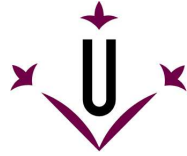


Universitat de Lleida
Facultat de Medicina



**COMPORTAMENT I REGULACIÓ DELS TELÒMERS
EN LA CARCINOGENÈSI COLORECTAL.
UTILITAT COM A MARCADORS PRONÒSTICS.**

Cristina Valls i Bautista
2007

Codirectors de la Tesi: Carme Piñol Felis i Joan Viñas Salas

RESUM

INTRODUCCIÓ: La neoplàsia colorectal ocupa el segon lloc entre les més freqüent i també és la segona causa de mort per càncer. Tot i que per una banda, en els últims anys les millores en els tractaments quirúrgic, neoadjuvant i adjuvant han contribuït a l'augment de la supervivència i al percentatge de curacions. Per l'altra, es continuen fent servir els mateixos factors pronòstics que fa uns anys, variables anatomopatològiques del tumor. El fet que la carcinogènesi colorectal sigui una de les més ben estudiades permet que els gens o factors que es veuen alterats durant aquest procés puguin ser estudiats com a possibles factors pronòstics per preveure l'evolució de la malaltia. L'activitat de la telomerasa (AT), la longitud del telòmer (LT) i l'expressió del TRF1 (factor 1 d'unió al telòmer) han estat els factors escollits per a ser estudiats com a factors pronòstics per la seva implicació en la regulació i homeòstasi dels telòmers, els quals tenen un paper important en l'estabilitat del genoma, en la viabilitat cel·lular i el desenvolupament del procés carcinogènic.

HIPÒTESIS: Estudar dins la nostra sèrie de pacients amb càncer colorectal (CCR) l'activitat de la telomerasa, la longitud del telòmer i l'expressió del TRF1, veure com es comporten dins la seqüència adenoma-carcinoma i determinar si poden ser nous factors pronòstics independents per al temps lliure de malaltia i de supervivència global.

PACIENTS I MÈTODES: L'AT es va determinar per la tècnica F-TRAP en la mucosa tumoral, transicional, normal i pòlips. La LT es va analitzar per mitjà del Southern blot en les mucoses tumoral i normal, en pòlips i sang de pacients amb CCR i en sang i en mucosa colònica de pacients sense cap afectació colorectal. L'expressió del TRF1 es va determinar per Western blot en mucosa tumoral i normal de pacients amb CCR. Es van relacionar l'AT, la LT i l'expressió del TRF1 entre sí i amb les característiques anatomopatològiques dels pacients. Es van realitzar les anàlisis del temps lliure de malaltia i de supervivència global i es van estudiar els factors pronòstics independents als 2 i 4 anys.

RESULTATS: L'AT en la mucosa tumoral era més elevada que en la mucosa normal ($p < 0.001$), mentre entre les mucoses transicional i normal les diferències no eren significatives. L'AT en els pòlips era més elevada que en la mucosa normal però inferior a la de la mucosa tumoral, i els pòlips aïllats tenien una AT superior que els pòlips sincrònics ($p = 0.020$). La mitjana de la LT en la mucosa tumoral era més curta que la de la mucosa normal ($p < 0.001$). Comparant la LT tumoral-normal de cada pacient obteníem que un 55% dels tumors mantenien la LT similar respecte la corresponent mucosa normal, un 10% els allargaven i un 35% els escurçaven. La LT en la mucosa tumoral i normal presentaven un comportament paral·lel ($p < 0.001$). La LT no es correlacionava amb l'AT. La longitud del telòmer en sang va ser molt similar entre els pacients amb i sense CCR però la LT en la mucosa normal dels pacients amb CCR era molt més curta que en la mucosa colònica dels pacients sans. La LT dels pacients sans es correlacionava amb l'edat, en la sang i també en la mucosa colònica ($p < 0.001$; $p = 0.037$). Les mostres tumorals expressaven majors nivells de TRF1 i l'expressió del TRF1 semblava estar relacionada amb la LT però no amb l'AT. Els pòlips van mostrar telòmers més curts que la mucosa normal però més llargs que la tumoral. La ràtio de la longitud del telòmer (RLT) va ser factor pronòstic independent per la supervivència global als 2 anys en els pacients amb càncer de còlon ($p = 0.022$). L'IT va ser un factor pronòstic independent pel temps lliure de la malaltia als 2 anys ($p = 0.035$) i per a la supervivència global als 2 i 4 anys només en els pacients amb càncer de recte ($p = 0.040$; $p = 0.030$).

CONCLUSIONS: L'AT augmenta a mesura que ho fa el grau de malignitat del tumor mentre que la LT disminueix. L'IT (índex de la telomerasa) és un factor pronòstic independent pel temps lliure de la malaltia als 2 anys i per a la supervivència als 2 i als 4 anys en els pacients amb càncer de recte. La RLT és un factor pronòstic independent pel temps de supervivència global als 2 anys en els pacients amb càncer de còlon.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La neoplasia colorrectal ocupa el segundo lugar entre las más frecuentes y también es la segunda que causa más muertes. Aunque, en los últimos años las mejoras en los tratamientos quirúrgicos, neoadyuvantes y adyuvantes han contribuido al aumento de la supervivencia y al porcentaje de curaciones. Por otra parte, se continúan usando los mismos factores pronóstico que hace unos años, variables anatomopatológicas del tumor. El hecho de que la carcinogénesis colorrectal sea una de las mejor estudiadas, permite que los genes o factores que se ven alterados durante este proceso puedan ser estudiados como posibles factores pronóstico para prever la evolución de la enfermedad. La actividad de la telomerasa (AT), la longitud del telómero (LT) y la expresión del TRF1 (factor 1 de unión al telómero) han sido los factores escogidos para ser estudiados como factores pronóstico por su implicación en la regulación y homeostasis de los telómeros, los cuales tienen un papel importante en la estabilidad del genoma, en la viabilidad celular y en el desarrollo carcinogénico.

HIPÓTESIS: Estudiar dentro de nuestra serie de pacientes con cáncer colorrectal (CCR) la actividad de la telomerasa, la longitud del telómero y la expresión del TRF1, observar como se comportan dentro de la secuencia adenoma-carcinoma y determinar si pueden ser nuevos factores pronósticos independientes para el tiempo libre de enfermedad y de supervivencia global.

PACIENTES Y MÉTODOS: La AT fue determinada mediante la técnica F-TRAP en la mucosa tumoral, transicional, normal y en pólipos colorrectales. La LT se analizó mediante Southern blot en las mucosas tumoral y normal, en pólipos y sangre de pacientes con CCR y en sangre y mucosa colónica de pacientes sin ninguna afectación colorrectal. La expresión del TRF1 fue determinada por Western blot en las mucosas tumoral y normal de pacientes con CCR. Se relacionaron la AT, la LT y la expresión del TRF1 entre sí y con las características anatomopatológicas. Se realizaron los análisis del tiempo libre de enfermedad y del tiempo de supervivencia global y se estudiaron los factores pronósticos independientes a los 2 y 4 años.

RESULTADOS: La AT en la mucosa tumoral fue más elevada que en la mucosa normal ($p < 0.001$), mientras que entre las mucosas transicional y normal las diferencias no fueron significativas. La AT en los pólipos fue más elevada que en la mucosa normal pero inferior que en la mucosa tumoral, y los pólipos aislados presentaron una AT superior que los pólipos sincrónicos ($p = 0.020$). La media de la LT en la mucosa tumoral fue más corta que en la mucosa normal ($p < 0.001$). Comparando la LT tumoral-normal de cada paciente obtuvimos que la LT se mantenía en un 55% de los tumores, se alargaba en un 10% y acortaba en un 35%. La LT en la mucosa tumoral y normal presentaba un comportamiento paralelo ($p < 0.001$). La LT no se correlacionó con la AT. La LT en sangre fue muy similar entre los pacientes con y sin CCR pero la LT en la mucosa normal de los pacientes con CCR fue más corta que en la mucosa colónica de los pacientes sanos. La LT de los pacientes sanos se correlacionó con la edad, en la sangre y también en la mucosa colónica ($p < 0.001$; $p = 0.037$). Las muestras tumorales expresaron niveles mayores de TRF1 y la expresión del TRF1 parecía estar relacionada con la LT pero no con la AT. Los pólipos mostraron telómeros más cortos que en la mucosa normal pero más largos que en la tumoral. La ratio de la longitud del telómero (RLT) fue factor pronóstico independiente para la supervivencia a los 2 años en los pacientes con cáncer de colon ($p = 0.022$). El IT (índice de telomerasa) fue un factor pronóstico independiente para el tiempo libre de enfermedad a los 2 años ($p = 0.035$) y para la supervivencia global a los 2 y 4 años solamente en los pacientes con cáncer de recto ($p = 0.040$; $p = 0.030$).

CONCLUSIONES: La AT aumenta a medida que lo hace el grado de malignidad del tumor mientras que la LT disminuye. El IT es un factor pronóstico independiente para el tiempo libre de enfermedad a los 2 años y para la supervivencia a los 2 y 4 años en los pacientes con cáncer de recto. La RLT es un factor pronóstico independiente para supervivencia global a los 2 años en los pacientes con cáncer de colon.

SUMMARY

INTRODUCTION: Colorectal cancer is the second cancer in incidence and mortality. Although in the last years the improvements in surgical, adjuvant and neoadjuvant therapies contributed to increase the survival rates and percentage of healings. But we still use the same prognostic factors, based on the anatomopathological characteristics of tumour. The fact that colorectal carcinogenesis is one of the most known allows to study the genes or other factors that can be altered during this process, and use them as possible prognostic factors to prevent the evolution of the illness. For this study the factors selected are: telomerase activity (TA), telomere length (TL) and TRF1 (telomeric repeat factor) expression due to their implication in the regulation and homeostasis of telomeres, which have an important role in the genome stability, cellular viability and carcinogenic development.

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES: To analyse in our series of patients with colorectal cancer (CRC) telomerase activity, telomere length and TRF1 expression, to observe its behaviour in the adenoma-carcinoma sequence and to determine if they could be new independent prognostic factors for disease-free survival and overall survival.

METHODS AND PATIENTS: The TA was determined by F-TRAP in tumoral, transitional and normal mucosa and polyps in 108 patients. The TL was analysed by Southern blot in tumoral and normal mucosa and blood cells in patients with CRC and in blood cells and colon mucosa in healthy patients. The TRF1 expression was determined by Western blot in tumoral and normal mucosa in patients with CRC. TA, TL and TRF1 expression were related to anatomopathological characteristics of patients. The disease-free survival and overall survival were realized and independent prognostic factors were studied at 2 and 4 years.

RESULTS: The TA in tumoral mucosa was higher than normal mucosa ($p < 0.001$), while the differences were not significant between transitional and normal mucosa. TA in the polyps was higher than normal mucosa but was lower than tumoral mucosa, and the isolated polyps had a higher TA than synchronic polyps ($p = 0.020$). The TL mean in tumoral mucosa was shorter than normal mucosa ($p < 0.001$). When we compared tumoral-normal TL in each patient we obtained that TL was maintained in 55% tumours, elongated in 10% and shortened in 35%. The TL in tumoral and normal mucosa showed a parallel behaviour ($p < 0.001$). TL did not correlate with TA. TL in blood cells was similar in patients with and without CRC, but TL in normal mucosa in patients with CRC was shorter than normal mucosa in healthy patients. TL in healthy patients correlates with age in blood cells and also in normal mucosa ($p < 0.001$; $p = 0.037$). Tumoral mucosa expressed greater levels of TRF1 and this expression seemed to be related to TL but not to TA. Polyps showed a greater TA than their respective normal mucosa and lower than tumoral mucosa, and polyps showed shorter telomeres than normal mucosa but longer than tumoral mucosa. The telomere length ratio (TLR) was an independent prognostic factor for overall 2 years survival in patients with colon cancer ($p = 0.022$). Telomerase index (TI) was an independent prognostic factor for 2 years disease-free survival ($p = 0.035$) and for overall survival at 2 and 4 years in patients with rectal cancer ($p = 0.040$; $p = 0.030$).

CONCLUSIONS: TA increases and TL reduces as the tumour malignancy degree increases. The TI is an independent prognostic factor for disease-free survival at 2 years and for overall survival at 2 and 4 years in patients with rectal cancer. The TLR is an independent prognostic factor for overall survival at 2 years in patients with colon cancer.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓ	1
I. 1. EPIDEMIOLOGIA DEL CÀNCER COLORECTAL.....	3
I. 2. PATOGÈNIA DEL CÀNCER COLORECTAL	4
2.1. FACTORS GENÈTICS.....	4
2.1.1. Gens Supressors de tumors	4
2.1.2. Oncogens.....	6
2.1.3. Gens mutadors	6
2.1.4. Inestabilitat genòmica	7
2.1.5. Virus	9
2.1.6. Telomerasa	9
2.2. FACTORS AMBIENTALS.....	10
I. 3. ETIOLOGIA DEL CÀNCER COLORECTAL	11
3.1. CÀNCER ESPORÀDIC	11
3.2. CÀNCER HEREDITARI	11
3.2.1. Síndromes polipòsiques	12
3.2.2. Síndromes no polipòsiques	13
I. 4. BIOLOGIA MOLECULAR DEL CÀNCER COLORECTAL	14
4.1. MODEL MOLECULAR DEL CÀNCER COLORECTAL	14
4.1.1. Lesions precursors.....	15
4.1.2. Seqüència adenoma-carinoma	15
I. 5. CARACTERÍSTIQUES ANATOMOPATOLÒGIQUES DEL CARCINOMA COLORECTAL	17
I. 6. PÒLIPS COLORECTALS	19
6.1. PÒLIPS NEOPLÀSICS.....	19
6.2. PÒLIPS NO NEOPLÀSICS.....	20
I. 7. CLÍNICA DEL CÀNCER COLORECTAL.....	21
7.1. MANIFESTACIONS CLÍNiques.....	21
7.2. DIAGNÒSTIC	22
7.3. FACTORS PRONÒSTIC	22
7.4. TRACTAMENT.	25

I. 8. ELS TELÒMERS	26
8.1. CARACTERÍSTIQUES DELS TELÒMERS	26
8.2. PROBLEMA FINAL DE REPLICACIÓ.....	27
8.3. HIPÒTESI SOBRE ELS TELÒMERS.....	28
8.4. CONSEQÜÈNCIES DE LA DISFUNCIONALITAT TELOMÈRICA	30
I. 9. LA TELOMERASA.....	30
9.1. COMPONENTS DE LA TELOMERASA	31
9.1.1. hTR (human Telmerase RNA)	31
9.1.2. hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase).....	31
9.1.3. Proteïnes auxiliars	33
9.2. REGULACIÓ DE LA TELOMERASA.....	34
9.2.1. Regulació d'hTR	35
9.2.2. Regulació d'hTERT	36
9.2.3. Passos per a la generació de la telomerasa activa	40
I. 10. PROTEÏNES ASSOCIADES AL TELÒMER	42
10.1. PROTEÏNES D'UNIÓ AL DNA TELÒMERIC	43
10.2. PROTEÏNES ASSOCIADES AL TELÒMER AMB FUNCIÓ TELOMÈRICA	44
10.3. PROTEÏNES ASSOCIADES AL TELÒMER AMB FUNCIÓ NO TELOMÈRICA	45
I. 11. REGULACIÓ DE LA LONGITUD DELS TELÒMERS.....	47
11.1. HIPÒTESI DE LA REGULACIÓ DELS TELÒMERS.....	47
I. 12. MECANISME D'ALLARGAMENT DEL TELÒMER TELOMERASA INDEPENDENT	48
I. 13. DUALITAT DE LA TELOMERASA	50
I. 14. LA TELOMERASA I EL CÀNCER	50
14.1. TELOMERASA I CÀNCER COLORECTAL	51
I. 15. TERAPIA ANTI-TELOMERASA	52
15.1 DIANA hTERT	52
15.2. DIANA hTR.....	53
15.3. NIVELL TRANSCRIPCIONAL I POST-TRANSCRIPCIONAL.....	53
15.4. TELÒMERS I PROTEÏNES ASSOCIADES	54

II. JUSTIFICACIONS, HIPÒTESIS I OBJECTIUS	55
III. PACIENTS I MÈTODES.....	59
III. 1. PACIENTS.....	61
1.1. OBTENCIÓ DE LES MOSTRES.....	61
Mostres de teixit	61
Mostres sanguínies.....	62
1.2. SEGUIMENT DELS PACIENTS	62
1.3. TRACTAMENT NEOADJUVANT I ADJUVANT.....	63
III. 2. METODOLOGIA.....	63
2.1. METODOLOGIA DE L'ACTIVITAT DE LA TELOMERASA.....	63
2.1.1. Extracció de la proteïna	63
2.1.2. Determinació de la concentració de proteïna.....	64
2.1.3. Determinació de l'activitat de la telomerasa.....	64
■ Càlcul de l'activitat i de l'índex de la telomerasa	65
2.2. METODOLOGIA DE LA LONGITUD DEL TELÒMER	65
2.2.1. Extracció del DNA genòmic.....	66
■ Extracció de DNA de teixit	66
■ Extracció de DNA de cèl·lules sanguínies	66
2.2.2. Determinació de la concentració de DNA.....	67
2.2.3. Determinació de la longitud del telòmer.....	67
■ Càlcul de la longitud del telòmer	69
2.3. METODOLOGIA DE L'EXPRESSIÓ DEL TRF1	70
2.3.1. Extracció de la proteïna	70
2.3.2. Determinació de la concentració de proteïna.....	70
2.3.3. Determinació de l'expressió del TRF1	70
■ Càlcul de l'expressió del TRF1	72
III. 3. VARIABLES DE L'ESTUDI	73
3.1. TIPUS DE MOSTRA	73
3.2. VARIABLES CLÍNiques	74
3.3. VARIABLES ANATOMOPATOLÒGIQUES DEL TUMOR.....	74
3.4. VARIABLES DE L'ESTUDI DE L'ACTIVITAT DE LA TELOMERASA.....	75
3.5. VARIABLES DE L'ESTUDI DE LA LONGITUD DEL TELÒMER	75
3.6. VARIABLES DE L'ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DEL TRF1	76

3.7. VARIABLES TEMPORALS EN ELS ESTUDIS DE SUPERVIVÈNCIA	76
III. 4. BASE DE DADES I TRACTAMENT	76
III. 5. ESTUDI ESTADÍSTIC DELS RESULTATS.....	76
IV. RESULTATS	79
IV. 1. ACTIVITAT DE LA TELOMERASA	81
1.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA	81
1.2. ASSOCIACIÓ DE L'ACTIVITAT DE LA TELOMERASA AMB LES CARACTERÍSTIQUES ANATOMOPATOLÒGIQUES.....	82
IV. 2. LONGITUD DEL TELÒMER	85
2.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA	85
2.2. ASSOCIACIÓ DE LA LONGITUD DEL TELÒMER AMB LES CARACTERÍSTIQUES ANATOMOPATOLÒGIQUES.....	86
2.3. COMPORTAMENT DELS TELÒMERS.....	88
2.4. CORRELACIÓ DE LA LONGITUD DEL TELÒMER AMB ALTRES VARIABLES.....	90
IV. 3. RELACIÓ ENTRE L'ACTIVITAT DE LA TELOMERASA I LA LONGITUD DEL TELÒMER.....	92
IV. 4. EXPRESSIÓ DEL TRF1	96
4.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA	96
4.2. ASSOCIACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DEL TRF1 AMB LES CARACTERÍSTIQUES ANATOMOPATOLÒGIQUES	97
IV. 5. RELACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DEL TRF1 AMB L'ACTIVITAT DE LA TELOMERASA I LA LONGITUD DEL TELÒMER.....	102
IV 6. ESTUDI DEL TEMPS LLIURE DE MALALTIA I DE LA SUPERVIVÈNCIA GLOBAL.....	104
6.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA	104
6.2. ANÀLISI DEL TEMPS LLIURE DE MALALTIA ALS 2 I 4 ANYS.....	106
6.2.1. Pacients amb càncer de còlon	106
6.2.2. Pacients amb càncer de recte	108

6.2.3. Pacients amb càncer colorectal	111
6.3. ANÀLISI DEL TEMPS DE SUPERVIVÈNCIA GLOBAL ALS 2 I 4 ANYS	114
6.3.1. Pacients amb càncer de còlon	114
6.3.2. Pacients amb càncer de recte	117
6.3.3. Pacients amb càncer colorectal	120
6.4. ANÀLISI MULTIVARIANT	124
6.5 TEST SENSIBILITAT I ESPECIFICITAT	129
IV. 7. LONGITUD DEL TELÒMER EN CÈL·LULES SANGUÍNIES.....	130
IV. 8. LONGITUD DEL TELÒMER EN PACIENTS SANS.....	133
IV. 9. ACTIVITAT DE LA TELOMERASA I LONGITUD DEL TELÒMER EN PÒLIPS	135
V. DISCUSSIÓ.....	141
V. 1. ACTIVITAT DE LA TELOMERASA	143
V. 2. LONGITUD DEL TELÒMER	147
V. 3. RELACIÓ ENTRE L'ACTIVITAT DE LA TELOMERASA I LA LONGITUD DEL TELÒMER	152
V. 4. EXPRESSIÓ DEL TRF1	154
V. 5. RELACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DEL TRF1 AMB L'ACTIVITAT DE LA TELOMERASA I LA LONGITUD DEL TELÒMER.....	156
V. 6. ESTUDI DEL TEMPS LLIURE DE MALALTIA I DE LA SUPERVIVÈNCIA GLOBAL	158
V. 7. LONGITUD DEL TELÒMER EN CÈL·LULES SANGUÍNIES.....	164
V. 8. LONGITUD DEL TELÒMER EN PACIENTS SANS	167
V. 9. ACTIVITAT DE LA TELOMERASA I LONGITUD DEL TELÒMER EN PÒLIPS	169

VI. CONCLUSIONS.....	173
VII. BIBLIOGRAFIA	177
VIII. ABREVIATURES.....	195
IX. ÍNDEX DE FIGURES	201

I. INTRODUCCIÓ

1. EPIDEMIOLOGIA DEL CÀNCER COLORECTAL

El càncer colorectal (CCR) és la segona causa de mort per càncer en la majoria de països occidentals, després del de pulmó en els homes i el de mama en les dones. El CCR a Espanya és la tercera neoplàsia més freqüent en homes després de les de pròstata i pulmó, mentre que entre les dones és la segona més freqüent després de la de mama (1). En el càncer de còlon la incidència és similar en ambdós sexes mentre que el càncer de recte és més freqüent en homes. La taxa d'incidència augmenta de manera notable a partir dels 50 anys. El CCR és més freqüent a Europa Occidental i Nord d'Amèrica mentre té una incidència baixa a Àfrica, Àsia i Sud d'Amèrica. Amb excepció de Japó que presenta una baixa incidència, sembla existir una relació amb un major desenvolupament i qualitat de vida. Això, unit al fet que els emigrants dels llocs de baixa incidència presenten ja en la mateixa generació una incidència d'aquesta neoplàsia similar a la de la nova zona de residència, demostra la responsabilitat dels factors ambientals (1, 2).

En aquests moments a Espanya es diagnostiquen 25.000 nous casos l'any i en aquest mateix període moren 12.500 persones per aquesta malaltia. Dels càncers colorectals detectats un 80% seran potencialment curables, d'aquests el 40% desenvoluparà recidives locals o a distància, menys del 25% d'aquestes recidives seran resecables. La probabilitat de la ressecció curativa és directament proporcional al temps de detecció d'aquesta. De manera global, només la meitat dels pacients amb carcinoma de còlon o recte viurà més de 5 anys i la recidiva és la causa de la majoria de les defuncions després d'una cirurgia amb intenció curativa. Durant els últims anys s'han aconseguit avenços importants sobretot en el càncer de recte, s'ha aconseguit disminuir les recidives fins a valors del 20-35%, gràcies a la generalització de l'escissió total del mesorecte (ETM) i a l'ús de la quimioradioteràpia neoadjuvant (3). La quimioteràpia també ha millorat en les últimes dècades, el 5-Fluorouracil encara manté el seu paper predominant després de 40 anys i la seva modulació per combinació amb l'àcid folínic ha millorat la supervivència dels pacients. El desenvolupament de l'irinotecan i l'oxiplatí han aconseguit allargar varis mesos la supervivència quan es combinen amb els règims bàsics del 5FU i FA (4). En les neoplàsies de còlon s'està administrant actualment oxaliplatí, 5-FU i leucovorin, és el que es coneix com a FOLFOX, amb resultats satisfactoris (5). Actualment, les dianes terapèutiques claus en el tractament del càncer colorectal són la via VEGF (vascular endothelial growth factor) i la via EGF (epidermal growth factor)(6).

2. PATOGÈNIA DEL CÀNCER COLORECTAL

El càncer es caracteritza per un creixement i multiplicació cel·lulars incontrolats i per la capacitat d'aquestes cèl·lules de disseminar-se o metastatitzar-se per l'organisme (7).

El càncer colorectal es desenvolupa com a resultat d'una acumulació progressiva d'alteracions genètiques i epigenètiques que condueixen a la transformació de l'epiteli colònic normal en adenocarcinoma de còlon (8, 9).

2.1 FACTORS GENÈTICS

Les alteracions en l'estructura o en la seqüència del DNA (mutacions) representen l'esdeveniment que inicia la carcinogènesi. D'una banda aquestes mutacions afecten a 3 tipus de gens: els supressors de tumors, els oncogens i els gens mutadors (7). D'altra banda, durant el procés de la tumorigènesi també poden tenir lloc altres esdeveniments com la inestabilitat genòmica, la inserció de genomes vírics i l'activació de la telomerasa.

2.1.1. Gens supressors de tumors

La seva inactivació (pèrdua o mutació d'ambdues còpies) dona lloc al desenvolupament tumoral i aquesta inactivació pot tenir lloc per mutació i/o delecció. Molts locis presenten heterogeneïtat entre els al·lels del cromosoma matern i patern. Un al·lel d'un gen supressor de tumors pot estar inactivat en la línia germinal o inactivar-se mitjançant una mutació somàtica, de manera que ara existiria una heterogeneïtat entre ambdós al·lels. Però si abans de la divisió cel·lular té lloc un procés de recombinació, com a conseqüència d'aquest, trobaríem l'al·lel mutat en ambdues còpies, per tant s'hauria produït el que s'anomena una pèrdua d'heterogositat (LOH).

◆ APC

El gen *adenomatous polyposis coli* (APC) és el veritable guardià de l'homeòstasi cel·lular en l'epiteli del còlon, controlant l'equilibri entre la proliferació i l'apoptosi (10). El gen APC es va identificar i caracteritzar el 1991. Es localitza al cromosoma 5q21, està format per 8.535 pb i distribuït en 15 exons, tot i que més tard es va descriure com un gen dividit en 20 exons (11). Codifica per una gran proteïna de 2.843 aminoàcids i 310 KDa. Aquesta proteïna presenta diverses isoformes probablement com a resultat de l'*splicing* alternatiu, presenta diferents dominis i això fa que pugui interaccionar amb nombroses molècules (12) donant lloc a diverses funcions (11, 13):

1. Regulació de la senyalització induïda per la β -catenina
2. Regulació de l'adhesió cel·lular a través de la β -catenina i l'E-cadherina

3. Regulació de la migració cel·lular per mitjà de la interacció amb els microtúbuls
4. Bloqueig del cicle cel·lular possiblement mitjançant la inhibició directa dels components del cicle cel·lular
5. Regulació coordinada de l'adhesió i mobilitat cel·lular

APC contribueix amb la ordenada migració de les cèl·lules intestinals dins de la cripta i la β -catenina juga un paper molt important en aquesta funció (11).

La inactivació del gen APC és l'esdeveniment que s'ha identificat en les primeres fases del càncer colorectal esporàdic (13). S'estima que un 85% dels tumors de còlon presenten mutacions somàtiques en el gen APC (14). L'anàlisi mutacional del gen APC revela que la majoria de mutacions germinals trobades en pacients amb poliposi familiar hereditària (FAP) són mutacions sense sentit que generen codons stop i per tant proteïnes truncades que són inactives. Més del 60% de les mutacions trobades en el gen APC es concentren en una regió central de la proteïna que rep el nom de *mutation cluster region* (MCR). L'MCR coincideix amb la regió de l'APC que intervé en les funcions dependents de la β -catenina, la qual cosa suggereix que aquesta funció és molt important en la patogènia del càncer colorectal. Diferents estudis han demostrat que la proteïna APC i la β -catenina són parts importants de la via de senyalització intracel·lular Wnt (14).

La via Wnt és un dels principals sistemes de senyalització. Les proteïnes Wnt ("wingless") dirigeixen la diferenciació de varis tipus de cèl·lules durant el desenvolupament embrionari. Aquestes proteïnes són una família de molècules altament conservades que regulen les interaccions intercel·lulars durant l'embriogènesi. També s'ha observat que els gens Wnt estan implicats en el càncer, ja que la via Wnt és essencial per a mantenir el compartiment de cèl·lules mare en les criptes intestinals. Quan s'exposen a determinats factors de creixement i citoquines generen progenitors que proliferen transitòriament i després es retiren del cicle cel·lular per a finalment diferenciar-se (11).

En absència funcional de la proteïna APC, la β -catenina s'acumula en el citoplasma, després és mobilitzada a l'interior del nucli on interacciona amb factors de transcripció que indueixen l'expressió de gens específics que estimulen la proliferació cel·lular contribuint a la formació del tumor (8, 10).

◆ p53

El gen supressor de tumors més conegut és el TP53, ja que les mutacions en aquest gen són les més freqüents en els càncers humans. Aquest gen es troba al cromosoma 17p.13.1 i la proteïna que codifica té diferents funcions entre les quals es troba la de factor de transcripció. Una de les principals funcions és com a component de la maquinària cel·lular que s'activa per a donar resposta al dany cel·lular (15). De

L'activació del p53 en resulta l'expressió de determinats gens (p21, BAX, MDM2,...) que bloquegen el cicle cel·lular o indueixen l'apoptosi. La funció del p53 és reconèixer el dany del DNA i induir l'aturada del cicle cel·lular, reparar el DNA o conduir la cèl·lula a l'apoptosi. Per aquest motiu el p53 és anomenat guardià del genoma (8). Per tant la pèrdua del p53 permet a les cèl·lules que han patit lesions genètiques sobreviure i proliferar, i se sap que aquestes cèl·lules tenen major incidència d'inestabilitat genètica i d'amplificació gènica. Per tant, la inactivació del p53 pot contribuir en el desenvolupant tumoral (15).

◆ DDC

El gen *deleted in colorectal cancer* es localitza en el locus 18q21. El gen DDC codifica per una proteïna amb homologia amb les proteïnes de la família NCAM (*neural cell adhesion molecule*) que tenen funcions de reconeixement i adhesió cel·lulars. La inactivació de DDC pot contribuir al desenvolupament tumoral per l'alteració del reconeixement de senyals extracel·lulars procedents d'altres cèl·lules, de la matriu extracel·lular o de molècules solubles (16).

2.1.2. Oncogens

L'activació d'aquests gens és per mitjà d'una mutació puntual, delecció, translocació o amplificació gènica. La majoria dels oncogens tenen funcions relacionades amb el creixement i la diferenciació cel·lular. Un dels oncogens més importants en el càncer colorectal és el K-ras (15).

◆ K-ras

El gen k-ras es localitza al cromosoma 12p i codifica per a una proteïna de 21 KDa (p21^{ras}) involucrada en la transmissió de senyals externes a través de la unió a la proteïna G. K-ras té activitat GTPasa constitutiva i aquesta es perd quan el gen és mutat. Les mutacions en aquest gen condueixen a un augment i desregulació en la proliferació cel·lular i transformació maligna (17). La mutació en l'oncogen k-ras s'ha observat en un 35% dels CCR esporàdics i es creu que té lloc en fases primerenques del procés carcinogènic a més s'està avaluant el seu paper en la formació de les metàstasis colorectals (18).

2.1.3. Gens mutadors

Les cèl·lules han de mantenir la integritat del genoma que transmetran a les cèl·lules filles, així com evitar l'acumulació de mutacions en els gens que controlen la proliferació cel·lular. Les cèl·lules posseeixen diversos sistemes de reparació del DNA per a poder garantir la integritat del seu genoma, entre ells el sistema MMR (*mismatch repair*). Els gens mutadors inclouen tot un conjunt de gens, la funció dels quals es reparar els errors produïts durant la replicació del DNA.

La funció del sistema de reparació MMR és eliminar errors en l'aparellament entre bases, així com els llaços d'inserció-delecció que tenen lloc com a conseqüència de que la DNA polimerasa pot lliscar durant la replicació. Les primeres lesions tenen lloc en el DNA no repetitiu i produeixen substitucions de bases, mentre que els llaços afecten al DNA repetitiu i donen lloc a guanys i pèrdues de curtes repeticions de nucleòtids dins dels microsatèl·lits. Això es coneix com a inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) i aquesta la podem trobar tan en càncers colorectals esporàdics com hereditaris, tot i que és una característica del Càncer Colorectal Hereditari no Polipòsic (CCHNP) (11). La inestabilitat dóna lloc a un fenotip mutador i és conseqüència de defectes (mutacions hereditàries en la línia germinal o silenciar la transcripció per metilació) en alguns dels gens implicats en el sistema MMR (hMSH2, hMSH3, hMSH6, hMLH1, hMLH3, hPMS1, hPMS2, entre d'altres)(19).

2.1.4. Inestabilitat genòmica

Ha estat suggerit que la desestabilització del genoma pot ser un primer pre-requisit en la carcinogènesi, ja que crea un estadi permissiu per a seguir acumulant mutacions genètiques que condueixen a la progressió del tumor (8, 20). Existeixen dos tipus fonamentals d'inestabilitat genòmica en el càncer colorectal: la inestabilitat cromosòmica (CIN) i la inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) i ambdues contribueixen al desenvolupament del càncer colorectal (figura 1).

♦ Inestabilitat cromosòmica

És l'aneuploidia i l'anormalitat cromosòmica estructural i numèrica (10). La CIN té lloc aproximadament en el 85% dels tumors de còlon i es caracteritza per la pèrdua al·lèlica, les amplificacions cromosomals i les translocacions (21).

Entre els mecanismes que poden intervenir en la CIN hi ha els gens involucrats en detectar les interaccions entre el fus i el cinetocor durant la mitosis. Aquests són els principals candidats a jugar un paper important en la inestabilitat cromosòmica en els càncers humans. De fet en aquest procés es creu que hi poden estar involucrats més de 100 gens que intervenen en l'estructura i funció del cinetocor. *In vitro* també s'ha observat que la inactivació de les proteïnes que regulen els punts de control del dany al DNA, el metabolisme del cromosoma i la funció del centrosoma influeixen en l'estabilitat cromosòmica (22) APC podria ser un dels gens responsables de la CIN perquè intervé en el control de la segregació dels cromosomes durant la mitosi (10). Les cèl·lules amb el gen APC mutat tenen una gran quantitat de microtúbuls que són incapaços d'unir-se al cinetocor i per tant són responsables del fenotip d'inestabilitat cromosòmica (22).

◆ Inestabilitat de microsatèl·lits

L'MSI representa un 15% dels CCR esporàdics. Els tumors pateixen canvis en el marc de lectura (*frameshift*) i substitucions de bases que principalment es troben en seqüències de nucleòtids repetits coneguts com a microsatèl·lits. La inestabilitat de microsatèl·lits és causada majoritàriament per la pèrdua de la funció del sistema MMR (21).

Els microsatèl·lits són seqüències repetitives presents en l'àcid desoxiribonucleic i són constituïts per unitats de repetició en tàndem. Repartits pel genoma n'hi ha aproximadament mig milió (19).

La inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) es defineix com una disminució o un augment en la longitud del microsatèl·lits en el DNA tumoral, en comparació amb el DNA normal corresponent (19).

Les regions del genoma on es troben els microsatèl·lits són difícils de replicar i els enzims encarregats de la síntesi del DNA poden lliscar i originar petits bucles, a causa d'insercions o delecions d'alguns nucleòtids, en la nova cadena sintetitzada. En condicions normals, les cèl·lules posseeixen tota una maquinària capaç de reconèixer i reparar aquests errors i mantenir la integritat del genoma. Aquest mecanisme és anomenat sistema de reparació d'aparellaments erronis o *mismatch repair* (MMR). S'ha proposat que els errors en el sistema de control de la fidelitat de replicació del DNA podrien donar lloc a una inestabilitat genòmica intrínseca a la cèl·lula que afavoriria l'augment (entre 100-1000 vegades) i l'acumulació de mutacions i induiria el desenvolupament tumoral (19).

La inestabilitat dona lloc a un fenotip mutador i és conseqüència de defectes (mutacions hereditàries en la línia germinal o silenciament transcripcional per metilació) en alguns dels gens implicats en el sistema MMR (hMSH2, hMSH3, hMSH6, hMLH1, hMLH3, hPMS1, hPMS2, entre d'altres)(19).

L'MSI en CCR esporàdic i hereditari té lloc per dos mecanismes diferents. En CCHNP la causa és una mutació germinal en els enzims del sistema MMR MSH2 i MLH1. Mentre l'MSI en el 5-15% en el CCR esporàdic és deguda a la pèrdua d'expressió dels gens del sistema MMR a causa del silenciament epigenètic (21).

El 1998, el *National Cancer Institute*, en un esforç per unificar criteris a l'hora de detectar la MSI en càncers colorectals, va recomanar l'anàlisi d'un panell de 5 marcadors, 2 de tipus mononucleòtid (BAT-25 i BAT-26) i 3 de tipus dinucleòtid (D2S123, D5S346 i D17S250). D'aquesta manera, els tumors poden classificar-se en 2 grups segons el grau de la MSI que presenten (19):

- Inestabilitat alta (MSI-A): 2 ó més loci presenten inestabilitat
- Inestabilitat baixa (MSI-B): 1 loci presenta inestabilitat
- Estabilitat: Cap dels 5 loci presenta inestabilitat

L'avaluació de la presència o no, de l'MSI és el primer pas per a l'estudi genètic d'individus susceptibles d'experimentar CCHNP. El panell de marcadors proposats pel *National Cancer Institute* és especialment efectiu per a la identificació de tumors colorectals amb mutacions en hMLH1 o hMSH2 i justifica aproximadament un 90% dels tumors amb MSI, mentre que ho és menys per a la detecció de tumors amb mutacions en altres gens del sistema MMR (19).

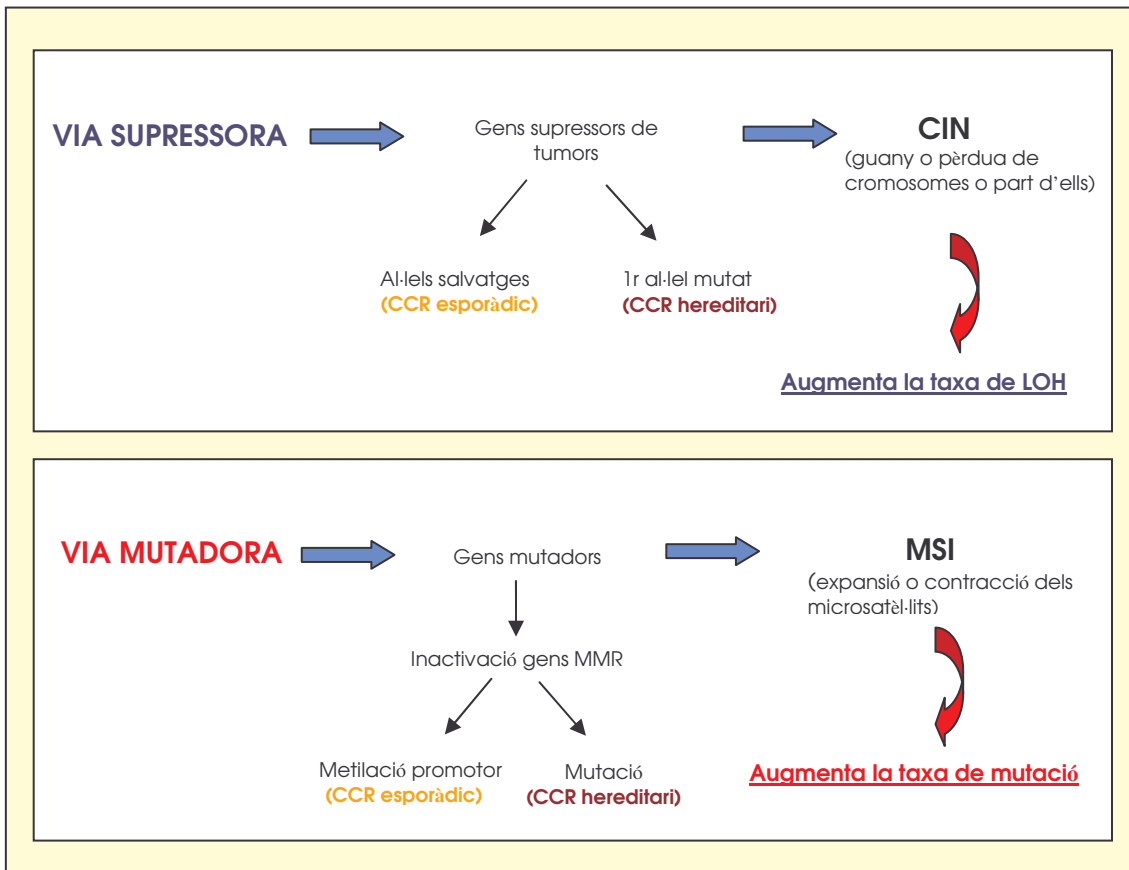


Figura 1. Esquema en el que es representen les dues vies per les quals es pot desenvolupar el càncer colorectal.

2.1.5. Virus

Existeixen múltiples retrovirus que són capaços d'integrar-se en el genoma humà i induir la formació de tumors. Aquests virus posseeixen una elevada eficàcia per a la integració aleatòria en el genoma de la cèl·lula hoste i poden ser portadors d'un oncogen com a part del seu genoma o bé actuar com a tal inserint-se a prop i modificant l'expressió dels protooncogenes cel·lulars. Per exemple el papillomavirus que és responsable de les berrugues benignes o dels tumors anogenitals (15).

2.1.6. La telomerasa

El càncer sorgeix per l'expansió clonal de cèl·lules proliferants. Seguidament a les mutacions que inicien l'expansió clonal, les cèl·lules pre-malignes acumulen altres

mutacions, per exemple p53, que confereixen inestabilitat genòmica a la cèl·lula i li permeten continuar dividint-se i per tant, escurçant els seus telòmers. Llavors té lloc la reactivació de la telomerasa que permet l'estabilització dels telòmers i la "immortalització". Per si sola la telomerasa no confereix la capacitat d'ésser "immortal", cal que tinguin lloc altres canvis (23).

La presència de la telomerasa ha estat analitzada en un gran nombre de tumors humans (sistema nerviós, pulmó, mama, pell, tracte urinari, fetge, tracte reproductiu femení i masculí, gastrointestinal, cap i coll) essent considerada per alguns autors com un segell del càncer. Les cèl·lules tumorals necessiten un mecanisme per a mantenir els telòmers i la telomerasa els permet fer-ho (23).

2.2. FACTORS AMBIENTALS

El càncer colorectal és una neoplàsia que afecta els països desenvolupats i la seva incidència en els països dels continents més pobres, Àfrica i Àsia, és molt baixa. Això ha donat peu a la realització d'estudis que han intentat trobar factors ambientals associats amb un augment o disminució del risc de patir CCR. S'ha demostrat que el risc de patir càncer colorectal té relació amb la dieta i l'estil de vida.

Els principals factors són:

1) Dieta i micronutrients

- ▶ La carn vermella i els greixos saturats augmenten el risc de patir CCR.
- ▶ Els vegetals i les verdures disminueixen el risc degut al seu elevat contingut en fibra i micronutrients.

La fibra té varis efectes: disminueix el temps de trànsit dels aliments pel tracte intestinal, produeix l'efecte "*bulky*", és a dir, dilueix el contingut intestinal, i es creu que pot interaccionar amb varis carcinògens.

Entre els micronutrients trobem vitamines antioxidants (A, E, i C), flavonoids, inhibidors de proteases, folat i calci.

2) Activitat física i obesitat

- ▶ L'activitat física disminueix el risc de patir càncer de còlon en ambdós sexes, però no té relació amb el risc de patir càncer de recte. Els mecanismes pels quals l'activitat física disminueix el risc de patir càncer no estan clars.
- ▶ L'obesitat augmenta el risc de patir càncer.
Un augment de l'activitat física estaria associat amb un cos amb un baix contingut lipídic.

3) Factors hormonals

- ▶ La gastrina: estimula la replicació en les cèl·lules epitelials del còlon normal i a través d'aquest mecanisme es considera un promotor del CCR. Un estudi recent conclou que nivells de gastrina per sobre dels normals augmenten el risc de patir CCR.

4) Tabac i begudes alcohòliques

- ▶ El tabac s'ha relacionat amb la prevalença de pòlips adenomatosos.
- ▶ Les begudes alcohòliques han mostrat resultats contradictoris en diferents estudis.

5) Malalties prèvies

- ▶ La colitis ulcerosa i la malaltia de Crohn's augmenten el risc de desenvolupar CCR en aquelles persones que les pateixen.

6) Medicaments

- ▶ Antiinflamatoris no esteroïdals, aspirina i sulindac s'ha observat que disminueixen el risc de patir CCR (24).

3. ETIOLOGIA DEL CÀNCER COLORECTAL

El càncer colorectal inclou un grup complex de tumors. Des d'un punt de vista genètic els càncers colorectals (CCR) poden ser classificats en càncers esporàdics que representen el 70% i en càncers hereditaris el 30% restant, del qual un 5% són síndromes amb una herència mendeliana i un 25% presenten una contribució multifactorial (25).

3.1. CÀNCER ESPORÀDIC

El càncer esporàdic és aquell que apareix degut a l'acumulació de mutacions durant un llarg període de temps. Aquestes mutacions han d'afectar els gens diana que fan més susceptibles a les cèl·lules. Com ja hem comentat prèviament, aquests gens, anomenats gens tumorals, s'identifiquen en tres tipus: oncogens, gens supressors de tumors, i gens mutadors (26).

3.2. CÀNCER HEREDITARI

Els CCR hereditaris suposen entre un 5-20% dels càncers colorectals diagnosticats. Els càncers hereditaris són aquells en els quals la primera mutació apareix en les cèl·lules germinals i es transmet de manera hereditària. Les successives mutacions són de caràcter adquirit i tenen lloc posteriorment en cèl·lules somàtiques, per tant el que s'hereta no és el càncer sinó una predisposició a aquest. La majoria de síndromes familiars (poliposi familiar adenomatosa, poliposi juvenil i síndrome de Lynch) es

transmeten com a malaltia autosòmica dominant. És a dir, l'herència d'un sol al·lel mutat és suficient per conferir el risc de patir la malaltia. La majoria de gens associats a aquestes síndromes són gens supressors de tumors, ens les quals és necessari que s'inactivin ambdós al·lells del gen, a nivell somàtic, perquè la cèl·lula esdevingui maligna (26).

Classificació dels CCR hereditaris:

- ▶ Síndromes polipòsiques
 - 1) Poliposi Adenomatosa Familiar (FAP)
 - 2) Poliposi Adenomatosa Familiar Atenuada (AFAP)
 - 3) Síndrome de Gardner
 - 4) Síndrome de Turcot
 - 6) Poliposis juvenils

- ▶ Síndromes no polipòsiques
 - 1) CCHNP

3.2.1. Síndromes polipòsiques

Des del punt de vista genètic aquestes poliposis familiars són degudes a mutacions en gens supressors de tumors i segueixen un patró d'herència dominant. La primera mutació es heretada per via germinal, aquest fet s'acompanya per una inestabilitat cromosòmica que predisposa a que es produeixi la segona mutació necessària per a desenvolupar el tumor.

◆ Poliposi Adenomatosa Familiar (FAP)

La FAP és una malaltia hereditària que es caracteritza pel desenvolupament durant la vida del pacient de centenars a milers de pòlips intestinals, localitzats predominantment en el còlon i en menor freqüència en l'estómac i el duodè. Alguns pacients a demés de pòlips presenten manifestacions extradigestives com lesions retinianes (CHRPE), quists epidermoids, osteomes de mandíbula i anomalies dentals (27). La seva incidència és de 1:10000 a 1:7000 (16) i representa menys de l'1% de tots els càncers colorectals (12). Els pòlips del còlon solen aparèixer en edat precoç i evolucionaran a càncer de manera natural en el 100% dels casos. L'alteració genètica responsable d'aquesta malaltia és una mutació en la línia germinal d'un gen supressor de tumors, el gen APC, el qual s'hereta de manera autosòmica dominant i té una penetrància del 100% (27).

La major part de les mutacions del gen APC es concentren en una petita regió de l'exó 15 i són mutacions puntuals que donen lloc a la síntesi d'una proteïna

truncada. La detecció d'aquesta proteïna s'està introduint en el diagnòstic de la FAP. Depenent del tipus de mutació que afecta al gen APC es poden expressar diferents formes clíniques de la poliposi, per exemple, existeix una variant atenuada de la FAP (27). A través d'estudis de lligament genètic s'ha pogut demostrar que el gen responsable de la síndrome de Gardner i el gen responsable de la síndrome de Turcot, es troben en el mateix locus que el gen APC, és a dir, que són variants al·lèliques (27).

♦ Poliposi Adenomatosa Familiar Atenuada (AFAP)

Aquesta variant presenta pocs adenomes i un risc baix de càncer i és deguda a una mutació en la zona proximal del gen (5'). Aquest pacients presenten menys adenomes i l'aparició del CCR té lloc per terme mig 12 anys més tard que en la FAP clàssica (27).

♦ Síndrome de Gardner

És una variant fenotípica de la FAP que transcorre amb quists epidermoides a la pell, osteomes mandibulars, hipertròfia congènita del pigment de la retina (CHRPE), fibromes i tumors desmoides (11).

♦ Síndrome de Turcot

Es caracteritza per adenomes profusos en el còlon (des de 50 fins a més de 100) i transcorre amb càncers al sistema nerviós central, específicament al cervell. Presenta dues variants en funció del gen mutat. La primera variant és deguda a la mutació germinal en el gen APC i on predomina el meduloblastoma; la segona presenta mutacions en els gens hMLH1 o hPMS2 i on predomina el glioblastoma multiforme (11).

♦ Poliposi juvenil

Es caracteritza per la presència difusa de pòlips hamartomatosos juvenils en el còlon els quals també poden aparèixer a l'estómac o l'intestí prim. S'identifica molecularment per les mutacions en el gen de la proteïna tirosina fosfat (11).

3.2.2. Síndromes no polipòsiques

♦ Càncer Colorectal Hereditari No Polipòsic (CCHNP)

És la principal síndrome no polipòsica, també anomenada síndrome de Lynch i representa un 5% de tots els CCR. Aquesta síndrome es caracteritza per l'aparició de CCR en edats primerenques amb excés de tumors sincrònics i metacrònics (11). No només predisposa al CCR sinó també a com a mínim 7 tumors en altres òrgans (endometri, estómac, ovaris, intestí prim, epiteli hepatobiliar, epiteli uroepitelial i cervell)(16). És una malaltia autosòmica dominant i el gen mutat correspon al grup de gens que s'anomenen gens mutadors, corresponents al sistema MMR. Són els gens encarregats de reparar els aparellaments incorrectes durant la replicació del DNA. La proteïna anormal perd la seva funció, els mals aparellaments no són reparats i això

conduïx a l'aparició de mutacions generalitzades per tot el genoma, augmentant la probabilitat que aquests pacients desenvolupin neoplàsies en diferents òrgans (27).

Els gens del sistema MMR implicats en aquesta síndrome amb més freqüència són hMSH2 i hMLH1 seguits de hMSH6 i hPMS2 (16).

4. BIOLOGIA MOLECULAR DEL CÀNCER COLORECTAL

4. 1. MODEL MOLECULAR DEL CÀNCER COLORECTAL

Fearon i Vogelstein (28) proposen un model per a la progressió del càncer colorectal (figura 2). El model proposa que la primera mutació que confereix un augment de la proliferació cel·lular té lloc en el gen APC, ja que aquest gen és el responsable de l'homeòstasi cel·lular. La inactivació somàtica del gen APC pot ser deguda a la pèrdua d'heterogozitat o a la mutació d'aquest i conduïx a la formació de criptes aberrants i micro-adenomes. El pas d'adenoma primerenc a adenoma intermedi vindria donat per la mutació en el oncogen k-ras. La pèrdua d'heterogozitat del locus 18q i la mutació del gen DDC participen en la progressió cap a adenoma tardà. La mutació i pèrdua del gen p53 (17q) és responsable de la transformació d'adenoma a carcinoma i altres canvis genètics estarien implicats en l'aparició de les metàstasis (16).

No tots els tumors colorectals han de presentar aquesta mateixa cronologia de les mutacions, ja que s'ha observat, que més important que l'ordre, és que totes aquestes mutacions es van acumulant al llarg del desenvolupament del càncer colorectal (28).

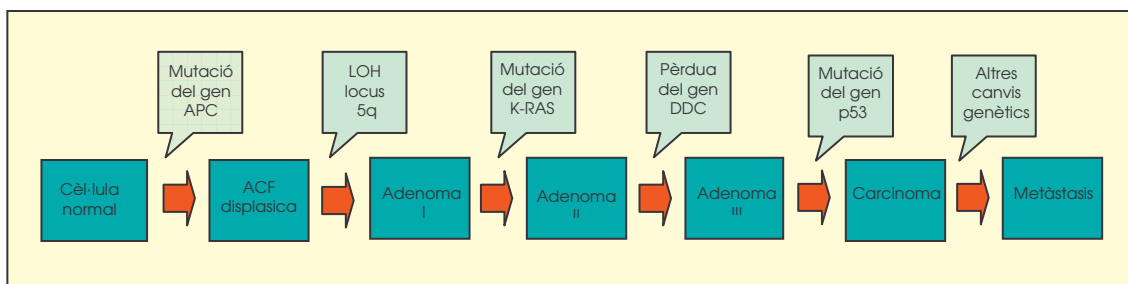


Figura 2. Model dels canvis genètics en cada una de les fases del càncer colorectal. Modificat de Fearon i Vogelstein (28).

La microestructura del còlon es caracteritza per criptes que tenen una profunditat d'unes 50 cèl·lules. A l'epiteli colònic en condicions normals hi ha una renovació quasi constant i normal de les cèl·lules superficials d'aquest epiteli, aproximadament cada sis dies mitjançant la proliferació i diferenciació de les cèl·lules de la cripta. La proliferació de les cèl·lules colòniques té lloc en la porció inferior de la cripta, es caracteritza per processos mitòtics a mesura que les cèl·lules s'allunyen de les

cèl·lules mare. A mesura que ascendeixen per la cripta, les cèl·lules colòniques, perden la capacitat proliferativa i es diferencien al arribar a la part apical de la cripta on finalment moren per apoptosi i són exfoliades a la llum intestinal (29, 30). Per tant, les cèl·lules que estan en contacte amb el contingut colònic són cèl·lules diferenciades que ja no es dividiran i que en pocs dies entraran en apoptosi, ja que l'epiteli colònic presenta una taxa de renovació molt elevada. L'estructura i funcionament de la cripta donen força a la hipòtesi basada en que la primera mutació afecta a les cèl·lules mare. Una mutació en aquestes cèl·lules originaria un clon cel·lular amb genotip mutat(31).

En adenomes aquesta seqüència està alterada. Té lloc la mitosis continuada i aquestes cèl·lules no pateixen diferenciació de manera que el compartiment on proliferen pot arribar a ocupar la cripta completa (11).

4.1.1. Lesions precursors

El procés de tumorigènesi pot començar amb un desordre generalitzat de la replicació i diferenciació cel·lular, el qual precedeix i acompanya el desenvolupament de lesions morfològiques. Així en estadis primerencs de la carcinogènesi les cèl·lules epitelials esdevenen incapaces de reprimir la síntesi de DNA durant la migració des de la porció inferior cap a la porció superior de la cripta i desenvolupen la capacitat proliferativa. Com a conseqüència la zona proliferativa s'expandeix, les cèl·lules en fase S es poden observar al llarg de tota la glàndula o cripta. Això és el que anomenem focus de criptes aberrants (ACF)(31). Els ACF es creu que poden ser els precursors d'adenomes i carcinomes (32). Les ACF consisteixen en criptes de l'intestí amb diferents graus d'atípia nuclear o displàsia. Es creu que l'evolució dels ACF donaria lloc als pòlips, que es defineixen com una proliferació no invasiva de les cèl·lules epitelials i es classifiquen en tubulars, túbulo-vellosos i vellosos.

No podem descartar les formacions de *novo*, alguns autors subratllen el paper potencial de les lesions planes (*flat lesions*) com a font de malignitat (31). Els adenomes plans són descrits com lleugeres elevacions de la mucosa de coloració vermellosa i difícilment poden ser detectats per rutina endoscòpica (31). Se sap que aquestes lesions provenen d'un clon cel·lular i que el seu potencial maligne està relacionat amb la seva mida (33).

4.1.2. Seqüència adenoma-carcinoma

Múltiples estudis han permès caracteritzar el procés carcinogènic del càncer colorectal. Actualment hi ha evidències clíniques, epidemiològiques i experimentals que indiquen que l'adenoma o pòlip adenomatós és una lesió pre-maligna que

precedeix la majoria de càncers. Tot i que no indica que tots els pòlips desenvolupin un càncer.

A continuació es recullen evidències que els pòlips poden transformar-se en carcinomes:

- 1) Les àrees adenomatoses són observades en els carcinomes.
- 2) FAP (Familial Adenomatous Polyposis) presenten centenars de pòlips i el càncer es desenvolupa en el 100% dels casos no tractats, 10-20 anys després de l'aparició del pòlip.
- 3) La vigilància endoscòpica i l'extirpació sistemàtica dels pòlips redueix la incidència de nous CCR i disminueix la mortalitat.
- 4) La incidència específica d'edat dels pòlips mostra un pic 5 anys abans de l'aparició del tumor.
- 5) Els factors ambientals relacionats amb el pòlip són els mateixos que els del CCR.

Si els pòlips i el càncer comparteixen els mateixos factors etiològics és probable que representin dues fases diferents del mateix desordre. Alguns estudis de genètica molecular mostren que les mateixes alteracions biològiques són detectades en adenomes i càncers (31).

Canvis que tenen lloc en la seqüència Adenoma-Carcinoma:

- 1) Estat hiperproliferatiu de la mucosa colorectal, inversió de la zona replicativa de la cripta, ara localitzada a la part superior.
- 2) Un grup (*cluster*) de cèl·lules activament replicatives poden patir una expansió clonal i donar lloc a un petit adenoma.
- 3) Aquest adenoma pot progressar per augment de la mida, adquirir atípia citològica i desenvolupar un patró vellós.
- 4) Adquirir un comportament maligne amb invasió/infiltració dels teixits adjacents i metastitzar-se.

Aquest procés pot tardar dècades a completar-se i és acompanyat per alguns canvis genètics (24):

- 1) Pèrdua al·lèlica: 5q (gen APC), 17p (p53), 18q (gen DCC)
- 2) Mutació en l'oncogen K-ras
- 3) Disminució de l'expressió del supressor de tumors DCC
- 4) Canvis en els gens APC i MCC
- 5) Mutació en el gen p53

5. CARACTERÍSTIQUES ANATOMOPATOLÒGIQUES DEL CARCINOMA COLORECTAL

◆ Localització

La classificació internacional de malalties oncològiques distingeix entre les neoplàsies de còlon i recte, tot i que recentment han estat tractats com a tres tipus diferents de càncers colorectals: còlon dret, còlon esquerre i recte. Aquesta nova classificació està basada en les següents indicacions (2, 7):

- ▶ Els tumors situats en aquestes tres zones tenen unes ràtios d'incidència específiques en les diferents àrees del món, suggerint l'existència de diferents agents causals.
- ▶ Les neoplàsies de còlon presenten diferent localització depenent de l'edat i sexe (còlon dret més freqüent en dones i còlon esquerre més freqüent en homes).
- ▶ Canvi en la tendència de la incidència entre tumors proximals i distals.

◆ Tipus histològic

- ▶ Adenocarcinoma: histològicament es caracteritza per la formació de glàndules amb més o menys grau de diferenciació.
- ▶ Carcinoma mucinós: és format per grans llacs de mucina extracel·lular barrejats amb cèl·lules tumorals. Aquests llacs constitueixen més del 50% de la massa tumoral. El carcinoma mucinós representa un 15% del total de carcinomes colorectals i és més freqüent en el recte.
- ▶ Carcinoma de cèl·lules en segell: És una forma poc habitual d'adenocarcinoma que normalment afecta persones amb edat jove. Les cèl·lules tumorals creixen de manera difusa, gairebé sense formació de glàndules. La major part de la mucina és intracel·lular, la seva acumulació ocasiona un desplaçament del nucli donant lloc a la típica forma en anell de segell de les cèl·lules.
- ▶ Altres tipus: el carcinoma amb diferenciació escamosa, i el carcinoma de cèl·lules petites.

◆ Grau de diferenciació

- ▶ ben diferenciat: consta de cèl·lules i estructures que s'assemblen al teixit d'origen de la neoplàsia (34).
- ▶ moderadament diferenciat: diferenciació glandular menys regular i pobra polaritat nuclear (35).
- ▶ pobrament diferenciat o indiferenciat: presenten pèrdua de la diferenciació glandular i de la polaritat nuclear i mostren un comportament

més agressiu a més no solen assemblar-se al teixit d'origen ni en estructura ni en funció (35).

Els tumors benignes són normalment diferenciats mentre que els malignes poden ser ben o poc diferenciats o ser completament indiferenciats (34).

◆ Aspecte

- ▶ vegetant: amb el creixement cap a l'interior de la llum.
- ▶ infiltrant: presenta creixement en profunditat, produint estenosi i retraccions.
- ▶ ulcerat: presenta úlcera.
- ▶ col·loide: sol ser voluminós i tou, apareix en pacients amb CCHNP.

◆ Estadi del tumor

L'estadi ens indica el nivell d'afectació tumoral de la paret del còlon i és un dels factors més importants ja que té un valor pronòstic.

La primera classificació, àmpliament acceptada, del grau del nivell d'invasió tumoral va ser descrita per Dukes en el 1932 en el carcinoma rectal (36). Els estadis de Dukes han sofert varies modificacions posteriors per a millorar la seva relació pronòstica, però totes ells es basen en l'extensió directa del tumor i en la presència de metàstasis limfàtiques. La classificació d'Astler, Coller i Turbull és la més utilitzada per la seva senzillesa i pel seu valor pronòstic. Es divideix en:

- ▶ Estadi A: El tumor es troba localitzat en la mucosa
- ▶ Estadi B: El tumor envaeix la capa muscular podent arribar fins a la serosa sense sobrepassar-la. Es pot subdividir en l'*estadi B1* si el tumor arriba fins a la muscular pròpia, però sense sobrepassar-la, i l'*estadi B2* si el tumor envaeix tota la paret del còlon.
- ▶ Estadi C: Similar als estadis B1 i B2 però amb metàstasis limfàtiques associades. Es subdivideix en l'*estadi C1* quan el tumor arriba fins a la muscular pròpia però sense sobrepassar-la i l'*estadi C2* quan el tumor envaeix tota la paret del còlon.
- ▶ Estadi D: Tumors amb disseminació peritoneal o metàstasis a distància.

◆ Sistema TNM (tumor, ganglis, metàstasis)

És un sistema clinicopatològic proposat conjuntament per la Unió Internacional contra el Càncer (UICC) i l'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC) que té en compte la invasió d'estructures veïnes a més a més del número de ganglis afectats pel tumor (34).

- ▶ T: fa referència a la disseminació local dins i fora de l'òrgan d'origen
 - Tx = desconegut
 - Tis = intraepitelial o invasió de la làmina pròpia
 - T1 = afectació de la submucosa
 - T2 = invasió de la muscular pròpia, sense sobrepassar-la
 - T3 = invasió de la serosa o grassa pericòlica
 - T4 = invasió d'òrgans adjacents i/o afectació de la cavitat peritoneal
- ▶ N: es refereix a l'afectació tumoral dels ganglis limfàtics
 - Nx = desconegut
 - N0 = absència de ganglis afectats
 - N1 = afectació 1-3 ganglis
 - N2 = afectació de 4 ó més ganglis
- ▶ M: es refereix a la presència o no de metàstasis
 - Mx = desconegut
 - M0 = absència
 - M1 = presència
- ▶ El sistema TNM es pot fer servir combinant els tres paràmetres
 - Estadi 0 = Tis N0 M0
 - Estadi I = T1-2 N0 M0
 - Estadi II = T3-4 N0 M0
 - Estadi III = T1-4 N1-2 M0
 - Estadi IV = T1-4 N0-2 M1

6. PÒLIPS COLORECTALS

Segons la seva naturalesa els pòlips es poden classificar en neoplàsics i no neoplàsics.

6.1. PÒLIPS NEOPLÀSICS

Els pòlips neoplàsics, també denominats adenomes o pòlips adenomatosos, són lesions premalignes amb capacitat per a transformar-se en adenocarcinomes. Es classifiquen en tubulars, vellosos i tubulo-vellosos.

Macroscòpicament poden ser pedunculats o sèssils. En general, la seva mida es correlaciona amb el tipus histològic, essent la majoria de les lesions menors d'1 cm adenomes tubulars, mentre que la meitat de les majors de 2 cm corresponen a adenomes tubulo-vellosos i vellosos.

Microscòpicament, els adenomes tubulars presenten una arquitectura glandular, mentre que els vellosos són papil·lars. L'epiteli dels adenomes és per definició displàsic (37, 38).

6.2. PÒLIPS NO NEOPLÀSICS

Pòlip hiperplàsic

Són lesions freqüents de mida petita que predominen en el còlon distal. Microscòpicament les glàndules presenten un aspecte serrat i una superfície micropapilar. Aquests pòlips tradicionalment s'han considerat no neoplàsics, però alguns estudis han mostrat mutacions en el gen k-ras i inestabilitat de microsatèl·lits en un percentatge reduït d'ells.

Adenomes serrats

Són pòlips mixtes hiperplàsics/adenomatosos, i representen menys de l'1% dels pòlips colorectals. La majoria són sèssils, predominen en el còlon distal i medeixen entre 0.2-7 cm. Microscòpicament l'epiteli és displàsic amb un patró arquitectural com el del pòlip hiperplàsic, encara que més vellós i amb glàndules més ramificades.

Pòlip hamartomatós

Són lesions hamartoses que habitualment es produeixen en pacients amb síndrome de Peutz-Jeghers o la malaltia de Cowden, encara que també poden aparèixer de manera aïllada. La majoria es diagnostiquen a la tercera dècada de la vida. La seva mida és variable i poden ser sèssils o pedunculats. Histològicament estan constituïts per glàndules desorganitzades sobre un eix arborescent de múscul llis.

Pòlip juvenil

Tenen lloc en les dues primeres dècades de la vida. La localització més freqüent és el recte i generalment són únics i pedunculats, menors de 3 cm. La seva superfície és llisa i brillant. Estan formats per glàndules tortuoses i quístiques, sense atípia epitelial, plenes de moc i immerses en un estroma edematós i inflamat.

Pòlip inflamatori

Generalment són secundaris a una malaltia inflamatòria intestinal. Així, poden ser observats en pacients amb colitis ulcerosa, malaltia de Crohn, o colitis isquèmica entre d'altres. Histològicament són illots de mucosa que semblen projectar-se degut a la ulceració de la mucosa adjacent (37, 38).

7. CLÍNICA DEL CÀNCER COLORECTAL

7.1. MANIFESTACIONS CLÍNIQUES

Alteració del ritme intestinal

Canvis en el ritme normal. Es pot manifestar en forma de diarrea o estrenyiment fixes o alternants.

