epitelials en els diferents òrgans fa difícil determinar si existeixen punts en comú en la regulació d'aquestes cèl·lules mare.

3.1.3. Què són les cèl·lules mare?

Tots els teixits del cos deriven de cèl·lules mare (en anglès *stem cells*) específiques. Aquestes cèl·lules mare específiques de teixit es distingeixen de les cèl·lules mare embrionàries en que la seva diferenciació queda molt restringida a l'hora de donar lloc als diferents tipus cel·lulars d'un òrgan determinat (Wicha, 2006).

Les cèl·lules que formen el zigot són essencialment totipotencials; és a dir, són capaces de formar l'embrió i el trofoblast de la placenta. Les cèl·lules mare de la massa cel·lular interna (*inner cell mass-ICM*) són essencialment pluripotencials; és a dir, són capaces de produir cèl·lules que donaran lloc a les tres capes embrionàries; ectoderma, mesoderma i endoderma però no són capaces de formar l'organisme sencer. Les cèl·lules de les tres capes embrionàries són bàsicament multipotencials; és a dir, són cèl·lules especialitzades que podran donar creixement a diferents tipus cel·lulars, teixits i estructures. Per acabar ens trobem amb les cèl·lules unipotencials que són aquelles que són capaces de produir un tipus cel·lular específic (Poulsom, 2002; Heins, 2004). (figura 8).

Les cèl·lules mare són cèl·lules indiferenciades que poden proliferar i que presenten la capacitat d'autorenovació i diferenciació en un o més tipus de cèl·lules especialitzades (Bishop, 2002). Posseeixen les característiques adequades per pensar que és en elles on s'originarà el càncer: les trobem al principi del flux cel·lular, sobretot

si el flux és unidireccional; les poblacions de cèl·lules mare s'automantenen elles mateixes; representen un percentatge petit del nombre total de cèl·lules, són relativament indiferenciades, és a dir, a la majoria de teixits on es troben no presenten l'especialització funcional de la progènie a la que donaran lloc i la seva vida és prou llarga per acumular les mutacions necessàries perquè es produeixi el fenotip tumoral.

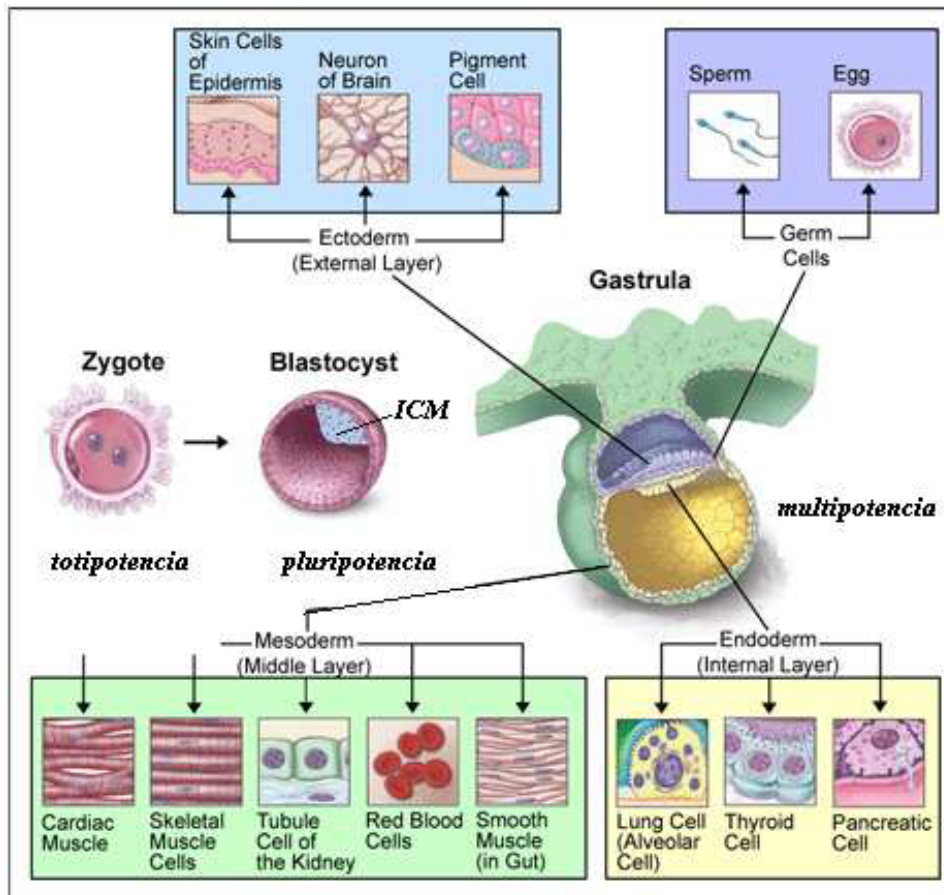


Figura 8: Processos de diferenciació de les cèl·lules mare.

En teixits adults les cèl·lules mare viuen en un microambient especial (nínxol) format per un grup de cèl·lules que les envolta juntament amb les seves matrius extracel·lulars fet que proporciona a la cèl·lula mare un ambient òptim per tal de realitzar les seves funcions però que varia en localització i composició depenent del tipus tissular que les contingui (Spradling, 2001; Li, 2005). Aquest nínxol, està format per un compartiment epitelial i un compartiment mesenquimal. El nínxol està estructurat per promoure els senyals que tenen lloc entre les cèl·lules mare i les cèl·lules veïnes. Existeixen tot un conjunt de característiques comuns a tots aquests microambients de les cèl·lules mare: cada microambient està format per un grup

cel·lular amb una localització especial la funció del qual és mantenir la viabilitat de les cèl·lules mare; es tracta d'un lloc d'ancoratge físic per a aquestes cèl·lules i existeixen un conjunt de molècules d'adhesió que estan involucrades en aquesta unió. Encara que és difícil saber quines vies de senyalització afecten en el comportament de la cèl·lula mare i quines vies són importants per influenciar el trànsit de les cèl·lules produïdes, el que està clar és que les cèl·lules mare reben diferents senyals extrínsecs i que la nova població de cèl·lules respon de manera diferent a senyals similars.

Normalment, en els sistemes hematopoètic, fol·licular i intestinal, aquest microambient manté a les cèl·lules mare en un estat de quiescència mitjançant senyals que inhibeixen la proliferació cel·lular i el creixement. Aquesta situació es va mantenint fins que les cèl·lules reben estímuls que els permetran dividir-se i proliferar. El manteniment del balanç entre els senyals proliferatius i els no proliferatius és clau per la regulació homeostàtica. Qualsevol mutació genètica que faci que les cèl·lules es comportin i actuïn independentment a les senyals de creixement, implicarà una proliferació cel·lular descontrolada i una possible tumorigènesi (Li, 2005).

En el procés de proliferació, la cèl·lula mare es divideix per donar lloc a dues cèl·lules filles, de les quals, una seguirà comportant-se com a cèl·lula mare (amb capacitat d'autorenovació); i l'altre s'anirà diferenciant cap a cèl·lula madura (Reya, 2001; Li, 2005). Aquest procés es coneix amb el nom de divisió asimètrica. Si per contra, les dues cèl·lules filles presenten les característiques de la cèl·lula progenitora el procés es coneix amb el nom de divisió simètrica (Sell, 2004). El senyal que regula quina cèl·lula filla mantindrà les característiques parentals i quina iniciarà el seu procés cap a la maduració ve determinat per un conjunt de vies de senyalització entre les que destaquen OCT-4, Wnt/bCatenina; Notch; BMP (bone morphogenic protein), i la via de Shh.

3.1.4. Cèl·lules mare intestinals

Per definició, les cèl·lules mare, presenten la capacitat de donar creixement a múltiples línies cel·lulars, estar anclades dins el seu propi microambient i poder realitzar una divisió cel·lular asimètrica.

En el cas de l'intestí, les cèl·lules mare resideixen a la base de les criptes de Lieberkühn o en zones molt properes, i a partir d'aquí, aquestes cèl·lules poden proliferar, migrar i diferenciar-se cap al lumen intestinal (figura 9). Una de les cèl·lules mare primitives és seleccionada durant el procés de desenvolupament de les criptes i

pobla cada cripta madura. Abans de tornar-se quiescent, aquesta cèl·lula mare pateix una divisió asimètrica. Les cèl·lules mare intestinals presenten mecanismes per tal de protegir el seu contingut de DNA original en presència d'agents que puguin causar-hi algun dany. Potten i col·laboradors, (Potten, 2002); van suggerir que aquesta divisió asimètrica de les cèl·lules mare presenta d'una banda una segregació del DNA original per tal de renovar-se ella mateixa (autorenovació) i una segregació del DNA sintetitzat de novo cap a les cèl·lules filles. D'aquesta manera, qualsevol error que pugui produir-se durant la replicació, serà segregat cap a les cèl·lules filles protegint d'aquesta manera el DNA present en la cèl·lula mare original (Marshman, 2002). Per acabar, la nova població de cèl·lules produïda, manté les propietats de les cèl·lules mare i és la responsable de poblar les criptes de l'epiteli biliar.

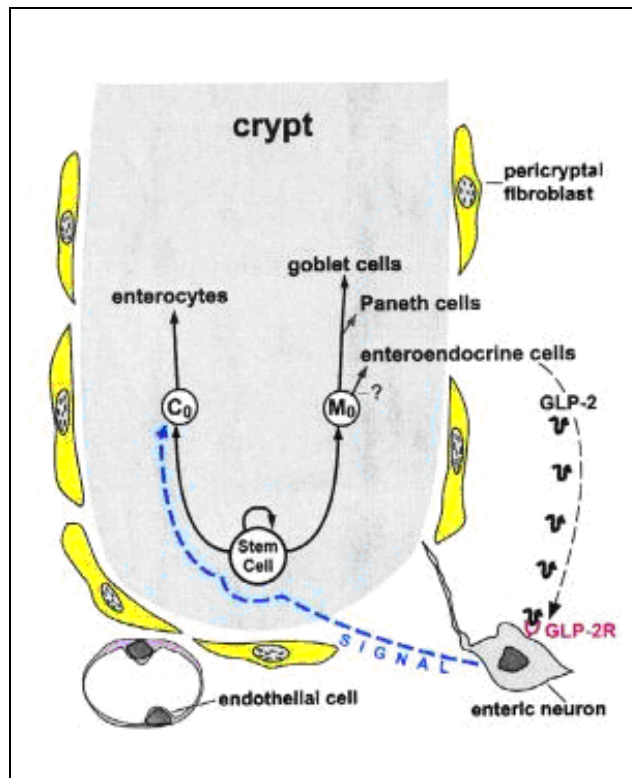


Figura 9: Microambient de les cèl·lules mare intestinals. Una cèl·lula multipotencial activa (SC) dona creixement a les cèl·lules filles (C₀) que produiran la línia enterocítica i a descendents que donaran lloc a les cèl·lules secretores.

L'habilitat de les cèl·lules mare per regenerar un teixit danyat ha estat utilitzada per a poder estudiar les seves característiques funcionals. En un model d'estudi en ratolí aplicable a humans (Potten, 1990), s'han pogut establir tres categories diferents en quant a la localització de les cèl·lules mare i els seus descendents (figura 10) : a la zona

constant, les criptes intestinals de ratolí contenen les cèl·lules ancestrals i a continuació trobem una zona de cèl·lules mare regeneratives o clonogèniques que donen lloc a les cèl·lules de trànsit diferenciades (transient cells-TA) i que mantenen la capacitat d'actuar com a cèl·lules mare en cas que sigui necessari. En tercer lloc, trobem una zona que conté aproximadament 20 cèl·lules clonogèniques i que donaran lloc als diferents tipus cel·lulars intestinals.

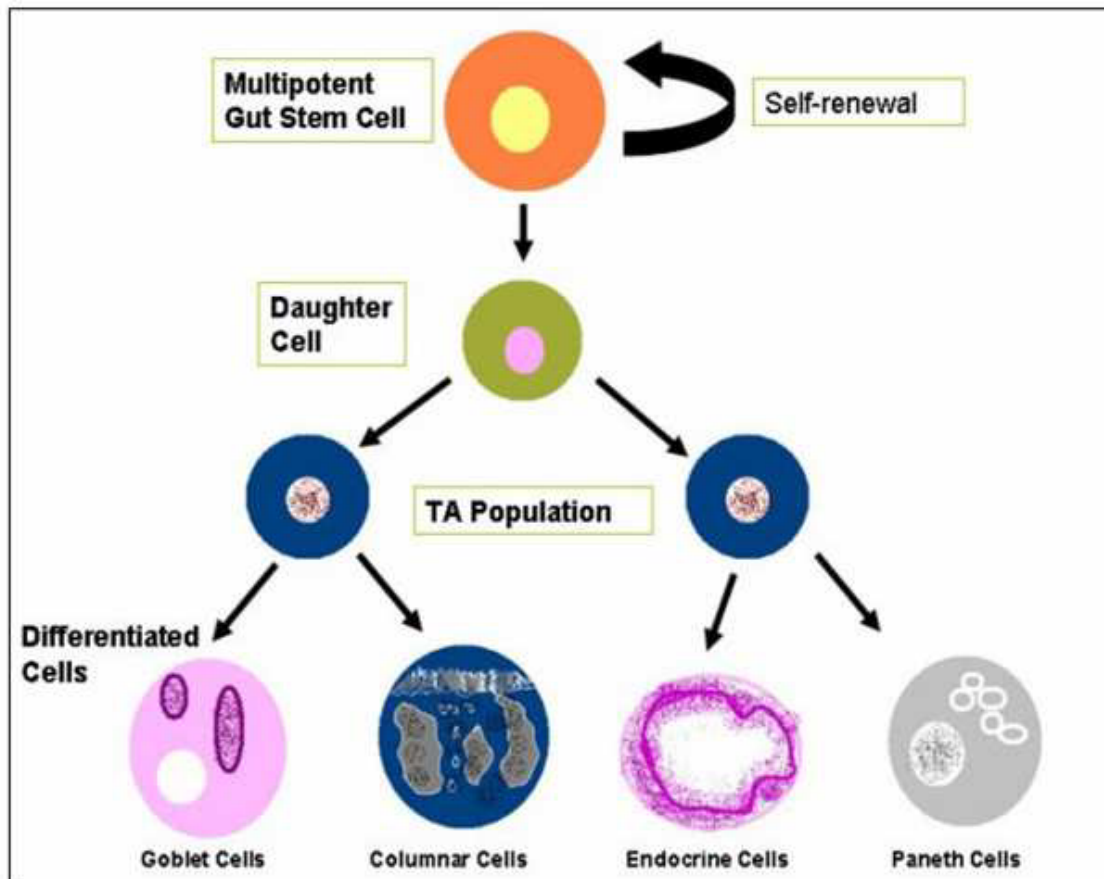


Figura 10: Jerarquia de les cèl·lules mare intestinals.

Per a identificar el nínxol d'un teixit determinat cal conèixer on es troben localitzades les cèl·lules mare dins d'aquell teixit concret. En el cas de l'intestí, la situació és la següent: les criptes intestinals estan rodejades per un epitelí intestinal de miofibroblasts (ISEMFs). Aquestes cèl·lules existeixen com a sinciti que s'extén a través de la làmina pròpia i que emergeix en els espais pericitals dels vasos sanguinis.

Aquests ISEMFs juguen un paper importantíssim en les interaccions mesènquima-epitelí. A més a més, els ISEMFs secreten el factor de creixement dels hepatòcits, el factor de creixement $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$) i el factor de creixement dels

queratinòcits (Plateroti, 1998). Els ISEMFs també són essencials per la regulació de la diferenciació de les cèl·lules intestinals a través dels factors de creixement citats anteriorment i possiblement, a través de factors pertanyents a la via de Wnt.

Els mecanismes moleculars amb els quals les cèl·lules mare multipotencials del tracte gastrointestinal donen lloc a tipus cel·lulars diferenciats entre ells no són massa coneguts, però existeix un elevat nombre de gens i de factors de creixement, que són expressats per cèl·lules mesenquimals intestinals i epitelials, que han estat identificats com a reguladors del desenvolupament, la proliferació, el desenvolupament en edat adulta i en el desenvolupament tumoral (Brittan, 2002).

