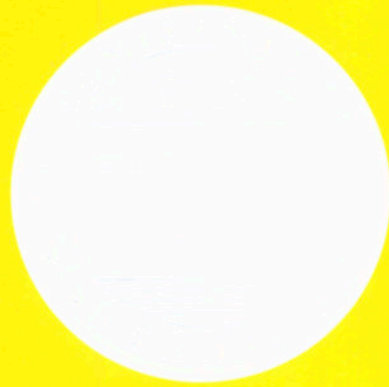
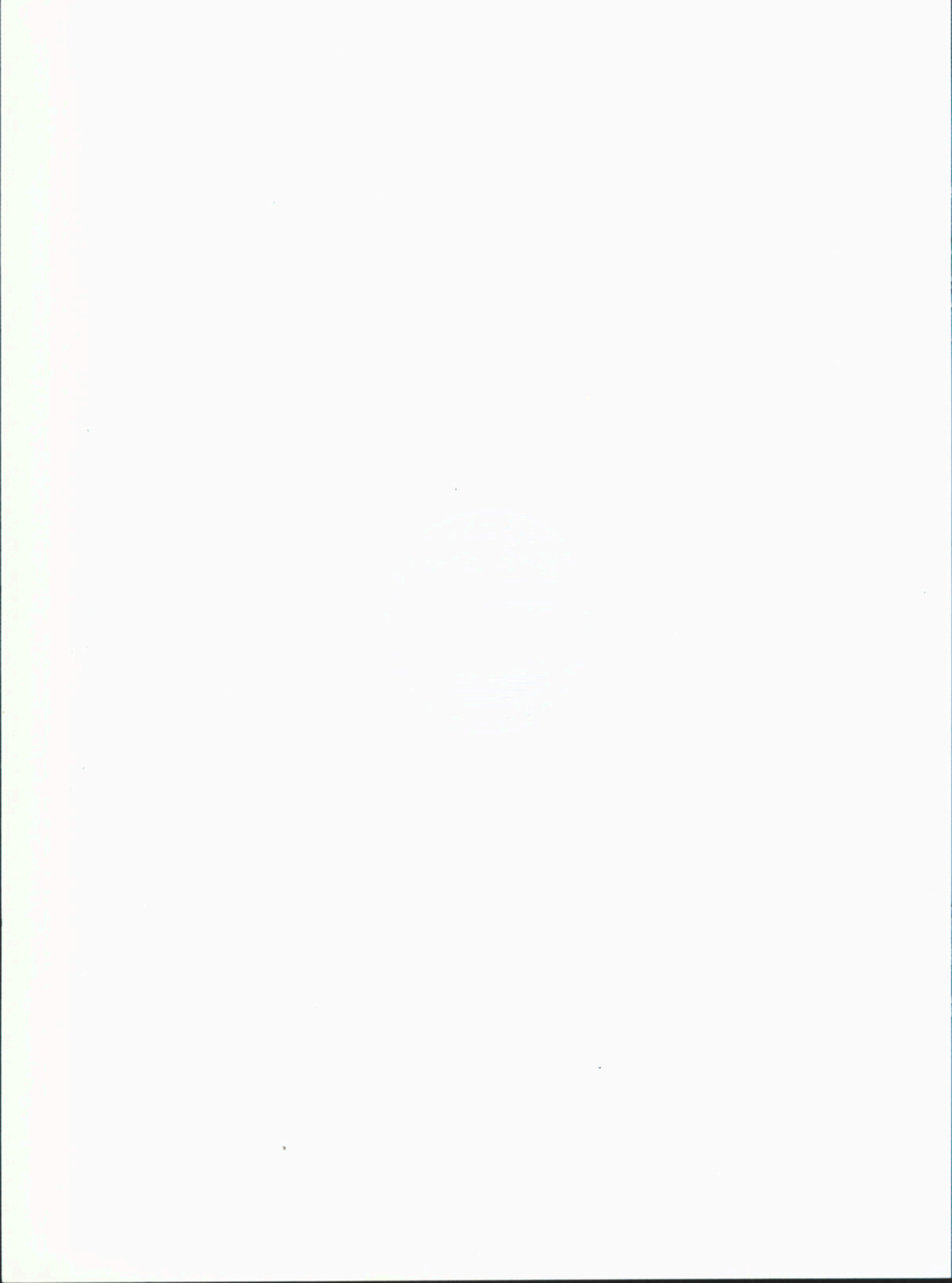


**REVISTA DE LA
REIAL ACADEMIA DE MEDICINA
DE CATALUNYA**

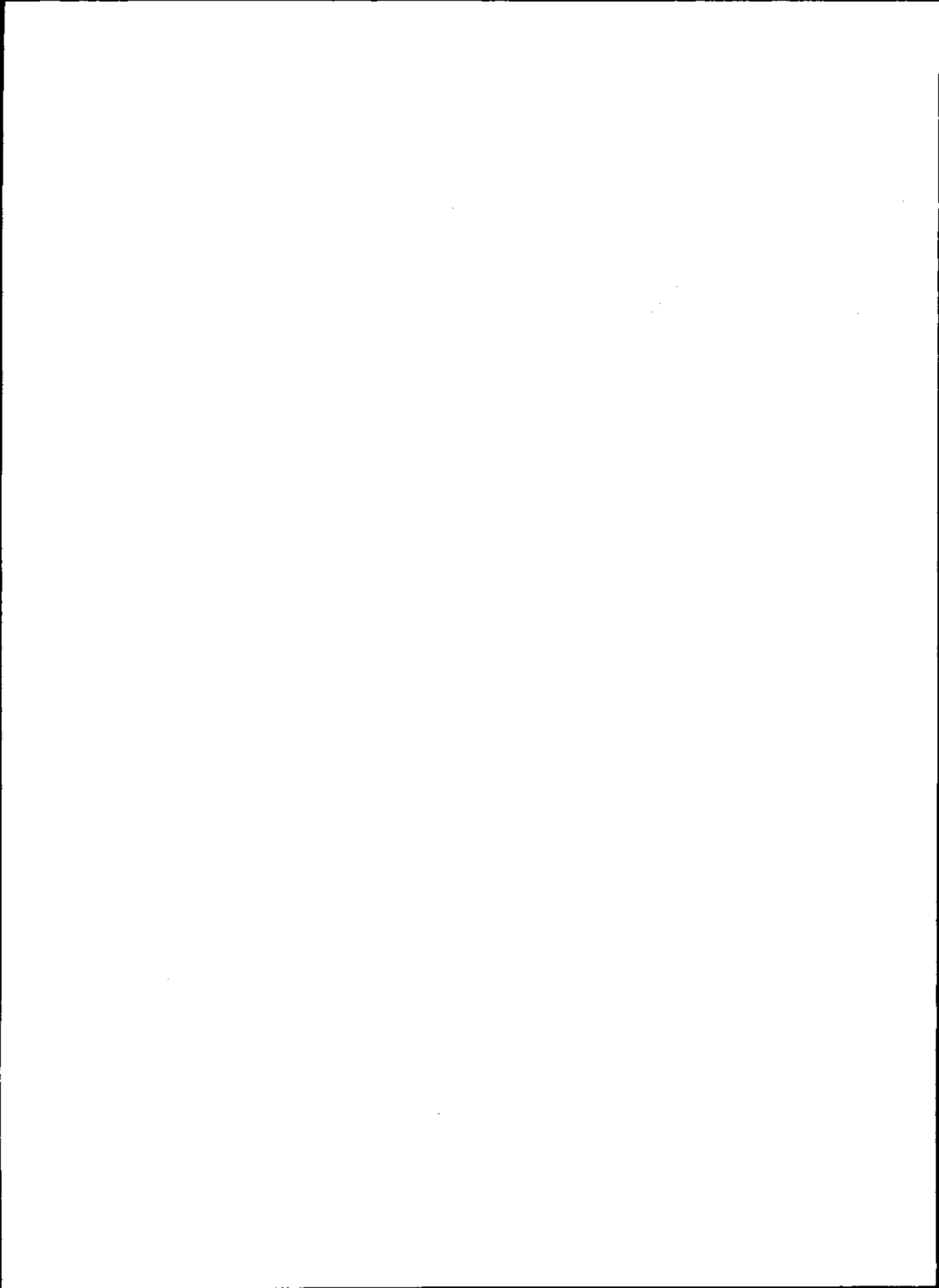


VOLUM 13 - NÚMERO 2 - 1998



**REVISTA DE LA
REIAL ACADÈMIA DE MEDICINA
DE CATALUNYA**

VOLUM 13 - NÚMERO 2 - 1998



REVISTA DE LA REIAL ACADEMIA DE MEDICINA DE CATALUNYA

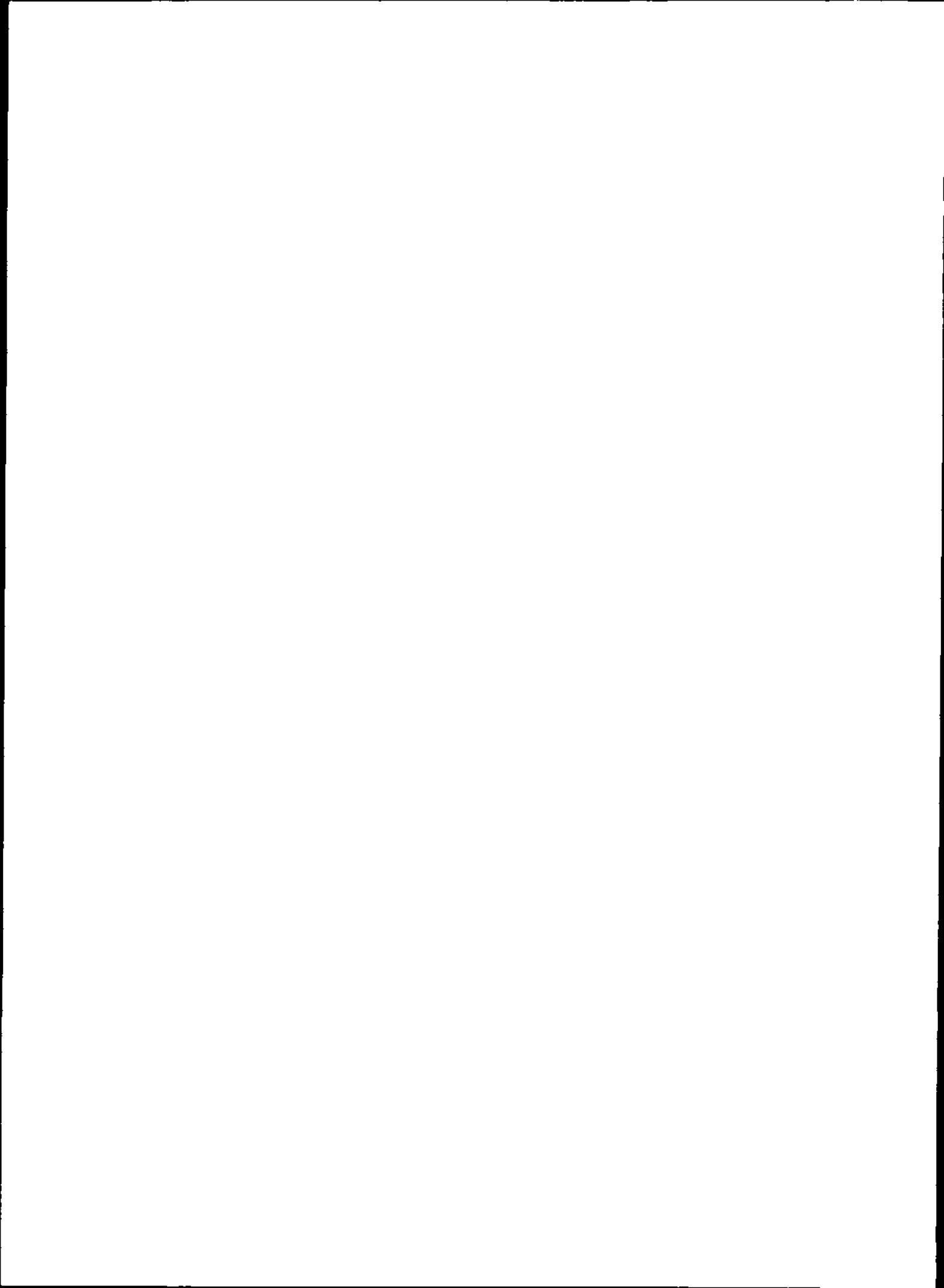
JUNTA DIRECTIVA DE LA REIAL ACADEMIA

PRESIDENT: Josep Laporte i Salas
VICEPRESIDENT: Josep A. Salvà i Miquel
SECRETARI GENERAL: Jacint Corbella i Corbella
VICE-SECRETARI: Francesc Climent i Montoliu
SECRETARI D'ACTES: Alfons Gregorich i Serrat
TRESORER: Joaquim Tornos i Solano
BIBLIOTECARI: Josep M. Massons i Esplugas
VOCAL: Jordi Sans i Sabrafèn
ARXIVER: Josep Esteve i Soler
PRESIDENT D'HONOR: Moisès Broggi i Vallès

CONSELL DE REDACCIÓ DE LA REVISTA

DIRECTOR: Màrius Foz i Sala
REDACTOR EN CAP: Nicolau Barquet i Esteve
SECRETARI DE REDACCIÓ: Ferran Nonell i Gregori
CONSELL EDITORIAL: Jacint Corbella i Corbella
Josep M. Dexeus i Trias de Bes
Rafael Esteve de Miguel
Joan Sabater i Tobella
Jordi Sans i Sabrafèn
Joaquim Tornos i Solano

REDACCIÓ: Ediciones Doyma, S.A. Travessera de Gràcia 17-21. 2on.
08021 Barcelona



REVISTA DE LA REIAL ACADÈMIA DE MEDICINA DE CATALUNYA

SUMARI

VOL. 13

Núm. 2

MAIG-AGOST 1998

EDITORIAL

A les portes d'un nou segle i cap al final d'un llarg camí
J. Sans-Sabrafen

61

COL·LOQUI: BIOLOGIA MOLECULAR DEL CÀNCER

Oncogens i antioncogens
A. Cardesa

63

Mecanismes moleculars en el càncer de còlon
E. Campo

69

Alteracions moleculars associades als tumors de bufeta urinària
C. Cordon-Cardo

75

Biologia molecular del càncer de pàncrees
G. Capellà i F. Lluís

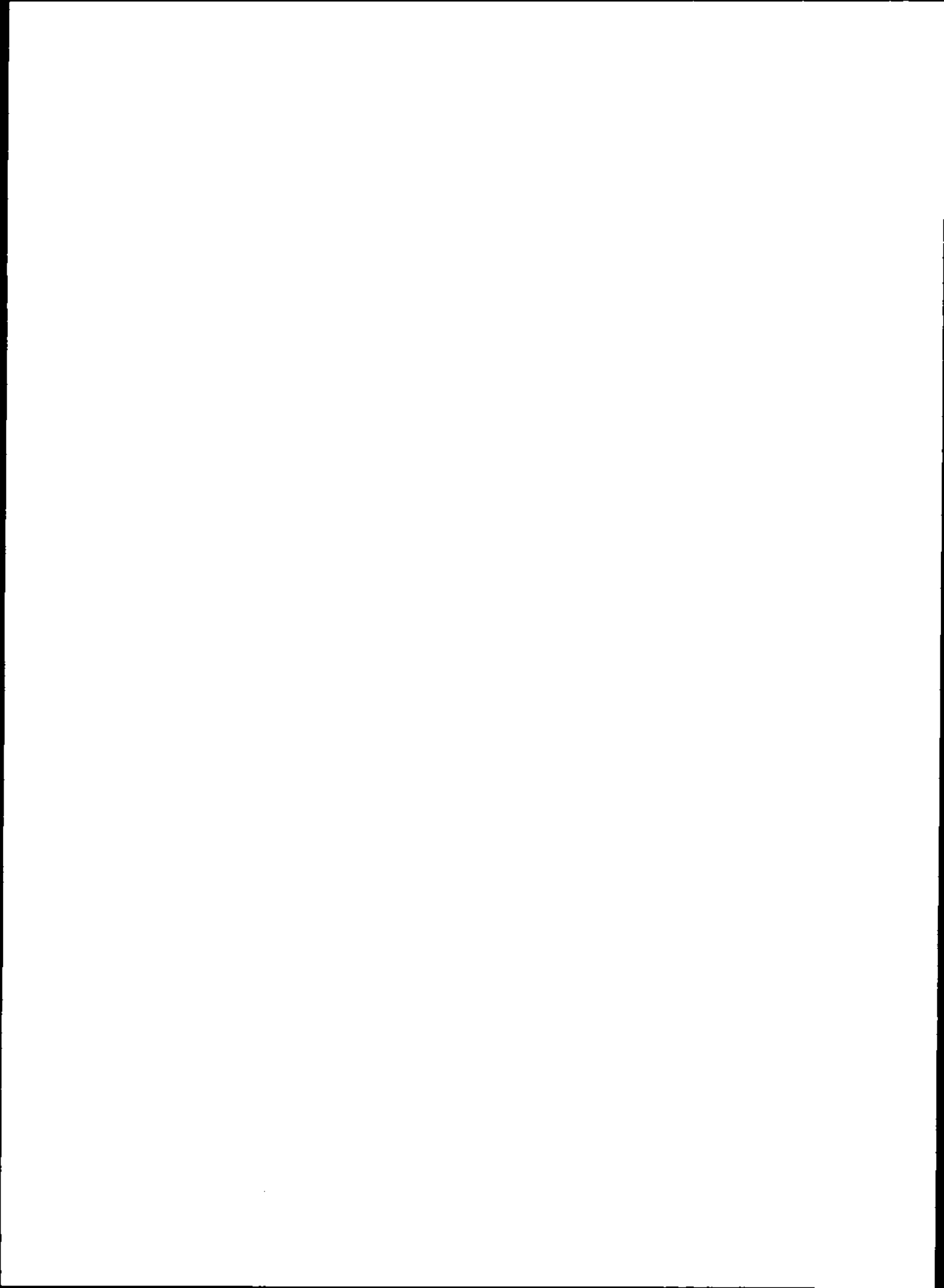
84

Bases moleculars del càncer de mama
P.L. Fernández

89

VIDA ACADÈMICA

93



A LES PORTES D'UN NOU SEGLE I CAP AL FINAL D'UN LLARG CAMÍ

Tot just comenci el nou segle es compliran 100 anys de la primera fita terapèutica específica important de la lluita de l'home contra les malalties neoplàstiques. La radioteràpia, en efecte, introduïda ben al començament d'aquest segle, aconseguia alshores els seus primers resultats, que hom contemplava amb sorpresa i esperança. Constituïa el primer pas important d'aquest llarg camí que, amb interrupcions més o menys perllongades, aniria conduint a l'esclat de progressos que estem vivint actualment. I quan diem esclat ens referim concretament a la biologia molecular, la qual, amb un constant i profund avenç, ens està descobrint les bases genètiques que condicionaran, sens dubte, la futura terapèutica oncològica.