Sagnat intestinal

És degut a la ulceració de la neoplàsia. Es pot manifesta en forma de rectorràgia, encara que normalment el sagnat és microscòpic i va barrejat amb les deposicions. Aquest sagnat ocult en les deposicions s'ha utilitzat per al diagnòstic precoç del CCR. Una altra forma possible de presentació és la detecció d'una anèmia. En el recte la sang sol manifestar-se per hematoquècia o rectorràgies. En el còlon dret per sang oculta i per tant el/la pacient presenta sovint anèmia com a primer símptoma.

Massa palpable

El tumor pot ser palpable en l'exploració abdominal quan està molt desenvolupat, gairebé sempre en el còlon dret. Si es tracta d'un càncer de recte pot ser detectat per tacte rectal.

Dolor

En general es tracta d'una sensació de plenitud o una molèstia indefinida que pot ser difusa o localitzada en una zona determinada. El dolor pot augmentar la seva intensitat quan es presenten problemes d'obstrucció, especialment en el còlon esquerre. Les neoplàsies de recte i de la part més distal de sigma poden generar-se quadres de dolor intens, degut a que la infiltració perirectal afecta les estructures nervioses.

Síndrome constitucional

Suposa l'existència d'un tumor evolucionat generalment amb metàstasis a distància. Es caracteritza per anorèxia, astènia i pèrdua de pes. Donat que el càncer colorectal tarda a donar símptomes clars se sol diagnosticar tard, passant molt de temps asimptomàtic (2).

7.2. DIAGNÒSTIC

Colonoscòpia

És el mètode més sensible per a valorar el còlon ja que permet visualitzar de manera directa la lesió així com també biopsiar-la.

Ènema opac

Presenta una sensibilitat menor que la colonoscòpia però ens permet visualitzar el còlon quan aquesta no és possible. No permet prendre biòpsies.

Tomografia Computaritzada (TC)

TC abdominal presenta una elevada sensibilitat en la valoració de les metàstasis a distància, sobretot les hepàtiques. TC toràcica ens permet detectar les metàstasis pulmonars. Actualment es pot practicar la colonoscòpia virtual per TC, la qual ofereix una exploració precisa, segura, ràpida, rendible i és més ben acceptada pels pacients (39).

Ecografia abdominal

Ens orienta sobre l'existència de metàstasis hepàtiques o extensió peritoneal. L'ecografia endoanal dóna bona informació dels tumors rectals baixos (2, 40).

7.3. FACTORS PRONÒSTIC

Les estadístiques ens mostren que un 77% dels pacients operats que recidiven ho fan durant els 2 primers anys (41) i un 91% ho fan als 5 anys, per aquest motiu creiem que és important disposar de factors pronòstic per a poder preveure les recidives o si més no poder saber quins són aquells pacients amb unes probabilitats més elevades de patir recidiva i així poder-los fer un seguiment més intensiu.

El col·legi de patòlegs d'Amèrica va elaborar el 1999 una classificació pels factors pronòstic en el càncer colorectal (42). La classificació comprèn 5 categories:

Categoria I: inclou els factors els quals tenen una eficàcia provada per a ser utilitzats com a factors pronòstic.

- ◆ Classificació T: extensió local del tumor valorada pel patòleg.
- ◆ Classificació N: les metàstasis afecten els ganglis regionals. És un dels factors que més clarament indiquen el pronòstic després d'una resectió quirúrgica.
- ◆ Invasió venosa limfàtica o sanguínia
- ◆ Classificació R: fa referència a la presència o no de tumor residual als marges del tumor.

- ◆ Nivells del CEA preoperatori: Es consideren nivells significativament elevats els superiors a 5 ng/μl. El CEA és àmpliament usat per al seguiment dels pacients amb càncer colorectal. Els seus valors en sèrum s'han considerat que tenen un valor pronòstic per dividir els pacients en grups d'alt i baix risc, un valor elevat implica un major índex de recurrències postquirúrgiques als dos anys (2). Un elevat CEA preoperatori és indicador de mal pronòstic amb reduïda supervivència global després de la resecció quirúrgica (43, 44). Sovint el monitoratge del CEA postoperatori pot permetre identificar les metàstasis (42).

Dins de la categoria I, el factor pronòstic més utilitzat és la classificació que engloba les classificacions T, N i M, és a dir l'estadi TNM. La supervivència als 5 anys s'ha observat que depèn de l'estadi del tumor (45):

- Estadi I : 93.2%
- Estadi II: 82.5%
- Estadi III: 59.5%
- Estadi IV: 8.1%

Categoria IIA: inclou factors clínics i/o biològics àmpliament estudiats i els quals mostren reiteradament tenir un valor pronòstic.

- ◆ Grau histològic
- ◆ Marge radial
- ◆ Classificació després de la teràpia neoadjuvant (TNM)

Categoria IIB: inclou factors que demostren ser prometedors factors pronòstics però encara falten dades perquè siguin inclosos en les categories I o IIA.

- ◆ Tipus histològic
- ◆ Característiques histològiques associades amb MSI
- ◆ Elevat grau de MSI: els anàlisis multivariants indiquen que la MSI és capaç d'indicar, per si sola, un millor pronòstic de manera independent a altres variables, inclòs l'estadi del tumor (19).
- ◆ Pèrdua heterogozitat en el locus 18q i pèrdua al·lèlica del gen DCC
- ◆ Configuració dels marges del tumor

Categoria III: inclou factors que no han estat suficientment estudiats per a determinar el seu valor pronòstic.

- ◆ Contingut de DNA

- ◆ Altres marcadors moleculars: gens supressors de tumors (LOH 1p, LOH 8p, LOH 1p/p53, LOH 5q), oncogens (k-ras, c-myc), gens relacionats amb el suïcidi cel·lular i l'apoptosi (bcl-2, BAX), factor de creixement transformant (TGF), receptor del factor de creixement epidèrmic (EGF-R), gens inhibidors de les quinases ciclina dependents (p27 i p21), gens relacionats amb l'angiogènesi (factor de creixement de l'endoteli vascular), gens de glicoproteïnes i molècules d'adhesió (CD-44, E-cadherin, sialo-Tn antigen), inhibidors i metaloproteïnes de la matriu, i gens supressors de metàstasi (nm23-H1).
- ◆ La invasió perineural
- ◆ Densitat microvascular
- ◆ Proteïnes cel·lulars i carbohidrats
- ◆ Fibrosi peritumoral
- ◆ Reacció inflamatòria peritumoral purulenta
- ◆ Focus de diferenciació neuroendocrina sense un tipus histològic
- ◆ Regió Organitzadora del nucleòl
- ◆ Índex de proliferació

Categoria IV: inclou factors que han estat ben estudiats i han demostrat no tenir valor pronòstic.

- ◆ Mida del tumor
- ◆ Configuració macroscòpica del tumor

A part dels factors pronòstics que apareixen en la classificació anterior també s'hi consideren els següents factors:

- ▶ **Edat:** Els tumors diagnosticats en edats extremes, tan en individus molt joves com en d'avançada edat, són associats a un pitjor pronòstic.
- ▶ **Sexe**
- ▶ **Localització**
- ▶ **La classificació Dukes:** L'estadi d'invasió parietal del tumor (Dukes-Astler-Coller-Turbull, TNM) representa el primer i principal factor pronòstic. Es relaciona directament amb la supervivència, presenta una relació indirecta, com més alt és el nivell invasió menor és el temps de supervivència.
- ▶ **Altres característiques anatomopatològiques** s'han associat en aquest cas al pitjor pronòstic: els tumors infiltrants, els que presenten una histologia mucinosa i aquells poc diferenciats o els que presenten invasió venosa.

Actualment, s'utilitzen principalment dos factors pronòstic clinicopatològics, que són l'estadi Dukes, la seva variant Astler-Coller i/o el sistema TNM (tots dos recullen el grau d'infiltració tumoral a la paret intestinal i la presència de metàstasis en els nòduls limfàtics) Aquests factors no són perfectes però ens donen una idea de quin és el comportament biològic del tumor i ens permeten prendre una decisió més o menys radical pel que fa al seu seguiment i tractament. Però les noves tècniques en biologia molecular i els nous coneixements sobre els processos que intervenen en la carcinogènesi han permès identificar possibles nous factors pronòstics. De manera que ha crescut el nombre de publicacions que intenten identificar nous factors pronòstic per al CCR. En revisions sobre aquest tema es presenten dades contradictòries i controvertides, per la qual cosa la seva aplicació en la rutina clínica es reserva de moment, a la espera de resultats més concloents. Aquest es el cas de l'edat, el sexe, la localització del tumor, la mesura del dany genòmic (contingut de DNA o ploidia del tumor) o factors moleculars molt variats, com els desequilibris al·lèlics, les mutacions puntuals en gens com p53 o K-ras, l'amplificació gènica de gens com myc o SKI, etc... (19).

7.4. TRACTAMENT

Tractament quirúrgic

La cirurgia és el principal tractament amb intenció curativa del CCR. L'objectiu de la cirurgia curativa és l'extirpació del tumor amb un marge adequat així com la ressecció de les adenopaties loco-regionals, això implica l'ampliació del marge de ressecció del tumor al menys 5 cm sobre la zona afectada i ressecar un nombre mínim de ganglis, que es considera que són entre 12 i 13 (46, 47).

El tractament pal·liatiu s'aplica en aquells pacients amb un estadi avançat de la malaltia, no susceptibles a un tractament quirúrgic radical. D'aquesta manera es pot aconseguir el control dels símptomes, a vegades difícils de tractar d'una altra manera i mantenir o millorar la qualitat de vida.

Tractament adjuvant

Aquest s'administra després d'un tractament quirúrgic radical amb la intenció de disminuir la probabilitat de recurrència i augmentar així la supervivència lliure de malaltia i la supervivència global, eradicant la malaltia metastàsica.

La quimioteràpia pot ser administrada amb finalitat adjuvant o pal·liativa. La seva principal limitació és la toxicitat.

La radioteràpia és principalment indicada en el càncer de recte. L'ús d'aquesta permet disminuir la taxa de recurrència local, reduir la mida en tumors grans i millorar la

seva ressecabilitat. En els casos de malaltia avançada local pot pal·liar amb èxit el dolor, el tenesme i el sagnat (2).

Tractament neoadjuvant

S'administra abans de la cirurgia; ja sigui la quimioteràpia sola en el còlon, encara en estudi (48) o de forma ja implantada, associada amb radioteràpia en el recte (49). En aquest cas s'altera l'anàlisi de la peça quirúrgica.

Seguiment

Tot i els avenços en el tractament adjuvant del CCR, la supervivència als 5 anys és molt baixa al voltant del 50% (3) i un 30-50% dels pacients amb intenció curativa presenten recidives (41). La majoria d'aquestes recidives es produeixen en els 2-3 anys posteriors a la cirurgia i solen afectar l'anastomosi, les estructures locoregionals, el fetge i els pulmons. El seguiment del CCR té com a finalitat la detecció precoç de les recidives, les metàstasis o l'aparició d'un nou CCR (metacrònic), permetent actuacions terapèutiques que redueixen la mortalitat.

La majoria dels malalts s'inclouen en programes de seguiment postoperatori que comprenen la realització d'una anamnesi i exploració física, una analítica general i concreta (CEA, sang oculta en femta), colonoscòpia, TC i radiografia de tòrax (2).

La determinació seriada del CEA s'utilitza freqüentment en el control postoperatori del pacient. En la majoria de pacients amb valors de CEA preoperatoris elevats, aquests solen tornar als nivells normals durant els 4 mesos posteriors a la ressecció completa del carcinoma. Moltes sèries han mostrat l'associació entre una nova elevació del CEA després de la cirurgia i la recidiva del CCR, essent a vegades aquest el primer signe en un pacient asimptomàtic (2).

8. ELS TELÒMERS

8.1. CARACTERÍSTIQUES DELS TELÒMERS

Els cromosomes humans són lineals i els seus extrems contenen unes seqüències altament conservades al llarg de l'evolució sobre les quals s'hi troben proteïnes associades, aquest complex s'anomena telòmer. Aquesta estructura és molt important per l'estabilització del cromosomes.

Els telòmers són regions de DNA no codificants del genoma. Aquest DNA consisteix en la seqüència 5'-TTAGGG-3' repetida en tàndem entre 5-15 Kpb (Kiloparells de bases) en humans, ja que la longitud dels telòmers és espècie específica (50). Aquesta seqüència de 6 nucleòtids es coneix com a "replicació telomèrica" i cada cromosoma en conté entre 1000-2000 (51-53).

Els telòmers són cadenes dobles de DNA però en l'extrem 3' tenen una longitud entre 30-110 nucleòtids de cadena senzilla que conté una elevada proporció de guanines (G). Aquest extrem 3' es coneix com l'extrem que sobresurt (*overhang*) i només és visible durant la fase S del cicle cel·lular (54). Aquest extrem 3' de cadena simple envaeix la cadena doble de repeticions telomèriques i forma una estructura de bucle que anomenem *T-loop* (figura 3). En la formació i estabilització del *T-loop* hi participen entre d'altres les proteïnes d'unió a les repeticions telomèriques TRF1 i TRF2 (*telomeric repeat factor 1 i 2*) (51-53).

Els telòmers tenen la funció de protegir els cromosomes de la degradació, la recombinació i la fusió amb altres cromosomes; permetre una completa replicació dels cromosomes i una correcta posició d'aquests dins del nucli; participar en la regulació i expressió de gens; servir com a rellotge molecular que controla la capacitat replicativa de les cèl·lules i la seva entrada en senescència (52, 53).

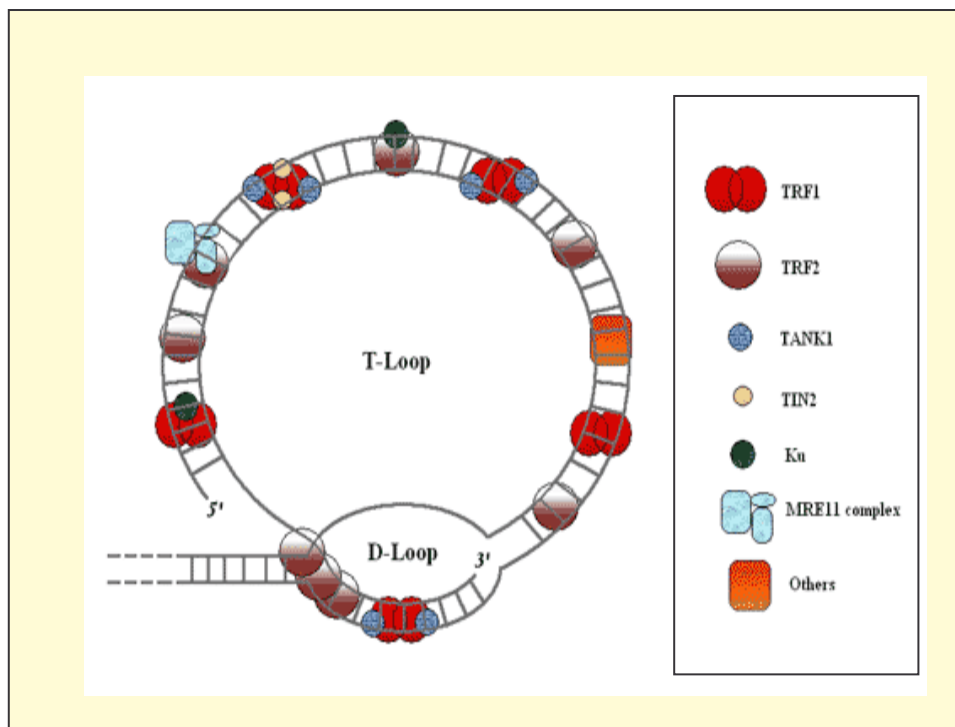


Figura 3. Estructura de *T-loop* que adopten els extrems dels telòmers amb la col·laboració de les proteïnes que s'uneixen a les repeticions telomèriques.

8.2. PROBLEMA FINAL DE REPLICACIÓ

La replicació del DNA comença en els punt d'origen de replicació. Les forques de replicació es mouen en direccions oposades ja que la DNA polimerasa només sintetitza en direcció 5' → 3'. Cada forca conté una cadena continua (*leading*) i una discontinua (*lagging*). La síntesi de la cadena discontinua necessita petits *primers* de RNA per fer servir com a motlles. Un cop acabada la síntesi aquests *primers* són eliminats i queden uns forats (*gaps*) en els extrems 5' de les cadenes sintetitzades de

novo, ja que la DNA polimerasa és incapaç de replicar aquets extrems (figura 4A). Aquests *gaps* en els extrems dels cromosomes o sigui en els telòmers és el que es coneix com a "problema final de replicació" (*end replication problem*)(figura 4B). Aquest fet es repeteix en cada ronda de replicació i conseqüentment els telòmers s'escurcen progressivament (52, 54).

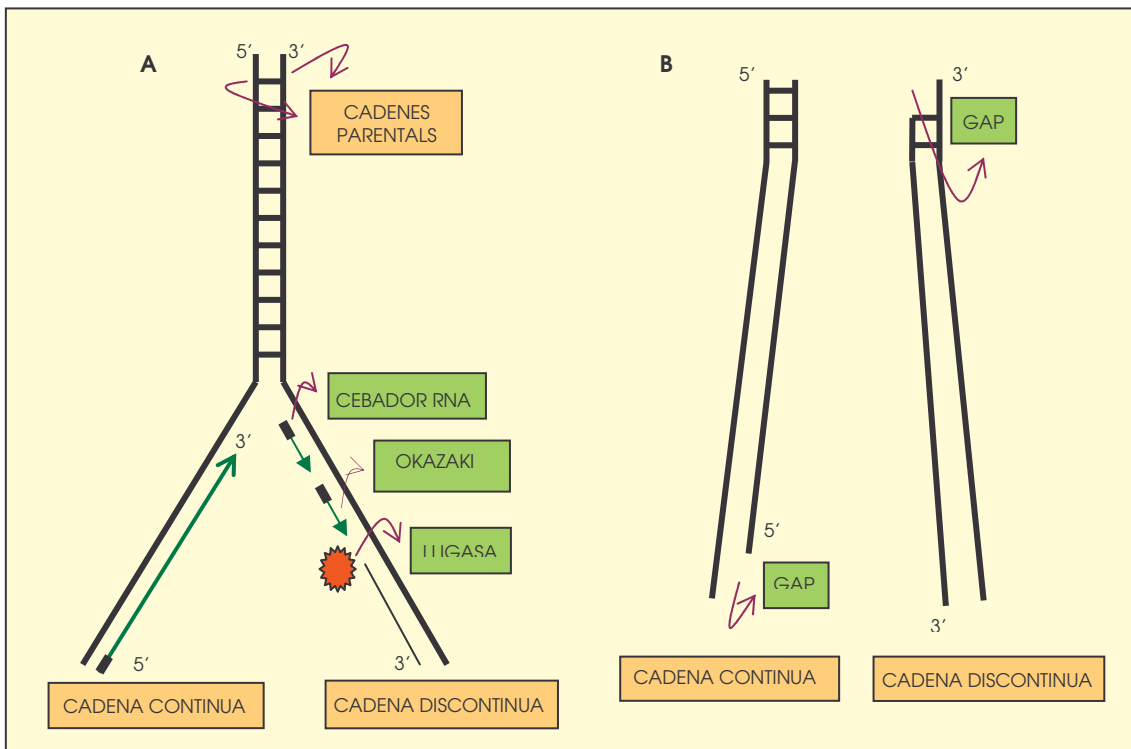


Figura 4. Problema final de replicació. A) Forca de replicació amb la síntesi continua en una cadena i discontinua en l'altra B) Replicació incompleta dels extrems del DNA de les cadenes que són sintetitzades de *novo*. Modificat de Dhaene et al., (55).

8.3. HIPÒTESI SOBRE ELS TELÒMERS

La hipòtesi sobre el funcionament dels telòmers va ser descrita per Harley el 1991. La hipòtesi de "l'envelliment del telòmer" postula que la suficient pèrdua de la longitud del telòmer en un o més cromosomes de cèl·lules somàtiques normals actua com a rellotge mitòtic i desencadena la senescència cel·lular (52, 56).

Les cèl·lules germinals presenten suficient activitat de la telomerasa, per a mantenir la longitud dels seus telòmers. Les cèl·lules mare (*stem cells*) perden uns 30 pb per any, ja que tenen una activitat de telomerasa dèbil que és insuficient per a mantenir estable la longitud dels seus telòmers, la telomerasa en aquestes cèl·lules només és activada sota estimulació ja que les *stem cells* quiescents (fase G_0) són telomerasa negatives (57). En les cèl·lules normals l'activitat de la telomerasa és baixa o nul·la i la longitud dels telòmers es va escurçant (figura 5).

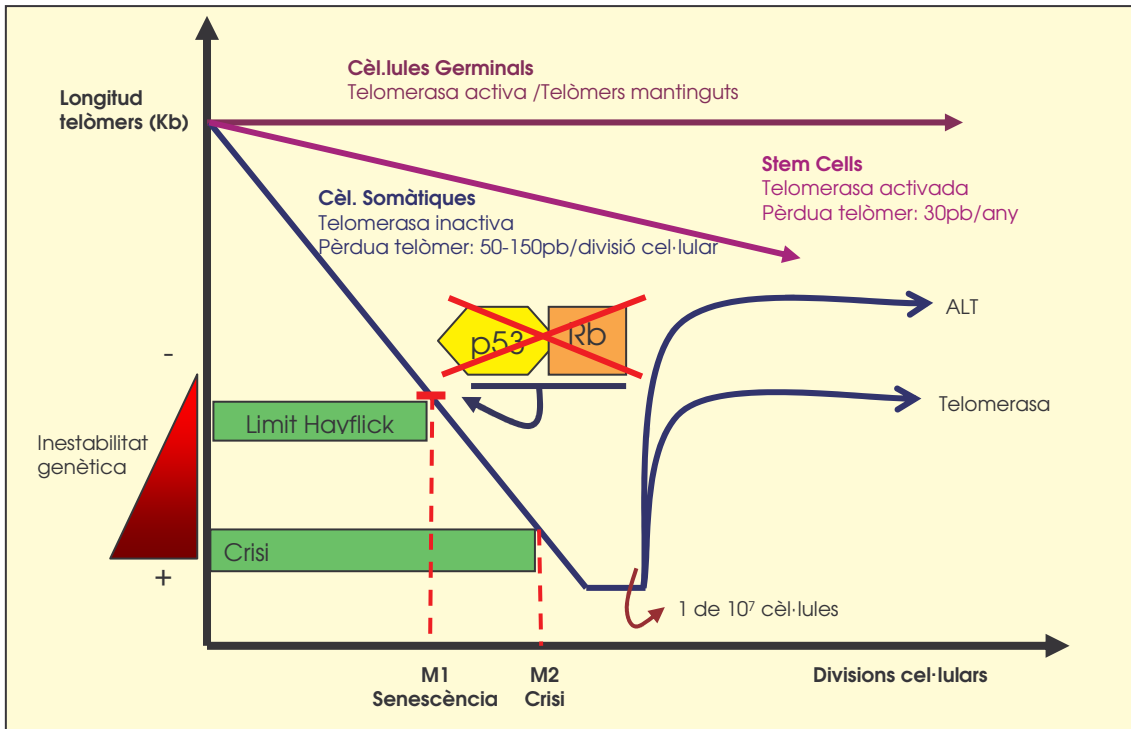


Figura 5. Esquema de la hipòtesi inicial de la telomerasa i els telòmers.

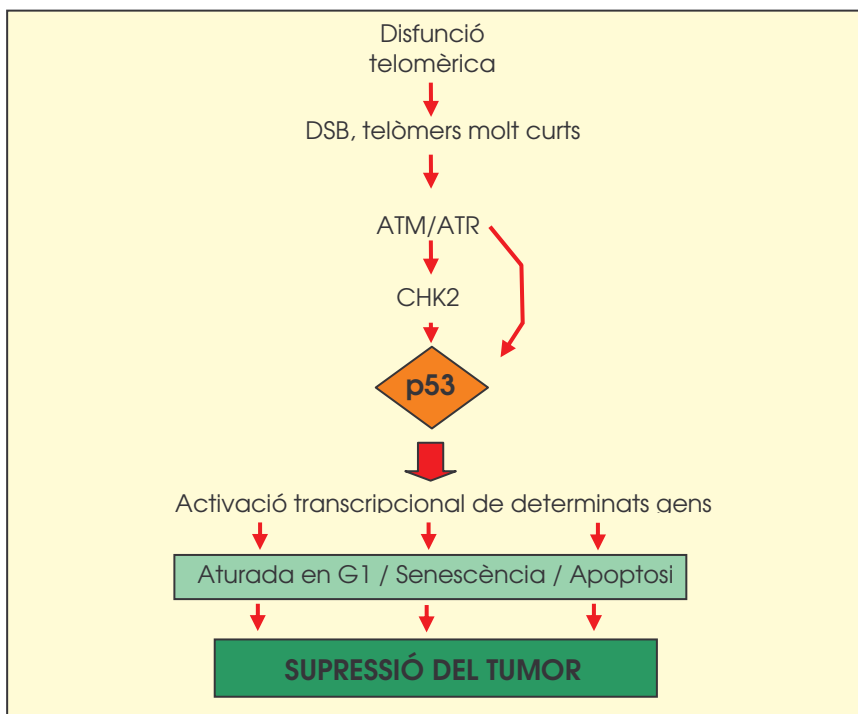


Figura 6. Esquema de la connexió entre el supressor de tumors p53 i els telòmers. Modificat d'Artandi i Attardi (58).

Els telòmers en cèl·lules somàtiques s'escurcen aproximadament entre 50 i 150 pb en cada divisió cel·lular, depenent del tipus cel·lular, això actua com a comptador mitòtic i determina el màxim de divisions cel·lulars i per tant la capacitat proliferativa de cada tipus cel·lular. De manera que quan aquest escurçament arriba a un punt

crític condueix a la cèl·lula a una aturada en el creixement, és el que anomenem senescència replicativa o estadi de mortalitat 1 (M1). No està clar com l'escurçament del telòmer activa la maquinària anti-proliferativa M1. S'ha proposat que el que activa la senescència és el gen p53 que es troba en el cromosoma 17p prop dels telòmers i que quant aquests arriben a una mida crítica, p53 activaria la maquinària anti-proliferativa (55). Algunes cèl·lules escaparien de la senescència replicativa, per inactivació d'aquests punts de control del cicle cel·lular com per exemple p53 o pRB (figura 6). Estudis *in vitro* han demostrat que el punt de control M1 pot ser evitat perquè les proteïnes p53 o pRB són reclutades per oncogens virals (SV40 o HPV) i no poden activar la via anti-proliferativa (55). Aquestes cèl·lules continuen dividint-se i patint escurçament del telòmer fins que arriben a un segon bloqueig de la proliferació anomenat crisi o estadi de mortalitat 2 (M2). Aquest estadi és caracteritzat per la mort massiva de cèl·lules, provocada pels telòmers extremadament curts, els quals provoquen inestabilitat cromosòmica. Rarament, algunes cèl·lules sobreviuen i escapen de la crisi. Aquestes cèl·lules per prevenir la pèrdua letal d'informació genètica es veuen obligades a mantenir estable la longitud dels seus telòmers. Llavors té lloc la reactivació de la telomerasa que les condueix a la proliferació "il·limitada" (52, 53, 55).

8.4. CONSEQÜÈNCIES DE LA DISFUNCIONALITAT TELOMÈRICA

El complex telomèric permet diferenciar els extrems dels cromosomes dels trencaments del DNA. Sense la protecció que ofereixen els telòmers s'activa la via de resposta al dany del DNA que dona lloc a l'aturada del cicle cel·lular, senescència o apoptosi. Els telòmers també eviten la degradació per part d'exonucleases i la fusió entre els extrems dels cromosomes (59).

L'absència de la telomerasa en cèl·lules somàtiques es pensa que és la causa de certs tipus d'inestabilitat cromosòmica que tenen lloc en estadis inicials de l'oncogènesi, afavorint l'aparició de càncers associats a anomalies cromosòmiques, com per exemple translocacions no recíproques, delecions i amplificacions (60).

9. LA TELOMERASA

La telomerasa va ser descoberta el 1985 en el holocitus ciliate *Tetrahymena thermophila* per Carol Greider i Elisabeth Balckburn (54).

La telomerasa és una ribonucleoproteïna capaç de resoldre "el problema final de replicació". És una DNA polimerasa RNA depenent que sintetitza seqüències de DNA telomèric i proporciona un potencial de proliferació "il·limitat". La telomerasa és

un gran complex amb una massa de 1000 KDa. Estudis *in vitro* han demostrat que dos components són essencials per a l'activitat de la telomerasa (61, 62):

- ◆ hTR (*human Telomerase RNA*): és una molècula de RNA que proporciona el motlle per a la síntesi de les repeticions telomèriques.
- ◆ hTERT (*human Telomerase Reverse Transcriptase*): és la subunitat catalítica amb activitat transcriptasa inversa.

9.1. COMPONENTS DE LA TELOMERASA

9.1.1. hTR (*human Telomerase RNA*)

L'hTR és un gen de còpia única que no conté cap intró i que es troba localitzat en el cromosoma 3q26.3. Aquest gen dona lloc a un mRNA de 451 aminoàcids. El RNA que la telomerasa fa servir com a motlle per a la síntesi de repeticions telomèriques, conté 11 nucleòtids: 5'CUAACCUAAC3' i es troba localitzat a l'extrem 3' de la molècula (55). L'extrem 3' també conté un domini H/ACA similar al que presenten els snoRNAs (*small nucleolar RNAs*). Aquest motiu és essencial per a l'acumulació dels RNAs *in vivo* mitjançant la unió a proteïnes que interaccionen amb el domini H/ACA (63). En l'extrem 5', hTR conté una regió que és reconeguda per les hnRNPs (*heterogeneous nucleolar RNPs*) C1 i C2 (64).

S'ha observat que les cèl·lules telomerasa negatives expressen hTR, això indica que aquest component s'expressa independentment de l'activitat de la telomerasa. La quantitat d'hTR augmenta quan la telomerasa és reactivada degut a un augment tan en la seva transcripció com en la seva estabilització (65). En cèl·lules cancerígenes té una expressió molt més elevada que en cèl·lules normals (66).

9.1.2. hTERT (*human Telomerase Reverse Transcriptase*)

Aquesta subunitat presenta activitat transcriptasa inversa, és a dir, a partir d'una cadena d'RNA és capaç de sintetitzar-ne una de DNA. La subunitat catalítica de la telomerasa (hTERT) és present en les cèl·lules diploides com a còpia simple en el cromosoma 5p15.33 (53, 55, 61). L'expressió d'hTERT està fortament relacionada amb l'activitat de la telomerasa, *in vivo* i *in vitro* (61, 62). Un fet peculiar del gen hTERT és la seva col·locació a la regió subtelomèrica i condueix a l'especulació que la seva posició pot contribuir a la regulació del propi hTERT (67). Aquesta proteïna es troba quasi exclusivament localitzada en el nucli.

◆ El gen hTERT

El gen consisteix en 16 exons i 15 introns, s'estén 40 Kb i codifica per a una proteïna de 127 KDa i 1132 aminoàcids (55). hTERT presenta un motiu telomerasa

específic (T) seguit per set motius conservats *Reverse Transcriptase* (RT), els quals formen una estructura determinada (68). Els set motius són molt importants per la funció transcriptasa inversa ja que reconeixen l'RNA motlle. Una mutació puntual en aquesta regió fa que la proteïna hTERT no sigui funcional perquè no pot reconèixer l'hTR, la qual és la subunitat que permet l'elongació del telòmer (69).

L'exó 1 conté el codó d'inici de la traducció i el codó stop es troba en l'exó 16. El motiu T telomerasa específic i els set motius RT són localitzats en exons diferents com es pot observar en la figura 7 (70).

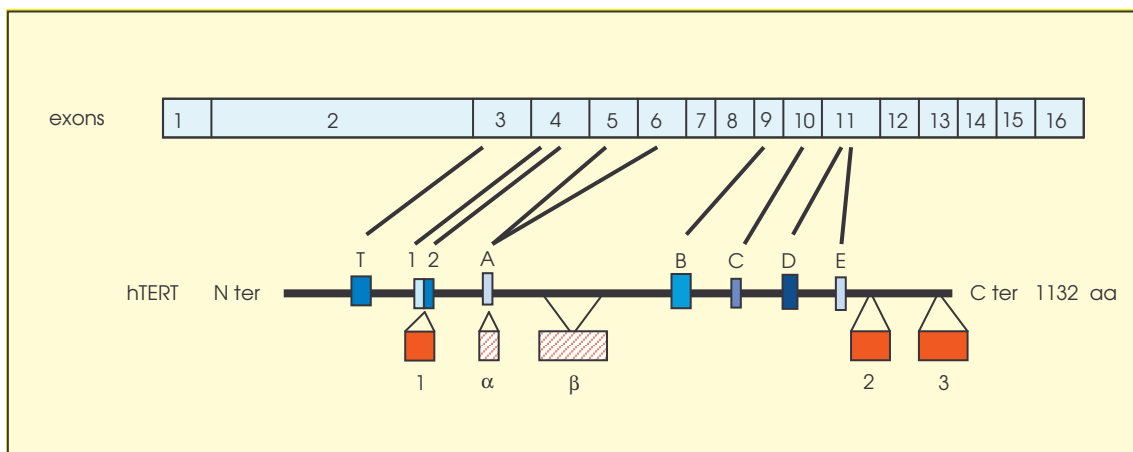


Figura 7. Organització del gen hTERT. Aquest gen està format per 16 exons. hTERT conté un motiu telomerasa específic (T) i set motius transcriptasa inversa (1,2,A,B,C,D,i E). En la part inferior de l'esquema es mostra en quins punts de la cadena d'aminoàcids (aa) tenen lloc les insercions (1,2 i 3) i les deleccions (α i β) que donen lloc a les variants d'*splicing*.

El gen hTERT té un *splicing* diferencial i s'han detectat diferents transcrits en cèl·lules humanes. Els llocs d'*splicing* es poden observar en la figura 7. La funció de l'*splicing* alternatiu dels mRNAs és actualment desconeguda. Pot representar una regulació addicional de l'expressió i de l'activitat de la telomerasa, però la funció d'aquests productes d'*splicing* no està clara (53, 70).

L'expressió del mRNA del component catalític (hTERT) és d'una a sis còpies per cèl·lula. L' hTERT és generalment reprimat en cèl·lules normals i augmentat en cèl·lules "immortals" i tumorals, suggerint que és el primer component de la proteïna que s'expressa (53). L'activitat de la telomerasa al final dels cromosomes és regulada per proteïnes d'unió al telòmer i PIKKs (fosfatididín-3 quinasa relacionada amb quinases). L'activació de la telomerasa és coordinada amb la replicació semiconservativa del DNA de manera cicle cel·lular dependent (54).

◆ El promotor d'hTERT

D'una banda, l'anàlisi de la seqüència revela que la regió del promotor hTERT perd les tradicionals caixes TATA o CAAT típiques en els promotors d'altres gens. D'altra

banda, conté una elevada densitat de dinucleòtids (CG que és coneixen com illes CpG) i llocs d'unió a diversos factors de transcripció (71).

El gen hTERT presenta una regulació peculiar:

- ◆ Presenta un dels promotors més forts que existeixen (semblant al del SV40).
- ◆ Té una expressió molt baixa, tant sols presenta 1-6 còpies per cèl·lula (72).
- ◆ El 95% del seu mRNA donarà lloc a una proteïna no funcional.
- ◆ És l'únic gen que es transcriu tenint el promotor metilat. Això vol dir que perquè aquest gen es transcriu és necessari que el promotor estigui metilat i a demés que sigui activat transcripcionalment.

9.1.3. Proteïnes auxiliars

Nombroses proteïnes o complexos proteics s'uneixen al complex de la telomerasa i contribueixen a la seva activació i estabilització.

◆ hTP1 (*human Telomerase-associated Protein 1*)

hTP1 probablement serveix no només com a proteïna estructural sinó com a subunitat reguladora en la interacció entre hTERT i els altres components del complex de la telomerasa (73). Aquesta proteïna interacciona amb hTR i hTERT i està associada amb l'AT (activitat de la telomerasa) *in vivo*. L'expressió d'hTP1 és general als teixits humans, suggerint que aquest component no està lligat amb la reactivació de la telomerasa (69). Li *et al.*, (73) han observat que tan la proteïna hTP1 com hTERT són fosforilades i que la seva fosforilació és un prerrequisit per a l'activació de la telomerasa (73).

◆ Complex xaperona hsp90 (*heat shock protein*)

Les proteïnes xaperones ajuden a la unió i estabilització de complexos proteics biològicament actius. El complex de la xaperona hsp 90 està format com a mínim per hsp90 (*heat shock protein 90*), p23, hsp 70, HOP (*hsp Organising Protein*) i hsp 40. Tan hsp 90 com p23 s'han trobat unides a hTERT, intervenen en la unió d'aquesta amb hTR i en la formació del complex actiu. L'hsp70 s'uneix a hTERT en absència d'hTR i es dissocia quan la telomerasa és activa per tant la seva unió és transitòria. Mentre hsp90 i p23 continuen unides al complex funcional de la telomerasa (74).

◆ hnRNPs (*heterogeneous nuclear RiboNucleoProteins*)

Les ribonucleoproteïnes heterogènies nuclears són una gran família de proteïnes d'unió als àcids nucleics (DNA i RNA) que sovint es troben a la partícula 40s. Algunes hnRNPs són estrictament nucleolars mentre que d'altres van i venen entre el nucli i el citoplasma. Els membres d'aquesta família estan implicats en l'empaquetament de

l'RNA, la regulació transcripcional, la recombinació del DNA, el processament del pre-mRNA, la traducció i el *turnover* de l'RNA i en la regulació del telòmer i la telomerasa (64).

Als telòmers s'uneixen les hnRNPs A1, A2-B1, D i E, mentre que a l'hTR de la telomerasa s'hi uneixen A1, C1-C2 i D. Les hnRNPs són importants per a la biologia del telòmer, i es creu que estan involucrades en la seva estructura i/o reclutament de la telomerasa al telòmer (64).

◆ Disquerina

Proteïna descoberta en pacients amb disqueratosi congènita (DC). La principal funció d'aquesta proteïna és establir les estructures secundàries d'RNA amb un domini H/ACA. La proteïna es troba unida a l'hTR ja que és un RNA que presenta el motiu H/ACA (75).

◆ L22 i Stau

Ambdues són proteïnes d'unió a l'RNA i s'han trobat associades a hTR i hTERT (76). S'ha suggerit que poden estar implicades en el transport, el processament i la localització nuclear d'hTR i en la unió dels components de la telomerasa (76, 77).

◆ La autoantigen

S'ha implicat en 3 processos cel·lulars, la maduració de RNPs, la traducció d'mRNAs, i en la finalització de la transcripció (77). Actua interaccionant amb el component hTR de la telomerasa (78).

9.2. REGULACIÓ DE LA TELOMERASA

L'activitat de la telomerasa és inactivada durant el desenvolupament embrionari en la majoria de cèl·lules somàtiques però segueix activa en alguns teixits, com per exemple les cèl·lules germinals masculines, els limfòcits activats i en alguns tipus de cèl·lules mare (*stem cells*) (79, 80).

Alguns estudis indiquen que l'activitat de la telomerasa es modula sota condicions fisiològiques particulars durant el desenvolupament i l'homeòstasi. Durant el creixement l'activitat és subjecta a la regulació per diferenciació i per senyals extra i intracel·lulars (53). La regulació transcripcional de l'hTERT es creu que és el principal mecanisme de regulació de la telomerasa en cèl·lules humanes. La identificació d'abundants llocs d'unió a elements reguladors i factors de transcripció en el promotor d'hTERT suggereixen que l'activitat de la telomerasa està subjecta a múltiples nivells de control i pot ser regulada per diferents factors en diferents contextos cel·lulars. Molts factors de transcripció són gens supressors de tumors i es veuen inactivats en la majoria

de càncers i permetent que el balanç activació/repressió de la telomerasa es vegi afavorit cap a l'activació.

La regulació de l'activitat de la telomerasa té lloc principalment a nivell transcripcional i post-transcripcional. Existeixen més punts de regulació com la modificació post-traducciona d'hTR i d'hTERT, el transport i localització subcel·lular de cada component, l'ensamblatge dels diferents components i activació de la telomerasa i l'accés al substrat els quals afegeixen nivells de complexitat a la seva regulació (53).

9.2.1. Regulació d'hTR

La regulació d'hTR podria ser controlada per diversos mecanismes:

- ◆ El gen hTR s'ha trobat amplificat en alguns tumors de manera que podria ser sobreexpressat en aquests.
- ◆ La seqüència del promotor conté varis llocs consens d'unió per a factors de transcripció i s'ha demostrat que s'hi poden unir activadors i repressors. Sp1 i Sp3 pertanyent a una família de proteïnes que han estat implicades en la regulació del cicle cel·lular, en l'estructura de la cromatina i en el manteniment de les illes CpG lliures de metilació. La regulació transcripcional que exerceixen les proteïnes de la família Sp és complexa però en general Sp1 activa l'expressió gènica mentre que Sp3 l'inhibeix. Dins del promotor d'hTR s'han identificat llocs d'unió per les proteïnes Sp. S'ha demostrat que Sp1 i Sp3 s'uneixen a aquests llocs i que les fluctuacions entre la ràtio Sp1/Sp3 o alteracions en la seva afinitat per la unió al promotor modularien l'expressió d'hTR *in vivo*. La proteïna RB regula negativament la transcripció d'un gran nombre de gens que participen en la progressió del cicle cel·lular. Però d'altra banda, s'ha observat sorprenentment que és un activador del promotor d'hTR. No s'ha pogut demostrar que la proteïna RB s'uneixi directament al promotor doncs podria ser que actués segregant altres factors de transcripció que fossin inhibidors (81).
- ◆ La presència d'illes CpG en el promotor fa pensar que la transcripció també pot estar regulada pel nivell de metilació en el promotor.

L'expressió d'hTR, analitzada per RT-PCR, mostra que aquest component és àmpliament expressat en teixit normal i tumoral. Això significa que hTR no és essencial per a la reactivació de la telomerasa perquè sempre trobem nivells basals però quan la telomerasa és reactivada els nivells d'hTR també augmenten. Això fa que els nivells d'hTR es correlacionin amb l'activitat de la telomerasa (66).

9.2.2. Regulació d'hTERT

L'expressió d'hTERT és fonamental per a l'activitat de la telomerasa (61), això fa que aquesta proteïna sigui sotmesa a diferents nivells de regulació. L'estudi de la organització genòmica i la caracterització del promotor han estat descrits per varis grups (68, 70, 71) i han permès conèixer millor la regulació d'hTERT.

La regulació d'hTERT pot tenir lloc principalment a nivell epigenètic, a nivell genètic i a nivell post-transcripcional i post-traduccionals.

◆ Regulació a nivell epigenètic

Els principals mecanismes epigenètics inclouen la metilació i el nivell d'empaquetament del DNA. Aquests mecanismes silencien gens sense ocasionar canvis en la seqüència que codifiquen i són potencialment reversibles. La potencial reversibilitat d'aquests canvis obre oportunitats a la intervenció terapèutica.

a) Metilació del promotor

La metilació del DNA és una modificació química covalent, resultant de l'addició d'un grup metil (-CH₃) en el carboni 5 de l'anell de la citosina (82). La majoria de citocines metilades es troben en regions riques en citocines i guanines que anomenem illes CpG. Aproximadament la meitat dels gens humans tenen illes CpG, i aquestes són presents en gens amb expressió constitutiva (*housekeeping*) i en gens amb un patró d'expressió teixit específic.

Els patrons de metilació del DNA són establerts aviat en l'embriogènesi i són finalment regulats durant el desenvolupament. Un exemple de metilació embrionària és l'*imprinting* dels gens del cromosoma X, inactivats aviat en els embrions femenins (83).

Existeixen dos models per explicar com pot actuar la metilació:

- 1) Inhibició de la interacció directe entre el promotor metilat i els factors de transcripció (83). Alguns factors de transcripció reconeixen seqüències que contenen residus CpG i la seva unió està inhibida per la metilació del promotor (82).
- 2) Involucra proteïnes d'unió al DNA metilat impedit que s'hi uneixin repressors transcripcionals específics per al DNA metilat (82, 83).

La metilació del DNA pot modificar l'activitat gènica sense canviar la seqüència i ha estat implicada en la carcinogènesi. En comparació amb les cèl·lules normals, les cèl·lules malignes mostren majors alteracions en el patró de metilació del seu DNA.

El control de l'expressió gènica per mitjà de la metilació és normalment associat amb el silenciament de gens. El promotor d'hTERT es troba hipermetilat en

tumors telomerasa negatius i telomerasa positius. La hipometilació s'ha detectat en teixits normals i en la majoria de línies cel·lulars normals sense expressió de telomerasa. El nivell de metilació varia i pot tenir un paper en la regulació del gen hTERT. La metilació en aquest gen està amb total desacord amb el model general de regulació gènica per metilació del promotor (84-86).

b) Empaquetament del DNA

Els diferents nivells d'organització de la cromatina són dependents de l'alt ordre dinàmic dels nucleosomes, els quals representen la unitat de repetició bàsica de la cromatina. Cada nucleosoma està format per un tetràmer H3-H4 i dos dímers H2A-H2B. Les histones són petites proteïnes bàsiques que contenen un domini globular i un NH₂ terminal més flexible que sobresurt dels nucleosomes, aquesta part rep el nom de cua de la histona. L'estructura de la cromatina és un regulador important i això fa que múltiples vies de senyalització convergeixin sobre la modificació de les histones. Les histones pateixen variacions originades per modificacions covalents (acetilació, fosforilació, metilació) de les cues de les histones, les quals permeten regular el contacte amb el DNA. L'estat transcripcional "obert-tancat" és àmpliament dependent de la posició del gen dins una cromatina accessible (eucromatina) o una cromatina inaccessible (heterocromatina) aquest fenomen s'anomena variació de l'efecte de posició (*position effect variegation*, PEV). Totes tres modificacions poden ser trobades en regions de cromatina transcripcionalment oberta o tancada. Indicant que no totes les metilacions que es produeixen sobre les histones silencien l'expressió d'aquests gens i que l'acetilació d'histones pot reprimir més que estimular la lectura de la informació genètica, és a dir, la transcripció (87).

Durant l'empaquetament del DNA, les modificacions de les histones per metilació o acetilació poden variar la conformació de la cromatina, afectant l'accessibilitat dels gens per part dels factors de transcripció. La modificació de les histones és un mecanisme universalment utilitzat per a la regulació de gens eucariotes (87).

◆ Regulació a nivell genètic

La presència de múltiples llocs d'unió a activadors i repressors suggereix que el sistema de regulació és complex.

a) Els factors que activen la transcripció d'hTERT són:

- ▶ c-Myc: és un oncogen que promou la proliferació, el creixement cel·lular i l'apoptosi. Alteracions en la seva estructura i en la seva expressió han estat lligats a diversos càncers humans. Els gens diana de

la família Myc són factors de transcripció involucrat en el cicle cel·lular, el creixement i la diferenciació. hTERT és diana directe de la família de gens c-Myc. Myc s'uneix a Max formant un heterodímer que reconeix les E-box del promotor d'hTERT i activa la transcripció gènica (71). Ha estat demostrat que c-myc indueix l'expressió d'hTERT i l'activitat de la telomerasa en alguns tipus cel·lulars (53).

► Sp1: és un factor de transcripció general que s'uneix a les caixes GC i activa un gran nombre de gens. El nucli del promotor d'hTERT presenta 5 caixes GC, les quals poden servir com a elements iniciadors de la transcripció. Sp1 coopera amb c-Myc per activar la transcripció d'hTERT en cèl·lules de manera tipus dependent. (53, 71).

► Hormones esteroïdals: l'activitat de la telomerasa és detectada en l'endometri normal durant el cicle menstrual i és fortament correlacionada amb l'activitat proliferativa de les cèl·lules endometrials suggerint que les hormones esteroïdals sexuals podrien regular l'activitat de la telomerasa. El promotor d'hTERT presenta dos llocs potencials de resposta als estrògens (EREs) per tant aquests poden activar la transcripció del gen hTERT (53, 71). La progesterona presenta una acció antagonista als estrògens. Hi ha evidències que indiquen que el promotor d'hTERT presenta una diana d'unió per la progesterona, l'efecte que exerceix aquesta és bifàsic segons la duració de l'exposició. L'exposició a progesterona inhibeix l'expressió induïda per estrògens de l'hTERT. El mecanisme pel qual la progesterona regula l'expressió d'hTERT sembla complex (53).

b) Alguns dels factors inhibidors de l'expressió d'hTERT són:

► WT1 (*Wilms' Tumor 1*): és un gen supressor de tumors i reprimeix transcripcionalment l'hTERT mitjançant la interacció directa amb el promotor. WT1 pot reprimir l'expressió del gen hTERT durant la diferenciació, i la inactivació de WT1 pot contribuir a l'activació de la telomerasa durant l'oncogènesi en els teixits diana, ja que la seva expressió es teixit específica (53, 71).

► p53: és una proteïna supressora de tumors que com a factor de transcripció regula gens diana que intervenen en el cicle cel·lular, la diferenciació, la senescència i l'apoptosis. El promotor d'hTERT presenta dos llocs d'unió pel p53 i d'aquesta manera podria inhibir l'activitat de la telomerasa a través de la repressió transcripcional. El p53 és inactivat en més del 50% dels tumors això impediria la repressió de l'expressió d'hTERT i d'aquesta manera contribuiria a la seva expressió (53, 71).

- ▶ MAD1: els membres de la família c-Myc/Mad/Max són el centre de control del creixement cel·lular, el desenvolupament i la regulació de diversos processos com la transformació, la diferenciació i l'apoptosi. Aquesta família de factors de transcripció s'uneix a les E-box del promotor i és capaç d'activar o reprimir l'expressió gènica. Ambdós c-Myc i Mad1 poden dimeritzar amb Max. Els heterodimers c-Myc/Max s'uneixen a les E-box activant l'expressió gènica, mentre que el dímer Mad/Max reprimeix l'expressió gènica (53).
- ▶ MZF-2 (*myeloid cell-specific zinc finger protein 2*): el promotor d'hTERT presenta quatre llocs d'unió a MZF-2 i aquest pot funcionar com a regulador negatiu de la transcripció d'hTERT (53).

A banda dels activadors i repressors l'expressió d'hTERT també podria ser regulada pel nombre de còpies del gen hTERT, ja que s'ha observat l'amplificació d'aquest gen en la meitat de línies tumorals estudiades (53).

◆ Regulació a nivell post-transcripcional i post-traducciona

a) Nivell post-transcripcional

El transcrit d'hTERT té com a mínim 6 llocs d'*splicing* alternatiu (4 llocs d'inserció i 2 llocs de delecció) i dona lloc a set variants d'*splicing*, 6 de les qual fan servir només un lloc d'*splicing* i una variant conté ambdós llocs de delecció α i β (66). Les variants que provenen dels 4 llocs d'inserció donen lloc a proteïnes truncades, que no seran funcionals. hTERT $\alpha^+\beta^+$ és la proteïna funcional, sense cap delecció ni inserció. Les variants hTERT β^- , hTERT $\alpha^-\beta^-$ no presenten AT ja que la seva traducció no és completa. La variant hTERT α^- és una delecció de 12 aminoàcids localitzats en el domini A de la retrotranscriptasa inversa. La variant hTERT α^- conté el lloc d'unió a l'hTR, per tant podria competir amb la variant d'hTERT $\alpha^+\beta^+$ per unir-se al hTR o interferint amb la unió dels factors de reclutament necessaris i això conduiria a una dèbil concentració del complex telomerasa actiu (88). La variant hTERT α^- pot ser important en la comprensió de la regulació de la telomerasa durant el desenvolupament, diferenciació i progressió del càncer (89). És possible que jugui un paper en la reducció de l'activitat de la telomerasa sense reduir la transcripció d'hTERT en cèl·lules sota certes condicions com diferenciació, quiescència, durant el desenvolupament o la carcinogènesi. (89). Les variants deleccionades han estat detectades per RT-PCR en cèl·lules immortalitzades, teixit normal i durant el desenvolupament (90).

La variant hTERT α^- actua com dominant negatiu inhibint l'activitat de la telomerasa causant escurçament del telòmer i és capaç d'induir la mort cel·lular. L'expressió d'hTERT α^- pot disminuir l'AT de manera dosis-depenent (90). Les cèl·lules que expressen hTERT presenten percentatges diferents de cada una de les variants de *splicing*, un 5% del mRNA $\alpha^+\beta^+$, entre 80-90% correspon a la variant β^- , 5-15% a la variant $\alpha^-\beta^-$ i menys d'un 1% a la variant α^- (89).

Els nivells d'hTR i mRNA d'hTERT es correlacionen dèbilment entre ells ja que la vida mitja d'hTR en cèl·lules tumorals és de tres setmanes mentre que la del mRNA d'hTERT és de dues hores. L'AT també és correlaciona dèbilment amb els nivells d'hTR i mRNA ($\alpha^+\beta^+$) hTERT (89).

b) Modificacions post-traduccionals

El processament post-traducciona de la proteïna hTERT podria regular la seva conformació tridimensional. La fosforilació d'hTERT per diferents quinases pot modular l'activitat de la telomerasa (73). Ainsler *et al.*, (88) proposen que hTERT existeix de forma inactiva en el citoplasma, en estat defosforilat en cèl·lules no estimulades, però sota estimulació, la fosforilació permet la localització nuclear d'hTERT de manera que permetria l'activació de la telomerasa i el funcionament sobre els telòmers (88).

9.2.3. Passos per a la generació de la telomerasa activa

- 1) Transcripció del pre-mRNA d'hTERT.
- 2) Processament del pre-mRNA que dona lloc a les diferents variants d'*splicing* (α^- , β^- , $\alpha^-\beta^-$, $\alpha^+\beta^+$).
- 3) Els mRNAs són transportats al citoplasma on seran traduïts.
- 4) No està clar que totes les formes d'*splicing* siguin traduïdes a proteïna però es creu que la forma α^- si que es traduiria perquè actua com a dominant negatiu.
- 5) hTERT pot ser importada dins el nucli en una forma inactiva.
- 6) p23 i hsp90 participen en la unió d'hTERT amb hTR que és estabilitzat per proteïnes H/ACA com la disquerina.
- 7) La funció catalítica pot dependre de la dimerització d'hTERT i d'hTR, i de la capacitat d'aquesta molècula activa per unir-se als telòmers.
- 8) Mecanisme de reclutament de la telomerasa sobre els telòmers per part de la hnRNP A1.
- 9) El reclutament també dependrà de l'accessibilitat de la telomerasa als telòmers.

Els tres passos més importants per a l'ensamblatge del complex proteic de la telomerasa són (figura 8):

1) Acumulació de l'RNA (hTR)

Els RNAs que no codifiquen proteïnes cal que siguin estabilitzats a través de la unió amb proteïnes amb dominis H/ACA com són les proteïnes d'unió als snoRNAs. Com ja hem comentat en un apartat anterior, l'RNA motlle de la telomerasa conté un domini H/ACA, que és reconegut per proteïnes d'unió als snoRNAs com és la disquerina. Aquesta unió evitarà que siguin degradats per les nucleases (75).

El processament del mRNA de l'hTR (pèrdua de la cua poli A) no se sap si té lloc abans o després que s'uneixi amb les H/ACA RNP i amb les altres proteïnes.

2) Activació catalítica

La subunitat catalítica, hTERT, s'uneix amb les proteïnes auxiliars que hem citat abans (hTP1, xaperones, i altres). Perquè la proteïna sigui activa cal que les dues subunitats s'uneixin i formin el complex actiu de la telomerasa.

3) Reclutament de la telomerasa per part del telòmer

El manteniment del telòmer requereix que la telomerasa s'uneixi i allargui l'extrem 3' dels cromosomes. El *T-loop* sembla inhibir l'elongació del telòmer ja que impedeix l'accés de la telomerasa a l'extrem 3' dels telòmers. Es creu que durant la fase S del cicle cel·lular, els *T-loops* perden la seva estructura permetent que la maquinària de replicació del DNA accedeixi a aquest, i és llavors quan la telomerasa té l'oportunitat d'accedir als telòmers. Es creu que existeix un mecanisme actiu de reclutament de la telomerasa al telòmer per part de determinades proteïnes que podrien ser, com ja hem avançat abans, hnRNP A1 i C (75).

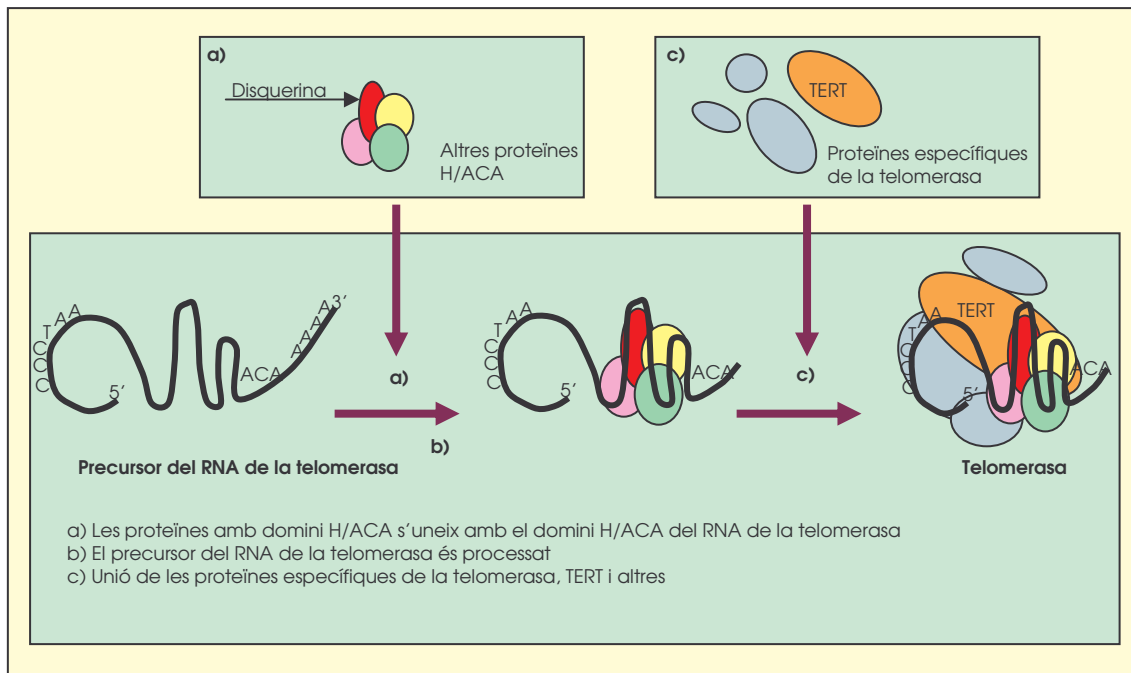


Figura 8. Procés d'unió dels diferents components que formen el complex de la telomerasa. Modificat de Collins K, (63).

La telomerasa pot funcionar com a homodímer, format per dos proteïnes hTERT i dos RNAs hTR. S'han proposat dos models per explicar el paper de cada parella de molècules:

- 1) Ambdós monòmers són actius i allarguen al mateix temps molècules separades. Aquest tipus d'elongació suposa una estreta coordinació dels complexos i podria ser operativa en l'extensió de dues cromàtides germanes.
- 2) Només un lloc catalític allarga el telòmer d'una manera alternant. Durant l'elongació, el segon complex estabilitza el dímer sobre la última repetició telomèrica afegida a través del seu lloc d'ancoratge. Després de cada cicle d'elongació els papers es podrien invertir. Aquest mecanisme podria proporcionar una explicació per a la translocació durant el procés de la síntesis dels telòmers (91).

10. PROTEÏNES ASSOCIADES AL TELÒMER

Les proteïnes associades al telòmer són molt importants per a formar i mantenir l'estructura protectora dels telòmers *in vivo*. Algunes proteïnes associades al telòmer s'uneixen directament al DNA telomèric mentre que d'altres s'associen al telòmer per interaccions via proteïna-proteïna (92). El complex proteic que s'uneix al telòmer

principalment està format per sis proteïnes (TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1 i hRap1) s'anomena *shelterin* (54).

10.1. PROTEÏNES D'UNIÓ AL DNA TELOMÈRIC

Hi ha tres proteïnes associades al telòmer que s'uneixen directament i específicament al DNA telomèric (figura 9). Aquestes són el TRF1, TRF2 i POT1 (93).

◆ Factors de repetició d'unió al telòmer

TRF: *telomeric repeat binding factor*

Els TRF són una família de proteïnes que presenten un domini semblant a Myb (*helix-turn-helix*) el qual s'uneix específicament a la doble cadena de DNA telomèric. Aquestes proteïnes formen homodímers (50, 93). El domini N-terminal diferencia les dues proteïnes, TRF1 presenta una composició àcida mentre que la del TRF2 és bàsica (50).

Mentre el TRF1 sembla estar directament involucrat en la regulació de la telomerasa, TRF2 es creu que principalment protegeix l'extrem dels cromosomes (94).

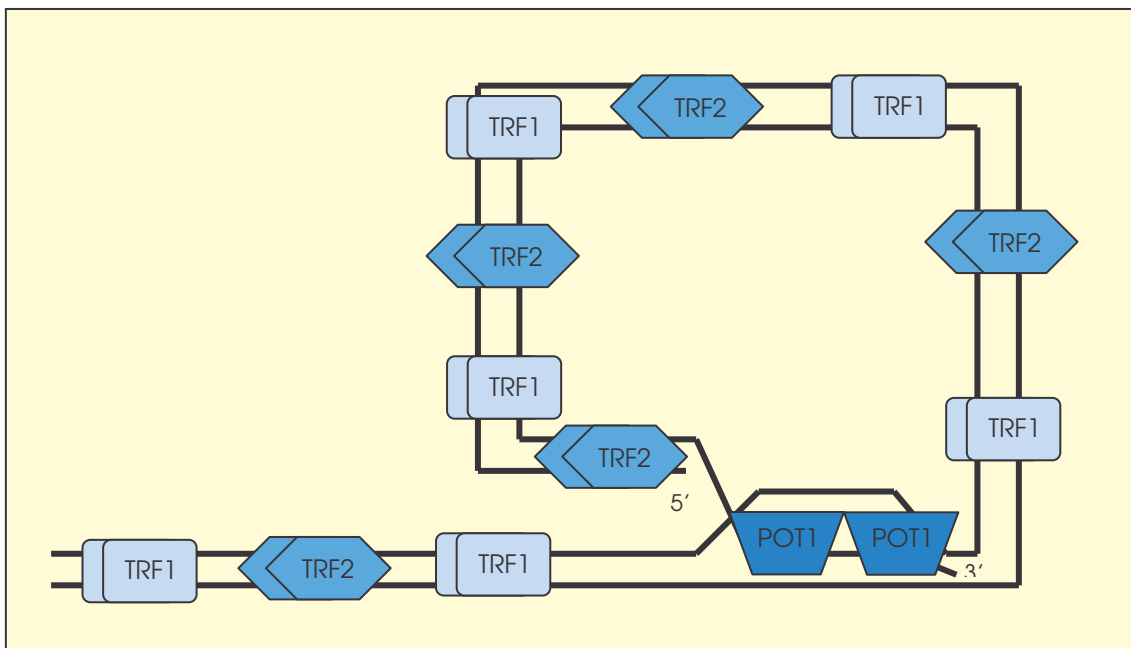


Figura 9. Les repeticions telomèriques són associades amb les proteïnes que s'uneixen directament al DNA telomèric, TRF1, TRF2 i POT1 les quals formen el nucli de l'estructura telomèrica. Modificat de Rodier *et al.*, (93).

- ▶ TRF1: factor de repetició d'unió al telòmer 1 (*telomeric repeat binding factor 1*)

Es troba codificat en el cromosoma 8q13 (55). És un regulador de la longitud del DNA telomèric. Actua en *cis* (no afecta a l'expressió de la telomerasa) com a regulador negatiu en cada telòmer, inhibeix l'elongació depenent de la telomerasa, impedit l'accessibilitat d'aquesta al telòmer (50). El nombre de

molècules per extrem de cromosoma es correlaciona amb la longitud del telòmer (59).

► TRF2: factor de repetició d'unió al telòmer 2 (*telomeric repeat binding factor 2*)

Codificat en el cromosoma 16q22.1 (55), indueix la formació del *T-loop*, protegint els extrems dels cromosomes de la degradació per part d'exonucleases i inhibint la fusió telòmer-telòmer (50, 95). TRF2 juga un paper essencial en l'estabilització i protecció dels telòmers. La pèrdua de TRF2 desencadena la mateixa resposta que quan es produeix algun dany en el DNA donant lloc a la senescència o l'apoptosi, aquesta aturada del cicle depèn de p53 i pRB (60). TRF2 també interacciona amb diverses proteïnes donant lloc al complex TRF2 (58, 59).

◆ POT1: *protection of telomere 1*

S'uneix a les repeticions telomèriques de cadena simple de l'extrem 3' *overhang* (rica en G). Restringeix l'accés de la telomerasa a l'extrem dels telòmers, limitant així l'elongació del mateix (58).

10.2. PROTEÏNES ASSOCIADES AL TELÒMER AMB FUNCIÓ TELOMÈRICA

Aquestes proteïnes no s'uneixen directament al DNA telomèric sinó a proteïnes que ja estan unides a aquest (figura 10). Aquestes proteïnes associades al telòmer semblen actuar principalment modulant la capacitat de TRF1, TRF2 i POT1 per controlar l'estructura, la funció i la longitud del telòmer (93).

◆ TIN2: *TRF1 interacting protein 2*

Forma part del complex TRF1 i interacciona amb tots els seus components (TRF1, tanquirasa 1 i PIP1). TIN2 pot modular els efectes de la tanquirasa 1 sobre el TRF1 ja que estabilitza la unió entre TRF1 i Tank1 (59). TIN2 també forma part del complex TRF2. TIN2 controla la longitud i l'estabilitat del telòmer, suggerint un acoblament funcional entre els processos de la regulació de la longitud i la protecció del telòmer (58). TIN2 podria assenyalar al complex TRF2 la separació transitòria del complex TRF1 dels telòmers durant la replicació del DNA o l'acció de la telomerasa (60). TIN2 pot coordinar les funcions de TRF1 i TRF2 (92, 93).

Es desconeix si hi ha un únic complex TIN2, el qual contingui TRF1 i TRF2 i les interaccions d'ambdós o si TIN2 forma múltiples complexos alguns dels quals contenen TRF1 mentre altres contenen TRF2. La majoria de complexos formats *in vitro* són TIN2-TRF1 o TIN2-TRF2, això indica que les interaccions amb TRF1 i TRF2 requereixen dominis

diferents de TIN2. (93).TIN2 sembla unir TRF1 a POT1 a través del pont format per les proteïnes PTOP/PIP1 (93).

El complex format per TRF1-TIN2-PTOP-PIP1 es pensa que regula negativament la longitud del telòmer, limitant l'accessibilitat de telomerasa al telòmer. TRF1 i TIN2 promouen una estructura telomèrica tancada, aquesta estructura assegura la funció dels telòmers.