3.1.5. Cèl·lules mare intestinals i l'origen del càncer colorectal

Les cèl·lules que formen el tracte gastrointestinal estan en constant renovació i cada regió d'aquest tracte és morfològicament diferent a les altres. Es creu que una única cèl·lula mare de cada cripta intestinal donarà lloc a un clon de cèl·lules diferenciades. La regulació del procés de proliferació cel·lular es controla a nivell de la cripta. L'aparició de criptes displàsiques és la manifestació del trencament del balanç entre divisió cel·lular i apoptosi; per tant, la desregulació de la funció normal de la cèl·lula és un punt clau en els primers estadis de la tumorigènesi (Sancho, 2004).

D'altra banda se sap que els carcinomes de còlon deriven de l'expansió clonal d'una única cèl·lula mare intestinal mutada (Wong, 1999; Bach, 2000). A favor d'aquesta teoria trobem els tres punts següents:

- En un primer moment existien dos tipus cel·lulars diferents com a possibles candidats de iniciar els processos carcinogènics. D'una banda teniem a les cèl·lules mare i d'altra banda les cèl·lules proliferatives diferenciades. A les criptes intestinals, les cèl·lules proliferatives tenen una vida curta i migren ràpidament. Aquest fet descarta a aquestes cèl·lules com a dianes del procés de carcinogènesi ja que el desenvolupament dels carcinomes és un procés lent que pot trigar anys en produir-se. Les cèl·lules mare són les úniques que presenten capacitat de renovació i expansió.
- La majoria de tumors humans contenen tipus cel·lulars originats a partir de cèl·lules mare d'aquell teixit concret (Kirkland, 1998).

- Canvis produïts en els mecanismes de regulació de les cèl·lules mare durant els estadis inicials de la carcinogènesi. Existeix un nombre elevat d'estudis que demostren que mutacions en el gen APC de les cèl·lules mare embrionàries afavoreixen l'inici de la carcinogènesi i que és possible alterar els nivells de diferenciació cel·lular modulant la dosi de β -catenina en aquestes cèl·lules pluripotencials (Gaspar, 2004). Aquesta cèl·lula mare intestinal mutada que progressa ho fa a través de canvis histològics molt ben caracteritzats; és a dir, a través de la seqüència adenoma-carcinoma, amb la seva corresponent acumulació de canvis genètics. Aquest conjunt de canvis genètics, que tenen lloc posteriorment a la mutació d'APC, inclouen l'activació mutagènica de l'oncogen k-Ras, la inactivació del supressor tumoral p53 i la deleció de material genètic localitzat al braç llarg del cromosoma 18. Tots aquests canvis poden anar acompanyats per la mutació dels següents supressors tumorals: DPC4/SMAD4/MADH4. Les mutacions en el gen APC solen ser suficients perquè els tumors colorectals assoleixin 1cm de diàmetre (Lamlum, 2000).

A més a més de les mutacions que proporcionen creixement al tumor, existeixen (epi)mutacions que donen lloc a varies formes d'instabilitat genòmica en els CCR. Les formes més conegudes d'instabilitat genòmica són les que afecten als mismatch repair genes (MMR) i que es produeixen degut a una alteració del gen MLH1 (silenciador transcripcional). Els càncers produïts per instabilitat genòmica representen un 15% del total de càncers de còlon que es produeixen.

3.2.-BASES MOLECULARS DEL CÀNCER

Actualment s'han descrit més d'un centenar de tipus de càncer produïts pel creixement descontrolat d'alguna de les cèl·lules que formen l'organisme. Malgrat la diversitat de tipus de càncers existents, tots comparteixen un mecanisme comú: la pèrdua de control dels gens responsables d'una ordenada proliferació cel·lular. Aquesta pèrdua de control es produeix per l'alteració o la mutació inicial d'alguns dels gens que confereix una major capacitat de proliferació a una cèl·lula. Els gens diana per a aquestes mutacions són els protooncogens i els gens supressors de tumors. Dins d'aquest segon grup podem fer una doble classificació entre gens caretaker i gens gate keepers.

3.2.1. Protooncogens

Els protooncogens codifiquen per a proteïnes responsables d'activar la proliferació cel·lular durant el desenvolupament embrionari, la morfogènesi, la regeneració de cèl·lules mortes i la curació de ferides, entre d'altres situacions. Aquests protooncogens poden patir una mutació que donarà lloc a la seva forma activa o oncogen.

Els oncogens són còpies de gens normals que han estat activats per una mutació puntual, per una deleció, per translocacions o per amplificacions. Sigui quina sigui la via d'activació el resultat final serà un creixement cel·lular descontrolat que pot resultar en un càncer. La funció d'aquests gens sol estar relacionada amb la regulació de la proliferació cel·lular i l'apoptosi.

Dins d'aquest grup d'oncogens hi trobem els receptors de membrana amb activitat tirosina-quinasa, com és el cas de EGFR; factors de creixement, com IL-3; proteïnes transductores citoplasmàtiques, com poden ser Ras, Akt i Crk; proteïnes citosòliques amb activitat serina-treonina quinasa, com Raf; factors de transcripció, com c-myc; proteïnes que participen directament en el control del cicle cel·lular, com és el cas de la Ciclina D1 i proteïnes implicades en la mort cel·lular, com bcl-2 (Duffy, 1993; Hunter, 1994)

S'ha observat que en els adenomes es troba augmentada l'expressió de c-myc i disminuïda l'expressió de c-fos; però l'alteració oncogènica més ben estudiada en els tumors de còlon és la del gen k-Ras.

Hi ha tres membres de la família ras: H-ras, k-Ras i N-ras. Aquest gen està localitzat al braç curt del cromosoma 12 en la posició 12.1 (12p12.2) i està format per 189 aminoàcids (AA) que codifiquen proteïnes de 21kD. Aquestes proteïnes, quan s'uneixen a la guanosina trifosfat (GTP) pels AA 10-17, 57-61 i 116-119 i a la cara interna de la membrana citoplasmàtica per l'AA 186 es transformen en proteïnes actives. L'activació del receptor tirosina quinasa i altres senyals de creixement dóna lloc a l'activació de la p21ras que en molts casos és necessària per la transmissió dels senyals. Ras-GTP activa a la vegada diverses dianes, i funcionarà com a missatgera en la transmissió de senyals extracel·lulars de creixement cel·lular, des de la membrana cel·lular fins a components intracel·lulars. En el CCR i en d'altres tumors gastrointestinals, el gen que habitualment apareix mutat és el K-ras.

Les mutacions en el gen ras apareixen en un moment relativament temprà respecte la progressió del tumor colorectal. Mutacions en el gen k-ras s'han observat en el 40%-50% dels carcinomes colorectals esporàdics i en els pòlips displàsics grans, però en menys del 10% dels casos dels adenomes petits (Casimiro,2002; Monzo, 2003).

3.2.2. *Gens Supressors Tumoral*s

La funció dels gens supressors tumorals és la de regular la proliferació, la diferenciació i la mort cel·lular; és a dir, controlar el cicle cel·lular, evitant el creixement excessiu i mantenint les característiques de les cèl·lules que especifiquen la seva localització original. La seva funció normal es perd quan s'inactiven els dos al·lels del gen. Es tracta de gens recessius; un dels gens s'inactiva per l'aparició d'una mutació puntual i l'altre per l'efecte d'una deleció. La pèrdua de funció dels gens supressors tumorals localitzats en els cromosomes 17p i 18q és important en la formació de tumors colorectals (Volgstein, 1992; Volgstein, 1998).

Els gens supressors de tumors poden dividir-se en dos tipus; els Gatekeeper i els Caretaker (Kinzler, 1996).

Gens Gatekeeper: són els gens responsables de mantenir constant el número de cèl·lules en les poblacions cel·lulars que es van renovant i d'assegurar-se que les cèl·lules responen correctament als estímuls. Actuen impedit el creixement tumoral i dins d'aquest grup hi trobem els següents gens; Adenomatous polyposis coli (APC), p53 i Dpc4/Smad4 (Kinzler, 1996; Kinzler, 1997).

✓ **Gen APC:** gen localitzat al braç llarg del cromosoma 5 (5q). Mutacions en el gen APC seran les responsables de l'adenopoliposis familiar (APF) i de la Síndrome de Gardner. Aquest gen codifica per una proteïna de 2843 AA i la seva principal funció és controlar el senyal de Wnt, ja que l'activació inapropiada de Wnt per pèrdua de funcionalitat d'APC contribueix a la progressió tumoral (Fodde, 2001; Hanson, 2005) (figura 11).

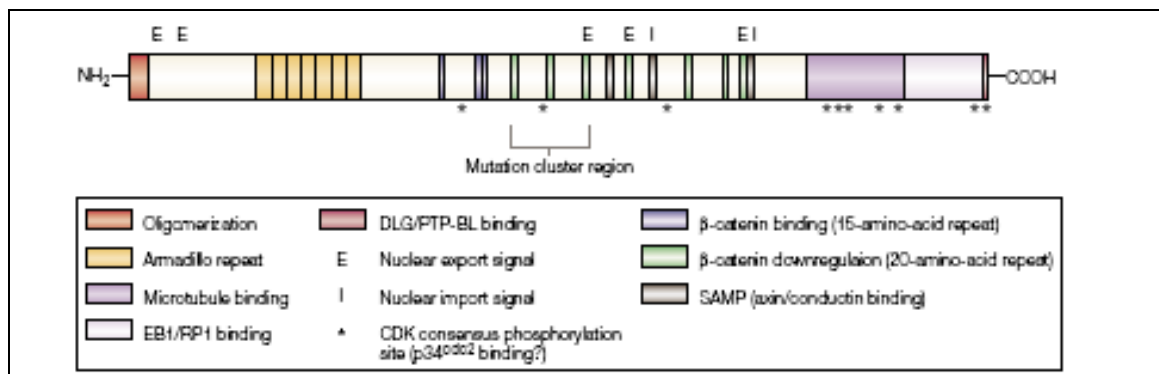


Figura 11: Estructura de la proteïna APC.

Aquesta proteïna és la clau per la proliferació cel·lular; és a dir, la seva inactivació dispara l'inici d'aquesta proliferació. La proteïna es troba localitzada a la part basal de les cèl·lules de l'epiteli del còlon i presenta una major expressió al terç superior de la cripta; intervé en la renovació de l'epiteli mitjançant la inducció de l'apoptosi.

La importància d'APC va augmentar quan es va veure que la majoria de càncers esporàdics, no familiars, també presentaven mutacions en aquest gen. També s'ha vist la seva importància en la iniciació dels tumors, ja que la seva inactivació ha estat demostrada en lesions neoplàsiques més inicials com poden ser les criptes aberrants (Takayama, 2001). Aquestes criptes aberrants són les precursors dels adenomes. Les funcions del gen APC van lligades a la seva unió amb la β -catenina. Aquest gen inhibeix a membres de la via de senyalització de Wnt (proteïnes de vertebrats que actuen com a factors de creixement secretats a l'exterior de la cèl·lula) que a la vegada promouen l'expressió de β -catenina.

La β -catenina és una proteïna citoplasmàtica que està associada a la proteïna transmembrana E-cadherina per una banda i a l' α -catenina per l'altra. Les β -catenines

són indispensables per l'adhesió cel·lular. Quan l'APC s'hi uneix, es desfà l'adhesió cèl·lula-substrat; per tant, la seva importància en el càncer podria ser deguda a la pèrdua d'aquesta adhesió ja que la cèl·lula es podrà desplaçar. A més a més, la β -catenina és l'ortòleg a mamífers de la proteïna Armadillo de *Drosophila* i és la peça clau de la senyalització de la via Wnt. Va ser descrita originalment com un component de les unions adherents on uneix E-cadherina amb α -catenina i, conseqüentment, la xarxa de microfilaments d'actina del citoesquelet (Cowin, 1994; Polakis, 2000). Aquesta β -catenina actua com a activador de la divisió cel·lular. Un increment de l'activitat de la β -catenina està directament relacionat amb una pèrdua de la diferenciació cel·lular epitelial (Brabletz, 2005).

La principal oncoproteïna en el CCR és la β -catenina; efectora de la via de senyalització de Wnt, que és un potent factor de creixement de l'intestí. Aquesta β -catenina es troba sobreexpressada en la majoria dels casos degut a mutacions del gen APC. En absència de Wnt, els nivells de β -catenina intracel·lular són minimitzats ja que és degradada per proteosomes. La β -catenina citoplasmàtica lliure és segrestada pel complex de destrucció, que conté APC entre d'altres compostos. Aquesta β -catenina és fosforilada i posteriorment poliubiquitinada; finalment és reconeguda pel proteossoma i és destruïda. En presència de Wnt, el seu receptor frizzled és activat. Això farà que el complex de destrucció no funcioni correctament i per tant que la β -catenina no sigui reconeguda com a molècula que s'ha de destruir; serà lliure per entrar al nucli i comportarà alteracions en la migració i l'adhesió de la cèl·lula, així com un increment de l'activitat transcripcional TCF-cMyc que indueix la proliferació cel·lular (Fodde, 2001; Narayan, 2003) (figura 12).

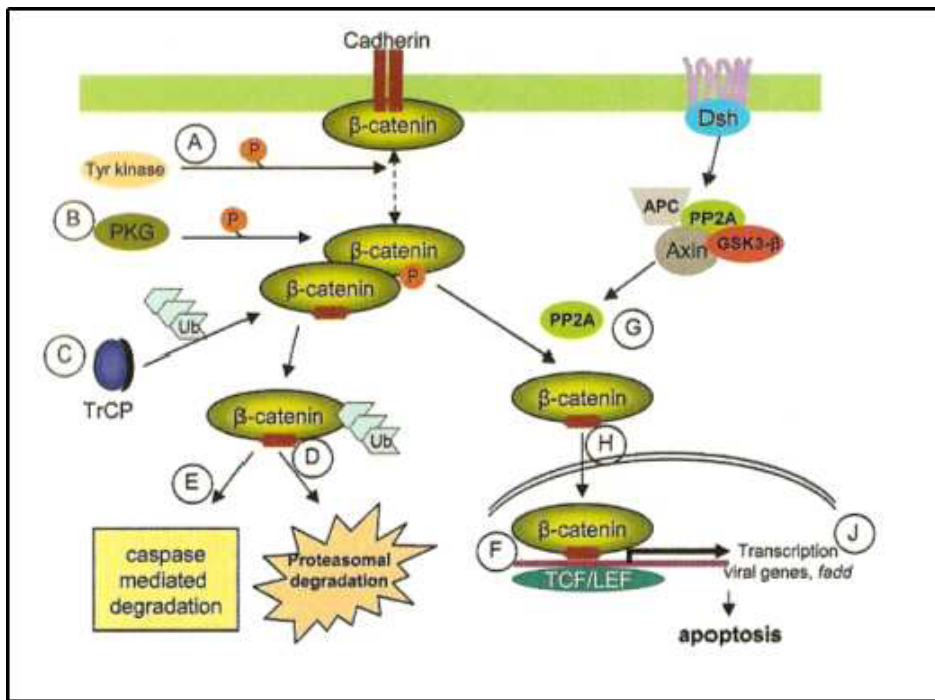


Figura 12: Via de senyalització de la β -catenina.

✓ **Gen p53:** també conegut amb el nom de “guardià del genoma”, Es tracta d’un factor de transcripció amb activitat supressora de tumors. Es localitza en el locus 17p13.1 i es troba mutat en el 50% dels adenocarcinomes de còlon. La proteïna resultant està formada per 393Aa i pesa 53kD. Aquesta proteïna pot dividir-se en tres fragments: 1) la regió amino-terminal, que conté el domini de transactivació transcripcional; 2) la regió carboxi-terminal, que conté les regions funcionals per la localització nuclear i la tetramerització; 3) a la part central existeix el domini d’unió al DNA.