Des de l'esmentada introducció de la radioteràpia fins que disposarem dels primers citostàtics, que permetien contemplar el tractament de la malaltia estesa, passaren més de 40 anys. Durant aquestes llargues dècades, l'home s'ho enginyà per treure el millor partit possible de la primera arma de què disposava, però, si hom fa excepció de determinats processos localitzats, les victòries que s'aconseguien, quasi sempre amb el decisiu ajut de la cirurgia, eren força limitades. En aquesta fase, en efecte, la cirurgia, que havia assolit un molt important desenvolupament, contribuï, més que la mateixa radioteràpia, a la curació del càncer. Quan arriba la Segona Guerra Mundial continuen morint-se la majoria de pacients afectats de malalties malignes.

Per aquelles estranyes circumstàncies del destí, una substància, anomenada gas mostassa, utilitzada com a producte bèl·lic durant aquesta gran guerra, passarà ràpidament des dels camps de batalla de Flandes a les venes dels nostres pacients, fet que inaugura, el 1946, la quimioteràpia citostàtica en la història de la Medicina. A partir d'aquí seguiran 50 anys de progressos continuats, durant els quals s'introdueix el concepte d'estratègia diagnòstica i terapèutica en la lluita contra aquestes malalties i que dona naixença a una nova especialitat anomenada Oncologia Mèdica, la qual estableix les bases científiques que permeten treure el màxim profit de tots els avanços que es van registrant i que es produeixen sobretot a mesura que s'introdueixen i apliquen els nous fàrmacs citostàtics. Aquests medicaments permeten estructurar combinacions poliquimioteràpiques que, seguint els conceptes d'intensitat i d'intermitència, destrueixen les cèl·lules neoplàstiques, tot i que amb un inevitable dany, que es pro-

cura reduir al mínim possible, sobre les cèl·lules normals. Amb totes aquestes combinacions, amb el decisiu ajut de la cirurgia i de la radioteràpia, i amb un millor coneixement de les estratègies diagnòstica i terapèutica oncològiques, ens trobem al final d'aquest segle amb l'important avenç que significa el poder guarir aproximadament la meitat de totes aquestes malalties. Però en arribar a aquest punt és obligat també que acceptem, amb humilitat, que essent molt el que s'ha avançat és també molt el que manca per aconseguir. Queda encara un llarg camí per recórrer.

Es digui el que es digui, des de fa uns 15 anys, gairebé no es produeixen innovacions terapèutiques transcendents en la lluita contra el càncer. Ens consola, emperò, el fet de poder presagiar que els progressos de les ciències bàsiques ens permetran disposar, relativament aviat, de nous tractaments, més selectius que els actuals citostàtics i que aniran dirigits contra els mecanismes íntims que anem progressivament coneixent i que representen graons més concrets que condueixen al desenvolupament de la malaltia cancerosa. La quimioteràpia no progressa amb la rapidesa desitjable. Es van introduint nous fàrmacs que permeten dissenyar noves combinacions que, en general, es limiten a millorar de forma discreta el percentatge de remissions i de guariments. És excepcional que s'introdueixi un nou citostàtic que sigui molt valuós i que pugui controlar una malaltia, com la 2-clorodesoxiadenosina o la desoxicofomicina ho aconseguen amb la tricoleucèmia. Els citostàtics, a més, disposen, en general, de poc poder autènticament corrector (limitat a la correcció del mecanisme íntim responsable) i solen ser massa tòxics per a les cèl·lules normals. Les molèsties subjectives que causen ens han obligat a introduir nous tractaments per a pal·liar-les. La seva toxicitat hematològica i visceral és també important i ens obliga per tant a emprar factors de creixement i d'altres mesures de suport mentre s'espera que el pacient es recuperi i pugui continuar el tractament. Cal sovint acceptar el preu d'una toxicitat força feixuga, tot i que és clar que en alguns processos, com és el cas de la malaltia de Hodgkin, el tractament se suporta prou bé, sobretot si es té en compte el benefici indiscutible que proporciona. Però, fins i tot en aquestes circumstàncies més favorables, hem de lamentar que es produeixen efectes secundaris tan importants per a la qualitat de vida dels pacients com l'ocasional aparició d'esterilitat o la més greu presentació de segones neoplàsies tardanes, les

quals, paradoxalment, acaben amb la vida de pacients que s'ha aconseguit primer de curar. El mateix recurs de l'auto-trasplantament, amb precursors del moll d'os o de la sang perifèrica, que ens veiem obligats a utilitzar en els casos rebels i que n'aconsegueix de guarir alguns, representa el relatiu fracàs dels actuals agents citostàtics, els quals, en aquests casos, s'han d'utilitzar a dosis encara molt més elevades i per tant molt més tòxiques i que evidencien la limitació dels nostres recursos terapèutics actuals, poc selectius encara i poc respectuosos amb les cèl·lules normals innocents. Estem parlant lògicament de quimioteràpia en general, i no fem esment, per exemple, dels tractaments hormonals minoritaris que s'empren eficaçment en determinades neoplàsies hormonosensibles com són les de pròstata i les de mama.

Les malalties neoplàstiques es desencadenen a partir de desviacions dels gens que intervenen en el control de la multiplicació cel·lular. Els gens muten, s'amplifiquen o pateixen translocacions que determinen el desencadenament d'una proliferació anòmala. El gran descobriment, l'any 1953, de l'estructura del DNA, fou l'inici d'un progrés indeturable que conduí a la identificació, fa uns 25 anys, de les primeres alteracions genètiques somàtiques específiques vinculades a les neoplàsies i que donaven origen al desenvolupament de la biologia molecular en l'àmbit de l'estudi del càncer. Durant tot aquest darrer quart de segle s'ha anat aprofundint més i més en el coneixement dels mecanismes més íntims que intervenen en la gènesi de la malaltia cancerosa i cal esperar que, a mesura que progressem en aquest coneixement, anem descobrint zones i punts "diana" que permetin que les terapèutiques del futur disposin d'objectius d'atac molt més precisos i concrets per a poder interferir la proliferació i el creixement tumorals. Uns gens faciliten la multiplicació i d'altres la inhibeixen afavorint la mort programada o apoptosi. És així com es configura el caràcter agressiu d'unes malalties i l'acumulatiu, relativament quiescent, d'altres i és així també com, coneixent els gens responsables, podrem arribar a interferir la mateixa patogènesi de tots aquests processos. Mentrestant, en l'àmbit experimental, hom disposa de nucleòtids antisentit que poden interferir el gen quimèric de la translocació t(9;22) de la leucèmia mieloide crònica i fins i tot, en clínica humana, d'una substància com és l'àcid holotransretinoic el qual, com que disposa d'un receptor específic en el cromosoma 17, que és el que rep el gen PML localitzat en el cromosoma 15, determina la diferenciació cel·lular normal dels promielòcits leucèmics generats per aquesta translocació i, en conseqüència, la

remissió de la malaltia. Fa poc que disposem ja, també en clínica humana i per al tractament dels limfomes no hodgki-nians, d'anticossos monoclonals anti CD20 que es poden dirigir contra cèl·lules B limfomatoses que expressen aquest antígen i també d'altres, com ara els anticossos monoclonals dirigits contra el gen c-erb B₂ per al tractament de determinats casos de càncer de mama avançats amb sobreexpressió HER 2. I mentrestant, i des de fa pocs anys, coneixem el que són els anomenats telòmers que governen la vida de les cèl·lules i que, ubicats en els extrems dels cromosomes, són sintetitzats per l'acció de l'enzim telomerasa, del qual disposen les cèl·lules embrionàries i canceroses per a aconseguir la immortalitat. Les cèl·lules normals, que posseeixen un capital determinat de telòmers, envelleixen i moren perquè no disposen de telomerasa i, per tant, de la capacitat de sintetitzar els telòmers que van perdent. Les cèl·lules neoplàstiques, que van recuperant el dot de telòmers, es multipliquen contínuament fins acabar amb la vida de l'hoste que en pateix la presència. Imaginem que un dia disposem en clínica humana d'un inhibidor de la telomerasa que, d'una forma àmplia i inespecífica, interfereixi la síntesi de telòmers i determini que s'aturi el desenvolupament d'un gran nombre de neoplàsies.

Diu David Lane, en un recent treball publicat a la revista "Lancet", que és sempre instructiu endevinar el futur i que és molt possible que, en el camp concret de les malalties neoplàstiques, s'esdevingui un gran canvi en els propers 25 anys, els mateixos que s'ha trigat a arribar on som ara, des que començà l'aplicació de la biologia molecular en el terreny del càncer. És fàcil presagiar que la distància entre els conceptes bàsics i la seva aplicabilitat clínica s'anirà escurçant progressivament fins arribar a una nova època en la qual, gràcies a aquesta progressiva aproximació, disposarem ja de tractaments molt més selectius, molt més correctors i molt més ben dirigits, per tant, contra els mecanismes íntims que intervenen decisivament en la gènesi i el desencadenament de la malaltia neoplàstica. Quan arribi aquest moment, la majoria dels actuals tractaments, molt valuosos ara, però sovint massa tòxics, quedaran reduïts a una pura anècdota històrica.

En el col·loqui que motiva aquest editorial hom pot comprovar aquests grans progressos que s'estan enregistrant en el coneixement de la intimitat genètica de diferents neoplàsies i que són la base, repetim, dels canvis pràctics conceptuals, diagnòstics i terapèutics que presagiem, que desitgem i que s'acosten.

JORDI SANS-SABRAFEN

ONCOGENS I ANTIONCOGENS

Antonio Cardesa*

ONCOGENS

El 1969 Huebner i Todaro van proposar que els gens responsables de regular el desenvolupament normal en els organismes multicel·lulars podien alterar-se i donar lloc al creixement sense regulació pròpia del càncer. El terme "oncogèn" va ser introduït per a descriure tals gens i el postulat va ser conegut com a la "hipòtesi de l'oncogèn".

La demostració experimental d'aquesta hipòtesi es va fer anys després, el 1983, per Bishop i Vermus, en descobrir que l'oncogèn o gen transformador *src* del virus del sarcoma de Rous compartia seqüències amb gens cel·lulars normals. Subsegüentment es va proposar que altres oncogens retrovirals (virus oncogens RNA) eren homòlegs als "protooncogens" de les cèl·lules normals. D'aquestes investigacions va sorgir el concepte vigent que els protooncogens són gens cel·lulars normals que estimulen creixement, desenvolupament i diferenciació, i que quan s'activen es converteixen en oncogens, que donen lloc a la cèl·lula transformada o neoplàstica.

A causa del fet que es van descobrir inicialment com a gens vírics, els protooncogens es designen segons els seus homòlegs vírics. Cada *v-onc* es designa amb una paraula de tres lletres que relaciona a l'oncogèn amb el virus a partir del qual va ser aïllat. Per tant, el *v-onc* contingut en el virus del sarcoma de Rous es coneix com a *v-src*, i la seva contrapartida cel·lular com a *c-src*. El protooncogèn corresponent es designa *src*, eliminant el prefix.

Pràcticament tots els oncogens retrovirals tenen la seva contrapartida de protooncogèn detectable en el DNA humà. Molts d'aquests protooncogens, activats per tota una sèrie de mecanismes, s'han associat amb una sèrie de càncers humans. Sembla ser que el procediment general pel qual es produeix la seva activació radica en modificacions en l'estructura o en l'expressió de certs protooncogens. Aquests mecanismes són els següents: mutacions puntiformes, translocacions

cromosòmiques, amplificació i/o sobreexpressió i inserció vírica (taula I). Tots aquests mecanismes donen lloc a oncogens dominants, és a dir, que l'activació d'un sol dels dos al·lels cel·lulars del protooncogèn és suficient per a produir l'efecte oncogènic corresponent.

Els oncogens codifiquen proteïnes denominades "oncoproteïnes", que s'assemblen als productes normals dels protooncogens, amb l'excepció que les oncoproteïnes manquen d'importants elements reguladors i que la seva producció per les cèl·lules transformades no depèn de factors de creixement o altres senyals externs.

Els oncogens i les seves oncoproteïnes s'agrupen generalment segons el paper que desenvolupen al llarg de la cascada de transició de senyals cel·lulars de la manera següent: 1) gens per a factors de creixement i/o receptors; 2) gens per a factors citoplasmàtics del sistema de transducció de senyals; 3) gens per a factors de transcripció intracel·lulars, i 4) gens per a altres tipus diversos de molècules (taula II). En essència, aquests diferents grups es corresponen amb els diferents passos que tenen lloc en la transmissió de la informació des de l'exterior de la cèl·lula fins a l'interior del nucli. Aquests són els següents: a) unió d'un factor de creixement al seu receptor específic sobre la membrana cel·lular; b) activació transitòria del receptor del factor de creixement; c) activació subsegüent de diverses proteïnes transductores de senyals en la capa interna de la membrana cel·lular; d) transmissió dels esmentats senyals, per mitjà de segons missatgers, des del citosol al nucli, i e) activació de factors reguladors nuclears que inicien la transcripció del DNA i, finalment, la divisió cel·lular.

Factors de creixement

La sobreexpressió de factors de creixement proporciona un important mecanisme en la progressió tumoral (taula III); les cèl·lules s'autoestimulen en el seu creixement per un mecanisme autocrí, fet per al qual es requereix que expressin el receptor del factor de creixement corresponent.

*Acadèmic Numerari, Departament d'Anatomia Patològica, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona

TAULA I
Mecanismes d'activació d'oncogens

- Mutacions puntiformes
- Translocacions cromosòmiques
- Amplificació i/o sobreexpressió
- Inserció vírica

TAULA II
Grups d'oncogens

- Gens per a factors de creixement i/o els seus receptors
- Gens per a factors citoplasmàtics del sistema de transducció de senyals
- Gens per a factors de transcripció intranuclears
- Gens per a altres tipus de molècules

TAULA III
Gens per a factors de creixement i/o els seus receptors

sis	Factor de creixement. Cadena beta PDGF. Sobreexpressió en gliomes i osteosarcomes
TGF-alfa	Factor de creixement. Sobreexpressió en carcinoma hepàtic i altres carcinomes
erb-B1	Receptor de l'EGF. Sobreexpressió en carcinoma epidermoide, pulmó, laringe, gliomes, etc.
erb-B2	Receptor del factor de creixement. Amplificat en càncers de mama, ovari, glàndules salivals
fms	Receptor de CSF1. Leucèmies mieloides
RET	Receptor del factor de creixement. Sobreexpressió en el carcinoma papil·lar i medul·lar de tiroides. Síndrome MEN2 hereditari

Aquest és el cas del protooncogen *sis* que codifica la cadena beta del PDGF. L'oncogen *v-sis* és el gen transformant del retrovirus *simien sarcoma virus*. Astrocitomes i osteosarcomes humans produeixen PDGF. A més, aquests mateixos tumors expressen receptors de PDGF, fet pel qual estan sotmesos a autoestimulació autocrina. Experimentalment s'ha vist que només les cèl·lules que posseeixen receptors de PDGF poden ser transformades en neoplàsiques pel *simien sarcoma virus*. El TGF-alfa o *transforming growth factor alfa* està relacionat amb el factor de creixement epidèrmic (EGF). El TGF-alfa es detecta freqüentment en diversos tipus de carcinomes que expressen alts nivells del receptor d'EGF, entre els quals es troba l'hepatocarcinoma. En tumors gastrointestinals, de mama i melanomes s'activen oncogens que codifiquen homòlegs de factors de creixement dels fibroblasts com són el *hst-1* i l'*int-2*.

Receptors de factors de creixement

Els receptors de factors de creixement són proteïnes transmembrana, amb un domini extern que s'uneix al lligand i un domini citoplasmàtic amb activitat tirosina cinasa. En les formes normals l'activitat cinasa s'activa transitòriament per unió al lligand. En les formes oncogèniques aquests receptors s'activen de manera persistent en el domini citoplasmàtic, sense necessitat que intervingui el seu lligand corresponent, que és el factor de creixement (taula III). Els receptors mutants envien continuament senyals mitogènics a la cèl·lula per mitjà de la fosforilació permanent de la tirosina en els substrats que formen cascada mitòtica.

L'oncogen transformant del virus de l'eritroblastosi aviària (*v-erb B*) codifica una proteïna que es correspon amb un receptor mutant de l'EGF (*epidemiol growth factor*). Per tot això, tots els protooncogens d'aquest grup es coneixen com a *erb-B*.

Molt més freqüents que les formes mutades d'aquests protooncogens són les formes normals amb expressió excessiva o sobreexpressió. La forma normal d'*erb-B1*, el gen receptor d'EGF està sobreexpressada en el 80% dels carcinomes epidermoïdes de pulmó i, menys freqüentment, en carcinomes es-

TAULA IV
Gens per a factors de transducció de senyals citoplasmàtics

K-ras	Activitat GTP-asa. Mutació puntiforme en carcinomes de pulmó, còlon, pàncreas, leucèmies
N-ras	Mutació puntiforme en neuroblastomes i limfoma de Burkitt
H-ras	Mutació puntiforme en càncer bufeta urinària
Bcr-abl	Activitat tirosina cinasa no receptora. Cromosoma fiadè fia. Translocació 9-22 en LMC i LLA del adult

camosos de laringe. També es troba sobreexpressada en carcinomes de bufeta de l'orina, de tub digestiu i d'astrocitomes. El gen *erb-B2*, segon membre de la família del receptor EGF està amplificat en carcinomes humans de mama, ovari, pulmó, estómac i glàndules salivals. El lligand d'aquest gen, l'he-regulina, és produït en els mateixos teixits que expressen els receptors.

El *v-fms* o gen transformant del virus del sarcoma feli té la seva contrapartida humana en el *c-fms*, que codifica una versió mutada del receptor del CSF-1 o *colony stimulating factor*. En les leucèmies mieloides s'han detectat mutacions puntiformes d'aquest protooncogen.