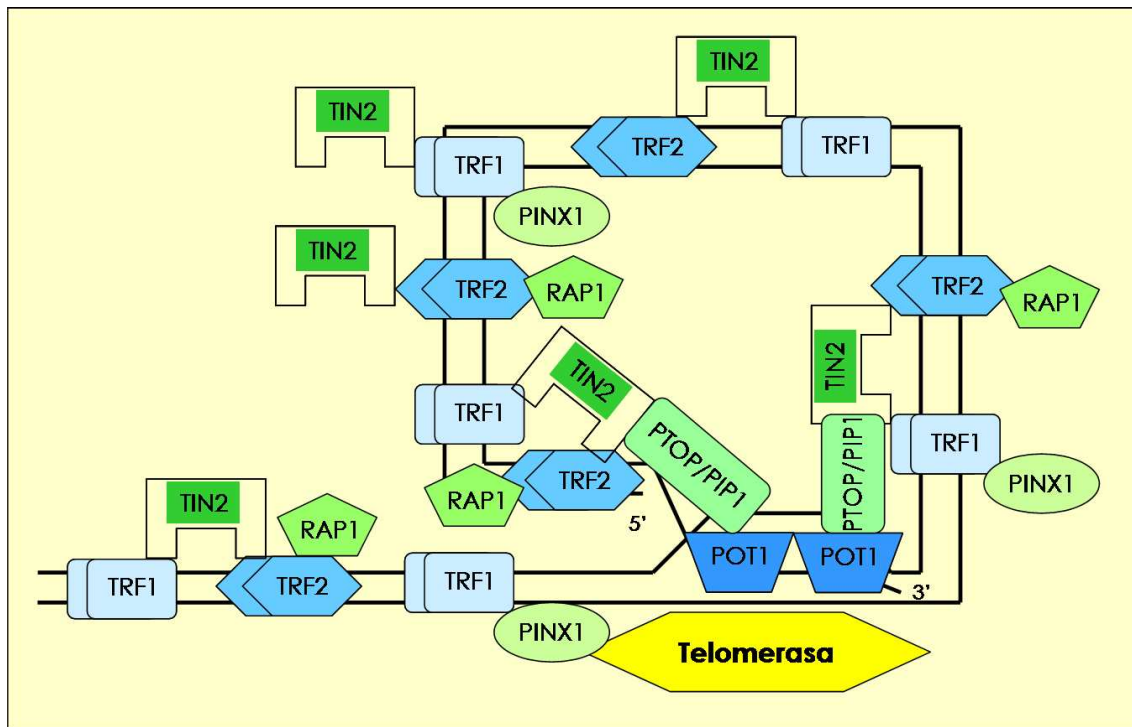


Figura 10. Estructura del final dels telòmers (*capping*). El nucli de l'estructura telomèrica (proteïnes de color blau) recluta altres proteïnes essencials per mantenir l'estructura de *T-loop* però aquestes no interaccionen directament amb les repeticions telomèriques (proteïnes de color verd). Modificat de Rodier *et al.*, (93).

◆ PIP1: *POT1 Interacting Protein*

Serveix com a pont entre el complex TRF1 i la proteïna POT1.

◆ Rap1: *repression and activation protein 1*

Interacciona amb TRF2. La sobreexpressió d'aquesta proteïna causa un gradual allargament del telòmer, això indica que aquesta juga un paper important en la regulació de la longitud del telòmer.

10.3. PROTEÏNES ASSOCIADAS AL TELÒMER AMB FUNCIO NO TELOMÈRICA

TRF1 i TRF2 també s'uneixen amb proteïnes que se sap o es creu que no tenen funcions telomèriques (figura 11).

◆ Tanquirasa: (*tankyrase*)

TANK1 i TANK2 interaccionen amb TRF1. Són poly(adenosinedifosfat(ADP)-ribosa)polimerases (PARP). L'ADP ribosilació del TRF1 disminueix la capacitat d'aquest per unir-se al telòmer. La sobreexpressió de tanquirasa en el nucli indueix l'ADP ribosilació del TRF1 alliberant-lo de la seva unió al telòmer. Això indueix l'allargament del telòmer, d'aquesta manera la tanquirasa donaria accés de la telomerasa al telòmer (93).

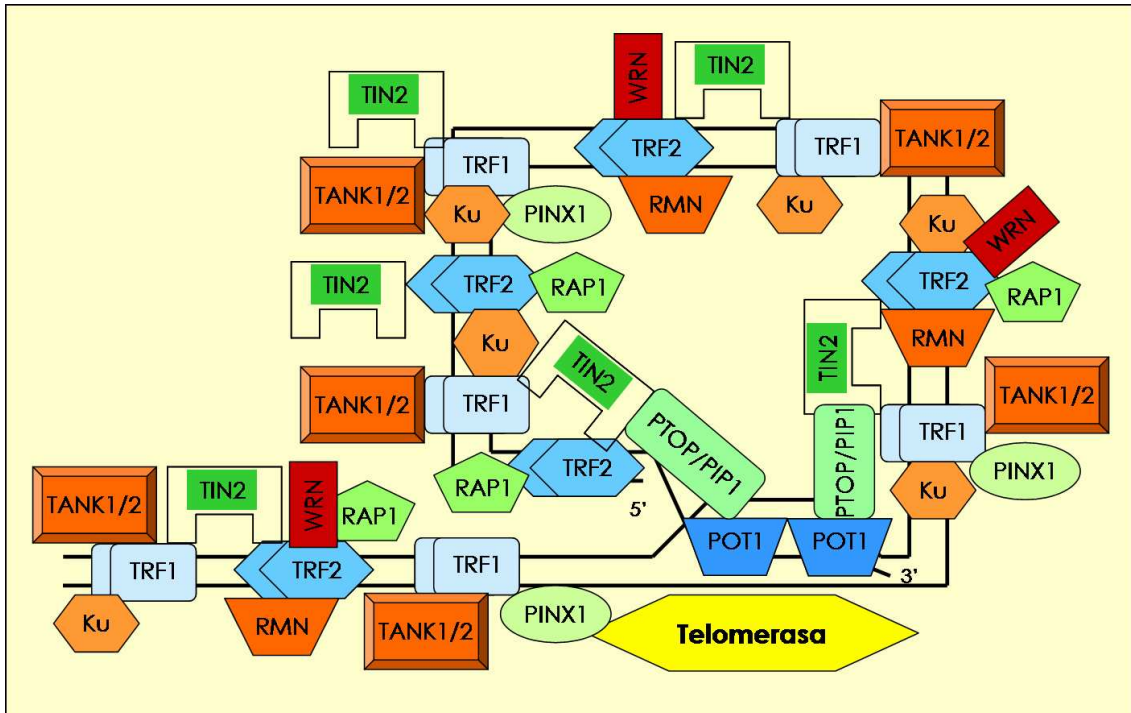


Figura 11. El *T-loop* també recluta un gran nombre de proteïnes, com tanquirases i proteïnes reparadores del DNA que tenen altres funcions no relacionades amb els telòmers (proteïnes vermelles i marrons). Modificat de Rodier *et al.*, (93).

◆ Ku: proteïnes que intervenen en la reparació del DNA

Interaccionen amb TRF1 i TRF2. Les seves funcions són prevenir la fusió i unir-se al extrems dels telòmers en absència de TRF2 funcional.

◆ ATM: *ataxia-telangiectasia-mutated*

◆ WRN: DNA helicases i exonucleases amb acció 3' i 5'

Aquestes preteïnes participen en la recombinació homòloga (HR) i NHEJ (*nonhomologous DNA end-jointed*)(93).

TRF1 i 2 interaccionen amb algunes proteïnes de reparació del DNA (ex. proteïna Ku). TRF2 interacciona amb algunes proteïnes que participen en la reparació del dany a DNA, incloent el complex MRN (*MRE11-RAD50-NBS*; *Nijmegen breakage syndrome*)

protein) el qual és molt important per a la recombinació homòloga i també pot participar en NHEJ (93).

11. REGULACIÓ DE LA LONGITUD DELS TELÒMERS

11.1. HIPÒTESI DE LA REGULACIÓ DELS TELÒMERS

L'homeòstasi dels telòmers depèn de dos factors:

- la longitud dels telòmers
- la concentració de la telomerasa

La quantitat de TRF1 unida a cada telòmer és proporcional a la longitud del telòmer, de manera que el complex TRF1 transmet informació sobre la longitud del telòmer a POT1 que es troba a l'extrem 3' del telòmer i controla l'accés de la telomerasa al seu substrat (58). Els telòmers llargs contenen gran quantitat del complex TRF1 unit i aquest promou un estadi tancat del telòmer impedit l'accés de la telomerasa, mentre que els telòmers curts presenten menys quantitat del complex unit i potencien l'estadi obert tenint més probabilitats de ser allargats (59). La variació dels nivells d'expressió del complex té un efecte important sobre la longitud del telòmer. Per exemple, la inhibició del TRF1 produeix l'elongació del telòmer mentre que l'activació del mateix en produeix l'escurçament. El mecanisme de regulació dels telòmers és sensible a la longitud (59).

El model per a explicar l'homeòstasi de la longitud dels telòmers combina els dos factors dels quals depèn i consta de 3 estats: no-extensible (tancat), extensible (obert) i extenent-se (figura 12).

L'estructura del telòmer pot canviar en la cèl·lula de manera cicle depenent restringint l'activitat de la telomerasa a la fase S del cicle cel·lular. Tots els telòmers són accessibles per la telomerasa durant un curt període de temps després de la replicació del DNA, però en telòmers llargs el canvi a l'estadi no-extensible és més ràpid que en telòmers curts, de manera que els telòmers curts poden tenir alta probabilitat d'unir-se a la telomerasa (54). No tots els telòmers són allargats després de cada fase de replicació del DNA, sinó que són allargats selectivament mostrant prioritat pels més curts (96).

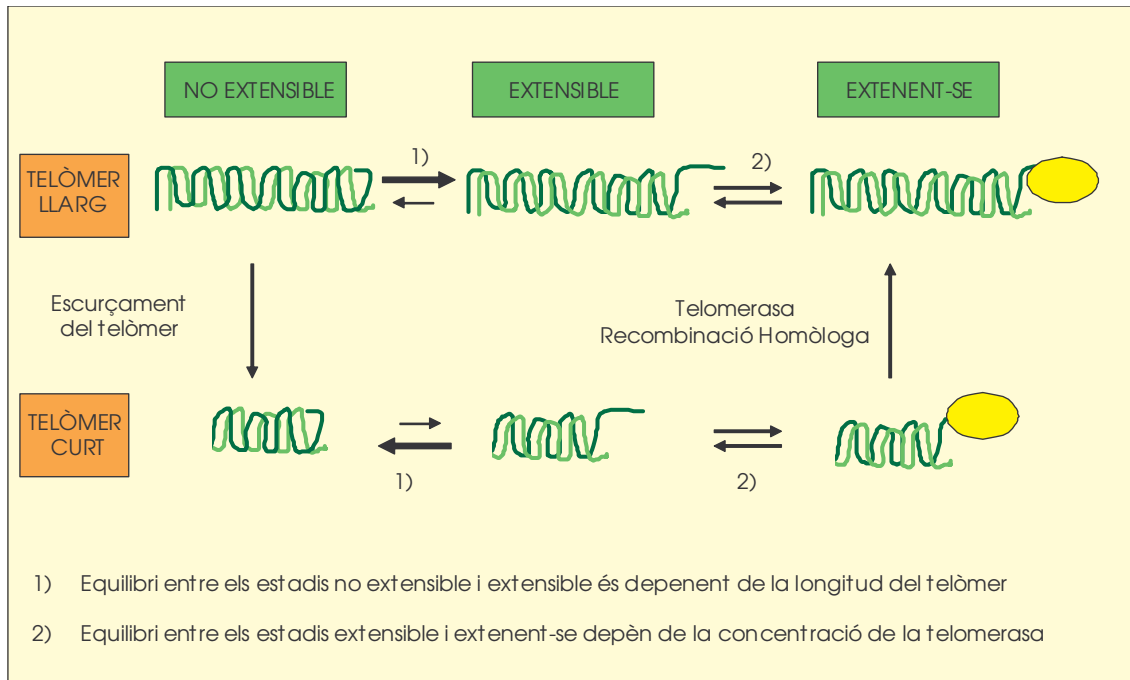


Figura 12. Model del tres estadis pel manteniment de la homeòstasi dels telòmers. Modificat de Hug i Lingner (54).

L'organització dels telòmers és dinàmica i depèn de la generació i conformació del extrem 3' de cadena senzilla. L'estadi tancat correspondria a la estructura de *T-loop* de manera que l'extrem 3' no seria accessible, mentre l'estadi obert el deixaria accessible a la telomerasa (60).

12. MECANISME D'ALLARGAMENT DEL TELÒMER TELOMERASA-INDEPENDENT

Alguns càncers telomerasa negatius mantenen la longitud dels seus telòmers per un mecanisme conegut com *ALT* (*Alternative Lengthening Telomeres*). Aquest mecanisme manté la longitud del telòmer però no necessita que la telomerasa sigui activada. Aquest mecanisme alternatiu consisteix en que una cadena de DNA telomèric s'uneix amb la cadena complementària d'un altre telòmer, d'aquesta manera la cadena complementària serveix com a motlle per a la síntesi del nou DNA telomèric (figura 13). Abans d'arribar a l'estat de crisi algunes cèl·lules han perdut tota la regió telomèrica, llavors s'activa el mecanisme ALT i la regió subtelomèrica substitueix la seqüència TTAGGG de la regió telomèrica (97).

Les cèl·lules amb el mecanisme alternatiu destaquen fenotípicament per tenir telòmers molt heterogenis i molt més llargs que els telòmers de cèl·lules telomerasa positives (94, 98). Les cèl·lules amb ALT són caracteritzades per la presència d'unes estructures nucleolars, els cossos PML (*promyelocytic leukemia*) associats a ALT (APBs), els quals contenen proteïna PML, proteïnes telomèriques TRF1 i TRF2, proteïnes involucrades en la reparació i recombinació del DNA, com per exemple el complex

MRN, RAD51, RAD52, WRN entre d'altres (98-100). S'ha proposat que els tumors que presenten un fenotip ALT tenen potencialment una inestabilitat cromosomal més alta que els tumors telomerasa positius (94).

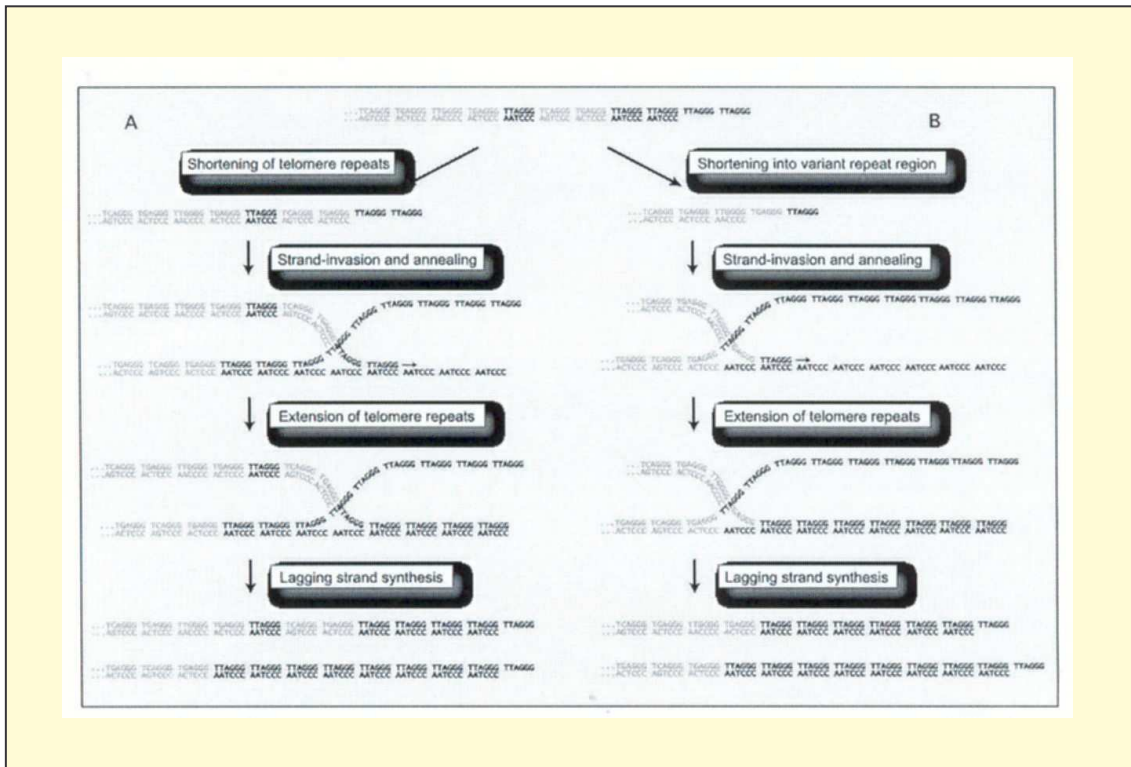


Figura 13. Mecanisme per a l'allargament del telòmer telomerasa-independent i que es coneix amb el nom d'ALT (*alternative lengthening telomere*). Reddel RR (97).

El mecanisme ALT és utilitzat molt més rarament que la telomerasa, s'ha detectat en un 20% de les línies cel·lulars immortalitzades i en alguns tipus de tumors concretament en els tumors d'origen neuroepitelial (astrocitomes) i mesenquimal incluint osteosarcomes i sarcomes del teixit tou tot i que també s'ha detectat en tumors d'origen epitelial (99, 101).

Alguns tumors presenten ambdós mecanismes, activitat de la telomerasa i ALT. Es desconeix si ambdós mecanismes poden coexistir en una mateixa cèl·lula o es manifesten en àrees diferents d'un mateix tumor (97).

NBS1 és essencial per la correcta unió dels APBs (*ALT-associated PML bodies*) en cèl·lules telomerasa negatives. APBs són estructures nuclears considerades com components essencials per a la maquinària del manteniment dels telòmers en cèl·lules ALT. Els APBs com ja hem esmentat contenen entre d'altres, repeticions telomèriques de DNA, TRF1, TRF2, MRN i proteïnes involucrades en el processament del DNA com RPA, RAD51 i RAD52. Per tant, com ja hem comentat abans, el complex MRN i NBS1 també tenen un paper important en les cèl·lules telomerasa negatives (60).

13. DUALITAT DE LA TELOMERASA

L'escurçament del telòmer i l'activació de la telomerasa poden actuar com a supressors de tumors o com a oncogens depenent del *timing* i del context genètic (figura 14). D'una banda, la pèrdua de repeticions telomèriques limita la proliferació cel·lular ocasionant senescència o apoptosi i serveix com a mecanisme supressor de tumors. D'altra banda la pèrdua de telòmer origina inestabilitat telomèrica deguda a l'absència de telomerasa i afavoreix l'inici dels esdeveniments en la formació del tumor.

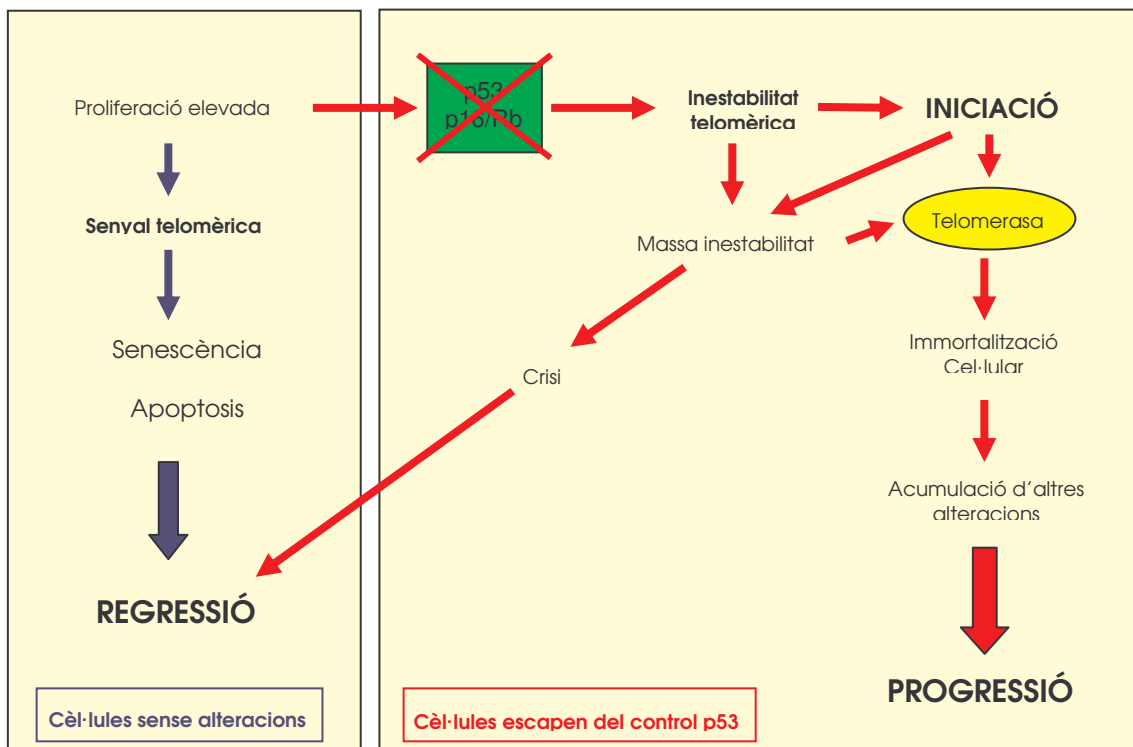


Figura 14. Rol dual de la telomerasa i els telòmers segons el context genètic de la cèl·lula. Modificat de Brunori *et al.*, (60).

La telomerasa pot restituir algunes funcions dels telòmers que són compatibles amb la proliferació durant llarg temps i permet que aquestes cèl·lules adquireixin altres mutacions necessàries per a la progressió tumoral. La telomerasa i el telòmer tenen, per tant, un rol dual en el desenvolupament del càncer (60, 102).

14. TELOMERASA I CÀNCER

La presència de la telomerasa ha estat analitzada en un gran nombre de tumors humans usant el *TRAP assay* (103, 104). L'activitat de la telomerasa no és present en totes les cèl·lules humanes. Durant el desenvolupament embrionari l'activitat de la telomerasa pot ser detectada fins les 12-21 setmanes de gestació depenent del teixit

(79). En els teixits embrionaris existeix una correlació entre l'AT i la presència de cèl·lules mare indiferenciades. Les cèl·lules mare en adults que presenten AT les troben en les cèl·lules germinals masculines, teixits en renovació de l'epiteli intestinal, epiteli de l'esòfag, endometri, epiteli cervical, queratinòcits basalts i cèl·lules mare hematopoiètiques i nivells baixos en sang perifèrica (79).

En la majoria de tumors (85-90%), el manteniment de la longitud dels telòmers es aconseguit per a una sobrerregulació de l'expressió de la telomerasa, mentre que el 10-15% de tumors restants mantenen la longitud dels seus telòmers a través del mecanisme alternatiu de l'allargament del telòmer (ALT), telomerasa independent i el qual implica la recombinació homòloga (94). L'AT és un element important per al desenvolupament tumoral i podria ser un marcador de progressió maligna.

La desregulació de l'expressió de la telomerasa ha estat directament relacionada amb algunes malalties humanes. Per exemple, el defecte molecular de la disqueratosi congènita és la disfunció de la telomerasa degut a mutacions en hTR o en proteïnes associades. Aquests pacients tenen visiblement els telòmers més curts que individus normals. Els defectes en la telomerasa donen com a resultat inestabilitat genètica i un augment en la incidència de càncer. L'activitat de la telomerasa és detectada en un 90% de les mostres tumorals i la seva expressió és suficient per escapar de les dues barreres proliferatives (M1 i M2). Amb cooperació amb alguns oncogenes la telomerasa dóna lloc a una conversió carcinogènica directe en cèl·lules epitelials i fibroblasts (53).

14.1. TELOMERASA I CÀNCER COLORECTAL

L'expressió de l'AT pel mètode TRAP en neoplàsies colorectals publicada en la literatura oscil·la entre el 80-100% dels casos. Alguns estudis conclouen que l'AT no es pot detectar en teixit colònic normal, altres han publicat que l'activitat de la telomerasa és apreciable en les cèl·lules de la mucosa normal. La incorporació de mètodes quantitativs i semiquantitatius ha permès demostrar que la majoria de tumors mostren una AT alta i que en els casos en els quals la mucosa normal és positiva aquesta presenta una activitat dèbil.

La majoria d'estudis coincideixen en afirmar que la telomerasa està relacionada amb la carcinogènesi. Aquest fet ha obert moltes portes hi ha desencadenat una abundant recerca sobre aquesta proteïna. No obstant, els resultats obtinguts en els diferents estudis publicats no sempre coincideixen, les variables que mostren relació amb l'AT en un estudi no la presenten en d'altres.

Molts estudis coincideixen en què l'AT és un bon marcador diagnòstic però en canvi són pocs i contradictòris els estudis en els quals s'ha valorat l'AT com a factor pronòstic (105).

15. TERAPIA ANTI-TELOMERASA

Els diferents components que formen la telomerasa i els múltiples punts de regulació fan que les teràpies anti-telomerasa puguin actuar en varis passos de la síntesis i l'activació de la telomerasa, així com sobre els telòmers i les proteïnes associades a aquest (94, 106).

Desafortunadament, aquests plantejaments requereixen llargs tractaments, sobre uns 100 dies per arribar a una reducció suficient del telòmer i són dependents de la longitud inicial dels telòmers del tumor (107).

15.1. DIANA hTERT

Inhibidor nucleòsid

Els anàlegs de nucleòsids són petites molècules que bloquegen la incorporació de dNTPs dins la neosíntesis de DNA durant l'activitat transcriptasa inversa de la telomerasa. El resultat que s'obté és una reducció transitòria de la longitud del telòmer (94, 107).

Inhibidor no nucleòsid

Inhibeix la telomerasa a través de la unió al lloc actiu de l'enzim sense afectar altres DNA polimerases. Provoca un progressiu escurçament del telòmer i una aturada en el creixement semblant a la senescència (94, 107).

Tecnologia anti-sens

Els *peptide nucleic acid* (PNA) són anàlegs de DNA i RNA i són resistents a la degradació d'exo i endonucleases. PNAs actuen a través de la inhibició selectiva de la telomerasa. Desafortunadament la baixa permeabilitat de la membrana als PNA és el major obstacle per al seu òptim funcionament.

L'activitat de la telomerasa també podria ser inhibida pels siRNAs (short-interfering RNA). Els siRNA diana per a components de la telomerasa semblen ser potencials teràpies ja que en línies cel·lulars tumorals s'ha observat una considerable reducció de la proteïna hTERT i uns nivells d'apoptosis superiors que en les cel·lules controls, tot i que encara es necessita la confirmació d'aquests resultats (94).

Ribozims

Els ribozims són RNAs anti-sentit que posseeixen una activitat endoribonucleasa que catalitza la hidròlisi específica dels ponts fosfodièster. Tenen un gran potencial farmacològic ja que són altament estables i seqüència específics. Els assajos de

degradació del mRNA de la subunitat hTERT de la telomerasa han estat exitosos en diverses línies de cèl·lules tumorals (94).

Dominant negatiu hTERT

Per inducció específica d'alteracions d'aminoàcids alguns mutants hTERT esdevenen catalíticament inactius però mantenen la capacitat d'unir-se al component hTR. El dominant negatiu hTERT competeix amb hTERT funcional per la unió amb hTR (94).

15.2. DIANA hTR

L'estratègia és bloquejar l'RNA de l'hTR i així evitar la unió amb l'hTERT d'aquesta manera s'inbeix l'activitat de la telomerasa.

Oligonucleòtids anti-sentit i siRNA

S'han desenvolupat estratègies fent servir la transfecció de vectors d'expressió anti-sentit contra hTR. La majoria d'estudis han estat capaços d'induir una disminució de l'activitat de la telomerasa i mostren una progressiva senescència cel·lular.

Els siRNA contra hTR han estat testats amb èxit *in vivo* i *in vitro* (94).

Ribozims

Proporcionen una inhibició específica de la telomerasa i un retard en el creixement cel·lular en algunes línies d'estudi però l'apoptosi efectiva o la reducció de la longitud del telòmer no van ser completament observades (94).

15.3. NIVELL TRANSCRIPCIONAL I POST-TRANSCRIPCIONAL

Nivell transcripcional

Aquestes teràpies pretenen actuar sobre els principals factors de transcripció que modulen l'expressió sobretot d'hTERT. El principal factor de transcripció diana sobre el qual es treballa és c-myc.

En la telomerasa s'ha observat una correlació positiva entre la hipermetilació de les illes CpG del promotor d'hTERT, l'expressió del mRNA i l'activitat de la telomerasa en múltiples línies cel·lulars de càncer. Per tant, un agent desmetilant com *5-azacytidine* podria desmetilar el promotor d'hTERT inhibint la transcripció i per tant la seva activitat (94).

Nivell post-transcripcional

Les possibilitats en aquest nivell són moltes ja que és en aquesta fase quan tenen lloc algunes modificacions, el transport cap al nucli dels components que formen el

complex de la telomerasa i durant aquest procés tots els components que formen el complex de la telomerasa s'uniran per a donar lloc al complex actiu. Durant aquesta etapa els fronts on poder actuar són molts (94).

15.4. TELÒMERS I PROTEÏNES ASSOCIADES

L'extrem 3' dels telòmers que sobresurt és un fragment de cadena senzilla ric en guanina i el qual sota determinades condicions fisiològiques pot formar estructures secundàries característiques com per exemple les estructures G-quadruplex (107, 108). Els fàrmacs que estableixen aquesta conformació es pensa que podran ser efectius inhibidors de la telomerasa (107, 108) L'estabilització d'aquests quadruplex que formen els extrems dels telòmers és una atractativa estratègia contra el càncer (108). Compostos derivats de proflavines, porfirines, acridines o antraquinones tenen la característica de tenir un anell aromàtic que es pot unir al G-quadruplex que formen els telòmers impedit que la telomerasa s'uneixi a l'extrem 3' i els telòmers siguin allargats (106).

En aquest moment els principals candidats de les teràpies sobre les proteïnes associades als telòmers són els factors d'unió al telòmer TRF1 i TRF2 (94).

II. JUSTIFICACIONS, HIPÒTESIS I OBJECTIUS

JUSTIFICACIONS

El càncer colorectal és la tercera neoplàsia en ordre de freqüència en la població mundial. Els factors pronòstic clàssics, els quals tenen una eficàcia provada, no han variat en els últims anys tot i els avenços en el diagnòstic precoç i les millores en les intervencions quirúrgiques i els tractaments oncològics. El que sí ha canviat és la llista de factors que reiteradament mostren el seu valor pronòstic i els que prometen ser-ho en un futur. Per això s'han intentat establir nous factors pronòstics com l'activitat de la telomerasa, la longitud del telòmer o l'expressió del TRF1. Els estudis existents actualment en la literatura mostren resultats contradictoris, tècniques no estandarditzades i un baix nombre de casos, per tot això ens plantejem les següents hipòtesis.

HIPÒTESIS

1. L'activació de la telomerasa segueix la seqüència adenoma-carcinoma en el càncer colorectal.
2. La longitud del telòmer i l'expressió del TRF1 mostren un comportament diferent en la mucosa tumoral que en la normal en el càncer colorectal.
3. L'activitat de la telomerasa, la longitud del telòmer i l'expressió del TRF1 són factors pronòstics pel temps lliure de malaltia i de supervivència global.

OBJECTIUS

Per a corroborar la primera hipòtesi es van plantejar els següents objectius:

1. Determinar l'activitat de la telomerasa en mostres tumorals, transicionals, normals i pòlips de pacients operats de CCR. Per això, es va posar a punt una tècnica estandarditzada i reproduïble per a realitzar aquesta determinació.
2. Demostrar la implicació d'aquests resultats en la seqüència adenoma-carcinoma de malalts amb neoplàsies colorectals.
3. Relacionar l'activitat de la telomerasa amb les característiques clíniques i anatomopatològiques dels pacients.

Per la segona hipòtesi:

1. Determinar la longitud del telòmer en mostres tumorals, normals i pòlips de pacients amb neoplàsies colorectals. Per això es va posar a punt una tècnica estandarditzada que fos reproduïble.
2. Relacionar la longitud del telòmer amb les característiques clíniques i anatomopatològiques dels pacients, així com amb l'activitat de la telomerasa.
3. Determinar l'expressió del TRF1 en la mucosa tumoral i normal.
4. Analitzar i relacionar l'expressió del TRF1 amb les característiques clíniques i anatomopatològiques dels pacients.
5. Relacionar l'expressió del TRF1 amb l'activitat de la telomerasa i la longitud del telòmer.

Per la tercera hipòtesi:

1. Conèixer l'índex de recidives, el temps lliure de malaltia i el temps de supervivència global als 2 i 4 anys dels pacients intervinguts de càncer colorectal.
2. Establir el paper pronòstic independent de l'activitat de la telomerasa, la longitud del telòmer i l'expressió del TRF1 en relació al temps lliure de malaltia i al temps de supervivència global als 2 i als 4 anys dels pacients intervinguts de càncer de còlon o de recte.

III. PACIENTS I MÈTODES

1. PACIENTS

L'estudi compren 108 pacients els quals van ser sotmesos a cirurgia programada per neoplàsia colorectal a l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova, i dels quals van ser recollides mostres pel Banc de Tumors del nostre Hospital, des del febrer de 2000 fins al gener de 2004. El protocol de recerca va ser aprovat pel Comitè d'Ètica de Recerca Clínica de l'hospital (CEIC) i es va disposar del consentiment escrit de tots ells per a participar i cedir les mostres per a ser analitzades genèticament.

1.1. OBTENCIÓ DE LES MOSTRES

◆ Mostres de teixit

Les mostres fresques de mucosa tumoral, transicional, i normal es van obtenir de les peces quirúrgiques en el moment de la cirurgia. Es va considerar mucosa transicional aquella que tenia una aparença macroscòpicament normal i que es trobava a menys d'1 cm del tumor (109). Es va considerar mucosa normal aquella que es trobava allunyada al menys 10 cm del tumor. També es van recollir mostres de pòlips, sincrònics o aïllats, del còlon.

El procés d'adquisició i emmagatzematge de les mostres es va dur a terme molt acuradament seguint el següent protocol. La mostra es va obtenir tallant un petit fragment de la peça quirúrgica amb un bisturí. Primerament, es va procedir a tallar la mucosa normal, seguidament la mucosa transicional i finalment la tumoral. D'aquesta manera es va evitar la possible contaminació de cèl·lules tumorals cap a les altres mucoses. Els fragments de les tres mucoses es van col·locar en tres pots separats els qual contenien PBS, aquest pas va permetre netejar les mucoses de possibles restes de femta, moc o sang. Un cop en el laboratori cada fragment de mucosa va ser tallat en fragments més petits i aquests van ser col·locats en criotubs degudament retolats. Els tubs van ser submergits en nitrogen líquid i emmagatzemats a -80°C fins al seu ús.

Les peces quirúrgiques van ser analitzades pel Servei d'Anatomia Patològica del nostre hospital. Les dades clíniques i patològiques van ser recollides en una base de dades. Els tumors van ser classificats d'acord amb la classificació tumor-nòdul-metàstasis de la Unió Internacional Contra el Càncer (UICC) i la classificació d'Astler-Coller modificada.

Les mostres de mucosa colònica de pacients sense cap afectació colorectal es van obtenir per colonoscòpia pel Servei de Digestiu del nostre hospital, de pacients sotmesos a colonoscòpia i amb el resultat de patologia no orgànica i després de disposar del seu consentiment.

◆ **Mostres sanguínies**

Dels pacients operats de càncer colorectal i dels sotmesos a colonoscòpia també se'ls van prendre mostres sanguínies durant el període pre-operatori i en el moment de la colonoscòpia respectivament. La sang un cop extreta era col·locada en tubs que contenien un anticoagulant (EDTA), seguidament se'n van agafar 0.5 mL dels quals es va realitzar l'extracció del DNA. El DNA va ser emmagatzemat a -20°C fins al seu ús.

En la figura 15 es resumeixen el nombre, el tipus i l'origen de les mostres recollides.

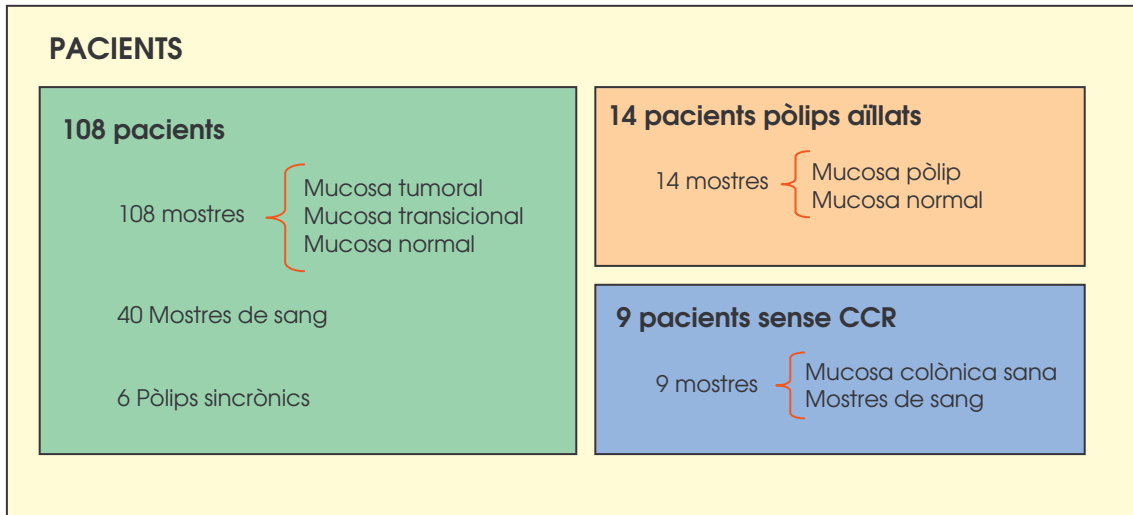


Figura 15. Esquema del tipus i nombre de mostres analitzades.

1.2. SEGUIMENT DELS PACIENTS

Els pacients van ser seguits pel Servei d'Oncologia, segons el següent protocol: els dos primers anys després de la intervenció quirúrgica els pacients van ser visitats per l'oncòleg cada 3 mesos. En aquesta visita es realitzava una exploració física, una anamnesi, una analítica (bioquímica, hemograma i CEA), la determinació de sang oculta en femta i cada 6 mesos es realitzava una colonoscòpia i un TC tòraco-abdominal de manera alternant. A partir dels 2 anys van ser visitats cada 6 mesos i es realitzava una exploració física, una anamnesi, una analítica, la determinació de sang oculta en femta i s'alternava la colonoscòpia amb el TC. Dels 2 anys fins als 5 es realitzava una visita anual amb les mateixes proves i alternant de nou la colonoscòpia amb el TC.

Per l'estudi es va tenir en compte un seguiment mínim dels pacients de 2 anys ja que durant aquest període és quan tenen lloc el 55-77% de les recidives (41), essent el seguiment màxim de 4 anys.

1.3. TRACTAMENT NEOADJUVANT I ADJUVANT

Quatre dels 108 pacients van rebre tractament neoadjuvant, quimioteràpia i radioteràpia.

El tractament postoperatori va ser realitzat seguint el protocol apropiat per còlon i recte d'acord amb l'estadi tumoral Dukes i TNM.

Dels pacients amb càncer de còlon que van rebre tractament adjuvant, 40 van rebre quimioteràpia, dels quals 35 van rebre 5FU+FA, 2 va rebre 5FU, 2 raltitrexed i 1 irinotecan. Els 25 pacients restants amb càncer de còlon no van rebre tractament adjuvant, 13 d'ells per no estar indicat per edat avançada, 4 per ser Astler-Coller A o B1 i els altres 8 perquè van rebutjar el tractament. Dels 43 pacients amb càncer de recte, 13 van rebre radioteràpia i quimioteràpia, dels quals set van rebre 5FU+FA i sis 5FU; 10 van rebre quimioteràpia en 9 d'ells era 5FU+FA i en un 5FU. En els 20 pacients restants no se'ls va donar tractament adjuvant, en 11 d'ells ja que no era indicat per l'estadi Astler-Coller, 7 per ser majors de 80 anys, i 2 per no van acceptar el tractament.

Donat que en termes d'activitat de la telomerasa no va haver-hi diferències significatives ($p = 0.974$) entre els 4 pacients que van rebre tractament neoadjuvant (mitjana AT va ser 2.67 TPG) i els que no (mitjana AT va ser 11.82 TPG), en l'apartat de resultats van ser tractats tots conjuntament.

2. METODOLOGIA

2.1. METODOLOGIA DE L'ACTIVITAT DE LA TELOMERASA

L'activitat de la telomerasa va ser mesurada a través d'un sistema quantitatiu, el *Fluorescent- Telomeric Repeat Amplification Protocol assay* (TRAP-F) (103, 104), utilitzant el *TRAPeze Telomerase Detection Kit* (INTERGEN®, Purchase, NY).

L'activitat de la telomerasa va ser analitzada en mucosa tumoral, transicional, normal i pòlips.

2.1.1. Extracció de la proteïna

Cada mostra de teixit va ser parcialment descongelada i es va tallar un fragment de 50 mg amb un bisturí estèril. Cada fragment va ser col·locat en un tub estèril i va ser homogeneïtzat (Ultra-Turrax T8, IKA-WERKE GmbH & Co, Staufen) en 200 µl de CHAPS lysis buffer (200mM Tris-HCl, pH 8.3, 15mM MgCl₂, 630mM KCl, 0.5% Tween 20, 10mM EGTA), i en les mostres tumorals es van afegir 6 µl d'inhibidor de la RNAsa (RNasin® Ribonuclease Inhibitor, 40 unitats/µl, Promega Madison WI, USA). Seguidament es van incubar les mostres en gel durant 30 minuts. Després de la incubació els lisats van ser centrifugats a 12.000 rpm durant 20 minuts a 4°C. Els sobrenedants van ser ràpidament congelats i emmagatzemats a -80°C fins a la seva anàlisi.

2.1.2. Determinació de la concentració de proteïna

La concentració proteica de l'extracte va ser determinada amb el mètode Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, GmbH, München), i l'extracte utilitzat contenia 1 µg de proteïna per a cada anàlisi de l'activitat de la telomerasa.

2.1.3. Determinació de l'activitat de la telomerasa

Aquesta anàlisi consta de dues reaccions que tenen lloc consecutivament en un mateix eppendorf (figura 16). La primera és l'extensió del primer TS per part de la telomerasa (si la mostra era telomerasa positiva) i la segona és l'amplificació d'aquest producte de PCR. Per tant, cada tub contenia per una banda, els productes habituals d'una PCR: 2.5 µl de 10x TRAP Reaction Buffer (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA, 0.1mM Benzamidina, 5mM β-mercaptoetanol, 0.5 % CHAPS, 10% glicerol), 0.5 µl de 50x dNTP mix (2.5mM), 0.2 µl de Taq polimerasa (5 Unitats/µl)(Roche Diagnostics GmbH, Penzberg), 0.5 µl de TRAP primer mix (RP primer, K1 primer, TSK1 template), i 19.8 µl d'aigua lliure de proteases, DNases i RNases. Per altra banda, contia a més 1 µg d'extracte de proteïna i 0.5 µl del primer TS (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3') conjugat amb FAM en l'extrem 5'. El protocol de PCR va ser el següent: 30 minuts a 30°C durant els quals va tenir lloc l'actuació de la telomerasa sobre el primer TS; i seguidament es va continuar amb un programa de PCR per amplificar el primer TS allargat que va ser 30 segons a 94°C; 30 segons a 52°C; i 45 segons a 72°C repetit durant 35 cicles. Es van agafar 0.5 µl dels productes de PCR, s'hi van afegir 9 µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA) i 0.5 µl de 120 LIZ Size Standard (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA). Aquesta barreja va ser desnaturalitzada a 95°C durant 10 minuts i seguidament es va col·locar 1 hora a 4°C. Finalment els productes van ser sotmesos a electroforesi dins el polímer POP 6 d'un seqüenciador automàtic, *3100-Avant Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA).

Les dades procedents del seqüenciador de DNA eren recollides i analitzades automàticament pel programa Abisprism® Genescan® version 3.7. Per a l'estandardització de l'activitat de la telomerasa, es va fer servir un control intern (TSR8; TRAP-eze®) per a l'estimació de la quantitat de primers amb repeticions telomèriques que eren col·locades per la telomerasa en un extracte donat. Cada pic va ser quantificat en termes d'àrea i alçada del mateix (110).

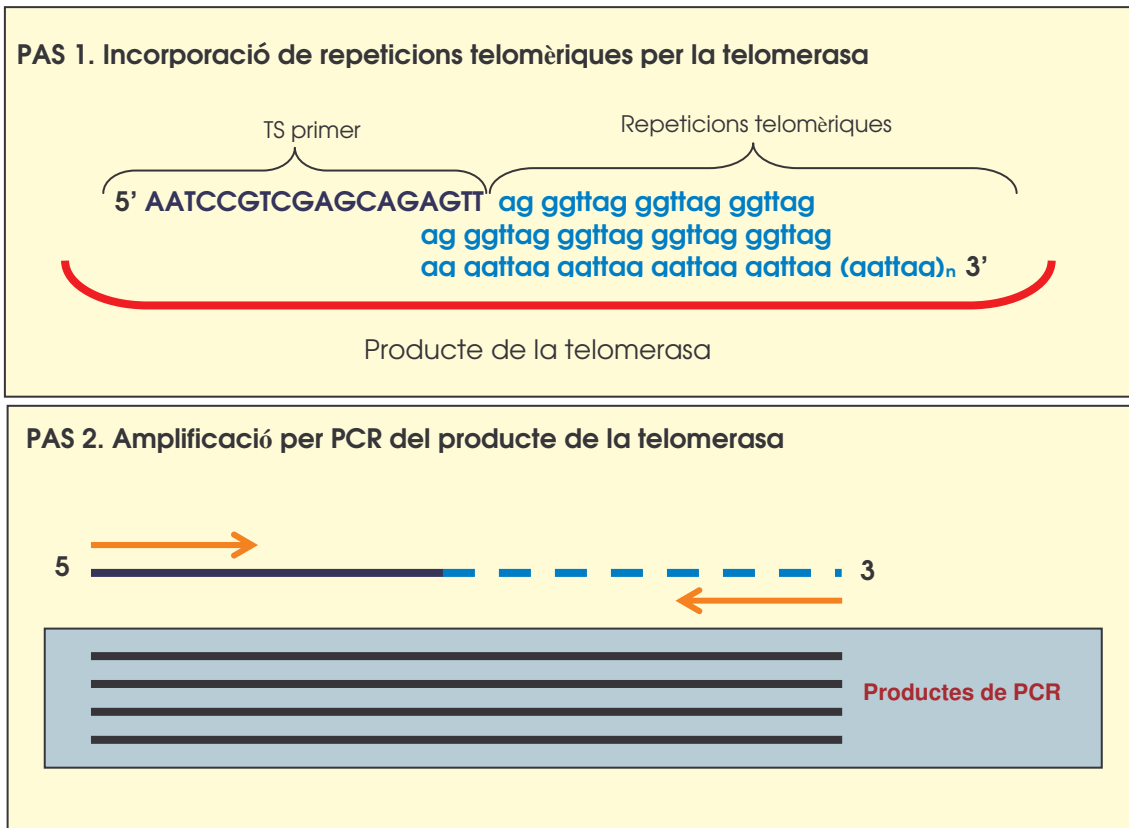


Figura 16. Esquema on es representen les dues etapes en les quals es basa la determinació de l'activitat de la telomerasa.

► Càlcul de l'activitat i de l'índex de la telomerasa

La quantificació de l'activitat de la telomerasa (AT) va ser determinada per la següent fórmula:

$$TPG = \frac{(\text{\textit{àrea total de l'activitat telomerasa}(50pb, 56pb, 62pb, 68pb...)} / (\text{\textit{àrea de control intern (36pb)}})) \times 100}{(\text{\textit{àrea total de l'activitat telomerasa}(50pb, 56pb...)} \text{ en control positiu (TSR8)}) / (\text{\textit{àrea del control intern (36pb)}} \text{ en control positiu})}$$

L'Índex de la Telomerasa (IT) va ser determinat per la fórmula següent:

$$IT = \text{Log} (\text{activitat telomerasa del teixit tumoral} - \text{activitat telomerasa del teixit normal})$$

2.2. METODOLOGIA DE LA LONGITUD DEL TELÒMER

La longitud del telòmer és a dir, el fragment de restricció del telòmer, va ser determinada per Southern blot (*Telo TAGGG Telomere length assay*, Roche Diagnostics GmbH Mannheim) en teixit tumoral, normal, en pòlips i en cèl·lules sanguínies de sang

perifèrica de pacients amb neoplàsies colorectals i també en mucosa colònica i cèl·lules sanguínies de pacients sense cap afectació colònica.

2.2.1. Extracció del DNA genòmic

◆ Extracció de DNA de teixit

Primerament, es va aïllar el DNA genòmic dels teixits (*DNA isolation Kit for cells and tissue*, Roche Diagnostics GmbH Mannheim).

Lisi i eliminació de l'RNA

Es van agafar 20 mg de teixit i se'ls van afegir 500 µl de *cellular lysis buffer*. El teixit es va homogeneïtzar (Ultra-Turrax T8, IKA-WERKE GmbH & Co, Staufen) fins a obtenir una suspensió fina. Seguidament es van afegir 0.30 µl de proteïnasa K, es vortejà la mostra 2-3 segons i es va col·locar a 65°C durant 1 hora. Passat aquest temps es van afegir 20 µl d'RNasa, es va vortejar de nou uns segons i es va deixar 15 minuts a 37°C.

Precipitació de les proteïnes

Per a precipitar les proteïnes es van afegir 220 µl de *Protein precipitation solution*, es va vortejar bé i es van incubar les mostres 5 minuts en gel. Seguidament es van centrifugar a 14000 rpm durant 20 minuts. El sobrenedant va ser pipetejat delicadament, ja que contenia el DNA, i es va col·locar en un tub nou estèril.

Precipitació del DNA

Per a obtenir el DNA es van afegir a les mostres 0.7 volums d'isopropanol, es va invertir el tub suaument i es van centrifugar les mostres a 1370g durant 10 minuts. Es va eliminar el sobrenedant, es van afegir 400 µl d'etanol 70% i es va agitar el tub per tal que el *pellet* es dissolgués amb l'etanol. A continuació es van centrifugar els tubs a 1370g durant 5 minuts, es va eliminar el sobrenedant i es va deixar que el *pellet* s'assequés a l'aire durant uns minuts.

Hidratació del DNA

Per aconseguir-ho es va resuspendre el *pellet* que contenia el DNA amb 100 µl del tampó TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0), agitant suaument i es va guardar a 4°C fins al seu ús.

◆ Extracció de DNA de cèl·lules sanguínies

L'extracció de DNA de sang dels pacients amb càncer colorectal i dels que no presentaven cap afectació colònica es va realitzar amb l'*AquaPure Genomic DNA blood kit* (Bio-Rad Laboratories).

Lisi cel·lular

Es van afegir en un tub de centrífuga 300 µl de sang i 900 µl de *RBC Lysis solution* i es va incubar durant 1 minut a temperatura ambient remenant per inversió. Passat aquest temps es va centrifugar durant 20 segons a 12.000 rpm, es va eliminar el sobrenedant i es va vortejar el *pellet* vigorosament uns 10 segons. Es van afegir 300 µl de *Genomic DNA Lysis solution* i es va pipetejar per lisar les cèl·lules.

Precipitació de les proteïnes

Es van afegir 100 µl de *Protein Precipitation Solution* en el lisat cel·lular i es va vortejar vigorosament durant 20 segons. Després es va centrifugar a 12.000 rpm durant 3 minuts. Les proteïnes precipitades van formar un *pellet* compacte. Si no era així, calia incubar amb 100 µl de *Protein Precipitation Solution* en gel durant 5 minuts i tornar a centrifugar.

Precipitació del DNA

Es va recuperar el sobrenedant (que contenia el DNA) en un tub nou, es van afegir 300 µl de 100% isopropanol (2-propanol) i es va barrejar invertint unes 50 vegades. A continuació es va centrifugar a 12.000 rpm durant 1 minut. Es va eliminar el sobrenedant, es van afegir 300 µl d'etanol 70% i es va invertir varies vegades per rentar el *pellet* de DNA. Per acabar es va tornar a centrifugar a 12.000 rpm durant 1 minut, es va llençar el sobrenedant i es va deixar que el *pellet* s'assequés a l'aire durant 10-15 minuts.

Hidratació del DNA

Es van afegir 100 µl de *DNA Hydration Buffer* i es va incubar a 65°C durant 5 -10 minuts. Seguidament es va passar pel vòrtex 5 segons i es va guardar el DNA a 4°C o per guardar-lo durant molt de temps, a -20°C.

2.2.2. Determinació de la concentració de DNA

Abans de començar el Southern blot es va quantificar el contingut de DNA de les mostres mitjançant la mesura de l'absorbància en un espectofotòmetre a 260 nm.

2.2.3. Determinació de la longitud del telòmer

El Southern blot va ser la tècnica per mitjà de la qual es va determinar la longitud dels telòmers i consta de tres etapes que es representen en la figura 17.

◆ Digestió del DNA genòmic

El DNA genòmic (2 µg) va ser digerit amb 20 unitats de cadascun d'aquests enzims, Hinf I i Rsa I, durant 2 hores a 37°C. També va ser digerit 1µg del DNA dels dos controls positius alt i baix (HC i LH, TeloTAAGGG). Per aturar la digestió es van afegir a cada mostra 4 µl de *loading buffer* 5x (TeloTAAGGG).

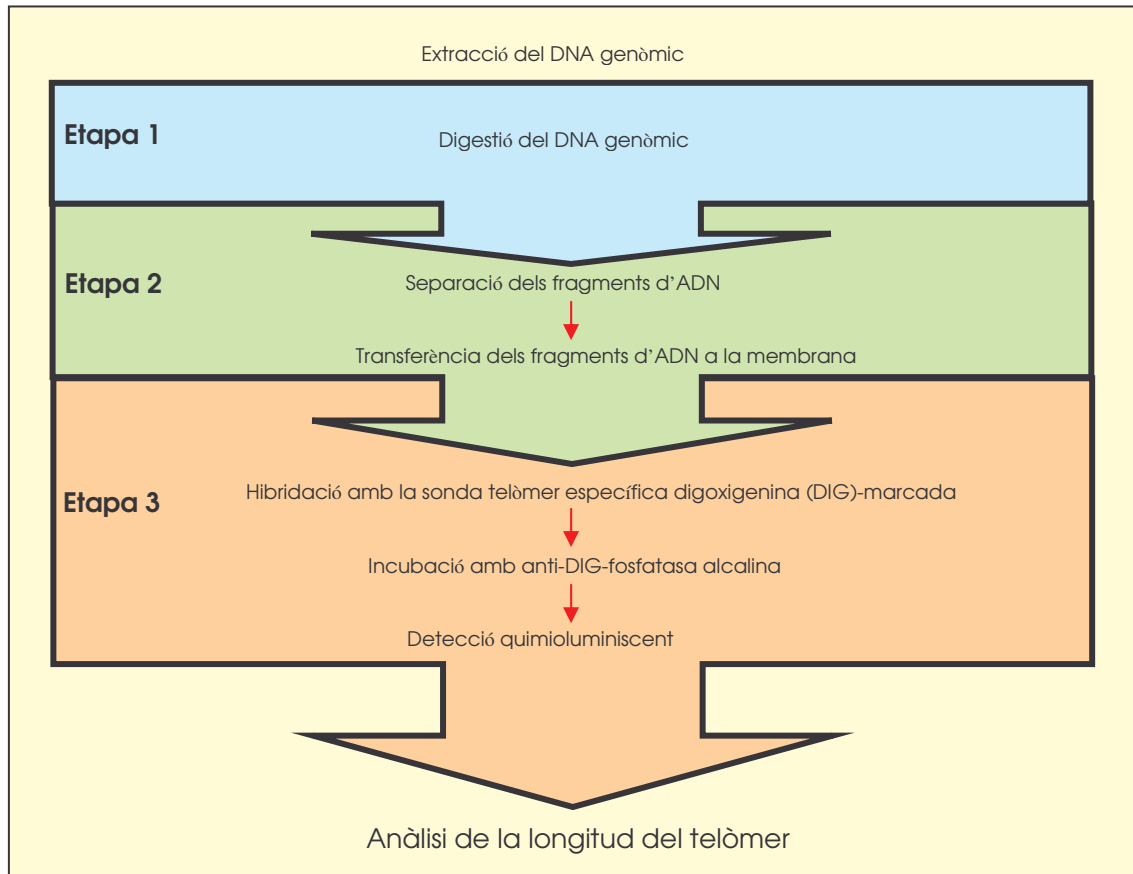


Figura 17. Representació esquemàtica de les principals etapes del Southern blot.

◆ Electroforesi i transferència

Seguidament es van separar els fragments resultants de la digestió a través d'una electroforesi en gel d'agarosa (0.8%), durant 3 hores a 100V amb tampó TAE 1x (0.04M Tris-acetat, 0.001M EDTA, pH 8.0). En el gel a part de les mostres també s'hi va carregar un marcador de pes molecular (DNA molecular weight marker III DIG-labeled 0.12-21.2 Kb, Roche Diagnostics GmbH). El gel es va depurar (HCl 0.25M), desnaturalitzar (NaOH 0.5M i NaCl 1.5M), i neutralitzar (Tris-HCl 0.5M i NaCl 3M pH 7.5). Seguidament es va transferir el contingut del gel sobre una membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham Biosciences) mitjançant un vacuum blot amb l'ajut del *transfer buffer* 20x SSC (3M NaCl, 0.3M Citrat de sodi, pH 7.0).

◆ Hibridació amb la sonda

El següent pas va ser unir (*crosslinking*) el DNA a la membrana a través d'una curta exposició amb llum ultra violeta. Abans d'hibridar la membrana amb la sonda específica dels telòmers es va realitzar una pre-hibridació durant 1 hora per eliminar les possibles unions inespecífiques i seguidament es va incubar la membrana durant 3 hores amb una solució d'hibridació que contenia la sonda telòmer-específica (TTAGGG)₄ marcada amb digoxigenina (DIG). Tan la pre-hibridació com la hibridació es van dur a terme a 42°C i amb agitació suau. Finalitzada la hibridació les membranes van ser rentades dues vegades en 2x SSC i 0.1% SDS durant 10 minuts a temperatura ambient, i després en 0.2x SSC i 0.1% SDS durant 20 minuts a 50°C. A continuació van ser incubades 30 minuts a temperatura ambient fent servir el *blocking buffer* (Telo TAGGG), passats els 30 minuts es va diluir el anti-DIG-AP (Telo TAGGG) en el *blocking buffer* restant i es va incubar amb agitació durant 30 minuts a temperatura ambient. Seguidament les membranes van ser rentades dues vegades en *washing buffer 1x* (Telo TAGGG) durant 15 minuts. Totes les incubacions van ser realitzades amb agitació suau. Per revelar la membrana es va incubar durant 5 minuts amb anti-DIG fosfatasa alcalina. La quimioluminiscència va ser detectada al Lumi-Imager i analitzada amb el software Lumi-Analyst (Boehringer Mannheim).

Els dos controls positius de DNA (control-DNA low i control-DNA high) són proporcionats amb el kit i pertanyen a DNA genòmic purificat de línies cel·lulars immortals. La mitjana de la longitud dels telòmers d'aquestes línies cel·lulars era de 3.9 Kpb i 10.2 Kpb, respectivament.

► Càlcul de la longitud del telòmer

La longitud dels telòmers va ser determinada per la següent fórmula:

$$LT = \Sigma (OD_i) / \Sigma (OD_i/L_i)$$

On "OD_i" era la senyal quimioluminiscent i "L_i" era la longitud del fragment en la posició "i". Les unitats de la longitud del telòmer es van mesurar en Kiloparells de bases (Kbp). Un cop es va tenir la imatge, el primer que es va fer va ser col·locar un enreixat de 30 quadres en cada línia (cada mostra). Per fer la subtracció del soroll de fons, es van seleccionar varis quadres en línies diferents on es trobés el senyal no telòmer-específic i representatiu del *background*, es va fer la mitjana i es va restar de tots els quadres de l'enreixat. Per a cada quadre es va necessitar el "OD_i" i la "L_i". La "OD_i" ens la proporcionava el programa i la "L_i" es va calcular realitzant una regressió, on les "y"

corresponien a cada fragment del marcador de pes molecular i les "x" a la posició que aquests ocupaven en l'enreixat. D'aquesta manera es va obtenir la longitud que corresponia a cada un dels 30 quadres que formaven cada columna de l'enreixat.

La ràtio de longitud del telòmer (RLT) va ser determinada com el quocient entre la longitud del telòmer en la mucosa tumoral i la longitud del telòmer en el teixit normal del mateix pacient.

L'escurçament del telòmer va ser considerat quan la longitud del telòmer en el teixit tumoral estava per sota del 80% de la longitud del telòmer de la mucosa normal i l'allargament quan estava per sobre del 120%, les mostres que estaven entre el 80 i el 120% eren les que mantenien una longitud similar entre ambdues mucoses i per tant es va considerar que la longitud no variava.

2.3. METODOLOGIA DE L'EXPRESSION DEL TRF1

L'expressió del TRF1 va ser analitzada a través del Western blot. Aquesta tècnica consta de 4 etapes que es resumeixen en la figura 18.

2.3.1. Extracció de la proteïna

Es va preparar una *mix* per 1mL de *Lysis buffer protein* (Tris 125mM, 2% a pH 6.8) s'hi van afegir 5 µl de PIC (*protease inhibitor cocktail*, Sigma-Aldrich) i també 10 µl PMSF (*Phenylmethanesulfonyl fluoride*, Sigma-Aldrich). Es van tallar fragments de teixit d'uns 40 mg i es van trossejar ben petits. A cada eppendorf es va col·locar el teixit i 400 µl de la *mix* de lisi, en les mostres tumorals es van afegir 0.5 µl d'inhibidor d'RNases, i es va homogeneïtzar (Ultra-Turrax T8, IKA-WERKE GmbH & Co, Staufen). A continuació es van centrifugar els lisats a 12.000 rpm durant 2 minuts. Es va recuperar el sobrenedant en tub nou estèril i es va sonicar (Digital Sonifier 450, Branson) per eliminar el DNA.

2.3.2. Determinació de la concentració de proteïna

Es va determinar la concentració proteica de les mostres a través del mètode *Bio Rad Micro protein assay* (Bio-Rad Laboratories) llegint l'absorbància a 590 nm.

2.3.3. Determinació de l'expressió del TRF1

◆ Electroforesi en gel d'acrilamida

La concentració de proteïna utilitzada va ser de 25 µg de proteïna total i per a fer la dissolució es va fer servir el mateix tampó de lisi que per a l'extracció proteica. A més a cada mostra es van afegir 5 µl de *loading buffer* (50mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 0.10% blau de bromofenol, 144mM β-mercaptoetanol i 10% de glicerol) i es va escalfar a 95°C durant 5 minuts. Les mostres van ser carregades en un gel d'acrilamida al 10% (30% acrilamida/bis solució 29:1, 3.3%C, Bio-Rad Laboratories) i van córrer durant 1hora i 30

minuts a 150V. A cada gel s'hi va col·locar una control positiu (cèl·lules 293, *human embryonic kidney cells*) a més d'un marcador de pes molecular (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, Fermentas, Life Sciences).

◆ Transferència i bloqueig dels llocs inespecífics

A continuació es va transferir el contingut del gel a una membrana de PVDF (*polyvinylidene fluoride*, Millipore) durant 1 hora a 70V. Acabada la transferència les membranes van ser bloquejades amb llet en pols al 5% (hidratada amb TBS) durant 2 hores amb agitació suau i a temperatura ambient, amb la finalitat de bloquejar els llocs d'unió inespecífics. Seguidament es van fer 3 rentats (15, 10 i 10 minuts) amb TBST (*Tris buffered saline* amb 0.1% *Tween*, Bio-Rad Laboratories).

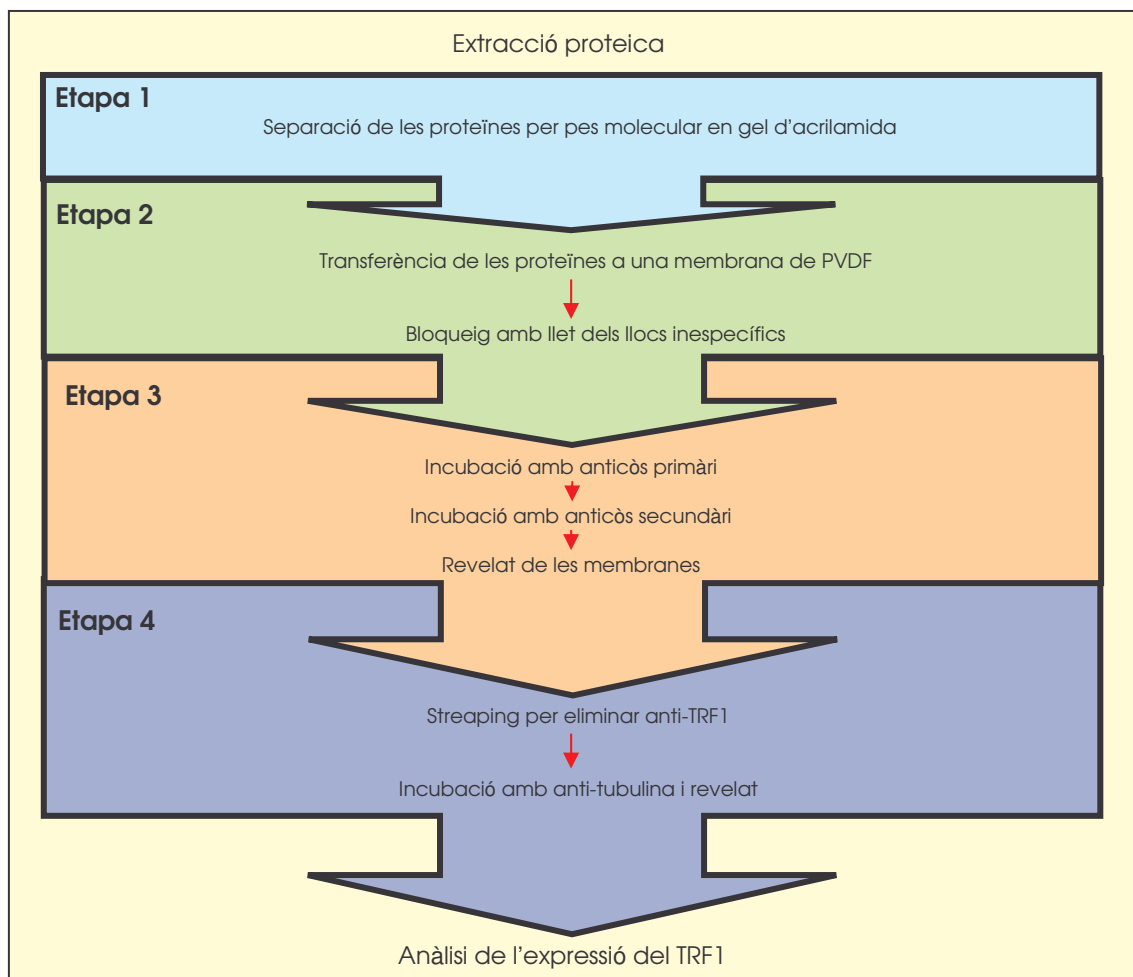


Figura 18. Esquema representatiu de les principals etapes del Western blot.

◆ Hibridació amb l'anticòs i revelat

La hibridació amb l'anticòs primari monoclonal anti-TRF1 (*clone TRF-78*, Sigma) a 1/500 diluït amb llet al 0.5% es va fer a temperatura ambient amb agitació durant 1 hora. Per eliminar les restes d'anticòs es van rentar les membranes amb TBST durant 20,

10, 10 i 5 minuts. Seguidament les membranes van ser incubades amb l'anticòs secundari conjugat amb peroxidasa (anti-mouse IgG, Jackson ImmunoResearch, Laboratories, INC.) es va fer servir una dilució 1/12500 durant dues hores a temperatura ambient i agitació suau. Es van tornar a rentar les membranes amb TBST 15, 10, 10 i 5 minuts. Seguidament es va procedir a revelar les membranes, per això es van incubar durant 5 minuts amb 400 µl dels reactius A i B (EZ-ECL *Chemiluminescence Detection Kit for HRP*, Biological Industries Kibbutz Beit Haemek, Israel) i es van exposar al Lumi-Imager durant 15 minuts.