La vida mitja de la proteïna és curta, aproximadament 6-20 min, de manera que no pot acumular-se en quantitats prou grans com per a ser detectable per mètodes immunohistoquímics. Aquest gen està implicat en el manteniment de l’estabilitat genòmica a través del control del cycle cel·lular i l’apoptosi en resposta a l’estrès genotòxic.

p53, en situació normal, s’expressa en nivells molt baixos i és activat quan hi ha dany a l’ADN. L’any 1992, Volgestein i els seus col·laboradors (Volgestein, 1992) van proposar un model en el qual p53 forma tetràmers que s’uneixen als p53-binding sites (PBS-llocs d’unió de p53) i s’activa l’expressió de gens adjacents que regularan directament la progressió del cycle cel·lular i l’apoptosi. Entre aquest gens trobem: p21, Gadd45, MDM2, Bax, Ciclina G i molts d’altres (Somasundaram K, 2000). L’expressió d’aquests gens atura la replicació de l’ADN i indueix la seva reparació. Si el dany en el

DNA és irreparable, p53 actua inhibint l'angiogènesi interaccionant amb TSP-1 o bé, desencadenant l'apoptosi. Aquest segon efecte es realitza per l'activació transcripcional de mediadors com "p-53 up-regulated modulator of apoptosis" (PUMA), un membre de la família BCL-2 que actua modulant l'activitat de la proteïna pro-apoptòtica (Chipuk, 2005) (Figura 13).

La regulació de p53 es dona principalment per la proteïna MDM2. Aquesta proteïna interfereix en l'activitat de p53 sense produir danys en l'ADN (Oliner, 1992). L'associació de p53 amb la proteïna MDM2 produirà una ubiquïtinització de p53 i la seva posterior degradació via proteossoma (Shieh, 1997).

Mutacions a p53 podrien estar involucrades en el desenvolupament del CCR (Baker, 1989), i es tractaria d'un procés tardà que actuaria durant la transició d'adenoma a carcinoma (Fearon, 1990).

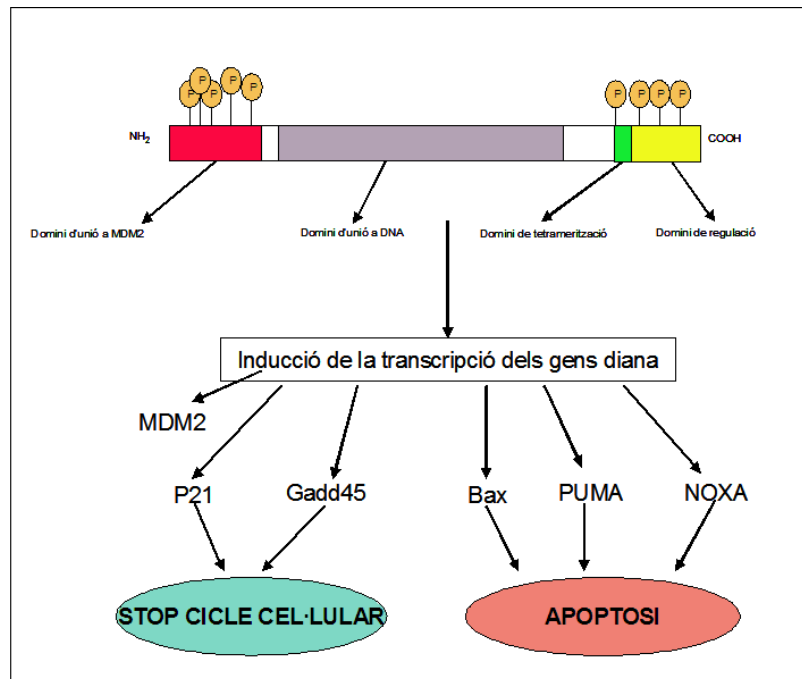


Figura 13: Actuació de la proteïna p53.

✓ **DCC/Smad4:** el gen *Deleted in Colorectal Carcinoma* (DCC) va ser el primer gen descrit en el braç llarg del cromosoma 18 (18q21.3) com a gen supressor tumoral (Volgstein, 1998). Aquest gen de 29 exons codifica per una proteïna de membrana amb homologia amb les molècules N-CAM. La seva pèrdua pot influir a la supervivència cel·lular i a la mobilitat. L'expressió de DCC s'ha vist reduïda o absent en carcinomes gàstrics, de pròstata, pàncrees, esòfag i endometri i s'ha suggerit que la seva inactivació

pot ser un factor important en el desenvolupament i en la progressió tumoral. Aproximadament en el 40% dels adenomes i carcinomes es detecta la delecció de DCC. En el cas de les neoplàsies colòniques esporàdiques, la delecció d'una regió que inclou el locus DCC es produeix en un 70% dels casos. (Gotley, 1996; Tarafa, 2000). La pèrdua d'aquest gen és un marcador pronòstic en el CCR (Shibata, 2007)

El gen *Deleted in Pancreatic Cancer Locus 4* (Smad4/DPC4) també està localitzat al cromosoma 18 (18q21.1); a una zona molt propera d'on es troba el gen DCC (Howe, 1998). Aquest gen, que està format per 11 exons (Hahn, 1996), codifica per una proteïna de la via de transducció de TGF- β (Zhou, 1998). L'estimulació de TGF- β implica la fosforilació i l'activació dels gens Smad2 i Smad3 que formaran complexos amb Smad4. Aquests complexos s'acumularan en el nucli i regularan la transcripció dels gens diana; alguns dels quals estimularan la tumorigènesi mitjançant un augment del creixement cel·lular, un augment de la mobilitat cel·lular i un increment de l'angiogènesi; mentre que d'altres inhibiran els processos tumorals mitjançant una reducció en el creixement cel·lular i un increment de l'apoptosi. (Inman, 2002) (figura 14)

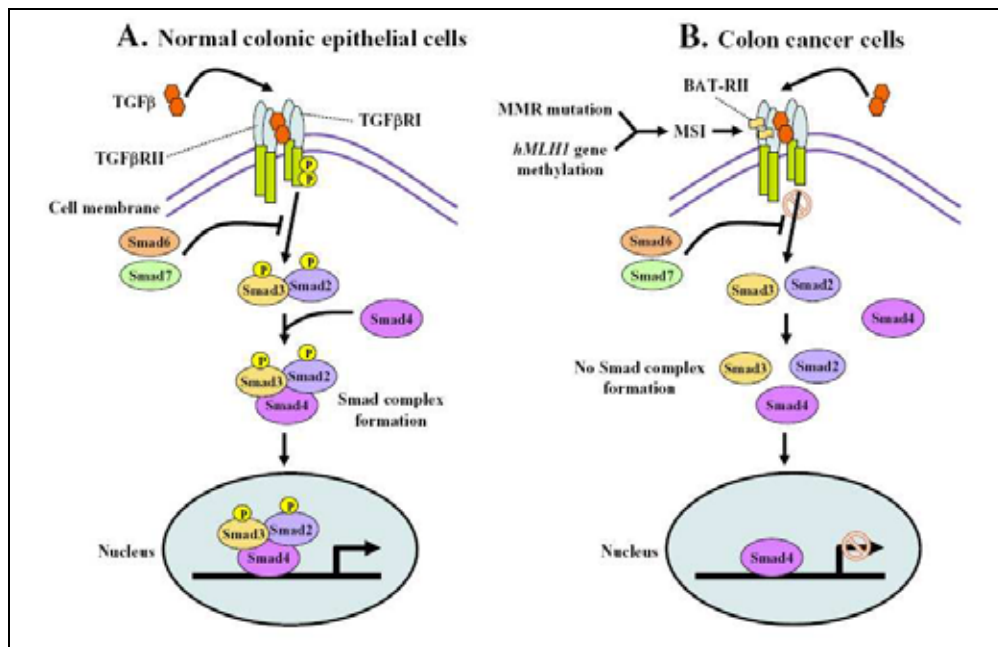


Figura 14: Via de transducció del senyal de TGF- β (Narayan, 2003).

Gens Caretaker: s'encarreguen de mantenir l'estabilitat del genoma i són els responsables de 1) corregir els errors que es puguin anar produint en la incorporació dels nucleòtids durant la replicació de l'ADN, també coneguts amb el nom de mismatch repair genes (MMR) i 2) reparar les alteracions de la molècula de DNA induïdes per agents externs, també coneguts amb el nom de nucleotide excision repair genes (NER). La presència de mutacions germinals en alguns d'aquests gens comporta que la cèl·lula tingui un mecanisme reparador deficient i implica l'acumulació de múltiples errors al llarg del genoma; fet molt característic dels tumors amb inestabilitat dels microsatèl·lits (MSI) (Blanes, 2006). Els microsatèl·lits són seqüències curtes que es repeteixen en tàndem. Es tracta de regions de l'ADN de difícil reparació i on la polimerassa comet múltiples errors. En individus sans aquests errors són corregits pel sistema de reparació però en persones que presenten defectes en aquest sistema, es produeix un acúmulo de mutacions en aquests microsatèl·lits donant lloc a aquesta patologia (MSI). D'altra banda, aquests errors en la replicació poden afectar també a zones de l'ADN incloses dins la pauta de lectura dels gens. Aquesta acumulació d'errors en la replicació de l'ADN és conseqüència de mutacions en els gens responsables de la seva reparació.

Dins del grup de gens que pertanyen als MMR genes hi trobem MSH2, MLH1, MSH6, MLH3, PMS1, PMS2 (Kinzler, 1996), els quals estan implicats en el CCR; la quinasa ATM i BRCA (Li, 2000). La reparació dels errors que tenen lloc durant la replicació de l'ADN (errors d'aparellament i petites insercions/deleccions d'una o dues bases) s'inicia per la unió d'heterodímers MSH2-MSH6 al fragment danyat. Aquesta primera fase va seguida per un canvi conformacional d'aquestes molècules el que facilita la unió del complex MLH1-PMS2. Posteriorment, es produeix l'escissió de la cadena d'ADN afectada i la síntesi d'una cadena nova. Quan s'han de reparar insercions/deleccions més llargues, probablement intervé el complex MSH2-MSH3 (Chung DC,1995) (figura 15).

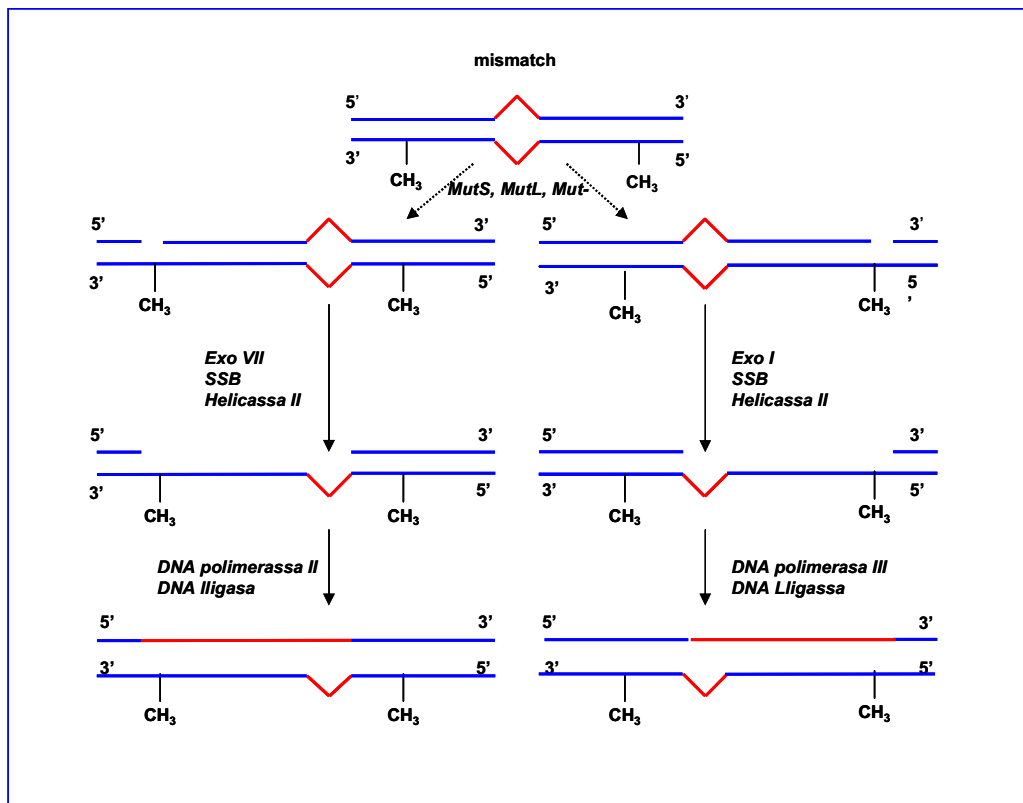


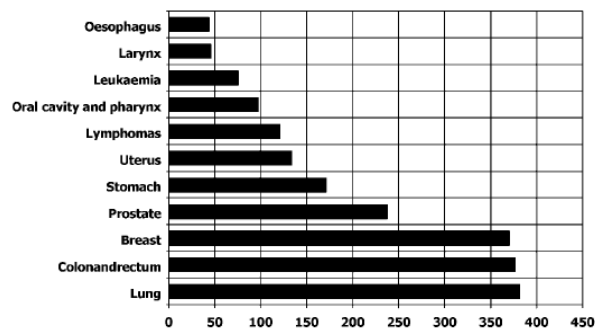
Figura 15: Model d'actuació dels MMR genes.

Com a membres de la família NER trobem els gens XPA, XPB, XPC, XPD, XPE, XPF, XPG, CSA i CSB involucrats en síndromes hereditàries com la Síndrome de Cockayne i la Tricotiodistròfia, no relacionades amb tumors; i la Xerodermia Pigmentada, relacionada amb melanomes malignes.

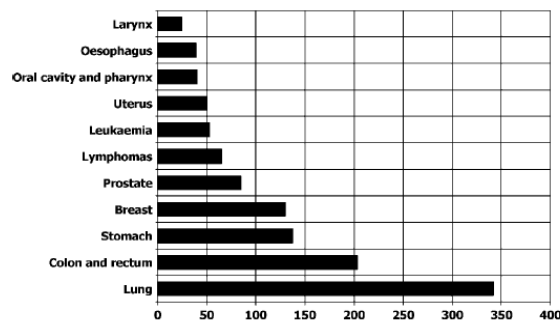
3.3.- CÀNCER COLORECTAL

3.3.1. Generalitats

El càncer colorectal (CCR) és la segona causa més comú de càncer, per darrera del càncer de pulmó, tant pel que fa a la incidència (13.2%) com a la mortalitat (203.000 morts l'any 2004) a Europa (Boyle, 2005) (taula 3,4). La metàstasi hepàtica és la via més comú de disseminació tumoral (Manfredi, 2006) i és la neoplàsia més freqüent del tub digestiu.



Taula 2: Incidència estimada de CCR a Europa l'any 2004.



Taula 3: Mortalitat estimada per CCR a Europa l'any 2004.

Als EUA, el CCR és la segona causa de mort per càncer; en el cas dels homes ocupa la tercera posició éssent superat pel càncer de pulmó i el de pròstata. (McCormick, 2002; Hawk, 2005).

A Espanya, en les dones, és la segona causa de mortalitat per càncer, ja que la primera és el càncer de mama (Sanz, 1992). El cas dels homes és semblant al dels EEUU.

A Catalunya es tracta de la neoplàsia més freqüent en ambdós sexes (20casos/100.000 habitants en el cas de les dones i 30 casos/100.000 habitants en el cas dels homes). (Liotta, 1991; Esteve, 1993). La incidència de càncer a Catalunya mostra una tendència creixent en el període transcorregut des de l'any 1980, tant en els homes com pel que fa a les dones tot i que és superior en el cas dels homes. En canvi, la mortalitat és similar en ambdós sexes. (Skibber, 2001).

Es tracta d'una malaltia molt poc freqüent en persones més joves de 50 anys a excepció d'aquells que presenten una predisposició genètica o que presenten una història de malaltia inflamatoria crònica intestinal (Hamilton, 2000), però a partir d'aquesta edat la seva incidència augmenta molt ràpidament. En els últims 30 anys ha anat augmentant i actualment representa el 15% dels nous casos de càncer diagnosticats. (Luk, 1993).