El protooncogen RET codifica per a un receptor de creixement. Mutacions d'aquest gen acompanyen la forma familiar de carcinoma medul·lar de tiroides i el síndrome MEN 2a. Aquest és un dels rars exemples en què mutacions dominants d'un protooncogen en la seva línia germinal són tolerades durant el desenvolupament humà. A més, una reordenació del domini tirosina cinasa del protooncogen RET, en el cromosoma 10, com un gen encara no caracteritzat però denominat PTC crea la seqüència híbrida RET/PTC que s'ha observat en la forma esporàdica de carcinoma papil·lar de tiroides.

Factors de transducció de senyals citoplasmàtics

Es coneixen diversos exemples d'oncoproteïnes que imiten la funció del sistema citoplasmàtic normal de transducció de senyals des de el receptor de la superfície cel·lular fins a les proteïnes nuclears que controlen l'expressió de gens. Es poden agrupar en dues categories principals: a) proteïnes d'unió GTP, i b) tirosines cinases no associades a receptores (taula IV).

Proteïnes d'unió a GTP. Aquí es troben els gens de la família RAS. Aproximadament el 30% de tots els tumors humans contenen versions mutades de proteïnes *ras*. En carcinomes de còlon, pàncrees i tiroides la incidència de mutacions *ras* és fins i tot molt superior.

Les proteïnes *ras* estan adherides a la superfície interna de la membrana cel·lular. Transmeten els seus senyals a efectors subsegüents únicament quan estan unides a GTP. Els gens *ras* sofreixen mutacions puntiformes que alteren la seva activitat

GTP-asa intrínseca, no es produeix la degradació a GDP i, d'aquesta manera, es manté la proteïna en estadi de senyalització activa continua. Les mutacions codifiquen per a substitucions d'aminoàcids en els codons 12, 13 i 61. El *ras* activat interacciona amb *Raf-1*. També està implicat un substrat d'aquest últim factor, la MAPK (*mitogen activated protein kinase*).

Tirosines cinases no associades a receptors. Inclouen entre altres el gen *abl* i el *src*. En la leucèmia mieloide crònica i en algunes leucèmies limfoblàstiques agudes l'activitat tirosina cinasa del protooncogen *abl* en el cromosoma 9 es troba descontrolada per la translocació (9, 22), per mitjà de la qual es fusiona amb part del gen *bcr* (*break-point cluster region*), el gen híbrid adquireix una activitat tirosina cinasa més potent. Encara que els mecanismes bioquímics pels quals la quimera *bcr-abl* causa progressió neoplàsica no estan encara clars, sembla ser que les propietats del producte de la nova fusió gènica difereixen de les dels gens originals.

La proteïna produïda per *v-src*, que es coneix com a pp60^{v-src}, va ser la primera tirosina cinasa retrovírica detectada. És una proteïna intracel·lular de membrana no associada a receptors que produeix fosforilació de la vinculina, la qual forma part de l'esquelet cortical submembranós de la cèl·lula. La vinculina fosforilada deixa d'exercir la seva acció i, amb això, es potencia la pèrdua de la cohesió intracel·lular pròpia de la neoplàsia. Tot i així, això no és suficient per a aclarir completament el fenomen de transformació neoplàsica.

A diferència de les cinases associades a receptors, les que no ho estan no són capaces de produir transformació neoplàsica només per la sobreexpressió i necessiten mutacions gèniques addicionals. El cas del *v-src* és una excepció, encara que els seus mecanismes estan encara en part per dilucidar.

Proteïnes reguladores nuclears

Les diferents vies de transducció de senyals convergeixen en el nucli i activen tota una gran sèrie de gens que controlen l'avanç ordenat de la cèl·lula a través del cicle cel·lular. Aquest procés és regulat per una sèrie de proteïnes nuclears que actuen controlant la transcripció de gens relacionats amb el creixement. Entre les proteïnes esmentades es troben els productes dels oncogens *myc*, *myb*, *fos* i *jun*. El prototipus d'aquesta classe és el gen *myc*, la proteïna del qual s'uneix característicament al DNA (taula V). La proteïna *c-myc* forma dímers amb la proteïna *Max*. Aquests dímers se suposa que són els que s'uneixen al DNA i actuen com a activadors de la transcripció. En el limfoma de Burkitt la translocació (8, 14) col·loca el protooncogen *c-myc*, situat normalment en la porció distal del braç llarg del cromosoma 8, en el veïnat del locus IgH localitzat en la porció distal del braç llarg del cromosoma 14, fet que causa una sobreexpressió i manca de regulació de l'oncoproteïna *c-myc*.

TAULA V
Gens per a factors de transcripció nuclears

C-myc	Translocat en el limfoma de Burkitt (T8, 14)
N-myc	Amplificat en el neuroblastoma
L-myc	Amplificat en el carcinoma microcític pulmonar

L'amplificació de N-myc es correlaciona amb un pitjor pronòstic en els neuroblasts. L'altre gen de la mateixa família, el L-myc, està amplificat en el carcinoma pulmonar de cèl·lules petites.

Altres tipus de molècules

Hi ha diverses classes d'oncogens que no encaixen clarament en el model del sistema de transducció de senyals (taula VI).

Un d'ells comprèn les proteïnes que regulen l'apoptosi. Bcl-2 forma dímers amb la proteïna Bax i sembla ser que inhibeix la capacitat dels homodímers Bax de causar mort cel·lular. En els limfomes centrefoliculars la translocació (14, 18) posa en contacte el locus IgH localitzat en el cromosoma 14, amb el gen Bcl-2 situat en el braç llarg del cromosoma 18. D'aquesta manera, el locus actiu de la immunoglobulina pesada causa sobreexpressió de Bcl-2, que evita la mort programada dels limfòcits centrefoliculars i permet que es produeixin en ells altres mutacions que condueixen a la seva transformació neoplàsica.

El gen Bcl-1 (PRAD-1) codifica per a la ciclina D1, la qual, per mitjà del complex cdk/ciclina D1, intervé en el cicle cel·lular controlant la transició de G1 a fase S. En els limfomes de cèl·lules del mantell es troba la translocació (11, 14). Per aquest mecanisme, el gen ciclina D1 localitzat en el cromosoma 11 queda en juxtaposició amb el locus de transcripció activa del gen IgH en el cromosoma 14. D'altra banda, el gen ciclina D1 es troba amplificat i sobreexpressat en estadis avançats de carcinoma de laringe i en carcinomes de mama.

Un últim apartat dins d'aquest grup són els oncogens que s'uneixen i inhibeixen la funció dels gens supressors o antioncogens. És a dir, són supressors de tumors. El MDM2 està am-

TAULA VI
Gens per a altres tipus de molècules

Bcl-2	Codifica la proteïna inhibidora de l'apoptosi. Expressió excessiva en el limfoma centre folicular (T 14, 18)
Bcl-1 (PRAD1)	Codifica per a la ciclina D1. Amplificada i sobreexpressada en el càncer de mama, laringe i limfoma del mantell (T 11, 14)
MDM2	Antagonista p53. Amplificat en sarcomes
HPV-F6	Inactiva p53. Càncer de cervix uteri
HPV-F7	Inactiva prb. Càncer de cervix uteri

TAULA VII
Mecanismes d'inactivació d'antioncogens

<ul style="list-style-type: none"> • Mutacions puntiformes • Deleccions cromosòmiques • Atrapament per proteïnes viriques
--

TAULA VIII
Grups d'antioncogens

<ul style="list-style-type: none"> • Gens de proteïnes inhibidores en superfície cel·lular • Gens de proteïnes inhibidores en citoplasma • Gens de proteïnes inhibidores en nucli • Gens per a la reparació del DNA • Gens de proteïnes inhibidores localització no coneguda • Gens de inhibidors de metastasis: antimetastogens
--

TAULA IX
Gens pes a proteïnes inhibidores localitzades en la superfície cel·lular

DCC	delecionat en càncer de còlon. Localitzat en 18 q. Molècula d'adhesió cel·lular. Proteïna de la superfamília de les immunoglobulines. Causa de fallada en la inhibició per contacte. Alterat en el 80 % de carcinomes de còlon.
-----	---

plificat en alguns sarcomes i és capaç de bloquejar funcionalment el domini transcripcional de P53 i unir-s'hi. Diversos virus DNA oncogènics en animals, com el polioma, l'adenovirus 12 i el SV40 produeixen proteïnes transformants que inactiven P53 i la proteïna Rb. En humans aquest fenomen esdevé amb els virus oncogènics del papil·loma humà HPV 16 i 18 relacionats amb càncer de coll d'úter. La proteïna d'HPV-E6 inactiva la proteïna salvatge P53 i la de HPV-E7 inactiva la proteïna Rb.

GENS SUPRESSORS O ANTIONCÒGENS

El primer tipus de gens que es van associar amb el desenvolupament de càncer van ser els oncogens. Tot i així, aviat es va veure que només es relacionaven amb aproximadament en el 20-30% dels càncers humans.

De manera diferent als oncogens, que són dominants i que quan són activats estan implicats en tumorigènesi, els gens supressors de tumors o antioncogens participen en la regulació de la proliferació cel·lular a la qual inhibeix quan cal, fet pel qual s'oposen a la transformació neoplàsica. Mutacions en els antioncogens tenen com a resultat la inactivació de la seva funció supressora i, per tant, l'aparició de càncer (taula VII).

Els antioncogens permeten explicar l'aparició tant esporàdica com familiar de tota una sèrie de tumors humans. Això està en relació amb la teoria de l'oncogènesi en "dos impactes" proposada per Knudson. Aquest investigador va suggerir que, en els tumors hereditaris, del progenitor afectat s'hereta una alteració genètica, "primer impacte", en un dels dos al·lels, la

TAULA X
Gens supressors: proteïnes en citoplasma

Gen	Cromosoma	
APC	5p	Poliposi adenomatosa de còlon familiar. La proteïna s'adhereix al citoesquelet
NF1	17q	Neurofibromatosi tipus 1 (neurofibromina)
NF2	22q	Schwannomes SNC i meningiomes (NF2) (schwannomina) Acció semblant a APC
VHL	3p	Malaltia de von Hippel Lindau. Carcinomes renals. Acció semblant a neurofibromina
DPC4	18q	Càncer de pàncreas

qual està present en totes les cèl·lules somàtiques del cos. La segona mutació, "segon impacte", es produeix en una de totes aquelles cèl·lules que ja són portadores de la primera mutació. En els casos esporàdics, les dues mutacions "impacte" es donen a l'atzar en un única cèl·lula somàtica, la progènie de la qual forma el tumor.

Les hipòtesis de Knudson ha estat àmpliament demostrada per estudis citogenètics i moleculars i s'ha investigat de manera molt precisa en el retinoblastoma humà. Les mutacions requerides per a produir retinoblastoma afecten el gen Rb localitzat en el cromosoma 13q14. En alguns casos la lesió genètica és suficientment gran com per a ser visible en la forma d'una deleció 13q14. Els dos al·lels normals del locus Rb han d'estar inactivats ("dos impactes") perquè es desenvolupi un retinoblastoma. En els casos familiars, els nens neixen amb una còpia normal i una altra de defectuosa del gen Rb. Posteriorment perden la còpia intacta per alguna forma de mutació somàtica (taula VII). En els casos esporàdics, els dos al·lels normals es perden per mutació somàtica en un dels retinoblasts. Un nen portador en totes les cèl·lules somàtiques d'un al·lel mutant Rb és perfectament normal, amb excepció de l'augment de risc de desenvolupar càncer. Això implica que el caràcter d'heterozigot en el locus Rb no afecta la conducta cel·lular. El retinoblastoma es desenvolupa quan la cèl·lula es converteix en homozigota per a l'al·lel mutant. A causa que el gen del retinoblastoma s'associa amb càncer quan es perden les dues còpies normals se'l designa com a gen recessiu del càncer. Els pacients amb retinoblastoma familiar tenen també un risc incrementat de patir osteosarcoma i altres sarcomes de parts toves. També s'ha observat inactivació del locus Rb en altres tumors, entre ells el carcinoma de mama, el carcinoma microcític pulmonar i el carcinoma de bufeta urinària.

El gen del retinoblastoma és el model per a entendre el mecanisme d'acció de la gran majoria dels gens supressors de càncer o antioncogens (taules VIII-XIII). Excepcions a aquest model són, entre altres, el gen p53, el gen APC i el NF1.

El tipus salvatge normal del gen p53 produeix una fosfoproteïna que regula la replicació de DNA, la proliferació cel·lular i la mort cel·lular o apoptosi. La seva funció és actuar com un "po-

TAULA XI
Gens supressors: proteïnes en el nucli

Gen	Cromosoma	
RB	13q	Proteïna Rb (gran fre del cicle cel·lular). Retinoblastoma, osteosarcoma, càncer de mama, pròstata, bufeta i pulmó
p53	17p	Majoria de càncers humans. S. Li-fraumeni. Proteïna p54 (guardià del cicle cel·lular)
MTS1	9p	Preserva rb no fosforilat. Proteïna p16. Múltiples tumors. Melanomes familiars.
WT1	11q	Repressió de la transcripció. Nefroblastoma.

licia molecular" o "guardià del genoma" i impedir la propagació de les cèl·lules danyades genèticament. El gen p53, a més, de funcionar com un gen supressor de càncer, pot funcionar també com un oncogen i com a tal es va considerar els primers anys després del seu descobriment. Certes formes de p53 poden transformar cèl·lules *in vitro* com fan diversos oncogenes. Sembla ser que certes mutants de p53 no només perden la seva funció normal, sinó que també guanyen la capacitat d'unir-se a la proteïna p53 salvatge i la inactiven. Per tant, una cèl·lula amb un al·lel mutant i un de normal es comporta com si no tingués p53 funcional en absolut. Les mutacions d'aquest tipus es denominen dominants negatives, a causa que l'al·lel mutant actua de forma dominant per a inutilitzar o anul·lar l'al·lel normal.

El gen APC també pot comportar-se com a dominant negatiu. Mutacions en la línia germinal d'un dels dos al·lells del gen APC són causa de l'adenomatosi polipoide de còlon i la síndrome de Gardner. Una proporció d'aquests adenomes esdevé maligna posteriorment. Això suggereix la hipòtesi que una mutació heretada del gen APC és suficient per a produir adenomes benignes i que la inactivació d'un segon al·lel seria requisit per a la transformació maligna. Per això, el gen APC no podria ser recessiu a nivell cel·lular. A més, la majoria dels carcinomes de còlon i recte familiars i dels adenomes polipoides benignes contenen un gen APC mutat. Tot i així, només el 30% dels adenomes i carcinomes de còlon i recte són homozigots per al gen APC, fet que sembla indicar que la inactivació dels dos al·lells probablement no és essencial per a la gènesi dels tumors esmentats.

El gen NF1 de la neurofibromatosi tipus 1 o malaltia de von Recklinghausen es comporta de manera molt semblant al gen APC. Les persones que hereten un al·lel mutant desenvoluparan nombrosos neurofibromes benignes, alguns dels quals rars vegades poden progressar a neurofibrosarcomes. En el càncer de còlon i recte no polipoide hereditari, conegut com a HNPCC o síndrome de Lynch, es troben mutacions en la línia germinal dels gens MSH2 i MLH1 que codifiquen per a enzims de reparació del desaparellament de bases del DNA. Els gens XP (A-G) reparen alteracions en els dímers de pirimidina i la seva herència anòmala és associada al xeroma pigmentari.

TAULA XII
Gens de reparació del DNA

MSH2	Repara el desaparellament de bases	HNPCC
MLH1	Repara el desaparellament de bases	HNPCC
XP (A-G)	Repara dímers de pirimidina	Xeroderma pigmentós

TAULA XIII
Gens supressors: proteïna localitzada no coneguda

Gen	Cromosoma	
BRCA 1	17q	Càncer de mama i ovari hereditari
BRCA-2	13q	Càncer de mama
HPC 1	17q	Càncer de pròstata

Els gens supressors BRCA-1 i BCR-2 es relacionen amb càncer de mama. El gen supressor HPC-1 s'ha relacionat recentment amb el càncer de pròstata hereditari.

El gen supressor de metàstasi o "antimetastogen" NM23 s'expressa amb menor intensitat en càncers amb metàstasis extenses que aquells casos de càncer sense metàstasi o pocs ganglis metastàtics. El terme NM ve de "no metastatitzant".

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

- Bishop JM, Varmus HE. Functions and origins of retroviral transforming genes. En: Weiss R, Teich R, Varmus H, Coffin J, ed. RNA Tumor Viruses. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1984.
- Buck KB, Liu ET, Larrick JW. Oncogenes. An introduction to the concept of cancer genes. Springer Publ 1988.
- Chang F, Synjamen S, Kurvimenk K, Synjamen K. The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 174-186.
- Cotran RS, et al. Molecular Basis of Cancer. En: Robbins Pathologic Basis of Disease, 5th ed. W.B. Saunders 1994, pág. 257-272.
- Fearon ER, Vogelstein B. Tumor suppressor genes and cancer. En: Holland JF, et al, ed. Cancer Medicine, 3rd ed. Filadèlfia: Lea & Febiger, 1993; 77.
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 77: 167.
- Gullick WJ. Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor receptors in human cancers. *Br Med Bull* 1991; 47: 87-98.
- Harris CC, Hollstein M. Medical progress: clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993; 329: 1318-1327.
- Hart IR, Easty D. Identification of genes controlling metastatic behaviour. *Br J Cancer* 1991; 63: 9-12.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; 75: 241-251.
- Holmes WE, Sliwkowski MX, Alcita RW, Hengel WJ, Lee J, Pask JW, et al. Identification of heregulin, a specific activator of p185^{HER2}. *Science* 1992; 256: 1205-1210.
- Huebner RJ, Todaro GJ. Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969; 64: 1087-1094.
- Hynes NF. Amplification and overexpression of the erb B-2 gene in human tumors: involvement in tumor development, significance as a prognostic factor, and potential as a target for cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 1993; 4: 19-26.
- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264: 436-440.
- Kato GJ, Dang CV. Function of the c-myc oncoprotein. *FASEB J* 1992; 6: 3065-3072.
- Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C et al. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 1991; 252: 1708-1711.

Kense SE. Oncogenes/Proto-Oncogenes, Tumor-Suppressor Genes, and DNA-Repair Genes in Human Neoplasia. Genetic alterations in neoplasia. En: Cellular and Molecular Pathogenesis. Ed. A.E. Sirica, Lippincott-Raven Publ. 1996; 321-340.

Klein G. Oncogenes. En: Holland JF, et al, ed. Cancer Medicine, 3rd ed. Filadelfia: Lea & Febiger, 1993; 65.

Knudson AG. Anticonceptions and human cancer. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 10.914-10.921.