◆ Streaping i incubació amb anti-tubulina

Per a determinar l'expressió de la tubulina en les mateixes membranes es van rentar amb TBST per eliminar les restes de revelador i es va procedir a l'*streaping* de les mateixes. Per això es van incubar les membranes amb solució de *streaping* (glicina 0.2M pH 2.5) 30 minuts dues vegades, entremig es van rentar les membranes amb TBST 5 minuts (x2 vegades). Es van rentar bé les membranes amb TBST 15, 10, 10 i 5 minuts. Llavors es va procedir a hibridar amb l'anticòs primari anti-tubulina, per això es van tornar a bloquejar les membranes exactament igual que abans i la dilució anti-tubulina 1/30000 (monoclonal anti-α tubulina Sigma, Saint Louis, Missouri) va ser incubada 1 hora a temperatura ambient, es van rentar les membranes i es va incubar amb l'anticòs secundari (el mateix que abans) durant 30 minuts i es va procedir a revelar de la manera comentada abans.

► Càlcul de l'expressió del TRF1

La quantificació de l'expressió del TRF1 per Western blot es va fer de manera qualitativa. L'expressió va ser analitzada tenint en compte l'expressió de l'alfa tubulina com a control intern de cada mostra i la determinació del nivell d'expressió es va fer en base a l'expressió del control positiu (línia cel·lular 293) considerant la seva expressió com el 100%.

Es van utilitzar els següents barems:

- "-" : expressió negativa
- "+" : expressió dèbil
- "++" : expressió intermèdia
- "+++" : expressió forta

La quantificació la van realitzar tres persones diferents i el resultat va ser el consens entre la opinió de com a mínim dues d'elles.

Per a determinar la ràtio de TRF1 es va realitzar una valoració entre l'expressió del TRF1 en la mucosa tumoral respecte la mucosa normal. Si l'expressió del TRF1 en la mucosa tumoral era superior (tenia més creuetes) que la corresponent mucosa normal

la ràtio es va considerar "+", si l'expressió era igual en ambdues mucoses la ràtio era "=" i si la mucosa normal mostrava una expressió superior que la tumoral la ràtio va ser considerada "-".

	ACTIVITAT TELOMERASA	LONGITUD TELÒMER	EXPRESSIÓ TRF1
M. Tumoral	108	104	83
M. Transicional	108	-	-
M. Normal	108	104	83
Mostra sang	-	40	-
M. Tumoral	6	6	-
M. Pòlip	6	6	-
M. Normal	6	6	-
M. Pòlip	14	14	-
M. Normal	14	14	-
M. sana	-	9	-
Mostra sang	-	9	-

Taula 1. Resumeix les determinacions realitzades en cada tipus de mostra.

L'activitat de la telomerasa va ser determinada en 108 pacients amb CCR en la mucosa tumoral, transicional i normal. Es va poder analitzar la LT en 104 pacients en la mucosa tumoral i normal, d'aquests 104 pacients se'n van escollir 40, agafant pacients amb AT i LT representatius, per a determinar la LT en cèl·lules sanguínies. L'expressió del TRF1 es va poder determinar en la mucosa tumoral i normal de 83 pacients.

3. VARIABLES DE L'ESTUDI

3.1. TIPUS DE MOSTRA

- ◆ Tumoral
- ◆ Transicional: aquella que tenia una aparença macroscòpicament normal i que es trobava a menys d'1 cm del tumor.
- ◆ Normal: considerem mucosa normal aquella que es trobava a 10 cm del tumor.
- ◆ Pòlips: podien ser sincrònics al càncer colorectal o bé aïllats.

- ◆ Mucosa colònica de pacients sense afectació colorectal
- ◆ Sang perifèrica: obtinguda de pacients intervinguts de càncer colorectal i de pacients sense cap afectació colorectal.

3.2. VARIABLES CLÍNiques

- ◆ Sexe

Variable qualitativa amb dues categories: home i dona.

- ◆ Edat

Hem codificat aquesta variable en una dicotòmica: ≤ 70 i >70 anys.

3.3. VARIABLES ANATOMOPATOLÒGIQUES DEL TUMOR

- ◆ Localització

Variable qualitativa que recull la localització del tumor en tres categories: còlon dret que compren el cec, el còlon ascendent, el còlon transvers i l'angle hepàtic; còlon esquerre que compren l'angle esplènic, el còlon descendent i el sigma; i el recte.

- ◆ Tipus histològic

Variable qualitativa amb dues categories: adenocarcinoma i carcinoma mucinós.

- ◆ Aspecte macroscòpic

Variable qualitativa amb tres categories: ulcero-infiltrant, vegetant i polipoide.

- ◆ Grau de diferenciació

Variable qualitativa amb tres categories: ben diferenciat, moderadament diferenciat i pobrament diferenciat.

- ◆ Estadi segons la classificació de Dukes

Variable qualitativa amb quatre categories segons el nivell d'invasió de la paret.

Dukes A: tumor limitat a la *muscularis mucosa*

Dukes B: tumor que sobrepassa la *muscularis mucosa*

Dukes C: tumor que envaeix tota la paret del còlon i a més presenta afectació ganglionar

Dukes D: tumors amb disseminació peritoneal o metàstasis a distància

- ◆ Classificació T

Variable qualitativa en cinc categories.

Tis: invasió intraepitelial o de la làmina pròpia

T1: afectació de la submucosa, però no de la muscular pròpia

T2: invasió de la muscular pròpia, sense sobrepassar-la

T3: invasió de la serosa

T4: invasió d'òrgans adjacents i/o afectació de la cavitat peritoneal

♦ Classificació N

Variable qualitativa dicotòmica, presència/absència de ganglis afectats.

Negativa: absència de ganglis afectats

Positiva: presència de ganglis afectats

♦ Classificació M

Variable qualitativa dicotòmica presència/absència de metàstasis a distància.

M0: absència de metàstasis

M1: presència de metàstasis

♦ Estadi TNM

Variable qualitativa que unifica les classificacions T, N i M. Presenta cinc categories.

Estadi 0: Tis N0 M0

Estadi I: T1-2 N0 M0

Estadi II: T3-4 N0 M0

Estadi III: T1-4 N1-2 M0

Estadi IV: T1-4 N0-2 M1

♦ Recidiva local

Variable qualitativa dicotòmica si/no.

Entenen per recidiva local l'aparició o reaparició del tumor en el llit on es trobava abans, és a dir, a la mateixa zona anatòmica.

♦ Progressió de la malaltia

Variable qualitativa dicotòmica si/no.

Es va considerar progressió de la malaltia l'aparició de recidiva local o metàstasis a distància posteriors a la cirurgia.

3.4. VARIABLES DE L'ESTUDI DE L'ACTIVITAT DE LA TELOMERASA

♦ Activitat de la telomerasa (AT)

Variable quantitativa expressada en TPG (Total Producte Generated)

♦ Índex de la telomerasa (IT)

Variable quantitativa que s'obté de realitzar el logaritme de la diferència entre l'activitat de la telomerasa en la mucosa tumoral i la de la mucosa normal del mateix pacient.

Aquesta variable és codificada com dicotòmica: IT baix (≤ 0.85) i IT alt (> 0.85).

3.5. VARIABLES DE L'ESTUDI DE LA LONGITUD DEL TELÒMER

♦ Longitud del telòmer (LT)

Variable quantitativa expressada en Kpb.

◆ Ràtio de la longitud del telòmer (RLT)

Variable quantitativa que prové de realitzar el quocient entre la longitud del telòmer de la mucosa tumoral i la de la mucosa normal del mateix pacient.

Variable codificada com a dicotòmica: RLT baix (≤ 1) i RLT alt (> 1).

3.6. VARIABLES DE L'ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DEL TRF1

◆ Expressió del TRF1

Variable qualitativa classificada en quatre categories: “-”, “+”, “++”, “+++”.

L'expressió del TRF1 també és classificada en tant sols dues categories: “-/+”, “++/+++”.

◆ Ràtio de l'expressió del TRF1

Variable codificada en tres categories: “-”, “=”, “+”.

La ràtio també va ser codificada en dues categories: “-/=” i “+”.

3.7. VARIABLES TEMPORALS EN ELS ESTUDIS DE SUPERVIVÈNCIA

◆ Temps lliure de malaltia

Variable quantitativa expressada en setmanes. S'obté de calcular el temps que transcorre entre la data de la intervenció quirúrgica i la data en la qual era diagnosticada la recidiva o la metàstasi, en el cas que es produïssin ambdues coses es va considerar la data del primer esdeveniment.

◆ Temps de supervivència global

Variable quantitativa expressada en setmanes. S'obté de calcular el temps que transcorre entre la data de la intervenció quirúrgica i la mort del pacient o el dia de l'última visita abans de tancar l'estudi.

4. BASE DE DADES I TRACTAMENT

Amb totes les dades recollides dels casos estudiats es va construir una base de dades matricial i informatitzada. Es va utilitzar un sistema de files i columnes capaç de ser llegit pel programa informàtic SPSS 14.0 per a Windows (SPSS, Inc.). Totes les dades van ser introduïdes com a dígit alfanumèrics en què les variables quantitatives representaven el valor de la variable i en les qualitatives una determinada categoria de la mateixa.

5. ESTUDI ESTADÍSTIC DELS RESULTATS

L'estudi estadístic dels resultats es va realitzar mitjançant l'ajuda del programa informàtic SPSS 14.0 per a Windows (SPSS, Inc.). Diferents proves estadístiques van ser utilitzades segons les variables estudiades. El grau de significació es va establir per a una $p \leq 0.05$. Els mètodes estadístics utilitzats en aquest estudi han estat els següents:

◆ Comparació de mitjanes

Es va fer servir la prova T per a mostres independents o relacionades.

◆ Comparació de variables qualitatives i quantitatives

Es van utilitzar les proves U de *Mann Whitney* i *Kruskal-Wallis*, proves no paramètriques per a la comparació de dues o més mitjanes respectivament.

◆ Selecció del punt de tall de l'Índex de la Telomerasa

Per a determinar el punt de tall de l'índex de la telomerasa va ser utilitzat el test χ^2 màxim (111-113). Considerant així aquesta variable com a qualitativa en dues categories: $IT \leq 0.85$ i $IT > 0.85$.

◆ Selecció del punt de tall per a la ràtio de la longitud del telòmer

Aquest punt de tall es va determinar fent servir la classificació i les tècniques de classificació i regressió en arbre (CART). Convertint aquesta variable en qualitativa en dues categories. $RLT \leq 1$ i > 1 .

◆ Correlacions entre les variables quantitatives

Per a la realització de les correlacions es va fer servir la regressió lineal i per als gràfics es va utilitzar una dispersió simple.

◆ Estudis de supervivència

La probabilitat de supervivència lliure de malaltia i supervivència global per a cada grup va ser calculada utilitzant el mètode de *Kaplan-Meier* i comparat usant el *log-rank test*.

La selecció dels factors que eren vàlids per a la regressió de *Cox* (anàlisi multivariant) es va realitzar de la següent manera: amb tots els factors que van mostrar significació en les proves de *Kaplan-Meier* (anàlisis univariants) es va realitzar una correlació bivariada de *Pearson* per saber els factors que estaven relacionats entre ells (la p dels quals era significativa) ja que dels que estaven relacionats entre ells únicament un podia ser utilitzat en la regressió de *Cox*. D'entre tots els factors que estaven relacionats entre ells, només es va seleccionar per a l'anàlisi multivariant aquell que presentava una millor significació en l'anàlisi univariant.

◆ Test de sensibilitat i especificitat

El valor predictiu dels factors pronòstics estudiats es va determinar mitjançant les anàlisis de sensibilitat i d'especificitat (114).

IV. RESULTATS

1. ACTIVITAT DE LA TELOMERASA

1.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

A continuació es mostren els resultats que s'obtenen de determinar l'activitat de la telomerasa mitjançant un seqüenciador de DNA (figura 19).

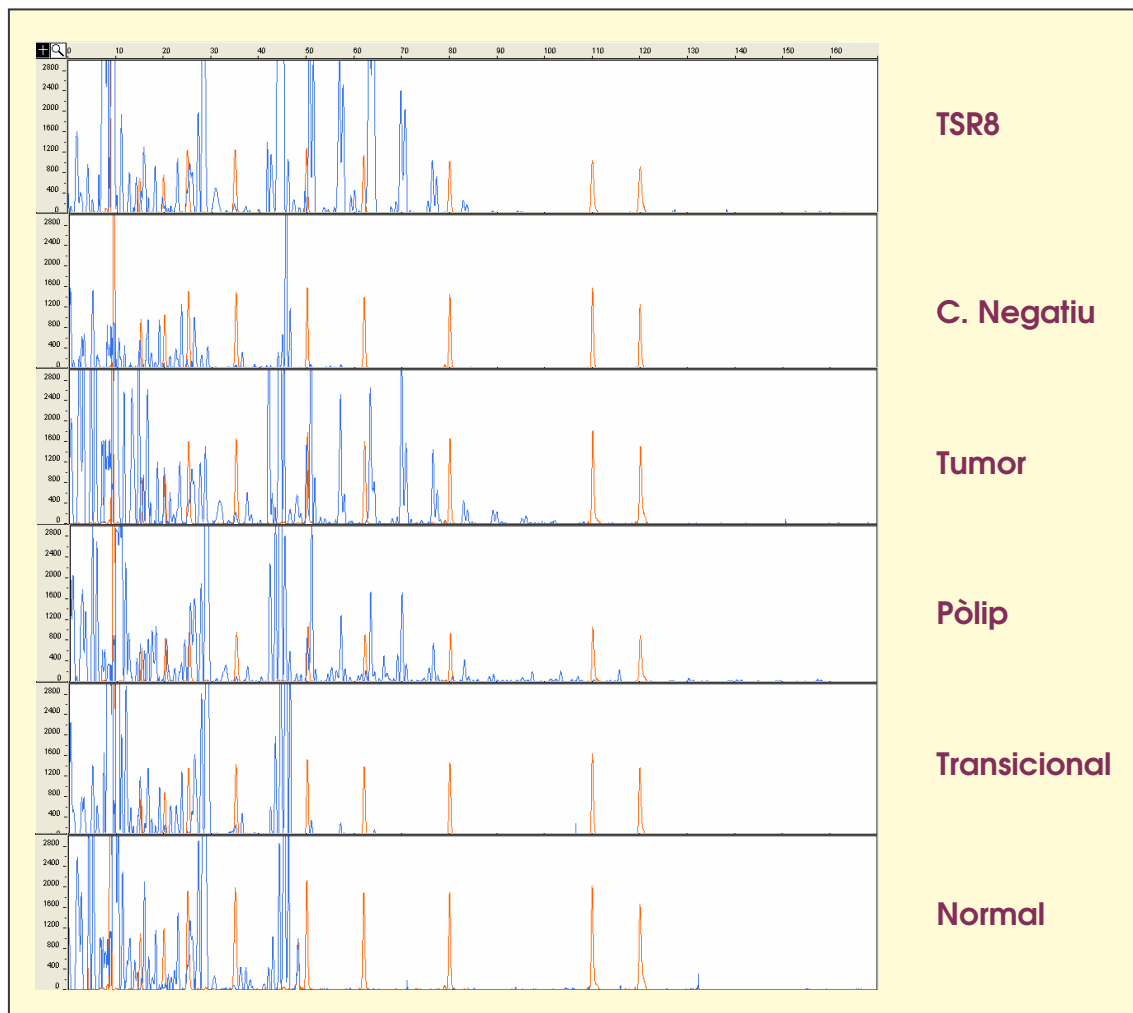


Figura 19. Imatges del seqüenciador de DNA. El pic de 36 pb és el control intern. Els productes d'extensió de la telomerasa són extensions de 6 nucleòtids (50, 56, 62, 68 pb...). El marcador de pes molecular està representat en vermell i les mostres en blau. TSR8 és el control positiu.

Les característiques dels 108 pacients en els quals es va determinar l'AT són descrites en la taula 2, la mitjana d'edat dels quals era 70.22 anys (rang 45-89 anys). L'activitat de la telomerasa va ser detectada en 81.5% (88/108) de les mostres tumorals, en 54% (58/108) de les mostres transicionals, i en 53% (57/108) de les mostres normals, aquests resultats són representats gràficament en la figura 20.

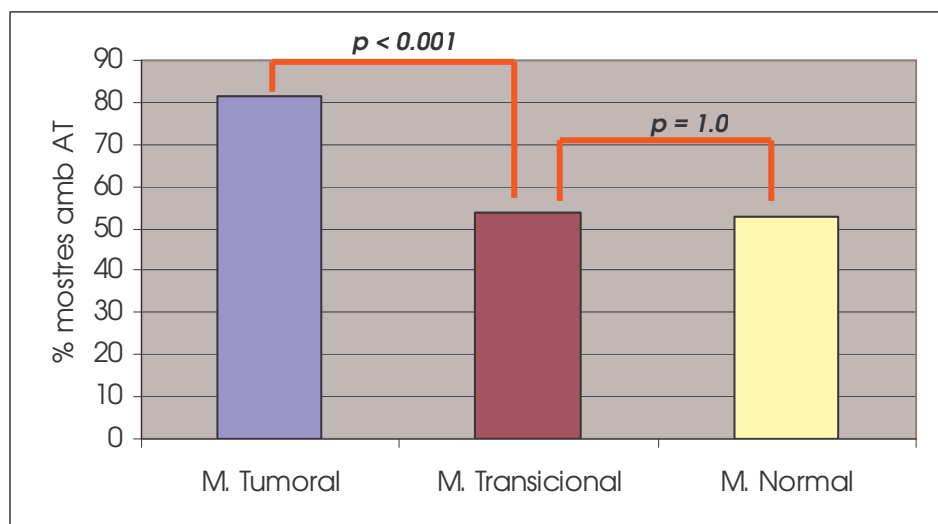


Figura 20. Percentatge de mostres telomerasa positives en cada una de les mucoses estudiades.

La mitjana de l'AT en la mucosa tumoral va ser 11.49 TPG (*Total Product Generated*); en la mucosa transicional va ser 1.51 TPG; i en la mucosa normal 1.09 TPG. L'anàlisi estadístic de les mitjanes va mostrar diferències significatives entre l'AT de la mucosa tumoral i la transicional, i entre la mucosa tumoral i la normal ($p < 0.001$ en ambdós casos). No hi va haver diferències significatives entre l'AT de la mucosa normal i la mucosa transicional ($p = 0.320$; figura 21). La mitjana de l'índex de la telomerasa va ser de 0.524.

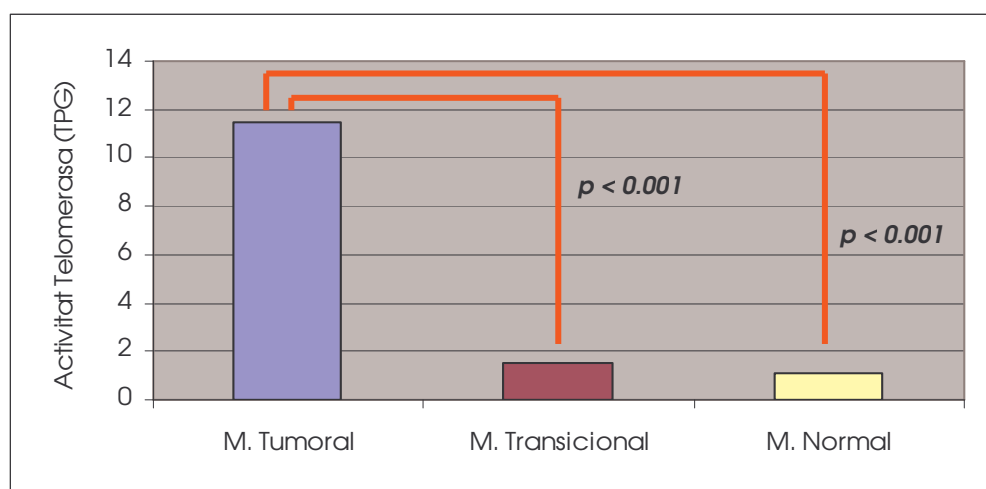


Figura 21. Mitjana de l'activitat de la telomerasa en les diferents mucoses.

1.2. ASSOCIACIÓ DE L'ACTIVITAT DE LA TELOMERASA AMB LES CARACTERÍSTIQUES ANATOMOPATOLÒGIQUES

No es va trobar relació de l'AT en les mucoses tumoral, transicional o normal ni amb les variables clíniques (sexe i edat) ni amb les anatomopatològiques (tipus histològic, localització del tumor, aspecte macroscòpic, grau de

diferenciació, classificació Dukes, nivell d'invasió en la paret (classificació T), invasió de nòduls limfàtics (classificació N), metàstasis a distància (classificació M) i estadi TNM) (taula 2).

VARIABLE	Nº (%)	AT tumor	p	AT trans	p	AT normal	p	IT	P
SEXE									
Homes	59 (55)	11.76		1.96		1.52		0.53	
Dones	49 (45)	11.17	0.816	0.96	0.692	0.58	0.866	0.52	0.915
EDAT									
≤ 70	49 (45)	14.13		2.19		1.27		0.64	
> 70	59 (55)	9.29	0.166	0.94	0.479	0.94	0.438	0.43	0.064
LOCALITZACIÓ TUMOR									
Còlon dret	37 (34)	12.81		0.60		1.08		0.41	
Còlon esquerre	28 (26)	11.40		2.33		1.82		0.53	
Recte	43 (40)	10.40	0.388	1.75	0.364	0.63	0.146	0.61	0.281
TIPUS HISTOLÒGIC									
Adenocarcinoma	97 (90)	12.65		1.54		1.18		0.54	
Mucinós	11 (10)	3.86	0.205	1.26	0.416	0.28	0.328	0.35	0.457
ASPECTE MACRÒS.									
Ulceroinfiltrant	57 (53)	9.36		1.70		1.65		0.44	
Vegetant	44 (41)	14.93		1.40		0.51		0.63	
Polipoide	7 (6)	7.18	0.637	0.59	0.999	0.20	0.444	0.52	0.314
GRAU DIFERENCIACIÓ									
Ben diferenciat	5 (5)	15.31		0.52		0.03		0.80	
Moderadament	87 (80)	12.22		1.66		1.29		0.51	
Pobrament	16 (15)	6.27	0.881	0.95	0.224	0.32	0.113	0.48	0.705
DUKES									
A	1 (1)	2.62		0		1.1		0.18	
B	63 (58)	10.24		1.95		0.95		0.49	
C	31 (29)	9.68		0.98		1.49		0.50	
D	13 (12)	22.51	0.809	0.72	0.754	0.83	0.424	0.78	0.727
CLASSIFICACIÓ T									
Tis	2 (2)	2.41		0.73		0.92		0.17	
T2	22 (20)	9.13		3.37		0.79		0.48	
T3	77 (71)	12.35		1.00		1.25		0.53	
T4	7 (7)	12.00	0.660	1.34	0.822	0.26	0.922	0.69	0.653
CLASSIFICACIÓ N									
Negativa	66 (61)	10.51		1.88		1.01		0.5	
Positiva	42 (39)	13.03	0.723	0.92	0.593	1.21	0.652	0.56	0.830
CLASSIFICACIÓ M									
M0	95 (88)	9.98		1.61		1.13		0.49	
M1	13 (12)	22.50	0.376	0.72	0.735	0.83	0.777	0.78	0.256
ESTADI TNM									
0	2 (2)	2.41		0.74		0.92		0.17	
I	20 (18)	9.5		3.43		0.80		0.48	
II	42 (39)	10.79		1.26		1.00		0.50	
III	31 (29)	9.67		0.98		1.50		0.50	
IV	13 (12)	22.50	0.871	0.72	0.940	0.83	0.442	0.78	0.810

Taula 2. Relació entre l'activitat de la telomerasa (AT) i l'índex de la telomerasa (IT) amb les variables clinicopatològiques.

Es va poder observar que el grup de pacients més jove mostrava una activitat més elevada (encara que no significativa) en totes les mucoses que el grup d'edat més avançada. Els tumors de tipus adenocarcinoma van presentar una activitat lleugerament superior als de tipus mucinós en totes les mucoses. Els pacients amb

tumors vegetants, ben diferenciats, T3+T4, nòduls positius i M1 també van presentar una activitat superior en la mucosa tumoral (sense significació estadística).

No es va trobar relació significativa entre l'IT i les característiques clínico-patològiques estudiades; tot i que es va observar que l'edat mostrava una diferència gairebé significativa ($p = 0.064$; taula 2) entre l'IT i els dos grups d'edat, essent els pacients més joves els que mostraven un IT més elevat, és a dir, una activitat neta del tumor superior (taula 2). Es va observar un augment de l'IT a mesura que s'avançava en els estadis de les classificacions de Dukes, T i l'estadi TNM, és a dir, l'activitat neta de la telomerasa augmentava al passar d'un estadi al següent.

VARIABLE	Nº pacients	IT BAIX (≤ 0.85)	(%)	IT ALT (> 0.85)	(%)	p
SEXE						
Homes	59	40	(68)	19	(32)	0.960
Dones	49	33	(67)	16	(33)	
EDAT						
≤ 70	49	28	(57)	21	(43)	0.034
> 70	59	45	(76)	14	(24)	
LOCALITZACIO TUMOR						
Còlon dret	37	29	(78)	8	(22)	0.156
Còlon esquerre	28	19	(68)	9	(32)	
Recte	43	25	(58)	18	(42)	
TIPUS HISTOLOGIC						
Adenocarcinoma	97	64	(66)	33	(34)	0.498
Mucinós	11	9	(82)	2	(18)	
ASPECTE MACROSCÒPIC						
Ulceró-infiltrant	57	41	(72)	16	(28)	0.518
Vegetant	44	27	(61)	17	(39)	
Polipoide	7	5	(71)	2	(29)	
GRAU DIFERENCIACIÓ						
Ben diferenciat	5	2	(40)	3	(60)	0.402
Moderadament	87	60	(69)	27	(31)	
Pobrament	16	11	(69)	5	(31)	
DUKES						
A	1	1	(100)	0	(0)	0.540
B	63	45	(71.5)	18	(28.5)	
C	31	20	(65)	11	(35)	
D	13	7	(54)	6	(46)	
CLASSIFICACIO T						
Tis	2	2	(100)	0	(0)	0.701
T2	22	15	(68)	7	(32)	
T3	77	52	(68)	25	(32)	
T4	7	4	(57)	3	(43)	
CLASSIFICACIO N						
Negativa	66	47	(71)	19	(29)	0.314
Positiva	42	26	(62)	16	(38)	
CLASSIFICACIÓ M						
M0	95	66	(69)	29	(31)	0.206
M1	13	7	(54)	6	(46)	
ESTADI TNM						
0	2	2	(100)	0	(0)	0.636
I	20	14	(70)	6	(30)	
II	42	30	(71)	12	(29)	
III	31	20	(65)	11	(35)	
IV	13	7	(54)	6	(46)	

Taula 3. Distribució dels pacients segons l'índex de la telomerasa (IT).

Aplicant el test màxim χ^2 ($N = 108$), es va trobar que el punt de tall de l'IT per a la progressió de la malaltia era 0.85, en el qual el χ^2 màxim era: 5.213 ($p = 0.022$). El valor 0.85 de l'IT va ser utilitzat per a classificar els pacients que mostraven un alt índex d'activitat de la telomerasa (> 0.85) i els pacients amb un baix índex (≤ 0.85), i va ser avaluat en relació als factors pronòstic clàssics. La taula 3 mostra la distribució de l'IT classificat com a baix i alt en cada una de les variables clíniques i anatomopatològiques estudiades. De totes les variables examinades, només l'edat ($p = 0.034$; taula 3) va mostrar relació amb la distribució de l'IT. El grup de menor edat mostrava un percentatge de pacients amb IT alt significativament més elevat comparat amb el grup de major edat.

2. LONGITUD DEL TELÒMER

2.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

La longitud dels telòmers va ser mesurada mitjançant un Southern blot, un exemple del qual es mostra en la figura 22.

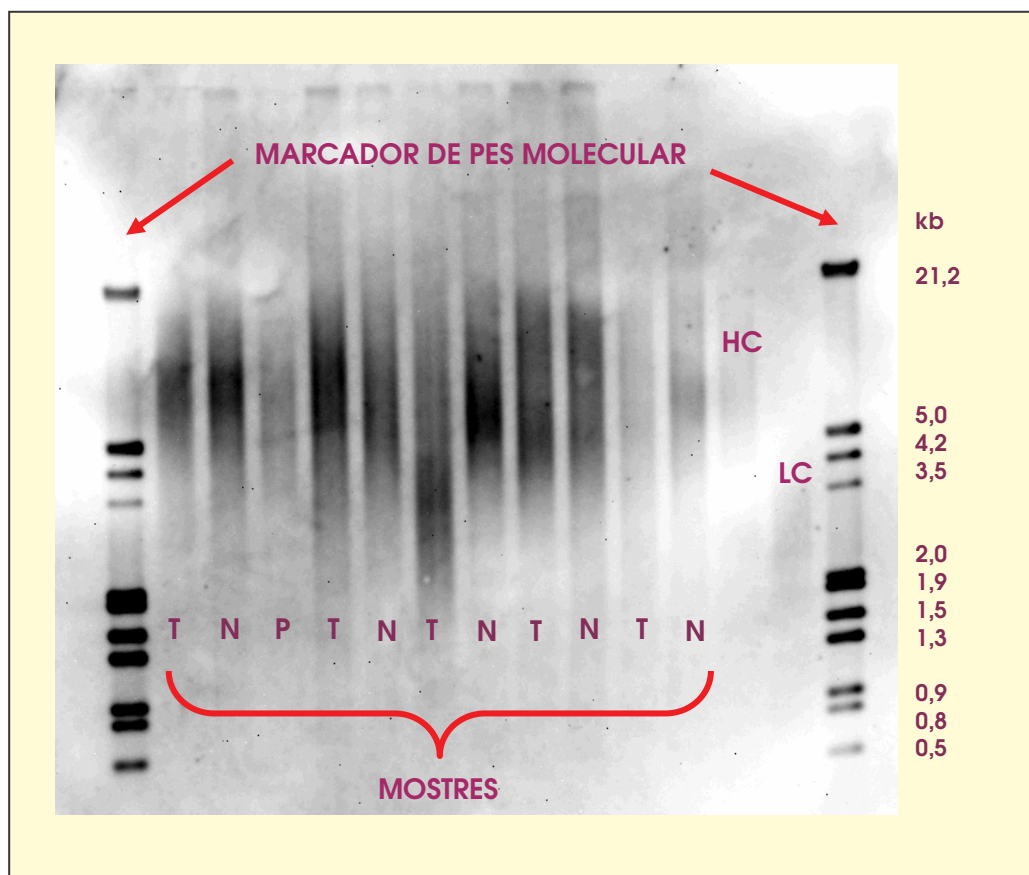


Figura 22. Imatge que s'obté amb el Lumi-Imager producte final del Southern blot. A esquerre i dreta de la imatge hi ha els marcadors de pes molecular, en el centre les mostres (T = mucosa tumoral, P = pòlip, N = mucosa normal) i a la dreta els controls positius (HC: *high control*, LC: *low control*).

La longitud del telòmer va ser possible estudiar-la en 104 dels 108 pacients. Les característiques d'aquests 104 pacients que formen part de l'estudi de la longitud del telòmer es mostren en la taula 4, la mitjana d'edat dels quals va ser 70.25 anys (rang 45-89 anys). La mitjana de la longitud del telòmer en la mucosa tumoral va ser 7.02 Kpb (rang 2.19-13.31 Kpb) i en la mucosa normal va ser 7.85 Kpb (rang 4.20-15.70 Kpb), essent la diferència entre ambdues estadísticament significativa ($p < 0.001$). La mitjana de la ràtio de la longitud del telòmer (RLT) va ser 0.90 (rang 0.35-1.96) (taula 4). En general la mucosa tumoral presentava telòmers significativament més curts que la mucosa normal. La longitud del telòmer en la mucosa transicional no va ser estudiada donat que no es van observar diferències en els nivells d'expressió de la telomerasa.

2.2. ASSOCIACIÓ DE LA LONGITUD DEL TELÒMER AMB LES CARACTERÍSTIQUES ANATOMOPATOLÒGIQUES

Al comparar la longitud del telòmer de la mucosa tumoral, normal i la ràtio de la longitud del telòmer amb les característiques anatomopatològiques estudiades no es van trobar diferències significatives (taula 4). Solament, el tipus histològic del tumor va mostrar una diferència gairebé significativa en la mucosa tumoral, presentant una longitud superior en els tumors de tipus mucinós.

La longitud del telòmer va mostrar diferències significatives entre la mucosa tumoral i la normal de tots els pacients ($n = 104$). Es va estudiar si aquestes diferències existien en cada una de les variables. Es van trobar diferències significatives en la longitud del telòmer entre la mucosa normal i la tumoral respecte al sexe, l'edat, la localització del tumor, l'aspecte macroscòpic i la classificació N. En el grau de diferenciació del tumor aquestes diferències existien només en els tumors moderadament diferenciats. En el tipus histològic del tumor només els adenocarcinomes presentaven diferències significatives. En la classificació de Dukes les diferències significatives només es van observar en l'estadi B. Les diferències també van ser significatives en els pacients amb tumors T2 i T3 però inexistents en els que presentaven tumors Tis o T4. Únicament els estadis I i II de la classificació TNM mostraven diferències significatives entre ambdues mucoses. Els pacients M0 van presentar diferències significatives entre la longitud d'ambdues mucoses però no la van presentar els M1 (taula 4).

VARIABLE	Nº	(%)	M. TUMORAL	M. NORMAL	p	RLT
PACIENTS	104	100	7.02 (2.19-13.31)	7.85 (4.20-15.70)	0.000	0.90 (0.35-1.96)
SEXE						
Homes	57	55	6.94 (2.29-12.02)	7.92 (4.20-15.70)	0.000	0.88 (0.39-1.46)
Dones	47	45	7.12 (2.19-13.31)	7.77 (4.35-11.88)	0.019	0.93 (0.35-1.96)
p			0.604	0.615		0.439
EDAT						
≤ 70	48	46	6.99 (2.19-11.27)	7.95 (4.35-12.60)	0.001	0.89 (0.35-1.60)
> 70	56	54	7.05 (3.22-13.31)	7.77 (4.20-15.70)	0.005	0.91 (0.39-1.96)
p			0.720	0.487		0.562
LOCALITZACIÓ TUMOR						
Còlon dret	36	35	6.75 (3.18-11.74)	7.41 (4.83-11.88)	0.044	0.93 (0.39-1.96)
Còlon esquerre	27	26	6.76 (2.19-13.31)	7.85 (4.50-10.87)	0.001	0.84 (0.35-1.23)
Recte	41	39	7.43 (4.42-12.02)	8.24 (4.20-15.70)	0.017	0.92 (0.52-1.60)
p			0.343	0.175		0.568
TIPUS HISTOLÒGIC						
Adenocarcinoma	93	89	6.91 (2.19-13.31)	7.83 (4.20-15.70)	0.000	0.89 (0.35-1.96)
Mucinós	11	11	7.93 (3.18-10.67)	8.01 (5.05-11.04)	0.885	1.01 (0.60-1.46)
p			0.067	0.669		0.161
ASPECTE MACROSCÒPIC						
Ulceró-infiltrant	56	54	6.99 (2.29-11.74)	7.84 (4.20-15.70)	0.001	0.90 (0.39-1.96)
Vegetant	42	40	7.15 (2.19-13.31)	7.89 (4.35-12.60)	0.031	0.91 (0.35-1.60)
Polipoide	6	6	6.42 (4.50-9.05)	7.74 (5.51-10.92)	0.037	0.83 (0.62-1.00)
p			0.747	0.882		0.817
GRAU DIFERENCIACIÓ						
Ben diferenciat	4	4	6.94 (5.14-9.39)	8.03 (6.82-9.29)	0.177	0.85 (0.67-1.01)
Moderadament	84	81	6.99 (2.19-13.31)	7.84 (4.35-15.70)	0.000	0.93 (0.35-1.96)
Pobrament diferenciat	16	15	7.22 (3.18-10.67)	7.87 (4.20-11.04)	0.213	0.92 (0.57-1.46)
p			0.798	0.867		0.769
DUKES						
A	1	1	5.54	8.04	-	0.69
B	60	58	6.91 (2.19-13.31)	7.97 (4.50-15.70)	0.000	0.86 (0.35-1.41)
C	31	30	7.42 (3.22-11.42)	7.78 (4.20-11.02)	0.257	0.97 (0.39-1.96)
D	12	11	6.68 (4.20-9.90)	7.24 (4.35-9.90)	0.280	0.95 (0.58-1.48)
p			0.512	0.825		0.240
CLASSIFICACIÓ T						
Tis	2	2	6.07 (5.54-6.60)	10.32 (8.04-12.60)	0.249	0.60 (0.52-0.69)
T2	19	18	7.07 (3.81-11.74)	8.09 (5.51-15.70)	0.008	0.88 (0.62-1.20)
T3	76	73	7.10 (2.19-13.31)	7.81 (4.20-11.04)	0.002	0.91 (0.35-1.96)
T4	7	7	6.25 (2.29-10.40)	6.90 (4.50-9.03)	0.442	0.89 (0.51-1.30)
p			0.771	0.603		0.969
CLASSIFICACIÓ N						
Negativa	62	60	6.89 (2.19-13.31)	7.92 (4.50-15.70)	0.000	0.87 (0.35-1.46)
Positiva	42	40	7.21 (3.22-11.42)	7.74 (4.20-11.02)	0.081	0.95 (0.39-1.96)
p			0.404	0.830		0.145
CLASSIFICACIÓ M						
M0	92	88	7.06 (2.19-13.31)	7.93 (4.20-15.70)	0.000	0.89 (0.35-1.96)
M1	12	12	6.78 (4.20-9.90)	7.24 (4.35-9.90)	0.280	0.95 (0.58-1.48)
p			0.607	0.407		0.576
ESTADI TNM						
0	2	2	6.08 (5.54-6.60)	10.32 (8.04-12.60)	0.249	0.60 (0.52-0.69)
I	17	16	7.03 (3.81-11.74)	8.16 (6.09-15.70)	0.008	0.87 (0.62-1.20)
II	42	40	6.87 (2.19-13.31)	7.78 (4.50-11.04)	0.002	0.87 (0.35-1.41)
III	31	30	7.42 (3.22-11.42)	7.85 (4.20-11.02)	0.257	0.97 (0.39-1.96)
IV	12	12	6.38 (4.20-9.90)	7.24 (4.35-9.90)	0.280	0.95 (0.58-1.48)
p			0.691	0.560		0.181

Taula 4. Relació entre la longitud del telòmer en les mucoses tumoral i normal i la ràtio de la longitud del telòmer (RLT) amb les característiques anatomopatològiques.

2.3. COMPORTAMENT DELS TELÒMERS

La comparació de mostres aparellades tumoral-normal de tots els pacients va mostrar el següent comportament dels telòmers, el 35% dels carcinomes escurçaven els seus telòmers, el 10% els allargaven i en el 55% restant no variaven (figura 23). Es va considerar que els telòmers s'escurçaven quan la longitud del telòmer en el teixit tumoral estava per sota del 80% de la longitud del telòmer de la mucosa normal i que s'allargava quan estava per sobre del 120%, les mostres que estaven entre el 80 i el 120% eren les que mantenien una longitud similar entre ambdues mucoses per tant es va considerar que la longitud no variava.

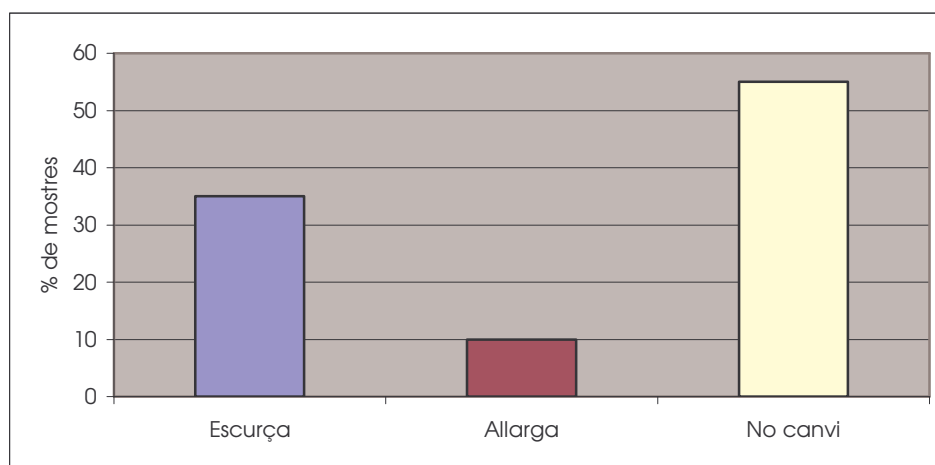


Figura 23. Comportament dels telòmers en els 104 pacients en els quals es va analitzar la longitud del telòmer.

La distribució del comportament del telòmer en les diferents variables es mostra en la taula 5. No es van trobar diferències en el comportament del telòmer en cap de les característiques clinicopatològiques estudiades.

VARIABLE	Nº PACIENTS (%)				p
	Nº Total	Escurça	Allarga	No canvi	
SEXE					
Homes	57	21 (37)	6 (10)	30 (53)	0.865
Dones	47	15 (32)	5 (11)	27 (57)	
EDAT					
≤ 70	48	17 (35.5)	6 (12.5)	25 (52)	0.799
> 70	56	19 (34)	5 (9)	32 (57)	
LOCALITZACIÓ TUMOR					
Còlon dret	36	13 (36)	4 (11)	19 (53)	0.965
Còlon esquerre	27	10 (37)	2 (7)	15 (56)	
Recte	41	13 (32)	5 (12)	23 (56)	
TIPUS HISTOLÒGIC					
Adenocarcinoma	93	34 (36)	9 (10)	50 (54)	0.405
Mucinós	11	2 (18)	2 (18)	7 (64)	
ASPECTE MACROSCÒPIC					
Ulceró-infiltrant	56	20 (36)	5 (9)	31 (55)	0.814
Vegetant	42	14 (33)	6 (14)	22 (53)	
Polipoide	6	2 (33)	0 (0)	4 (67)	
GRAU DIFERENCIACIÓ					
Ben diferenciat	4	2 (50)	0 (0)	2 (50)	0.934
Moderadament diferenciat	84	29 (34)	9 (11)	46 (55)	
Pobrament diferenciat	16	5 (31)	2 (13)	9 (56)	
DUKES					
A	1	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0.326
B	60	24 (40)	5 (8)	31 (52)	
C	31	6 (19)	4 (13)	21 (68)	
D	12	5 (42)	2 (16)	5 (42)	
CLASSIFICACIÓ T					
Tis	2	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0.322
T2	19	6 (32)	1 (5)	12 (63)	
T3	76	26 (34)	8 (11)	42 (55)	
T4	7	2 (28.5)	2 (28.5)	3 (43)	
CLASSIFICACIÓ N					
Negativa	62	25 (40)	6 (10)	31 (50)	0.331
Positiva	42	11 (26)	5 (12)	26 (62)	
CLASSIFICACIÓ M					
M0	92	31 (34)	9 (10)	52 (56)	0.578
M1	12	5 (42)	2 (16)	5 (42)	
ESTADI TNM					
0	2	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0.344
I	17	6 (35)	1 (6)	10 (59)	
II	42	17 (40)	4 (10)	21 (50)	
III	31	6 (19)	4 (13)	21 (68)	
IV	12	5 (42)	2 (16)	5 (42)	

Taula 5. Comportament dels telòmers segons les característiques anatomopatològiques del tumor.

Es van calcular les mitjanes de la longitud del telòmer en la mucosa tumoral i normal en cada un dels grups de comportament dels telòmers. La mitjana de la longitud del telòmer en la mucosa tumoral va ser 5.23 Kpb en els tumors que escurçaven els telòmers, 9.66 Kpb en els que els allargaven i 7.65 Kpb en els que no els variaven, essent la diferència entre totes les mitjanes estadísticament significativa ($p < 0.001$; taula 6). Mentre la longitud dels telòmers en la mucosa normal va ser de 7.93 Kpb en el grup de tumors que escurçaven els telòmers, 6.95 Kpb en el grup que els allargaven, i 7.98 Kpb en el grup que no els variaven, sense que aquestes diferències fossin significatives. També es va analitzar si les diferències entre la longitud del telòmer de la mucosa tumoral i normal dins de cada grup de comportament eren

estadísticament significatives. Els resultats obtinguts van ser que tots tres grups mostraven una diferència significativa entre la longitud d'ambdues mucoses a pesar que en el 55% dels casos es va considerar que no hi havia un canvi en la longitud del telòmer (taula 6). Aquests resultats es representen en la figura 24.

COMPORTAMENT TELÒMERS	Nº pacients	%	LT M. TUMORAL	LT M. NORMAL	p
Esturçça	36	35	5.23 (rang 2.19-10.30)	7.93 (rang 4.50-15.70)	0.000
Allarga	11	10	9.66 (rang 6.46-13.30)	6.95 (rang 4.35-10.80)	0.000
No canvi	57	55	7.65 (rang 4.20-12.02)	7.98 (rang 4.20-11.88)	0.002
p			0.000	0.327	

Taula 6. Relació entre la longitud del telòmer i el comportament d'aquest en la mucosa tumoral i la normal.

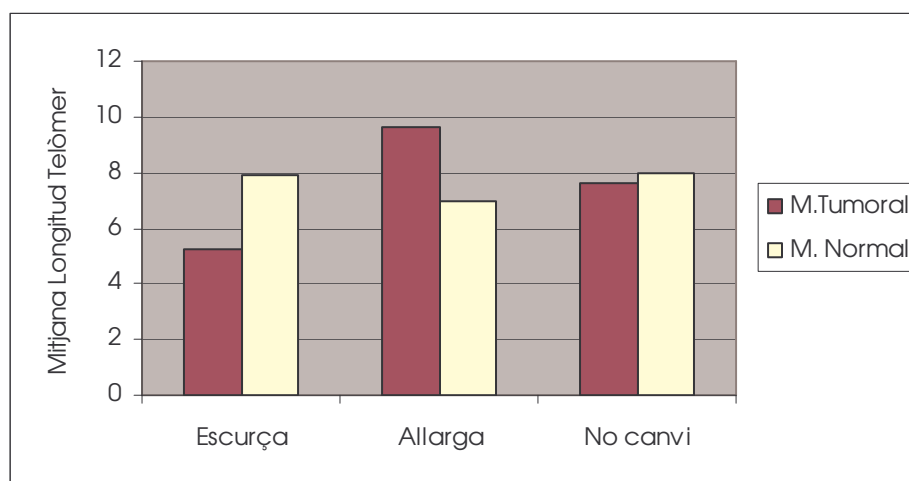


Figura 24. Representació de les mitjanes de la longitud del telòmer en la mucosa tumoral i normal segons el comportament dels telòmers.

2.4. CORRELACIÓ DE LA LONGITUD DEL TELÒMER AMB ALTRES VARIABLES

L'anàlisi de la longitud del telòmer del teixit tumoral i normal dels 104 pacients va mostrar una correlació significativa entre ambdues mucoses ($r^2 = 0.362$, $p < 0.001$; figura 25). Es va estudiar si existia correlació entre la longitud del telòmer en la mucosa tumoral i l'edat dels pacients ($r^2 = 0.000$, $p = 0.839$; figura 26) i també es va analitzar si existia alguna correlació entre la LT en la mucosa normal i l'edat ($r^2 = 0.000$, $p = 0.854$; figura 27), i es va observar que en cap de les dues mucoses existia una correlació entre la LT i l'edat.

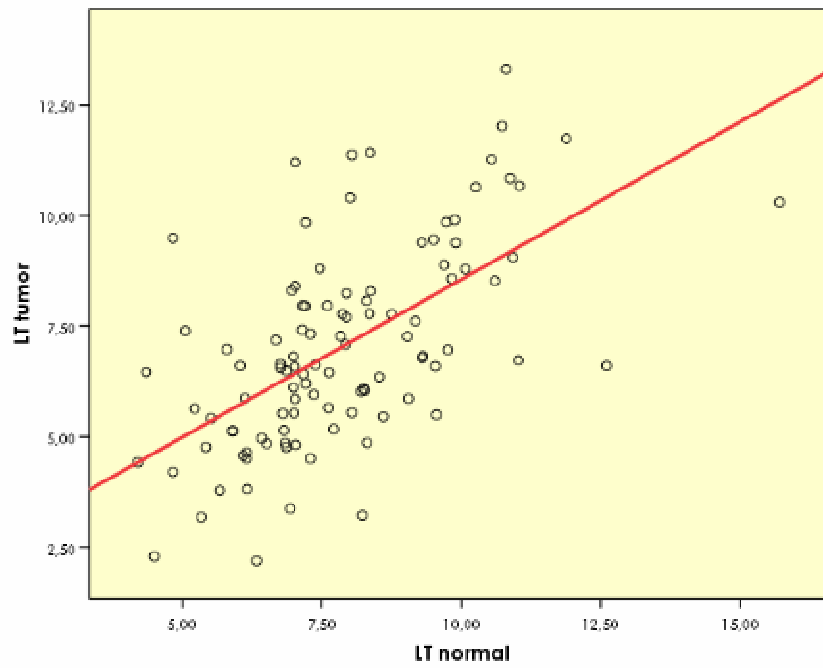


Figura 25. Correlació de la longitud del telòmer entre la mucosa tumoral i la normal.

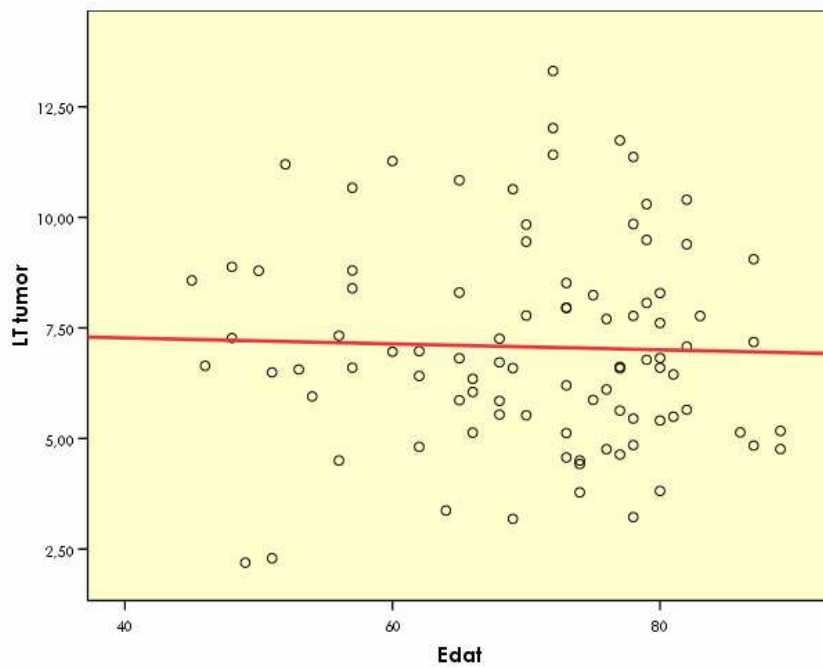


Figura 26. Correlació de la longitud del telòmer entre la mucosa tumoral i l'edat.

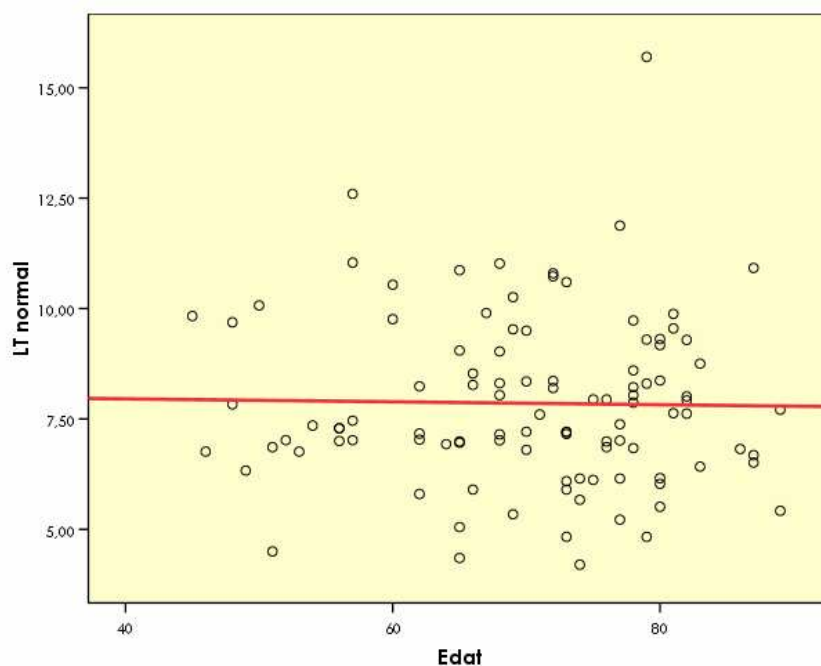


Figura 27. Correlació de la longitud del telòmer entre la mucosa normal i l'edat.

3. RELACIÓ ENTRE L'ACTIVITAT DE LA TELOMERASA I LA LONGITUD DEL TELÒMER

En un total de 104 pacients es van poder determinar ambdós paràmetres, l'activitat de la telomerasa i la longitud del telòmer. La mitjana de la longitud del telòmer en les mostres tumorals telomerasa positives (n = 84) va ser de 6.86 Kpb mentre que la mitjana en les mostres tumorals telomerasa negatives (n = 20) va ser de 7.71 Kpb sense que la diferència entre elles fos significativa (taula 7).

VARIABLE	Nº patients	%	LT tumor
AT (-)	20	19	7.71 (4.57-10.64)
AT (+)	84	81	6.86 (2.19-13.31)
<i>p</i>			0.092

Taula 7. Longitud del telòmer en la mucosa tumoral segons si presentava o no activitat de la telomerasa.

La mitjana de la longitud del telòmer en la mucosa normal era similar en les mostres normals telomerasa positives (n = 51) 7.81 Kpb *versus* 7.89 Kpb de les mostres telomerasa negatives (n = 53; taula 8).

VARIABLE	Nº patients	%	LT normal
AT (-)	53	51	7.89 (4.20-15.70)
AT (+)	51	49	7.81 (4.5-12.60)
<i>p</i>			0.755

Taula 8. Longitud del telòmer en la mucosa normal segons si presentava o no activitat de la telomerasa.

Els telòmers dels tumors telomerasa positius presentaven un patró de comportament significativament ($p = 0.042$) diferent respecte el dels tumors telomerasa negatius (figura 28). Els tumors telomerasa positius mostraven més percentatge d'escurçament que els tumors telomerasa negatius mentre que la majoria de tumors telomerasa negatius mantenien la longitud dels seus telòmers i mostraven escurçament i allargament en percentatges inferiors (taula 9).

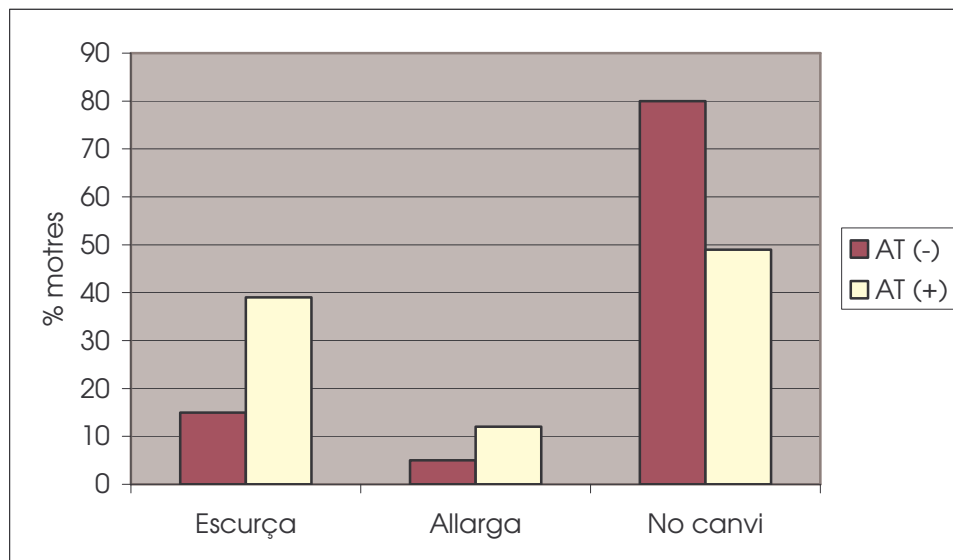


Figura 28. Percentatge de mostres en cada un dels tres tipus de comportament dels telòmers segons si les mostres eren telomerasa positives o negatives.

	COMPORTAMENT TELÒMER		
	Escurça	Allarga	No canvi
Pacients (104)	35% (36)	10% (11)	55% (57)
AT (-) (20)	15% (3)	5% (1)	80% (16)
AT (+) (84)	39% (33)	12% (10)	49% (41)

Taula 9. Comportament que mostraven els telòmers segons si els tumors eren telomerasa positius o negatius.

Al correlacionar l'activitat de la telomerasa de les 104 mostres amb la longitud del telòmer es va observar que no existia relació entre ambdues variables ni en la

mucosa tumoral ni en la normal ($r^2 = 0.000$, $p = 0.839$; $r^2 = 0.000$, $p = 0.854$)(figures 29 i 30 respectivament).

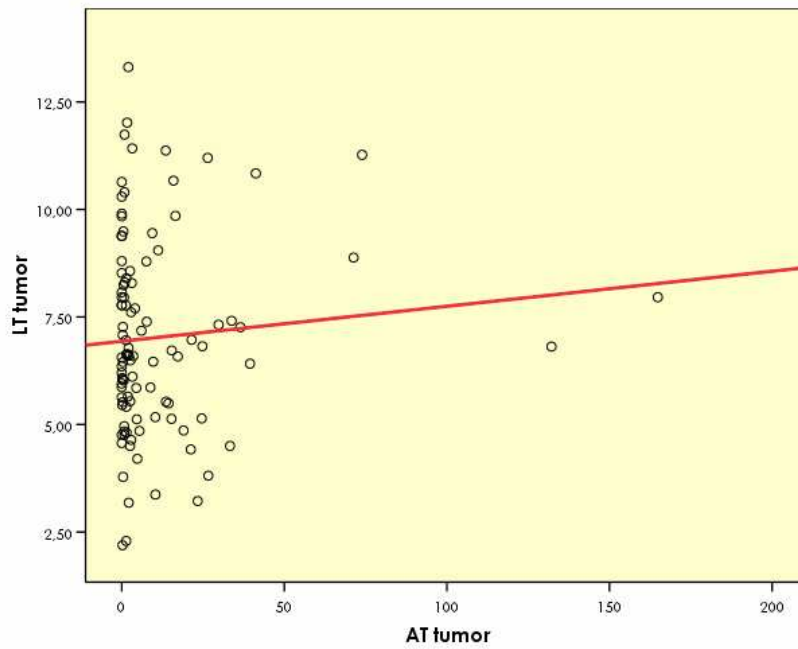


Figura 29. Correlació entre la longitud del telòmer i l'activitat de la telomerasa en la mucosa tumoral.

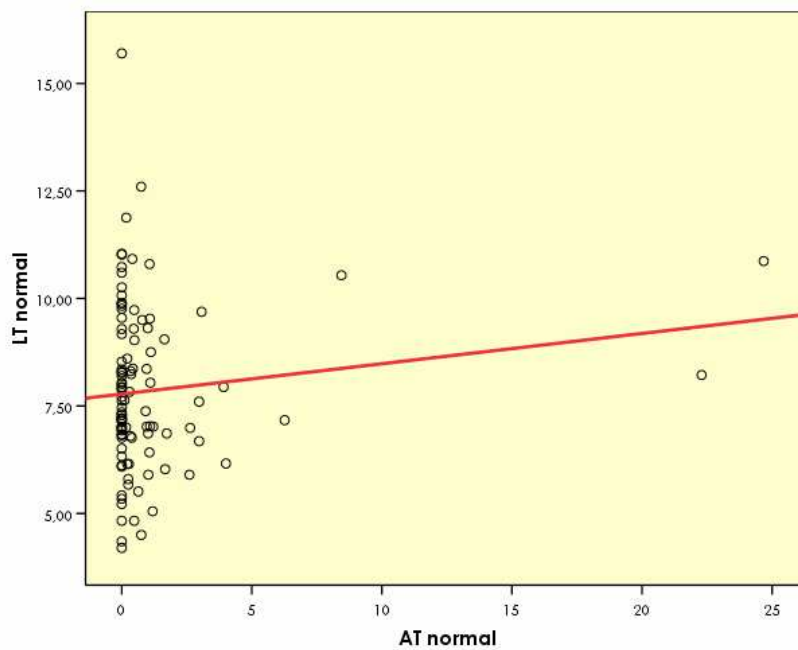


Figura 30. Correlació entre la longitud del telòmer i l'activitat de la telomerasa en la mucosa normal.

En la taula 10 es mostren els resultats de l'estudi de la correlació entre la longitud del telòmer i l'activitat de la telomerasa en mucosa tumoral i també els resultats de correlacionar la RLT (la ràtio de la longitud del telòmer) respecte l'IT (índex de telomerasa). Únicament es va observar una tendència a la significació en la correlació entre l'AT-LT en el grup d'edat més jove.

	Nº Pacients	%	Correlació AT - LT	Correlació IT - RLT
TOTAL PACIENTS	104	(100)	0.685	0.465
SEXE				
Homes	57	(55)	0.341	0.653
Dones	47	(45)	0.847	0.846
EDAT				
≤ 70	48	(46)	0.086	0.175
> 70	56	(54)	0.719	0.426
LOCALITZACIÓ TUMOR				
Còlon dret	36	(35)	0.836	0.760
Còlon esquerre	27	(26)	0.145	0.807
Recte	41	(39)	0.814	0.381
TIPUS HISTOLÒGIC				
Adenocarcinoma	93	(89)	0.346	0.534
Mucinós	11	(11)	0.337	0.830
ASPECTE MACROSCÒPIC				
Ulceró-infiltrant	56	(54)	0.173	0.744
Vegetant	42	(40)	0.944	0.490
Polipoide	6	(6)	0.274	0.546
GRAU DIFERENCIACIÓ				
Ben diferenciat	4	(4)	0.154	0.093
Moderadament	84	(81)	0.267	0.264
Pobrament diferenciat	16	(15)	0.290	0.287
DUKES				
A	1	(1)	-	-
B	60	(58)	0.795	0.997
C	31	(30)	0.207	0.842
D	12	(11)	0.548	0.455
CLASSIFICACIÓ T				
Tis	2	(2)	-	-
T2	19	(18)	0.378	0.873
T3	76	(73)	0.326	0.673
T4	7	(7)	0.892	0.810
CLASSIFICACIÓ N				
Negativa	62	(60)	0.776	0.803
Positiva	42	(40)	0.377	0.873
CLASSIFICACIÓ M				
M0	92	(88)	0.417	0.983
M1	12	(12)	0.548	0.455
ESTADI TNM				
0	2	(2)	-	-
I	17	(16)	0.299	0.813
II	42	(40)	0.600	0.999
III	31	(30)	0.207	0.842
IV	12	(12)	0.548	0.455

Taula 10. Correlació de l'AT amb la LT i l'IT amb l'RLT en les diferents característiques estudiades (els resultats són expressats com a significació (p)).

4. EXPRESSIÓ DEL TRF1

4.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

L'estudi de l'expressió del TRF1 es va realitzar mitjançant Western blot, una imatge d'aquest es mostra en la figura 31.

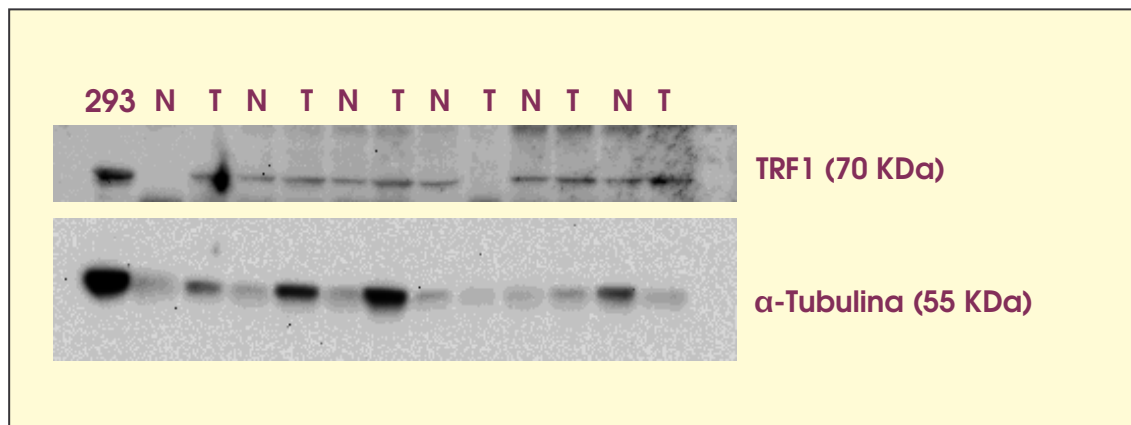


Figura 31. Imatge d'un Western blot (293: línia cel·lular que sobreexpressa TRF1, N = mostra normal, T = mostra tumoral, les quals eren mostres aparellades). Primera fila correspon al TRF1 i la segona a l'alfa-tubulina, proteïna d'expressió constitutiva que s'ha utilitzat com a control intern de cada mostra.

Aquest estudi inclou 83 pacients dels quals es va poder determinar l'activitat de la telomerasa, la longitud del telòmer i l'expressió de la proteïna d'unió al telòmer TRF1. La mitjana d'edat d'aquest pacients era de 69.63 anys (rang, 45-89 anys) i les característiques estudiades es mostren en les taules següents (11-13).

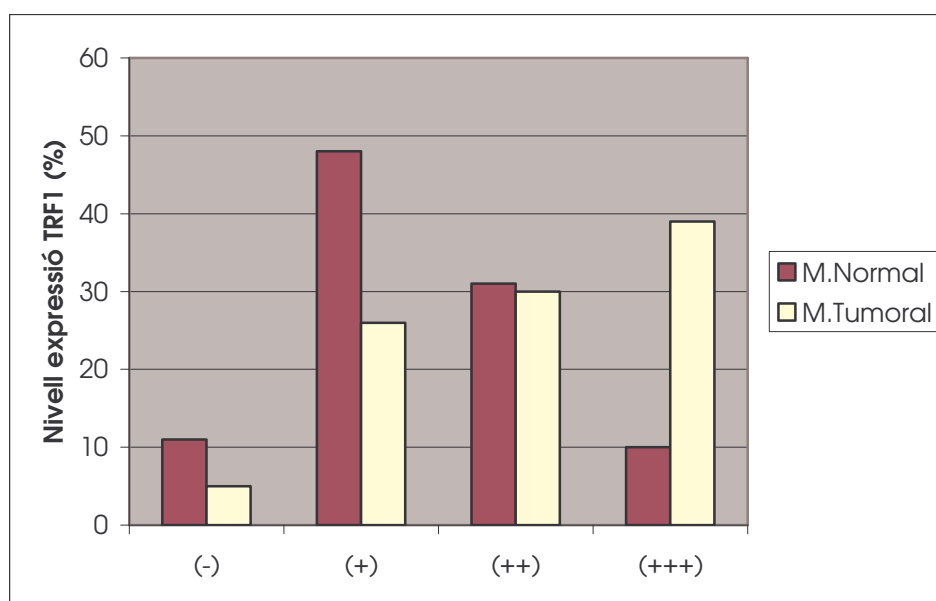


Figura 32. Distribució dels nivells d'expressió del TRF1 en les mucoses normal i tumoral.

Tal i com s'ha esmentat en l'apartat de pacients i mètodes la quantificació de l'expressió del TRF1 es va dur a terme de manera qualitativa classificant-la en quatre categories: absència d'expressió (-), expressió dèbil (+), expressió intermèdia (++), i expressió alta (+++). L'expressió del TRF1 va ser detectada en un 95% de les mostres tumorals i en un 89% de les normals. En la mucosa tumoral es va observar que un 5% dels casos no mostraven expressió, un 26% mostraven expressió dèbil, un 30% intermèdia i un 39% alta. Mentre que en la mucosa normal un 11% no mostraven expressió, un 48% van mostrar expressió dèbil, 31% intermèdia i tant sols un 10% expressió alta (figura 32).