Tradicionalment es divideix en CCR esporàdic o familiar. La major part dels casos corresponen a formes esporàdiques de la malaltia essent la proporció de casos familiars d'entre un 20-25% (de la Cahepelle, 2004; Benito, 2006). Existeixen dues síndromes hereditàries associades al CCR, la Poliposi Adenomatosa Familiar (FAP) i el càncer colorectal hereditari no associat a poliposi (HNPCC) (Rustgi, 1994). Tots dos tipus de càncer tenen una gran importància des d'un punt de vista fisiopatològic, clínic i terapèutic. Alguns dels gens que es troben mutats a nivell germinatiu tant a la FAP com a HNPCC, es troben implicats en el desenvolupament del CCR esporàdic. A més a més, gràcies a la identificació dels gens responsables s'ha pogut establir el diagnòstic pressimptomàtic dels individus portadors de mutacions en aquests gens i per tant que presenten un risc de desenvolupar la malaltia (Giardiello, 2001).

Tenim poques dades sobre la distribució del CCR entre les diferents races; però existeixen estudis realitzats a la població dels Estats Units que demostren un major predomini d'aquesta patologia en individus de raça negra (afroamericans) tot i que a l'Àfrica, la presència d'aquesta malaltia és molt infreqüent (Troisi, 1999). Aquests individus també presenten una taxa de mortalitat superior però que podria ser causa no d'un major grau d'agressivitat del tumor sinó conseqüència d'un pitjor accés a l'assistència sanitària (Akerley, 1993).

3.3.2. *Factors de risc*

- Edat < 40 anys: es tracta d'un factor de gran importància i s'estableix com a límit mínim en les campanyes de diagnòstic precoç de la malaltia.
- Adenomes: és possible afirmar que tots els CCR s'originen a partir d'un adenoma.
- Colitis Ulcerosa: pacients que presenten aquesta malaltia amb una evolució d'entre 7-10 anys presenten un risc incrementat d'entre 5 a 11 vegades, respecte la població normal de desenvolupar un CCR.
- Colitis Granulomatosa: pacients amb Malaltia de Crohn presenten un risc 20 vegades superior de desenvolupar un CCR.
- Predisposició genètica: dins d'aquest grup s'hi inclouen diferents situacions que engloben des de síndromes polipòsics familiars, tumors hereditaris no polipòsics i síndromes de càncer familiar.

3.3.3. *Carcinoma colorectal esporàdic*

El desenvolupament del CCR resulta de l'activació de determinats oncogenes (KRas) i de la inactivació de gens supressors (APC, TP53, SMAD4, DCC) (figura 16). En aquest model s'ha observat com els diferents estadis de progressió es corresponen amb l'aparició i l'acumulació de mutacions en gens concrets. La primera alteració detectada a l'epiteli normal és, freqüentment, la deleció d'un fragment del braç llarg del cromosoma 5 que inclou al gen APC. Quan l'adenoma creix i assoleix una mida de més d'1 cm de diàmetre aparèixen mutacions en k-Ras i, posteriorment, s'observen delecions en diferents cromosomes; generalment en el cromosoma 17 i en el cromosoma 18 que inclouen els gens p53 i DCC respectivament. Aquestes mutacions ja provoquen l'aparició de carcinomes invasius. Actualment s'estan començant a identificar altres gens que s'han trobat mutats i associats a alguns dels estadis anteriors com és el cas de TGF β -RII (relacionat amb l'epiteli normal); DPC4 (relacionat amb l'adenoma) i bcl-2 (carcinomes) (Rosa, 2000).

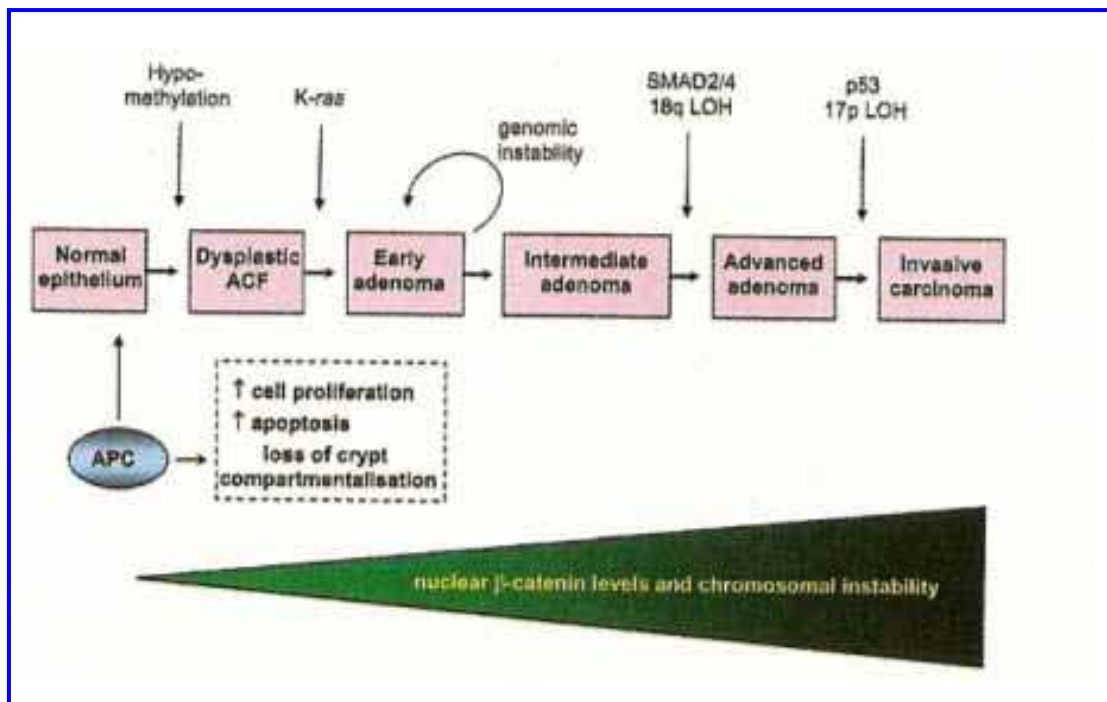


Figura 16: Model genètic en el càncer colorectal.

Es requereixen 4 o 5 mutacions en una cèl·lula perquè aquesta es transformi en maligne. El comportament biològic del tumor depèn més de l'acumulació de mutacions que no pas de l'ordre en com aquestes mutacions s'han produït (Fearon, 1990), tot i que les mutacions de p53 són un esdeveniment tardà i les d'APC solen ser un esdeveniment precoç.

L'any 2002, l'estudi de Rajagopalan i col·laboradors (Rajagopalan, 2002), indica que les mutacions de k-ras tenen lloc després de la iniciació del procés tumoral però abans de la seva conversió maligna. I això implica que les mutacions de ras solen aparèixer després de la pèrdua d'APC, però abans de la inactivació de DCC i p53. Les mutacions de ras s'associen com a mínim amb dues característiques histopatològiques de forma més específica; major tamany i major intensitat de displàsia.

3.3.4. Síndromes canceroses hereditàries

Les síndromes hereditàries més comuns són la Poliposi Adenomatosa Familiar (FAP) i el càncer de còlon hereditari no polipòsic (HNPCC).

3.3.4.1. Poliposi Adenomatosa Familiar

La FAP és una malaltia hereditària autosòmica dominant caracteritzada per l'aparició de nombrosos pòlips adenomatosos distribuïts per còlon i recte (entre 100 i 1000). La seva taxa de malignització és molt baixa tot i que l'elevat nombre de pòlips que apareixen asseguren l'aparició d'un càncer de còlon a una edat molt jove. Sense tractament, un o més d'aquests adenomes pot proliferar i convertir-se en adenocarcinoma (de la Chapelle, 2004).

Mitjançant estudis de lligament genètic s'ha pogut identificar el gen responsable d'aquesta malaltia; l'APC (Adenomatous polyposis coli). Es tracta d'un gen localitzat al braç llarg del cromosoma 5; 5q21, (Grodén, 1991). Aquesta proteïna està formada per 2843 aminoàcids i presenta molts dominis amb diferents funcions cada un d'ells. Més del 95% de mutacions d'APC són insercions o delecions que donen com a resultat final una proteïna truncada (Human Genetic Disease Database). Aquesta proteïna APC juga un paper important en la regulació de l'apoptosi ja que s'ha comprovat que transferint un gen APC normal a una cèl·lula amb els seus dos gens APC mutats, pot induir-se l'apoptosi.

A l'existir una bona relació genotip-fenotip, la localització de la mutació condiciona l'espectre clínic de la malaltia (Fodde, 2001). La poliposi clàssica està normalment associada a mutacions que apareixen entre els codons 169 i 1600. La hipertròfia congènita pigmentària de la retina apareix a pacients amb mutacions entre els codons 463 i 1387 (de la Chapelle, 2004). Una altra varietat clínic de la FAP, la Síndrome de Gardner apareix com a conseqüència de mutacions en una regió relativament petita entre els codons 1403 i 1578.

3.3.4.2. Càncer de Còlon Hereditari no Polipòsic (HNPCC)

També conegut amb el nom de la Síndrome de Lynch. Es tracta d'una malaltia hereditària amb un patró autosòmic dominant que es caracteritza pel desenvolupament precoç del CCR i, freqüentment, aquest tipus de malaltia presenta un risc incrementat a l'hora de patir neoplàsies d'altres orígens com d'endometri, d'estómac, d'ovari, genitourinàries, de pàncrees i d'intestí prim. Afecta aproximadament 1/500 individus (Kinzler, 1996). Mentre que en el carcinoma esporàdic la degeneració d'un adenoma succeeix al cap d'uns 5 o 10 anys, en el HNPCC la progressió pot tenir lloc en només dos anys.

La causa d'aquest tipus de càncer és l'aparició de mutacions en la línia germinal dels gens reparadors del DNA o *MMR* (MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2) (Vasen, 2007). Donat l'elevat risc de desenvolupar un CCR (superior al 80% al llarg de la vida dels individus amb mutacions germinals en els gens *hMSH2* i *hMLH1*) (Vasen, 2001), diversos autors suggereixen la possibilitat d'efectuar una colectomia profilàctica en tots els individus pertanyents a famílies que compleixen els criteris diagnòstics de CCHNP i que es demostrin portadors de mutacions en aquests gens. Lindor, l'any 2005, va publicar un estudi on s'analitzava la incidència de HNPCC seguint els Criteris d'Amsterdam Tipus 1. A l'estudi hi va incloure 90 famílies amb defectes en els gens reparadors i 71 famílies que no presentaven aquests defectes. La conclusió de l'estudi va ser que les famílies que no presentaven defectes evidents en els gens MMR presentaven un patró d'incidència de CCR diferent al de les famílies que si presentaven evidències de defectes en aquests gens (Lindor, 2005).

Actualment el diagnòstic clínic d'aquesta síndrome es basa en el compliment dels anomenats criteris d'Amsterdam I i II o els criteris de Bethesda (Vasen, 1991; Vasen, 1999) (taula 4)

| |
|--|
| CRITERIS D'AMSTERDAM I (l'individu els ha de complir tots) |
| <ul style="list-style-type: none"> → 3 o més familiars amb CCR(confirmació histopatològica), un d'ells familiar de 1er grau dels altres dos → 2 generacions successives afectes → 1 o més CCR diagnosticats abans dels 50 anys |
| CRITERIS D'AMSTERDAM II (l'individu els ha de complir tots) |
| <ul style="list-style-type: none"> → 3 o més familiars amb CCR o un tumor associat a HNPCC, un d'ells familiar de 1er grau dels altres dos → 2 generacions successives afectes → 1 o més CCR diagnosticats abans dels 50 anys |
| CRITERIS D'E BETHESDA (l'individu n'ha de complir un) |
| <ul style="list-style-type: none"> → individus de famílies que compleixen els criteris d'Amsterdam → individus amb 2 càncers associats a HNPCC → individus amb CCR i un familiar de 1er grau amb CCR i/o un tumor associat a HNPCC (un d'ells diagnosticat bas dels 45 anys i/o un adenoma colònic (diagnosticat abans dels 40 anys) → individus amb CCR o càncer d'endometri diagnosticat abans dels 45 anys → individus amb CCR dret, indiferenciat, diagnosticat abans dels 45 anys → individus amb CCR en cèl·lules en anell de segell, abans dels 45 anys → individus amb adenomes colònics diagnosticats abans dels 40 anys |

Taula 4: Criteris d'Amsterdam I, II i de Bethesda per al diagnòstic de CCHNP.

3.3.5. *Localització dels adenocarcinomes*

La majoria de neoplàsies es localitzen a nivell distal (còlon descendent/sigma). (Haenzsel, 1971) tot i que estudis més recents mostren una tendència a la major aparició de neoplàsies proximals (còlon dret/transvers) (Cady, 1993), encara que aquest fet podria estar justificat pel perfeccionament de les tècniques endoscòpiques que permetria l'accés directe cap a aquestes regions (Bartram, 1993). A més a més, els carcinomes de còlon dret semblen ser més freqüents en gent d'avançada edat, (Slater, 1982), individus de raça negra (Thomas, 1992) i en pacients amb malaltia diverticular (Stephansson, 1993).

En un estudi presentat l'any 2002 per McGrath i els seus col·laboradors (McGrath, 2002), on s'examinen i comparen 4 tècniques d'exploració/detecció (colonoscòpia amb endoscopi flexible fins l'angle esplènic, sigmoidoscòpia, colonoscòpia virtual i colonoscòpia convencional) buscant així la tècnica idònia per a ser utilitzada en programes de detecció precoç i la conclusió a la que s'arriba és que la colonoscòpia convencional és la tècnica que millor resultats ens proporciona a l'hora de detectar la malaltia (Winawer, 2005).

3.3.6. *Progressió del tumor*

La metàstasi és la principal causa de mort dels pacients de càncer. Ja hem vist anteriorment que el càncer és el resultat de l'acumulació de mutacions en una serie de gens determinats (coneguts amb el nom de protooncogens i gens supressors tumorals). L'acumulació de tumors produeix una hiperplàsia o creixement desordenat i posteriorment, invasivitat cel·lular, angiogènesi i finalment metàstasi.

El procés comença amb el fenomen d'invasivitat que consisteix en la pèrdua d'adhesió intercel·lular, que causarà la separació de les cèl·lules veïnes; la degradació de la matriu extracel·lular, deguda a l'augment de l'activitat proteolítica com a conseqüència de l'expressió i secreció de proteases; i finalment, un augment de la mobilitat per part de les cèl·lules canceroses respecte les cèl·lules normals, ja que a mida que augmenta el potencial invasiu i metastàsic incrementa també el grau de mobilitat.

A més a més de la invasivitat cel·lular, el creixement tumoral també requereix d'una vascularització per arribar a ser metastàsic. Aquesta vascularització es realitza mitjançant la formació de nous vasos sanguinis a partir de vasos preexistents. Aquest procés es coneix amb el nom d'angiogènesi. És un mecanisme necessari pel creixement

del tumor més enllà d'1 a 2mm de diàmetre i permet al tumor primari accedir als nutrients necessaris per a poder créixer i disseminar les seves cèl·lules canceroses pel torrent circulatori. Finalment, si alguna d'aquestes cèl·lules sobreviu a aquesta extravasació i colonitza algun teixit distant, s'iniciarà el creixement de nous tumors.

3.3.7. Característiques clíniques del càncer colorectal

La transformació neoplàsica que pateix l'epiteli del còlon fins a convertir-se en carcinoma colorectal és un fenomen progressiu. La fase inicial es caracteritza per una proliferació de la mucosa seguida d'una sèrie de trastorns que donaran lloc a la formació d'adenomes. Aquests adenomes seran els veritables precursors del càncer de còlon perquè en ells és on es desenvoluparà el carcinoma invasor. Aquest carcinoma va progressant fins que arriba a infiltrar les capes de la paret intestinal i assoleix les vies de disseminació limfàtiques i venoses. És en aquest moment quan la reacció estromal i els fenòmens d'angiogènesi induïts pel tumor, determinaran la capacitat invasiva i metastatitzant.

Generalment, el CCR no dona símptomes fins a fases avançades de creixement. Prèviament al diagnòstic poden aparèixer canvis en el ritme intestinal i/o hemorràgies ocultes en les femtes. Aquest sagnat pot passar inadvertit, ja que normalment s'associa a estrenyiment i a la presència d'hemorroides.