Koskinen PJ, Alitalo K. Role of myc amplification and overexpression in cell growth, differentiation, and death. Semin Cancer Biol 1993; 4: 3-12.

McCormick F. Signal transduction. How receptors turn Ras on. Nature 1993; 363: 15-16.

Nevins FR. E2F: a link between tum Ras on. Nature 1993; 363: 15-16.

Nevins FR. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral onco proteins. Science 1992; 258: 424-429.

Protzlow TP, Brasitus TA, Fulton NC, Cheyer C, Kaplan EL. K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon. J Natl Cancer Inst 1993; 85: 2.004-2.007.

Puzsai I, Lewis CE, Lorengen T, McGree JO. Growth factors: regulation of normal and neoplastic growth. J Pathol 1993; 169: 191-201.

Schwab M. Amplification of N-myc as a prognostic marker for patients with neuroblastoma. Semin Cancer Biol 1993; 4: 13-18.

Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. Cell 1992; 70: 523-536.

Weinberg RA. The integration of molecular genetics into cancer management. Cancer 1992; 70: 1.653-1.658.

Weinberg RA. The retinoblastoma gene and gene product. Cancer Surv 1992; 12: 43-47.

Witkowski JA. The inherited character of cancer -an historical survey. Cancer Cells 1990; 2: 22-57.

Wynford-Thomas D. Oncogenes and anti-oncogenes: the molecular basis of tumour behavior. J Pathol 1991; 165: 187-201.

Zur Hausen H. Human pathogenic papillomaviruses. Berlin: Springer-Verlag, 1993.

ONCOGENS I ANTIONCOGENS

El terme oncogen designa els gens responsables de regular el desenvolupament normal en els organismes multicel·lulars. Els protooncogens són gens cel·lulars normals que estimulen el creixement, el desenvolupament, i la diferenciació cel·lulars; quan s'activen, es converteixen en oncogens, que donaran lloc a la cèl·lula transformada o neoplàstica. Els oncogens codifiquen proteïnes, denominades oncoproteïnes, que són similars als productes normals dels protooncogens, amb l'excepció del fet que no tenen importants elements reguladors i que la producció que les cèl·lules transformades en fan no depèn de factors de creixement o d'altres senyals externs. Els oncogens poden agrupar-se segons el paper que desenvolupen al llarg de la cascada de transmissió de senyals cel·lulars: 1) gens per a factors de creixement i/o els seus receptors; 2) gens per a factors citoplasmàtics del sistema de transducció de senyals; 3) gens per a factors de transcripció intranuclears, i 4) gens per a altres tipus de molècules. Tot i així, aviat es va veure que els oncogens només es relacionen amb el 20-30% dels càncers humans. Els gens supressors de tumors o antioncogens inhibeixen la proliferació cel·lular quan s'activen i s'oposen així a tal proliferació neoplàstica; mutacions en els antioncogens donen com a resultat la inactivació de la seva funció supressora i l'aparició del càncer.

ONCOGENES Y ANTIONCOGENES

El término oncogén designa a los genes responsables de regular el desarrollo normal en los organismos multicelulares. Los protooncogenes son genes celulares normales que estimulan el crecimiento, desarrollo y diferenciación celulares; cuando se activan, se convierten en oncogenes, que darán lugar a la célula transformada o neoplásica. Los oncogenes codifican proteínas, denominadas oncoproteínas, que son similares a los productos normales de los protooncogenes, con la excepción de que carecen de importantes elementos reguladores y que su producción por las células transformadas no depende de factores de crecimiento u otras señales externas. Los oncogenes pueden agruparse según el papel que desempeñan a lo largo de la cascada de transmisión de señales celulares: 1) genes para factores de crecimiento y/o sus receptores; 2) genes para factores citoplasmáticos del sistema de transducción de señales; 3) genes para factores de transcripción intranucleares, y 4) genes para otros tipos de moléculas. Sin embargo, pronto se vio que los oncogenes sólo se relacionan con el 20 al 30% de los cánceres humanos. Los genes supresores de tumores o antioncogenes inhiben la proliferación celular cuando se activan y se oponen así a la proliferación neoplásica; mutaciones en los antioncogenes dan como resultado la inactivación de su función supresora y la aparición del cáncer.

ONCOGENES AND ANTI-ONCOGENES

The term oncogene is used for genes responsible for regulating normal development in multicellular organisms. Proto-oncogenes are normal genes that stimulate cell growth, development and differentiation. When activated, they become the oncogenes that will give rise to a transformed or neoplastic cell. Oncogenes codify proteins called oncoproteins, which are similar to the normal products of proto-oncogenes but that lack key regulatory elements and whose production by transformed cells does not depend on growth factors or other external signals. Oncogenes can be grouped according to the role they play in the cascade of transmission of cell signals: 1) genes for growth factors and/or their receptors; 2) genes for cytoplasmic factors in the signal transduction system; 3) genes for intranuclear transcription factors, and 4) genes for other types of molecules. It became apparent to researchers early on, however, that oncogenes are involved in only 20 to 30% of human cancers. Tumor suppressor genes or anti-oncogenes inhibit cell proliferation when they are activated and in this way fight neoplastic proliferation. Mutations in anti-oncogenes lead to the inactivation of their function as suppressors and to the appearance of cancer.

MECANISMES MOLECULARS EN EL CÀNCER DE CÒLON

Elias Campo*

INTRODUCCIÓ

El carcinoma de còlon i recte és una de les neoplàsies més comunes a Espanya, tant per la seva prevalença global com per la seva freqüència com a causa de mort. Aquesta freqüència s'està incrementant progressivament en els últims anys, de forma similar al que succeeix en altres països occidentals. De fet, es considera que el 50% de la població dels països desenvolupats patirà un tumor de còlon i recte, ja sigui adenoma o carcinoma, abans d'arribar als 70 anys d'edat¹.

La progressió del càncer de còlon i recte és un fenomen ben conegut des del punt de vista de l'anatomia patològica, amb unes etapes ben definides. Les primeres lesions reconegudes són els denominats pòlips hiperplàsics, sobre els quals es desenvolupa una progressiva alteració de la diferenciació cel·lular que dona lloc a l'adenoma. Els adenomes creixen i adquireixen una progressiva displàsia que, generalment, es relaciona amb la mesura del tumor. A vegades aquests canvis displàsics o adenomes no fan protusió sobre la superfície i es denominen adenomes plans. En etapes posteriors, aquestes lesions displàsiques es transformen en un carcinoma que, després de romandre localitzat en la làmina pròpia, progressa i s'infiltra en les capes de la paret intestinal, i assoleix les vies de disseminació, fonamentalment limfàtiques i venoses, per les qual es desenvoluparà metàstasi a distància en el fetge (75%), els pulmons (15%), l'os (5%) i el cervell (5%), fonamentalment².

En els últims anys s'han produït importants avanços en el coneixement dels mecanismes moleculars associats a la progressió morfològica d'aquests tumors. Les claus per a la identificació dels gens implicats en aquest procés han sorgit de l'anàlisi dels dos tipus fonamentals de càncer de còlon i recte heredofamiliar: la poliposi còlica familiar (PCF) i la síndrome de càncer de còlon i recte hereditari no associat a poliposi o síndrome de Lynch. Les alteracions moleculars de la poliposi adenomatosa apareixen també en el 85% dels carcinomes esporàdics. D'altra banda, les alteracions moleculars que es donen en els pacients amb síndrome de Lynch succeeixen en el 15% de carcinomes esporàdics.

La via molecular més freqüent està caracteritzada per una mutació inicial en el gen APC (*Adenomatous Polyposis coli*) seguida de l'activació d'un oncogen dominant, *c-K-ras*, i la inacti-

vació d'altres antioncògens entre els quals destaquen el DCC i el p53^{3,4}. En aquesta via sembla ser molt important tant el nombre total d'alteracions oncogèniques com la seqüència en l'ordre d'aparició. Així, per exemple, pacients amb mutacions en línia germinal de p53 rara vegada desenvolupen carcinomes de còlon i recte mentre que aquest gen està mutat en més del 70% d'aquests tumors, fet que suggereix que els seu efecte oncogènic sobre la mucosa de còlon i recte únicament es donarà si prèviament s'han produït alteracions en altres gens⁵.

Més recentment s'ha identificat un nou mecanisme genètic implicat en la progressió del càncer de còlon i recte: la inestabilitat genètica. En aquests casos, les cèl·lules tumorals contenen una infinitat de mutacions en regions microsatèl·lits del DNA. Aquesta via de progressió està implicada en les síndromes hereditàries de carcinoma de còlon i recte no associat a poliposi⁶. També es produeix entre el 9 i el 20% de carcinomes esporàdics^{6,7}.

La poliposi còlica familiar com a model molecular de progressió: mutacions en oncògens (*c-K-ras*) i antioncògens (*apc/dcc/p53*)

La identificació del gen APC com a gen responsable de la PCF i la caracterització de les diferents mutacions que es donen en els pacients que n'estan afectats han permès de comprendre diversos aspectes d'aquesta malaltia⁸. L'alteració del gen APC en el càncer de còlon i recte és clau i sembla constituir la primera alteració necessària. Aquest gen actuaria com a gen guardià del procés neoplàsic (*gatekeeper gene*). Sense l'alteració del gen APC, les mutacions d'altres gens o antioncògens portarien a la cèl·lula a situacions d'hiperplàsia o d'apoptosi però sense risc per a desenvolupar una neoplàsia⁴.

Els pacients amb PCF presenten mutacions del gen APC en la línia germinal però també es troben mutacions somàtiques en carcinomes de còlon i recte esporàdics. En els tumors desenvolupats en aquests pacients hi ha inactivació dels dos al·lels. Les mutacions descrites fins al moment són diverses però totes elles porten a una absència en la producció de proteïna normal, amb la producció de proteïnes truncades la detecció de les quals pot utilitzar-se com a mètode diagnòstic primerenc de la malaltia⁴. Els diferents tipus de mutacions s'han relacionat amb les diferents formes de presentació clí-

*Departament d'Anatomia Patològica, Hospital Clínic de Barcelona
Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina,
Universitat de Lleida

ca d'aquesta malaltia com la síndrome de Gardner o la poliposi familiar atenuada.

Els possibles mecanismes d'acció d'aquestes proteïnes anòmals i com influeixen en el diferent fenotip dels pacients són aspectes no aclarits. Algunes observacions suggereixen que la proteïna APC podria tractar-se d'una proteïna de citoesquelet amb capacitat d'interaccionar amb la betacatenina. Sembla que totes les mutacions de la proteïna APC alteren aquesta interacció. La connexió amb betacatenina pot influir en la transformació neoplàstica per mitjà de la interferència en els mecanismes d'adhesió cel·lular via cadherines i també alterant l'equilibri entre proliferació cel·lular i apoptosi, ja que la betacatenina està implicada en els dos processos⁴.

L'oncogen més freqüentment mutat en carcinomes de còlon i recte és el **K-ras**. Les alteracions d'aquest gen es troben en el 50% dels carcinomes i també en un nombre similar d'adenomes amb una mesura superior a 1 cm. Tot i així, només el 10% d'adenomes petits (de menys d'1 cm) presenten mutacions de **K-ras**. Aquestes observacions suggereixen que les mutacions d'aquest oncogen no són els fenòmens inicials en el desenvolupament dels tumors però que afavoreixen la progressió dels adenomes⁵. Les mutacions de **ras** estan presents tant en tumors esporàdics com en els tumors sorgits en el context de la PCF, el que indica que els dos tipus de carcinomes comparteixen vies moleculars de progressió 10-12. La majoria de mutacions de **ras** succeeixen en el codó 12 (70%) i una proporció inferior en el 13 (18%)⁶. Algunes mutacions particulars del codó 12 semblen tenir relació amb la conducta biològica dels carcinomes. La mutació Asp en el codó 12 sembla conferir un poder transformant superior *in vitro* i podria associar-se a una capacitat de metastasi superior *in vivo*⁷.

Les delecions al·lèliques de la **regió 18q** s'observen en més del 70% dels carcinomes i en prop d'un 50% d'adenomes⁸. L'estudi d'aquesta zona cromosòmica ha arribat a la identificació de diversos gens potencialment implicats entre els quals destaquen els gens **DCC**, **DPC4** i **MADR2**¹⁰⁻¹⁴⁻¹⁵. Les pèrdues al·lèliques del gen **DCC** s'associen amb una disminució de la seva expressió. La funció encara no és ben bé coneguda però podria estar relacionada amb mecanismes d'adhesió cel·lular implicats en processos de migració i diferenciació. Les pèrdues al·lèliques de la regió 18q i la pèrdua d'expressió de la proteïna **DCC** es relacionen amb una conducta més agressiva dels carcinomes en estadi II¹⁶⁻¹⁷.

La pèrdua al·lèlica de la regió 17p13 és una dels fenòmens genètics més freqüents en el carcinoma de còlon i recte. Succeeix en el 70-80% dels casos però només en el 10-30% dels adenomes, el que suggereix que aquesta alteració pot estar relacionada amb el pas d'adenoma a carcinoma¹⁸. La regió cromosòmica que ha patit la delecio conté el gen **p53** i en els carcinomes es detecten mutacions puntuals en l'al·lel restant¹⁹⁻²⁰. La vida mitjana de la proteïna p53 és molt curta però la proteïna mutada s'estabilitza i té una vida mitjana més llar-

ga. Encara existeixen excepcions importants, la majoria de mutacions porten a la sobreexpressió de la proteïna, que es fa així detectable en els teixits per mitjà de tècniques immunohistoquímiques. L'expressió de p53 en la mucoses del còlon normal és sempre negativa. La seva sobreexpressió s'associa amb l'aparició de displàsia d'alt grau/carcinoma *in situ* en els adenomes; això indica que les alteracions de p53 juguen un paper important en la transformació maligna dels adenomes²¹. No està clar, tot i així, si la inactivació de p53 pot també conferir un pitjor pronòstic als carcinomes de còlon i recte. Les dades són molt contradictòries, a causa de la utilització de diverses metodologies i valoracions²²⁻³⁰. Tot i així, sembla poc probable que una alteració genètica que es troba en un nombre tan elevat de tumors i en una fase tan inicial dels carcinomes pugui jugar un paper molt important determinant en la major agressivitat dels mateixos.

Càncer de còlon i recte hereditari no associat a poliposi: el model de la inestabilitat genètica en microsatèl·lits

L'estudi de les síndromes de Lynch o càncer hereditari no associat a la poliposi ha permès d'identificar la presència d'alteracions en l'estabilitat genètica com a una via alternativa de progressió tumoral en el càncer de còlon i recte, que també pot estar implicada en d'altres tumors. Els carcinomes en aquests pacients així com en el 15% dels carcinomes esporàdics es caracteritzen per tenir múltiples mutacions en les regions denominades microsatèl·lits i que es caracteritzen per guany o pèrdua de seqüències repetides. Aquestes alteracions indiquen l'existència d'errors en la replicació del DNA^{13,6-8-31}. Curiosament, aquests tumors tenen una significativa menor freqüència de mutacions de p53 i c-K-ras, es localitzen en el còlon proximal, freqüentment són de tipus mucinosos o poc diferenciats, tenen un contingut de DNA normal (diploide), es presenten com a tumors localitzats sense metastasi i els pacients tenen una supervivència superior que els afectats de carcinomes clàssics⁷⁻³². La presència d'aquesta inestabilitat genètica es detecta en fases inicials dels adenomes i s'incrementa amb la progressió neoplàstica cap al carcinoma³³. Aquestes alteracions semblen causades per mutacions en gens responsables de la reparació d'anomalies en l'aparellament de nucleòtids de la molècula de DNA. Aquests gens són **hMSH2**, **hMLH1**, **hPMS1** i **hPMS2**, localitzats en els cromosomes 2p22, 3p21, 2q31 i 7 p22, respectivament³⁴⁻³⁷. Si aquests gens no funcionen, les alteracions en el DNA s'acumulen progressivament i produeixen una inestabilitat genètica creixent.

En els pacients afectats de síndromes de Lynch, síndrome de Torre-Muir i en alguns casos de síndrome de Turcot es detecten mutacions puntuals d'aquests gens en línia germinal en més del 90% dels casos. Els tumors d'aquests pacients presenten pèrdues en l'heterozigosi en l'al·lel restant i d'aquesta

forma, s'inactiven les dues còpies del gen 38. El 15% de carcinomes esporàdics tenen també mutacions somàtiques en alguns d'aquests gens, però no existeix mutació en línia germinal. Tot i així, una alta percentatge de pacients joves (de menys de 35 anys) amb carcinomes de còlon aparentment esporàdics que presenten alteracions en els microsatèl·lits són, en realitat, portadors de mutacions en línia germinal en alguns d'aquests gens³⁸.

Els errors de replicació que es donen en aquests casos s'acumulen en les regions de microsatèl·lits. La majoria d'aquestes seqüències no codifiquen per a proteïnes i el possible significat de les seves alteracions és desconegut. Tot i així, recentment s'ha identificat la inactivació del tipus II del receptor del TGF-beta en el càncer de còlon amb fenotip mutador a causa de mutacions en seqüències repetides incloses en aquest gen⁴⁰. Curiosament, el gen *MADR2* localitzat en 18p21 que ha sofert una deleció en el càncer de còlon i recte codifica per a una proteïna que també es troba en la via de transmissió de senyals del TGF-beta, fet pel qual sembla que l'alteració d'aquesta via podria ser comuna en els dos tipus de progressió tumoral del càncer de còlon i recte.

Mecanismes d'invasió tumoral en la progressió de càncer de còlon i recte

El procés d'invasió i de metastasi tumoral és complex i requereix l'activació i la inactivació de diversos gens que controlen la interacció de les cèl·lules tumorals entre si i amb elements diversos de l'organisme que invadeixen, particularment amb la matriu extracel·lular i les estructures vasculares. En aquesta progressió juguen un paper important diverses molècules d'adhesió i proteases degradadores de matriu extracel·lular. En el procés d'invasió, les cèl·lules tumorals han de perdre la capacitat adhesiva entre elles i al seu torn han d'unir-se a les molècules de matriu extracel·lular que les envolten. Aquests complexos mecanismes es manifesten per la pèrdua d'expressió d'algunes molècules d'adhesió i la sobreexpressió d'altres de diferents. L'activació de diverses proteases permet la degradació enzimàtica de la matriu extracel·lular³ obre vies per les quals les cèl·lules tumorals es disseminen. Estudis recents han caracteritzat algunes d'aquestes molècules que semblen intervenir en el procés d'invasió i metastasi del càncer de còlon i recte.