La ràtio entre l'expressió del TRF1 en la mucosa tumoral i normal va ser codificada com (-) quan la mucosa normal mostrava una expressió més elevada que la tumoral, (=) quan ambdues mostraven la mateixa i (+) quan l'expressió era superior en la mucosa tumoral. Així un 11% dels casos presentaven una ràtio (-), un 34% van mostrar una ràtio (=) i el 55% restant (+)(figura 33).

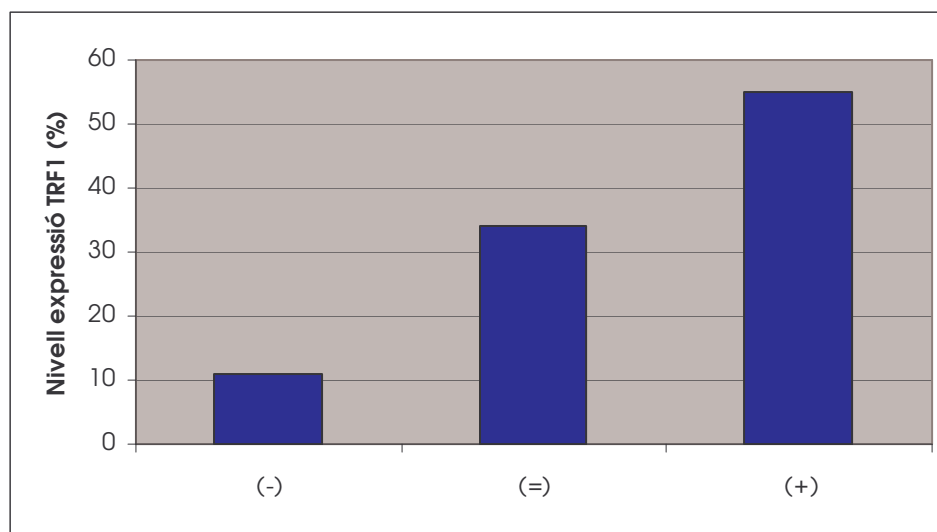


Figura 33. Distribució de la ràtio entre l'expressió del TRF1 en la mucosa tumoral i en la normal.

4.2. ASSOCIACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DEL TRF1 AMB LES CARACTERÍSTIQUES ANATOMOPATOLÒGIQUES

Es va estudiar la relació entre les variables anatomopatològiques i l'expressió del TRF1 segons la distribució en cada un dels grups esmentats anteriorment (taules 11-13). Es va observar una tendència a la significació de l'expressió del TRF1 en la mucosa normal amb el sexe, on les dones mostraven major expressió del TRF1 ($p = 0.061$; taula 11) i amb la ràtio de la longitud del telòmer on els telòmers amb una ràtio superior a 1 van mostrar major expressió del TRF1, sense que aquesta diferència fos significativa

(taula 11). Únicament es va trobar associació significativa entre el grau de diferenciació del tumor i la ràtio del TRF1 ($p = 0,050$; taula 12).

VARIABLE (N°)	TRF1 tumor (%)				TRF1 normal (%)				RÀTIO TRF1 (%)		
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	=	+
PACIENTS (N = 83)	4 (5)	22(26)	25(30)	32(39)	9(11)	40(48)	26(31)	8(10)	9(11)	28(34)	46(55)
SEXE											
Homes (46)	3(7)	15(33)	14(30)	14(30)	7(15)	26(57)	10(22)	3(6)	6(13)	14(30)	26(57)
Dones (37)	1(3)	7(19)	11(30)	18(48)	2(5)	14(38)	16(43)	5(14)	3(8)	14(38)	20(54)
<i>p</i>				0,279				0,061			0,665
EDAT											
≤ 70 (41)	1(2)	8(19)	12(30)	20(49)	3(7)	22(54)	12(29)	4(10)	4(10)	11(27)	26(63)
> 70 (42)	3(7)	14(33)	13(31)	12(29)	6(14)	18(43)	14(33)	4(10)	5(12)	17(40)	20(48)
<i>p</i>				0,198				0,673			0,338
COMPORAMENT TELÒMER											
Escurça (32)	2(6)	13(41)	7(22)	10(31)	6(19)	11(34)	12(38)	3(9)	4(12)	13(41)	15(47)
Allarga (7)	0(0)	3(43)	1(14)	3(43)	0(0)	4(57)	2(29)	1(14)	2(29)	2(29)	3(42)
No canvi (44)	2(4)	6(14)	17(39)	19(43)	3(7)	25(57)	12(27)	4(9)	3(7)	13(29)	28(64)
<i>p</i>				0,151				0,408			0,324
RLT 1											
≤ 1 (63)	4(6)	17(27)	18(29)	24(38)	9(14)	29(46)	21(33)	4(7)	6(9)	20(32)	37(59)
> 1 (20)	0(0)	5(25)	7(35)	8(40)	0(0)	11(55)	5(25)	4(20)	3(15)	8(40)	9(45)
<i>p</i>				0,679				0,094			0,537
IT 0.85											
≤ 0.85 (57)	3(5)	14(25)	17(30)	23(40)	5(9)	26(46)	19(33)	7(12)	6(10)	21(37)	30(53)
> 0.85 (26)	1(4)	8(31)	8(31)	9(34)	4(15)	14(54)	7(27)	1(4)	3(11)	7(27)	16(62)
<i>p</i>				0,921				0,471			0,673

Taula 11. Associació de l'expressió del TRF1 amb les variables clíniques i relacionades amb la longitud del telòmer i l'activitat telomerasa.

VARIABLE (N°)	TRF1 tumor (%)				TRF1 normal (%)				RÀTIO TRF1 (%)		
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	=	+
LOCALITZACIÓ											
Còlon dret (32)	2(6)	8(25)	12(38)	10(31)	3(9)	14(44)	11(34)	4(13)	3(9)	14(44)	15(47)
Còlon esquerre (21)	0(0)	4(19)	6(29)	11(52)	3(14)	12(57)	4(19)	2(10)	2(10)	3(14)	16(76)
Recte (30)	2(7)	10(33)	7(23)	11(37)	3(10)	4(47)	11(37)	2(6)	4(13)	11(37)	15(50)
<i>p</i>				0,554				0,842			0,209
TIPUS HISTOLÒGIC											
Adenocarcinoma(73)	3(4)	20(27)	23(32)	27(37)	9(12)	36(49)	22(30)	6(8)	7(10)	24(33)	42(57)
Mucinos (10)	1(10)	2(20)	2(20)	5(50)	0(0)	4(40)	4(40)	2(20)	2(20)	4(40)	4(40)
<i>p</i>				0,662				0,402			0,473
ASPECTE MACROSCÒPIC											
Ulceroinfiltrant (42)	3(7)	12(29)	14(33)	13(31)	3(7)	19(45)	16(38)	4(10)	6(14)	17(41)	19(45)
Vegetant (36)	1(3)	9(25)	9(25)	17(47)	6(17)	19(53)	7(19)	4(11)	2(5)	10(28)	24(67)
Polipoid (5)	0(0)	1(20)	2(40)	2(40)	0(0)	2(40)	3(60)	0(0)	1(20)	1(20)	3(60)
<i>p</i>				0,789				0,358			0,328
GRAU DIFERENCIACIÓ											
Ben diferenciat (3)	0(0)	1(33)	2(67)	0(0)	0(0)	1(33)	2(67)	3(0)	0(0)	3(100)	0(0)
Moderadament (66)	3(5)	18(27)	19(29)	26(39)	9(14)	33(50)	19(29)	5(7)	7(11)	18(27)	41(62)
Pobrament (14)	1(7)	3(21)	4(29)	2(43)	0(0)	6(43)	5(36)	3(21)	2(14)	7(50)	5(36)
<i>p</i>				0,792				0,359			0,050

Taula 12. Associació de l'expressió del TRF1 amb la localització i característiques anatomopatològiques del tumor.

VARIABLE (Nº)	TRF1 tumor (%)				TRF1 normal (%)				RÀTIO TRF1 (%)		
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	=	+
DUKES											
A (1)	0(0)	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	1(100)	0(0)
B (47)	4(8)	12(26)	14(30)	17(36)	5(11)	21(44)	16(34)	5(11)	7(15)	17(36)	23(49)
C (24)	0(0)	6(26)	9(37)	9(37)	1(4)	15(63)	6(25)	2(8)	2(8)	8(33)	14(59)
D (11)	0(0)	3(27)	2(18)	6(55)	3(27)	3(27)	4(37)	1(9)	0(0)	2(18)	9(82)
<i>p</i>				0.576				0.581			0.354
CLASSIFICACIÓ T											
Tis (2)	0(0)	1(50)	0(0)	1(50)	1(50)	1(50)	0(0)	0(0)	0(0)	1(50)	1(50)
T2 (11)	1(9)	2(18)	3(27)	5(46)	1(9)	4(36)	4(36)	2(19)	1(10)	5(45)	5(45)
T3 (63)	3(5)	17(27)	20(32)	23(36)	6(9)	29(47)	22(35)	6(9)	8(13)	21(33)	34(54)
T4 (7)	0(0)	2(28)	2(28)	3(44)	1(14)	6(86)	0(0)	0(0)	0(0)	1(14)	6(86)
<i>p</i>				0.979				0.324			0.678
CLASSIFICACIÓ N											
Negativa (49)	4(8)	13(36)	14(29)	18(37)	5(10)	22(45)	17(35)	5(10)	7(14)	18(37)	24(49)
Positiva (34)	0(0)	9(27)	11(32)	14(41)	4(12)	18(53)	9(27)	3(8)	2(6)	10(29)	22(65)
<i>p</i>				0.396				0.852			0.283
CLASSIFICACIÓ M											
M0 (72)	4(6)	19(26)	23(32)	26(36)	6(8)	37(51)	22(31)	7(10)	9(13)	26(36)	37(51)
M1 (11)	0(0)	3(27)	2(18)	6(55)	3(27)	3(27)	4(37)	1(9)	0(0)	2(18)	9(82)
<i>p</i>				0.561				0.220			0.144
ESTADI TNM											
0 (2)	0(0)	1(50)	0(0)	1(50)	1(50)	1(50)	0(0)	0(0)	0(0)	1(50)	1(50)
I (11)	1(9)	2(18)	3(27)	5(46)	1(9)	4(36)	4(36)	2(19)	1(10)	5(45)	5(45)
II (35)	3(9)	10(29)	11(31)	11(31)	3(9)	17(48)	12(34)	3(9)	6(17)	12(34)	17(49)
III (24)	0(0)	6(26)	9(37)	9(37)	1(4)	15(63)	6(25)	2(8)	2(8)	8(33)	14(59)
IV (11)	0(0)	3(27)	2(18)	6(55)	3(27)	3(27)	4(37)	1(9)	0(0)	2(18)	9(82)
<i>p</i>				0.857				0.494			0.627

Taula 13. Associació de l'expressió del TRF1 amb les diferents classificacions del tumor.

En l'estudi estadístic anterior no es va trobar associació significativa possiblement a causa del baix nombre de mostres en alguns dels grups, degut a l'elevat grau de fragmentació. Així es va decidir agrupar l'expressió del TRF1 en només dues categories, la primera agrupava els casos que no mostraven expressió del TRF1 i els que mostraven una expressió dèbil (-/+) i la segona categoria englobava els que presentaven una expressió intermèdia i alta (++/+++). Pel que feia referència a la ràtio es va passar de tres grups a dos, fusionant els casos en els que predominava l'expressió en la mucosa normal i els que mostraven igual expressió en ambdues mucoses (-/=) i mantenint el grup que presentaven una expressió més elevada en la mucosa tumoral (+). En la figura 34 es mostra la distribució de l'expressió del TRF1 en ambdues mucoses segons la recodificació de la variable.

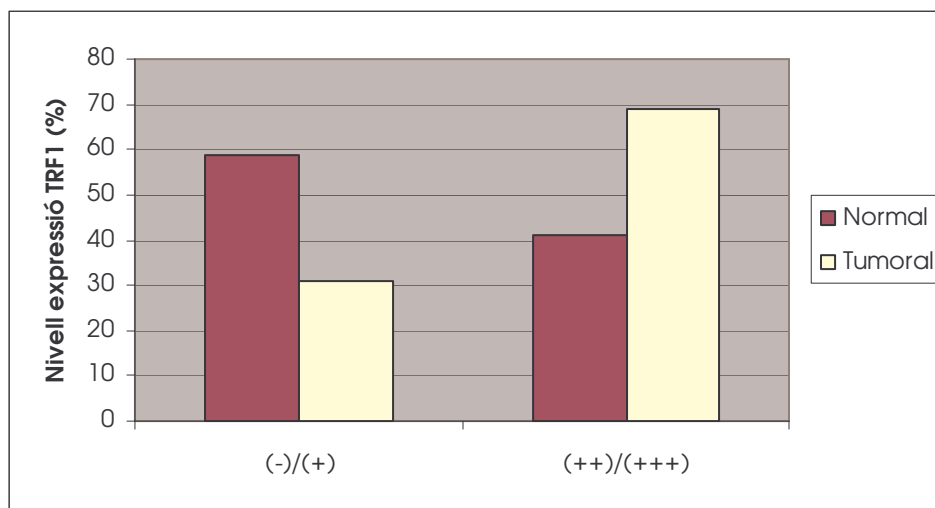


Figura 34. Distribució de les mostres normals i tumorals segons els nivells d'expressió del TRF1, negatiu/dèbil o mig/alt.

VARIABLE (N°)	TRF1 tumor (%)		TRF1 normal (%)		RÀTIO TRF1 (%)	
	-/+	++ /+++	-/+	++/+++	-/=	+
PACIENTS (N = 83)	26 (31)	57 (69)	49 (59)	34 (41)	49 (59)	34 (41)
SEXE						
Homes (46)	18 (39)	28 (61)	33 (72)	13 (28)	20 (43.5)	26 (56.5)
Dones (37)	8 (22)	29 (78)	16 (43)	21 (57)	17 (46)	20 (54)
<i>p</i>		0.087		0.009		0.822
EDAT						
≤ 70 (41)	9 (22)	32 (78)	25 (61)	16 (39)	15 (37)	26 (63)
> 70 (42)	17 (40.5)	25 (59.5)	24 (57)	18 (43)	22 (52)	20 (48)
<i>p</i>		0.069		0.723		0.148
COMPORAMENT TELÒMER						
Escurça (32)	15 (47)	17(53)	17 (53)	15 (47)	17 (53)	15 (47)
Allarga (7)	3 (43)	4 (57)	4 (57)	3 (47)	4 (57)	3(43)
No canvi (44)	8 (18)	36 (82)	28 (64)	16 (36)	16 (36)	28 (64)
<i>p</i>		0.023		0.651		0.273
RLT						
≤ 1 (63)	21(33)	42 (67)	38 (60)	25 (40)	26 (41)	37 (59)
> 1 (20)	5 (25)	15 (75)	11 (55)	9 (45)	11 (55)	9 (45)
<i>p</i>		0.484		0.674		0.282
IT 0.85						
≤ 0.85 (57)	17 (30)	40 (70)	31 (54)	26 (46)	27 (47)	30 (53)
> 0.85 (26)	9 (35)	17 (65)	18 (69)	8 (31)	10 (38.5)	16 (61.5)
<i>p</i>		0.662		0.202		0.449

Taula 14. Associació entre l'expressió del TRF1 (negativa/baixa o intermèdia /alta) i les variables clíniques i les relacionades amb la longitud del telòmer i l'activitat de la telomerasa.

Un cop es va transformar el nivell d'expressió del TRF1 en una variable dicotòmica es van observar algunes associacions significatives o amb tendència a ser-ho. En la mucosa tumoral es va observar una major expressió del TRF1 en les dones sense que la diferència arribés a ser estadísticament significativa. L'edat va mostrar una associació gairebé significativa amb l'expressió del TRF1 en la mucosa tumoral ($p = 0.069$; taula 14), on els pacients més joves mostraven major expressió del TRF1. El comportament dels telòmers va presentar una associació significativa amb l'expressió del TRF1 en la mucosa tumoral, els tumors que no variaven la longitud del seus

telòmers presentaven una major expressió del TRF1 ($p = 0.023$; taula 14). Els homes en la mucosa normal mostraven un percentatge significativament menor de mostres amb nivells d'expressió del TRF1 mig/alt que les dones ($p = 0.009$; taula 14).

VARIABLE (N°)	TRF1 tumor (%)		TRF1 normal (%)		RÀTIO TRF1 (%)	
	- /+	++ /+++	- /+	++ /+++	-/=	+
LOCALITZACIÓ						
Còlon dret (32)	10 (31)	22 (69)	17 (53)	15 (47)	17 (53)	15 (47)
Còlon esquerre (21)	4 (19)	17 (81)	15 (71)	6 (29)	5 (24)	16 (76)
Recte (30)	12 (40)	18 (60)	17 (57)	13 (43)	15 (50)	15 (50)
p		0.284		0.393		0.083
TIPUS HISTOLÒGIC						
Adenocarcinoma (73)	23 (31.5)	50 (68.5)	45 (62)	28 (38)	31 (42.5)	42 (57.5)
Mucinós (10)	3 (30)	7 (70)	4 (40)	6 (60)	6 (60)	4 (40)
p		0.923		0.192		0.295
ASPECTE MACROSCÒPIC						
Ulceroinfiltrant (42)	15 (36)	27 (64)	22 (52)	20 (48)	23 (55)	19 (45)
Vegetant (36)	10 (28)	26 (72)	25 (70)	11 (30)	12 (33)	24 (67)
Polipoid (5)	1 (20)	4 (80)	2 (40)	3 (60)	2(40)	3 (60)
p		0.642		0.209		0.161
GRAU DIFERENCIACIÓ						
Ben diferenciat (3)	1 (33)	2 (67)	1 (33)	2 (67)	3 (100)	0(0)
Moderadament (66)	21 (32)	45 (68)	42 (64)	24 (36)	25 (38)	41 (62)
Pobrament (14)	4 (29)	10 (71)	6 (43)	8 (57)	9 (65)	5 (35)
p		0.969		0.233		0.028

Taula 15. Associació entre l'expressió del TRF1 (negativa/baixa o intermèdia /alta) i la localització i les característiques anatomopatològiques del tumor.

VARIABLE (N°)	TRF1 tumor (%)		TRF1 normal (%)		RÀTIO TRF1 (%)	
	- /+	++ /+++	- /+	++ /+++	-/=	+
DUKES						
A (1)	1 (100)	0(0)	1 (100)	1 (0)	1 (100)	0 (0)
B (47)	16 (34)	31 (66)	26 (55)	21 (45)	24 (51)	23 (49)
C (24)	6 (25)	18(75)	16 (67)	8 (33)	10 (42)	14 (58)
D (11)	3 (27)	8 (73)	6 (54.5)	5 (45.5)	2 (18)	9 (82)
p		0.410		0.652		0.156
CLASSIFICACIÓ T						
Tis (2)	1 (50)	1 (50)	2 (100)	0 (0)	1 (50)	1(50)
T2 (11)	3 (27)	8 (73)	5 (45.5)	6 (54.5)	6 (54.5)	5 (45.5)
T3 (63)	20 (32)	43 (68)	35 (56)	28 (44)	29 (46)	34 (54)
T4 (7)	2 (29)	5 (71)	7 (100)	0 (0)	1 (14)	6 (86)
p		0.932		0.060		0.373
CLASSIFICACIÓ N						
N (-) (49)	17 (35)	32 (65)	27 (55)	22 (45)	25 (51)	24 (49)
N (+) (34)	9 (26.5)	25 (73.5)	22 (65)	12 (35)	12 (35)	22 (65)
p		0.427		0.382		0.156
CLASSIFICACIÓ M						
M0 (72)	23(32)	49 (68)	43 (60)	29 (40)	35 (49)	37 (51)
M1 (11)	3(27)	8 (73)	6 (54.5)	5 (45.5)	2 (18)	9 (82)
p		0.756		0.745		0.059
ESTADI TNM						
0 (2)	1 (50)	1(50)	2 (100)	0(0)	1 (50)	1 (50)
I (11)	3 (27)	8 (73)	5 (45.5)	6 (54.5)	6 (54.5)	4 (45.5)
II (35)	13 (37)	22 (63)	20 (57)	15 (43)	18 (51)	17(49)
III (24)	6 (25)	18 (75)	16 (67)	8 (33)	10(42)	14(58)
IV (11)	3 (27)	8 (73)	6 (54.5)	5 (45.5)	2 (18)	9 (82)
p		0.829		0.567		0.365

Taula 16. Associació entre l'expressió del TRF1 (negativa/baixa o intermèdia/alta) i les classificacions del tumor.

En el còlon esquerre es va observar una majoria de pacients amb la ràtio TRF1 alta, encara que aquesta diferència no va arribar a ser significativa (taula 15). També es va observar una associació entre la ràtio de l'expressió del TRF1 i el grau de diferenciació, on els tumors moderadament diferenciats presentaven major expressió de la ràtio del TRF1 ($p = 0.028$; taula 15).

La classificació T va mostrar una associació gairebé significativa amb l'expressió del TRF1 en la mucosa normal ($p = 0.060$; taula 16). La classificació M va presentar una tendència a la significació amb la ràtio de l'expressió del TRF1 ($p = 0.059$; taula 16).

5. RELACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DEL TRF1 AMB L'ACTIVITAT DE LA TELOMERASA I LA LONGITUD DEL TELÒMER

En la figura 35 s'observa l'expressió del TRF1 en les mostres tumorals segons si aquestes expressaven o no activitat de la telomerasa. De les mostres amb AT negativa ($n = 16$) un 12.5% presentaven expressió del TRF1 negativa/dèbil i el 87.5% restant mostraven expressió intermèdia/alta. De les 67 mostres amb AT (+), un 36% presentaven expressió del TRF1 (negativa/dèbil) i el 64% restant presentava una expressió del TRF1 intermèdia/alta. Aquestes diferències gairebé eren significatives ($p = 0.071$).

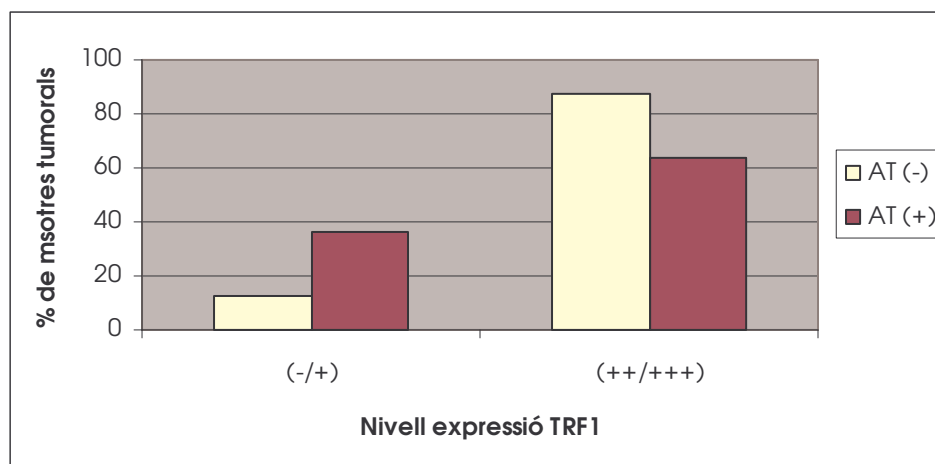


Figura 35. Percentatge de mostres amb expressió del TRF1 (negativa/baixa, intermèdia/alta) segons si expressaven o no activitat de la telomerasa.

El grup amb expressió de TRF1 més elevada també va mostrar uns telòmers més llargs tan en la mucosa tumoral com la normal. També es va calcular l'activitat de la telomerasa, en la mucosa tumoral on el grup amb elevada expressió va mostrar una activitat més elevada que el grup amb baixa o nul·la expressió (sense significació estadística). En la mucosa normal aquest comportament va resultar ser a la inversa (taula 17).

VARIABLE	LT tumor	AT tumor
TRF1 tumor		
-/+ (26)	6.40	9.77
++/+++ (57)	6.94	13.18
<i>p</i>	0.097	0.106
	LT normal	AT normal
TRF1 normal		
-/+ (49)	7.35	1.52
++/+++ (34)	8.41	0.71
<i>p</i>	0.052	0.784

Taula 17. Relació de l'expressió del TRF1 amb la LT i amb l'AT.

Els resultats van revelar que podria existir relació entre la longitud del telòmer i l'expressió del TRF1 tan en la mucosa tumoral com en la mucosa normal (significació gairebé estadística).

Per estudiar la possible relació entre les variables que fan referència a l'activitat de la telomerasa (IT 0.85), la longitud del telòmer (comportament dels telòmers i RLT 1) i l'expressió del TRF1 (expressió del TRF1 en el tumor i la ràtio del TRF1), es van realitzar les següents proves aparellant dues a dues les variables entre elles.

	IT ≤ 0.85	IT > 0.85
ESCURÇA	25	11
ALLARGA	7	4
NO CANVI	40	17
		<i>p</i> = 0.911

Taula 18. Associació entre l'índex de telomerasa i el comportament dels telòmers.

	TRF1 TUMOR -/+	TRF1 TUMOR ++/+++
ESCURÇA	15	17
ALLARGA	3	4
NO CANVI	8	36
		<i>p</i> = 0.023

Taula 19. Associació entre l'expressió del TRF1 en el tumor i el comportament dels telòmers.

	IT ≤ 0.85	IT > 0.85
RLT ≤ 1	54	23
RLT > 1	18	9
		<i>p</i> = 0.737

Taula 20. Associació la ràtio de la longitud del telòmer i entre l'índex de telomerasa.

	IT ≤ 0.85	IT > 0.85
TRF1 TUMOR -/+	17	9
TRF1 TUMOR ++/+++	40	17
		<i>p</i> = 0.662

Taula 21. Associació entre l'expressió del TRF1 en el tumor i l'índex de telomerasa.

	TRF1 TUMOR -/+	TRF1 TUMOR ++/+++	
RLT ≤ 1	21	42	
RLT > 1	5	15	$p = 0.484$

Taula 22. Associació entre la ràtio de la longitud del telòmer i l'expressió del TRF1 en el tumor.

Es va poder observar que existia relació entre algunes de les variables estudiades sobre els telòmers. El comportament dels telòmers (escurça/allarga/ no canvi) no va mostrar associació significativa amb l'índex de la telomerasa (taula18), però sí que va presentar relació amb l'expressió del TRF1 en el tumor ($p = 0.023$; taula19), on la majoria dels tumors que no variaven la longitud dels seus telòmers respecte la mucosa normal mostraven una expressió elevada del TRF1. L'índex de la telomerasa no va mostrar associació ni amb la RLT (taula 20) ni tampoc amb l'expressió del TRF1 en el tumor (taula 21). La ràtio de la longitud del telòmer no va mostrar associació amb l'expressió del TRF1 en el tumor (taula 22).

6. ESTUDI DEL TEMPS LLIURE DE MALALTIA I DE LA SUPERVIVÈNCIA GLOBAL

6.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Els estudis de supervivència es van basar en l'estudi del temps lliure de malaltia i del temps de supervivència global, als 2 i 4 anys. Per aquesta part del treball es van eliminar els pacients amb metàstasi en el moment del diagnòstic ($n = 13$; Dukes D o estadi IV de TNM), per tant, el nombre de pacients es va reduir de 108 a 95. Els estudis de supervivència es van realitzar per una banda, separant els pacients amb càncer de còlon dels de càncer de recte i per l'altra prenent tots els pacients conjuntament. El fet de separar els pacients amb càncer de còlon ($n = 54$) dels de recte ($n = 41$) es va realitzar en base a diferències en els mecanismes de desenvolupament de la neoplàsia com en el comportament que tenen aquests tumors en termes de recidiva i metàstasi.

Les freqüències de recidiva, metàstasi i supervivència als 2 i 4 anys en el còlon, el recte i conjuntament es mostren en la taula 23.

	RECIDIVA		METÀSTASI		PROGRESSIÓ		MORTALITAT	
	2 ANYS	4 ANYS	2 ANYS	4 ANYS	2 ANYS	4 ANYS	2 ANYS	4 ANYS
CÒLON	1(1.8%)	1(1.8%)	5(9.2%)	9 (16.6%)	6(11.1%)	10(18.5%)	13(24%)	16(29.6%)
RECTE	5 (12%)	6(14.6%)	10(24.4%)	14(34.1%)	15(36.5%)	20(48.7%)	12(29.2%)	17(41.4%)
TOTAL	6(6.3%)	7(7.3%)	15(15.7%)	23(24.2%)	21(22.1%)	30(31.5%)	25(26.3%)	33(34.7%)

Taula 23. Freqüències de recidiva, metàstasi, progressió i mortalitat als 2 i 4 anys, en els pacients amb càncer de còlon, de recte i prenent-los conjuntament.

El nombre de progressions de la malaltia als 2 anys era de 21, però representaven 19 pacients, ja que dos d'ells presentaven ambdues coses a la vegada. Als 4 anys va haver-hi 30 progressions que representaven 27 pacients ja que tres d'ells tenien recidiva local i metàstasi. El 100% de les recidives en el còlon van tenir lloc durant els dos primers anys després de la cirurgia, i en el recte les recidives que van aparèixer durant els 2 anys següents a la cirurgia van ser 83.3%. En el còlon als 2 anys apareixien el 55.5% de les metàstasis i en el recte el 71.4%. La taxa de mortalitat als 2 anys en el còlon va ser del 24%, als 4 anys va ser de gairebé un 30%, mentre que en el càncer de recte les taxes eren una mica més elevades, als 2 anys la taxa de mortalitat va ser del 29.2% i als a 4 anys del 41.4% (taula 23).

La mitjana del temps lliure de malaltia en el còlon, en el recte i en general als 2 i 4 anys i la mitjana del temps de supervivència global en el còlon, recte i en general als 2 i 4 anys es mostren en la taula 24. El temps lliure de malaltia tant als 2 anys com als 4 va ser superior en els malalts de còlon i el temps de supervivència global als 2 anys va ser similar en ambdós grups però als 4 anys va ser superior en els pacients amb càncer de còlon.

	TEMPS LLIURE DE MALALTIA		TEMPS DE SUPERVIVÈNCIA GLOBAL	
	2 ANYS	4 ANYS	2 ANYS	4 ANYS
CÒLON	92.38 (15-104)	162.90 (15-208)	95.59 (32-104)	170.31 (32-208)
RECTE	86.56 (20-104)	136.80 (20-208)	92.87 (20-104)	157.21 (20-208)
TOTAL	89.87 (15-104)	151.64 (15-208)	94.98 (20-104)	164.66 (20-208)

Taula 24. Mitjanes del temps lliure de malaltia i de supervivència global en setmanes en el còlon, el recte i prenent-los conjuntament. El temps és expressat en setmanes, entre parèntesis es mostra el rang.

Abans d'iniciar els estudis de supervivència es va realitzar una correlació de Pearson per saber quins dels factors, els quals serien analitzats com a possibles factors pronòstics per a la progressió de la malaltia i la supervivència global, podien estar relacionats entre ells i així interferir en els resultats de la regressió de Cox, prova que determina si els factors estudiats són factors pronòstics independents o no. Els factors que van mostrar estar relacionats entre ells van ser els següents:

Grau de diferenciació ↔ Histologia del tumor

Classificació de Dukes ↔ Classificació T

Classificació de Dukes ↔ Classificació N

Classificació de Dukes ↔ Estadi TNM

Classificació T ↔ Classificació N

Classificació T ↔ Estadi TNM

Classificació N ↔ Estadi TNM

Índex de la telomerasa ↔ IT+RLT

Expressió del TRF1 en el tumor ↔ Ràtio de l'expressió del TRF1

Expressió del TRF1 en el tumor ↔ Comportament dels telòmers

Mortalitat ↔ Estadi TNM

Mortalitat ↔ RLT

6.2. ANÀLISI DEL TEMPS LLIURE DE MALALTIA ALS 2 I 4 ANYS

6.2.1. Pacients amb càncer de còlon

En els 54 pacients amb càncer de còlon, el temps lliure de malaltia als 2 anys únicament va mostrar associació significativa amb la classificació T ($p = 0.020$; figura 36) i als 4 anys amb el comportament dels telòmers ($p = 0.009$; figura 37), els pacients amb tumors que no varien la longitud dels telòmers respecte la mucosa normal mostraven un temps lliure de malaltia significativament superior als que escurçaven o allargaven els seus telòmers (taula 25).

La variable que combina dos dels paràmetres que són objectiu d'aquest estudi, IT+RLT, mostra el mateix comportament en el temps lliure de malaltia als 2 i als 4 anys en els pacients de còlon. Els pacients amb IT alt-RLT baix mostraven un 100% del temps lliure de malaltia, els seguien aquells que tenien IT baix-RLT alt i amb percentatges molt similars els pacients que presentaven IT baix-RLT baix, mentre els que presentaven pitjor pronòstic eren els que tenien ambdós paràmetres alts (aquestes diferències no eren significatives).

VARIABLE	TOTAL (%)	2-anys	p	4-anys	p
SEXE					
Home	23 (43)	87%		78.3%	
Dona	31 (57)	93.5%	0.418	87.1%	0.386
EDAT					
≤ 70	25 (46)	92%		76%	
> 70	29 (54)	89.7%	0.776	89.7%	0.309
TIPUS HISTOLÒGIC					
Adenocarcinoma	48 (89)	89.6%		83.3%	
Mucinós	6 (11)	100%	0.433	83.3%	0.925
ASPECTE MACROSCÒPIC					
Ulcero-infiltrat	30 (55)	83.3%		73.3%	
Vegetant	23 (43)	100%		95.7%	
Polipoide	1 (2)	100%	0.124	100%	0.074
GRAU DIFERENCIACIÓ					
Ben diferenciat	4 (7)	100%		100%	
Moderadament	41 (76)	90.2%		85.4%	
Pobrament	9 (17)	88.9%	0.793	66.7%	0.250
DUKES					
B	35 (65)	94.3%		85.7%	
C	19 (35)	84.2%	0.255	78.9%	0.435
CLASSIFICACIÓ T					
T2	8 (15)	100%		87.5%	
T3	41 (50)	92.7%		85.4%	
T4	5 (35)	60%	0.020	60%	0.218
CLASSIFICACIÓ N					
N (-)	35 (65)	94.3%		85.7%	
N (+)	19 (35)	84.2%	0.255	78.9%	0.435
ESTADI TNM					
I	8 (15)	100%		75%	
II	27 (50)	92.6%		88.9%	
III	19 (35)	84.2%	0.426	78.9%	0.554
IT					
≤ 0.85	42 (78)	90.5%		81%	
> 0.85	12 (22)	91.7%	0.836	91.7%	0.333
RLT					
≤ 1	40 (75)	92.5%		85%	
> 1	13 (25)	84.6%	0.256	76.9%	0.240
IT + RLT					
> 0.85 + ≤ 1	9 (17)	100%		100%	
> 0.85 + > 1	2 (4)	50%		50%	
≤ 0.85 + > 1	11 (21)	90.9%		81.8%	
≤ 0.85 + ≤ 1	31 (58)	90.3%	0.156	80.6%	0.150
COMPORAMENT TELÒMER					
Escurça	19 (36)	84.2%		68.4%	
Allarga	5 (9)	80%		60%	
No canvi	29 (55)	96.6%	0.284	96.6%	0.009
TRF1 M. TUMORAL					
-/+	11 (25)	81.8%		81.8%	
++/+++	33 (75)	90.9%	0.479	78.8%	0.891
RÀTIO TRF1					
-/=	20 (45)	90%		80%	
+	24 (55)	87.5%	0.842	79.2%	0.775

Taula 25. Resultats de l'anàlisi univariant de Kaplan-Meier entre el temps lliure de malaltia i les variables estudiades en els pacients amb càncer de còlon.

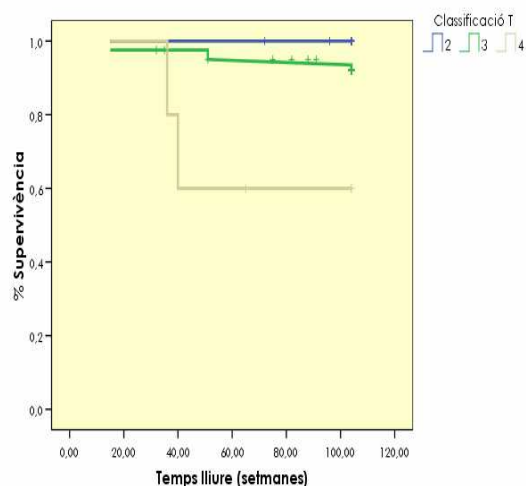


Figura 36. Corbes de supervivència del temps lliure de malaltia als 2 anys en els pacients amb càncer de còlon en funció de la classificació T.

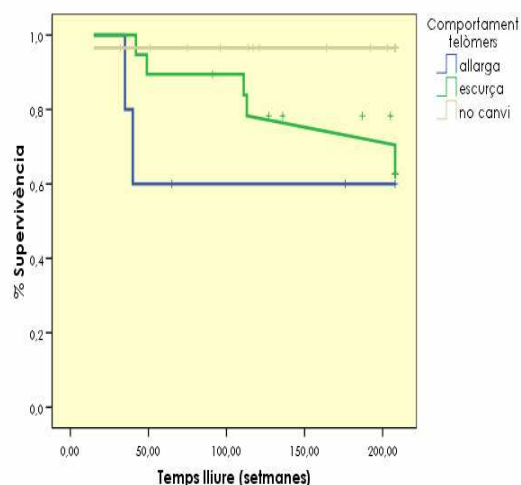


Figura 37. Corbes de supervivència del temps lliure de malaltia als 4 anys en els pacients amb càncer de còlon en funció del comportament dels telòmers.

6.2.2. Pacients amb càncer de recte

En els 41 pacients amb càncer de recte, el temps lliure de malaltia als 2 anys va presentar associació significativa amb la classificació de Dukes ($p = 0.016$; figura 38A), la classificació N ($p = 0.005$; figura 38B), l'estadi TNM ($p = 0.021$; figura 39A), l'IT ($p = 0.023$; figura 39B) on els pacients amb un IT inferior a 0.85 van mostrar un major temps lliure de malaltia que aquells amb un IT superior a 0.85, IT+RLT ($p < 0.001$; figura 40); els pacients amb IT alt-RLT alt eren els que mostraven menor temps lliure de malaltia seguits dels que tenien un IT alt-RLT baix, i continuació amb percentatges similars els pacients amb IT baix-RLT baix i alt. Als 4 anys mantenien l'associació significativa la classificació de Dukes ($p = 0.010$; figura 41A), la classificació N ($p = 0.004$; figura 41B), l'estadi TNM ($p = 0.012$; figura 42A), l'IT+RLT ($p = 0.008$; figura 42B). Mentre als 4 anys l'IT perdia l'associació significativa amb el temps lliure de malaltia (taula 26).

VARIABLE	TOTAL (%)	2-anys	p	4-anys	p
SEXE					
Home	31 (76)	61.3%	0.403	51.6%	0.406
Dona	10 (24)	80%		70%	
EDAT					
≤ 70	17 (41)	70.6%	0.669	58.8%	0.556
> 70	24 (59)	62.5%		54.2%	
TIPUS HISTOLÒGIC					
Adenocarcinoma	38 (93)	65.8%	0.976	55.3%	0.761
Mucinós	3 (7)	66.7%		66.7%	
ASPECTE MACROSCÒPIC					
Ulceroinfiltrat	24 (59)	62.5%	0.734	54.2%	0.948
Vegetant	12 (29)	66.7%		58.3%	
Polipoide	5 (12)	80%		60%	
GRAU DIFERENCIACIÓ					
Ben diferenciat	1 (2)	100%	0.618	100%	0.787
Moderadament	36 (88)	66.7%		55.6%	
Pobrament	4 (10)	50%		50%	
DUKES					
A	2 (5)	100%	0.014	100%	0.010
B	27 (66)	74.1%		63%	
C	12 (29)	41.7%		33.3%	
CLASSIFICACIÓ T					
is	2 (5)	100%	0.151	100%	0.089
T2	14 (34)	78.6%		71.4%	
T3	25 (61)	56%		44%	
CLASSIFICACIÓ N					
Negativa	29 (71)	75.9%	0.005	65.5%	0.004
Positiva	12 (29)	41.7%		33.3%	
ESTADI TNM					
0	2 (5)	100%	0.021	100%	0.012
I	13 (32)	84.6%		76.9%	
II	14 (34)	64.3%		50%	
III	12 (29)	41.7%		33.3%	
IT					
≤ 0.85	24 (59)	75%	0.023	58.3%	0.146
> 0.85	17 (41)	52.9%		52.9%	
RLT					
≤ 1	29 (74)	65.5%	0.617	55.2%	0.698
> 1	10 (26)	60%		50%	
IT + RLT					
> 0.85 + ≤ 1	12 (31)	58.3%	0.000	58.3%	0.008
> 0.85 + > 1	4 (10)	25%		25%	
≤ 0.85 + > 1	6 (15)	83.3%		66.7%	
≤ 0.85 + ≤ 1	17 (44)	70.6%		52.9%	
COMPORAMENT TELÒMER					
Escurça	12 (31)	83.3%	0.250	66.7%	0.552
Allarga	4 (10)	75%		50%	
No canvi	23 (59)	52.2%		47.8%	
TRF1 M.TUMORAL					
-/+	12 (43)	66.7%	0.927	50%	0.615
++/+++	16 (57)	62.5%		56.3%	
RÀTIO TRF1					
-/=	15 (54)	66.7%	0.860	53.3%	0.805
+	13 (46)	61.5%		53.8%	

Taula 26. Resultats de l'anàlisi univariant de Kaplan-Meier entre el temps lliure de malaltia i les variables estudiades en els pacients amb càncer de recte.

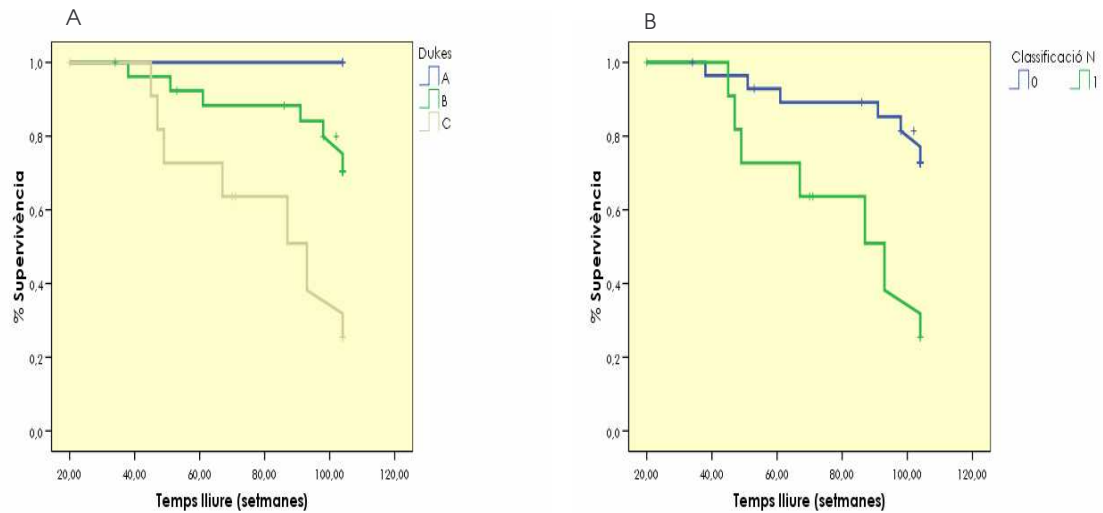


Figura 38. Corbes de supervivència del temps lliure de malaltia als 2 anys en els pacients amb càncer de recte en funció de la classificació de Dukes (A) i de la classificació N (B).

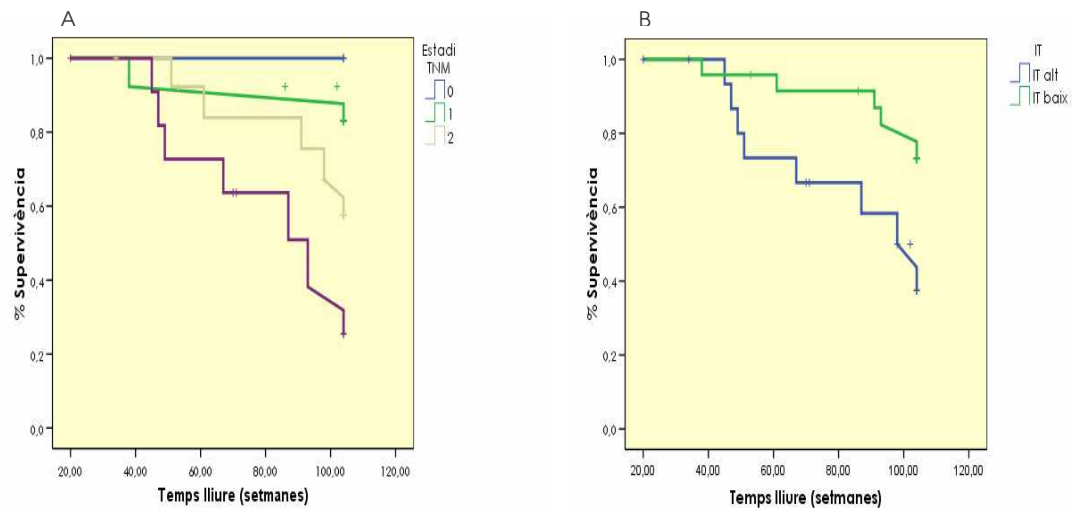


Figura 39. Corbes de supervivència del temps lliure de malaltia als 2 anys en els pacients amb càncer de recte en funció de l'estadi TNM (A) i l'IT (B).

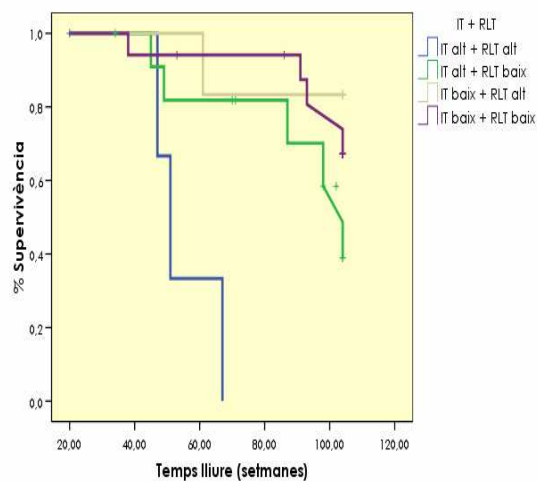


Figura 40. Corbes de supervivència del temps lliure de malaltia als 2 anys en els pacients amb càncer de recte en funció de l'IT+RLT.

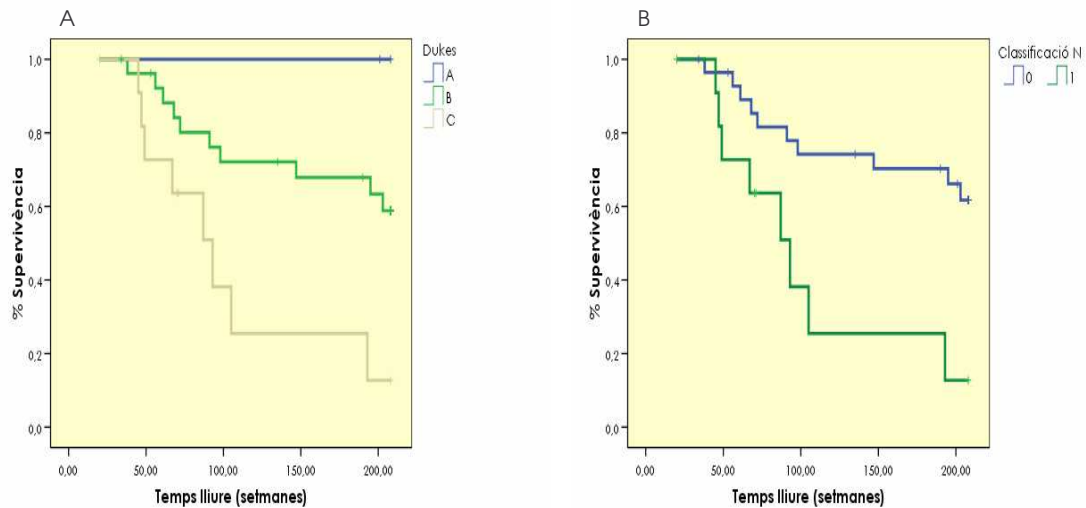


Figura 41. Corbes de supervivència del temps lliure de malaltia als 4 anys en els pacients amb càncer de recte en funció de la classificació de Dukes (A) i de la classificació N (B).

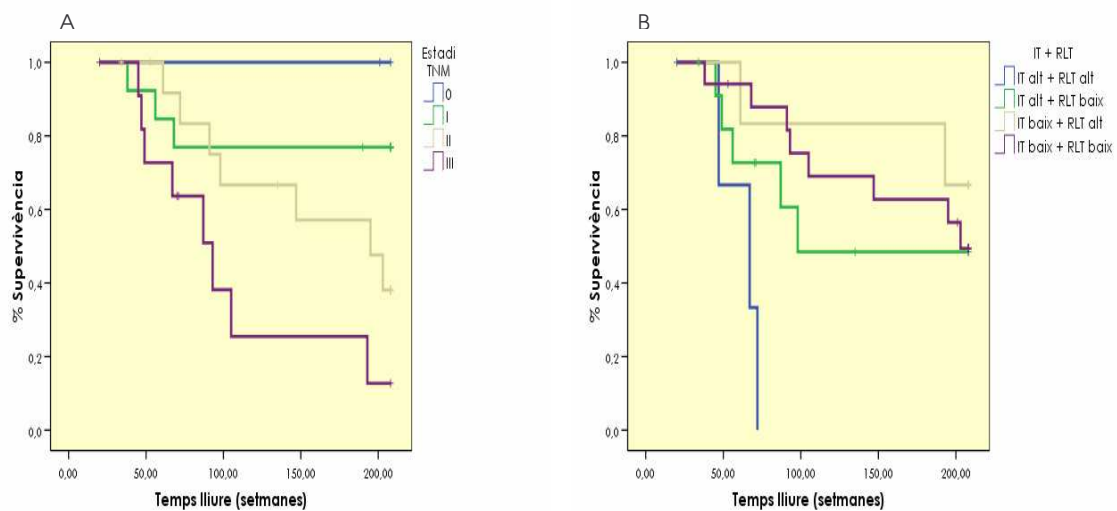


Figura 42. Corbes de supervivència del temps lliure de malaltia als 4 anys en els pacients amb càncer de recte en funció de l'estadi TNM (A) i l'IT+RLT (B).

6.2.3. Pacients amb càncer colorectal

En general, tractant conjuntament els 95 pacients amb càncer colorectal el temps lliure de malaltia va mostrar associació estadísticament significativa amb el sexe ($p = 0.039$; figura 43A), la classificació N ($p = 0.032$; figura 43B), IT+RLT ($p < 0.001$; figura 44). L'IT mostrava una associació pràcticament significativa ($p = 0.052$). Als 4 anys aquestes tres variables continuaven mostrant associació significativa, sexe ($p = 0.040$; figura 45A), classificació N ($p = 0.042$; figura 45B), IT+RLT ($p = 0.002$; figura 46). Les dones van presentar major temps lliure de malaltia als 2 i als 4 anys. Els pacients sense ganglis afectats tenien un major temps lliure de malaltia als 2 i als 4 anys. Els pacients amb IT alt-RLT alt presentaven un temps lliure de malaltia inferior a la resta. L'IT als 4 anys no va mostrar un valor proper a la significació com ho feia als 2 anys (taula 27).

VARIABLE	TOTAL (%)	2-anys	p	4-anys	p
SEXE					
Home	54 (57)	72.2%		63.0%	
Dona	41 (43)	90.2%	0.039	82.9%	0.040
EDAT					
≤ 70	42 (44)	83.3%		69%	
> 70	53 (56)	77.4%	0.506	73.6%	0.994
TIPUS HISTOLÒGIC					
Adenocarcinoma	86 (91)	79.1%		70.9%	
Mucinos	9 (9)	88.9%	0.550	77.8%	0.772
ASPECTE MACROSCÒPIC					
Ulcero-infiltrat	54 (57)	74.1%		64.8%	
Vegetant	35 (37)	88.6%		82.9%	
Polipoide	6 (6)	83.3%	0.224	66.7%	0.127
GRAU DIFERENCIACIÓ					
Ben diferenciat	5 (5)	100%		100%	
Moderadament	77 (81)	79.2%		71.4%	
Pobrament	13 (14)	76.9%	0.549	61.5%	0.353
DUKES					
A	2 (2)	100%		100%	
B	62 (65)	85.5%		75.8%	
C	31 (33)	67.7%	0.090	61.3%	0.101
CLASSIFICACIÓ T					
is	2 (2)	100%		100%	
T2	22 (23)	86.4%		77.3%	
T3	66 (70)	78.8%		69.7%	
T4	5 (5)	60%	0.286	60%	0.488
CLASSIFICACIÓ N					
Negativa	64 (67)	85.9%		76.6%	
Positiva	31 (33)	67.7%	0.032	61.3%	0.042
ESTADI TNM					
0	2 (2)	100%		100%	
I	21 (22)	90.5%		76.2%	
II	41 (43)	82.9%		75.6%	
III	31 (33)	67.7%	0.141	61.3%	0.199
IT					
≤ 0.85	66 (69)	84.8%		72.7%	
> 0.85	29 (31)	69%	0.052	69%	0.473
RLT					
≤ 1	69 (75)	81.2%		72.5%	
> 1	23 (25)	73.9%	0.198	65.2%	0.193
IT + TLR					
> 0.85 + ≤ 1	21 (23)	76.2%		76.2%	
> 0.85 + > 1	6 (7)	33%		33%	
≤ 0.85 + > 1	17 (18)	88.2%		76.5%	
≤ 0.85 + ≤ 1	48 (52)	83.3%	0.000	70.8%	0.002
COMPORAMENT TELÒMER					
Escrutça	31 (34)	83.9%		67.7%	
Allarga	9 (10)	77.8%		55.6%	
No canvi	52 (56)	76.9%	0.655	75%	0.216
TRF1 M. TUMORAL					
-/+	23 (32)	73.9%		65.2%	
++/+++	49 (68)	81.6%	0.432	71.4%	0.467
RÀTIO TRF1					
-/=	35 (49)	80%		68.6%	
+	37 (51)	78.4%	0.868	70.3%	0.537

Taula 27. Resultats de l'anàlisi univariant de Kaplan-Meier entre el temps lliure de malaltia i les variables estudiades en els pacients amb càncer colorectal.

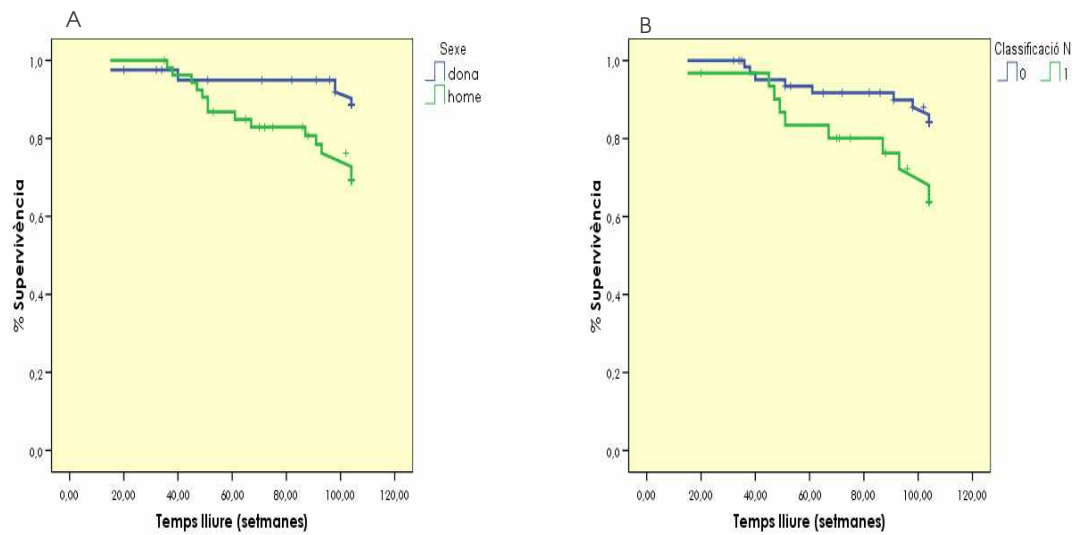


Figura 43. Corbes de supervivència del temps lliure de malaltia als 2 anys en els pacients amb càncer colorectal en funció del sexe (A) i la classificació N (B).

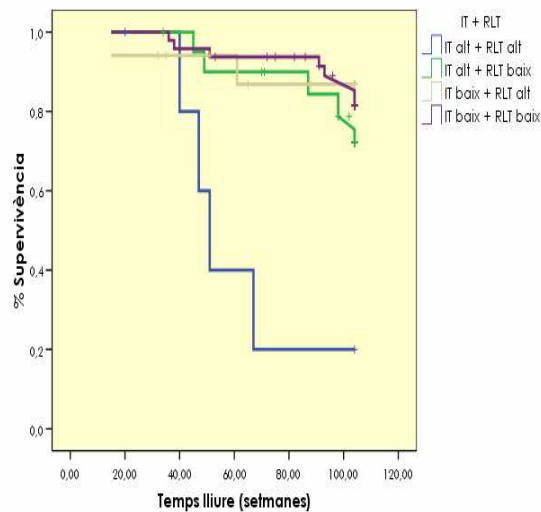


Figura 44. Corbes de supervivència del temps lliure de malaltia als 2 anys en els pacients amb càncer colorectal en funció de l'IT+RLT.

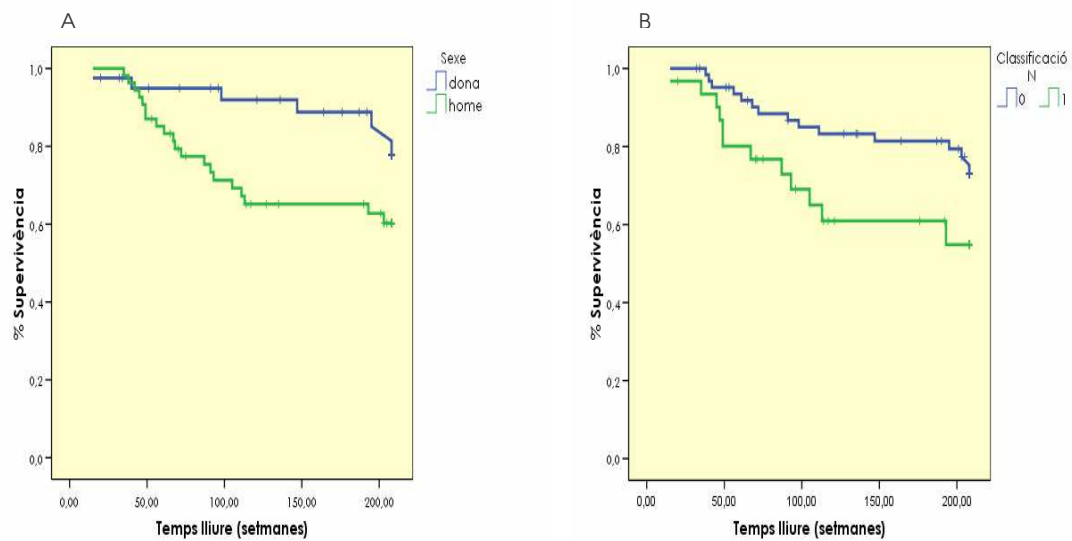


Figura 45. Corbes de supervivència del temps lliure de malaltia als 4 anys en els pacients amb càncer colorectal en funció del sexe (A) i la classificació N (B).

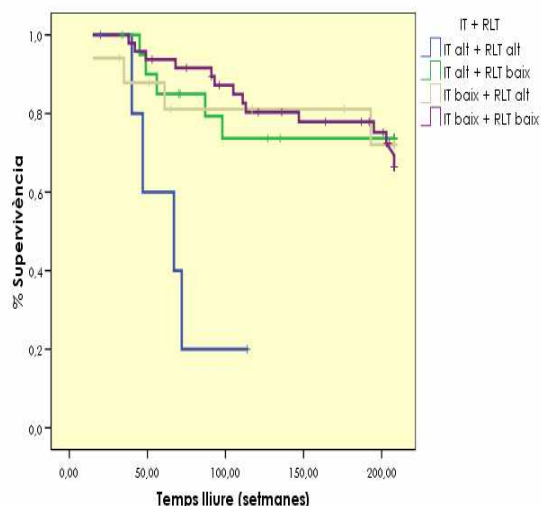


Figura 46. Corbes de supervivència del temps lliure de malaltia als 4 anys en els pacients amb càncer colorectal en funció de l'IT+RLT.

6.3. ANÀLISI DEL TEMPS DE SUPERVIVÈNCIA GLOBAL ALS 2 I 4 ANYS

6.3.1. Pacients amb càncer de còlon

Als 2 anys de seguiment els pacients amb càncer de còlon van presentar una associació significativa del temps de supervivència global amb la ràtio de la longitud del telòmer ($p < 0.001$; figura 47A), l'IT+RLT ($p = 0.001$; figura 47B) i la ràtio del TRF1 ($p = 0.030$; figura 48). El comportament dels telòmers van mostrar una associació gairebé significativa ($p = 0.077$; taula 28). Als 4 anys, les variables que mostraven associació significativa van ser l'edat ($p = 0.034$; figura 49A), la classificació de Dukes ($p = 0.036$; figura 49B), la classificació N ($p = 0.036$; figura 50A), RLT ($p = 0.001$; figura 50B), IT+RLT ($p = 0.001$; figura 51A), la ràtio del TRF1 ($p = 0.047$; figura 51B). Els pacients amb càncer de còlon amb un RLT baix presentaven un temps de supervivència superior, als 2 i als 4 anys. El temps de supervivència en funció de l'IT+RLT va mostrar que els pacients amb càncer de còlon amb major supervivència als 2 i 4 anys eren aquells que presentaven un RLT baix independentment de l'expressió de l'IT.

VARIABLE	TOTAL (%)	2-anys	p	4-anys	p
SEXE					
Home	23 (43)	73.9%		65.2%	
Dona	31 (57)	77.4%	0.821	74.2%	0.530
EDAT					
≤ 70	25 (46)	84%		84%	
> 70	29 (54)	69%	0.173	58.6%	0.034
TIPUS HISTOLÒGIC					
Adenocarcinoma	48 (89)	79.2%		75%	
Mucinós	6 (11)	50%	0.137	33.3%	0.065
ASPECTE MACROSCÒPIC					
Ulcero-infiltrat	30 (55)	73.3%		66.7%	
Vegetant	23 (43)	82.6%		78.3%	
Polipoide	1 (2)	0%	0.190	0%	0.115
GRAU DIFERENCIACIÓ					
Ben diferenciat	4 (7)	75%		75%	
Moderadament	41 (76)	80.5%		75.6%	
Pobrament	9 (17)	55.6%	0.281	44.4%	0.225
DUKES					
B	35 (65)	82.9%		80%	
C	19 (35)	63.2%	0.145	52.6%	0.036
CLASSIFICACIÓ T					
T2	8 (15)	87.5%		87.5%	
T3	41 (76)	75.6%		70.7%	
T4	5 (9)	60%	0.480	40%	0.197
CLASSIFICACIÓ N					
Negativa	35 (78)	82.9%		80%	
Positiva	19 (22)	63.2%	0.145	52.6%	0.036
ESTADI TNM					
I	8 (15)	100%		100%	
II	27 (50)	77.8%		74.1%	
III	19 (35)	63.2%	0.171	52.6%	0.052
IT					
≤ 0.85	42 (78)	73.8%		66.7%	
> 0.85	12 (22)	83.3%	0.464	83.3%	0.274
RLT					
≤ 1	40 (75)	87.5%		80%	
> 1	13 (25)	38.5%	0.000	38.5%	0.001
IT + RLT					
> 0.85 + ≤ 1	9 (17)	100%		100%	
> 0.85 + > 1	2 (4)	0%		0%	
≤ 0.85 + > 1	11 (21)	45.5%		45.5%	
≤ 0.85 + ≤ 1	31 (58)	83.9%	0.001	74.2%	0.001
COMPORAMENT TELÒMER					
Escurça	19 (36)	84.2%		73.7%	
Allarga	5 (9)	40%		40%	
No canvi	29 (55)	75.9%	0.077	72.4%	0.140
TRF1 M. TUMORAL					
-/+	11 (25)	72.7%		63.6%	
++/+++	33 (75)	75.8%	0.801	69.7%	0.609
RÀTIO TRF1					
-/=	20 (45)	60%		55%	
+	24 (55)	87.5%	0.030	79.2%	0.047

Taula 28. . Resultats de l'anàlisi univariant de Kaplan-Meier entre el temps de supervivència global i les variables estudiades en els pacients amb càncer de còlon.

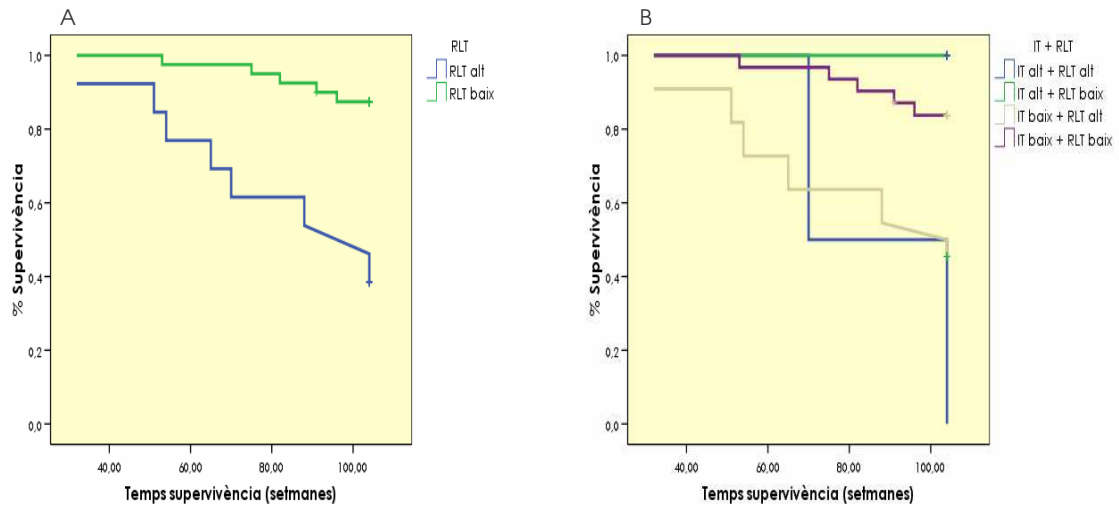


Figura 47. Corbes de supervivència global als 2 anys en els pacients amb càncer de còlon en funció de l'RLT (A) i l'IT+RLT (B).

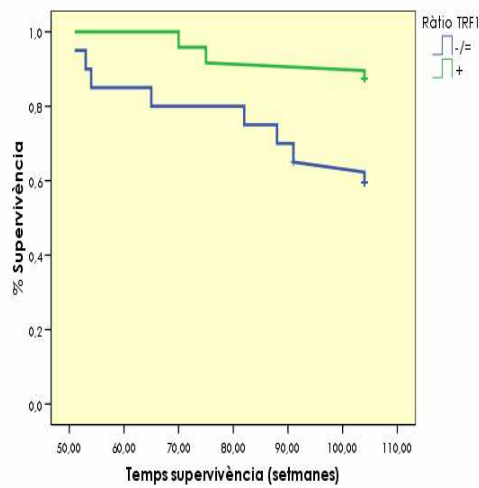


Figura 48. Corbes de supervivència global als 2 anys en els pacients amb càncer de còlon en funció de la ràtio del TRF1.