La forma de debutar varia segons quina sigui la seva localització. El carcinoma de còlon dret s'observa freqüentment en sexe femení i en pacients d'edat avançada i normalment presenta inestabilitat dels microsatèl·lits i una proteïna p53 normal. D'altra banda els carcinomes localitzats al còlon esquerre, que s'observen més freqüentment en sexe masculí i en edats més joves; es caracteritzen per la presència d'inestabilitat cromosòmica i una p53 mutada (McCashland, 2001; Iacopetta, 2002; Fukatsu, 2007).

Els carcinomes de còlon dret presenten com a símptomes l'hemorràgia oculta i una anèmia ferropènica secundària que és conseqüència directe d'aquest sagnat crònic. Els carcinomes de còlon esquerre ocasionen obstrucció intestinal amb dolor còlic, vòmits, distensió abdominal i tancament intestinal.

A part de tota aquesta simptomatologia local, també existeixen uns símptomes generals com astènia, anorèxia, febre tumoral i pèrdua de pes.

3.3.8. Pronòstic del carcinoma de còlon i recte

La taxa de supervivència a cinc anys oscil·la entre un 40% i un 60%. El 71% de recurrències apareixen dins dels dos primers anys de tractament i un 90% ho fan dins els següents cinc anys.

Les taxes de mortalitat presenten una distribució global molt semblant a les taxes d'incidència. A l'estudi realitzat pel grup de López-Abente, l'any 1997 (López-Abente, 1997), l'evolució de la mortalitat com a conseqüència del CCR mostra un increment anual de l'1,62% en el cas dels homes i del 0,85% en el cas de les dones.

La supervivència d'un pacient diagnosticat de CCR ve determinada per un conjunt de factors de pronòstic que són d'una banda inherents al comportament del tumor i d'altra banda de l'hoste. La majoria de factors són comuns per la majoria de tumors sòlids, però en el cas del CCR n'hi ha uns d'específics que han de tenir-se més en consideració. Entre ells hi destaquen la localització del tumor; presència/absència de simptomatologia, estadi de Dukes i nivells serològics de CEA. Altres factors pronòstics que poden tenir-se en compte són: edat, sexe, extensió local, mida, tipus histològic i grau, reacció inflamatòria peritumoral, marges tumorals i afectació de ganglis limfàtics.

Per l'estadiatge o classificació de la malaltia segons la seva extensió, tenim diverses classificacions. La més utilitzada per la seva claredat i la seva correspondència amb el pronòstic és la classificació original de Dukes, modificada posteriorment per Astler i Coller (taula 5)

| ESTADI | EXTENSIO |
|---------------|---|
| A | tumor limitat a mucosa i submucosa |
| B1 | penetració tumoral a la capa muscular pròpia |
| B2 | penetració tumoral a la capa serosa |
| B3 | afectació de viscères adjacents |
| C1 | B1 més afectació ganglionar |
| C2 | B2 més afectació ganglionar |
| C3 | B3 més afectació ganglionar |
| D | Invasió dels òrgans distants |

Taula 5: Classificació de Dukes modificada per Astler i Coller

Posteriorment, es va desenvolupar el sistema d'estadiatge TNM (Hutter, 1986) pel CCR que és més complert però més difícil d'utilitzar. Aquest sistema de classificació considera paràmetres clínics, radiològics i d'anatomia patològica

classificant els tumors en quatre estadis diferents. Aquest sistema ens indica la propagació del càncer en relació a les capes afectades de la paret de còlon, recte, afectació dels nòduls limfàtics i d'òrgans, ja siguin veïns o situats a més distància de l'origen tumoral. (figura 17, taula6)

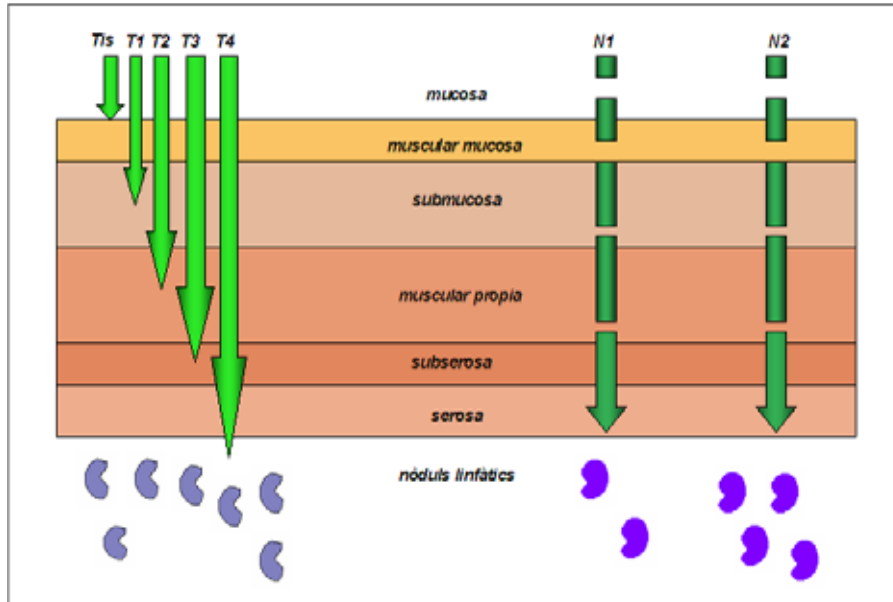


Figura 17: Diferents estadis de la invasió tumoral.

| | | | |
|-------------------|-------------|------|----|
| Estadi I | T1 | N0 | M0 |
| | T2 | | |
| Estadi II | T3 | N0 | M0 |
| | T4 | | |
| Estadi III | Qualsevol T | N1,2 | M0 |
| Estadi IV | Qualsevol T | N3 | M+ |

| | |
|-----------|--|
| T1 | Invasió fins a la submucosa |
| T2 | Invasió parcial de la muscular pròpia |
| T3 | Si hi ha serosa: envaeix la muscular pròpia fins la subserosa o serosa, sino, envaeix la muscular pròpia |
| T4 | Si hi ha serosa: infiltra el peritoneu o a través seu estructures o òrgans veïns. Si no hi ha serosa envaeix directament altres òrgans |
| N0 | Els ganglis limfàtics no estan afectats |
| N1 | 1-4 ganglis positius |
| N2 | >4 ganglis positius |
| N3 | Metàstasi en qualsevol gangli situat sobre trajectes vasculars |
| M0 | No hi ha metàstasi a distància |

Taula 6: Classificació CCR pel sistema TNM

T es refereix al tumor primari; N al nombre de ganglis afectats i M a la disseminació metastàsica.

Un cop s'ha identificat la categoria TNM pel pacient, aquesta informació es combina per determinar l'estadi de la malaltia, que després podrà utilitzar-se per predir la supervivència del pacient (O'Connell, 2004). L'estadiatge dels nòduls limfàtics és el marcador pronòstic més influent a l'hora de considerar si el pacient ja està lliure de malaltia i a l'hora de considerar la supervivència global, tot i que existeix certa heterogeneïtat a cada estadi tumoral (Jemal, 2005).

3.3.9. Etiologia del càncer colorectal

Els motius de l'elevat risc de CCR en els països desenvolupats no estan del tot clars. El risc de patir CCR està associat als antecedents familiars però també pot tenir un component ambiental força important. Entre els factors ambientals més estudiats destaquem el tabaquisme, el consum d'alcohol, la pràctica d'exercici físic i la influència de la dieta.

3.3.9.1. Tabaquisme i consum de begudes alcohòliques

Existeixen estudis realitzats als EEUU on s'observa que fins a un 20% de casos de CCR poden estar relacionats amb el tabac. Els carcinògens derivats del tabac arriben a la mucosa colorectal a través del tracte digestiu o a través de la circulació i poden actuar negativament en l'expressió de gens relacionats amb el càncer. Existeixen estudis epidemiològics (Giovannucci, 2001) en els que es posa de manifest l'existència d'una relació dosi-depenent respecte al nombre de paquets consumits a l'any (relació que augmenta a partir dels 10 paquets/any), la duració de l'hàbit tabàquic (relació que augmenta a partir dels 20-30 anys de consum), el nombre d'anys d'abstinència (en el cas dels ex-fumadors) i l'edat d'iniciació al tabaquisme.

El consum diari d'alcohol està associat amb un augment de risc de patir CCR. Aquesta relació entre ingesta d'alcohol i malaltia és més elevada en els tumors distals que en els proximals (Scheppach, 1999). Part del seu mecanisme d'actuació carcinogènica és degut a la seva interferència amb la disponibilitat d'àcid fòlic, ja que es tracta d'un component essencial per totes aquelles reaccions que necessiten la transferència de grups metil.

L'alcohol actua sobre la carcinogènesi afavorint la proliferació cel·lular de la mucosa i donant lloc a una hiperproliferació que la farà més susceptible a l'acció d'altres carcinògens com el fum del tabac. L'efecte combinat dels nivells alts d'alcohol i

tabaquisme representen un risc més alt del 70% de patir un CCR que en aquells individus que només presenten un dels dos hàbits (Slattery, 2001).

3.3.9.2. Exercici Físic

Un estil de vida sedentari pot considerar-se com una causa important de desenvolupar un CCR ja que aquest sedentarisme es relaciona amb un augment de la temperatura intracolònica i per tant una estimulació de la proliferació tumoral. Contràriament, la pràctica diària d'exercici provocaria un augment del peristaltisme colònic que implicaria un descens del temps en que els factors carcinògens intraluminals estarien en contacte amb la mucosa colònica (Holmqvist, 2000, Stevens, 2006).

3.3.9.3. Hàbits alimentaris

Entre els factors de risc ambientals implicats en la neoplàsia colorectal, el més important és la dieta (Mason, 2002). Una baixa ingesta de fibres i el consum de carn vermella i de greixos Omega-3 i Omega-6 de manera desequilibrada (Norat, 2002) pot contribuir a incrementar el risc de càncer. De la mateixa manera, el consum de fruita, vegetals, calci, àcid fòlic, Vitamina B12 i Vitamina D ens ajudarien a prevenir el càncer (Divisi, 2006). Aproximadament, entre un 30% i un 40% de tots els tipus de càncer podrien prevenir-se seguint una dieta i un estil de vida saludable (Divisi, 2006; González, 2006).

Es considera, de manera generalitzada, que la pauta dietètica associada a la carcinogènesi està caracteritzada per: 1) el baix contingut en fibra vegetal no absorbible; 2) l'alt contingut d'hidrats de carboni refinats; i 3) l'alt contingut en greixos (McCullough, 2004).

- Greixos: S'han realitzat estudis on s'ha demostrat que en països que presenten una elevada ingesta de greix la incidència de càncer de mama, còlon i pròstata és més elevada que en aquells països que presenten una ingesta de greixos menor (Carroll, 1975; Armstrog, 1975). La ingesta de greix incrementa el risc de CCR per l'estimulació de la secreció mutagènica d'àcids biliars secundaris.
- Hidrats de Carboni: Els polisacàrids de la dieta inclouen midons (pasta, pa...), polisacàrids no midons i sucres. Els polisacàrids amb un índex de glucèmia alt

estan associats a nivells elevats de glucosa i insulina en sang. Si ens trobem en situacions de insulino-resistència, podria veure's incrementat el risc de càncer (Pereira, 2002). Existeix una certa controvèrsia en com els hidrats de carboni poden influir en el risc de càncer ja que hi ha estudis on no s'han trobat evidències d'una relació entre elevada glucèmia i càncer (Terry, 2003) i d'altres on sí s'ha trobat aquesta relació (Higginbotham, 2004).

- Vegetals i Fruita: Contenen nombroses substàncies amb activitat anticancerígena com l'àcid fòlic, els carotenoides, els flavonoides i les vitamines (Steinmez, 1991). Els mecanismes anticancerígens que poden presentar són entre d'altres l'alteració dels nivells hormonals (Adlercreutz, 2002), la modulació de la metil·lació del DNA (Duthie, 1999), i la prevenció de la formació d'adductes de DNA (Ames, 1995). S'ha de mostrar, però, que les dietes amb alt consum de fruita o vegetals poden reduir el risc de desenvolupar determinats tipus de càncer però no de tots ells (World Cancer Research Fund & American Institute for Cancer research, 1997). A més a més, augmentar la quantitat de fruites i vegetals en la dieta de pacients amb recurrència no representa una reducció en el risc d'adenomes colorectals (Schatzkin, 2002).
- Vitamines: S'ha descrit una associació negativa entre el consum de vitamina C i el risc de CCR (Stemmerman, 1990; Heilbrun, 1989). El consum de vitamina A i dels seus precursors dietètics s'associa amb una reducció del CCR (Birt, 1989). Aquesta vitamina A actuaria bloquejant la formació de radicals lliures (Troll, 1991). Shibata i els seus col·laboradors (Shibata, 1992) van realitzar un estudi prospectiu on troben que la disminució del risc de patir CCR mitjançant suplementes de vitamina A i vitamina C només és estadísticament significativa en dones. Els antioxidants com la vitamina C poden reduir el risc de càncer neutralitzant els radicals lliures que poden causar danys en el DNA. Carotenoides i flavonoides també poden tenir activitat antioxidant (Yang, 2001). La vitamina E també ajuda en la prevenció al risc de càncer mitjançant la reducció dels radicals lliures que poden danyar el DNA i també ajuda actuant a través del sistema immune.

Els greixos i els olis són la font principal de vitamina E (Institute of Medicine, 2002). D'altra banda, poblacions amb elevada exposició a la llum

ultraviolada (la vitamina D és sintetitzada per la pell després de l'exposició a aquest tipus de llum) presenten una disminució en el risc de càncer de mama, pròstata i còlon (McCollough, 2004)

- Fibra Dietètica: El paper de la fibra dietètica en la carcinogènesi del còlon va ser proposat per primera vegada per Burkitt l'any 1969. La idea va sorgir de la seva observació clínica de que el CCR (i d'altres alteracions) era una malaltia estranya en la població africana, les dietes de les quals són riques en aliments no processats (Burkitt, 1969). Posteriorment, diferents estudis epidemiològics han demostrat l'existència d'una associació entre ingesta de fibra i un menor risc de patir CCR (West, 1989; Vogel, 1989). La fibra s'uneix als àcids biliars disminuint el temps de trànsit intestinal, augmentant el volum de les femtes i fermentant els àcids grassos volàtils que actuaran com a anticarcinògens ja que, juntament amb la disminució del pH, podran disminuir la conversió d'àcids biliars primaris en secundaris (Burkitt, 1971; Stephen, 1980; Shankar, 1991).
- Calci: La ingesta de calci pot influir en el risc de desenvolupar un càncer; encara que té un doble paper; d'una banda pot disminuir el risc de CCR (Platz, 1999) però a la vegada una ingesta elevada de calci està associada amb el risc de desenvolupar altres tipus de càncer com és el cas del càncer de pròstata (Rodríguez, 2003). La protecció que ens dona el calci contra el CCR es fa mitjançant la seva unió amb àcids biliars secundaris i àcids grassos ionitzats del còlon per tal de formar sabons insolubles i així poder reduir els estímuls proliferatius de la mucosa del còlon i reduir-ne també la proliferació cel·lular (Lamprecht, 2001). Existeixen nombrosos estudis fets en animals que demostren que afegint un suplement de calci a la dieta s'arriba a disminuir la incidència de tumors en el còlon (Pence, 1996; Vinas-Salas, 1998). La major evidència d'aquest fet en humans la tenim en dos estudis realitzats els anys 1999 i 2000 (Baron, 1999; Bonithon-Kopp, 2000) on, de manera independent, es demostra que a pacients en els quals s'ha detectat la presència d'adenomes mitjançant la tècnica de la colonoscòpia, si se'ls afegeix un suplement de calci a la seva dieta, presenten menys probabilitat de desenvolupar adenomes recurrents en comparació amb pacients als quals se'ls administrava placebo (Miller, 2007).