Molècules d'adhesió

Les interaccions intracel·lulars i entre les cèl·lules i la matriu extracel·lular es duen a terme per mitjà de diverses molècules d'adhesió de tipus integrina i no integrina⁴¹⁻⁴³. Algunes d'aquestes molècules es modulen de forma important en el procés de transformació neoplàstica.

Entre les proteïnes de tipus no integrina implicades en la progressió tumoral destaca el **receptor de laminina de 67kDa (67 LR)**, una proteïna de membrana amb alta afinitat per la laminina⁴⁴⁻⁴⁶. Encara que l'estructura i la funcionalitat d'aquesta molècula no estan completament aclarits, diversos estudis han demostrat la sobreexpressió d'aquest gen en diferents models tumorals, inclòs el càncer de còlon i recte. En aquests tumors, la sobreexpressió de mRNA i proteïna del 67LR es relaciona amb la poca diferenciació dels tumors i la progressió tumoral, ja que és pràcticament negativa en la mucosa normal i s'incrementa en els adenomes, els carcinomes i les metastasis ganglionars⁴⁶⁻⁴⁹.

Galectines és el terme recentment proposat per a designar una família de proteïnes amb homologia estructural que reconeixen els grups betagalactòsids de diferents glucoconjugats⁵⁰. Aquestes molècules desenvolupen un paper en la regulació del creixement, l'adhesió i la migració cel·lular, en la resposta immune i en la progressió neoplàstica. Les galectines 1 i 3 tenen també capacitat d'unió a la laminina. La **galectina 3** (31kd) s'ha implicat en el procés de disseminació de la metastasi en models experimentals^{51,52}. En el carcinoma de còlon i recte humà, la galectina 3 es troba disminuïda respecte de la mucosa normal i es relaciona amb la progressió de la metastasi. A més, existeix un canvi en la topografia de la seva localització cel·lular, ja que en la mucosa normal es localitza preferentment en el nucli mentre que en els carcinomes es trasllada al citoplasma⁵³. La funció d'aquesta molècula no és ben coneguda, però la seva diferent topografia en la mucosa normal i neoplàstica suggereix que pugui tenir funcions diferents. De fet, a més de les seves propietats adhesives la galectina 3 sembla actuar com a un factor de transcripció. La **galectina 1** es produeix fonamentalment en l'estroma i la seva expressió s'incrementa progressivament en els adenomes i carcinomes, el que suggereix una activació de les cèl·lules de l'estroma. L'expressió de les integrines en el càncer és complexa i depèn del teixit i dels tipus tumorals. En el carcinoma de còlon i recte, una reducció o pèrdua de β_1 integrines s'ha associat amb una poca diferenciació del carcinoma^{54,55} i la disminució en l'expressió de $\alpha_5\beta_1$ integrines, en estadis de Dukes avançats⁵⁶. Aquesta disminució en l'expressió d'integrines en el càncer de còlon i recte és similar a la que es dona en el càncer de mama⁵⁷ però no en d'altres tumors, com el melanoma⁵⁸.

Altres molècules d'adhesió implicades en la progressió del càncer de còlon i recte són el CD44, que interacciona amb l'àcid hialurònic, la fibronectina i el col·làgen, i les **cadherines**, relacionades amb la interacció intracel·lular. En diferents models tumorals humans i murins, s'ha demostrat que variants específiques de CD44 produïdes per processament alternatiu del RNA (*splicing*) poden associar-se a una fenotip de metastasi. Encara que els seus significats en càncer de còlon i recte no està clar^{59,61}. En la transformació neoplàstica de còlon i recte es produeix una pèrdua en l'expressió cadherina E associada a la

pèrdua de diferenciació dels tumors i també amb la progressió tumoral⁶⁴.

Degradació de la matriu extracel·lular

La degradació de les diferents barreres de matriu extracel·lular que troben les cèl·lules tumorals en la seva progressió (membranes basals, teixits intersticials) és el seu procés complex, amb participació de diversos sistemes enzimàtics altament regulats⁶⁷. Les proteases implicades en la progressió tumoral s'agrupen en tres famílies principals: les metal·loproteïnes, el sistema de l'activador del plasminògen de tipus urocinasa i cisteïna proteïnases (catepsines)⁶⁸. Aquests enzims són produïts per les cèl·lules tumorals o per cèl·lules de l'estroma induïdes pel tumor. Freqüentment, requereixen un procés d'activació en el qual participen altres enzims i, al seu torn, poden ser inhibides específicament per inhibidors que també poden ser produïts pel mateix tumor. El procés d'invasió és, per tant, el resultat d'un balanç entre tots aquests mecanismes que inclouen la producció d'enzims, la seva activació i la seva possible inhibició. Encara que el conjunt de molècules d'aquests sistemes que participen en la progressió del càncer de còlon i recte dista molt d'estar ben caracteritzat, existeixen dades importants sobre la participació de diversos enzims.

Diferents estudis han demostrat una important correlació entre l'expressió de les metal·loproteïnes i la capacitat invasiva i de metastasi dels tumors^{62,64-66}. En carcinomes de còlon i recte hi ha un increment en l'expressió i l'activació de MMP1 (col·lagenasa intersticial), MMP2 (col·lagenasa de 72 kd), MMP9 (col·lagenasa de 92 kd), MMP7 (matrilisina) i estromeliasina-3. Estudis recents del nostre grup indiquen que els carcinomes de còlon i recte produeixen un nou enzim amb una gran activitat degradadora, la col·lagenasa 3⁶⁷ que, a diferència de totes les anteriors, no és present en la mucosa normal (observacions no publicades). Aquestes proteases semblen ser produïdes i alliberades al medi per cèl·lules de l'estroma activades pel tumor. Recentment s'ha identificat un nou tipus de metal·loproteïnes que semblen estar ancorades en la membrana cel·lular (MT-MMPs). La MT1-MMP es produeix en el càncer de còlon i recte i pot activar la col·lagenasa 3. D'aquesta manera, s'està dibuixant un paper coordinat en cascada de l'acció d'aquests enzims en la progressió tumoral.

Les **catepsines B i L** són cisteïna proteïnases lisosomals que participen en el recanvi de proteïnes cel·lulars. Com les diverses metal·loproteïnes, les catepsines B i L s'han implicat en els processos d'invasió i de metastasi⁶³. Particularment, la catepsina B és capaç de degradar diverses proteïnes extracel·lulars entre les quals es troba la laminina. En carcinomes de còlon i recte humans existeix un increment en l'expressió de catepsina B associat amb una redistribució en la cèl·lula, en la qual passa de l'àrea paranuclear/lisosomal al pol basal en con-

tacte amb la matriu extracel·lular. Així mateix, l'increment d'expressió es correlaciona amb l'estadi de progressió i la supervivència dels malalts⁶⁹. La catepsina B en aquests tumors sembla estar produïda tant per les cèl·lules epitelials com per les cèl·lules de l'estroma. Els majors nivells d'activitat enzimàtica es troben en els límits d'infiltració del tumor.

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. Parker R, Tonn T, Bolden S, Wingo P. Cancer statistics, 1996. *CA Cancer J Clin* 1996; 46: 5-27.
2. Morson BC, Dawson IMP. *Gastrointestinal Pathology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1979.
3. Fearon C, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
4. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-170.
5. Lynch HT, Watson P, Smyrk TC, Lanspa SJ, Lynch JE, Lynch PM, et al. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993; 104: 1535-1549.
6. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkänen L, Mecklin JP, et al. Clues of the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 812-816.
7. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363: 558-561.
8. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816-819.
9. Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, Malkhosyan S, Perucho M. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nature Genetics* 1994; 6: 273-281.
10. Fearon ER, Jones P. Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. *FASEB J* 1992; 6: 2783-2790.
11. Vogelstein B, Fearon E, Hamilton S, Kern S, Preisinger A, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumour development. *N Engl J Med* 1988; 319: 525-532.
12. Lazo PA. Alteraciones genéticas en el carcinoma de colon. *Med Clin (Barc)* 1992; 99: 350-354.
13. Moerkkerk P, Arends JW, vanDriel M, de Bruijne A, de Goeij A, ten Kate J. Type and number of K-ras point mutations relate to stage of human colorectal cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 3376-3378.
14. Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Hoodless P, Kim H, et al. MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGF-beta regulated MAD related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 1996; 86: 543-542.
15. Hahn SA, Schutte M, Shamsul Hoque ATM, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, et al. DPD4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996; 271: 350-353.
16. Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu ZF, Levitt RC, Sistonen P, et al. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994; 331: 267-268.
17. Shibata D, Reale MA, Lavin P, Silverman M, Fearon ER, Steele G, et al. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1996; 335: 1727-1732.
18. Vogelstein B, Fearon E, Kern S, Hamilton S, Preisinger A, Nakamura Y, et al. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 207-211.
19. Baker S, Fearon E, Nigro J, Hamilton S, Preisinger A, Jessup J, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 217-221.
20. Baker S, Preisinger A, Jessup J, Paraskeva C, Markowitz S, Willson J, et al. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1990; 50: 7217-7222.
21. Campo E, Calle-Martín Odí, Micol R, Palacin A, Romero M, Fabregat V, et al. Loss of heterozygosity of p53 gene and p53 protein expression in human colorectal carcinomas. *Cancer Res* 1991; 51: 4436-4442.
22. Scott NP, Sagar P, Stewart J, Blair GC, Dixon MF, Quirque P. p53 in colorectal cancer: clinicopathological correlations and prognostic significance. *Br J Cancer* 1991; 63: 317-319.

23. Yamaguchi A, Kurosaka Y, Fushida S, Kanno M, Yonemura Y, Miwa J, et al. Expression of p53 protein in colorectal cancer and its relationship to short-term prognosis. *Cancer* 1992; 70: 2778-2784.
24. Remvikos Y, Tominaga O, Hammel P, Laurent-Puig P, Salmon R, Dutrillaux B, et al. Increased p53 protein content of colorectal tumours correlates with poor survival. *Br J Cancer* 1992; 66: 758-764.
25. Bell SM, Scott N, Cross D, Sagar P, Lewis FA, Blair GA, et al. Prognostic value of p53 overexpression and c-Ki-ras gene mutations in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1993; 104: 57-64.
26. Sun X-F, Carstensen JM, Zhang H, Stal O, Wingren S, Haschek T, et al. Prognostic significance of cytoplasmic p53 oncoprotein in colorectal adenocarcinoma. *Lancet* 1992; 340: 1369-1373.
27. Bosari S, Viale G, Bossi P, Maggioni M, Coggi G, Murray JJ, et al. Cytoplasmic accumulation of p53 protein: an independent prognostic indicator in colorectal adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 681-687.
28. Campo E, Miquel R, Jares P, Bosch F, Juan M, Leone A, et al. Prognostic significance of the loss of heterozygosity of Nm23-H1 and p53 genes in human colorectal carcinomas. *Cancer* 1994; 73: 2913-2921.
29. Morrin M, Kelly M, Barret N, Delaney P. Mutations of Ki-ras and p53 genes in colorectal cancer and their prognostic significance. *Gut* 1994; 35: 1627-1631.
30. Bosari S, Viale G, Roncalli M, Graziani D, Borsani G, Lee AKC, et al. p53 gene mutations, p53 protein accumulation and compartmentalization in colorectal adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1995; 147: 790-798.
31. Peinado MA, Malkhosyan S, Velázquez A, Perucho M. Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10065-10069.
32. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1994; 145: 148-156.
33. Jacoby RF, Marshall DJ, Kailas S, Schlack S, Harris B, Love R. Genetic instability associated with adenoma to carcinoma progression in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology* 1995; 109: 73-82.
34. Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, et al. The human mutator gene homologue MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75: 1027-1038.
35. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, et al. Mutations of a MutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; 75: 1215-1225.
36. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, et al. Mutation of a MutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994; 263: 1625-1629.
37. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994; 371: 75-80.
38. Hemminki A, Peltomäki P, Mecklin JP, Jarvinen H, Salovaara N, Nystrom-Lathi M, et al. Loss of wild type MLH1 gene is a feature of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 1994; 8: 405-410.
39. Liu B, Farrington SM, Petersen GM, Hamilton SR, Parsons R, Papadopoulos N, et al. Genetic instability occurs in the majority of young patients with colorectal cancer. *Nature Med* 1995; 1(4): 348-352.
40. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995; 268: 1336-1338.
41. Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 1990; 4: 2868-2880.
42. Castronovo V. Laminin receptors and laminin-binding proteins during tumor invasion and metastasis. *Invasion Metastasis* 1993; 13: 1-30.
43. Cid MC, Esparza J, Juan M. Moleculas de adhesión en las interacciones entre los leucocitos, los endotelios y la matriz extracelular. I Estructura, distribución y función biológica. *Med Clin (Barc)* (en prensa).
44. Wewer UM, Liotta LA, Jaye M, Ricca GA, Drohan WN, Claysmith AP, et al. Altered levels of laminin receptor mRNA in various human carcinoma cells that have different abilities to bind laminin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 7137-7141.
45. Sobel ME. Differential expression of the 67kDa laminin receptor in cancer. *Semin Cancer Biol* 1993; 4: 311-317.
46. Castronovo V, Campo E, van den Brule FA, Claysmith AP, Cioco V, Liu FT, et al. Inverse modulation of steady-state messenger RNA levels of two non-integrin laminin binding proteins in human colon carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1161-1169.
47. Campo E, Monteagudo C, Castronovo V, Claysmith AP, Fernández PL, Sobel ME. Detection of laminin receptor mRNA in human cancer cell lines and colorectal tissues by *in situ* hybridization. *Am J Pathol* 1992; 141: 1073-1083.
48. Sanjuan X, Fernández PL, Miquel R, Muñoz J, Castronovo V, Menaro S, et al. Overexpression of the 67-kd laminin receptor correlates with tumor progression in human colorectal carcinoma. *J Pathol* (en prensa).
49. Yow H, Wong JM, Chen HS, Lee C, Steele GD, Chen LB. Increased mRNA expression of a laminin-binding protein in human colon carcinoma: complete sequence of a full length cDNA encoding the protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6394-6398.
50. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DNW, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, et al. Galectins: a family of animal β -galactoside-binding lectins. *Cell* 1994; 76: 597-598.
51. Raz A, Pazerini G, Carri P. Identification of the metastasis-associated galactoside-binding lectin as a chimeric gene product with homology to an IgE-binding protein. *Cancer Res* 1989; 49: 3489-3493.
52. Raz A, Zhu D, Hogan V, Shah N, Raz T, Karkash R, et al. Evidence for the role of the 34-kDa galactoside-binding lectin in transformation and metastasis. *Int J Cancer* 1990; 46: 871-877.
53. Lotz MM, Andrews CW Jr, Korzeilus CA, Lee EC, Steele GD Jr, Clarke A, et al. Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 35) and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3466-3470.
54. Pignatelli M, Liu D, Masim MM, Stamp GWH, Hirano S, Takeichi M. Morphoregulatory activities of E-cadherin and beta-1 integrins in colorectal tumor cells. *Br J Cancer* 1992; 66: 629-634.
55. Koukoulis GK, Virtanen I, Moll R, Quaranta V, Gould VE. Immunolocalization of integrins in the normal and neoplastic colonic epithelium. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1993; 63: 373-383.
56. Koretz K, Schlag P, Boumsell L, Mofer P. Expression of VLA α 2, VLA α 6, VLA β 1 chains in normal mucosa and adenomas of the colon, and in colon carcinomas, and their liver metastases. *Am J Pathol* 1991; 138: 741-750.
57. Pignatelli M, Hanby AM, Stamp GWH. Low expression of β 1, α 3 and α 5 subunits of VLA integrins in malignant mammary tumors. *J Pathol* 1991; 165: 25-32.
58. Klein CF, Steinmayer T, Kaufmann L, Brocker E. Identification of a melanoma progression antigen as integrin VLA-2. *J Invest Dermatol* 1991; 96: 281-284.
59. Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haubmann I, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991; 65: 13-24.
60. Mulder JR, Kruyt PM, Sewnath M, Oosting J, Seldennik CA, Weidema WF, et al. Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins. *Lancet* 1994; 344: 1470-1472.
61. Heider K-H, Hofmann M, Hors E, van den Berg F, Ponta H, Herrlich P, et al. A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J Cell Biol* 1993; 120: 227-233.
62. Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J* 1993; 7: 1434-1441.
63. Jessup JM, Cathepsin B and other proteases in human colorectal carcinoma. *Am J Pathol* 1994; 145: 253-262.
64. Urbanski SJ, Edwards DR, Maitland A, Leco KJ, Watson A, Kossakowska AC. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in primary pulmonary carcinomas. *Br J Cancer* 1992; 66: 1188-1194.
65. Campo E, Merino E, Liotta LA, Keumann R, Stetler-Stevenson W. Distribution of the 72-kD type IV collagenase in nonneoplastic and neoplastic thyroid tissue. *Hum Pathol* 1992; 23: 1395-1401.
66. Campo E, Merino JM, Tavassoli FA, Charonis AS, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Evaluation of basement membrane components and the 72-kDa type IV collagenase in serous tumors of the ovary. *Am J Surg Pathol* 1992; 16: 500-507.
67. Freije JM, Diez-Ita I, Balbin M, Sánchez LM, Blasco R, Tolvía J, et al. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 1994; 269: 16766-16773.
68. Okada A, Belloq JP, Rouyer N, Chenard MP, Rio MC, Chambon P, et al. Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2730-2734.
69. Campo E, Muñoz J, Miquel R, Palacin A, Cardesa A, Slocane B, et al. Cathepsin B expression in colorectal carcinoma correlates with tumor progression and shortened patient survival. *Am J Pathol* 1994; 145: 301-309.

Càncer de còlon

Els estudis moleculars del càncer de còlon i recte han definit dues vies moleculars de progressió que impliquen diversos gens: 1) el model molecular de progressió, descrit en la poliposi còlica familiar, i 2) el model de la inestabilitat genètica en microsatèl·lits, definit en el càncer de còlon i recte hereditari no associat a poliposi o síndrome de Lynch. L'ordre d'aparició de les mutacions en els diferents gens sembla ser crucial en el desenvolupament d'aquests tumors. D'altra banda, el procés d'invasió i de metastasi s'associa amb una manca de regulació en els mecanismes d'adhesió cel·lular i degradació de la matriu extracel·lular. La possible coordinació d'aquests mecanismes i la seva possible seqüència no són conegudes. D'altra banda, sembla possible que les diferents vies genètiques de desenvolupament de càncer de còlon i recte poden utilitzar mecanismes invasors diferents, atesa la diferent evolució biològica i clínica dels esmentats càncers. Un millor coneixement d'aquests mecanismes podrà permetre un millor diagnòstic dels malalts i un disseny de teràpies més enfocades a la conducta biològica dels tumors.