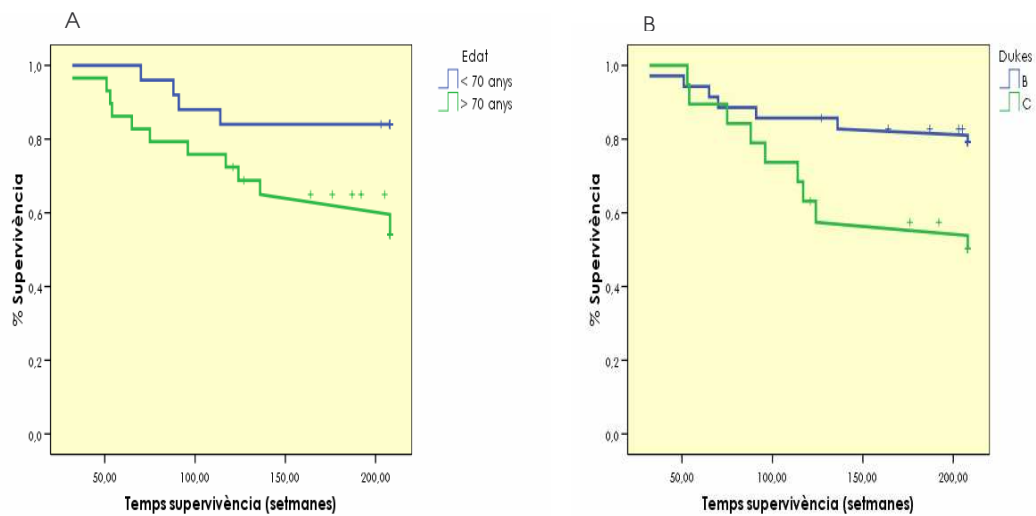


Figura 49. Corbes de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer de còlon en funció de l'edat (A) i la classificació de Dukes (B).

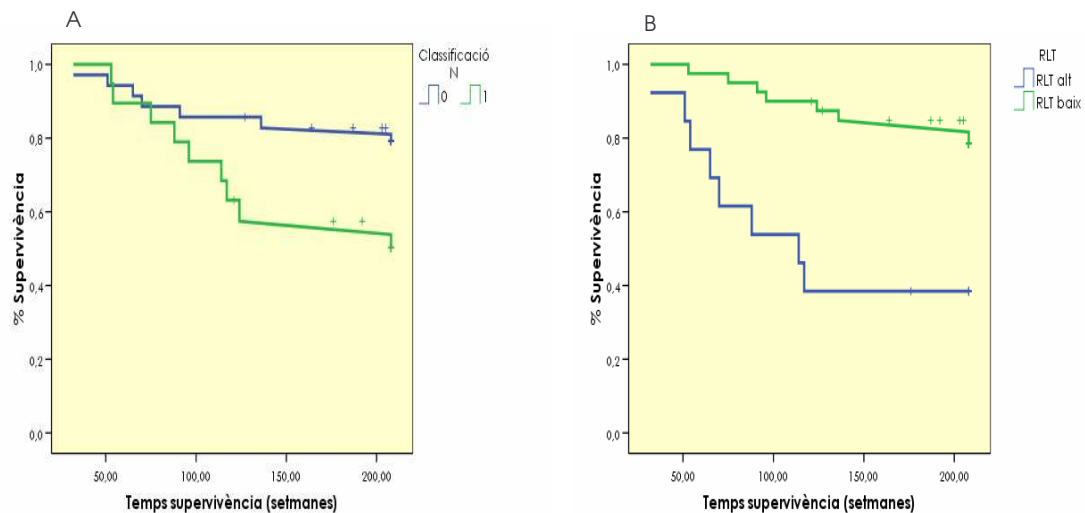


Figura 50. Corbes de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer de còlon en funció de la classificació N (A) i la RLT(B).

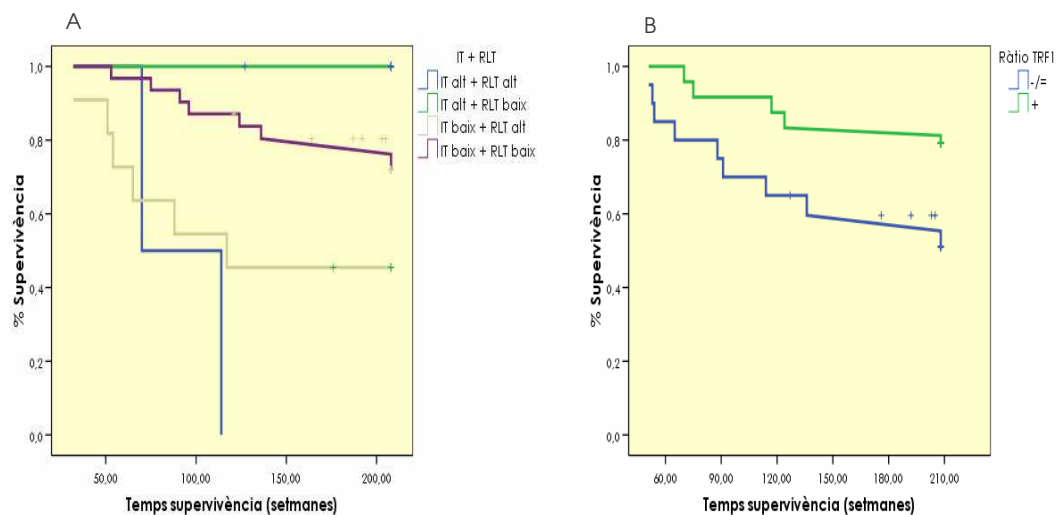


Figura 51. Corbes de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer de còlon en funció de l'IT+RLT (A) i la ràtio del TRF1(B).

6.3.2. Pacients amb càncer de recte

En els pacients amb càncer de recte van mostrar estar relacionades amb el temps de supervivència global als 2 anys el grau de diferenciació ($p = 0.025$), la classificació N ($p = 0.023$; figura 52A), l'IT ($p = 0.011$; figura 52B) i l'IT+RLT ($p < 0.001$; figura 53). El grau de diferenciació tot i que va mostrar una associació significativa pensem que no era fiable degut al baix nombre de pacients en dues de les tres categories. La classificació de Dukes va presentar una associació gairebé significativa ($p = 0.063$; taula 29). Als 4 anys van presentar associació significativa amb el temps de supervivència global el grau de diferenciació ($p = 0.012$), la classificació de Dukes ($p = 0.019$; figura 54A), la classificació N ($p = 0.007$; figura 54B), l'estadi TNM ($p = 0.031$; figura 55A), l'IT ($p = 0.010$; figura 55B) i l'IT+RLT ($p < 0.001$; figura 56). L'edat als 4 anys tendia a la significació ($p = 0.062$; taula 29). Els pacients amb IT baix van mostrar un

major temps de supervivència, als 2 i als 4 anys. Els pacients que presentaven una major supervivència eren aquells que tenien un IT baix independentment de si presentaven RLT alt o baix.

VARIABLE	TOTAL (%)	2-anys	p	4-anys	p
SEXE					
Home	31 (76)	67.7%	0.662	58.1%	0.959
Dona	10 (24)	80%		60%	
EDAT					
≤ 70	17 (41)	82.4%	0.184	76.5%	0.062
> 70	24 (59)	62.5%		45.8%	
TIPUS HISTOLÒGIC					
Adenocarcinoma	38 (93)	71.1%	0.883	60.5%	0.431
Mucinós	3 (7)	66.7%		33.3%	
ASPECTE MACROSCÒPIC					
Ulceroinfiltrat	24 (59)	66.7%	0.554	54.2%	0.791
Vegetant	12 (29)	83.3%		66.7%	
Polipoide	5 (12)	60%		60%	
GRAU DIFERENCIACIÓ					
Ben diferenciat	1 (2)	0%	0.025	0%	0.012
Moderadament	36 (88)	75%		63.9%	
Pobrament	4 (10)	50%		25%	
DUKES					
A	2 (5)	100%	0.063	100%	0.019
B	27 (66)	77.8%		66.7%	
C	12 (29)	50.0%		33.3%	
CLASSIFICACIÓ T					
is	2 (5)	100%	0.337	100%	0.150
T2	14 (34)	78.6%		71.4%	
T3	25 (61)	64%		48%	
CLASSIFICACIÓ N					
Negativa	29 (71)	79.3%	0.023	69%	0.007
Positiva	12 (29)	50%		33%	
ESTADI TNM					
0	2 (5)	100%	0.106	100%	0.031
I	13 (32)	84.6%		76.9%	
II	14 (34)	71.4%		57.1%	
III	12 (29)	50.0%		33.3%	
IT					
≤ 0.85	24 (59)	83.3%	0.011	70.8%	0.010
> 0.85	17 (41)	52.9%		41.2%	
RLT					
≤ 1	29 (74)	72.4%	0.347	55.2%	0.905
> 1	10 (26)	60%		60%	
IT + RLT					
> 0.85 + ≤ 1	12 (31)	58.3%	0.000	41.7%	0.000
> 0.85 + > 1	4 (10)	25%		25%	
≤ 0.85 + > 1	6 (15)	83.3%		83.3%	
≤ 0.85 + ≤ 1	17 (44)	82.4%		64.7%	
COMPORAMENT TELÒMER					
Escurça	12 (31)	75%	0.878	75%	0.340
Allarga	4 (10)	75%		75%	
No canvi	23 (59)	65.2%		43.5%	
TRF1 M. TUMORAL					
-/+	12 (43)	58.3%	0.289	41.7%	0.314
++/+++	16 (57)	75%		56.3%	
RÀTIO TRF1					
-/=	15 (54)	60%	0.255	46.7%	0.556
+	13 (46)	76.9%		53.8%	

Taula 29. Resultats de l'anàlisi univariant de Kaplan-Meier entre el temps de supervivència global i les variables estudiades en els pacients amb càncer de recte.

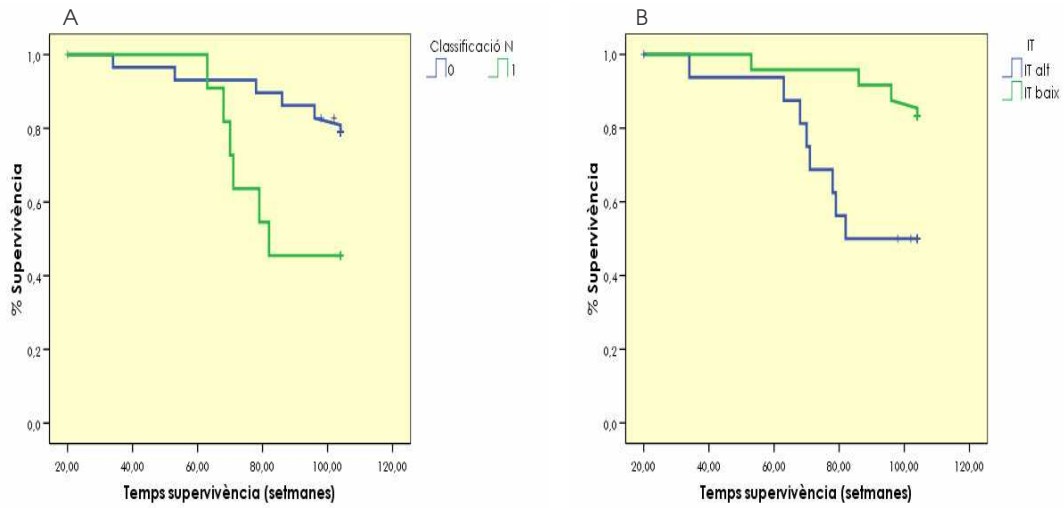


Figura 52. Corbes de supervivència global als 2 anys en els pacients amb càncer de recte en funció de la classificació N (A) i l'IT(B).

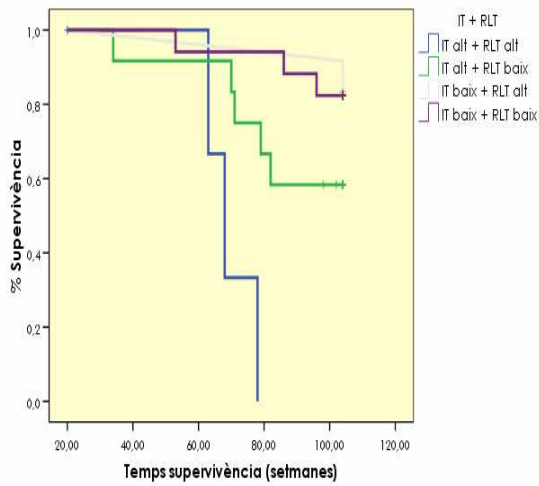


Figura 53. Corbes de supervivència global als 2 anys en els pacients amb càncer de recte en funció de l'IT+RLT.

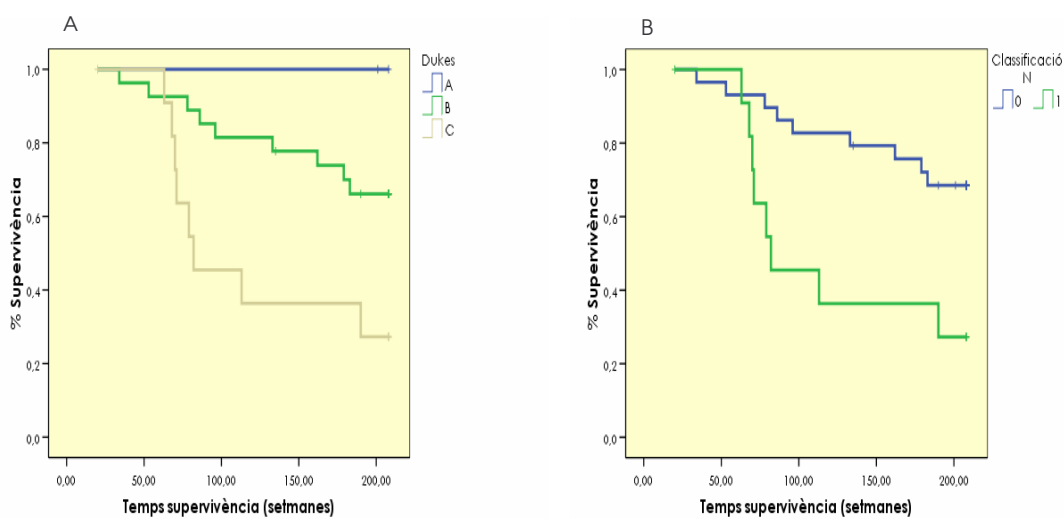


Figura 54. Corbes de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer de recte en funció de la classificació de Dukes (A) i la classificació N (B).

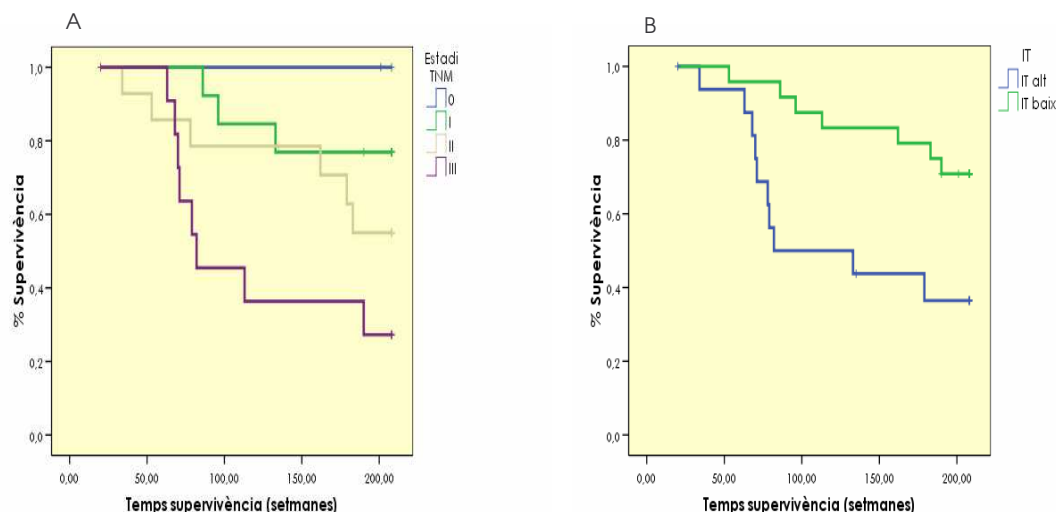


Figura 55. Corbes de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer de recte en funció de l'estadi TNM (A) i l'IT (B).

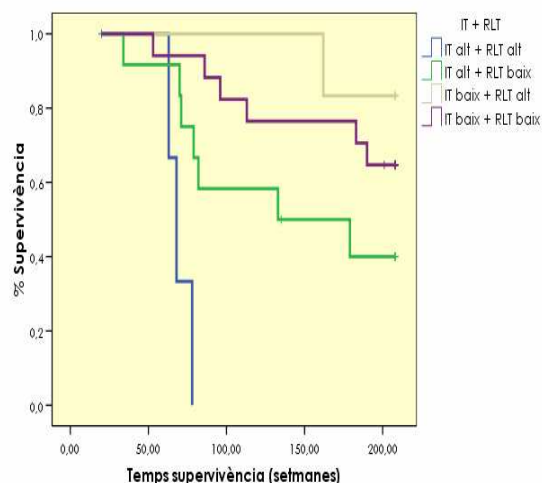


Figura 56. Corbes de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer de recte en funció de l'IT+RLT.

6.3.3. Pacients amb càncer colorectal

En general els factors que presentaven associació significativa amb el temps de supervivència global van ser la classificació de Dukes ($p = 0.046$; figura 57A), la classificació N ($p = 0.014$; figura 57B), l'estadi TNM ($p = 0.050$; figura 58A), el RLT ($p = 0.001$; figura 58B), l'IR+RLT ($p < 0.001$; figura 59A), i la ràtio del TRF1 ($p = 0.015$; figura 59B). L'edat no va arribar a mostrar una associació estadísticament significativa ($p = 0.054$; taula 30).

VARIABLE	TOTAL (%)	2-anys	p	4-anys	p
SEXE					
Home	54 (57)	70.4%		61.1%	
Dona	41 (43)	78%	0.515	70.7%	0.409
EDAT					
≤ 70	42 (44)	83.3%		81%	
> 70	53 (56)	66%	0.054	52.8%	0.004
TIPUS HISTOLÒGIC					
Adenocarcinoma	86 (91)	75.6%		68.6%	
Mucinos	9 (9)	55.6%	0.251	33.3%	0.075
ASPECTE MACROSCÒPIC					
Ulceroinfiltrat	54 (57)	70.4%		61.1%	
Vegetant	35 (37)	82.9%		74.3%	
Polipoide	6 (6)	50%	0.214	50%	0.277
GRAU DIFERENCIACIÓ					
Ben diferenciat	5 (5)	60%		60%	
Moderadament	77 (81)	77.9%		70.1%	
Pobrament	13 (14)	53.8%	0.119	38.5%	0.075
DUKES					
A	2 (2)	100%		100%	
B	62 (65)	80.6%		74.2%	
C	31 (33)	58.1%	0.042	45.2%	0.006
CLASSIFICACIÓ T					
T1	2 (2)	100%		100%	
T2	22 (23)	81.8%		77.3%	
T3	66 (70)	71.2%		62.1%	
T4	5 (5)	60%	0.489	40%	0.250
CLASSIFICACIÓ N					
Negativa	64 (67)	81.3%		75%	
Positiva	31 (33)	58.1%	0.014	45.2%	0.002
ESTADI TNM					
0	2 (5)	100%		100%	
I	21 (32)	90.5%		85.7%	
II	41 (34)	75.6%		68.3%	
III	31 (33)	58.1%	0.050	45.2%	0.008
IT					
≤ 0.85	66 (69)	77.3%		68.2%	
> 0.85	29 (31)	65.5%	0.160	58.6%	0.220
RLT					
≤ 1	69 (75)	81.2%		69.6%	
> 1	23 (25)	47.8%	0.001	47.8%	0.013
IT + RLT					
> 0.85 + ≤ 1	21 (23)	76.2%		66.7%	
> 0.85 + > 1	6 (7)	16.7%		16.7%	
≤ 0.85 + > 1	17 (18)	58.8%		58.8%	
≤ 0.85 + ≤ 1	48 (52)	83.3%	0.000	70.8%	0.000
COMPORAMENT TELÒMER					
Escurça	31 (33)	80.6%		74.2%	
Allarga	9 (10)	55.6%		55.6%	
No canvi	52 (57)	71.2%	0.189	59.6%	0.253
TRF1 M. TUMORAL					
-/+	23 (32)	65.2%		52.2%	
++/+++	49 (68)	75.5%	0.290	65.3%	0.174
RÀTIO TRF1					
-/=	35 (49)	60%		51.4%	
+	37 (51)	83.8%	0.015	70.3%	0.049

Taula 30. Resultats de l'anàlisi univariant de Kaplan-Meier entre el temps de supervivència global i les variables estudiades en els pacients amb càncer colorectal.

Als 4 anys van presentar associació significativa l'edat ($p = 0.004$; figura 60A), la classificació de Dukes ($p = 0.006$; figura 60B), la classificació N ($p = 0.002$; figura 61A), l'estadi TNM ($p = 0.008$; figura 61B), l'RLT ($p = 0.013$; figura 62A), l'IT+RLT ($p < 0.001$; figura 62B), la ràtio del TRF1 ($p = 0.049$; figura 63). El tipus histològic i l'aspecte

macroscòpic van mostrar una tendència encara que no significativa en ambdós casos ($p = 0,075$; taula 30). L'edat que als 2 anys no arribava a ser significativa als 4 anys ho era, els pacients amb 70 anys o menys tenien un temps de supervivència més elevat. Els pacients amb l'RLT baixa presentaven major temps de supervivència, als 2 i 4 anys. Els pacients amb IT baix-RLT baix tenien una major supervivència, seguits dels que tenien un IT alt-RLT baix, essent els pacients que tenien ambdós paràmetres alts els que mostraven menor temps de supervivència, als 2 i 4 anys.

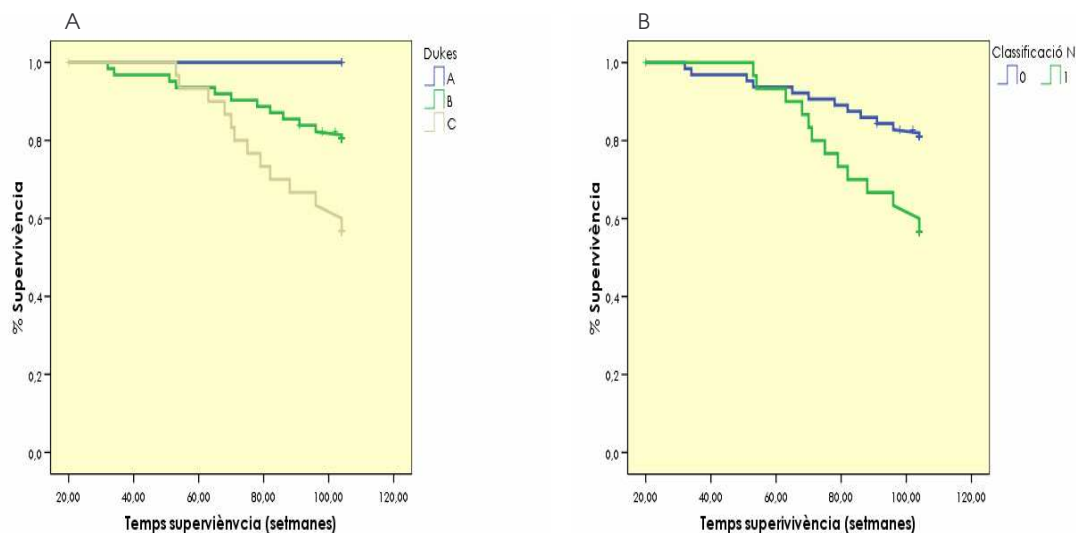


Figura 57. Corbes de supervivència global als 2 anys en els pacients amb càncer colorectal en funció de la classificació de Dukés (A) i la classificació N (B).

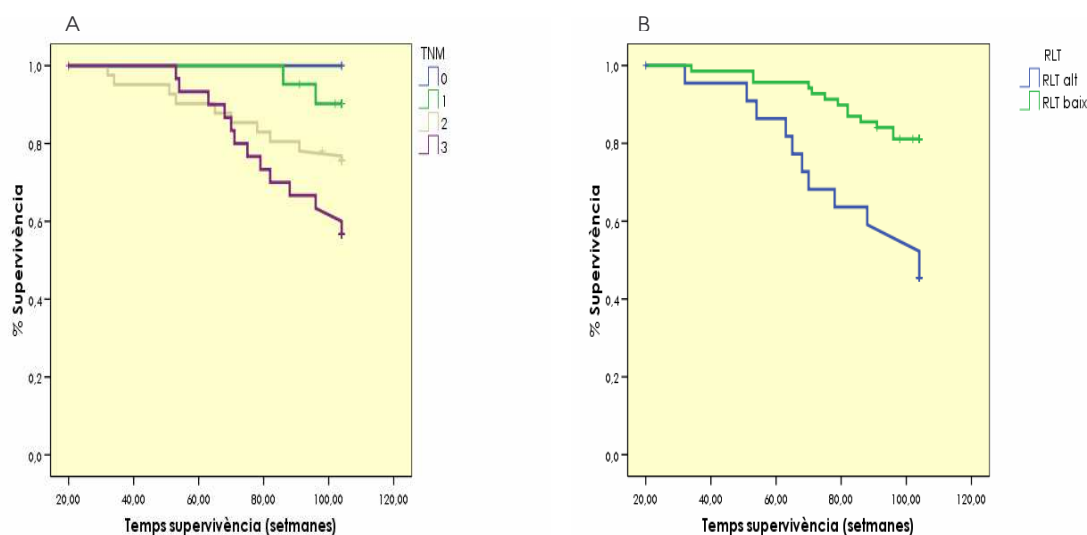


Figura 58. Corbes de supervivència global als 2 anys en els pacients amb càncer colorectal en funció de l'estadi TNM (A) i l'RLT (B).

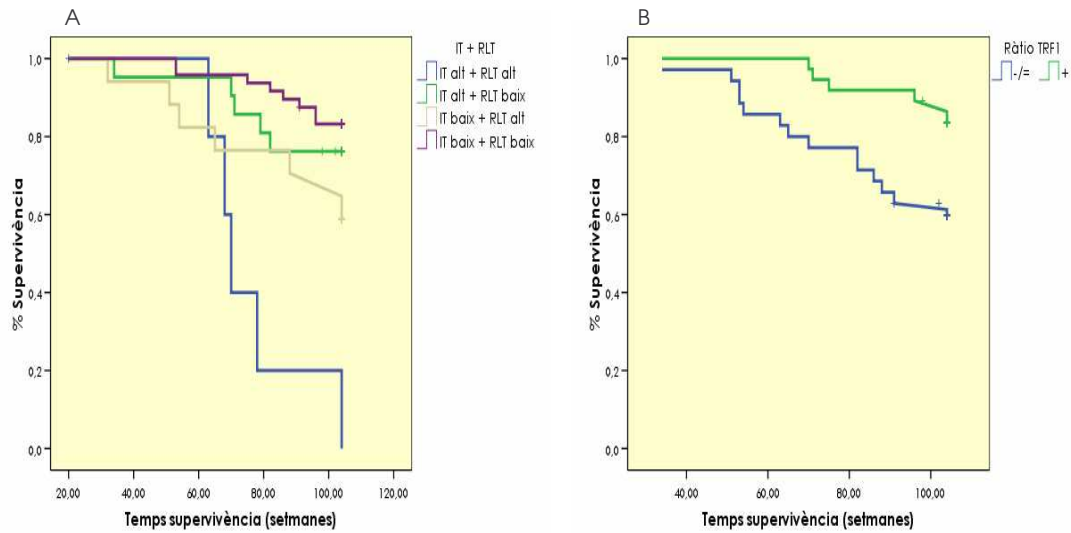


Figura 59. Corbes de supervivència global als 2 anys en els pacients amb càncer colorectal en funció de l'IT+RLT (A) i la ràtio del TRF1 (B).

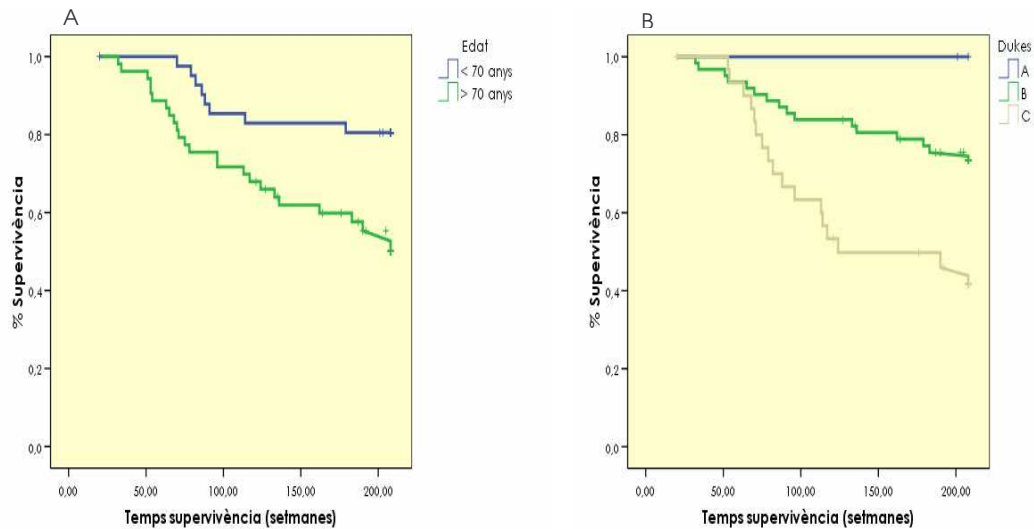


Figura 60. Corbes de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer colorectal en funció de l'edat (A) i la classificació de Dukes (B).

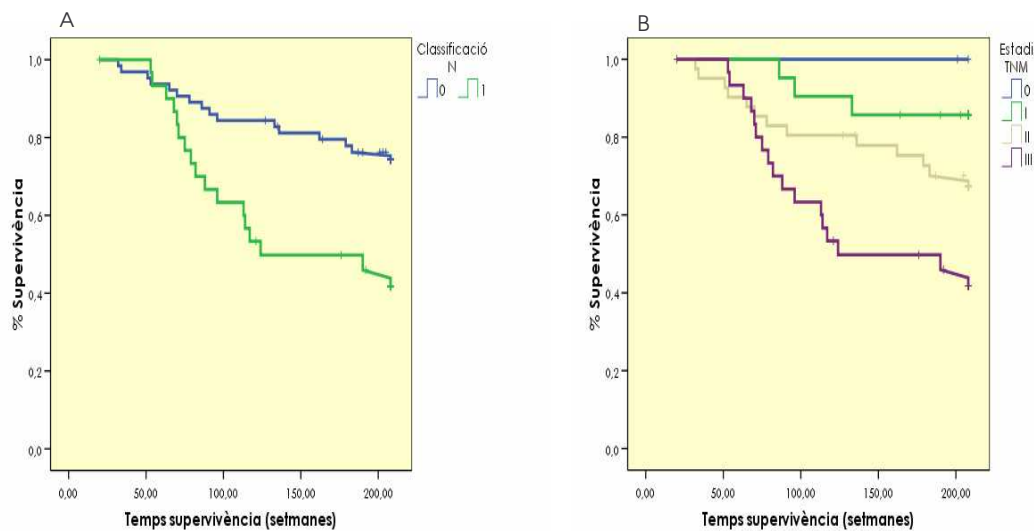


Figura 61. Corbes de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer colorectal en funció de la classificació N (A) i l'estadi TNM (B).

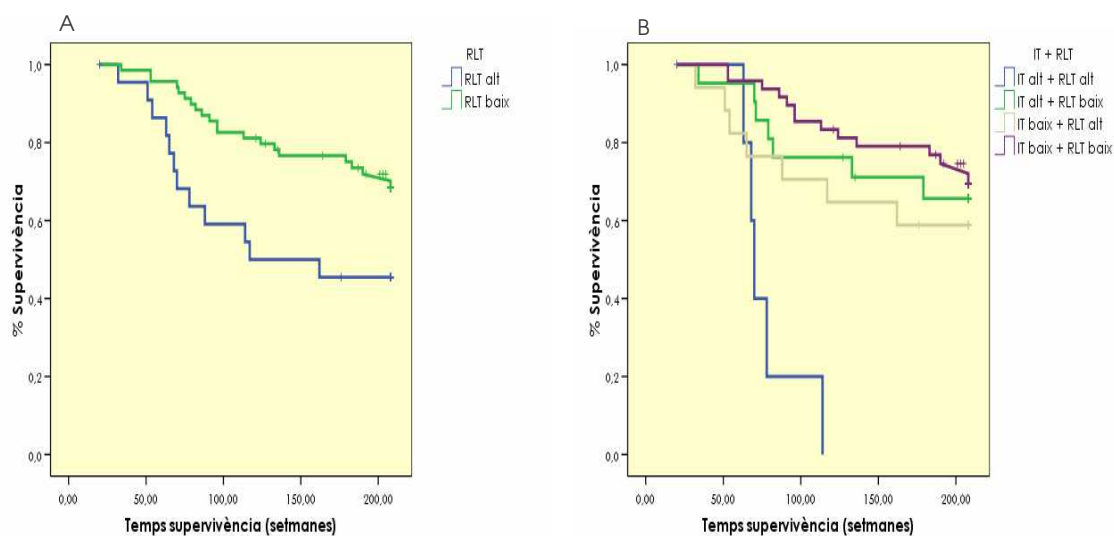


Figura 62. Corbes de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer colorectal en funció de l'RLT (A) i l'IT+RLT (B).

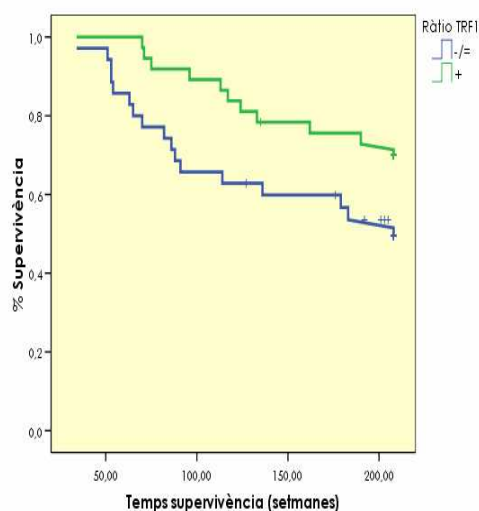


Figura 63. Corbes de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer colorectal en funció de la ràtio del TRF1.

6.4. ANÀLISI MULTIVARIANT

6.4.1. Temps lliure de malaltia en els pacients amb càncer de còlon

Donat que als 2 anys únicament un factor, la classificació T, va mostrar associació amb el temps lliure de malaltia; en els pacients amb càncer de còlon no va ser possible realitzar l'anàlisi multivariant.

L'únic factor que va mostrar una associació significativa amb el temps lliure de malaltia als 4 anys va ser el comportament dels telòmers i tampoc va ser possible realitzar l'anàlisi multivariant.

6.4.2. Temps lliure de malaltia en els pacients amb càncer de recte

Els factors que van mostrar una associació amb el temps lliure de malaltia en el recte als 2 anys van ser la classificació de Dukes, la classificació N, l'estadi TNM, l'IT i l'IT+RLT. D'aquests factors n'hi havia tres que mostraven relació entre ells, les classificacions de Dukes i N i l'estadi TNM dels quals només un podia ser analitzat en la regressió de Cox. El factor seleccionat va ser el que presentava una millor significació en l'anàlisi univariant, és a dir, la classificació N. Els altres dos factors que també van mostrar associació amb el temps lliure de malaltia van ser l'IT i l'IT+RLT que alhora també mostraven relació entre ells. Es van realitzar dues regressions de Cox una amb cada un d'aquests factors i amb la classificació N.

Els resultats de les dues regressions de Cox realitzades indicaven que l'índex de telomerasa (IT) i la classificació N eren factors pronòstics independents per a la progressió de la malaltia als 2 anys en el càncer de recte (taula 31). Al realitzar la regressió de Cox amb la classificació N i l'IT+RLT només era factor pronòstic la classificació N però no la variable que combinava l'IT i la ràtio de la longitud del telòmer (taula 32).

	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
							Inferior	Superior
IT	1,231	,583	4,451	1	,035	3,424	1,091	10,745
N	1,478	,579	6,515	1	,011	4,384	1,409	13,638

Taula 31. Anàlisi multivariant dels factors pronòstic en el temps lliure de malaltia als 2 anys en els pacients amb càncer de recte.

	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
							Inferior	Superior
N	1,353	,562	5,805	1	,016	3,871	1,287	11,640
IT+RLT	-,342	,213	2,585	1	,108	,710	,468	1,078

Taula 32. Anàlisi multivariant dels factors pronòstic en el temps lliure de malaltia als 2 anys en els pacients amb càncer de recte.

Els factors que van presentar una associació significativa amb el temps lliure de malaltia als 4 anys van ser la classificació de Dukes, la N, l'estadi TNM i l'IT+RLT. Es van incloure en l'anàlisi multivariant la classificació N i l'IT+RLT i només la classificació N va mostrar ser un factor pronòstic independent per a la progressió de la malaltia en el recte als 4 anys (taula 33).

	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
							Inferior	Superior
IT+RLT	-,179	,188	,908	1	,341	,836	,579	1,208
N	1,261	,499	6,382	1	,012	3,528	1,327	9,383

Taula 33. Anàlisi multivariant dels factors pronòstic en el temps lliure de malaltia als 4 anys en els pacients amb càncer de recte.

6.4.3. Temps lliure de malaltia en els pacients amb càncer colorectal

Els factors que van mostrar associació significativa amb el temps lliure de malaltia tan als 2 com als 4 anys en el càncer colorectal van ser el sexe, la classificació N i l'IT+RLT. Tots tres van ser analitzats per la regressió de Cox ja que entre ells no estaven relacionats i el resultat va ser que cap d'ells era un factor pronòstic independent per a la progressió de la malaltia ni als 2 ni als 4 anys en el càncer colorectal (taula 34 i 35).

	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
							Inferior	Superior
N	,817	,465	3,083	1	,079	2,263	,909	5,632
IT+RLT	-,226	,174	1,686	1	,194	,797	,566	1,122
Sexe	-,964	,569	2,871	1	,090	,381	,125	1,163

Taula 34. Anàlisi multivariant dels factors pronòstic en el temps lliure de malaltia als 2 anys en els pacients amb càncer colorectal.

	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
							Inferior	Superior
IT + RLT	-,051	,153	,111	1	,740	,950	,704	1,283
N	,650	,393	2,742	1	,098	1,916	,887	4,136
Sexe	-,820	,443	3,430	1	,064	,440	,185	1,049

Taula 35. Anàlisi multivariant dels factors pronòstic en el temps lliure de malaltia als 4 anys en els pacients amb càncer colorectal.

6.4.4. Temps de supervivència global en els pacients amb càncer de còlon

Els factors que van mostrar associació amb el temps de supervivència global en el còlon van ser l'RLT, l'IT+RLT i la ràtio de l'expressió del TRF1. Entre ells no estaven relacionats, de manera que tots tres van poder ser analitzats en l'anàlisi multivariant. Dels tres factors només la ràtio de la longitud del telòmer va ser un factor pronòstic per a la supervivència global en el càncer de còlon (taula 36).

	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
							Inferior	Superior
IT+RLT	,349	,516	,457	1	,499	1,417	,515	3,899
Ràtio TRF1	-,985	,696	2,004	1	,157	,373	,096	1,460
RLT	1,798	,783	5,274	1	,022	6,037	1,301	28,006

Taula 36. Anàlisi multivariant dels factors pronòstic en el temps de supervivència global als 2 anys en els pacients amb càncer de còlon.

Als 4 anys els factors que van presentar relació amb el temps de supervivència global van ser els mateixos que als 2 anys, és a dir, TLR, l'IT+RLT i la ràtio de l'expressió del TRF1 però a més també van ser-ho l'edat, la classificació de Dukes i la N. Aquests dos últims factor estaven relacionats entre ells i es va decidir analitzar la classificació N juntament amb la resta de factors amb associació significativa. La regressió de Cox

va mostrar que cap d'ells era factor pronòstic independent per a la supervivència als 4 anys en el còlon (taula 37).

	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
							Inferior	Superior
IT+RLT	9,043	254,201	,001	1	,972	8459,101	,000	2,0E+220
N	,187	1,285	,021	1	,884	1,205	,097	14,949
Ràtio TRF1	-,838	1,469	,326	1	,568	,432	,024	7,699
Edat	,205	1,442	,020	1	,887	1,227	,073	20,714
RLT	9,353	254,208	,001	1	,971	11528,846	,000	2,8E+220

Taula 37. Anàlisi multivariant dels factors pronòstic en el temps de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer de còlon.

6.4.5. Temps de supervivència global en els pacients amb càncer de recte

Els factors que van mostrar associació significativa amb el temps de supervivència en el recte van ser el grau de diferenciació, la classificació N, l'IT i l'IT+RLT. Els dos últims estaven relacionats entre ells, de manera que es van realitzar dues anàlisis multivariant una amb l'IT i l'altre amb l'IT+RLT, i a més el grau de diferenciació tampoc es va tenir en compte ja que en un dels grups només hi havia un pacient, es va pensar que la significació no era real. En la primera regressió de Cox (taula 38) es va observar que l'IT era un factor pronòstic independent per a la supervivència als 2 anys en el recte.

	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
							Inferior	Superior
IT	1,295	,630	4,221	1	,040	3,652	1,061	12,566
N	1,047	,597	3,073	1	,080	2,849	,884	9,186

Taula 38. Anàlisi multivariant dels factors pronòstic en el temps de supervivència global als 2 anys en els pacients amb càncer de recte.

La segona regressió que es va realitzar amb l'IT+RLT va mostrar que cap d'ells era un factor pronòstic independent (taula 39).

	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
							Inferior	Superior
N	1,007	,596	2,857	1	,091	2,737	,852	8,797
IT+RLT	-,358	,224	2,561	1	,110	,699	,451	1,084

Taula 39. Anàlisi multivariant dels factors pronòstic en el temps de supervivència global als 2 anys en els pacients amb càncer de recte.

Als 4 anys els factors que van mostrar associació significativa amb el temps de supervivència global van ser els mateixos que als 2 anys però a més s'hi van afegir la classificació de Dukes i l'estadi TNM però aquests dos estaven relacionats entre ells i amb la classificació N i donat que aquesta última classificació era la que va mostrar una millor significació es van realitzar dues regressions de Cox amb els mateixos factors que als 2 anys. La classificació N i l'índex de la telomerasa van mostrar ser

factores pronòstics independents per a la supervivència als 4 anys en els pacients amb càncer de recte (taules 40 i 41).

	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
							Inferior	Superior
IT	1,099	,507	4,701	1	,030	3,000	1,111	8,100
N	1,130	,501	5,094	1	,024	3,097	1,160	8,266

Taula 40. Anàlisi multivariant dels factors pronòstic en el temps de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer de recte.

	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
							Inferior	Superior
N	1,063	,499	4,532	1	,033	2,895	1,088	7,704
IT+RLT	-,300	,184	2,653	1	,103	,741	,516	1,063

Taula 41. Anàlisi multivariant dels factors pronòstic en el temps de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer de recte.

6.4.6. Temps de supervivència global en els pacients amb càncer colorectal

Els factors que van presentar una associació amb el temps de supervivència eren la classificació de Dukes, la N, l'estadi TNM, l'RLT, l'IT+RLT i la ràtio de l'expressió del TRF1. No van ser analitzats en la regressió de Cox la classificació N ni l'estadi TNM. El resultat de l'anàlisi multivariant van ser que cap d'ells era un factor pronòstic independent per la supervivència als 2 anys tot i que tres d'ells mostraven una significació gairebé significativa (taula 42).

	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
							Inferior	Superior
N	,786	,461	2,908	1	,088	2,196	,889	5,422
IT+RLT	-,099	,203	,239	1	,625	,905	,608	1,348
RLT	,868	,477	3,306	1	,069	2,381	,935	6,066
Ràtio TRF1	-,984	,516	3,631	1	,057	,374	,136	1,028

Taula 42. Anàlisi multivariant dels factors pronòstic en el temps de supervivència global als 2 anys en els pacients amb càncer colorectal.

Als 4 anys van mostrar associació amb el temps de supervivència els mateixos factors que als 2 anys i va sumar-s'hi l'edat. Els factors inclosos en la regressió de Cox van ser els mateixos que als dos anys i s'hi va afegir l'edat. El resultat va ser que cap dels factors va resultar ser pronòstic per a la supervivència als 4 anys en el càncer colorectal (taula 43).

	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
							Inferior	Superior
N	-2,694	3,941	,467	1	,494	,068	,000	152,920
IT + RLT	-2,436	2,631	,857	1	,354	,087	,001	15,190
RLT	-4,834	23,690	,042	1	,838	,008	,000	1E+018
RàtioTRF1	-7,061	7,172	,969	1	,325	,001	,000	1091,914
Edat	7,796	9,444	,682	1	,409	2432,009	,000	3E+011

Taula 43. Anàlisi multivariant dels factors pronòstic en el temps de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer colorectal.

En resum, la classificació T i el comportament dels telòmers (escurçament, no canvi, allargament) van ser els únics factors associats amb el temps lliure de malaltia als 2 i 4 anys respectivament en els pacients amb càncer colon i per tant, van ser els únics factors pronòstics independents. La ràtio de la longitud del telòmer va ser factor pronòstic independent per a la supervivència global als 2 anys. En els pacients amb càncer de recte van ser factors pronòstics independents la classificació N i l'índex de la telomerasa pel temps lliure de malaltia als 2 anys i només la classificació N als 4 anys. Per a la supervivència global va ser factor pronòstic independent l'IT als 2 anys i als 4 anys van ser-ho la classificació N i l'IT (taula 44).

	TEMPS LLIURE DE MALALTIA		SUPERVIVÈNCIA GLOBAL	
	2 ANYS	4 ANYS	2 ANYS	4 ANYS
CÒLON	Classificació T	Comportament telòmers	RLT	-
RECTE	Classificació N i IT	Classificació N	IT	Classificació N i IT
COLORECTAL	-	-	-	-

Taula 44. Factors pronòstics independents en funció de la localització del tumor, el temps lliure de malaltia i la supervivència global als 2 i 4 anys.

6.5. TEST SENSIBILITAT I ESPECIFICITAT

En el temps lliure de malaltia i en la supervivència global pels pacients amb càncer de recte van resultar ser factors pronòstics independents la classificació N i l'IT. D'aquests dos factors es va analitzar quin percentatge de progressions i de supervivència eren capaços de detectar, així com també si els teníem en compte ambdós alhora, si el nombre de casos classificats correctament augmentava. Els resultats dels tests d'especificitat i sensibilitat dels factors pronòstic als 2 i 4 anys en el temps lliure de malaltia i en la supervivència global es mostren en les taules 45 i 46.

TEMPS LLIURE	2 ANYS			4 ANYS		
	Sensibilitat	Especificitat	C. Correctament	Sensibilitat	Especificitat	C.correctament
IT > 0.85	57%	67%	63%	44%	61%	54%
N positiva	50%	81%	71%	44%	83%	66%
IT+N	36%	89%	71%	28%	87%	61%

Taula 45. Percentatge de sensibilitat, específicitat i de pacients que classifica correctament cada una de les variables i ambdues alhora en el temps de malaltia als 2 i 4 anys.

SUPERVIÈNCIA	2 ANYS			4 ANYS		
	Sensibilitat	Especificitat	C. correctament	Sensibilitat	Especificitat	C.correctament
IT >0.85	67%	69%	68%	59%	71%	66%
N positiva	50%	79%	71%	47%	83%	68%
IT+N	50%	93%	80%	35%	92%	68%

Taula 46. Percentatge de sensibilitat, especificitat i de pacients que classifica correctament cada una de les variables i ambdues alhora en la supervivència global als 2 i 4 anys.

Els resultats de la progressió als 2 anys van mostrar que la N positiva classificava correctament un percentatge més elevat de progressions que l'IT, i que quan es combinaven el percentatge era el mateix que quan es feia servir la classificació N sola. Mentre que la progressió als 4 anys, la capacitat de classificar correctament va disminuir en tots els factors.

L'IT en la supervivència als 2 anys classificava correctament un 68% dels casos mentre la classificació N ho feia en un 73% i si es combinaven el percentatge de casos classificats correctament augmentava fins un 80%. Però als 4 anys la capacitat de classificar els malalts correctament disminuïa en tots dos factors i al combinar-los mantenia el percentatge de casos que presentava la classificació N sola.

L'IT va mostrar una sensibilitat més elevada que la N, excepte en un cas en què eren iguals i que quan es combinaven ambdós factors. Mentre la N va presentar una especificitat més elevada que l'IT però inferior a la que en resultava quan es combinaven ambdós factors.

7. LONGITUD DEL TELÒMER EN CÈL·LULES SANGUÍNIES

Aquest estudi inclou 40 dels pacients intervinguts de càncer colorectal dels quals es va obtenir sang perifèrica durant el pre-operatori. La mitjana d'edat d'aquests pacients era 70.90 anys (rang 48-82 anys). La mitjana de la longitud del telòmer en cèl·lules sanguínies va ser 8.84 Kpb (rang 6.65-12.90Kpb), en la mucosa normal del còlon 7.97 Kpb (rang 4.83-12.60 Kpb) i en la mucosa colònica tumoral 7.33 Kpb (rang 2.19-13.30 Kpb). Les diferències van ser significatives entre la longitud del telòmer de les cèl·lules sanguínies i la del teixit tumoral ($p < 0.001$), i també entre la longitud de les cèl·lules sanguínies i la del teixit normal ($p = 0.041$). Les diferències també van ser significatives entre la longitud del telòmer en la mucosa tumoral i la mucosa normal ($p = 0.050$; taula 47).

VARIABLE	Cèl·lules sanguínies	M. normal	M. tumoral
LONGITUD DEL TELÒMER	8.84 (6.65-12.90) ^{a, b}	7.97 (4.83-12.60) ^{b, c}	7.33 (2.19-13.30) ^{a, c}

Taula 47. Mitjana de la longitud del telòmer en els diferents teixits (^a $p < 0.001$, ^b $p = 0.041$, ^c $p = 0.050$).

Es podria pensar que els leucòcits de la sang són cèl·lules sanes encara que el pacient hagi estat intervingut d'un càncer colorectal, doncs si fos així i d'acord amb la teoria del funcionament dels telòmers esmentada abans creiem que la longitud del telòmer de la sang s'hauria de correlacionar amb l'edat dels pacients.

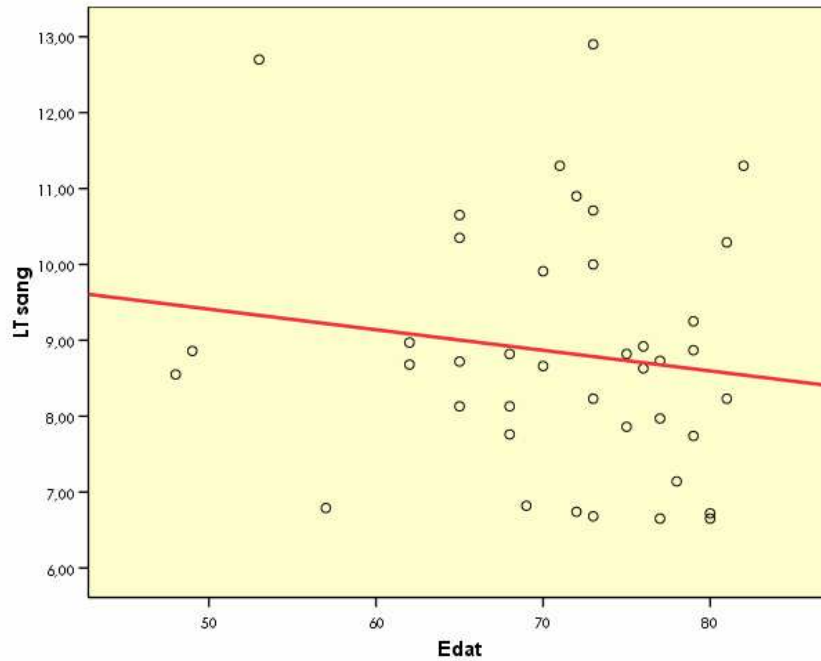


Figura 64. Correlació entre la longitud del telòmer en cèl·lules sanguínies i l'edat dels pacients.

Tal i com mostra la figura 64 i la corresponent regressió lineal no existeix associació lineal entre ambdues ($r^2 = 0.020$, $p = 0.381$). En l'apartat anterior s'ha pogut observar un comportament paral·lel entre la mucosa tumoral i la mucosa normal però aquest no existeix entre la mucosa normal i la sang ($r^2 = 0.043$, $p = 0.201$; figura 65).

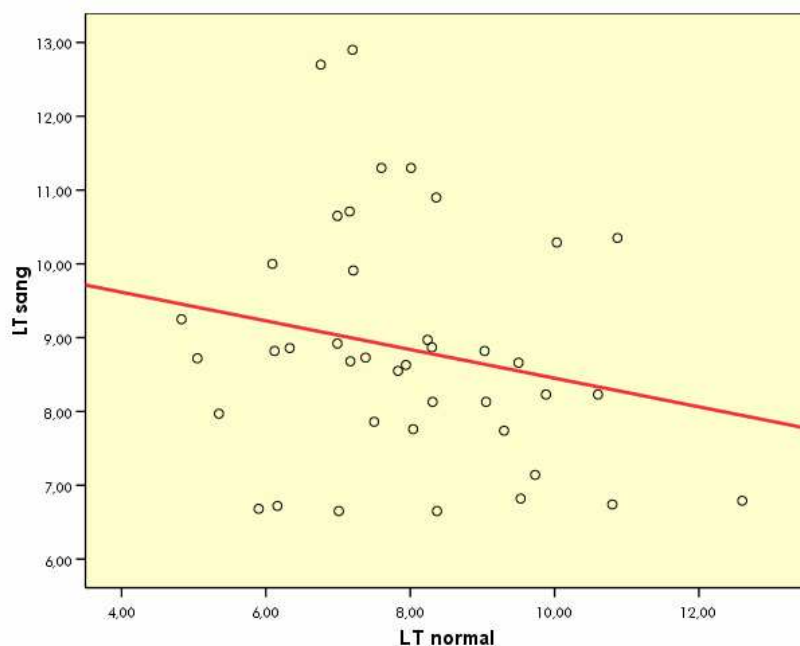


Figura 65. Correlació entre la longitud del telòmer en cèl·lules sanguínies i en mucosa colònica normal de pacients intervinguts de càncer colorectal.

El comportament que s'ha observat entre la longitud del telòmer de la mucosa normal colònica i la longitud en cèl·lules sanguínies va ser el següent: 37.5% de les mostres de la mucosa colònica normal s'escurçaven respecte les cèl·lules sanguínies, un 20% s'allargaven i un 42.5% no variaven significativament la seva longitud.

VARIABLE	LT CÈL·LULES SANGUÍNIES	
EDAT		
≤ 70 (16)	8.90 (6.79-12.70)	
> 70 (24)	8.80 (6.65-12.90)	
<i>p</i>		0.754
SEXE		
Dones (15)	8.99 (6.74-12.90)	
Homes (25)	8.75 (6.65-12.70)	
<i>p</i>		0.391
CLASSIFICACIÓ N		
N (-) (24)	8.85 (6.65-12.90)	
N (+) (16)	8.83 (6.65-11.30)	
<i>p</i>		0.553
CLASSIFICACIÓ M		
M0 (34)	8.73 (6.65-12.90)	
M1 (6)	9.44 (8.13-11.30)	
<i>p</i>		0.256

Taula 48. Associació de la longitud del telòmer en cèl·lules sanguínies amb les característiques clíniques i anatomopatològiques dels pacients.

La longitud dels telòmers en les cèl·lules sanguínies no va mostrar relació amb cap de les variables estudiades dels pacients amb càncer colorectal (taula 48).

8. LONGITUD DEL TELÒMER EN PACIENTS SANS

Es va analitzar la longitud del telòmer de la mucosa colònica, obtinguda per endoscòpia, de 9 pacients sans i també la longitud del telòmer de les cèl·lules sanguínies d'aquests mateixos pacients, les característiques de tots ells es mostren en la taula 49.

Nº mostra	Edat	Sexe	Localització	LT endoscòpia	LT sang
20	71	Home	C. dret	9.04	6.39
28	46	Dona	C. esquerra	10.98	9.77
42	62	Home	C. dret	7.58	7.93
55	39	Home	C. esquerra	10.64	10.64
80	74	Dona	C. dret	7.28	7.41
83	73	Home	C. esquerra	9.22	6.39
85	75	Dona	C. esquerra	6.82	7.46
101	50	Home	C. esquerra	14.73	10.25
121	63	Dona	C. dret	8.51	8.03

Taula 49. Característiques dels pacients sans.

La mitjana de la longitud del telòmer en la mucosa colònica va ser de 9.42 Kpb mentre que en les cèl·lules sanguínies va ser de 8.25 Kpb, la diferència entre ambdues longituds tendia a ser significativa sense ser-ho ($p = 0.082$; taula 49).

En el grup de pacients més joves el telòmer en cèl·lules sanguínies va mostrar una longitud significativament superior al dels pacients més vells. Mentre en el sexe i la localització no es van observar diferències significatives en la longitud del telòmer ni en de les cèl·lules sanguínies (taula 50).

VARIABLE	Nº	%	LT endoscòpia	LT sang	p
Pacients	9	100	9.42 (6.82-14.73)	8.25 (6.39-10.64)	0.082
SEXE					
Homes	5	56	10.24 (7.58-14.73)	8.32 (6.39-10.64)	
Dones	4	44	8.39 (6.82-10.98)	8.16 (7.41-9.77)	
p			0.286	1	
EDAT					
≤ 62	4	44	10.98 (7.58-14.73)	9.64 (7.93-10.64)	
> 62	5	56	8.17 (6.82- 9.22)	7.13 (6.39-8.03)	
p			0.111	0.032	
LOCALITZACIÓ					
Còlon dret	4	44	8.10 (7.28-9.04)	7.44 (6.39-8.03)	
Còlon esquerra	5	56	10.47 (6.82-14.73)	8.90 (6.39-10.64)	
p			0.190	0.286	

Taula 50. Relació entre la LT en la mucosa del colon i les cèl·lules sanguínies amb les característiques dels pacients.

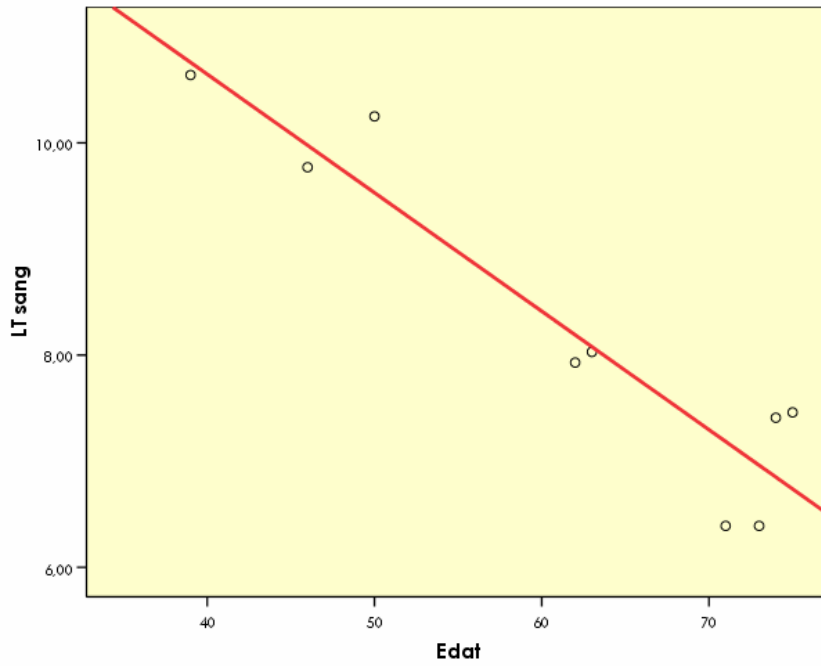


Figura 66. Correlació entre l'edat dels pacients i la LT en cèl·lules sanguínies.

La longitud del telòmer en les cèl·lules sanguínies va mostrar una correlació significativa amb l'edat ($r^2 = 0.881$, $p < 0.001$; figura 66).

La longitud del telòmer en la mucosa normal endoscòpica va correlacionar-se amb l'edat dels pacients ($r^2 = 0.484$, $p = 0.037$; figura 67).

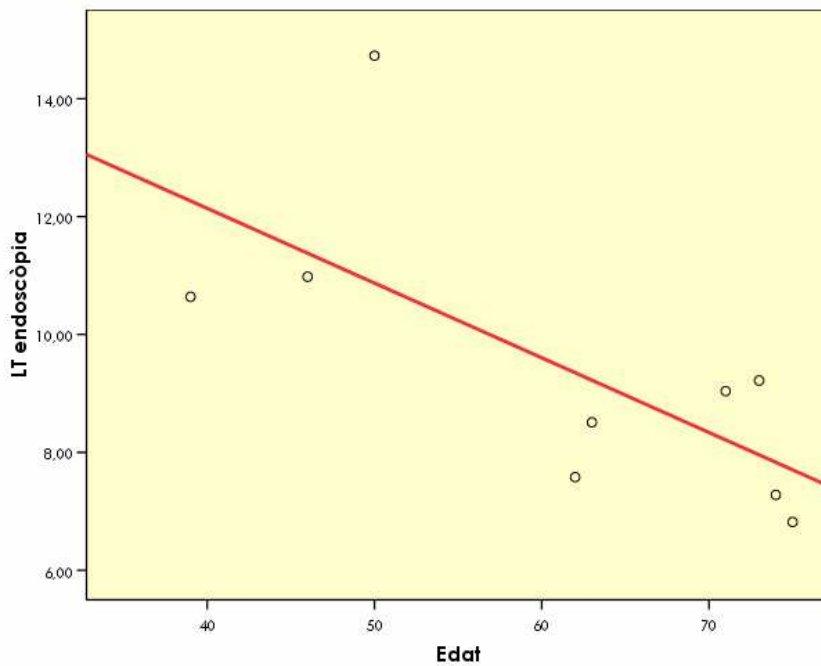


Figura 67. Correlació entre l'edat dels pacients i la LT en la mucosa colònica.

La longitud del telòmer d'ambdós tipus de mostres, de teixit colònic i sanguínia, també van mostrar estar correlacionats entre elles ($r^2 = 0,479$, $p = 0,039$; figura 68).

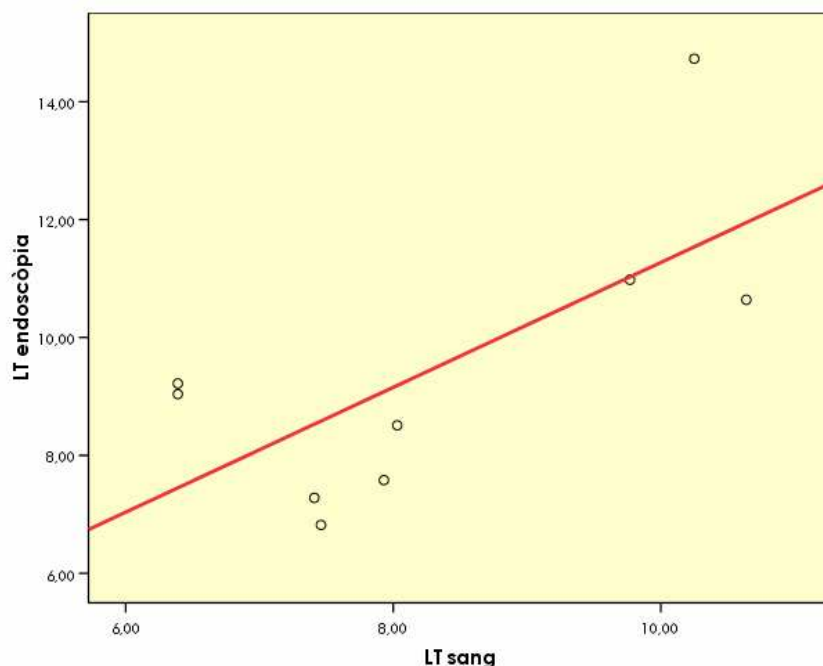


Figura 68. Correlació entre la LT de les cèl·lules sanguínies i la LT de la mucosa colònica.

9. ACTIVITAT DE LA TELOMERASA I LONGITUD DEL TELÒMER EN PÒLIPS

Aquesta part del treball inclou per una banda 14 pacients amb pòlips colorectals una altra amb 6 pacients els quals presentaven sincrònicament pòlips i càncer colorectal i una tercera en la qual s'analitzen els pacients amb pòlips aïllats. De totes aquestes mostres es va determinar l'activitat de la telomerasa i la longitud del telòmer.

Estudi dels pacients (n = 14) amb pòlips colorectals.

L'activitat de la telomerasa va ser trobada en un 86% dels pòlips i en un 50% de les corresponents mucoses normals (taula 51).

	Nº casos AT (+)/ Nº casos totals	% AT (+)	AT (rang)	LT (rang)
PÒLIPS	12/14	86%	5.85 (0-33.40)	6.78 (3.21-11.19)
M. NORMAL	7/14	50%	0.58 (0-2.35)	7.78 (4.83-11.33)
<i>p</i>			0.077	0.082

Taula 51. Dades sobre AT i la LT dels 14 pacients amb pòlips.

La mitjana de l'activitat de la telomerasa en els pòlips va ser 5.85 TPG i la mitjana en la mucosa normal 0.58 TPG, la diferència entre ambdues mucoses no va arribar a ser significativa ($p = 0.077$). La mitjana de la longitud del telòmer en els pòlip va ser 6.78 Kpb i en la mucosa normal 7.78 Kpb essent aquesta diferència gairebé significativa ($p = 0.082$; taula 51).

El patró de comportament dels telòmers dels pòlips respecte la corresponent mucosa normal va ser un 43% d'escurçament, un 7% d'allargament i un 50% de manteniment, aquests resultats van ser molt similar als que es van obtenir en el comportament dels tumors.

Al estudiar l'AT en els pòlips i en la mucosa normal segons les característiques estudiades: el sexe, la localització i la histologia del pòlip i el fet de presentar o no càncer sincrònic. Es va observar que els pòlips que presentaven un càncer sincrònic mostraven una AT significativament inferior a aquells que no el presentaven ($p = 0.020$).

VARIABLES	AT PÒLIP	AT NORMAL	p	LT PÒLIP	LT NORMAL	P
N = 14	5.85	0.58	0.077	6.78	7.78	0.082
SEXE						
Homes (7/14)	9.99	0.58	0.118	6.49	7.43	0.175
Dones (7/14)	1.71	0.58	0.055	7.08	8.13	0.295
p	0.318	0.805		0.620	0.710	
LOCALITZACIÓ PÒLIP						
Còlon (8/14)	1.93	0.29	0.020	6.15	7.57	0.082
Recte (6/14)	11.07	0.965	0.156	7.62	8.06	0.617
p	0.414	0.228		0.228	0.573	
HISTOLOGIA PÒLIP						
Tubular (3/14)	8.81	0.517	0.431	7.10	7.92	0.162
Vellós (1/14)	0.91	0	-	7.94	7.93	-
Túbulo-vellós (10/14)	5.46	0.66	0.161	6.57	7.72	0.153
p	0.443	0.650		0.416	0.969	
NEOPLÀSIA						
Si (6/14)	1.10	0.33	0.242	6.69	7.51	0.269
No (8/14)	9.42	0.77	0.097	6.65	7.98	0.173
p	0.020	0.345		0.852	0.950	

Taula 52. Relació entre les característiques dels pòlips amb l'AT i la LT.

Es va observar que l'AT en el pòlip era significativament superior a la de la mucosa normal dels pòlips localitzats en el còlon ($p = 0.020$), les dones van mostrar una AT en els pòlips superior que en la mucosa normal ($p = 0.055$) i els pacients que no presentaven càncer sincrònic mostraven una AT en el pòlip superior a la de la mucosa normal encara que la diferència no arribava a ser significativa ($p = 0.097$; taula 52).