- Àcid Fòlic: L'àcid fòlic és essencial per totes aquelles reaccions que necessiten la transferència de grups metil (Giovanucci,2002). La deficiència d'aquest àcid podria incrementar el risc de carcinogènesi colorectal a través de diferents mecanismes (Kim, 2004), com per exemple, hipometilació del DNA i hipermetilació de zones promotores de DNA que afectaria a l'expressió de gens supressors tumorals i a l'expressió de gens reparadors del DNA. Una ingesta adequada d'àcid fòlic protegeix contra el CCR (de Vogel, 2006) però existeixen tota una sèrie d'estudis que demostren el doble paper que pot jugar el fòlic ja que d'una banda pot prevenir la carcinogènesi en teixit sa, però a la vegada pot estimular el creixement de tumors ja existents (Ulrich, 2005).

3.4.-Gens Estudiats Implicats en el Desenvolupament Embrionari i en el Càncer Colorectal

3.4.1. Generalitats

Existeix un nombre d'estudis del desenvolupament que han identificat un conjunt de gens que afecten al destí i a la proliferació cel·lulars durant el desenvolupament intestinal. Alguns d'aquests gens són Hes1, Math1, Rac1 i TCF4 (Vidrich, 2003).

Quan es va comprovar que existia una certa associació familiar en alguns tipus de càncer, es va començar a pensar que es tractava d'una malaltia genètica.

Els primers descobriments de gens alterats en càncer són de principis dels anys 80. En els darrers anys s'ha vist que la majoria dels gens alterats són gens i vies implicades en el desenvolupament embrionari.

Funcionalment parlant, totes les característiques que ens defineixen un teixit tumoral com poden ser l'evasió de la mort cel·lular programada, l'angiogènesi sostinguda, la invasió tissular i els processos metastàsics entre d'altres, ens indiquen que es tracta d'un creixement sense control i, com a conseqüència, el desenvolupament d'un càncer.

Podem parlar de dos tipus d'alteracions en la maquinària genètica; *alteracions de les vies genètiques* i *alteracions de gens*. En el càncer el que muten no són les vies sinó els gens i l'alteració d'un sol gen pot produir el trastorn de tota una via amb greus conseqüències pel que fa al funcionament cel·lular. S'ha vist que Delta/Notch, Wnt/Frizled, Hedgehog/Patched i TGF β /BMP, que són les vies més importants en el període del desenvolupament, presenten alteracions en diferents tipus de càncer donant avantatges a les cèl·lules tumorals (figura 18).

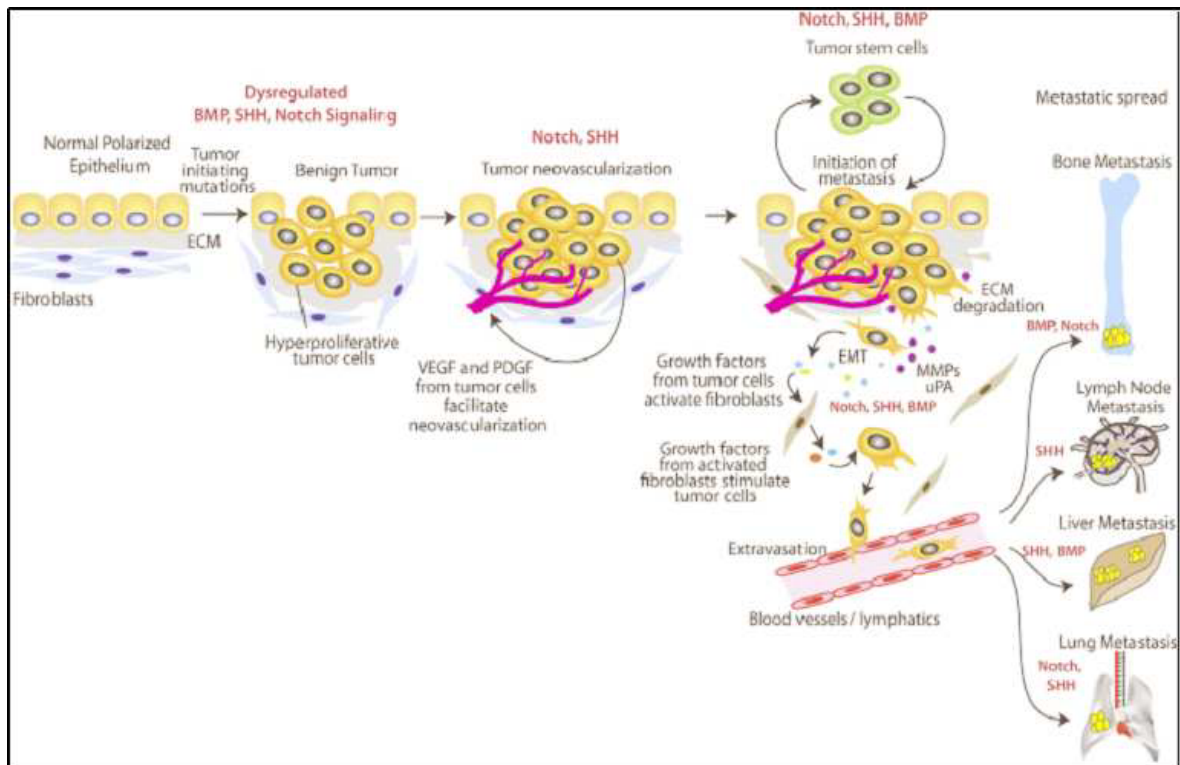


Figura 18: Vies del desenvolupament implicades en la progressió tumoral i la metastasi (Bailey, 2007).

3.4.2. Família Hedgehog

3.4.2.1. Generalitats

Les molècules senyalitzadores, o citosines, són factors de creixement que intervenen en la majoria d'interaccions entre els grups cel·lulars dels embrions. S'han identificat nombroses famílies de molècules senyalitzadores, però una de les més importants en el desenvolupament embrionari és la família Hedgehog (Oniscu, 2004).

La seva via de senyalització va ser primerament descrita en *Drosophila*. Tots els components de la via són els responsables de determinar l'orientació anteroposterior del desenvolupament de les estructures embrionàries de *Drosophila* i de les seves larves.

A *Drosophila* trobem només un gen de la família Hedgehog, mentre que en vertebrats se n'han descrit tres: Sonic hedgehog (Shh), Desert hedgehog (Dhh) i Indian hedgehog (Ihh). Ihh regula la proliferació i diferenciació dels condrocits i el desenvolupament del pàncrees i s'expressa en el ronyó d'individus adults i en còlon. D'altra banda, Dhh s'expressa en els testicles d'individus adults.

Shh és un morfogen, és a dir, una molècula secretora la senyal de la qual pot especificar múltiples identitats cel·lulars ja que ens determina el patró de desenvolupament embrionari (Ingham, 2006). Aquest gen està format per tres exons localitzats al braç curt del cromosoma 7, en la posició 7q36, (figura 19). Durant l'embriogènesi té un paper molt important en el desenvolupament de l'ectoderma, el mesoderma i l'endoderma. En l'ectoderma temprà, Shh està involucrat en el desenvolupament d'estructures neuroectodèrmiques com són el tub neural, el cervell, el cerebel i les cèl·lules de la cresta neural (Ruiz-Altava, 2004) i estructures ectodèrmiques epitelials, com l'epidermis i els fol·licles pilosos (Chiang, 1999). En el mesoderma temprà, Shh està estretament relacionat amb el desenvolupament d'estructures mesodèrmiques extraembrionàries com poden ser les cèl·lules hematopoètiques (Bhardwaj, 2001) i factors angiogènics (Pola, 2001). En l'endoderma temprà, Shh està molt relacionat amb la formació dels pulmons (Miller, 2001), el pàncrees (Hebrok, 2000) i el tracte gastrointestinal (Ramahlo-Santos, 2000; Madison, 2004).

Les proteïnes de la família Hedgehog són sintetitzades com a molècules precursors de 45kDa i presenten un procés d'autoclivatge per l'extrem C-terminal d'aquest precursor.

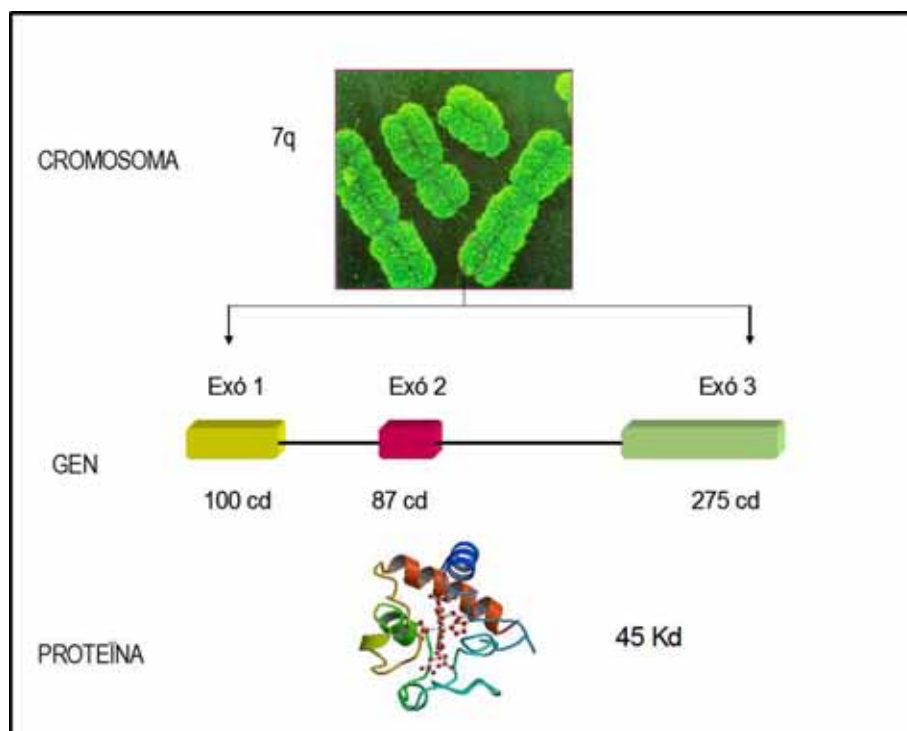


Figura 19: Sonic hedgehog.

Aquesta proteïna presenta una regió N-terminal molt conservada i una regió C-terminal més variable. Després de la síntesis i de l'alliberació del prepèptid pel reticle endoplasmàtic rugós, el pèptid senyalitzador es fragmenta i es produeix la glucosidació del pèptid restant. Encara dins la cèl·lula, Shh pateix un procés d'autoclivatge per l'activitat catalítica del seu fragment C-terminal. D'aquesta reacció d'autoclivatge n'obtenim 2 fragments; el C-terminal de 25kDa que no presenta cap altra funció coneguda; i el fragment N-terminal de 19kDa que és amb el que es donarà tota l'activitat senyalitzadora de Hedgehog (Ingham, 2001). L'autoclivatge de Hedgehog es dona mitjançant un intermediari tioèster que pateix un atac nucleofilic per part del colesterol (Porter, 1996; Ming, 1998).

Mentre es produeix aquesta fragmentació, el fragment N-terminal s'uneix covalentment a una molècula de colesterol. Posteriorment, aquest pèptid N-terminal de 19kDa és secretat per la cèl·lula. A la superfície d'una cèl·lula diana, i gràcies al colesterol, Shh, a través dels aminoàcids Asn50 i Ser156 del fragment N-terminal, s'uneix al seu receptor Patched (Ptch), que és una proteïna amb 12 dominis transmembrana. Ptch està a la vegada relacionat amb una altra molècula transmembrana, Smoothed (Smo); molècula necessària per activar la via de transducció de senyal de Shh.

3.4.2.2. Via de senyalització de Shh

En una situació sense presència de Shh, la proteïna transmembrana Ptch exerceix un efecte repressiu sobre Smo i com a conseqüència la via de transducció del senyal està inactivada. En canvi, quan trobem Shh a la cèl·lula, aquest s'uneix a Ptch de manera que desapareix l'acció inhibidora de Ptch sobre Smo. Un cop Smo és activat, actuarà sobre el complex Fu-Cos-Ci fosforilant-lo i provocant que perdi la seva capacitat d'unió als microtúbuls. En aquest moment, el complex Ci/Gli deixa d'estar sota el control de PKA, CK1 i GSK-3 β i és activat. Ara, Ci/Gli entra dins el nucli cel·lular on activarà la transcripció dels gens diana per Hh. Dins d'aquests gens diana hi trobem molècules involucrades en el cicle cel·lular, en l'adhesió cel·lular, en la transducció del senyal, apoptosi, molècules antagonistes de Wnt, inhibidors de proteases i proteïnes d'unió a metalls. A més a més, aquests gens diana solen acompanyar a un conjunt de proteïnes entre les quals destaquen HNF3 β , família Hox, diferents morfògens BMP, Ptch i la proteïna inhibidora de Hh (HIP). L'augment de Ptch i HIP produirà un efecte feedback en el senyal de Hh, fent que Hh reguli a la baixa la seva pròpia activitat. En definitiva,

Smo acaba modulant l'activitat de la família de proteïnes Gli regulant la seva expressió (Figura 20)

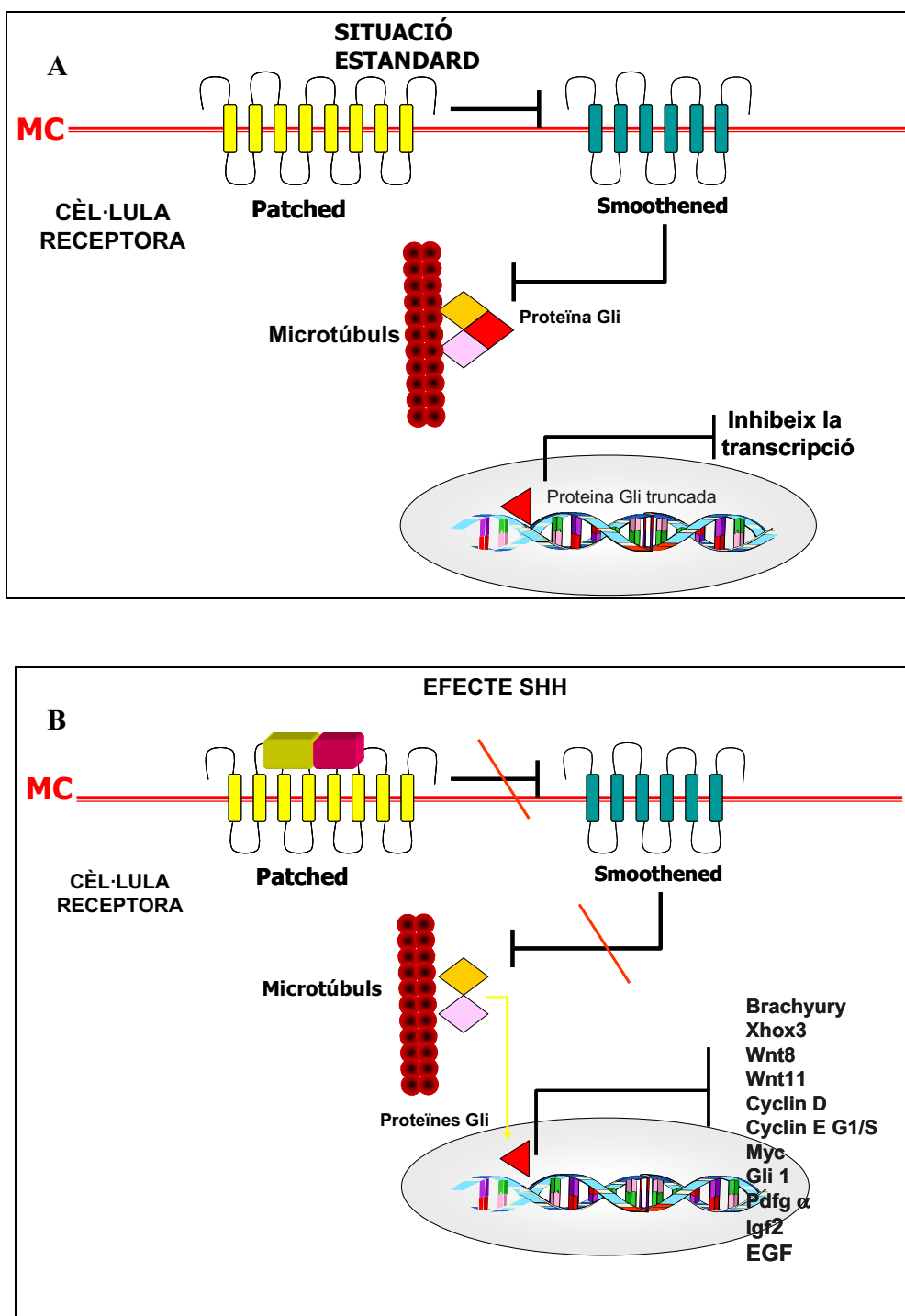


Figura 20: Via de transducció del senyal de Shh. A: absència de Hh. B: presència de Hh.