Cáncer de colon

Los estudios moleculares del cáncer colorrectal han definido dos vías moleculares de progresión que implican a diversos genes: 1) el modelo molecular de progresión, descrito en la poliposis cólica familiar, y 2) el modelo de la inestabilidad genética en microsatélites, definido en el cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis o síndrome de Lynch. El orden de aparición de las mutaciones en los diferentes genes parece ser crucial en el

desarrollo de estos tumores. Por otra parte, el proceso de invasión y metástasis se asocia con una disregulación en los mecanismos de adhesión celular y degradación de la matriz extracelular. La posible coordinación de estos mecanismos y su posible secuencia no son conocidos. Por otra parte, parece posible que las diferentes vías genéticas de desarrollo de cáncer colorrectal puedan utilizar mecanismos invasores diferentes, dada la distinta evolución biológica y clínica de los mismos. Un mejor conocimiento de estos mecanismos podrá permitir un mejor diagnóstico de los enfermos y un diseño terapéutico más enfocado a la conducta biológica de los tumores.

Colon cancer

Research in colorectal cancer has identified two molecular pathways of disease progression implicating several genes: 1) the molecular model described for familial polyposis coli, and 2) the model of genetic microsatellite instability defined in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch's syndrome). The order of appearance of mutations in various genes seems to be crucial to tumor development. The invasive and metastatic process is associated with the deregulation of cell adhesion mechanisms and the degradation of the extracellular matrix. It appears possible that the different genetic pathways by which colorectal cancer develops may have different invasive mechanisms, given their distinct biological and clinical courses. Greater understanding of these mechanisms will lead to better diagnosis as well as treatments that focus more specifically on the biological behavior of tumors.

ALTERACIONS MOLECULARS ASSOCIADES ALS TUMORS DE BUFETA URINÀRIA

Carlos Cordon-Cardo, M. D., ph. D.*

Les malalties neoplàsiques es caracteritzen per la proliferació incontrolable i per la pèrdua de diferenciació cel·lular¹. Les cèl·lules canceroses adquireixen, durant el procés de transformació maligna, les propietats d'invasió, sembra a distància o metastasi, així com resistència a múltiples fàrmacs. El resultat final és un avantatge selectiu en el creixement que permet a les cèl·lules malignes desenvolupar una malaltia d'àmplia disseminació que acaba causant la mort del pacient. Aquestes característiques són el reflex de la inestabilitat gènica i l'acumulació de mutacions tant "positives" (activació de protooncogenes) com "recessives" (inactivació de gens supressors) que es produeixen durant el procés de progressió tumoral.

La classificació dels esmentats processos neoplàsics s'ha dut a terme segons les característiques histògenes de les lesions tumorals². La teràpia antineoplàsica no s'inicia fins que s'he fet un diagnòstic histològic del procés, bé sigui per mitjà d'una biòpsia tissular, bé sigui l'estudi d'una mostra citològica. A part del diagnòstic, l'estadi clínic i el patològic permeten decidir la intervenció terapèutica adequada. Tot i així, tenim prou documentació per a afirmar que dos tumors morfològicament similars poden comportar-se amb patrons biològics d'agressivitat radicalment oposada. Aquest fet limita tant la nostra avaluació clínica en la predicció del curs de la malaltia com el dissenyar pautes terapèutiques apropiades.

Durant l'última dècada s'han començat a descobrir les funcions d'un grup de gens els productes dels quals són els responsables del control que s'exerceix en el cicle de replicació cel·lular, així com de programes de diferenciació i regulació del procés de mort fisiològica cel·lular o apoptosi^{3,4}. L'impacte de la detecció de mutacions en gens reguladors se centra en el seu potencial ús pràctic en l'estratificació de pacients amb càncer en grups de "bon" enfront de "mal" pronòstic. Nous marcadors tumorals i alteracions genètiques que es correlacionen amb el comportament biològic de certes lesions neoplàsiques estan sent validats en protocols clínics, fins i tot en l'àmbit de col·laboracions internacionals. La incorporació d'aquests paràmetres moleculars al nostre arsenal diagnòstic i pronòstic augmentarà la nostra capacitat per a valorar l'agressivitat dels tumors i per a dissenyar estratègies terapèutiques més eficaces.

El càncer de bufeta urinària ocupa el sisè lloc d'incidència en el

món, encara que en els Estats Units de Nord Amèrica sigui el quart tipus de càncer més freqüent⁵. Aproximadament el 90% dels tumors de bufeta són d'origen epitelial i el 95% de les esmentades neoplàsies són de tipus transicional. S'han reconegut dues lesions tumorals com a neoplàsies no invasives: tumors superficials papil·lars (Ta) i tumors plans o *in situ* (Tis). Aquestes dues presentacions no només es poden distingir per la morfologia, sinó que a més tenen un comportament clínic diferent⁶. Els tumors superficials papil·lars tendeixen a produir recurrències i la seva progressió a lesions invasives és poc freqüent. Tot i així, els carcinomes *in situ* plans, a més de ser per definició d'alt grau tumoral, tendeixen a progressar i a produir una malaltia biològicament més agressiva. La progressió tumoral d'aquestes lesions, definida com a desenvolupament de carcinoma transicional invasiu o detecció de metastasi, s'ha xifrat en, aproximadament, del 5 al 15% per a lesions Ta, mentre que s'ha pogut evidenciar entre el 40 i el 60% en pacients amb carcinoma *in situ*⁶. La història natural del carcinoma transicional de bufeta, així com les alteracions moleculars s'estan reconeixent en les esmentades lesions i que a continuació revisarem, van ser la base en la qual ens fundem per a proposar un nou model de progressió tumoral (fig. 1). Segons el model esmentat, la nostra hipòtesi de treball va ser el fet que diferents aberracions genètiques estaven associades amb lesions neoplàsiques morfològicament diferents i que, al seu torn, aquestes eren també responsables de la seva evolució clinicopatològica oposada. En els apartats que segueixen es resumeixen els estudis realitzats pel nostre grup i altres investigadors i es fa èmfasi en els aspectes biològics significatius relacionats amb el desenvolupament i la progressió de tumors de bufeta urinària.

Significat clínic d'estudis inicials citogenètics i moleculars

Els estudis de cariotip convencional duts a terme inicialment en tumors de bufeta van revelar diverses anomalies cromosòmiques que eren al seu torn freqüents i no aleatòries. Es va descobrir que canvis específics, com la monosomia del cromosoma 9 i delecions intersticials del cromosoma 13, no només eren abundants sinó que a més es correlacionaven amb l'estadi i el grau tumoral de les lesions analitzades⁷. Per mitjà de tècniques d'hibridació *in situ* d'interfície en teixits tumorals es va comprovar⁸ l'alta freqüència de canvis en el

*Director de la Divisió de Patologia Molecular, Departament d'Anatomia Patològica, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, 1275 York Avenue, New York, New York 10021

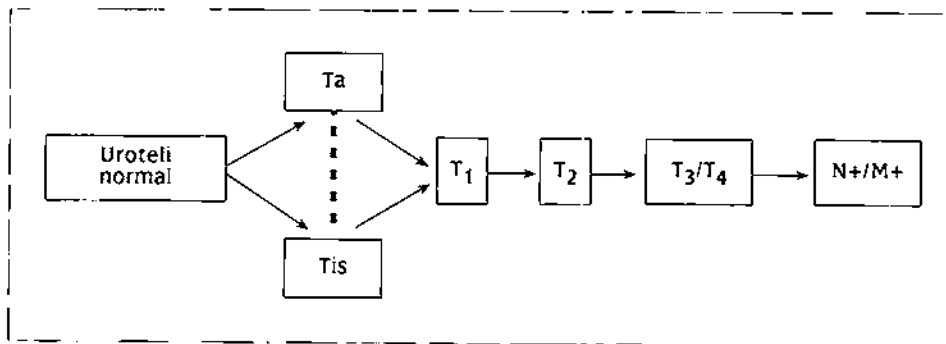


Fig. 1 Representació esquemàtica de la hipòtesi de progressió tumoral de les neoplàsies de bufeta urinària. A diferència d'altres versions de progressió tumoral, el nostre model incorpora rutes divergents per a lesions inicials (esquema modificat d'una publicació prèvia del nostre grup que va aparèixer en la revista *Lancet* - veure referència 13).

cromosoma⁹. També es van detectar alteracions 9 en els cromosomes 1, 7, 11, 17 i 18. Aquests estudis ens van proporcionar els coneixements bàsics per a la planificació d'una anàlisi més profunda, per a la qual es van utilitzar tècniques de genètica molecular recombinant.

El pas següent va ser l'anàlisi de pèrdues al·lèliques, per mitjà de l'estudi de polimorfismes genètics (*restriction fragment length polymorphism* o RFLP). Fearon et al.¹⁰ van comunicar la pèrdua d'heterozigositat (*loss of heterozygosity* o LOH) del braç curt del cromosoma 11 (11p). Tsai et al.¹¹ van revelar que les pèrdues al·lèliques més freqüents en tumors de bufeta corresponien al braç llarg del cromosoma 9 (9q), així com a delecions del braç curt dels cromosomes 17 (17p-) i 11 (11p-). Els estudis duts a terme en el nostre laboratori van ser els primers a utilitzar un nombre de pacients considerable que, a més, estaven clínica i patològicament ben caracteritzats. A més d'aquests criteris, les mostres tumorals es seleccionaven per les seves característiques morfològiques i es revisaven detalladament abans d'utilitzar-les en estudis moleculars. Va ser per mitjà de l'anàlisi de les esmentades lesions i del banc de dades de què disposàvem com vam obtenir suficients resultats, després d'estudiar sondes gèniques en la gran majoria de braços cromosòmics, per a proposar un nou model de desenvolupament i progressió tumoral del càncer de bufeta¹²⁻¹⁴. Es va observar que les delecions del cromosoma 9 es correlacionaven amb tumors superficials papil·lars i que no hi havia pèrdues al·lèliques de l'esmentat cromosoma en les lesions Tis. Tot i així, es van identificar delecions en regions cromosòmiques corresponents a 3p, 5q i 17p en lesions que mostraven invasió de la làmina pròpia (tumors classificats com T1). Aquestes anomalies eren següent per pèrdues al·lèliques de les regions cromosòmiques corresponents a 11p, 6q, 13q i 18q. Aquestes aberracions només es van detectar en tumors que presentaven franca invasió de capes musculars profundes (lesions classificades com a T2-T4). La distribució de les alteracions genètiques descrites ens va permetre de suggerir que certes mutacions estaven relacionades amb el desenvolupament de tumors superficials (per exemple, delecions de 9q en tumors papil·lars superficials), mentre que altres s'associaven amb mecanismes de progressió tumoral (per exemple, delecions de 17p en tumors invasius). Ens faltava, però, identificar

quins eren els gens específics que estaven alterats en les regions cromosòmiques aberrants detectades en les mostres clíniques de tumors primaris de bufeta estudiats. Amb aquesta finalitat, diferents membres del nostre equip es van centrar en l'anàlisi detallada de regions cromosòmiques anòmales, així com en l'estudi de gens candidats a supressors tumorals que residien en les zones esmentades.

Significat biològic i clínic de mutacions del gen TP53

El gen supressor TP53 es localitza en el braç curt del cromosoma 17 humà (banda 17p13.1) i codifica la fosfoproteïna nuclear de 53 kilo-Dalton (kD) denominada p53^{15,16}. Una de les principals funcions de la proteïna p53 és la de regular el cicle de replicació cel·lular, actuant com a "guardià" del codi genètic, identificant possibles errors i parant el cicle en la meitat de la fase G1 quan els detecta¹⁷. Així s'evita que els errors es reproduïxin durant la fase S o de síntesi del DNA. p53 també actua com a un factor de transcripció, transactivant gens implicats en processos reguladors de la proliferació cel·lular i l'apoptosi^{18,19}.

Les mutacions del gen TP53 són les anomalies gèniques més freqüents trobades en el càncer humà²⁰. Tot i així, aquestes mutacions no s'havien correlacionat amb factors pronòstics clinicopatològics en tumors provinents de lesions clíniques (també denominats tumors primaris, per a distingir-los en línies cel·lulars tumorals). Estudis duts a terme en el nostre laboratori van ser pioners en aquesta àrea i van demostrar que les alteracions esmentades podien oferir un avantatge selectiu a cèl·lules tumorals vesicals per a créixer descontroladament, així com produir alts nivells d'inestabilitat gènica^{21,22}. Va ser el nostre propòsit centrar-nos primerament a definir la freqüència amb què les alteracions esmentades succeïen en els primers estadis del càncer de bufeta. Dividim els nostres estudis en l'anàlisi de lesions papil·lars superficials (Ta i T1 amb component papil·lar) enfront de carcinomes *in situ* (Tis i T1 associats a Tis).

En el primer estadi es va observar que l'acumulació nuclear de p53 s'associava a la progressió tumoral²³. Es van analitzar 43 pacients amb carcinoma transicional de bufeta estadi T1, tractats amb resecció transuretral exclusivament, utilitzant

l'anticòs monoclonal (AcM) 1801 i mètodes d'immunohistoquímica. En 18 casos la tinció nuclear va ser negativa (fenotip p53-negatiu), mentre que 25 casos van mostrar un patró homogeni o heterogeni de immunoreacció (fenotip p53-positiu). La taxa de progressió comparant els dos grups va ser superior en pacients que tenien un fenotip positiu (20,5% de taxa de progressió per un any) enfront de pacients amb fenotip negatiu (7,5% de taxa de progressió anual) ($p < 0,001$) (fig. 2). La detecció nuclear de p53 va ser un factor pronòstic advers independent del grau, la presència d'invasió vascular o l'associació amb carcinoma *in situ* en aquest grup de pacients²³.

Continuant els nostres estudis, ens vam centrar després en la detecció de patrons alterats d'expressió de p53 en 54 pacients amb lesions Ta²⁴ i 33 pacients amb lesions classificades com a Tis pur²⁵. Per mitjà d'anàlisi multivariable, es va evidenciar que l'expressió nuclear de la proteïna p53 mutada és el predictor més important de progressió en les dues poblacions (Ta - taxa de progressió, $p = 0,002$; Tis - taxa de progressió, $p < 0,001$). Tot i així, la detecció de fenotip p53 positiu va ser molt més freqüent en tumors superficials plans (Tis - 48%)²⁴ que en lesions papil·lars superficials (Ta - 22%)²⁵. La nostra conclusió va ser que les delecions del braç curt del cromosoma 17, on resideix el gen TP53, i les mutacions de l'esmentat gen no només eren freqüents en carcinomes superficials, sinó que a més eren probablement alteracions primàries associades amb processos de desenvolupament tumoral de carcinoma *in situ* de bufeta urinària.

Aquests treballs es van continuar amb una anàlisi de la freqüència i la possible rellevància clínica de detectar sobreexpressió nuclear de p53 en carcinomes transicionals invasius (T2-4) de pacients tractats amb el règim quimioteràpic M-VAC (metotrexat, vinblastina, adriamicina i cisplati)²⁶. Vam estudiar un grup de 90 pacients amb una mitjana de seguiment clínic de 5,8 anys. El fenotip p53-positiu, indicatiu d'alteracions de p53, es va identificar en lesions tumorals de 47 pacients (52,2%), mentre que els restants 43 pacients mostraven lesions tumorals de fenotip p53-negatiu. En els pacients que pertanyien al grup p53-positiu s'objectivà un curs més agressiu de la seva malaltia, la resposta al tractament quimioteràpic no va ser bona i es va recollir un alt percentatge de morts degudes a càncer de bufeta. L'anàlisi estadística de multivariància va demostrar que la sobreexpressió nuclear de p53 (genotip p53-positiu) era significatiu i independent d'altres paràmetres (per exemple, estadi, grau tumoral i multifocalitat, entre altres) ($p = 0,001$)²⁶. La conclusió va ser que mutacions del gen TP53 i alteracions del seu producte no només estan relacionades amb el procés de progressió tumoral, sinó que a més poden trobar-se involucrades en el fracàs de resposta terapèutica utilitzant agents quimioteràpics convencionals. La raó d'aquest fracàs que es pot relacionar més amb la pèrdua de capacitat de mort cel·lular natural o apoptosi que amb el desenvolupament d'un fenotip de resistència a múltiples fàrmacs (*multidrug resistance* o MDR). En el cas de presentació

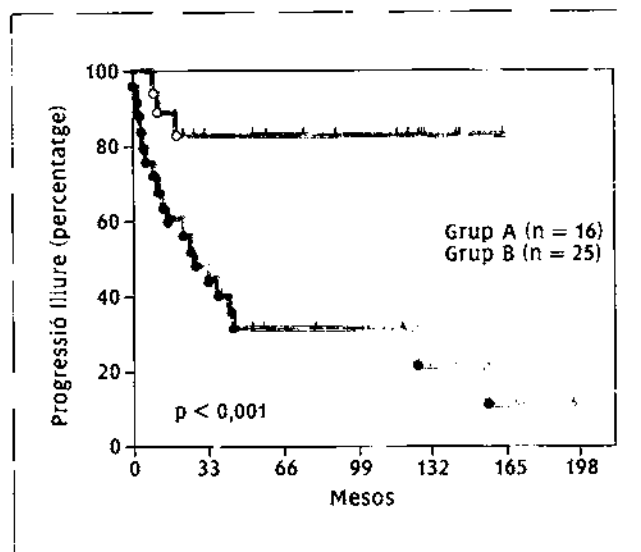


Fig. 2. Taxa de progressió del grup de pacients amb lesions T1 estratificat per mitjà de fenotip negatiu enfront de positiu per a sobreexpressió de p53 nuclear (figura modificada d'una publicació prèvia del nostre grup que va aparèixer en la revista *Journal of the National Cancer Institute* - veure referència 23)

del fenomen MDR, l'esdeveniment patofisiològic, sembla ser l'expressió de la glicoproteïna-P (*P-glycoprotein* o Pgp)^{27,28}. Aquesta molècula és una proteïna transmembrana que actua com una bomba d'efluxió, excloent de la cèl·lula productes tòxics com certs agents quimioteràpics. Tot i així, mutacions del gen TP53 poden desactivar processos d'apoptosi i produir una cèl·lula tumoral que, més que resistent, és "immortal". En altres paraules, les cèl·lules neoplàsiques amb alteracions de p53 perden la capacitat de reconèixer dany cel·lular, inclòs el dany tòxic produït per certs fàrmacs i es divideixen constantment, sense sortir-se del cicle de replicació cel·lular ni morir. Estudis similars han estat reproduïts posteriorment per altres grups d'investigadors que han validat les nostres observacions. Aquestes anàlisis s'han dut a terme, en general, utilitzant tècniques de laboratori similars i material clínic de pacients afectats per tumors de bufeta apropiat²⁹⁻³¹. Altres estudis, tant del nostre laboratori com d'altres grups, han demostrat que les alteracions de p53 són freqüents i tenen significat clínic en altres processos neoplàsics, com el càncer de mama^{32,34} i el de còlon i recte³⁵⁻³⁶.