Al estudiar la longitud en relació amb les característiques estudiades, es va observar que els pòlips túbulo-vellosos presentaven una diferència major entre la

longitud del pòlip i la mucosa normal mentre que els vellosos presentaven pràcticament la mateixa longitud del telòmer.

Al realitzar una correlació entre l'activitat de la telomerasa i la longitud del telòmer en pòlips no es va trobar associació significativa entre ambdues variables.

Estudi dels pacients (n = 6) que presentaven càncer sincrònic.

Es van estudiar per separat els 6 pacients que presentaven pòlips i càncer sincrònics. Es va comparar l'AT del tumor amb la del pòlip i amb la de la mucosa normal. Un 83% dels tumors eren telomerasa positius, un 67% dels pòlips i un 33% de les mucoses normals. La mitjana de l'AT del tumor va ser de 5.65 TPG, la del pòlip 1.09 i la de la mucosa normal 0.33 TPG. Les diferències entre les mitjanes no van ser significatives però sí que es va observar una major AT en el tumor que en el pòlip i major AT en aquest que en la mucosa normal (taula 53).

MUCOSA	Nº Pacients	% AT (+)	AT (rang)	LT (rang)
TUMOR	5/6	83%	5.65 (0 - 19.02)	6.28 (4.20 - 8.80)
PÒLIP	4/6	67%	1.09 (0 - 3.57)	6.95 (4.94 - 9.91)
NORMAL	2/6	33%	0.33 (0 - 1.64)	7.50 (4.83 - 9.05)

Taula 53. Dades sobre l'AT i la LT en els pacients amb pòlips i càncer sincrònic.

Al estudiar la AT en les diferents mucoses segons les característiques del pòlip es va trobar que els pòlips túbulo-vellosos presentaven una AT major encara que no significativa ($p = 0.060$) que els pòlips tubulars.

La mitjana de la longitud del tumor va ser de 6.28 Kpb, la del pòlip 6.95 Kpb i la mucosa normal 7.50 Kpb sense que les diferències arribessin a ser significatives. La longitud del telòmer dels pòlips no presentava diferències significatives dins de les variables estudiades (taula 54).

VARIABLE	AT TUMOR	AT PÒLIP	AT NORMAL	LT TUMOR	LT PÒLIP	LT NORMAL
SEXE						
Homes (3/6)	4.73	1.07	0.54	5.36	6.99	7.36
Dones (3/6)	6.57	1.19	0.11	7.20	6.92	7.65
P		0.827	0.507	0.796	0.275	0.827
LOCALITZACIÓ						
Colon (4/6)	6.27	1.14	0.09	5.75	6.49	7.13
Recte (2/6)	4.41	1.01	0.82	7.33	7.88	8.25
P		0.643	0.814	0.411	0.533	0.800
TIPUS HISTOLÒGIC						
Tubular (2/6)	9.51	0.00	0.173	6.83	6.84	7.88
Tubulo-vellós (4/6)	3.72	1.64	0.410	6.00	7.01	7.32
P		1	0.060	0.784	0.643	1

Taula 54. Relació entre les característiques del pòlip i l'AT i la LT en els diferents teixits.

Estudi dels pacients (n = 8) amb pòlips colorectals aïllats.

L'activitat de la telomerasa va ser trobada en un 100% dels pòlips i en un 62.5% de les corresponents mucoses normals (taula 54). La mitjana de l'activitat de la telomerasa en els pòlips va ser 9.41 TPG i la mitjana en la mucosa normal 0.77 TPG, la diferència entre ambdues mucoses no era ser significativa). La mitjana de la longitud del telòmer en els pòlip va ser 6.65 Kpb i en la mucosa normal 7.98 Kpb sense que aquesta diferència fos significativa (taula 55).

	Nº casos AT (+)/ Nº casos totals	% AT (+)	AT (rang)	LT (rang)
PÒLIPS	8/8	100%	9.41 (0.91-33.40)	6.65 (3.21-11.19)
M. NORMAL	5/8	62.5%	0.77 (0-2.35)	7.98 (5.54-11.33)
p			0.097	0.173

Taula 55 . Dades sobre AT i la LT dels 14 pacients amb pòlips aïllats.

El patró de comportament dels telòmers dels pòlips respecte la corresponent mucosa normal va ser un 50% d'escurçament, un 12.5% d'allargament i un 37.5% de manteniment, aquests resultats van ser molt similar als que es van obtenir en el comportament dels tumors.

Al estudiar l'AT en els pòlips i en la mucosa normal segons les característiques estudiades: el sexe, la localització i la histologia del pòlip sense observar diferències significatives en cap d'elles. Les dones van presentar diferències significatives entre l'AT del pòlip i la de la mucosa normal. Els pòlips localitzats en el còlon també van presentar diferències significatives entre l'AT del pòlip i la mucosa normal (taula 56).

VARIABLES	AT PÒLIP	AT NORMAL	p	LT PÒLIP	LT NORMAL	p
N = 8	9.41	0.77	0.097	6.65	7.98	0.173
SEXE						
Homes (4/8)	16.72	0.61	0.125	6.11	7.48	0.217
Dones (4/8)	2.10	0.92	0.001	7.20	8.48	0.499
p	0.114	0.886		0.686	0.686	
LOCALITZACIÓ PÒLIP						
Còlon (4/8)	2.72	0.50	0.042	5.82	8.00	0.187
Recte (4/8)	16.11	1.03	0.163	7.48	7.96	0.718
p	0.486	0.686		0.343	0.886	
HISTOLOGIA PÒLIP						
Tubular (1/14)	26.42	1.20	-	7.61	8.01	-
Vellós (1/14)	0.91	0	-	7.94	7.93	-
Túbulo-vellós (6/14)	7.99	0.82	0.196	6.28	7.98	0.222
p	0.443	0.468		0.416	0.969	

Taula 56. Relació entre les característiques dels pòlips aïllats amb l'AT i la LT.

La taula 57 mostra els resultats obtinguts en les diferents mostres i variables estudiades. L'AT va ser detectada en la mucosa normal de pacients amb CCR amb un valor dèbil, en la mucosa transicional l'AT era una mica superior a la mucosa normal sense que les diferències arribessin a ser significatives. Els pòlips aïllats van presentar una AT superior a la mucosa normal i transicional però inferior a la tumoral, mentre els pòlips sincrònics semblaven tenir un comportament diferents dels aïllats, l'activitat de la telomerasa era molt més baixa que en els pòlips aïllats. La mucosa tumoral tenia un AT superior a qualsevol de les altres mostres analitzades. D'una banda, per a l'AT sembla ser que existeix una seqüència entre la mucosa normal-adenoma-carcinoma on l'AT cada cop és més elevada. Per altra banda, en gran part de les mostres normals l'AT ja és activada però la seva expressió és molt dèbil i sembla que en la fase de pòlip es donessin les condicions perquè aquesta expressió augmentés.

La longitud del telòmer en sang va ser molt similar entre els pacients amb i sense CCR però la LT en la mucosa normal del còlon dels pacients amb CCR era molt més curta que en la dels pacients sans, si continuem la seqüència observem que els pòlips aïllats presenten un LT més curta que la mucosa normal dels pacients amb CCR i els pòlips sincrònics presenten una LT una mica més llarga que la dels pòlips aïllats. La mucosa tumoral presenta una LT inferior a la mucosa normal i similar a la dels pòlips. Es va observar que durant el procés carcinogènic existia una tendència a escurçar els telòmers i la mucosa normal de pacients amb CCR presentaven telòmers més curts que la mucosa còlonica de persones sanes. Per tant, la mucosa normal de pacients amb CCR presentava canvis com una expressió dèbil de l'AT i un lleuger escurçament del telòmer.

	CONTROLS SANS		PACIENTS AMB CÀNCER COLORECTAL					
	SANG	MUCOSA CÒLON	SANG	MUCOSA NORMAL	MUCOSA TRANS	PÒLIP AILLAT	PÒLIP SINCRÒNIC	MUCOSA TUMORAL
AT (TPG)	-	-	-	1.09	1.51	5.85	1.09	11.49
LT (Kpb)	8.25	9.42	8.84	7.85	-	6.78	6.95	7.02

Taula 57. AT i LT en totes les mostres en les que van ser analitzades.

1. ACTIVITAT DE LA TELOMERASA

El primer grup de recerca que va estudiar l'activitat de la telomerasa a través del mètode TRAP van ser Kim *et al.*, al 1995 (104). Mitjançant aquesta tècnica van demostrar que només presentaven AT les cèl·lules amb un potencial de replicació "il·limitat" com les cèl·lules germinals, les cèl·lules tumorals i les línies cel·lulars immortalitzades però no les cèl·lules somàtiques normals. Aquests autors (103) van detectar l'AT en el 90% dels tumors analitzats i en cap de les mostres normals i van determinar que l'AT en un futur podria ser utilitzada com a marcador diagnòstic i pronòstic. A més, la telomerasa semblava ser essencial per a la continuada proliferació de les cèl·lules cancerígenes i per tant, el desenvolupament d'agents anti-cancerígens basats en la inhibició de la telomerasa podrien ser molt efectius.

A partir d'aquest moment comencen a aparèixer en la literatura diferents treballs que analitzen l'AT en diferents neoplàsies. La tècnica es va anar modificant en el temps, intentant que fos més senzilla, més sensible i que pogués quantificar els nivells d'expressió i no només dir si l'activitat era present o absent, com en el treballs inicials. Les últimes incorporacions en la tècnica van ser l'ús de la fluorescència i l'anàlisi a través d'un seqüenciador de DNA. Aquesta anàlisi era més sensible que l'anterior metodologia, la qual es basava en un gel d'acrilamida, de forma que les bandes que determinaven la presència de l'AT havien de ser observades a ull nu.

Totes aquestes millores en la tècnica van permetre observar que les cèl·lules en regeneració i les cèl·lules cancerígenes no eren les úniques que presentaven AT sinó que també ho feien un percentatge de cèl·lules normals. Per a la primera tècnica calien moltes cèl·lules amb AT o poques cèl·lules però amb una activitat elevada per a ser detectada a ull nu en un gel d'acrilamida, mentre que les noves tecnologies eren capaces de detectar l'AT en un nombre més baix de cèl·lules o bé detectar uns nivells d'activitat menors. Alguns autors van atribuir l'AT de la mucosa normal a una micrometàstasi del tumor en la mucosa adjacent (115), al fet que l'activació de la telomerasa era un episodi universal de la carcinogènesi colònica (116), a la presència de limfòcits infiltrats els quals posseeixen AT (117), o també podria reflexar l'AT de la zona proliferativa de les criptes intestinals on es troben les cèl·lules precursors i els seus descendents immediats (118).

En aquest estudi, l'activitat de la telomerasa va ser detectada en un 81.5% (88/108) de les mostres tumorals. La freqüència de càncers colorectals telomerasa-positius, en altres estudis existents en la literatura va ser 100% (110, 115, 119, 120,121), 95.5% (122), 93% (123), 90% (104, 124), 82.4% (116), 81.3% (125) i 80% (126). En general es podria dir que més del 80% dels CCR presenten activitat de la telomerasa.

L'activitat de la telomerasa també ha estat detectada en altres tumors: 93% de dels tumors de mama (103), 100% dels tumors de tiroïdes (127), 62% dels tumors de fetge (128) i en el 62% dels tumors de pulmó (129) però també en moltes altres neoplàsies com ens mostren Granger *et al.*, (23). Per tant, observant aquests resultats podríem considerar que l'activació de la telomerasa és un esdeveniment que podem trobar d'una forma generalitzada en totes les neoplàsies. Alguns càncers que són telomerasa-negatius mantindrien la longitud dels seus telòmers per un mecanisme telomerasa independent, que es coneix com el mecanisme alternatiu de l'allargament dels telòmers (ALT), que es basa en processos de recombinació del DNA (56, 97).

En la mucosa transicional es va trobar que un 54% (58/108) de les mostres presentaven activitat de la telomerasa. En la literatura existeix un únic estudi on també s'analitzava la mucosa transicional, el treball de Boldrini *et al.*, (119), els quals van trobar que un 83.4% (30/36) de les mostres transicionals exhibien activitat de la telomerasa. En el nostre estudi, el percentatge de mostres transicionals amb activitat de la telomerasa va ser similar al percentatge de mostres de la mucosa normal que presentaven activitat de la telomerasa. En el nostre treball malgrat la mucosa transicional presentava canvis morfològics com l'augment en l'espessor de la mucosa, l'allargament de les criptes i la hiperplàsia de les cèl·lules calciformes (130) no va mostrar canvis en el patró d'expressió de l'activitat de la telomerasa respecte la mucosa normal.

Els primers estudis en CCR publicats arribaven a la conclusió que l'activitat de la telomerasa era imperceptible en la mucosa normal (104, 120, 122, 131, 132). Mentre altres estudis, la majoria d'ells més recents, van detectar l'activitat de la telomerasa en un rang d'entre el 9 i 44.5% de les mostres normals (110, 115-117, 119, 121, 122, 124). En aquest estudi l'AT en la mucosa normal es va detectar en un 53% dels casos (57/108). Aquesta divergència de resultats podria ser deguda a l'aplicació de les diferents variants de la tècnica TRAP, com ja s'ha comentat anteriorment, era la substitució del gel d'acrilamida per l'anàlisi realitzada per seqüenciador de DNA, canvi que ha millorat la sensibilitat de la tècnica. A més, es coneix que les cèl·lules mare (stem cells) en teixits en regeneració tenen activitat de la telomerasa; a l'intestí aquestes cèl·lules, com prèviament s'ha explicat en la introducció, es troben localitzades en la porció basal de les criptes i podrien ser responsables de la presència d'aquesta activitat en la mucosa normal (117,133). Per tant, no és estrany trobar certa activitat de la telomerasa en la mucosa normal a més s'ha descrit que l'AT sola no condueix a la transformació maligna sinó que són necessaris altres canvis en el genoma de la cèl·lula (23). Granger *et al.*, (23) van determinar que quan l'ambient histològic del tumor presentava AT (ex. epiteli intestinal) es considerava com un resultat positiu quan els nivells de telomerasa eren més alts que els del teixit control. No obstant, era possible discriminar entre el teixit

tumoral i normal per mitjà de tècniques quantitatives ja que les mostres normals mostraven valors molt inferiors (117,119).

Una manera d'analitzar els casos de mucosa normal amb AT positiva podria ser fent servir l'índex de la telomerasa (IT), aquest consisteix en restar a l'AT del tumor l'activitat de la telomerasa de la corresponent mucosa normal i després aplicar-hi el logaritme. El valor obtingut es considera com l'activitat de la telomerasa neta en el tumor, ja que el tumor també conté cèl·lules mare (*stem cells*) i possiblement alguns limfòcits activats (121). Els nivells baixos d'AT que es van detectar en la mucosa normal es van atribuir a les cèl·lules mare (*stem cells*) presents en les criptes intestinals i també a alguns limfòcits activats que poden ser presents en la mostra analitzada.

Igual que en els estudis trobats en la literatura, en aquest treball es van trobar diferències significatives entre la mitjana de l'AT del tumor (11.49 TPG) i la de la mucosa normal (1.09 TPG). Diferències significatives també van ser trobades entre la mucosa tumoral (11.49 TPG) i la mucosa transicional (1.51 TPG), però no entre l'activitat de la telomerasa de la mucosa transicional i la de la normal. Boldrini *et al.*, (119) també van analitzar la mucosa transicional i van observar que aquesta exhibia una activitat de la telomerasa molt baixa i amb uns valors molt similars als de la mucosa normal. En el nostre treball ambdues mucoses també exhibien el mateix comportament a nivell de l'activitat de la telomerasa. Tot i que inicialment es va plantejar l'estudi de les tres mucoses, al obtenir resultats sobre l'AT els quals eren molt similars entre la mucosa transicional i la normal, va fer que es decidís obviar l'estudi de la mucosa transicional a partir d'aquest moment en quan a posteriors estudis com la longitud del telòmer o l'expressió del TRF1. D'acord amb aquests resultats podríem afirmar que l'activitat de la telomerasa és significativament superior en mostres tumorals que en les transicionals i normals però no ens permet diferenciar entre la mucosa transicional i la normal. Possiblement a la mucosa transicional existeixin alguns canvis que predisposin al desenvolupament tumoral però l'activitat de la telomerasa encara no seria un d'ells. El fet que els tumors presentin una activitat de la telomerasa més elevada que la mucosa normal suggereix que quan s'aconsegueix un determinat nivell d'activitat de la telomerasa, aquest permet la proliferació "il·limitada" juntament amb altres canvis necessaris. Encara que una activitat basal podria significar senzillament un augment de la proliferació cel·lular.

En aquest estudi no es va trobar associació significativa entre l'AT en les diferents mucoses amb les variables anatomopatològiques estudiades, coincidint amb alguns estudis (110, 115, 117, 125, 132, 133). Però contràriament, altres estudis (116, 119, 121, 124) van descriure diferències significatives entre els grups clínics de l'estadi de Dukes i l'activitat de la telomerasa; Lukman *et al.*, (116) van observar que els estadis més avançats de la classificació Dukes presentaven nivells significativament més elevats

d'AT. Ghori *et al.*, (121) també van obtenir una correlació significativa entre l'estadi de Dukes i l'activitat de la telomerasa, els estadis més avançats mostraven major AT. Sanz-Casla *et al.*, (124) van observar que els pacients Dukes A presentaven un menor percentatge de tumors amb activitat telomerasa positiva que els pacients Dukes B, C i D. Boldrini *et al.*, (119) van obtenir nivells elevats de l'AT associats amb els estadis avançats de Dukes. Engelhardt *et al.*, (131) van agrupar els tumors en fases primerenques (Dukes A+B) i fases avançades (Dukes C+D), observant que les fases avançades mostraven 1.3 vegades més activitat de la telomerasa que les fases primerenques (sense significació estadística). D'altra banda, Kawanishi-Tabata *et al.*, (126) van trobar una associació significativa entre la classificació T i l'activitat de la telomerasa (negativa/positiva), on els T4 presentaven més percentatge de casos amb AT positiva que els T2 i T3. Boldrini *et al.*, (119) també van observar que els pacients T3 i T4 tenien uns nivells d'AT més elevats que els estadis inferiors, i que els pacients N1-N2 mostraven una AT significativament més elevada que els N0.

Són pocs els autors que han investigat fent servir l'índex de la telomerasa (IT), que és obtingut després de restar l'activitat de la telomerasa de la mucosa normal a la de la mucosa tumoral i aplicant el logaritme a aquesta diferència, essent el valor final l'activitat neta del tumor. En el nostre estudi aplicant l'índex de la telomerasa no es van trobar associacions significatives amb cap de les variables clíniques ni anatomopatològiques. Únicament es va observar una tendència a la significació amb l'edat, on els tumors dels individus més joves mostraven una AT neta del tumor, és a dir, un índex de la telomerasa, més elevat que els pacients del grup d'edat més avançada. Posteriorment, en els estudis de supervivència els individus més joves no van mostrar tenir ni pitjor pronòstic ni supervivència en la nostra sèrie. Per tant, creiem que aquesta AT neta del tumor més elevada en pacients joves es podria atribuir a que aquests presenten un metabolisme més actiu o una proliferació més elevada pel fet de ser més joves. En la literatura un treball també va obtenir una associació inversament significativa entre l'activitat de la telomerasa i l'edat (131). Shoji *et al.*, (110) van identificar una relació significativa de l'IT amb el nivell d'invasió de la paret (T) i també amb la invasió venosa (negativa/positiva).

Al classificar els pacients segons si presentaven alt o baix IT només es van trobar diferències significatives amb l'edat. L'edat, que abans s'ha vist que presentava una diferència gairebé significativa amb l'IT, al relacionar l'edat amb l'IT alt o baix la diferència va arribar a ser significativa. El grup d'edat ≤ 70 anys va mostrar un major percentatge de pacients amb IT alt que el grup d'edat més avançada.

2. LONGITUD DEL TELÒMER

La longitud del telòmer determina la capacitat proliferativa de les cèl·lules segons la teoria dels telòmers i l'envelliment (52). En cada divisió cel·lular les cèl·lules mare (*stem cells*) perden repeticions telomèriques, l'activitat de la telomerasa restitueix algunes de les repeticions perdudes però no totes, de manera que els telòmers fins i tot en les cèl·lules mare es van escurçant. Posteriorment, la vida proliferativa de les cèl·lules descendents de les cèl·lules mare dependrà de la longitud dels seus telòmers, ja que aquests descendents en una situació normal són telomerasa negatius. Si no hi ha cap mecanisme que compensi l'escurçament del telòmer les cèl·lules amb telòmers curts, haurien de tenir una vida proliferativa més curta que aquelles amb telòmers més llargs. En les cèl·lules tumorals no és tant senzill perquè entren en joc els mecanismes que mantenen la longitud dels telòmers (l'activitat de la telomerasa o bé el mecanisme ALT).

La hipòtesi inicial va ser que les mostres amb AT tindrien telòmers més llargs per tant, les seves cèl·lules tindrien una vida més llarga i en conseqüència un pitjor pronòstic pel pacient. Un cop es van haver analitzat els resultats obtinguts aquesta hipòtesi va deixar de ser vàlida ja que no es va trobar associació entre l'AT i la longitud del telòmers. Actualment, es creu que el paper de la telomerasa es mantenen estables els telòmers (56), ja que s'ha observat que la inestabilitat genòmica depèn en gran part de l'estat dels telòmers.

En la determinació de la longitud del telòmer, a diferència de l'anàlisi de l'activitat de la telomerasa, la tècnica utilitzada va ser la mateixa en tots els treballs, el Southern blot, i els resultats presents en la literatura com veurem a continuació són més homogenis.

En aquest estudi es va demostrar que la longitud del telòmer en la mucosa tumoral (mitjana 7.02 Kpb) era més curta que en la mucosa normal (mitjana 7.85 Kpb). Altres estudis sobre la longitud del telòmer en càncer colorectal també van observar un escurçament significatiu de la mucosa tumoral al comparar-la amb la mucosa normal (125, 131, 134-136). El rang de les mitjanes de la longitud del telòmer en aquests estudis en la mucosa tumoral i normal va ser 5.7-7.12 Kpb i 6.8-9.25 Kpb respectivament. Els estudis de la longitud del telòmer en altres tipus de carcinoma també coincidien en què existeix un escurçament del telòmer en la mucosa tumoral (101, 127, 137-140). Suggestint que l'escurçament dels telòmers és un fet general del procés carcinogènic en els diferents òrgans.

En aquest estudi no es van trobar diferències significatives entre la longitud del telòmer en les mucoses tumoral i normal i la ràtio de la longitud del telòmer (RLT) amb les variables anatomopatològiques. En la literatura s'han trobat estudis amb diferents

resultats, d'una banda, estudis com el de Gertler *et al.*, (134) que van observar que els telòmers dels estadis primerencs del tumor (I) eren significativament més curts que els dels tumors en estadis més avançats (II, III, IV) i el d'Engelhardt *et al.*, (131) que també van trobar que els telòmers en estadis primerencs (Dukes A+B) eren significativament més curts que els telòmers de tumors en estadis avançats (Dukes C+D). D'altra banda, Garcia-Aranda *et al.*, (125) van observar diferències significatives en la localització del tumor, tumors situats en el còlon dret mostraven telòmers més curts que els situats en el còlon esquerre i el recte; i també en el grau de diferenciació del tumor, els tumors ben diferenciats mostraven telòmers més llargs que els moderadament i pobrament diferenciats. La divergència d'aquests resultats no pot assegurar que la longitud del telòmer tingui cap relació amb les variables anatomopatològiques del tumor.

Al comparar la longitud del telòmer de tots els pacients entre la mucosa tumoral i normal es va observar que la diferència entre les seves mitjanes era significativa. També es va analitzar si aquesta diferència s'observava en cada una de les característiques clíniques i anatomopatològiques estudiades. Els resultats obtinguts van mostrar que només algunes de les variables mantien la diferència, aquestes van ser el sexe, l'edat, la localització del tumor i l'aspecte macroscòpic. Mentre que les característiques que feien referència al grau d'invasió del tumor, i el nivell d'afectació en estructures contigües, únicament els estadis intermedis mostraven una diferència significativa mentre que en els menys i els més evolucionats no era significativa. Degut al baix nombre de casos en els estadis menys evolucionats no podem estar segurs dels resultats obtinguts. Pel que fa als estadis més avançats el fet que les diferències no siguin significatives podria ser degut a que la mucosa normal realment ja no sigui "sana" i ja pateixi canvis en la regulació dels telòmers. Actualment, és acceptat que els elements que es troben en el microambient de les cèl·lules i dels teixits són reguladors decisius del comportament cel·lular en cultiu i de l'homeòstasi *in vivo*, i que els mateixos factors influeixen en el curs de la progressió del tumor (141). Per aquest motiu pensem que aquests factors podrien tenir com a diana el sistema de regulació dels telòmers, per tant aquests factors podrien actuar sobre les cèl·lules tumorals i també sobre les cèl·lules normals, provocant la reducció de la longitud dels telòmers. Un dels factors microambientals que s'ha demostrat que té un efecte sobre la LT és l'estrès oxidatiu (142). Segons Cawton *et al.*, la LT podria ser afectada per diversos factors incloent l'AT, l'índex de divisió cel·lular i la quantitat d'estrès oxidatiu, el qual podria ser determinat per factors genètics i ambientals (143). En els estadis més avançats en els que existeix la invasió d'estructures contigües creiem que la longitud del telòmer del que es va considerar mucosa normal ja havia pogut començar a patir escurçament, esdeveniment que s'ha identificat que té lloc en estadis primerencs de la carcinogènesi (144), degut al microambient en el que es troba.

A l'estudiar el comportament del telòmer en la mucosa tumoral respecte la corresponent mucosa normal es va observar que un 35% dels tumors escurçava els telòmers, un 10% els allargaven i en un 55% mantenien una longitud similar a la de la mucosa normal. Per una banda, va haver-hi un treball el de García-Aranda *et al.*, (125) on els percentatges en cada un dels grups van ser molt similars als nostres 40%, 12% i 48% respectivament. Per altra banda, els nostres resultats s'allunyaven una mica més d'altres estudis com Takagi *et al.*, (145), els quals van trobar un 62%, 5%, 33%; Kim *et al.*, (135) van obtenir un 80%, 10%, 10% respectivament. En tots aquests estudis predominaven l'escurçament i/o el manteniment dels telòmers, mentre l'allargament mostrava un percentatge baix. Altres autors com Engelhardt *et al.*, (131) i Gertler *et al.*, (134) van obtenir resultats més divergents als esmentats, ja que van observar un 90% d'escurçament, un 10% de manteniment i un 86% escurçament i un 14% d'allargament respectivament. En aquests dos últims estudis l'escurçament del telòmer representava més del 80% dels tumors i en cap dels dos estudis va haver-hi tumors que presentessin allargament dels telòmers o manteniment d'aquests respectivament, aquests resultats diferien dels esmentats en primer lloc. En tots els treballs el comportament que predominava era l'escurçament, excepte en els treballs de Garcia-Aranda *et al.*, (125) i en el nostre on la majoria de tumors presentaven manteniment de la longitud dels telòmers. Les diferències que es van observar en els percentatges d'allargament i manteniment podrien ser degudes als diferents mecanismes que els autors van utilitzar per a classificar el comportament dels telòmers. En el nostre estudi i en els de Garcia-Aranda *et al.*, (125), Takagi *et al.*, (145) i Kim *et al.*, (135) es va fer servir el mateix criteri (explicat en l'apartat de pacients i mètodes) per establir el comportament dels telòmers, mentre que els dos treballs (131, 134) que mostraven resultats més divergents no esmentaven el criteri emprat per a la classificació del comportament dels telòmers. Donat que els nostres resultats sobre el comportament dels telòmers eren molt similars als de Garcia-Aranda *et al.*, (125) grup ubicat a Madrid, ens va fer pensar que podria haver-hi factors genètics i/o ambientals atribuïbles a la població geogràfica d'Espanya. D'acord amb la hipòtesi de Harley sobre el funcionament del telòmers (52) s'esperaria que els tumors mantinguessin o allarguessin (65% dels tumors en aquest estudi) la longitud dels seus telòmers en comparació amb les corresponents mostres de mucosa normal ja que s'ha demostrat que els tumors presenten una activitat de la telomerasa significativament augmentada en relació a la mucosa normal. Actualment, s'ha postulat que la regulació dels telòmer depèn de dos factors, per una banda, la concentració de la telomerasa (nivell d'expressió) i per l'altra la conformació dels telòmers (oberta/tancada) que depèn de la quantitat de proteïnes unides a aquests. Per tant, el 55% dels tumors que mostraven un manteniment en la longitud del telòmer (no canvi respecte la longitud en la mucosa normal) podria ser

degut a un equilibri entre la proliferació i l'activitat de la telomerasa. El 35% dels tumors que mostraven escurçament dels telòmers podria ser que tot i que s'expressés la telomerasa per algun motiu aquesta no tingués accés als telòmers o bé degut a una dèbil o insuficient concentració de la telomerasa. Mentre que el 10% que allargaven els seus telòmers es podria atribuir a una elevada concentració de la telomerasa i una accessibilitat d'aquesta als telòmers o bé que en aquests tumors actués el mecanisme alternatiu de l'allargament dels telòmers (ALT) o que ambdós mecanismes actuessin conjuntament (97). El mecanisme ALT possiblement tingui una major eficiència i pugui afegir més repeticions telomèriques que no pas la telomerasa, ja que s'ha demostrat que les cèl·lules ALT positives tenen telòmers més llargs que les telomerasa positives (94, 98) de manera que permetria que els telòmers dels tumors fossin més llargs que els de la mucosa normal. La teoria del funcionament dels telòmers es compliria en el 65% dels tumors però en el 35% no seria aplicable. Per tant, creuríem necessari estudiar alguns factors com TRF-1 i TRF-2 ja que serien la tercera part implicada en l'homeòstasi de la regulació dels telòmers.

Al comparar la mitjana de la longitud del telòmer en la mucosa tumoral en els tres grups de comportament dels telòmers les diferències van resultar ser significatives però no van ser-ho al comparar la LT de la mucosa normal. Això ens estava indicant que era la mucosa tumoral la que realment era modificada, ja que la longitud del telòmer en aquesta mucosa variava molt entre els grups. Quan es va comparar la longitud de telòmer entre la mucosa tumoral i normal en cada grup de comportament les diferències van ser significatives en els tres grups. En els grups de tumors que escurçaven i allargaven els telòmers, aquestes diferències ja eren d'esperar perquè per definició les diferències entre les mostres aparellades de cada pacient superaven el 20%. Però en el grup dels tumors que mantenien la longitud dels seus telòmers les diferències entre la longitud del telòmer en les mostres aparellades no superaven la diferència del 20%, però quan aquests pacients van ser tractats en grup la diferència va arribar a ser significativa. Tot i que comparant ambdues mucoses pacient a pacient les diferències no fossin suficients per a considerar que la longitud del telòmer de la mucosa tumoral s'escurçava respecte la normal, quan es va agafar el grup de pacients que no variaven la longitud dels seus telòmers la diferència entre la mitjana de la longitud de cada mucosa sí que va mostrar una diferència significativa, indicant que la LT en el tumor sempre era més curta que la de la mucosa normal, exceptuant el 10% de tumors que van presentar allargament.

En aquest estudi, no es va trobar associació entre el comportament del telòmers (escurçament, allargament i no canvi) i les variables anatomopatològiques. Aquests resultats coincidien amb els de Garcia-Aranda *et al.*, (125). Contràriament, Takagi *et al.*, (145) van trobar que la major part de tumors del tipus I de la classificació de

Borrmann mostraven escurçament del telòmer i la seva freqüència era significativament diferent en els carcinomes de tipus II; també van observar que el percentatge d'escurçament del telòmer era significativament diferent depenent de la localització del tumor, superior en el còlon ascendent que en el sigma i el recte. Kim *et al.*, (135) van observar que els pacients Dukes C presentaven un percentatge d'escurçament significativament més elevat que els Dukes B. Els resultats continuaven essent divergents entre els diferents treballs publicats.

Al mateix temps es va observar que la longitud del telòmer en la mucosa normal presentava un comportament paral·lel al de la mucosa tumoral; entenen com a comportament paral·lel el fet que en un mateix pacient ambdues mucoses presentin un mateix patró, és a dir, els telòmers serien o bé curts o llargs en ambdues mucoses. Altres autors, Garcia-Aranda *et al.*, (125) i Nakamura *et al.*, (136) també van trobar una correlació positiva de la LT entre ambdues mucoses. Aquests resultats indicarien que la longitud del telòmer i el seu comportament són diferents en cada individu i que poden tenir un patró que es mantingués en la mucosa normal i tumoral. El nombre de parells de bases que es perden per divisió cel·lular és variable segons el tipus cel·lular (146) i possiblement existeixin diferències interindividuais però no intraindividuals entre la mucosa tumoral i normal ja que hem observat que el seu comportament és paral·lel. Encara que la mucosa tumoral presentava un telòmer més curt perquè el seu número de divisions cel·lulars era més elevat. Aquest fet donava suport a la nostra metodologia d'agafar com a factor pronòstic no un punt de tall en la longitud del telòmer de la mucosa tumoral sinó una ràtio entre la LT tumoral i normal, sense que en aquesta interferissin les diferències entre individus perquè cada persona tenia la seva ràtio que depenia del quocient entre la longitud del telòmer en la mucosa tumoral i la longitud del telòmer en la corresponent mucosa normal. L'escurçament del telòmer en la mucosa tumoral respecte la normal era indicativa de l'extensiva proliferació del tumor, indicant que la progressió del tumor trencaria el balanç entre la pèrdua de telòmer proliferativa i la síntesis telomèrica de *novo* (134). D'acord amb la hipòtesi dels telòmers, la longitud dels telòmers en cèl·lules sense activitat de la telomerasa esperaríem que disminuís amb l'edat. No es va trobar correlació entre l'edat i la longitud del telòmer ni en la mucosa normal ni en la tumoral. Però altres autors com Gertler *et al.*, (134) van trobar una correlació entre la longitud del telòmer i l'edat només en la mucosa normal, on els pacients més joves presentaven telòmers més llargs. Mentre Nakamura *et al.*, (136) van obtenir relació entre la longitud del telòmer i l'edat en ambdues mucoses, la raó per la qual trobaven relació entre l'edat i la longitud del telòmer tan en la mucosa tumoral com en la normal podria ser perquè hi havia una correlació entre la longitud del telòmer en ambdues mucoses. D'acord amb la teoria dels telòmers Hastie *et al.*, (147) van demostrar que els telòmers eren molt més

curts en la mucosa colònica i en sang que en teixit fetal i esperma i que hi havia una reducció en la longitud del telòmer amb l'edat en sang i en la mucosa sana del còlon. Per tant, en el nostre estudi el que s'esperava era que l'edat mostrés relació amb la longitud del telòmer en la mucosa normal ja que en la mucosa tumoral la regulació de la longitud del telòmer considerem que estava alterada. Però la mucosa normal no va mostrar aquesta correlació amb l'edat, posant de manifest que la mucosa normal de pacients amb CCR presentaria una alteració en el comportament dels telòmers i corroboraria el possible efecte del microambient tumoral sobre aquesta mucosa.

3. RELACIÓ ENTRE L'ACTIVITAT TELOMERASA I LONGITUD DEL TELÒMER

Els resultats que es van obtenir en aquest apartat no van ser els que s'esperaven quan es va plantejar l'estudi. S'esperava que les mostres telomerasa positives presentarien uns telòmers més llargs que aquelles que eren telomerasa negatives. En canvi el que es va observar va ser que els tumors amb AT positiva van mostrar una longitud dels seus telòmers gairebé significativament més curts que els dels tumors amb AT negativa. Una possible explicació seria que les mostres telomerasa negatives presentessin el mecanisme alternatiu i que les mostres tumorals telomerasa positives dependrien de la concentració de factors d'unió als telòmers (conformació oberta/tancada) perquè la telomerasa pogués actuar. L'ALT compensaria l'escurçament del telòmer per mecanismes basats en la recombinació, i per tant independents de la telomerasa. Aquest mecanisme alternatiu del manteniment dels telòmers no s'ha descartat que pugui coexistir amb la telomerasa en un mateix tumor i potser fins i tot en una mateixa cèl·lula. Per tant, alguns tumors telomerasa positius podrien presentar ambdós fenòmens (97). En la mucosa normal la longitud dels telòmers va resultar ser molt similar entre les mostres telomerasa positives i les negatives, ja que l'activitat que va mostrar la mucosa normal era dèbil. Contràriament als nostres resultats, Garcia-Aranda *et al.*, (125) van observar que els tumors AT (+) presentaven telòmers més llargs que aquells amb AT (-), sense que aquestes diferències fossin significatives.

El comportament dels telòmers va presentar una distribució significativament diferent entre els tumors telomerasa positius i els telomerasa negatius. La majoria de tumors telomerasa negatius mantenien la longitud dels seus telòmers, i només 1 tumor amb AT (+) escurçava els telòmers. Només un 12% dels tumors telomerasa positius allargaven els seus telòmers, mentre un 39% els escurçaven, possiblement perquè la taxa de proliferació era superior a l'expressió de la telomerasa o bé perquè l'estructura dels telòmers no permetia l'accés d'aquesta. Un 41% mantenien la longitud dels seus

telòmers, una explicació podria ser que la proliferació i l'expressió de la telomerasa mantindrien un equilibri.

En la literatura existeixen dos estudis els quals tampoc van observar correlació entre l'activitat de la telomerasa i la longitud del telòmer en els tumors (133, 145), mentre que Gertler *et al.*, (134) van trobar correlació significativa entre la longitud del telòmer i l'expressió de la subunitat hTERT de la telomerasa tan en la mucosa tumoral com en la normal. Una possible explicació al fet de no poder observar una relació directa entre l'activitat de la telomerasa i la longitud del telòmer es degut a que les cèl·lules tumorals per la longitud dels seus telòmers ja haurien d'haver entrat en senescència però gràcies a la pèrdua dels controls cel·lulars haurien continuat dividint-se i haurien activat la telomerasa per a sobreviure, per tant, la telomerasa no podia reconstituir aquesta gran pèrdua sinó únicament mantenir una longitud estable que permetés a les cèl·lules continuar proliferant. És a dir, que el fet de trobar els telòmers de la mucosa tumoral més curts que els de la normal seria lògic segons aquest plantejament.

Es va analitzar la correlació entre l'AT i la LT en les diferents característiques anatomopatològiques estudiades per veure si en alguna de les característiques del tumor o en determinats estadis d'aquest es podia observar la correlació entre l'AT i la LT sense que cap correlació fos detectada.

Aquestes observacions sumades al fet que no es va trobar correlació entre l'activitat de la telomerasa i la longitud del telòmer en la mucosa tumoral ens va fer pensar i) que potser el fet que els tumors amb AT negativa tinguessin els telòmers més llargs que els tumors amb AT positiva podria ser degut al mecanisme alternatiu del manteniment del telòmer, possiblement aquest era més eficient a l'hora d'afegir repeticions telomèriques (94, 98) ii) que el mecanisme alternatiu del manteniment del telòmer fos present tan en els tumors telomerasa negatius com en els telomerasa positius (97), iii) que existís algun factor que no ens deixés veure la relació directa entre l'activitat de la telomerasa i la longitud del telòmer com per exemple algun dels factors d'unió al telòmer com podien ser TRF1 i TRF2 els quals tenen un paper en la regulació dels telòmers, iv) a més molts autors coincideixen en que els factors ambientals cel·lulars, com per exemple l'estrès oxidatiu i l'estrès psicològic crònic poden conduir a l'escurçament del telòmer i a la disminució de l'activitat de la telomerasa (148). Tots aquests factors que influeixen sobre l'AT i la LT no són excloents entre ells, de manera que tots podrien col·laborar en certa mesura.

4. EXPRESSIÓ DEL TRF1

En els apartats anteriors hem observat que l'activitat de la telomerasa es trobava augmentada i la longitud del telòmer disminuïda respecte la mucosa normal. A més no es va trobar correlació entre l'activitat de la telomerasa i la longitud del telòmer ni en la mucosa tumoral ni en la normal. Això ens va fer pensar que possiblement hi havia algun factor que potser regulava o tenia un efecte sobre l'AT i la longitud del telòmer. El candidat escollit va ser el TRF1. Aquesta proteïna es troba als extrems dels telòmers ajudant a mantenir l'estructura de *T-loop* que adopten els telòmers per protegir-se de la degradació (50, 93). La quantitat del complex TRF1 unida als telòmers es proporcional a la seva longitud i impedeix físicament que la telomerasa s'uneixi als extrems dels telòmers i afegeixi repeticions telomèriques que compensin l'escurçament del telòmer (59). Indicant que els telòmers llargs presentarien una elevada quantitat de TRF1 unida als telòmers i per tant aquests no serien allargats, mentre que els més curts al tenir menys quantitat de TRF1 unit presentarien prioritat per a ser allargats. El TRF1 controlaria l'acció de la telomerasa sobre cada telòmer de manera individual. Llavors s'aconseguiria un equilibri en la longitud dels telòmers de la cèl·lula si la quantitat de TRF1 unit als telòmers fos suficient per evitar una innecessària elongació per la telomerasa però suficientment baixa per permetre que l'enzim pogués allargar aquells telòmers més curts (59). Però també es coneix que una sobreexpressió de TRF1 provoca un escurçament dels telòmers en les cèl·lules telomerasa positives (50).

Per Western blot es va detectar que un 95% i un 89% de les mostres tumorals i normals respectivament expressaven TRF1. Al classificar ambdues mucoses segons el nivell d'expressió del TRF1 es va observar que els tumors presentaven un elevat percentatge de mostres amb un nivell d'expressió del TRF1 elevat. La ràtio entre l'expressió del TRF1 en la mucosa tumoral i normal ens va mostrar que en més de la meitat de les mostres (55%) el tumor presentava una expressió superior de la que presentava la mucosa normal i solament en un 11% dels casos l'expressió era superior en la mucosa normal. En la literatura s'han trobat treballs molt diversos pel que fa a les tècniques utilitzades per a determinar l'expressió del TRF1, els tipus de tumors analitzats i els resultats obtinguts. Les principals tècniques per a estudiar el TRF1 són el Western blot (WB) a través del qual es determina el nivell de proteïna; la PCR retrotranscriptasa (RT-PCR) que mesura els nivells de mRNA de la proteïna; i la immunohistoquímica (IQ) que és una altra tècnica per a mesurar el nivells de proteïna. Garcia-Aranda *et al.*, (125, WB/càncer colorectal), Oh *et al.*, (149, RT-PCR/hepatocarcinoma), Kanauchi *et al.*, (150, RT-PCR/ càncer adrenal) i Matsutani *et al.*, (151, RT-PCR/càncer gàstric) van obtenir que la mucosa tumoral mostrava major expressió del TRF1 que la mucosa normal. Mentre que La Torre *et al.*, (152, WB/càncer cerebral) van observar que el

cervell normal, sa, no expressava TRF1 i per tant, que els nivells en teixit tumoral eren més elevats. Contràriament a aquests resultats Saito *et al.*, (153, RT-PCR/càncer de mama), Shi *et al.*, (154, WB/leucèmies) i Yamada *et al.*, (155, RT-PCR/càncer gàstic) van observar que el teixit normal mostrava uns nivells d'expressió del TRF1 superiors als del tumor, i Miyachi *et al.*, (156, IQ/càncer gàstic) obtenien un índex de cèl·lules TRF1 positives superior en les mostres normals. Aragona *et al.*, (157, IQ/tumors gastrointestinals) van observar que el 94.7% dels tumors no expressaven TRF1.

En aquest treball no es va trobar associació entre els nivells d'expressió del TRF1, classificat en 4 categories, i les característiques anatomopatològiques. Degut que en algunes d'aquestes categories hi havia un baix nombre de casos es va decidir classificar l'expressió del TRF1 en només dues categories: expressió negativa/dèbil i expressió intermèdia/alta. La ràtio del TRF1 entre la mucosa tumoral i normal també es va transformar en una variable dicotòmica. Després d'aquesta recllassificació es van observar algunes associacions significatives. L'expressió del TRF1 en la mucosa normal mostrava una associació significativa amb el sexe, on més de la meitat dels homes presentaven expressió negativa/dèbil, mentre les dones mostraven majoritàriament expressió intermèdia/alta. El comportament dels telòmers va presentar una associació significativa amb l'expressió del TRF1 en la mucosa tumoral, on es va observar que els telòmers que no variaven la seva longitud presentaven un elevat percentatge de mostres amb una elevada expressió del TRF1, aquest fet podria estar indicant alguna relació entre el TRF1 i la longitud dels telòmers, però aquest aspecte serà comentat amb més profunditat en l'apartat següent. També es va observar una associació entre el grau de diferenciació i la ràtio del TRF1, tots els tumors ben diferenciats expressaven baix TRF1. En la literatura alguns treballs van observar associació entre l'expressió del TRF1 i les característiques anatomopatològiques; un primer treball en el qual el percentatge de cèl·lules TRF1 positives es correlacionava positivament amb la histologia dels tumors gàstrics (a major nivell de diferenciació major expressió de TRF1) i negativament amb el grau de profunditat d'aquest (a major grau de profunditat menor expressió del TRF1)(156); un segon treball va observar una associació significativa entre l'expressió del TRF1 en tumors cerebrals i el grau histològic del tumor, a major grau menor expressió del TRF1 (152). Saito *et al.*, (153) van trobar associació significativa de l'expressió del mRNA del TRF1 amb la mida del tumor de mama (tumors petits mostraven una expressió més elevada de TRF1), i també amb la presència o absència de receptors per a la progesterona (els tumors amb receptors per a la progesterona presentaven nivells de TRF1 superiors a aquells que no els presentaven).

5. RELACIÓ DE L'EXPRESSIONI DEL TRF1 AMB L'ACTIVITAT DE LA TELOMERASA I LA LONGITUD DEL TELÒMER

Es va observar que els pacients amb tumors telomerasa negatius tenien un percentatge més elevat de mostres amb expressió intermèdia/alta del TRF1, no obstant l'anàlisi estadística no va arribar a ser significativa, tot i que va mostrar una tendència, potser amb un nombre de mostres superior aquesta diferència podria arribar a ser significativa. Però contràriament, en el treball realitzat per Garcia-Aranda *et al.*, (125) van detectar una major expressió de TRF1 en tumors colorectals telomerasa positius versus els telomerasa negatius, sense que la diferència fos significativa. D'acord amb els nostres resultats, Saito *et al.*, (153) van observar que els tumors de mama telomerasa negatius tenien una expressió del mRNA TRF1 significativament més elevada que els telomerasa positius. Shi *et al.*, (154) van obtenir una correlació negativa entre l'AT i l'expressió del TRF1, en les leucèmies mentre que Kanauchi *et al.*, (150) van observar una correlació directa entre l'expressió d'hTERT i la del TRF1 en els càncers adrenals. Actualment, és conegut que el TRF1 unit als telòmers impedeix físicament la unió de la telomerasa amb aquests i no en permet la seva elongació. Una possible explicació seria que el TRF1 podria actuar de manera diferent segons si els tumors fossin telomerasa positius o negatius.

Les mostres amb una expressió del TRF1 intermèdia/alta presentaven una longitud dels telòmers més llarga (sense significació estadística) que aquelles amb expressió negativa/baixa, tan en la mucosa tumoral com en la normal. Coincidint amb aquesta relació, Ohyashiki *et al.*, (158) van obtenir que les leucèmies amb telòmers llargs expressaven nivells de TRF1 superiors, mentre les leucèmies amb telòmers curts eren les que alhora presentaven uns nivells de TRF1 més baixos (sense significació). Aquests resultats coincideixen amb els d'altres autors els quals afirmaven que la quantitat de TRF1 unit als telòmers era proporcional a la longitud d'aquests (50). D'altra banda, en la literatura hi ha un treball en el qual no troben correlació entre l'expressió del TRF1 i la longitud dels telòmers en els hepatocarcinomes (149).

Per establir una possible associació entre les tres variables estudiades en aquest treball (AT, LT i expressió del TRF1) es va estudiar la relació entre elles de dues en dues. El comportament dels telòmers va mostrar relació amb l'expressió del TRF1, abans ja hem comentat que la mitjana de la longitud del telòmer mostrava una diferència gairebé significativa amb l'expressió del TRF1, ara no era directament la longitud dels telòmers sinó el comportament d'aquests el que presentava associació amb l'expressió del TRF1. D'altra banda l'expressió del TRF1 no tenia relació amb l'activitat de la telomerasa.

En general es va trobar que els tumors amb AT (-) expressaven més TRF1 i a la vegada tenien telòmers més llargs, mentre que els tumors AT (+) expressaven menys TRF1 i tenien telòmers més curts, una possible explicació per aquest comportament seria que els telòmers més llargs tindrien la capacitat d'unir més molècules de TRF1 que els més curts, els quals tenen menys seqüències telomèriques (59).

La majoria de tumors van presentar activitat de la telomerasa positiva i més de la meitat també van mostrar AT en les mucoses transicional i normal. El tumor es diferenciava de les mucoses transicional i normal tan en percentatge de mostres amb AT positiva com en el valor d'aquesta activitat, mentre les mostres transicionals van presentar percentatges d'AT baixos i valors d'aquesta molt similars als de la mucosa normal. L'activitat de la telomerasa no era associada amb cap de les variables anatomopatològiques del tumor. Un 55% dels pacients tenien un IT positiu, és a dir, una activitat neta del tumor positiva.

La longitud del telòmer en la mucosa tumoral era significativament més curta que en la mucosa normal. Al comparar la LT de cada tumor amb la corresponent mucosa normal obteníem que més de la meitat dels tumors mantenien la longitud dels seus telòmers similar a la de les corresponents mucoses normals, un petit percentatge (10%) presentaven els telòmers més llargs en la mucosa tumoral i un percentatge inferior a la meitat mostraven un escurçament de la longitud del telòmer respecte la mucosa normal. La longitud del telòmer tampoc va mostrar associació amb cap de les variables del tumor estudiades. La longitud del telòmer no va mostrar correlació amb l'edat ni en la mucosa tumoral ni en la normal.

Les mostres amb AT (+) mostraven telòmers més curts (sense significació) que les mostres AT (-), i a més l'AT i l'LT no es correlacionaven ni en la mucosa tumoral ni en la normal. De les 11 mostres que allargaven els seus telòmers, 10 mostraven AT (+) i només 1 era AT (-), dels 36 tumors que escurçaven els telòmers 33 presentaven AT (+) i només 3 AT (-), 57 tumors no variaven la longitud dels seus telòmers, és a dir els mantenien similars als de la mucosa normal, 41 dels quals presentaven AT (+). Creiem que els tumors que mostraven allargament dels telòmers aquest podria ser degut a l'AT, excepte un cas que era AT (-), que aquest podria presentar el mecanisme alternatiu; els tumors que escurçaven els telòmers seria lògic pensar que aquest escurçament era degut a una AT negativa o molt baixa, però la mitjana de l'AT en aquest grup era molt similar a la que presentaven els tumors que allargaven els seus telòmers, per això creiem que l'AT en aquests tumors no era suficient per a mantenir la longitud del telòmer i que en els tumors que allargaven els seus telòmers a més de l'activitat de la telomerasa també podria expressar-se el mecanisme alternatiu i seria aquest el que permetria allargar-los; els tumors que mantenien la longitud del telòmer similar a la de la mucosa normal alguns d'ells presentaven AT (-) i per tant podrien presentar

únicament el mecanisme alternatiu i els altres tenien AT (+) aquesta era més alta que la dels grups en què s'allargaven o escurçaven doncs podria ser l'AT fos suficient per a mantenir la longitud dels telòmers en aquests tumors.

Els tumors presentaven un major percentatge d'expressió alta del TRF1 que la corresponent mucosa normal. Els tumors amb AT (-) i expressió alta de TRF1 eren un percentatge més elevat que els tumors amb AT (+). Els tumors amb expressió alta del TRF1 tenien telòmers més llargs que els que tenien una expressió del TRF1 més baixa, en la mucosa normal també s'observava aquest mateix comportament.

En general es va poder observar que els tumors AT (+) tenien els telòmers més curts que els tumors AT (-) i a la vegada presentaven menor expressió del TRF1, mentre els tumors AT (-) presentaven telòmers més llargs i expressaven majors nivells de TRF1. Aquests resultats coincidien amb articles ja citats els quals afirmen que existeix una relació directa entre la longitud del telòmer i el factor d'unió als telòmers 1 (TRF1), és a dir, els telòmers més llargs tenen més llocs d'unió per a aquests factors (59). El fet de trobar els telòmers més curts en els tumors AT (+) creiem que seria perquè l'activitat de la telomerasa no seria capaç de restituir les repeticions telomèriques que es perdrien en cada cicle de divisió cel·lular mentre els tumors AT (-) podrien tenir activat el mecanisme alternatiu basat en processos de recombinació i l'eficiència d'aquest mecanisme seria més elevada i permetria no només restituir les pèrdues telomèriques sinó afegir-ne més de les que s'havien perdut, ja que alguns autors han observat telòmers més llargs en cèl·lules amb el mecanisme alternatiu que els de cèl·lules telomerasa positives (98). Garcia-Aranda *et al.*, (125) van observar que els tumors colorectals amb AT (+) que escurçaven els seus telòmers mostraven una expressió del TRF1 significativament més elevada que els tumors sense escurçament. Matsutani *et al.* (151) van observar que els carcinomes gàstrics amb telòmers curts expressaven significativament nivells més alts de telomerasa i de TRF1 i els tumors gàstrics amb telòmers llargs tendien a expressar nivells baixos de la telomerasa i del TRF1.

6. ESTUDIS DEL TEMPS LLIURE DE MALALTIA I DE LA SUPERVIVÈNCIA GLOBAL

El temps lliure de malaltia i la supervivència global fins avui s'han relacionat amb les classificacions de Dukes i Astller-Coller o bé amb l'estadi TNM que presentaven els pacients en el moment del diagnòstic i aquests són els que anomenem factors pronòstics clàssics. Aquests factors presenten una associació amb els temps lliure de malaltia i el temps de supervivència global, així els estadis més avançats pateixen un major nombre de progressions i de defuncions que els estadi menys evolucionats; aquests resultats també els hem observat en aquest treball. Actualment el que s'intenta es trobar un o més factors pronòstics independents que ens determinin aquells

pacients que tindran un major risc de presentar progressió de la malaltia o de morir, amb una eficiència major que la que ens donen els factors pronòstic clàssics. Aquesta necessitat de trobar factors pronòstic millors ha portat als investigadors a buscar aquests factors entre els gens, les mutacions dels quals estan involucrades en el procés de múltiples etapes que caracteritza la carcinogènesi colorectal. Aquests inclouen principalment el gen APC, K-ras, DCC, p53, TGF- β , la inestabilitat de microsatèl·lits entre d'altres (159-164). En aquest treball es van escollir l'AT en forma de l'IT, la longitud del telòmer com a comportament dels telòmers i ràtio de la longitud dels telòmers i l'expressió del TRF1.

En aquesta part dels estudis de supervivència i recerca de factors pronòstics, els diferents anàlisis van ser realitzats pels pacients amb càncer de còlon i de recte separatament i també conjuntament per observar si existien diferències. Els percentatges de recidiva, progressió i mortalitat als 2 i 4 anys eren més elevats en els pacients amb càncer de recte respecte als de còlon. A més d'haver-hi un major nombre d'esdeveniments, aquests tenien lloc abans en el temps en aquest grup de pacients. En el nostre estudi van recidivar 27 pacients la majoria dels quals van fer-ho durant els dos primers anys, durant aquest període van tenir lloc el 100% de les recidives del còlon, el 83.3% de les del recte i el 85.7% de les recidives colorectals en conjunt. Aquests resultats coincidien amb els de Sadahiro *et al.*, (41) els quals van observar que un 77% de les recidives que es donaven ho feien durant els 2 anys següents a la cirurgia.

Els pacients amb càncer de còlon van mostrar associació significativa entre el temps lliure de malaltia i la classificació T als 2 anys i el comportament dels telòmers als 4 anys, on els pacients que mantenien la longitud dels seus telòmers presentaven un temps lliure de malaltia superior i els que els allargaven eren els que presentaven pitjor pronòstic. En els pacients amb càncer de recte, la classificació N i l'IT eren factors pronòstic independents als 2 anys. Aquests resultats indicaven que els pacients amb un índex de la telomerasa superior a 0.85 o els pacients amb nòduls limfàtics envaïts pel tumor tenien més possibilitats de patir progressió de la malaltia durant els 2 anys posteriors a la cirurgia que els pacients amb un baix índex de la telomerasa i/o ganglis limfàtics no envaïts pel tumor. Als 4 anys només la classificació N va resultar ser un factor pronòstic independent per a la progressió de la malaltia en el recte. Al tractar tots els pacients conjuntament cap de les variables va resultar ser un factor pronòstic independent per a la progressió de la malaltia ens els pacients amb càncer colorectal ni als 2 ni als 4 anys. L'IT determina una activitat de la telomerasa en el tumor rellevant ja que s'hi havia restat l'activitat basal o dèbil que presentava la mucosa normal i posteriorment s'hi havia aplicat el logaritme. A major IT el tumor podria restituir les repeticions telomèriques que es perden en cada divisió cel·lular i així evitar

l'escurçament excessiu del telòmer que conduiria la cèl·lula a la senescència o a l'apoptosi i permetre que es divideixi un major nombre de vegades i d'aquesta manera oferir una major capacitat proliferativa al tumor. Els factors pronòstics independents per a la progressió de la malaltia van ser la classificació N i l'IT als 2 anys i la classificació N als 4 anys en els pacients amb càncer de recte. Mentre que en els de còlon no es va trobar cap factor pronòstic i a l'agafar ambdós grups conjuntament tampoc. En la literatura existeixen estudis que mostren evidències d'un comportament etiològic, patològic i clínic diferent, entre els tumors de còlon i recte (165-167). Per tant, varem pensar que també podrien existir factors pronòstics diferents per a cada un d'aquests tumors, encara que aquest fet no sigui compartit per la resta d'autors que trobem en la literatura.

El factor pronòstic independent per al temps de supervivència als 2 anys va ser únicament la ràtio de la longitud del telòmer en els pacients amb càncer de còlon. Així, els pacients amb una RLT inferior a 1 eren aquells que tenien una LT en el tumor més que la corresponent mucosa normal (ja que la ràtio de la longitud del telòmer s'obtenia de realitzar el quocient entre la LT de la mucosa tumoral i la LT de la normal) presentaven major supervivència donat que els telòmers curts no permetien una elevada proliferació del tumor. Als 4 anys cap de les variables va ser un factor pronòstic independent per a la supervivència en els pacients amb càncer de còlon. L'IT va ser un factor pronòstic independent pel temps de supervivència global als 2 anys en els pacients amb càncer de recte, indicant que els pacients amb un IT inferior a 0.85 tenien una supervivència significativament superior als que tenien un IT alt, a més aquest era un factor pronòstic per a poder determinar aquells pacients amb major risc de morir durant els 2 anys següents a la cirurgia. La classificació N i l'IT van resultar ser factors pronòstics independents per a la supervivència als 4 anys. Els pacients amb càncer colorectal no van mostrar cap factor pronòstic independent per a la supervivència global ni als 2 ni als 4 anys.

En resum, es van trobar dos factors pronòstics per a preveure la progressió de la malaltia als 2 anys en el malalts de càncer de recte que van ser la classificació N i l'IT, mentre que als 4 anys només ho era la classificació N. Podria ser perquè el nombre de casos era baix o bé perquè dels 2 als 4 anys es produïen un baix nombre de progressions de la malaltia amb una manca de potència estadística. En el temps de supervivència global van ser factors pronòstics als 2 anys la ràtio de la longitud dels telòmers en els pacients amb càncer de còlon i l'IT als 2 anys i la classificació N i l'IT als 4 anys van ser-ho en els pacients amb càncer de recte. Aquests resultats ens mostraven de nou com les carcinogènesis de còlon i recte presentaven certes diferències ja que es va observar que la longitud del telòmer tenia un paper més

important en la carcinogènesi del còlon mentre que l'AT a través de l'IT tenia més protagonisme en el de recte.

El pronòstic dels pacients amb CCR ha estat relacionat amb les classificacions de Dukes, Astler-Coller, TNM i altres. Però aquests factors exhibeixen una àmplia variabilitat entre els estadis de la malaltia i la progressió. Per a poder identificar els pacients amb un risc elevat de desenvolupar la progressió de la malaltia s'estan buscant nous marcadors amb ràtios de discriminació més elevats i millors. Els factors que s'estan estudiant són els relacionats amb els telòmers i els seus mecanismes de regulació. Els estudis de supervivència i els factors pronòstics per al temps lliure de la malaltia i el temps de supervivència global en el CCR publicats sobre l'activitat de la telomerasa fins aquest moment són pocs i contradictoris. Tatsumoto *et al.*, (133) en la seva sèrie de 100 pacients que van seguir durant 5 anys i els quals van classificar segons alta o baixa activitat de la telomerasa; van obtenir, per mitjà dels gràfics de supervivència de Kaplan-Meier, diferències significatives entre l'AT i la supervivència lliure de malaltia i també amb la supervivència global. Aquestes conclusions indicaven que els pacients amb alta activitat de la telomerasa tenien pitjor pronòstic clínic amb una elevada probabilitat de patir recidiva i menors probabilitats de supervivència. Però no van comprovar si l'activitat de la telomerasa era un factor pronòstic independent per a la progressió de la malaltia i la supervivència. Per una banda, aquests resultats serien similars als del nostre estudi perquè determinen l'AT com a factor pronòstic però per l'altra, Tatsumoto *et al.*, (133) no van comprovar que l'AT fos un factor pronòstic independent i tampoc van estudiar per separat els pacients amb càncer de còlon i de recte. Sanz-Casla *et al.*, (124) van classificar els seus 103 pacients, els quals van seguir durant 1 any, segons l'activitat de la telomerasa negativa o positiva i van observar que els pacients amb AT negativa presentaven un 100% de supervivència lliure de malaltia i un 100% de supervivència global. Garcia-Aranda *et al.*, (125) van estudiar 68 pacients en els quals van identificar l'AT positiva com un marcador de tendència cap a pitjor pronòstic (temps lliure de malaltia). Kawanishi-Tabata *et al.*, (126) van classificar els 122 pacients, els quals van fer un seguiment de 3 anys, segons AT (-/+), i van trobar una correlació inversament significativa entre l'AT i la supervivència lliure de malaltia, indicant que els pacients amb una activitat de la telomerasa positiva tenien un millor pronòstic, menys probabilitats de patir recidiva. No van trobar relació entre l'AT i la supervivència global. Una possible explicació per aquestes divergències podria ser que Kawanishi-Tabata *et al.*, (126) només van agafar pacients en l'estadi II del CCR.

Els estudis sobre la longitud del telòmer com a factor pronòstic existents en la literatura presentaven resultats similars als del nostre treball. Gertler *et al.*, (134) van observar que els 22 pacients amb telòmers més curts o iguals a 5.4 Kpb presentaven

una supervivència global més elevada que els 35 pacients amb la longitud del telòmer en la mucosa tumoral superior a 5.4 Kpb. També van observar que els pacients (n = 43) amb una RLT igual o inferior a 0.9 Kpb presentaven una supervivència global més elevada que els pacients (n = 14) amb una RLT > 0.9. Però únicament la ràtio de la longitud del telòmer va resultar ser un factor pronòstic independent per a la supervivència global. Garcia-Aranda *et al.*, (125) van classificar els 68 pacients en els que tenien una longitud del telòmer en la mucosa tumoral ≤ 6.12 Kpb i els que presentaven la longitud del telòmer > 6.12 Kpb. Van observar que el grup de pacients amb els telòmers més llargs presentaven pitjor pronòstic en relació a la supervivència lliure de malaltia, i també van trobar que aquest també era un factor pronòstic independent. També van poder observar que el grup de pacients amb longitud del telòmer en la mucosa tumoral > 6.12 Kpb mostraven menor probabilitat de supervivència comparats amb aquells que tenien la longitud del telòmer ≤ 6.12 Kpb, sense que la diferència arribés a ser significativa. També van observar que els pacients amb AT (+) però RLT ≤ 0.66 tenien un temps lliure de malaltia significativament més elevat que els que presentaven RLT superior a 0.66. Altres estudis, com el d'Engelhardt *et al.*, (131) d'una banda van observar que els pacients amb baixa supervivència (< 10 mesos) eren Dukes C i D, tenien una elevada AT i curts telòmers; d'altra banda, pacients amb elevada supervivència (> 45 mesos) tenien significativament una AT baixa i presentaven telòmers llargs (per aquests anàlisis no es van fer servir test de supervivència).

Existeixen pocs estudis que relacionin l'expressió del TRF1 amb la supervivència, un d'ells és el treball de García-Aranda *et al.*, (125) en el qual van observar que els pacients amb tumors telomerasa positius i amb una ràtio de l'expressió del TRF1 (entre la mucosa tumoral i normal) superior a 1.1 presentaven major temps de supervivència global. La Torre *et al.*, (152) van classificar els 20 pacients, els quals van seguir 4 anys, segons si expressaven <500 ADU (unitats densiomètriques arbitràries) o > 500 ADU. Els resultats van ser que els pacients amb expressió menor de 500 ADU van presentar un temps de supervivència superior a aquells amb valors superiors a 500 ADU; l'estudi multivariant va mostrar que l'expressió del TRF1 era un factor pronòstic independent pel temps de supervivència.

L'activitat de la telomerasa com a factor pronòstic presenta molta controvèrsia. No només pel fet que els punts de tall que els autors consideren alta i baixa activitat, d'altres divideixen els pacients amb activitat positiva i negativa, mentre que nosaltres hem fet servir un índex entre l'activitat del tumor i la de la mucosa normal. Excepte un grup la resta de resultats coincideixen que l'AT positiva o elevada, o bé l'IT elevat estan associats amb un pitjor pronòstic i supervivència. Donat que l'AT confereix a les cèl·lules una vida molt més llarga de la que els correspondria, és lògic que l'AT positiva

o elevada estigui relacionada amb un pitjor pronòstic. La longitud del telòmer sembla donar resultats més uniformes, si bé els punts de tall per a determinar si parlem de telòmers curts o llargs varia una mica entre els diferents estudis, existeix un consens i els telòmers curts presenten millor pronòstic; pel que fa a la RLT, les que són inferiors a 1, és a dir, els telòmers del tumor són inferior als de la mucosa normal també presentaven millor pronòstic. Per tant, podríem deduir que els tumors que presenten telòmers curts, són tumors menys agressius, potser al tenir telòmers curts el seu ritme de proliferació es veu disminuït i això fa que les probabilitats de patir una progressió de la malaltia siguin menor i per tant la supervivència del pacient augmenti. En aquest treball no es va torbar que l'expressió del TRF1 fos un factor pronòstic ni per la progressió de la malaltia ni pel temps de supervivència global. El baix nombre de treballs sobre aquesta proteïna d'unió als telòmers fa pensar que serà necessari estudiar més sobre les seves funcions i el seu mecanisme d'acció i també estudiar a fons el seu possible paper com a factor pronòstic en el càncer colorectal.

Com es pot observar no existeixen treballs en la literatura que separin els malalts de càncer de còlon dels de recte, però el nostre treball ha demostrat que els factors que poden ser factors pronòstics per a un potser no ho són per l'altre i que tractant-los conjuntament podria fer que aquests factors pronòstic no poguessin ser detectats.

Els tests de sensibilitat i especificitat realitzats amb els factors pronòstic independents pels pacients amb càncer de recte ens van donar més informació sobre aquests. En la progressió de la malaltia als 2 anys la probabilitat de classificar correctament un individu malalt (sensibilitat) era més alta per l'IT que per la classificació N i disminuïa molt quan s'usaven ambdues variables conjuntament. Mentre que la probabilitat de classificar correctament un individu sa (especificitat) era més alta per a la classificació N i encara augmentava més quan es prenen conjuntament arribant gairebé al 90%. El valor que ens permet saber quin factor és millor, és el que ens determina quants pacients són classificats correctament, el millor factor als 2 anys per a determinar la progressió de la malaltia seria la classificació N, ja que tot i classificar correctament el mateix percentatge de malalts que l'IT+N, la N sola presenta una especificitat semblant a la de l'IT+N però la sensibilitat és superior. Als 4 anys observem que la sensibilitat, especificitat i el fet de classificar correctament als pacients disminueix respecte dels 2 anys en cada una de les variables i semblaria que la N tornaria a ser la millor variable a usar com a factor pronòstic.