3.4.2.3. Funcions del gen Shh i el seu paper en el càncer

El paper de Shh en el desenvolupament de l'aparell gastrointestinal ha estat extensament estudiat en ratolí, on es troba expressat en l'endoderma intestinal als 8.5 dies després del coit (dpc) i en l'epiteli de l'intestí mig i l'intestí posterior en els estadis 11.5 dpc i 12.5 dpc (Ramahlo-Santos, 2000).

Recentment, l'expressió de Shh també ha estat descrita a la regió subepitelial dels microvil·li i de les criptes així com en les àrees adjacents al múscul llis i a les zones més allunyades de l'intestí (Powell, 2005; Madison, 2004). En el cas de teixits adults, Shh es troba altament expressat en aquelles àrees on hi trobem cèl·lules mare; és a dir, a la base de les criptes tant en el cas del intestí prim com del còlon (van den Brick, 2001, van den Brick, 2002).

L'expressió de Shh i de Ihh durant en el desenvolupament intestinal està involucrada en el procés de formació de l'eix anteroposterior, en el patró radial i en la proliferació i diferenciació de les cèl·lules mare. Ratolins tractats experimentalment de manera que no presentin expressió de Shh i de Ihh moren abans del naixement però presenten fenotips intestinals com poden ser l'estenosi duodenal, la transformació intestinal de l'estómac, còlon sense presència de ganglis i anus imperforat. Altres experiments que suprimeixen el senyal de Hh mitjançant la injecció d'un antiHh donen com a resultat una desorganització intestinal amb presència d'un epiteli vacuolat i un sistema de processament de lípids defectuós, però, en aquests casos, no existeix un efecte en la proliferació de les cèl·lules mare. Potser la diferència en aquests fenotips és el resultat de la necessitat del senyal de Shh durant la morfogènesi intestinal i aquesta necessitat només pot apreciar-se si el senyal de Shh és interromput durant l'embriogènesi.

Tot i que el senyal de Shh és vital en la morfogènesi intestinal, també participa en la diferenciació epitelial. Inhibint el senyal de Hh injectant ciclopamina, que és un antagonista de Shh, podem veure una expressió anormal de villina i una pèrdua d'expressió d'anhidrasa carbònica IV en l'epiteli colònic, dos productes gènics que intervenen en la diferenciació dels enteròcits.

Les mutacions de Shh es troben associades amb la prosencefàlia tant en ratolí com en humans (Chiang, 1996; Belloni, 1996). En el cas dels humans, la prosencefàlia pot anar acompanyada de malformacions en l'aparell gastrointestinal, com poden ser la malrotació intestinal, atrèsia esofagal i anus imperforat (Cohen, 1989). En els darrers

anys, molts investigadors han descrit que alteracions en l'expressió de Shh estan relacionades amb la tumorigènesi en el teixit endodèrmic (Thayer, 2003; Oniscu, 2004).

La desregulació de la via de transducció del senyal de Sonic té un paper molt important en la tumorigènesi i es va poder establir gràcies al descobriment de que mutacions inactivadores en el gen *Ptch* són responsables de certa predisposició a patir determinats tipus de càncer com el carcinoma de cèl·lula basal (BCC) i el medul·loblastoma (Wicking, 2001, Ruiz-Altaba, 2002). Els medul·loblastomes són tumors originats a la zona de la fosa posterior del cervell i representen un 20% dels tumors cerebrals en pacients pediàtrics. S'observen amb major freqüència a la primera dècada de vida i la meitat afecta a nens menors de 6 anys d'edat. D'altra banda, el BCC és un tumor cutani de creixement lent que implica canvis cancerosos en les cèl·lules basals de la pell. Més del 90% d'aquests carcinomes tenen lloc en àrees cutànies exposades de manera regular al sol o a algun tipus de radiació ultraviolada. Generalment aquest tipus de càncer s'inicia a partir dels 40 anys d'edat (Rubin, 2006).

A l'esquema podem veure diferents models d'activació de la via Hedgehog en càncer. El primer model ens mostra com afecten les mutacions que fan perdre la funció a *Ptch* o que representen un guany de la funció de *Smo*; la via de transducció del senyal sempre estarà activada independentment de la presència de Hh. En el segon model veiem que la cèl·lula tumoral produeix i respon al lligand; es tracta d'un model autocrí d'actuació. El tercer esquema ens mostra un model d'actuació paracrí, on les cèl·lules tumorals produeixen Shh i una cèl·lula veïna respon a la presència de Hh produint factors de creixement addicionals que seran utilitzats pel tumor per créixer i sobreviure (figura 21)

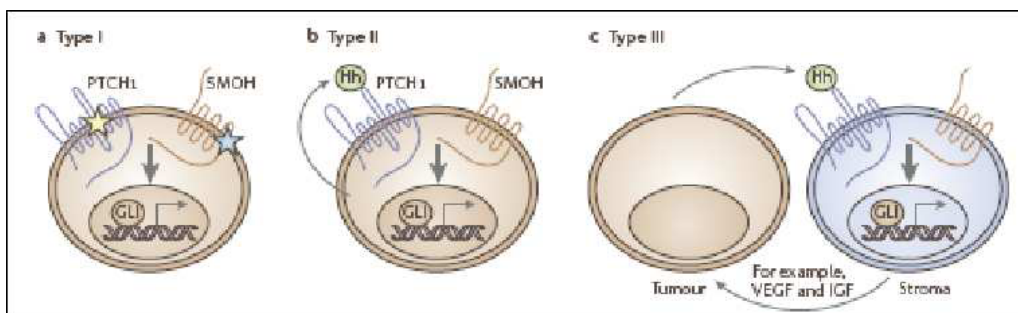


Figura 21: Models d'activació de la via Hh en càncer. (Rubin, 2006).

3.4.3. Família CEA

3.4.3.1. Generalitats

L'antigen carcínomic embrionari, o CEA, va ser descrit per primera vegada l'any 1965 per Gold i Freedman (Gold, 1965a; Gold, 1965b) quan van identificar un antigen que es trobava present tant a còlon fetal com en l'adenocarcinoma de còlon però que no es trobava en el còlon adult sa. Com que la proteïna només va ser detectada en teixit fetal i cancerós, se la va anomenar antigen carcínomic embrionari. Estudis posteriors han demostrat que CEA també es troba present en el teixit sa de l'adult encara que les seves concentracions són 60 vegades més baixes que en el cas del teixit cancerós (Boucher, 1989).

La família CEA està formada per 29 gens localitzats al cromosoma 19q13.2 i entre els marcadors CYP2A i D19S15. L'anàlisi de la seva seqüència aminoacídica (Paxton, 1987) ens indica que pertanyen a la superfamília de les immunoglobulines (Ig). Aquesta família inclou gens que codifiquen per a proteïnes d'adhesió; com és el cas de la molècula d'adhesió intracel·lular 1 (ICAM-1) així com la majoria d'antígens d'histocompatibilitat. Dels 29 gens que formen la família CEA, 18 presenten expressió; dels quals, 7 pertanyen al subgrup CEA i 11 al subgrup PSG (pregnancy-specific glycoprotein). La nomenclatura utilitzada per a cada un dels membres va ser restablerta per Beauchemin i els seus col·laboradors l'any 1999 (Beauchemin, 1999) i és la següent: CEACAM1(BGP), CEACAM3 (CGM1); CEACAM4(CGM7); CEACAM5(CEA); CEACAM6(NCA-90); CEACAM7(CGM-2); CEACAM8(NCA-95).

Dins el grup CEA s'ha trobat que existeixen dos tipus de domini d'immunoglobulines. Un és el domini N-terminal format per 180Aa i que és homòleg al domini variable de les immunoglobulines i 6 dominis constants que són homòlegs als de la zona C2 de les immunoglobulines. L'extrem C-terminal conté una regió hidrofòbica que es modifica per tal de proporcionar la unió de glicosil fosfatidil inositol a la membrana cel·lular. Això fa que els subgrups CEA i PSG es diferenciïn entre ells en el seu extrem C-terminal; mentre que els membres del subgrup PSG són secretats, els del subgrup CEA es troben units a la membrana. Aquestes molècules anclades a la membrana presenten diferents dominis; CEACAM1, CEACAM3 i CEACAM4 presenten domini extracel·lular, domini transmembrana i domini citoplasmàtic; mentre que la resta de membres només presenten domini extracel·lular. A més, CEACAM1, CEACAM3 i CEACAM4 s'uneixen a la superfície cel·lular mitjançant el domini transmembrana mentre que la resta de membres del grup ho fa mitjançant unions de glicosil fosfatidilinositol (figura 22)

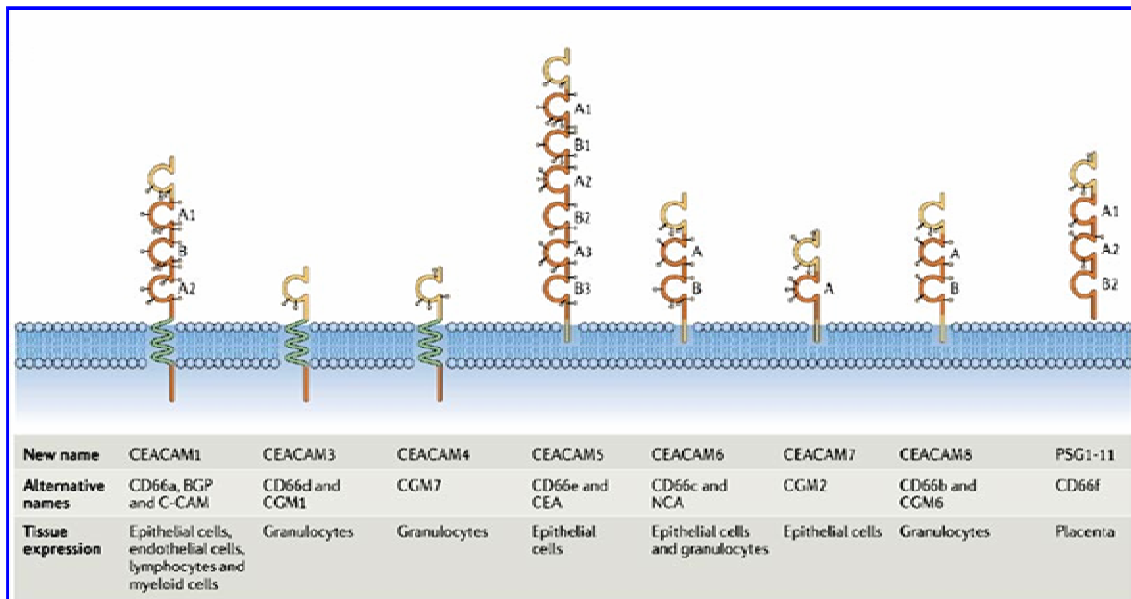


Figura 22: Estructura dels membres de la família CEACAM (Gray-Owen, 2006).

La família CEACAM té un paper important en nombrosos processos biològics com poden ser l'adhesió cel·lular, la immunitat i l'apoptosis. Experiments *in vitro* van demostrar que els membres de la família CEACAM són capaços de realitzar interaccions amb altres membres de la seva família (adhesions homofíliques) o amb molècules diferents (adhesions heterofíliques) i degut a les seves capacitats d'unió, els membres de la família CEA estan relacionats amb les metàstasis (Thompson, 1991). L'explicació d'aquest fet ve donada per experiments en els quals la injecció de CEAs en ratolins incrementava la formació de metàstasis (Hosteter, 1990). Altres treballs han demostrat l'increment del potencial metastàtic després de transfectar cèl·lules canceroses de còlon amb cDNA de CEA (Ilantzis, 2002).

3.4.3.2. Membres de la subfamília CEA

- **CEACAM 1:** També es coneix amb el nom de glicoproteïna biliar (BGP). Aquest CEACAM1 és l'homòleg d'una molècula d'adhesió de rata anomenada CAM. Conté un domini transmembrana hidrofòbic seguit d'un domini citoplasmàtic que tant pot ser curt com llarg. Mitjançant splicing alternatiu obtenim 7 isoformes de CEACAM1, i en totes elles es manté el domini N. La principal diferència entre les 7 isoformes és el tipus de domini citoplasmàtic que

presenten. En el cas del domini citoplasmàtic llarg, veiem que està format per 71 AA que inclouen nombrosos residus de serina, treonina i tirosina. Aquests residus poden ser fosforilats i poden participar en processos de transducció de senyals i en interaccions proteïna-proteïna. D'altra banda, les isoformes amb domini citoplasmàtic curt, codifiquen per a 10 residus citoplasmàtics als quals els falten els llocs de fosforilació i per tant no es donen els processos descrits anteriorment (Kuespert, 2006).

CEACAM1 s'expressa a les cèl·lules que tenen origen epitelial i mieloide. Neumaier i col·laboradors (Neumaier, 1993) van realitzar un estudi on suggereixen que la pèrdua o un reducció en l'expressió de CEACAM1 és un esdeveniment important en la carcinogènesi colorectal. Altres estudis demostren, mitjançant assajos angiogènics realitzats *in vitro* i *in vivo*, que BGP presenta propietats angiogèniques. BGP purificat de granulòcits i de cèl·lules endotelials estimula la proliferació, la quimiotaxis i la formació d'estructures similars a tubs capil·lars de les cèl·lules endotelials microvasculars humanes. El VEGF165 incrementa l'expressió de CEACAM1 tant a nivell de mRNA com a nivell proteic. Anticossos monoclonals de BGP bloquegen la formació de capil·lars formats a partir de VEGF165 (Ergun, 2000). Aquests experiments suggereixen que CEACAM1 és el principal efector de VEGF en els primers passos de la formació de microvesícules. Donat que CEACAM1 s'expressa en microvesícules tumorals però no en els grans vasos sanguinis podríem pensar que CEACAM1 podria ser una diana important en la inhibició de l'angiogènesis tumoral. L'expressió de CEACAM1 a tumors primaris, ens indicaria una recaiguda metastàsica (Sienel, 2003)

- **CEACAM 3**: També es coneix amb el nom de CGM1 o CD66D. Es tracta d'un gen format per 8 exons (Nagel, 1993) i la seva expressió s'observa de manera específica a granulòcits (Streichert, 2001). Existeixen dues isoformes diferents del gen que reben el nom de W282 i W264. Les dues isoformes contenen el pèptid senyal, i un domini N-terminal amb dos llocs de glicosilació. W264 també presenta un domini transmembrana i un domini citoplasmàtic, mentre que W282 presenta només un domini hidrofòbic curt després del domini N-terminal, cosa que ens indica que es tracta d'una isoforma secretada.