Significat biològic i clínic d'alteracions del gen MDM2

La proteïna p53 pot ser inactivada per delecions o mutacions del gen que la codifica, com indicàvem en l'apartat anterior, o per mitjà de la formació de complexos amb proteïnes denominades oncoviriques, com la proteïna E6 produïda pels virus de tipus papil·loma (*human papilloma virus* o HPV)³⁷. Més recentment s'ha caracteritzat una proteïna cel·lular denominada mdm2, producte del protooncogen MDM2^{38,39}. Aquesta proteïna té com a funció més important l'unir-se a p53, formant

complexos estables, i inactivant les propietats transactivadores de p53. El gen MDM2 s'ha localitzat en el mapa cromosòmic del braç llarg del cromosoma 12 (banda 12q13-14). En certs tumors, aquest gen s'amplifica i funciona com un oncògen. La proteïna nuclear que codifica té un pes molecular de 90 kD, raó per la qual també es coneix la proteïna mdm2 com a p90.

El gen MDM2 té un promotor que al seu torn conté un element de reconeixement per a p53. Això significa que el gen MDM2 està regulat, en la transcripció, per la proteïna p53. A causa del fet que la proteïna mdm2 (p90) forma complexos amb p53, s'ha postulat i evidenciat que entre les dues molècules existeix un procés retroactiu regulador (*feedback regulatory loop*)^{39,40}. Així doncs, el dany pel que fa a DNA incrementa la síntesi de p53, que al seu torn inicia la transcripció de mdm2. Quan s'arriba a nivells massa alts de p53, ja s'han produït suficients molècules de mdm2 per a unir-se a p53 i aturar el procés. Tot i així, si en condicions anòmales es produeix mdm2 en grans quantitats, com podria ser en el cas d'amplificació gènica, la proteïna p53 es troba conjugada constantment i per definició, inactiva. En aquesta circumstància, el gen MDM2 es converteix en un oncogen activat.

Va ser en aquest moment quan en el nostre laboratori va unir forces amb el laboratori dirigit pel Dr. Arnold Levine, de la Universitat de Princeton. El grup del Dr. Levine va ser el pioner en els estudis de p53 i el que va descobrir el gen MDM2, conjuntament amb el grup dirigit pel Dr. Bert Vogelstein de la Universitat de John Hopkins. Va ser així com vam fer una anàlisi de tumors vesicals per a definir la freqüència d'alteracions de MDM2, al mateix temps que relacionàvem les esmentades alteracions amb mutacions de TP53 i patrons anòmals de la seva proteïna (p53)⁴¹. Vam analitzar els esmentats gens i les seves proteïnes codificades en una sèrie de 87 tumors urotelials primaris. Vam detectar sobreexpressió nuclear de p53 en les cèl·lules tumorals del 41% dels casos estudiats. El nivell de la proteïna mdm2 (p90) es va identificar elevat en el 30% dels casos, i el gen MDM2 estava amplificat només en dos tumors. Es va observar una correlació significativa entre la sobreexpressió de mdm2 i els tumors que es presentaven amb baix estadi i grau tumoral. Es va concloure que mdm2/p90 i p53 estan freqüentment alterats en tumors vesicals i que podrien estar involucrats en la gènesi i el progrés del càncer urotelial⁴¹.

També en col·laboració amb el Dr. Levine vam dissenyar un estudi per a avaluar els canvis de TP53 i MDM2 en sarcomes dividint osteosarcomes de parts toves. La nostra sorpresa va ser que en els esmentats tumors d'origen mesenquimàtic les alteracions de TP53 i MDM2 eren encara més freqüents. Es va detectar un nombre important de lesions que mostraven ampliació gènica de MDM2 i sobreexpressió dels seu producte. A més, les alteracions de TP53 i MDM2 definien un grup de pacients que sofrien un curs molt agressiu de la malaltia⁴². Una lliçó important dels estudis esmentats és que tumors dife-

rents poden respondre a lesions moleculars similars de forma radicalment oposada.

Significat biològic i clínic de les alteracions del gen del retinoblastoma (RB)

El gen del retinoblastoma (RB) va ser el primer a ser reconegut com a gen supressor tumoral, i es va considerar com a un prototip dels gens supressors. Van ser les observacions dutes a terme pel Dr. Knudson, durant el seu estudi epidemiològic del retinoblastoma intraocular típic de la infantesa, les que van definir el postulat d'inactivació de gens recessius o antioncògens⁴³. Knudson va proposar la hipòtesi de la necessitat de sofrir dues mutacions (*two hits*), que inactiven així els dos al·lels heretats. Una d'aquestes alteracions podria estar present en les cèl·lules germinals i per tant ser heretada, circumstància en la qual només es necessitaria una segona mutació somàtica per a desenvolupar el fenotip transformat. La clonació del gen i els estudis posteriors, que utilitzen tècniques de DNA recombinat, van demostrar que la hipòtesi de Knudson era correcta i que la forma més habitual d'inactivació de gens supressors era per mitjà de la delecció d'un al·lel, seguit per una mutació puntual de l'al·lel contralateral restant. El gen del retinoblastoma codifica una fosfoproteïna nuclear, denominada pRB, de pes molecular aproximat de 110kD⁴⁴. La funció de pRB és la regulació, en sentit estricte, del control del cicle de replicació cel·lular⁴⁵. Aquesta funció s'exerceix per mitjà del segrest de proteïnes que tenen la capacitat d'unió al DNA i l'activitat transactivadora, com per exemple el factor de transcripció E2F⁴⁶. Durant el cicle de replicació cel·lular, pRB es fosforila per l'activitat dels complexos ciclina cinasa ciclina dependents (cicl-Cdks), que en modifiquen l'estructura quaternària i n'alliberen els productes segrestats. Aquests, al seu torn, permeten que la transició de G1 a S es dugui a terme, per mitjà de l'activació d'enzims i subproductes requerits per a la síntesi i la replicació del DNA. Aquests esdeveniments biològics seran exposats més detalladament en l'apartat següent. A més de les mutacions gèniques descrites i de forma similar a la descrita per a p53, pRB pot formar complexos amb proteïnes oncovirals tals com E1A dels adenovirus o E7 dels virus del tipus papil·loma^{47,48}. Aquests complexos inhibeixen la funció de pRB i, consegüentment, el seu paper regulador del cicle de replicació cel·lular.

Un dels grups que va clonar el gen RB està dirigit pel Dr. William Benedict, actualment en el Baylor College of Medicine. El nostre laboratori ha col·laborat amb el grup del Dr. Benedict en l'anàlisi d'alteracions de pRB i la caracterització de mutacions en RB. Va ser així com els dos primers articles que tractaven d'alteracions de pRB en pacients afectats per tumors transicionals de bufeta van aparèixer junts i amb un missatge clínic similar^{49, 50}. Els dos treballs van demostrar que la inactivació del producte codificat pel gen RB era una alteració fre-

qüent en càncer de bufeta i que s'associava a estadis avançats de la malaltia. La supervivència dels pacients amb alteracions de pRB era molt menor que la dels pacients que presentaven patrons d'expressió normals. Específicament, el nostre estudi va avaluar 48 tumors primaris i va detectar alteracions en lesions de 14 pacients (29,2%). La supervivència de pacients sense alteracions a cinc anys era més alta, amb diferències estadísticament significatives, quan es comparava a la de pacients amb patrons aberrants de pRB ($p < 0,001$). La nostra conclusió va ser que tumors que exhibien alteracions de pRB tenien un comportament biològic agressiu i que la detecció de les esmentades anomalies en tumors de bufeta en estadis avançats podia convertir-se en un paràmetre molecular amb implicacions pronòstiques en pacients afectats per càncer de bufeta.

Significat biològic i clínic de mutacions del cromosoma 9: p16 i p15 com a gens supressors tumorals

A causa de la gran freqüència amb la qual el cromosoma 9 presenta delecions en tumors urotelials, s'ha postulat que en l'esmentat cromosoma existeix al menys un gen supressor implicat en processos de tumorigènesi de neoplàsies vesicals. El nostre grup va resoldre d'examinar específicament alteracions moleculars tant del braç curt com del braç llarg en una sèrie de lesions ben caracteritzades clinicopatològicament. L'objectiu primari dels nostres estudis era el de definir les regions amb pèrdues de material genètic, així com la seva associació amb paràmetres patològics i clínics associats a mal pronòstic en pacients amb tumors de bufeta⁵¹. Es va observar que la majoria de tumors estudiats (77% en total) mostraven pèrdues al·lèliques i/o alteracions en microsatèl·lits al menys per a un dels marcadors moleculars analitzats en el cromosoma 9. Es van identificar dues regions que incloïen la majoria d'alteracions i se'n va trobar una en la zona del telòmer del braç curt (9p21), mentre que l'altra regió es trobava en la part contraposada, en la zona distal del braç llarg (9q34.1-34.3). La freqüència més alta en pèrdues al·lèliques es va caracteritzar en 9p21, mapant sobre el locus de l'interferon alpha (IFNA). Alteracions genètiques de l'esmentat marcador molecular han estat documentades en altres processos neoplàsics, com gliomes i melanomes⁵².

Durant els nostres estudis de mapatge del cromosoma 9 vam entrar en contacte amb el grup d'investigadors dirigit pel Dr. Marc Skolnick de la Universitat de Utah a Salt Lake City. Va ser així com vam participar en el descobriment del gen supressor MTS1 (*multiple tumor suppressor gene 1*)^{53,54}. Aquest gen va ser clonat al mateix temps, a causa de les seves propietats de regulador negatiu del cicle de replicació cel·lular, pel grup del Dr. David Beach dels laboratoris Cold Spring Harbor a Nova York. El gen MTS1 era el mateix que el gen que es descrivia com a p16⁵⁵. Aquest gen codifica una proteïna al paper biològic

de la qual és el d'inhibir la fosforilació de la proteïna del retinoblastoma (pRB). L'esmentada propietat es produeix per mitjà de la formació de complexos de p16 amb les anomenades cinases ciclina dependents (*cyclin dependent kinases* o Cdk), descobrint que al seu torn va ser dut a terme pel Dr. Manuel Serrano mentre treballava en el laboratori del Dr. Beach⁵⁵. La col·laboració del nostre laboratori amb el grup del Dr. Skolnick va demostrar que les alteracions de p16/MTS1 són de caràcter molecular peculiar, ja que la majoria són delecions homozigòtiques⁵⁴⁻⁵⁶. També es va evidenciar que les mutacions de p16/MTS1 són independents de les mutacions de TP53 en una sèrie de casos analitzats⁵⁶. Aquestes troballes van ser la primera documentació d'un procés mutant específic per a p16/MTS1 en tumors primaris humans.

Més recentment, el grup dirigit pel Dr. Beach ha descobert el gen denominat p15 o MTS2⁵⁷. Aquest gen resideix en la mateixa regió que el gen p16/MTS1, i de fet és el seu veí més pròxim. En termes de genètica molecular es definirien com a gens en tàndem, ja que estan un a continuació de l'altre en el mateix braç del cromosoma 9 i, per definició, en la mateixa regió (9p21). En la col·laboració amb el grup del Dr. Beach, el nostre laboratori ha demostrat que en la majoria de casos de tumors vesicals, quan es troben delecions homozigòtiques de p16/MTS1, també es detecten pèrdues al·lèliques totals de p15/MTS2⁵⁸. Així doncs, hem arribat a la conclusió que la pèrdua de tots els al·lels de p16 i p15 representa un nou mecanisme alternatiu als descrits per a la inactivació de gens supressors tumorals. És més, la nostra anàlisi de tumors primaris de bufeta ha revelat que les esmentades alteracions es correlacionen amb estadis tumorals inicials (Ta/T1 papil·lar - però no són Tis) i grau tumoral baix (graus 1 i 2)⁵⁸.

Estem actualment duent a terme estudis que inclouen sèries llargues de tumors vesicals per a poder justificar si realment delecions homozigòtiques de p16 i p15 són esdeveniments primaris per a un subgrup de tumors superficials papil·lars de bufeta urinària. La nostra hipòtesi de treball és que alteracions d'un gen, encara no clonat, en la regió 9q34.1-34.3, representarien esdeveniments primaris per a un altre subgrup de tumors superficials papil·lars amb característiques biològiques d'agressivitat inferior que aquells que tinguessin alteracions de p16 i/o p15.

Implicacions biològiques i clíniques de mutacions de gens reguladors del cicle de replicació cel·lular en processos neoplàsics

El progrés de les cèl·lules eucariotes per mitjà del cicle de replicació cel·lular depèn de la formació, l'activació i la inactivació d'una sèrie de complexos formats per ciclins i cinases ciclina dependents (cicl-Cdk)⁵⁹. El control d'aquests complexos heterodimers s'exerceix en les diferents fases del cicle cel·lular, i impedeixen l'entrada prematura de la cèl·lula en divisió a

la fase següent. Els complexos cicl-Cdk executen la seva funció reguladora per mitjà de la fosforilació de molècules fonamentals involucrades en els punts de transició del cicle de replicació, tals com pRB^{60,61}. Es va proposar que les mutacions i la sobreexpressió de ciclines i Cdk, principalment ciclina D1 i Cdk4, representen esdeveniments oncogènics⁶². L'amplificació del gen de la ciclina D1, conegut com a PRAD1 o CCND1, s'ha documentat en carcinomes de mama i en càncer de laringe^{63,64}. D'altra banda, s'ha detectat amplificació gènica de Cdk4 en línies cel·lulars de glioma⁶⁵.

Recentment s'ha identificat una nova família de reguladors del cicle de replicació cel·lular que actuen com a inhibidors de Cdk⁶⁶. Als gens que codifiquen els esmentats inhibidors, se'ls ha denominat CKIs. Els productes de gens CKIs s'uneixen a Cdk o als complexos cicl-Cdk, inhibint l'activitat catalítica del complex. La funció biològica de les proteïnes codificades per CKIs, a més del fet que els seus gens es localitzen en àrees de cromosomes alterades en un nombre considerable de càncers humans, va suggerir que podrien ser classificats amb gens supressors tumorals.

El primer membre descrit d'aquesta família d'inhibidors va ser p21, el gen del qual es denomina també WAF1 o CIP1⁶⁷. p21 inactiva els complexos ciclina A/E cdk2 i ciclina D1/D2/D3-cdk4, i impedeix l'entrada de cèl·lules en divisió a la fase S quan s'expressa de forma excessiva. Un descobriment importantíssim va ser la caracterització de la regulació de p21, ja que el gen p21/WAF1 es troba sota el control de p53⁶⁸ de forma similar al control exercit per p53 sobre MDM2. A causa d'aquests resultats, s'ha postulat que existeix una relació íntima entre p53 i pRB, per mitjà d'interaccions moleculars que permeten un control del cicle de progressió cel·lular en el punt crucial (*check point*) de la fase G1.

Fins al moment no s'han donat a conèixer alteracions del gen p21/WAF1 en tumors primaris humans; tot i així, el nostre grup ha detectat una possible mutació en un tumor transicional de bufeta que podria produir una proteïna truncada no funcional.

La família de CKIs ha sumat nous membres, entre ells els ja descrits p16 i p15. Com comentàvem, la proteïna p16 és codificada pel gen p16/MTS1, també denominat INK4A ("inhibitor of Cdk4"). p16 s'uneix de forma específica a Cdk4 i Cdk6, inhibint indirectament la fosforilació de pRB. La proteïna p15 posseeix una gran homologia amb p16; és codificada pel gen p15/MTS2/INK4B. A l'igual de p16, p15 inactiva Cdk4 i Cdk6 formant complexos estables i inactivant la fosforilació de pRB. La diferència més important entre p16 i p15 se centra en la regulació de la seva expressió. Mentre que la p16 pot estar controlada per senyals interns, s'ha demostrat que p15 és un substrat efector del factor de creixement tumoral beta (TGFβ), i que els seus mecanismes de regulació negativa són externs. Tant p16 com p15 apareixen freqüentment alterats en línies cel·lulars derivades de múltiples tipus de tumors. L'alteració més comuna és la deleció total dels al·lells funcionants dels dos gens. Diferents grups han demostrat que les esmentades aberracions genètiques es donen amb freqüències variables en un nombre importants de tumors primaris humans^{69,72}. Sembla ser lògic, doncs, el fet de postular que els esmentats gens són candidats supressors tumorals.

La proteïna p27/Kip1 és un altre nou membre regulador negatiu del cicle de replicació cel·lular^{73,74}. El gen p27/Kip1 va ser descobert pel grup del Dr. Joan Massagué en la nostra Institució. p27 respon, com p15, a certs estímuls externs mitjançats per TGFβ 2,3, i provoca la detenció del cicle en la fase G1. Aquesta proteïna té certa homologia amb p21/WAF1, i inactiva els

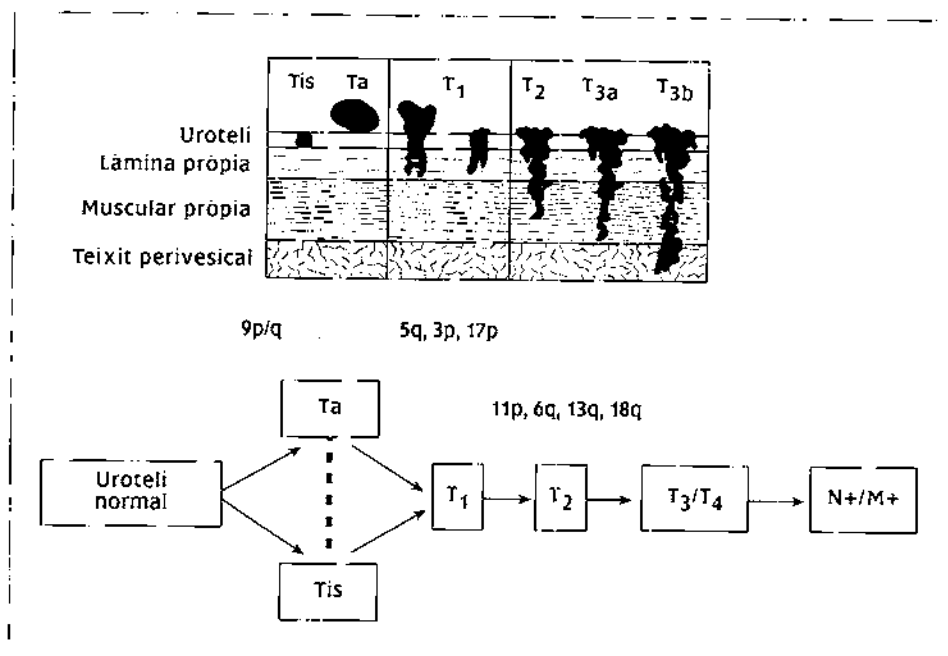


Fig. 3. Il·lustració dels estadis patològics del càncer de bufeta i alteracions moleculars associades a la progressió tumoral en lesions neoplàsiques vesicals (diagrama modificat d'una publicació prèvia del nostre grup que va aparèixer en la revista *Lancet* - veure referència 13).

complexos cicE-Cdk2, cicA-Cdk2 i cicD-Cdk4^{73,74}. Aquest inhibidor del cycle ha estat localitzat pel nostre grup en el cromosoma 12, regió 12p12-p13⁷⁵. En un estudi en col·laboració del nostre laboratori amb el dirigit pel Dr. Massagué no vam detectar mutacions de p27/Kip1 en els tumors primaris estudiats⁷⁵. Aquestes observacions es van comprovar en dos estudis independents que es van publicar al mateix temps que la nostra feina^{76,77}.