La supervivència global als 2 anys va mostrar major sensibilitat de l'IT i major especificitat de la classificació N i aquesta continuava classificant correctament un major nombre de pacients que l'IT; però al prendre ambdues variables conjuntament la sensibilitat es mantenia respecte la N però la especificitat augmentava fins al 93% i el

percentatge de pacients classificats correctament era superior que en qualsevol d'ambdues variables per separat, als 2 anys la millor variable era l'IT+N. Als 4 anys la sensibilitat, l'especificitat i la capacitat de classificar correctament els pacients disminuïen en totes les variables, excepte l'especificitat de la N que augmentava lleugerament, a més al combinar ambdues variables als 4 anys la capacitat de classificar correctament era igual que al fer servir la N sola.

Els tests de sensibilitat i especificitat van demostrar segons els nostres resultats que per a la progressió de la malaltia la N és el millor factor pronòstic als 2 anys i també als 4 però amb pèrdua de sensibilitat i de capacitat de classificar correctament. Per a la supervivència als 2 anys segons els nostres resultats és útil combinar un factor pronòstic clàssic, com és la classificació N, amb un nou factor l'IT, mentre que als 4 anys no vam obtenir el mateix resultat i solament la classificació N presentava la mateixa capacitat de classificar correctament que la combinació d'ambdues variables. Podríem dir, que l'IT és un factor pronòstic de recidiva precoç en els nostres malalts.

7. LONGITUD DEL TELÒMER EN CÈL·LULES SANGUÍNIES

En els pacients amb CCR es va observar que els telòmers de la mucosa normal tenien un comportament paral·lel als de la mucosa tumoral. Tot i que la longitud dels telòmers en els tumors disminuïa més ràpidament que en la mucosa normal per la seva elevada capacitat proliferativa. Aquest fet podria ser degut a que la mucosa normal en termes de la longitud del telòmer no era del tot normal. Per comprovar aquesta hipòtesi es va relacionar l'LT de les mucoses colòniques amb l'edat dels pacients, el fet d'existir correlació entre l'LT i l'edat es prenia com a normalitat en el funcionament i la regulació dels telòmers. L'LT en la mucosa tumoral no va mostrar correlació amb l'edat, aquest resultat ja l'esperàvem perquè havíem observat nivells d'AT i LT diferents respecte la mucosa normal. L'LT en la mucosa normal tampoc va mostrar correlació amb l'edat, aquest fet i el comportament paral·lel amb els telòmers de la mucosa tumoral ens van fer pensar que aquesta mucosa potser no era normal en termes de comportament i regulació dels telòmers, potser perquè compartia el mateix microambient que el tumor. Per saber si el comportament que havíem observat en la mucosa normal era el d'un teixit sa i sense canvis pre-neoplàsics vàrem decidir analitzar la longitud del telòmer d'un teixit allunyat del tumor i donat que posseïem mostres sanguínies d'aquests pacients aquest va ser el teixit escollit.

La longitud del telòmer en cèl·lules de sang perifèrica va ser determinada en 40 dels pacients intervinguts de càncer colorectal. Es va considerar la sang com a possible teixit sa allunyat del tumor. La mucosa colònica normal es va considerar com a mucosa sana, amb la qual poder comparar la mucosa tumoral; tot i que es trobava

allunyada del tumor podria ser que a afectes de l'activitat de la telomerasa i la longitud del telòmer no tingués un comportament normal ja que compartia el mateix microambient en el qual es trobava el tumor, en un mateix pacient. Amb aquesta anàlisi es va voler comprovar si la que s'havia considerat mucosa colònica normal presentava moltes diferències respecte la longitud del telòmer de les cèl·lules sanguínies.

La sang va mostrar una longitud del telòmer (8.84 Kbp) significativament més elevada que la longitud de la mucosa normal (7.97 Kbp) i tumoral (7.33 Kbp). Prenent la sang com a "teixit sa" allunyat del tumor esperàvem trobar correlació entre la longitud del telòmer en cèl·lules sanguínies i l'edat ja que aquesta seria una prova de que la sang seria un teixit en el qual no estarien afectats els telòmers i la seva regulació. En la nostra sèrie de malalts aquesta correlació no es va observar, indicant que la longitud dels telòmers en sang dels malalts amb càncer colorectal possiblement també es veiessin alterats.

L'associació entre la longitud del telòmer i l'edat podria ser alterada per alguns factors incloent l'activitat de la telomerasa, l'índex de divisió cel·lular i la quantitat d'estrès oxidatiu, així la LT podria ser alterada tan per factors genètics com ambientals. Això explicaria que la LT i l'edat en alguns casos no es correlacionessin (143). També es va determinar si existia correlació entre la longitud del telòmer de les cèl·lules sanguínies i la LT de la mucosa normal però tampoc van mostrar correlació. En l'apartat on es va estudiar la longitud del telòmer, es va observar que l'LT en la mucosa tumoral i normal en malalts amb càncer colorectal si que mostraven una correlació directa. Per tant, tots aquests resultats ens van fer pensar que la mucosa colònica normal ja no era realment sana sinó que ja mostrava canvis en relació al telòmer i a la seva regulació. En aquestes correlacions també hi intervindria el fet que en cada divisió cel·lular el nombre de parells de bases que es perden és depenent del tipus de teixit (ex: 33pb/any en leucòcits, (147) i 15pb/any en fibroblasts, (168)).

L'expressió de la telomerasa fa que l'escurçament dels telòmers sigui més lent però no evita el desgast telomèric. La telomerasa assegura que les cèl·lules mare (hematopoiètiques, en aquest cas) seran capaces de cobrir la demanda cel·lular pel manteniment i reparació dels teixits.

Un augment en l'AT és detectat en progenitors immadurs de la medul·la òssia i l'AT disminueix amb la maduració cel·lular (169). Els limfòcits T i B tenen un progressiu escurçament del telòmer amb l'edat i expressen nivells baixos d'AT amb estimulació de mitògens (23). Per tant, cal tenir en compte que els telòmers en sang poden ser més o menys dinàmics segons els requeriments hematopoiètics de l'organisme (23).

L'envelliment del sistema immunitari involucra canvis en el sistema sencer, constitucionalment i funcionalment, suggerint que les persones més velles tenen més

possibilitats de patir infeccions, disminució de la immunitat i càncer (23). La longitud del telòmer podria ser un marcador per saber l'envelliment en cèl·lules somàtiques humanes (168). La variació en la longitud del telòmer entre individus podria reflectir la història de la exposició genotòxica, la inestabilitat genòmica i el risc de malaltia (170).

En molts treballs es considera la longitud del telòmer de les cèl·lules sanguínies com un factor predictor de la mortalitat en individus d'uns determinats rangs d'edat per malalties infeccioses i cardiovasculars (167).

Un estudi ha comprovat que la longitud del telòmer provinent d'esperma no disminueix amb l'edat (168) i que és superior a la de teixits com el còlon o la sang (147). L'activitat de la telomerasa en cèl·lules germinals és suficient per prevenir l'escurçament del telòmer amb l'edat. En canvi, les cèl·lules mare no tenen suficient activitat de telomerasa per prevenir l'escurçament del telòmer associat amb la continua renovació del teixit i l'increment de l'edat (96). Està clar que l'escurçament del telòmer és associat amb malalties cròniques humanes i síndromes d'envelliment prematur com la hipertensió, les síndromes en les que falla la medul·la òssia, la disqueratosi congènita i la síndrome de Werner (171). Mutacions en els components de la telomerasa s'han observat en algunes anomalies com per exemple, l'anèmia aplàstica i la disqueratosi congènita. Ambdues són malalties caracteritzades per anomalies en la pell i disfunció en la medul·la òssia, això resultaria del defecte en el manteniment del compartiment de les cèl·lules mare hematopoiètiques. Càncer i edat són processos en els quals està implicada la telomerasa i són cada vegada més, catalogats com a malalties de les cèl·lules mare (96).

Molts estudis que relacionen la longitud del telòmer i l'edat fan servir cèl·lules mononuclears de sang perifèrica per la senzilla raó que són fàcils d'obtenir. Recentment, s'han publicat molts estudis que examinen la longitud del telòmer en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica, els quals han obtingut una correlació entre l'escurçament del telòmers i una gran varietat de malalties relacionades amb l'edat com l'infart de miocardi prematur, la demència vascular, l'ateroesclerosi i l'alzheimer (142). L'estrès oxidatiu s'ha postulat com un mecanisme involucrat en l'envelliment i l'escurçament del telòmer i ha estat proposat com un mecanisme d'unió entre els dos. Així si una persona té susceptibilitat a l'estrès oxidatiu perquè té les defenses antioxidants reduïdes o bé perquè l'ambient d'aquesta persona, les activitats, o els hàbits possibiliten l'acumulació de l'estrès oxidatiu al llarg de la vida; l'estrès oxidatiu pot afectar a totes les cèl·lules de l'organisme, donant lloc a un escurçament en les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica, però també a les cèl·lules dels teixits que desenvoluparan les malalties relacionades amb l'edat. Coincidint amb aquest concepte, s'ha demostrat que la mitjana de la longitud del telòmer en cèl·lules sanguínies és més curta en individus amb elevats nivells de vida amb estrès i això pot

predisposar a pitjor salut i malaltia crònica. Així, les cèl·lules mononuclears sanguínies podrien ser un bon biomarcador d'envelliment, reflectint l'estrès metabòlic acumulat durant l'envelliment de l'organisme (142).

La sang és representativa de tots els teixits ja que està en contacte amb tots ells i a més és reflex dels processos inflamatoris de l'organisme.

L'LT en cèl·lules sanguínies i en la mucosa normal de pacients amb CCR van presentar un ritme d'escurçament diferent tot i tractar-se de mostres sanes. Aquestes diferències es podrien atribuir al fet de correspondre a teixits diferents amb diferents taxes de replicació i pèrdua de pb/divisió cel·lular o bé pot ser degut a que la mucosa normal d'aquests pacients amb CCR ja no és normal en termes de la regulació de la longitud del telòmer. Per a poder discriminar entre una teoria o l'altra era necessari saber quin comportament tenien els telòmers en sang i mucosa colònica en pacients sense cap afectació colorectal.

8. LONGITUD DEL TELÒMER EN PACIENTS SANS

Els resultats obtinguts fins aquest moment ens van fer pensar que la mucosa normal de malalts operats de càncer colorectal potser no era normal ja que la longitud del telòmer de les mucoses tumoral i normal es correlacionaven i mostraven una longitud del telòmer significativament diferent de la sang. Ens vàrem preguntar quin seria el comportament normal de la longitud del telòmer en la mucosa del còlon i de les cèl·lules sanguínies de pacients sense cap afectació colorectal.

La mitjana de la longitud del telòmer en la mucosa colònica obtinguda per endoscòpia de pacients (n = 9) sense cap afectació colorectal va ser de 9.42 Kpb mentre que la mitjana en les cèl·lules sanguínies dels mateixos pacients va ser de 8.25 Kpb, estadísticament la diferència no va arribar a ser significativa, però la diferència era superior a 1 Kb. Un treball similar al nostre és el que van realitzar Friedrich *et al.*, (146) en el que van mesurar la longitud del telòmer en 3 teixits del mateix pacient amb índexs de proliferació diferents com eren els leucòcits, la pell i el teixit sinovial. Van observar que els telòmers dels leucòcits eren significativament més curts que els de la pell i els del teixit sinovial però no van trobar diferències entre els telòmers d'aquests dos últims teixits (146).

Els pacients més joves (≤ 62 anys) van mostrar telòmers en cèl·lules sanguínies significativament més llargs que els pacients més vells, en la mucosa del còlon també però la diferència no va ser significativa.

La longitud del telòmer en cèl·lules sanguínies de pacients sans va mostrar una correlació inversa amb l'edat, mentre en l'apartat anterior la longitud dels telòmers en sang de malalts amb càncer colorectal no van mostrar aquesta correlació. També es

va observar una correlació inversa entre la LT de la mucosa colònica de pacients sans amb l'edat, és a dir, individus més vells tenen els telòmers més curts. Altres treballs també van trobar que l'LT de teixits sans era inversament correlacionada amb l'edat, com els de O'Sullivan *et al.*, (170) en mucosa colònica sana i en leucòcits; Hastie *et al.*, (147) en leucòcits; Allsopp *et al.*, (168) en fibroblasts i Friedrich *et al.*, (146) van observar una correlació significativa entre l'edat i la longitud del telòmer tan en els leucòcits com en la pell. Sense tenir en compte l'edat dels individus la LT era significativament més curta en cèl·lules amb replicació ràpida (leucòcits) comparada amb cèl·lules de replicació més lenta com la pell i el teixit sinovial (146). Mentre que Frenck *et al.*, (169) afirmaven que la disminució de la longitud del telòmer en els leucòcits no és constant amb l'edat sinó que existeix una disminució ràpida des del naixement fins al 4 anys, després vindria una fase de pèrdua molt lenta fins al 30 anys i a partir d'aquesta edat hi hauria una progressiva disminució de la longitud dels telòmers. La seva conclusió era que el procés d'escurçament del telòmer era regulat de manera diferent en els leucòcits depenen de l'edat.

En aquest treball també es va observar que existia una correlació directe entre la longitud del telòmer dels dos teixits sans analitzats. Presentaven un comportament paral·lel entre ambdós teixits; una possible explicació a la diferència de la longitud del telòmer podria ser que el nombre de repeticions telomèriques que es perden en cada cicle de divisió cel·lular i la taxa de renovació són dependents del tipus cel·lular. Friedrich *et al.*, (146) també van trobar una correlació significativa entre la longitud del telòmer dels tres teixits sans analitzats, teixit sinovial-pell, teixit sinovial-leucòcits, i leucòcits-pell. Per tant, podríem dir que existeix un patró similar de reducció del telòmer en els diferents teixits, això explicaria el fet que observéssim comportaments paral·lels entre diferents teixits i la diferència en la mitjana de la longitud del telòmer seria deguda al ritme de replicació de cada teixit (146) i les diferències que hi poguessin haver en el nombre de parells de bases que es perden en cada cicle de replicació que són dependents del teixits (147, 168).

En els pacients sense cap afectació colorectal la LT era superior en la mucosa colònica que en la sang, contràriament al que es va observar entre la mucosa colònica i la sang de pacients amb CCR. A més la longitud del telòmer d'ambdues mucoses sanes es va correlacionar amb l'edat dels pacients. Per tant, la mucosa colònica normal de pacients amb CCR podria presentar alteracions en la regulació dels telòmers.

9. ACTIVITAT DE LA TELOMERASA I LONGITUD DEL TELÒMER EN PÒLIPS

Actualment és conegut i acceptat que els pòlips són un pas previ al desenvolupament dels tumors. Fearon i Volgestein van determinar els canvis que tenien lloc durant la seqüència adenoma-carcinoma. Els principals canvis corresponien a mutacions, delecions i pèrdua d'heterogozitat (28). Però l'AT i la LT ja eren presents en aquest estadi, són fenòmens primerencs en l'evolució de la carcinogènesi? Els resultats existents fins avui són diversos i són pocs els estudis trobats en la literatura en els quals es compara l'AT o l'LT del pòlip amb les de la mucosa normal del mateix pacient; si es vol estudiar la seqüència mucosa normal-pòlip-tumor cal comparar els paràmetres dins els mateixos pacients perquè l'estudi sigui coherent.

En aquest treball els pòlips van mostrar activitat de la telomerasa en un 86% dels casos mentre que en la corresponent mucosa normal va ser detectada en un 50%. Un dels pocs treballs que comparava els pòlips amb la mucosa normal dels mateixos pacients va obtenir un 22% AT en els pòlips colorectals i totes les mostres de la mucosa normal van mostrar AT negativa (173). Altres estudis van comparar l'AT dels pòlips amb l'AT de la mucosa normal sense que ambdues mucoses fossin del mateix pacient. Aquests estudis van trobar entre el 40-62.5% AT en els pòlips i en la mucosa normal entre el 0-18.2% (117, 120, 122, 131, 173).

La mitjana de l'AT en els pòlips va ser de 5.85 TPG mentre que en la corresponent mucosa normal va ser de 0.58 TPG. En altres treballs l'AT en els pòlips va ser de 1.7 TPG (131) i 7.8 TPG (117) i en la mucosa normal però no dels mateixos pacients va ser de 0 i 3.34 TPG respectivament. No es va trobar diferència significativa entre l'AT del pòlip i la de la mucosa normal tampoc Engelhardt *et al.*, (131) ni Abe *et al.*, (117) les van trobar.

La mitjana de la longitud del telòmer en els pòlips va ser de 6.78 Kpb i en la mucosa normal de 7.78 Kpb sense que aquesta diferència arribés a ser significativa. En altres estudis on la mucosa normal amb la qual comparen els pòlips no era del mateix pacient les mitjanes van ser les següents, sense que les diferències fossin significatives en cap d'ambdós casos: Engelhardt *et al.*, (131) 7.1 Kpb en els pòlips i 7.46 Kpb en la mucosa normal, Kim *et al.*, (135) van obtenir 9.41 Kpb en els pòlips i 9.25 Kpb en el teixit normal.

En els pòlips ja es podia observar un comportament diferent al de la mucosa normal tot i que les diferències no arribessin a ser significatives potser pel baix nombre de casos, l'AT de la telomerasa era més alta en els pòlips i a més aquests ja mostraven uns telòmers més curts que la corresponent mucosa normal. Aquests canvis però amb significació estadística eren observats abans entre la mucosa tumoral i la normal.

El comportament dels pòlips en aquest treball comparant la longitud del telòmer dels pòlips amb les corresponents mucoses normals els resultats van ser de 43%

escurçament, 7% allargament i un 50% de manteniment. Kim *et al.*, (135) van fer exactament el mateix i van obtenir un 20% d'escurçament, 30% allargament i un 50% de manteniment. Aquests resultats van ser bastant similars però en el treball de Kim *et al.*, (135) no va haver-hi gaire diferència entre el percentatge de pòlips que s'allargaven dels que s'escurçaven. Chandeneau *et al.*, (123) també treballaven amb mostres aparellades però no sabem quin va ser el criteri que van fer servir per a determinar que un 45% s'escurçaven, un 36% s'allargaven i un 18% es mantenien. Els percentatges trobats de cada un dels comportaments dels pòlips respecte la mucosa normal en el nostre treball no diferien gaire dels trobats anteriorment entre el tumor i la mucosa normal, és a dir, que els pòlips tenien ja un comportament similar al dels tumors però amb unes diferències menys acusades de l'AT i la LT entre el pòlip i la mucosa normal. Globalment es podria dir que l'escurçament de la longitud del telòmer és un mecanisme que té lloc aviat durant la carcinogènesi colorectal (144).

En general no es van trobar diferències entre l'AT en el pòlip i la mucosa normal però al analitzar-ho segons les variables estudiades, es va observar una diferència significativa entre l'AT d'ambdós teixits en els pòlips de còlon. Aquesta diferència en les dones va resultar gairebé significativa.

Al relacionar l'AT del pòlip i la mucosa normal amb les variables anatomopatològiques es va observar una diferència significativa entre l'AT en els pòlips que presentaven i els que no presentaven un càncer sincrònic. Mentre que d'una banda Yan *et al.*, (120) van observar correlació entre AT i el grau de displàsia, el 100% d'adenomes que mostraven elevat grau de displàsia presentaven AT davant el 20% que presentaven exclusivament baix grau de displàsia. D'altra banda, Tang *et al.*, (122) van trobar associació significativa entre la mida del pòlip i el percentatge d'AT que presentaven, observant que els pòlips més grans tenien un percentatge més elevat de mostres telomerasa positives. També van observar que els pòlips que presentaven càncer sincrònic, presentaven un percentatge de mostres telomerasa positives significativament més elevat. Podria ser perquè els pòlips que es desenvolupen relativament a prop d'un tumor donin prioritat al desenvolupament d'aquest o bé que l'organisme estigui en fase d'alerta degut a la presència del tumor, s'activin mecanismes per intentar controlar-lo i al haver-hi un pòlip a prop aquest sigui el que es beneficiï dels mecanismes d'alerta ja que es troba en un estat menys avançat que el tumor per a poder ser controlat per l'organisme. No es va trobar associació significativa entre la longitud del telòmer i les característiques anatomopatològiques estudiades.

L'activitat de la telomerasa i la longitud del telòmer no van mostrar estar correlacionades com ja hem vist tampoc van estar-ho en la mucosa tumoral.

La segona part de l'estudi dels pòlips va ser l'estudi de l'AT i la longitud del telòmer en 6 pacients els quals presentaven pòlips i càncer colorectal sincrònic dels quals també es va analitzar la mucosa normal. Aquesta part de l'estudi no ha pogut ser comparada amb altres treballs perquè no hem trobat a la literatura cap treball similar. Un 83% (5/6) dels càncers van mostrar AT, un 67% (4/6) dels pòlips i un 33% (2/6) de les mostres de mucosa normal. La mitjana de l'AT en les mostres tumorals va ser de 5.65 TGP, en els pòlips va ser de 1.09 TPG i en la mucosa normal de 0.53 TPG. Les diferències no van resultar ser significatives entre cap de les mostres. Es va poder observar una AT intermèdia dels pòlips inferior a la de la mucosa tumoral però superior a la de la mucosa normal. En relació a les característiques anatomopatològiques del pòlip estudiades només es va observar que els pòlips tubulo-vellosos presentaven una AT gairebé significativament més elevada que els pòlips tubulars.

Els pòlips van mostrar una longitud del telòmer que era superior a la de la mucosa tumoral però inferior a la de la mucosa normal. No es va trobar associació significativa entre la longitud del telòmer en les diferents mucoses i les característiques anatomopatològiques del pòlip.

La tercera part de l'estudi dels pòlips va ser l'estudi dels 8 pacients amb pòlips aïllats. En el qual es va observar el mateix comportament que quan es van agafar tots els pòlips en general o els pòlips sincrònics amb el tumor, l'AT era més elevada en els pòlips que en la mucosa normal i la longitud del telòmer era més curta en el pòlip que en la mucosa normal. No es va observar relació entre l'AT i la LT amb el sexe, la localització o la histologia del pòlip. Al comparar l'AT i la LT dels pòlips sincrònics al tumor amb els pòlips aïllats es va observar que els pòlips aïllats presentaven una major AT i una LT inferior als pòlips sincrònics indicant una major malignitat.

En aquest estudi es va poder observar una AT creixent en la seqüència adenoma-carcinoma d'un mateix pacient així com una disminució de la longitud del telòmer a mesura que avançàvem de la mucosa normal cap a la tumoral, en cap cas les diferències eren estadísticament significatives. Creiem que amb un nombre major de casos aquestes diferències podrien ser significatives i confirmar l'existència d'una seqüència en el comportament dels telòmers des de la mucosa normal fins a la tumoral passant pels pòlips. Alguns autors han descrit que durant el desenvolupament de les lesions pre-neoplàsiques, la proliferació cel·lular és controlada exclusivament per interaccions amb altres cèl·lules, la matriu extracel·lular i per factors de creixement solubles i insolubles de manera que el guany de funció per la mutació en oncogens, la pèrdua de funció per la mutació en gens supressors de tumors i l'alteració de la via de la senescència permetran l'expansió clonal (174).

Nosaltres creiem que per a poder estudiar la seqüència adenoma-carcinoma i poder obtenir uns resultats coherents la millora manera de fer-ho és estudiant en un mateix pacient les diferents mucoses que corresponen a diferents fases de l'evolució carcinogènica. Així d'una banda, eliminem les possibles diferències entre individus i podem comparar el mateix nombre de casos en cada una de les mucoses. Per altra banda, ens permet estudiar la seqüència individualment en cada pacient.

VI. CONCLUSIONS

1. L'activitat de la telomerasa és present en més del 80% dels tumors i en la meitat de mostres normals, però l'activitat de la telomerasa és significativament superior en la mucosa tumoral.
2. L'activitat de la telomerasa i la longitud del telòmer no es correlacionen amb cap de les variables anatomopatològiques del tumor estudiades.
3. La mucosa tumoral té una longitud del telòmer més curta que la mucosa normal.
4. L'activitat de la telomerasa no es correlaciona amb la longitud del telòmer en un mateix pacient amb càncer colorectal.
5. La longitud del telòmer no es correlaciona amb l'edat dels pacients amb càncer colorectal ni en la mucosa tumoral ni en la normal.
6. En un mateix malalt la longitud del telòmer en la mucosa tumoral i normal té comportament paral·lel.
8. La mucosa tumoral presenta una major expressió del factor d'unió a les repeticions telomèriques (TRF1).
9. Els telòmers més llargs tenen major expressió del TRF1 en les mostres tumorals.
10. La longitud del telòmer de les cèl·lules sanguínies i de la mucosa colònica de pacients sans es correlaciona amb l'edat, però no en pacients amb càncer colorectal.
11. En els pacients amb càncer de recte l'índex de la telomerasa és un factor pronòstic per al temps lliure de malaltia als 2 anys en i als 2 i 4 anys per a la supervivència global.
12. La ràtio de la longitud del telòmer és l'únic factor pronòstic per al temps de supervivència global als 2 anys en els pacients amb càncer de còlon.
13. La combinació de la longitud del telòmer i l'activitat de la telomerasa no afegeix més informació, sobre la progressió de la malaltia i la supervivència global en pacients amb càncer colorectal, que la seva mesura aïllada.

Per tant, podem concloure, en relació a les hipòtesis plantejades:

1. Rebutjar la primera hipòtesi, donat que no existeixen canvis estadísticament significatius entre l'activitat de la telomerasa de la mucosa normal i la del pòlip ni entre la del pòlip i la de la mucosa tumoral.

2. Acceptar parcialment la segona hipòtesi ja que la longitud del telòmer en el tumor presenta canvis significatius respecte la longitud del telòmer de la mucosa normal. El TRF1 mostra un patró d'expressió diferent entre la mucosa tumoral i normal (sense arribar a obtenir-se diferències significatives en l'estudi).

3. Acceptar parcialment la tercera hipòtesi ja que l'activitat de la telomera i la longitud del telòmer han estat factors pronòstics per a la progressió de la malaltia i la supervivència, però no ho ha estat l'expressió del TRF1.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Boyle P. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007; 18: 581-92.
2. Barroso M, Caunedo A, Herrerías JM. Cáncer de Colon y Recto. En: Berenguer J (eds) *Gastroenterología y Hepatología*. 3ª ed. Madrid Elsevier Science 2002: 377-389.
3. Ramirez-Rodriguez J.M, Aguilera-Diago V. Recidiva local en el cáncer de colon y recto. *Cir Esp* 2005; 78: 344-50.
4. Diez-Fernández R, Salinas Hernández P, Giron-Duch C. A review of chemotherapy for metastatic colon cancer. *Farm Hosp* 2006; 30: 359-69.
5. Leichman CG. Adjuvant therapy for colon cancer 2005: new opinions in the twenty-first century. *Surg Oncol Clin N AM* 2006; 15: 159-73.
6. Gill S, Blackstock AW, Goldberg RM. Colorectal cancer. *Mayo Clin Proc* 2007; 82: 114-29.
7. Ponz de Leon M, Percesepe A. Pathogenesis of colorectal cancer. *Dig Liver Dis* 2000; 32: 807-21.
8. Grady WM, Markowitz SD. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002; 3: 101-28.
9. Grady WM. Epigenetic events in the colorectum and in colon cancer. *Biochem Soc Trans* 2005; 33: 684-8.
10. Molatore S, Ranzani GN. Genetics of colorectal polyps. *Tech Coloproctol* 2004; 8: 240-2.
11. Cruz-Bustillo Clarens D. Genética molecular del cáncer colorectal. *Rev Esp Enferm Dig* 2004; 96: 48-59
12. Lipton L, Tomlinson I. The genetics of FAP and FAP-like syndromes. *Fam Cancer* 2006; 5: 221-6.
13. Fodde R. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38: 867-871.

14. Cabrera CM, López-Nevot MA. APC e inestabilidad cromosómica en el cáncer de colon. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97: 738-43.
15. Hill RP. Biología del Càncer. En: Rubin P (eds) *Oncología Clínica. Enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes*. 8ª ed. Madrid Elsevier Science 2003: 32-46.
16. Benito M, Díaz-Rubio E. Molecular biology in colorectal cancer. *Clin Trans Oncol* 2006; 8: 391-8.
17. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJ. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut* 2005; 54: 1283-6.
18. Smakman N, Borel Rinkes IH, Voest EE, Kranenburg O. Control of colorectal metastasis formation by K-ras. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1756: 103-114.
19. Morales C, Peinado MA. Inestabilidad de microsatélites: papel diagnóstico e implicaciones pronósticas. *Gastroenterología y Hepatología continuada* 2006; 5:18-22.
20. Grady WM. Epigenetic events in the colorectum and in colon cancer. *Biochem Soc Trans* 2005; 33: 684-8.
21. Sorëide K, Janssen EA, Söiland H, Körner H, Baak JPA. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg* 2006; 93: 395-406.
22. Cruz-Bustillo Clarens D. Inestabilidad genómica y cáncer colorectal. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97: 683-7.
23. Granger MP, Wright WE, Shay JW. Telomerase in cancer and aging. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 41: 29-40.
24. Ponz de Leon M, Roncucci L. The cause of colorectal cancer. *Dig Liver Dis* 2000; 32: 426-39.
25. Bodmer WF. Cancer genetics: colorectal cancer as a model. *J Hum Genet* 2006; 51: 391-6.

26. Gonzalez-Aguilera J.J, Fernández-Peralta A.M, Moreno-Azcoita M. La genética del cáncer colorectal (I). Síndromes polipósicos. Cir Esp Vol 60 1996, nº 3.
27. Cordero C, Leo E, de la Santa J. Pólipos y Síndromes de poliposis intestinal. En: Berenguer J (eds) Gastroenterología y Hepatología. 3ª ed. Madrid Elsevier Science 2002: 361-376.
28. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990; 61: 759-67.
29. Leedham SJ, Brittan M, McDonald SA, Wright NA. Intestinal stem cells. J Cell Mol Med 2005; 9: 11-24.
30. Komarova NL, Cheng P. Epithelial tissue architecture protects against cancer. Math Biosci 2006; 200: 90-117.
31. Ponz de Leon M, Di Gregorio C. Pathology of colorectal cancer. Dig Liver Dis 2001; 33: 372-88.
32. Cheng L, Lai MD. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. World J Gastroenterol 2003; 9: 2642-9.
33. Kim WH, Suh JH, Kim TI, Shin SK et al. Colorectal flat neoplasia. Dig Liver Dis 2003; 35: 165-71.
34. Spitalnik P, Di Sant'Agnesse PA. Patología del cáncer. En: Rubin P (eds) Oncología Clínica. Enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes. 8ª ed. Madrid Elsevier Science 2003: 47-61.
35. Jass JR, O'Brien MJ, Riddell RH, Snover DC. Recommendations for the reporting of surgical resected specimens of colorectal carcinoma. Hum Pathol 2007; article in press.
36. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. J Pathol Bacteriol 1932; 35: 323-32.
37. Payà A, Niviero M. Pólipos y poliposis colónica. GH continuada 2001; 1: 1-5.
38. Colucci PM, Yale SH, Rall CJ. Colorectal polyps. Clin Med Res 2003; 1: 261-2.

39. Banerjee S, Van Dam J. CT colonography for colon cancer screening. *Gastrointest Endoscop* 2006; 63: 121-33.
40. Lund JA, Sundstrom SH, Haaverstad R, Wibe A, Svinsaas M, Myrvold HE. Endoanal ultrasound is of little value in follow-up of anal carcinomas. *Dis Colon Rectum* 2004; 47: 839-42.
41. Sadahiro S, Toshiyuki S, Kenji I, *et al*. Recurrence patterns after curative resection of colorectal cancer in patients followed for a minimum of ten years. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1362-6.
42. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ *et al*. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 979-94.
43. Bannura G, Cumsille MA, Contreras J, Barrera A, Melo C, Soto D. Carcinoembryonic antigen (CEA) as an independent prognostic factor in colorectal carcinoma. *Rev Med Chil* 2004; 132: 691-700.
44. Goldstein MJ, Mitchell EP. Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest* 2005; 23: 338-51.
45. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1420-5.
46. Sobin LH, Greene FL. TNM Classification: clarification of number of regional Lymph nodes for NO. *Br J Cancer* 2001; 85: 780.
47. Swanson RS, Compton CC, Stewart AK, Bland KI. The prognosis of T3N0 colon cancer is dependent on the number of lymph nodes examined. *Ann Surg Oncol*. 2003; 10: 65-71.
48. Garufi C, Ettorre GM, Vanni B, Torsello A, Terzoli E. Neoadjuvant chemotherapy for metastatic colon cancer: too much caution and still too much to be assessed. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2218-9.

-
49. Chao M, Gibbs P, Tjandra J et al. Preoperative chemotherapy and radiotherapy for locally advanced rectal cancer. *ANZ J Surg* 2005 ;75: 286-91.
50. Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S et al. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 1659-68.
51. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350: 569-73.
52. Autexier C, Greider CW. Telomerase and cancer: revisiting the telomere hypothesis. *Trends Biochem Sci* 1996; 21: 387-91.
53. Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66: 407-25.
54. Hug N, Lingner J. Telomere length homeostasis. *Chromosoma* 2006; 115: 413-25.
55. Dhaene K, Van Mark E, Parwaresch R. Telomeres, telomerase and cancer: an update. *Virchows Arch* 2000; 437: 1-16.
56. Desmaze C, Soria JC, Freulet- Marriere MA, Mathieu N, Sabatier L. Telomere-driven genomic instability in cancer cells. *Cancer Lett* 2003; 194: 173-82.
57. Krupp G, Klapper W, Parwaresch R. Cell proliferation, carcinogenesis and diverse mechanisms of telomerase regulation. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 464-86.
58. Artandi SE, Attardi LD. Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331: 881-90.
59. Smogorzewska A, de Lange T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 177-208.
60. Brunori M, Luciano P, Gilson E, Géli V. The telomerase cycle: normal and pathological aspects. *J Mol Med* 2005; 83: 244-57.
61. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 1997; 90: 785-95.

62. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB et al. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 1997; 277: 955-9.
63. Collins K. Mammalian telomeres and telomerase. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 378-83.
64. Ford LP, Wright WE, Shay JW. A model for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in telomere and telomerase regulation. *Oncogene* 2002; 21: 580-3.
65. Yi X, Tesmer VM, Savre-Train I, Shay JW, Wright WE. Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 989-97.
66. Yi X, Shay JW, Wright WE. Quantitation of telomerase components and hTERT mRNA splicing patterns in immortal human cells. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 4818-25.
67. Shay JW, Wright WE. Implications of mapping the human telomerase gene (hTERT) as the most distal gene on chromosome 5p. *Neoplasia* 2000; 2: 195-6.
68. Cong YS, Wen J, Bacchetti S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 137-42.
69. Harrington L, McPhail T, Mar V, et al. A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 1997; 275: 973-7.
70. Wick M, Zubov D, Hagen G. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene* 1999; 232: 97-106.
71. Poole JC, Andrews LG, Tollefsbol TO. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* 2001; 296: 1-12.
72. Renaud S, Bosman FT, Benhattar J. Implication of exon region in the regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300: 47-54.
73. Li H, Zhao L, Yang Z, Funder JW, Liu J. Telomerase is controlled by protein kinase Ca in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 33436-42.

-
74. Forsythe HL, Jarvis JL, Turner JW, Elmore LW, Holt SE. Stable association of hsp90 and p23, but not hsp 70, with active human telomerase. *J Biol Chem* 2001; 276: 15571-4.
75. Collins K, Mitchell JR. Telomerase in the human organism. *Oncogene* 2002; 2: 564-79.
76. Le S, Sternglanz R, Greider CW. Identification of two-RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 999-1010.
77. Aigner S, Lingner J, Goodrich KJ, *et al.* Euplotes telomerase contains an La motif protein produced by apparent translational frameshifting. *EMBO J* 2000; 19: 6230-9.
78. Ford LP, Shay JW, Wright WE. The La antigen associates with the human telomerase ribonucleoprotein and influences telomere length in vivo. *RNA* 2001; 7: 1068-75.
79. Ulaner GA, Giudice LC. Developmental regulation of telomerase activity in human fetal tissues during gestation. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 769-73.
80. Meyerson M. Role of telomerase in normal and cancer cells. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2626-34.
81. Zhao JQ, Glasspool RM, Hoare SF, Bisland A, Szatmari I, Keith WN. Activation of telomerase rna gene promoter activity by NF-Y, Sp1, and the retinoblastoma protein and repression by Sp3. *Neoplasia* 2000; 2: 531-9.
82. Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood* 1999; 93: 4059-4070.
83. Kondo Y, Issa JP. Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23: 29-39.
84. Devereux TR, Horikawa I, Anna CH, Annab LA, Afshari CA, Barrett JC. DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Cancer Res* 1999; 59: 6087-90.
85. Guilleret I, Yan P, Grange F, Braunschweig R, Bosman FT, Benhattar J. Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. *Int J Cancer* 2002; 101: 335-41.

86. Guilleret I, Benhattar J. Demethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter reduced hTERT expression and telomerase activity and shortened telomeres. *Exp Cell Res* 2003; 289: 326-34.
87. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001; 293: 1074-80.
88. Aisner DL, Wright WE, Shay JW. Telomerase regulation: not just flipping the switch. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12: 80-5.
89. Yi X, White DM, Aisner DL, Baur JA, Wright WE, Shay JW. An alternative splicing variant of the human telomerase catalytic subunit inhibits telomerase activity. *Neoplasia* 2000; 2: 433-40.
90. Colgin LM, Wilkinson C, Englezou A, Kilian A, Robinson MO, Reddel RR. The hTERT alpha splice variant is a dominant negative inhibitor of telomerase activity. *Neoplasia* 2000; 2: 426-32.
91. Wenz C, Enenkel B, Amacker M, Kelleher C, Damm K, Lingner J. Human telomerase contains two cooperating telomerase RNA molecules. *EMBO J* 2001; 20: 3526-34.
92. Kim S, Beausejour C, Davalos AR, Kaminker P, Heo SJ, Campisi J. TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres. *J Biol Chem* 2004; 279: 43799-804.
93. Rodier F, Kim SH, Nijjar T, Yaswen P, Campisi J. Cancer and aging: the importance of telomeres in genome maintenance. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 977-90.
94. Olaussen KA, Dubrana K, Domont J, Spano JP, Sabatier L, Soria JC. Telomeres and telomerase as targets for anticancer drug development. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 57: 191-214.
95. Kanoh J, Ishikawa F. Composition and conservation of the telomeric complex. *Cell Mol Life Sci* 2003; 11: 2295-302.
96. Flores I, Benetti R, Blasco MA. Telomerase regulation and stem cell behaviour. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18: 254-260.
97. Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres, telomerase and cancer. *Cancer Lett* 2003; 194: 155-62.

-
98. Cerone MA, Londono-Vallejo JA, Bacchetti S. Telomere maintenance by telomerase and by recombination can coexist in human cells. *Hum Mol Genet* 2001; 18: 1945-52.
99. Muntoni A, Reddel R. The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Hum Mol Genet* 2005; 14: R191-6.
100. Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* 2002; 21: 598-610.
101. Ohali A, Avigad S, Ash S, *et al.* Telomere length is a prognostic factor in neuroblastoma. *Cancer* 2006; 107: 1391-9.
102. Shay JW, Zou Y, Hiyama E, Wright WE. Telomerase and cancer. *Hum Mol Gen* 2001; 10: 677-85.
103. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-5.
104. Kim NW, Piatyszek MA, Weinrich SL *et al.* Detection of telomerase activity in human cells and tumors by a telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Methods Cell Sci* 1995; 17: 1-15.
105. Piñol C, Reñé JM. Telomerasa y cáncer colorectal. *Gastroenterología práctica* 2004; 13: 12-20.
106. Hsu YH, Lin JJ. Telomere and telomerase as targets for anti-cancer regeneration therapies. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 5: 513-8.
107. Saretzki G. Telomerase inhibition as cancer therapy. *Cancer Lett* 2003; 194: 209-19.
108. Oganessian L, Bryan TM. Physiological relevance of telomeric G-quadruplex formation: a potential drug target. *Bioessays* 2007; 29: 155-65.
109. Tamai O, Miyazato H, Shiraishi M, Kusano T, Muto Y. Morphologic and mucin histochemical analysis of transitional zones in advanced ulcerated colorectal carcinomas: potential prognostic indicators. *J Surg Oncol* 1998; 67: 85-9.

110. Shoji Y, Yoshinaga K, Inoue A, Iwasaki A, Sugihara K. Quantification of telomerase activity in sporadic colorectal carcinoma: association with tumor growth and venous invasion. *Cancer* 2000; 88: 1304-9.

111. Miller R, Siegmund D. Maximally selected chi square statistics. *Biometrics* 1982; 38: 1011-1016.

112. Halpern J. Maximally selected chi square statistics for small samples. *Biometrics* 1982; 38: 1017-1023.

113. Kimura M, Koida T, Yanagita Y. A study on telomerase activity and prognosis in breast cancer. *Med Oncol* 2003; 20: 117-26.

114. Armitage P, Berry G. Métodos estadísticos en epidemiología. En: *Estadística para la investigación médica*. Barcelona Doyma 1992: 534-68.

115. Brown T, Aldous W, Lance R, Blaser J, Baker T, Williard W. The association between telomerase, p53 and clinical staging in colorectal cancer. *Am J Surg* 1998; 175: 364-6.

116. Lukman K, Maskoen AM, Achmad TH, Hanafi B, Kamadihadja W. Telomerase activity in different clinical staging of colorectal adenocarcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho* 2000; 27: 491-7.

117. Abe N, Watanabe T, Nakashima M, et al. Quantitative analysis of telomerase activity: a potential diagnostic tool for colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 692-5.

118. Masutomi K, Hahn WC. Telomerase and tumorigenesis. *Cancer Lett* 2003; 194: 163-72.

119. Boldrini L, Faviana P, Gisfredi S et al. Evaluation of telomerase in the development and progression of colon cancer. *Int J Mol Med* 2002; 10: 589-92.

120. Yan P, Saraga EP, Bouzourene H, Bosman FT, Benhattar J. Telomerase activation in colorectal carcinogenesis. *J Pathol* 1999; 189: 207-12.

-
121. Ghori A, Usselman B, Ferryman S, Morris A, Fraser I. Telomerase expression of malignant epithelial cells correlates with Duke's stage in colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2002; 4:441-6.
122. Tang R, Cheng AJ, Wang JY, Wang TC. Close correlation between telomerase expression and adenomatous polyp progression in multistep colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 1998; 58: 4052-4.
123. Chadeneau C, Hay K, Hirte HW, Gallinger S, Bacchetti. Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 2533-6.
124. Sanz-Casla MT, Vidaurreta M, Sanchez-Rueda D, Maestro ML, Arroyo M, Cerdán FJ. Telomerase activity as a prognostic factor in colorectal cancer. *Onkologie* 2005; 28: 553-7.
125. Garcia-Aranda C, de Juan C, Diaz-Lopez A *et al.* Correlations of telomere length, telomerase activity and telomeric-repeat binding factor 1 expression in colorectal carcinoma. *Cancer* 2006; 106: 541-51.
126. Kawanishi-Tabata R, López F, Fratantonio S *et al.* Telomerase activity in stage II colorectal cancer. *Cancer* 2002;95:1834-9.
127. Kammori M, Tabuko K, Nakamura K *et al.* Telomerase activity and telomere length in benign and malignant human thyroid tissues. *Cancer Letters* 2000; 159: 175-81.
128. Kobayashi T, Kubota K, Takayama T, Makuuchi M. Telomerase activity as a predictive marker for recurrent of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *Am J Surg* 2001; 181: 284-8.
129. Marchetti A, Bertacca G, Buttitta F, *et al.* Telomerase activity as prognostic indicator in stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2077-81.
130. Sawady J, Friedman MI, Katzin WE, Mendelson G. Role of transitional mucosa of the colon in differentiating primary adenocarcinoma from carcinomas metastatic to the colon. An immunohistochemical study. *Amer J Surg Pathol* 1991; 15: 136-144.

131. Engelhardt M, Drullinsky P, Guillem J. Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 122: 1141-5.

132. Iida A, Yamaguchi A, Hirose K. Telomerase activity in colorectal cancer and its relationship to bcl-2 expression. *J Surg Oncol* 2000; 73: 219-23.

133. Tatsumoto N, Hiyama E, Murakami Y et al. High telomerase activity is an independent prognostic indicator of poor outcome in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6:2696-701.

134. Gertler R, Rosenberg R, Stricker D *et al.* Telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression as markers for progression and prognosis of colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1807-14.

135. Kim HR, Kim YJ, Kim HJ, Kim SK, Lee JH. Telomere length changes in colorectal cancers and polyps. *J Korean Med Sci* 2002; 17: 360-5.

136. Nakamura K, Furugori E, Esaki Y *et al.* Correlation of telomere lengths in normal and cancers tissue in the large bowel. *Cancer Lett* 2000; 158: 179-84.

137. Odagiri E, Kanada N, Jibiki K, Demura R, Aikawa E, Demura H. Reduction of telomeric length and c-erbB-2 gene amplification in human breast cancer, fibroadenoma, and gynecomastia. Relationship to histologic grade and clinical parameters. *Cancer* 1994; 73: 2978-84.

138. Shirotani Y, Hiyama K, Ishioka S, *et al.* Alteration in length of telomeric repeats in lung cancer. *Lung Cancer* 1994; 11: 29-41.

139. Meeker AK, Hicks JL, Platz EA, *et al.* Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human prostate tumorigenesis. *Cancer Res* 2002; 62: 6405-9.

140. van Heek NT, Meeker AK, Kern SE, *et al.* Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol* 2002; 161: 1541-7.

141. Bissell MJ, Kenny PA, Radisky DC. Microenvironmental regulators of tissue structure and function also regulate tumor induction and progression: the role of extracellular matrix and its degrading enzymes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005; 70: 343-56.

-
142. Rando TA. Prognostic value of telomere length: the long and short of it. *Ann Nuerol* 2006; 60: 155-7.
143. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* 2003; 361: 393-5.
144. Meeker AK, Hicks JL, Iacobuzio-Donahue CA, *et al.* Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3317-26.
145. Takagi S, Kinouchi Y, Hiwatashi N *et al.* Relationship between microsatellite instability and telomere shortening in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2000; 43: 12-7.
146. Friedrich U, Griesse EU, Schwab M, Fritz P, Thon KP, Klotz U. Telomere length in different tissues of elderly patients. *Mech Ageing Dev* 2000; 119: 89-99.
147. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 1990; 346: 866-8.
148. Epel ES, Blackburn EH, Lin J *et al.* Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 17312-5.
149. Oh BK, Kim YJ, Park C, Park YN. Up-regulation of telomere-binding proteins, TRF1, TRF2, and TIN2 is related to shortening during human multistep hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol* 2005; 166: 73-80.
150. Kanauchi H, Wada N, Ginzinger DG *et al.* Diagnostic and prognostic value of fas and telomeric-repeat binding factor-1 genes in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3690-3.
151. Matsutani N, Yokozaki H, Tahara E *et al.* Expression of telomeric repeat binding factor 1 and 2 and TRF1-interacting nuclear protein 2 in human gastric carcinomas. *Int J Oncol* 2001; 19: 507-512.
152. La Torre D, De Divitiis O, Conti A *et al.* Expression of telomeric repeat binding factor-1 in astroglial brain tumors. *Neurosurgery* 2005; 56: 802-10.

153. Saito K, Yagihashi A, Nasu S et al. Gene expression for suppressors of telomerase activity (telomeric-repeat binding factors) in breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 253-8.
154. Shi JM, Huang H, Chen QF, Lin MF. A study of the relation between expression level of TRF1 protein and telomerase activity in human acute leukaemia. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006; 7: 154-8.
155. Yamada M, Tsuji N, Nakamura M et al. Down-regulation of TRF1, TRF2 and TIN2 genes is important to maintain telomeric DNA for gastric cancers. *Anticancer Res* 2002; 22: 3303-7.
156. Miyachi K, Fujita M, Tanaka N, Sasaki K, Sunagawa M. Correlation between telomerase activity and telomeric-repeat binding factors in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2002; 21: 269-75.
157. Aragona M, Buda CA, Panetta S et al. Immunohistochemical telomeric-repeat binding factor-1 expression in gastrointestinal tumors. *Oncol Rep* 2000; 7: 987-90.
158. Ohyashiki JH, Hayashi S, Yahata N et al. Impaired telomere regulation mechanism by TRF1 (telomere-binding protein), but not TRF2 expression, in acute leukemia cells. *Int J Oncol* 2001; 18: 593-8.
159. Rosati G, Chiacchio R, Reggiardo G, De Sanctis D, Manzione L. Thymidylate synthase expression, p53, bcl-2, Ki-67 and p27 in colorectal cancer: relationships with tumor recurrence and survival. *Tumour Biol* 2004; 25: 258-63.
160. Zhao DP, Ding XW, Peng JP, Zheng YX, Zhang SZ. Prognostic significance of bcl-2 and p53 expression in colorectal carcinoma. *J Zhejiang Univ Sci B* 2005; 6: 1163-9.
161. Bouzourene H, Gervaz P, Cerottini et al. p53 and Ki-ras as prognostic factors for Dukes' stage B colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1080-15.
162. Leahy DT, Mulcahy HE, O'Donoghue DP, Parfrey NA. bcl-2 protein expression is associated with better prognosis in colorectal cancer. *Histopathology* 1999; 35: 360-7.
163. Kouraklis G, Kakisis F, Theoharis S et al. Prognostic significance and correlation with survival of bcl-2 and TGF- β RII in colon cancer. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 2284-9.

-
164. Lim SB, Jeong SY, Lee MR et al. Prognostic significance of microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19: 533-7.
165. Kapiteijn E, Liefers GJ, Los LC et al. Mechanisms of oncogenesis in colon versus rectal cancer. *J Pathol* 2001; 195 :171-8.
166. Russo A, Bazan V, Iacopetta B et al. The TP53 colorectal cancer prognostic and international significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7395-6.
167. Hilska M, Collan YU, O Laine VJ et al. The significance of tumor markers for proliferation and apoptosis in predicting survival in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 2197-208.
168. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10114-8.
169. Freck RW, Blackburn EH, Shannon KM. The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5607-10.
170. O'Sullivan J, Risques RA, Mandelson MT, et al. Telomere length in the colon declines with age: a relation to colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 573-7.
171. Geserick C, Blasco MA. Novel roles for telomerase in aging. *Mech Ageing Dev* 2006; 127: 579-83.
172. Katayama S, Shiota G, Oshimura M, Kawasaki H. Clinical usefulness of telomerase activity and telomere length in the preoperative diagnosis of gastric and colorectal cancer. *J cancer Res Clin Oncol* 1999; 125: 405-10.
173. Mizumoto I, Ogawa Y, Niiyama H et al. Possible role of telomerase activation in the multistep tumor progression of periampullary lesions in patients with familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1261-5.
174. Gatenby RA, Vincent TL. An evolutionary model of carcinogenesis. *Cancer Res* 2003; 63: 6212-20.

VIII. ABREVIATURES

Aa: Aminoàcid
ACF: Focus de Criptes Aberrant (*Aberrant Crypt Foci*)
AFAP: Poliposi Adenomatosa Familiar Atenuada (*Attenuated Familial Adenomatous Polyposis*)
AJCC: *American Joint Committee on Cancer*
ALT: *Alternative Lengthening of Telomeres*
Anti-DIG-AP: Anti-Digoxigenina fosfatasa alcalina
APBs: *ALT-associated PML Bodies*
APC: *Adenomatous Polyposis Coli*
AT: Activitat de la Telomerasa
ATM: *Ataxia-Telangiectasia-Mutated*
ATR: *AT and Rad3-related*
BAX: *Bcl-2-Associated X protein*
Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*
CART: *Classification And Regression Trees*
CCHNP: Càncer Colorectal Hereditari No Polipòsic (HNPCC: *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*)
CCR: Càncer ColoRectal
CEA: Antigen carcino-embriònic (*CarcinoEmbryonic Antigen*)
CEIC: Comitè d'Ètica i d'Investigació Clínica
Chk2: *Checkpoint Kinase 2*
CHRPE: *Congenital Hypertrophy of the Retinal Pigment Epithelium*
CIN: Inestabilitat Cromosòmica (*Chromosomal INstability*)
DCC: *Deleted in Colorectal Cancer*
DCK: Disqueratosi Congènita
DIG: Digoxigenina
DNA: *DeoxyriboNucleic Acid*
dNTP: deoxyriboNucleotide TriPhosphate
DSBs: *Double-Strand Break*
EDTA: *EthyleneDiamineTetraacetic Acid*
EGF: Factor de Creixement Epidèrmic (*Epidermal Growth Factor*)
EGF-R: Receptor del Factor de Creixement Epidèrmic (*Epidermal Growth Factor Receptor*)
EGTA: Ethylene Glycol-bis(2-aminoethyl ether)-Tetraacetic Acid
EREs: *Estrogen Response Elements*
ETM: Escissió Total del Mesorecte
FA: Àcid Folínic
FAM: marcador fluorescent

FAP: Poliposi Adenomatosa Familiar (*Familial Adenomatous Polyposis*)
FU: FluoroUracil
HC: High Control
hMLH: *human MutL Homologue*
hMSH: *human MutS Homologue*
hPMS: *human Post-Meiotic Segregation*
hnRNP: *heterogeneous nuclear RiboNucleoProteins*
HOP: *hsp Organising Protein*
HPV: *Human PapillomaVirus*
HR: Recombinació Homòloga (*Homologous Recombination*)
hRap: *human Repressor/activator protein*
hTERT: *human Telomerase Reverse Transcriptase*
hTP1: *human Telomerase-associated Protein 1*
hTR: *human Telomerase RNA*
hsp: *heat shock protein*
Ig G: Immunoglobulina G
IQ: Immunohistoquímica
IT: Índex de la Telomerasa
K1: *primer*
LC: *Low Control*
LOH: *Loss Of Heterozygosity*
LT: Longitud del telòmer
MCC: *Mutated in Colorectal Cancer*
MCR: *Mutation Cluster Region*
MDM2: *Murine Double Minute 2*
MMR: *MistMach Repair*
MRN: MRE11/RAD50/NBS
mRNA: RNA missatger
MSI: Inestabilitat de Microsatèl·lits (*Microsatellite INstability*)
MZF-2: *Myeloid cell-specific Zinc Finger protein 2*
NBS: Síndrome Nijmegen (*Nijmegen Breakage Syndrome protein*)
NCAM: *Neuronal cell Adhesion Molecular*
NHEJ: *Non-Homologous DNA end-joining*
PARP: *Poly(ADP-Ribosa)Polymerase*
PBS: Solució tampó de fosfat salí (*Phosphate Buffered Saline*)
PCR: *Polymerase Chain Reaction*
PEV: *Position-Effect Variegation*
PIC: *Protease Inhibitor Cocktail*

PIKK: *Phosphoinositide-3-Kinase related Kinases*
PIP1: *POT1 Interacting Protein 1*
PML: *Promyelocytic Leukemia*
PMSF: *PhenylMethaneSulfonyl Fluoride*
PNA: *Peptide Nucleic Acid*
POT1: *Protection Of Telomere 1*
PP2A: *Protein Phosphatase 2A*
pRB: *protein RetinoBlastoma*
PTOP1: *proteïna interacciona amb POT1*
PVDF: *PolyVinylidene Fluoride*
RLT: *Ràtio de la Longitud del Telòmer*
RNP: *RiboNucleoProtein*
RNA: *RiboNucleic Acid*
RP: *primer*
RT: *Reverse Transcriptase*
RT-PCR: *PCR transcriptasa inversa (ReverseTranscriptation Polymerase Chain Reaction)*
SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*
siRNA: *short-interfering RNA*
snoRNAs: *small nucleolar RNAs*
SSC: *Solució Salina Citrat*
SV40: *Simian Virus 40*
TAE: *Tris Acetat EDTA*
Tank: *tanquirasa*
TBS: *Tris Buffered Saline*
TBST: *Tris Buffered Saline with Tween*
TC: *Tomografia Computaritzada*
TE: *Tris-EDTA*
TGF: *factor de creixement transformant (Transforming Growth Factor)*
TIN2: *TRF-1 Interacting Nuclear protein 2*
TNM: *Tumor-Node-Metastasis*
TPP1: *PTOP1/PIP1/TIN1*
TRAP: *Telomeric Repeat Amplification Protocol*
TRAP-F: *Fluorescent- Telomeric Repeat Amplification Protocol*
TRF-1: *Telomeric Repeat binding Factor 1*
TRF-2: *Telomeric Repeat binding Factor 2*
TS: *primer*
TSK1: *primer*
TSR8: *Control positiu en l'anàlisi TRAP*

UICC: Unió Internacional Contra el Càncer

VEGF: Factor de Creixement de l'Endoteli Vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

WB: Western Blot

WT1: *Wilms' Tumor protein 1*

Wnt: *Wingless pathway*

WRN: DNA helicases i exonucleases

UNITATS

cm: centímetre

g: acceleració de la gravetat

Kb: Kilobase(s)

Kpb: Kiloparells de bases

KDa: KiloDaltons

M: Molar (mols/litre)

mg: miligram

mL: miliLitre

mM: miliMolar (milimols/litre)

µg: microgram

µl: microlitre

ng: nanogram

nm: nanòmetre

pb: parells de bases

rpm: revolucions per minut

TPG: Producte Total Generat (*Total Product Generated*)

V: Volts

IX. ÍNDEX DE FIGURES

Figura 1. Esquema en el que es representen les dues vies per les quals es pot desenvolupar el carcinoma colorectal.....	9
Figura 2. Model dels canvis genètics en cada una de les fases del càncer colorectal. Modificat de Fearon i Vogelstein (28).....	14
Figura 3. Estructura de <i>T-loop</i> que adopten els extrems dels telòmers amb la col·laboració de les proteïnes que s'uneixen a les repeticions telomèriques.....	27
Figura 4. Problema final de replicació. A) Força de replicació amb la síntesi continua en una cadena i discontinua en l'altra B) Replicació incompleta dels extrems del DNA de les cadenes que són sintetitzades de <i>novo</i> . Modificat de Dhaene et al., (55).....	28
Figura 5. Esquema de la hipòtesi inicial de la telomerasa i els telòmers.....	29
Figura 6. Esquema de la connexió entre el supressor de tumors p53 i els telòmers. Modificat d'Artandi i Attardi (58).....	29
Figura 7. Organització del gen hTERT. Aquest gen està format per 16 exons. hTERT conté un motiu telomerasa específic (T) i set motius transcriptasa inversa (1,2,A,B,C,D,i E). En la part inferior de l'esquema es mostra en quins punts de la cadena d'aminoàcids (aa) tenen lloc les insercions (1,2 i 3) i les delecions (α i β) que donen lloc a les variants d' <i>splicing</i>	32
Figura 8. Procés d'unió dels diferents components que formen el complex de la telomerasa. Modificat de Collins K (63).....	42
Figura 9. Les repeticions telomèriques són associades amb les proteïnes que s'uneixen directament al DNA telomèric, TRF1, TRF2 i POT1 les quals formen el nucli de l'estructura telomèrica. Modificat de Rodier <i>et al.</i> , (93).....	43
Figura 10. Estructura del final dels telòmers (<i>capping</i>). El nucli de l'estructura telomèrica (proteïnes de color blau) recluta altres proteïnes essencials per mantenir l'estructura de <i>T-loop</i> però aquestes no interaccionen directament amb les repeticions telomèriques (proteïnes de color verd). Modificat de Rodier <i>et al.</i> , (93).....	45
Figura 11. El <i>T-loop</i> també recluta un gran nombre de proteïnes, com tanquirases i proteïnes reparadores del DNA que tenen altres funcions no relacionades amb els telòmers (proteïnes vermelles i marrons). Modificat de Rodier <i>et al.</i> , (93).....	46
Figura 12. Model del tres estadis pel manteniment de la homeòstasi dels telòmers. Modificat de Hug i Lingner (54).....	48
Figura 13. Mecanisme per a l'allargament del telòmer telomerasa-independent i que es coneix amb el nom d'ALT (<i>alternative lengthening telomere</i>). Reddel RR (97).....	49
Figura 14. Rol dual de la telomerasa i els telòmers segons el context genètic de la cèl·lula. Modificat de Brunori <i>et al.</i> , (60).....	50
Figura 15. Esquema del tipus i nombre de mostres analitzades.....	62
Figura 16. Esquema on es representen les dues etapes en les quals es basa la determinació de l'activitat de la telomerasa.....	65
Figura 17. Representació esquemàtica de les principals etapes del Southern blot.....	68
Figura 18. Esquema representatiu de les principals etapes del Western blot.....	71

Figura 19. Imatges del seqüenciador de DNA. El pic de 36 pb és el control intern. Els productes d'extensió de la telomerasa són extensions de 6 nucleòtids (50, 56, 62, 68 pb...). El marcador de pes molecular està representat en vermell i les mostres en blau. TSR8 és el control positiu.....	81
Figura 20. Percentatge de mostres telomerasa positives en cada una de les mucoses estudiades.....	82
Figura 21. Mitjana de l'activitat de la telomerasa en les diferents mucoses.....	82
Figura 22. Imatge que s'obté amb el Lumi-Imager producte final del Southern blot. A esquerre i dreta de la imatge hi ha els marcadors de pes molecular, en el centre les mostres (T = mucosa tumoral, P = pòlip, N = mucosa normal) i a la dreta els controls positius (HC: <i>high control</i> , LC: <i>low control</i>).....	85
Figura 23. Comportament dels telòmers en els 104 pacients en els quals es va analitzar la longitud del telòmer.....	88
Figura 24. Representació de les mitjanes de la longitud del telòmer en la mucosa tumoral i normal segons el comportament dels telòmers.....	90
Figura 25. Correlació de la longitud del telòmer entre la mucosa tumoral i la normal....	91
Figura 26. Correlació de la longitud del telòmer entre la mucosa tumoral i l'edat.....	91
Figura 27. Correlació de la longitud del telòmer entre la mucosa normal i l'edat.....	92
Figura 28. Percentatge de mostres en cada un dels tres tipus de comportament dels telòmers segons si les mostres eren telomerasa positives o negatives.....	93
Figura 29. Correlació entre la longitud del telòmer i l'activitat de la telomerasa en la mucosa tumoral.....	94
Figura 30. Correlació entre la longitud del telòmer i l'activitat de la telomerasa en la mucosa normal.....	94
Figura 31. Imatge d'un Western blot (293: línia cel·lular que sobreexpressa TRF1, N = mostra normal, T = mostra tumoral, les quals eren mostres aparellades). Primera fila correspon al TRF1 i la segona a l'alfa-tubulina, proteïna d'expressió constitutiva que s'ha utilitzat com a control intern de cada mostra.....	96
Figura 32. Distribució dels nivells d'expressió del TRF1 en les mucoses normal i tumoral..	96
Figura 33. Distribució de la ràtio entre l'expressió del TRF1 en la mucosa tumoral i en la normal.....	97
Figura 34. Distribució de les mostres normals i tumorals segons els nivells d'expressió del TRF1, negatiu/dèbil o mig/alt.....	100
Figura 35. Percentatge de mostres amb expressió del TRF1 (negativa/baixa, intermèdia/alta) segons si expressaven o no activitat de la telomerasa.....	102
Figura 36. Corbes de supervivència del temps lliure de malaltia als 2 anys en els pacients amb càncer de còlon en funció de la classificació T.....	108

Figura 37. Corbes de supervivència del temps lliure de malaltia als 4 anys en els pacients amb càncer de còlon en funció del comportament dels telòmers.....	108
Figura 38. Corbes de supervivència del temps lliure de malaltia als 2 anys en els pacients amb càncer de recte en funció de la classificació de Dukes (A) i de la classificació N (B).....	110
Figura 39. Corbes de supervivència del temps lliure de malaltia als 2 anys en els pacients amb càncer de recte en funció de l'estadi TNM (A) i l'IT (B).....	110
Figura 40. Corbes de supervivència del temps lliure de malaltia als 2 anys en els pacients amb càncer de recte en funció de l'IT+RLT.....	110
Figura 41. Corbes de supervivència del temps lliure de malaltia als 4 anys en els pacients amb càncer de recte en funció de la classificació de Dukes (A) i de la classificació N (B).....	111
Figura 42. Corbes de supervivència del temps lliure de malaltia als 4 anys en els pacients amb càncer de recte en funció de l'estadi TNM (A) i l'IT+RLT (B).....	111
Figura 43. Corbes de supervivència del temps lliure de malaltia als 2 anys en els pacients amb càncer colorectal en funció del sexe (A) i la classificació N (B).....	113
Figura 44. Corbes de supervivència del temps lliure de malaltia als 2 anys en els pacients amb càncer colorectal en funció de l'IT+RLT.....	113
Figura 45. Corbes de supervivència del temps lliure de malaltia als 4 anys en els pacients amb càncer colorectal en funció del sexe (A) i la classificació N (B).....	113
Figura 46. Corbes de supervivència del temps lliure de malaltia als 4 anys en els pacients amb càncer colorectal en funció de l'IT+RLT.....	114
Figura 47. Corbes de supervivència global als 2 anys en els pacients amb càncer de còlon en funció de l'RLT (A) i l'IT+RLT (B).....	116
Figura 48. Corbes de supervivència global als 2 anys en els pacients amb càncer de còlon en funció de la ràtio del TRF1.....	116
Figura 49. Corbes de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer de còlon en funció de l'edat (A) i la classificació de Dukes (B).....	116
Figura 50. Corbes de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer de còlon en funció de la classificació N (A) i la RLT(B).....	117
Figura 51. Corbes de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer de còlon en funció de l'IT+RLT (A) i la ràtio del TRF1(B).....	117
Figura 52. Corbes de supervivència global als 2 anys en els pacients amb càncer de recte en funció de la classificació N (A) i l'IT(B).....	119
Figura 53. Corbes de supervivència global als 2 anys en els pacients amb càncer de recte en funció de l'IT+RLT.....	119
Figura 54. Corbes de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer de recte en funció de la classificació de Dukes (A) i la classificació N (B).....	119

Figura 55. Corbes de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer de recte en funció de l'estadi TNM (A) i l'IT (B).....	120
Figura 56. Corbes de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer de recte en funció de l'IT+RLT.....	120
Figura 57. Corbes de supervivència global als 2 anys en els pacients amb càncer colorectal en funció de la classificació de Dukes (A) i la classificació N (B).....	122
Figura 58. Corbes de supervivència global als 2 anys en els pacients amb càncer colorectal en funció de l'estadi TNM (A) i l'RLT (B).....	122
Figura 59. Corbes de supervivència global als 2 anys en els pacients amb càncer colorectal en funció de l'IT+RLT (A) i la ràtio del TRF1(B).....	123
Figura 60. Corbes de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer colorectal en funció de l'edat (A) i la classificació de Dukes (B).....	123
Figura 61. Corbes de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer colorectal en funció de la classificació N (A) i l'estadi TNM (B).....	123
Figura 62. Corbes de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer colorectal en funció de l'RLT (A) i l'IT+RLT (B).....	124
Figura 63. Corbes de supervivència global als 4 anys en els pacients amb càncer colorectal en funció de la ràtio del TRF1.....	124
Figura 64. Correlació entre la longitud del telòmer en cèl·lules sanguínies i l'edat dels pacients.....	131
Figura 65. Correlació entre la longitud del telòmer en cèl·lules sanguínies i en mucosa colònica normal de pacients intervinguts de càncer colorectal.....	132
Figura 66. Correlació entre l'edat dels pacients i la LT en cèl·lules sanguínies.....	134
Figura 67. Correlació entre l'edat dels pacients i la LT en la mucosa colònica.....	134
Figura 68. Correlació entre la LT de les cèl·lules sanguínies i la LT de la mucosa colònica.....	135