- **CEACAM 5:** Conegut amb el nom de CEA. A mitjans de 1960, va ser identificat com un antigen associat a tumor molt important del càncer de còlon humà. És el producte obtingut de l'expressió del gen CEACAM5. Es caracteritza per tenir 7 dominis d'immunoglobulina extracel·lulars i un anclatge a la membrana cel·lular de glicosil fosfatidil inositol. Aquest tipus d'anclatge, que penetra una mica dins la membrana cel·lular, és una de les raons per les que el CEACAM5 soluble és detectable en sèrum. En situació normal el trobem expressat en cèl·lules epitelials i és el marcador més abundant trobat a la superfície apical de les cèl·lules de l'epiteli gastrointestinal; encara que també pot trobar-se en altres epitelis mucosos com el de la nasofaringe, l'epiteli pulmonar, el tracte urogenital i a les glàndules sudorípares. Pot presentar unions homofíliques i heterofíliques amb altres membres de la família CEACAM i també pot intervenir en les adhesions entre cèl·lules (Benchimol, 1989). És el marcador tumoral clàssic utilitzat en la detecció de diferents tipus d'adenocarcinoma; especialment en adenocarcinomes d'origen colorectal. Encara que el trobem en major quantitat en els tumors CCR que en el teixit sa, això és degut a diferències en quant a l'expressió i a diferències en la ràtio d'eliminació. CEACAM5 també és un inhibidor de l'anoikis; un procés apoptòtic que manté l'arquitectura tissular matant aquelles cèl·lules que han perdut el seu punt d'anclatge amb la matriu extracel·lular (Ordonez, 2000). Una sobreexpressió de CEACAM5 10-30 vegades superior a la normal afecta a l'arquitectura tissular; cosa observable de manera tridimensional en cultius de línies cel·lulars de carcinoma de còlon (Ilantzis, 2002). El trobem expressat a la mucosa colorectal normal juntament amb altres 3 membres de la seva família que són: CEACAM1, CEACAM6 i CEACAM7.

La seva presència en els nòduls limfàtics està associada a un elevat nombre de morts per càncer i existeix una diferència significativa entre els nivells d'expressió de CEACAM5 en sangs de pacients amb metàstasis hepàtiques i els casos control. Nombrosos estudis han demostrat que la supervivència lliure de malaltia en pacients amb CCR que presenten incrementats els seus nivells de CEACAM5 en sang extreta abans de la intervenció quirúrgica és significativament molt baixa si es comparava amb aquells que presentaven nivells de CEACAM5 negatius respecte un gen de referència, com el GADPH, obtinguts mitjançant quantificació relativa.

Altres treballs suggereixen que els nivells en sang de mRNA de CEACAM5 en pacients amb estadi de Dukes D, són més elevats que en altres estadis de CCR (Bustin, 2006).

- **CEACAM 6/CEACAM 7:** CEACAM6 també és conegut amb el nom de NCA (non-specific crossreacting antigen). Burnett i col·laboradors (Burnett, 1998), van identificar les seqüències de CEACAM6 i van comprovar que tot i que presentava una seqüència molt propera evolutivament parlant a la de CEACAM5, són estructuralment i funcionalment diferents. El seu patró d'expressió és molt ampli, trobant-se des d'en granulòcits, a cèl·lules epitelials com en gran varietat d'òrgans. CEACAM6 es troba sobreexpressat en gran varietat de malalties epitelials i, com en el cas de CEACAM5, també actua inhibint l'anoikis. Una desregulació en l'expressió de CEACAM5 i de CEACAM6 podria contribuir de manera molt directa en la tumorigènesi del còlon degut a que hi hauria una inhibició de la diferenciació terminal i de l'anoikis. Tant CEACAM6 com CEACAM5 són importants per a que actuïn els tres mutadors tumorals de còlon que són la inestabilitat cromosòmica, una deficiència en l'actuació dels MMR genes i la inactivació de p53.

CEACAM7 també rep el nom de CGM2. Podem veure que presenta un patró d'expressió molt restringit trobant-se present només a còlon, apèndix i pàncrees. També s'ha estudiat l'expressió de CEACAM6 i CEACAM7 durant el desenvolupament fetal de còlon i va comparar-se amb els nivells trobats de CEACAM5. Per a la realització de l'experiment es van utilitzar 6 fetus d'entre 18 i 35 setmanes de gestació, així com còlon de nen de 2 i de 10 dies i també còlon d'un individu adult. L'estudi revela que els tres membres de la família CEA presenten una expressió apical al llarg del desenvolupament i que aquesta expressió es manté després del naixement. CEACAM5 s'expressa a la superfície apical de totes les cèl·lules epitelials situades a la base de la cripta; CEACAM6 es troba expressat a les cèl·lules situades a la meitat superior i CEACAM7 a la base de les cèl·lules epitelials del terç superior de la cripta (Schölzel, 2000).

A continuació podem veure els diferents patrons d'expressió que presenten CEACAM6 i CEACAM7 obtinguts a partir de la realització d'anàlisis immunohistoquímics (taula 7)

| Monoclonal antibody antigen recognized | 9A6 | | Expression pattern |
|--|---------|---------|--|
| | CEACAM6 | CEACAM7 | |
| Tongue | + | - | Upper third of squamous epithelia |
| Esophagus | + | - | Squamous epithelia |
| Stomach body | + | - | Single crypts, luminal cells |
| Duodenum | - | - | |
| Jejunum | - | - | |
| Ileum | - | - | |
| Appendix | + | + | Epithelia, upper fifth of crypt for each antigen |
| Colon | + | + | Epithelia, upper fifth of crypt for each antigen |
| Thyroid gland | - | - | |
| Submandibular salivary gland | + | - | Mucous epithelia most prominent |
| Anterior lingual gland | + | - | Mucous epithelia most prominent |
| Pancreas | + | + | Small ducts, with BAC2 only individual cells |
| Breast | + | - | Some breast ducts |
| Adrenal gland | - | - | |
| Liver | + | - | Granulocytes |
| Gall bladder | + | - | Apical epithelia |
| Lung | + | - | Pneumocytes, bronchiole epithelia, granulocytes |
| Kidney | - | - | |
| Bladder | - | - | |
| Skin | + | - | Eccrine sweat glands, hair follicles, squamous epithelia |
| Bone marrow | + | - | Myeloid cells |
| Tonsils | + | - | Epithelia and granulocytes |
| Spleen | + | - | Myeloid cells |
| Prostate gland | + | - | Single ducts |
| Fallopian tube | - | - | |
| Cervix | + | - | Squamous epithelia |
| Uterus | - | - | |
| Ovary | - | - | |
| Testis | - | - | |
| Seminal vesicle | - | - | |
| Epididymus | - | - | |
| Heart | - | - | |
| Urether | - | - | |
| Umbilical cord | + | - | Amnion epithelia |
| Placenta | + | - | Amnion epithelia |

Taula 7: Patrons d'expressió CEACAM6 i CEACAM7 (Schölzel, 2000).

3.4.3.3. Expressió dels membres de la família CEA en teixits adults sans.

Les regions promotores dels membres de la família CEA presenten les típiques seqüències TATA, els elements CCAAT, regions riques en G i C i els llocs SP1. Existeix molta informació sobre la distribució tissular de CEACAM5, CEACAM1 i PSG, mentre que en els casos de CEACAM6, CEACAM7 i CEACAM4 la informació que tenim és bastant limitada. Es coneix molt poc sobre la distribució tissular de CEACAM3 i CEACAM8.

A nivell proteic, els membres de la família CEA, poden presentar tres tipus d'expressió dins les cèl·lules; expressió epitelial, com és el cas de CEACAM5 i CEACAM7; expressió en els granulòcits, com CEACAM3 i CEACAM8 o tenir un ampli espectre d'expressió com en el cas de CEACAM1 i CEACAM6 (Hammarström,

1997).

CEACAM1 presenta una major distribució en teixit normal i s'expressa en diferents epitelis com poden ser el d'esòfag i el d'estómac, l'epiteli intestinal, el còlon, pàncrees, fetge, vesícula biliar, ronyons, bufeta urinària, cèrvix, endometri, glàndules sudorípares i sebàcies, així com també en granulòcits i limfòcits. CEACAM6 es troba present a les cèl·lules epitelials de diferents òrgans i a granulòcits i monòcits. I CEACAM5 presenta una expressió molt limitada en teixits normals adults. El trobem de manera normal a les cèl·lules columnars i les cèl·lules caliciformes del còlon, a les cèl·lules escamoses de la llengua, a les cèl·lules que formen els conductes de les glàndules sudorípares i a cèl·lules de la pròstata (Hammarström, 1997). El principal lloc de producció de PSG és la placenta, i aquesta producció es dona sobretot durant el primer trimestre de l'embaràs. Tot i així, PSG no s'expressa exclusivament a la placenta, ja que s'han pogut aïllar clons de cDNA de PSG a fetge fetal, glàndules salivals, cèl·lules mieloides i testicles.

CEACAM7 presenta una distribució tissular similar a CEACAM5, expressant-se notablement a les cèl·lules de còlon però no en granulòcits. I en el cas de CEACAM3 i CEACAM8 trobem expressió en granulòcits i probablement no presenten expressió en les cèl·lules epitelials (Hammarström, 1999).

Hi ha quatre membres d'aquest subgrup que s'expressen conjuntament a còlon normal humà. Es tracta de CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6 i CEACAM7. Mitjançant anàlisis de RT-PCR, hibridacions in situ i immunohistoquímica, s'ha demostrat que el mRNA i les proteïnes dels 4 membres s'expressen a nivells elevats a les cèl·lules columnars epitelials madures així com a les cèl·lules epitelials diferenciades de la cripta. Les cèl·lules indiferenciades de les criptes no expressen CEACAM1 ni CEACAM7 però sí CEA i CEACAM6 a baixos nivells (Hammarström, 1991).

3.4.3.4. Expressió dels membres de la família CEA en tumors

Existeixen diversos estudis que, mitjançant mètodes immunohistoquímics, ens mostren que l'expressió de CEMCAM1 en teixits tumorals de mama, de còlon, de pròstata i d'endometri es baixa si la comparem amb l'expressió en teixits normals. Però a la vegada, la sobreexpressió de CEACAM1 en aquests teixits normals ha estat relacionada amb el creixement tumoral. Està demostrat que CEACAM1 no s'expressa ni en els melanòcits ni a teixit normal de pulmó, però la seva expressió en melanoma i

teixit tumoral de pulmó promou la progressió tumoral i es relaciona amb un pitjor diagnòstic.

CEACAM6 es troba sobre expressat en el CCR on és un indicador de mal pronòstic. Estudis realitzats en cultius cel·lulars demostren que CEACAM6 actua promovent la inducció de IGF en les cèl·lules d'adenocarcinoma pancreàtic, afavorint d'aquesta manera el creixement i la invasió cel·lular.

CEACAM5 és un dels marcadors més característics utilitzats en la clínica del càncer colorectal degut a que es tracta d'una molècula molt estable i la trobem a nivells elevats en el sèrum de pacients oncològics; per contra, la seva expressió en teixits i en sèrum de persones sanes és molt limitada. Aquest fet fa que molts autors, utilitzant assajos de RT-PCR, hagin realitzat estudis amb la sang de pacients amb CCR o altres tipus de càncer, per detectar la presència de cèl·lules circulants que expressin CEACAM5, per tal de poder detectar malaltia residual o com a indicador de possible recaiguda.

En còlon normal humà hi ha quatre membres que s'expressen conjuntament. En el cas de CCR, tots aquests gens es troben desregulats. CEACAM1 es regula a la baixa. CEACAM7 presenta un patró d'expressió molt similar a CEACAM1 en teixits normals, i per això també el trobem regulat a la baixa en tumors colorectals. Tot i això, encara no es coneix res sobre quina funció realitza i la proteïna que codifica tampoc ha estat caracteritzada. CEACAM6 es troba regulat a l'alça en els tumors colorectals en comparació amb la mucosa normal, cosa que suggereix que podria tenir una acció oposada a la que puguin tenir CEACAM1 i CEACAM7 (taula 8).

| Type of tumor | CEA* | NCA | BGP | CGM6 | CGM1 | CGM2 | CGM7 | PSG |
|------------------------------|------|-----|-----|------|------|------|------|-----|
| Epithelial | | | | | | | | |
| Colorectal carcinoma | + | + ↑ | + ↓ | | | + ↓ | | |
| Gastric carcinoma | + ↑ | + ↑ | + ↑ | | | + ↑ | | |
| Lung adenocarcinoma | + | + | + | | | | | |
| squamous cell carcinoma | - | | + ↑ | | | | | |
| Breast carcinomas | (+) | + | | | | - | | |
| Pancreatic carcinoma | + | | | | | | | |
| Gallbladder carcinoma | + | | | | | | | |
| Urinary bladder carcinoma | + | | | | | | | |
| Mucinous ovarian carcinoma | + | + | (+) | - | - | + | - | |
| Serous ovarian carcinoma | (+) | (+) | (+) | - | - | | - | |
| Endometrial adenocarcinoma | + | + | + | - | - | | - | |
| Hepatocellular carcinoma | - | | + ↓ | | | | | |
| Thyroid carcinoma | - | | | | | | | |
| Nasopharyngeal carcinoma | - | | | | | | | |
| Other | | | | | | | | |
| Malignant mesothelioma | - | | | | | | | |
| Small cell lung carcinoma | + | | - | | | | | |
| Acute lymphoblastic leukemia | - | + | (+) | | - | | - | |
| Melanoma | - | | | | | | | |
| Different sarcoma | - | | | | | | | |
| Hydatidiform mole | | | | | | | | + |
| Choriocarcinoma | | | | | | | | + |

Taula 8: Patrons d'expressió de la família CEACAM en una situació tumoral. Més del 50% de les mostres són (+). ↑ i ↓ indiquen que la molècula pot ser up-o downregulated comparada amb el seu teixit normal (Hammarström, 1999).

3.4.3.5. Factors que poden afectar els nivells de CEACAM5 en el sèrum de pacients amb CCR

Es tracta d'una glicoproteïna implicada en el desenvolupament de metàstasis hepàtiques en el CCR. Els seus nivells en sèrum es controlen mitjançant l'estadiatge i localització tumoral, la mida, el grau de diferenciació del tumor, la presència o absència de metàstasis i la seva ràtio d'eliminació (Roselli, 2003).

Entre els diferents factors destacarem els següents (Duffy, 2001):

- Estadiatge del tumor: es produeix un increment dels valors de CEA a mida que augmenta l'estadiatge del tumor.
- Classificació tumoral: existeixen diversos estudis que han demostrat que els CCR amb tumors ben diferenciats presenten més quantitat de CEA que els casos on la diferenciació tumoral no està ben definida.

- Fetge: és l'òrgan que realitza la metabolització dels CEA. A les cèl·lules de Küppfer el CEA és modificat perquè li són eliminats els seus residus d'àcid silíac. Posteriorment, aquest CEA és endocitat per les cèl·lules parenquimatoses del fetge on és degradat. Algunes malalties benignes del fetge afecten a la funcionalitat d'aquest i, per tant, a l'eliminació dels CEA. Com a conseqüència trobarem els nivells incrementats en el sèrum de pacients amb malalties hepàtiques no malignes; però en pacients amb els símptomes apropiats, un augment dels nivells de CEA de 5 vegades per sobre del límit normal, ens indicarà presència d'adenocarcinoma.
- Localització del tumor en el còlon: pacients amb tumors localitzats en el còlon esquerre presenten les concentracions de CEA incrementades respecte aquells pacients on la localització del tumor és a la part dreta del còlon.
- L'obstrucció de les criptes intestinals també indica un augment dels nivells de CEA en pacients amb malaltia colorectal.
- En general s'accepta que un increment progressiu dels nivells de CEA en plasma després d'una intervenció quirúrgica aparentment radical en CCR significaria una recurrència del tumor. Per contra, el descens dels nivells de CEA els tres primers mesos després de la intervenció quirúrgica, indicaria una resecció complerta de la malaltia. Ja s'ha comentat abans, que nivells elevats també poden ser causa de processos no malignes com hepatitis, pancreatitis, úlcera pèptica.

Però els nivells de CEA també han estat molt qüestionats per una sèrie de factors que veurem a continuació:

- Valors anormals es troben en menys del 50% de pacients amb recidiva precoç o localitzada i en casi el 75% de casos de malaltia disseminada, normalment amb afectació hepàtica. El percentatge de malalts amb metàstasis pulmonars amb nivells de CEA elevats és molt baix. La incidència de falsos positius varia entre el 6 i el 25% dels casos.

- A la majoria de les series, l'elevació dels nivells de CEA coincideix amb la presència de simptomatologia relacionada amb la recidiva, i només en menys d'un 20% de casos precedeix, entre 3 i 4 mesos, a l'aparició d'aquests símptomes.
- Entre un 7 i un 36% de pacients sense tumor recurrent demostrable presenten elevacions transitòries de CEA.
- Cap estudi ha demostrat una major supervivència en pacients monitoritzats amb CEA.