Més recentment s'ha caracteritzat el gen p18, que es localitza en el cromosoma 1 (banda 1p32). Aquest gen codifica una proteïna que forma complexos dímers estables Cdk4 i Cdk6, inhibeix l'activitat cinasa dels complexos cicD-Cdk4 i cicD-Cdk6, i inhibeix així també la fosforilació de pRB⁷⁸. Poc sabem, encara, del seu mecanisme de regulació i de la seva possible implicació en tumors humans.

Conclusions

Els avanços realitzats en els camps de la biologia cel·lular i molecular han produït un progrés vertiginós dels nostre nivell comprensiu referent a processos de proliferació i diferenciació cel·lular. Així mateix, els mecanismes inherents al fenomen de mort cel·lular programada, o apoptosi, s'estan descobrint. El balanç d'aquests tres processos és el que permet l'homeòstasi cel·lular i regeix l'organogènesi tissular. Mutacions de gens reguladors profundament implicats en aquests mecanismes són, aparentment, els esdeveniments més importants tant del desenvolupament com de la progressió tumoral. És l'acumulació, més que l'ordre, de les esmentades alteracions gèniques la que afavoreix la seva activitat sinèrgica i determina la transformació maligna de certs clons de cèl·lules neoplàstiques.

El model molecular de progressió que hem proposat per al càncer de bufeta s'il·lustra en la figura 3. Aquest model incorpora rutes divergents que defineixen tumors de baix estadi papil·lars superficials enfront de plans (carcinoma *in situ*). És la nostra hipòtesi que les alteracions que sofreixen les cèl·lules tumorals de lesions papil·lars són principalment desbalanços proliferatius. Tot i així, el complex grau de mecanismes de control, així com el nombre de molècules que de forma redundante supervisa aquests punts crítics del cycle de replicació cel·lular i apoptosi, no permet l'expressió desmesurada d'un fenotip biològicament agressiu. Oposat a aquest procés, altres lesions sofreixen mutacions de gens reguladors "essencials" que permeten l'acumulació d'altres aberracions, proporcionant un alt grau d'instabilitat gènica i afavorint el desencadenament d'un fenotip altament invasiu.

Marcadors biològics que es correlacionen amb el comportament de lesions tumorals s'estan identificant constantment. Al mateix temps, s'estan desenvolupant noves tècniques de laboratori que detecten i avaluen els esmentats marcadors, ja sigui tant pel que fa genotip com pel que fa a fenotip. La im-

plementació d'aquests mètodes en el camp de l'oncologia clínica ens proporcionarà noves guies per al diagnòstic primerenc i el pronòstic de processos neoplàstics. Al seu torn, aquestes noves estratègies ens permeten de dissenyar règims terapèutics més efectius, millorant la qualitat de vida i prolongant la supervivència dels pacients que pateixen càncer.

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. Willis RA. The spread of tumors in the human body. Londres: Butterworth & Co., 1952.
2. Sugarbaker PH, Dunnick NR, Sugarbaker EV. Diagnosis and Staging of Cancer. En: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, ed. Cancer Principles and Practice of Oncology. Filadèlfia: J.B. Lippincott Co., 1986.
3. Murray AW, Hunt T. The Cell Cycle, An Introduction. Nueva York: Freeman 1993.
4. Majno G, Joris I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. Am J Pathol 1995; 146: 3-15.
5. Cancer Facts and Figures-1995. American Cancer Society, 1995.
6. Cordon-Cardo C. Precursor Lesions of Bladder Carcinoma. En: Marks PA, Weil R, ed. Challenges of Modern Medicine. Ares-Serono Symposia Publications, 1993; 1: 35-45.
7. Gibas Z, Probst GR, Cornolly JG, Pontes JE, Sandberg AA. Nonrandom chromosomal changes in transitional cell carcinoma of the bladder. Cancer Res 1984; 44: 1.257-1.264.
8. Hopman AHN, Moesker O, Smeets WGB, Pauwels RPE, Vooijs GP, Ramaekers FCS. Numerical chromosome 1, 7, 9, and 11 aberrations in bladder cancer detected by *in situ* hybridization. Cancer Res 1991; 51: 644-651.
9. Waldman FM, Carroll PR, Kerschmann R, Cohen MB, Field FG, Mayall BH. Centromeric copy number of chromosome 7 is strongly correlated with tumor grade and labeling index in human bladder cancer. Cancer Res 1991; 51: 3.807-3.813.
10. Fearon ER, Feinberg AP, Hamilton SH, Vogelstein B. Loss of genes on the short arm of chromosome 11 in bladder cancer. Nature 1985; 318: 377-380.
11. Tsai YC, Nichols PW, Hiti AL, Williams Z, Skinner DG, Jones PA. Allelic losses of chromosomes 9, 11, and 17 in human bladder cancer. Cancer Res 1990; 50: 44-47.
12. Presti JC, Reuter VE, Galan T, et al. Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer. Cancer Res 1991; 51: 5.405-5.409.
13. Dalbagni G, Presti J, Reuter V, Fair WR, Cordon-Cardo C. Genetic alterations in bladder cancer. Lancet 1993; 324: 469-471.
14. Cordon-Cardo C, Dalbagni D, Sarkis A, Reuter VE. Genetic Alterations Associated With Bladder Cancer. En: Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA, ed. Important Advances in Oncology. Filadèlfia: J.B. Lippincott Company, 1994.
15. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. Nature: 1991; 351: 453-456.
16. Vogelstein B, Kinzler K. p53 Function and Dysfunction. Cell: 1992; 70: 523-526.
17. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in cellular response to DNA damage. Cancer Res 1991; 51: 6.304-6.311.
18. Zambetti G, Bargonetti J, Walker K, Prives C, Levine AJ. Wild-type p53 mediates positive regulation of gene expression through a specific DNA sequence element. Genes Dev 1992; 6: 1.143-1.152.
19. Kern SE, Pieterpol JA, Thiagalingam S, Seymour A, Kinzler KW, Vogelstein B. oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. Science 1992; 256: 827-830.
20. Greenblatt MS, Bennett WP, Holstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res 1994; 54: 4.855-4.878.
21. Dalbagni G, Presti JC, Reuter VE, Zhang ZF, Fair WR, Cordon-Cardo C. Molecular genetic alterations of chromosome 17 and p53 nuclear overexpression in human bladder cancer. Diag Mol Pathol 1993; 2: 4-14.
22. Cordon-Cardo C, Dalbagni D, Sáez GT, Oliva MR, Zhang Z-F, Rosai J, et al. TP53 mutations in human bladder cancer: genotypic versus phenotypic patterns. Int J Cancer 1994; 56: 347-353.
23. Sarkis A, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Sheinfeld J, Herr H, Zhang ZF et al. Detection of p53 mutations in superficial (T1) bladder carcinomas as a marker of disease progression. JNCI 1993; 85: 53-59.

24. Sarkis AS, Zhang Z-F, Cordon-Cardo C, Melamed J, Dalbagni G, Sheinfeld J, et al. p53 nuclear overexpression and disease progression in Ta bladder carcinoma. *Int J Oncol* 1993; 3: 355-360.
25. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Melamed J, Zhang Z-F, Sheinfeld J, et al. Association of p53 nuclear overexpression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. *J Urol* 1994; 152: 388-392.
26. Sarkis AS, Bajorn DF, Reuter VE, Herr HW, Netto G, Zhang Z-F, Schultz PK, Cordon-Cardo C, Scher HI: The prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant M-VAC. *J Clin Oncol* (em prensa).
27. Cordon-Cardo C. Immunohistochemical analysis of P-glycoprotein expression in human normal and tumor tissues, in *Molecular and Cellular Biology of Multidrug Resistance in Tumor Cells*, Ed. I. Roninson, Plenum Publishing Corporation, 1991.
28. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Grauer LR, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR. Multidrug resistance gene (MDR1) P glycoprotein is expressed by endothelial cell at blood brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1989; 86: 695-698.
29. Lipponen PK. Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in transitional-cell bladder cancer and its prognostic value. *Int J Cancer* 1989; 53: 365-370.
30. Soini Y, Turpeenniemi-Hujanen T, Kamel D, Auto-Harjainen H, Risteli J, Risteli L, Nuorva K, Paakko P, Vahakangas K: p53 immunohistochemistry in transitional cell carcinoma and dysplasia of the urinary bladder correlates with disease progression. *Br J Cancer* 1993; 68: 1029-1035.
31. Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen S-C, Nichols PW, Skinner DG, Jones PA, Cote RJ. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med* 1994; 331: 1259-1264.
32. Thor AD, More DH II, Edgerton SM, Kawasaki ES, Reihnsaus E, Lynch HT, Marcus JN, Schwartz L, Chen L-C, Maya B, Smith HS. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 845-855.
33. Allred DC, Clark GM, Elledge R, Fuqua SAW, Brown RW, Chamness GC, Osborne CK, McGuire WL: Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 200-206.
34. Drobnjak M, Cote RJ, Drudis T, Cordon-Cardo C. P53 and RB expression in breast cancer: correlations with hormone receptor and lymph node status. *Int J Oncol* 1993; 2: 173-178.
35. Zeng Z-S, Sarkis AS, Zhang Z-F, Klimstra DS, Charytonowicz E, Guillem JG, Cordon-Cardo C, Cohen AM: p53 nuclear overexpression: An independent predictor of survival in lymph node-positive colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 1994; 12: 2043-2050.
36. Remvikos Y, Tomainigo O, Hammel P et al. Increased p53 protein content of colorectal tumors correlates with poor survival. *Br J Cancer* 1992; 66: 758-764.
37. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248: 76-79.
38. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transcription. *Cell* 1992; 69: 1237-1245.
39. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53 associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; 358: 80-83.
40. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994; 266: 1821-1828.
41. Lianes P, Orlow I, Zhang ZZ, Oliva MR, Sarkis AS, Reuter VE, Cordon-Cardo C. Altered patterns of MDM2 and TP53 expression in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1325-1330.
42. Cordon-Cardo C, Latres E, Drobnjak M, Oliva MR, Pollack D, Woodruff JM, Marechal V, Chen J, Brennan MF, Levine AJ. Molecular abnormalities of MDM-2 and P53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1994; 54: 794-799.
43. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820-823.
44. Friend SH, Horowitz JM, Gerber MR, Wang XF, Gohennann E, Li TP, Weinberg RA. Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9059-9063.
45. DeCaprio JA, Ludlow JW, Lynch D, Furukawa Y, Griffin J, Pivnick Worms H, Huang CM, Livingston DM. The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell* 1989; 58: 1085-1095.
46. Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 1991; 65: 1053-1061.
47. Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, Friend SH, Raybuck M, Weinberg RA, Harlow E. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1988; 334: 124-129.
48. Dyson H, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 243: 934-937.
49. Cordon-Cardo C, Wartinger D, Petrylak D, Dalbagni G, Fair WR, Fuks Z, Reuter VE: Altered expression of the retinoblastoma gene product as predictor of outcome in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1251-1256.
50. Logothetis CJ, Xu H-J, Ro JY, Hu SX, Sahin A, Ordonez N, Benedict WF. Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1256-1261.
51. Orlow I, Lianes P, Lacombe L, Dalbagni G, Reuter VE, Cordon-Cardo C. Chromosome 9 deletions and microsatellite alterations in human bladder tumors. *Cancer Res* 1994; 54: 2848-2851.
52. Weaver-Feldhaus J, Gruis NA, Neuhausen S, Le Pasier D, Stockert E, Skolnick MH, Kamb A. Localization of a putative tumor suppressor gene by using homozygous deletions in melanomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7563-7567.
53. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q: A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264: 436-440.
54. Kamb A, Liu Q, Harshman K, Tawgian S, Cordon-Cardo C, Skolnick MH. Rares of p16 (MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss. *Science* 1994; 415-417.
55. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; 366: 704-707.
56. Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Frye C, Orlow I, Lacombe L, Ponce-Castaneda V, Lianes P, Latres E, Skolnick M, Cordon-Cardo C, Kamb A: The MTS1 and TP53 genes may involve separate pathways of tumorigenesis. *Am J Pathol* (em prensa).
57. Hannon GJ, Beach D. p15^{INK4} is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest. *Nature* 1994; 371: 257-261.
58. Orlow I, Lacombe L, Hannon GJ, Serrano M, Dalbagni G, Pelicer I, Reuter VE, Zhang Z-F, Beach D, Cordon-Cardo C. Deletion of p16 (INK4A/MTS1) and p15 (INK4B/MTS2) in human bladder tumors. Submitted for publication.
59. Draetta G, Beach D. Activation of cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle dependent phosphorylation and subunit rearrangement. *Cell* 1988; 54: 17-26.
60. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994; 79: 551-555.
61. Nurse P. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 1994; 79: 547-550.
62. Lamme GA, Peters G. Chromosome 11q13 abnormalities in human cancer. *Cancer Cells* (Cold Spring Harbor) 1991; 3: 413-420.
63. Gillet C, Ranti V, Smith R, Fischer C, Bartek J, Dickson C, Barnes D, Peters G. Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res* 1994; 54: 1812-1817.
64. Jares P, Fernández PL, Campo E, Nadal A, Bosch F, Aiza G, Noyach I, Traseria J, Cardesa A: PRAD-1/cyclin D1 gene amplification correlates with messenger RNA overexpression and tumor progression in human laryngeal carcinomas. *Cancer Res* 1994; 54: 4813-4817.
65. Reifenberger G, Reifenberger J, Ichimura K, Meltzer PS, Collins VP. Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2. *Cancer Res* 1994; 54: 4299-4303.
66. Peter M, Herskowitz I: joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell* 1994; 79: 181-184.
67. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D: p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; 366: 701-704.
68. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lind D, Mercer WF, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1994; 75: 817-825.
69. Mori T, Miura K, Aoki T, Nishihira T, Mori S, Nakamura Y. Frequent somatic mutation of the MTS1/CDK4 (multiple tumor suppressor/cyclin dependent kinase 4 inhibitor) gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54: 3396-3397.
70. Caldas C, Hahn SA, Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE: Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nature Genetics* 1994; 8: 27-32.
71. Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, Collins P, CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK 4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res* 1994; 54: 6321-6324.

72. Hussussian CJ, Struwing JP, Goldstein AM, Higgins PAT, Ally DS, Sheahan MD, Clark Jr. WH, Tucker MA, Dracopoli NC: Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nature Genetics* 1994; 8: 15-21.
73. Polyak K, Kato J-Y, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A: p27^{kip1}, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes & Develop* 1994; 8: 9-22.
74. Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994; 78: 67-74.
75. Ponce-Castaneda MV, Lee M-H, Latres E, Polyak K, Lacombe L, Montgomery K, Mathew S, Krauter K, Sheinfeld J, Massague J, Cordon-Cardo C: p27^{kip1}: Chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors. *Cancer Res* 1995; 55: 1.211-1.214.
76. Pietenpol JA, Bohlender SK, Sato Y, Rowley JD, Papadopoulos N, Liu B, Friedman C, Trask BJ, Roberts JM, Kinzler KW, Vogelstein B. Assignment of human p27^{kip1} gene to 12p13 and its analysis in leukemias. *Cancer Res* 1995; 55: 1.206-1.210.
77. Bullrich F, MacLachlan TK, Sang N, Druck T, Veronese ML, Allen SL, Chiorazzi N, Koff A, Huebner K, Croce CM, Giordano A: Chromosomal mapping of members of the cdk2 family of protein kinases, cdk3, cdk6, P15^{INK4} and P16^{INK4} and cdk inhibitor, p27^{kip1}, to regions involved in human cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 1.199-1.205.
78. Guan K-L, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y: Growth suppression by p18, a p16^{INK4}- and p124^{INK4}-related CDK6 inhibitor, correlates with wild type pRB function. *Genes & Develop* 1994; 8: 2.939-2.952.

Tumors de bufeta urinària

L'estat de coneixements actual permet d'afirmar que dos tumors morfològicament similars poden comportar-se amb patrons biològics d'agressivitat radicalment oposada. L'autor es basa en la història natural del carcinoma transicional de bufeta, així com en les alteracions moleculars reconegudes en les esmentades lesions, per a proposar un nou model de progressió tumoral. Aquest model incorpora rutes divergents que defineixen tumors de baix estadi papil·lars superficials enfront de tumors plans (carcinoma *in situ*). En el primer cas, les alteracions consisteixen en desbalanços proliferatius, però els mecanismes de control no permeten l'expressió desmesurada d'un fenotip biològicament agressiu; en el segon cas, es produeixen mutacions de gens reguladors essencials que permeten l'acumulació d'altres aberracions, que proporcionen un alt grau d'inestabilitat gènica i afavoreixen l'expressió d'un fenotip altament invasiu. Al mateix temps, s'estan desenvolupant tècniques de laboratori que detecten marcadors biològics que es correlacionen amb el comportament dels tumors, fet que ens proporcionarà noves guies per al diagnòstic primerenc i per al disseny de règims terapèutics.

Tumores de vejiga urinaria

El estado de conocimientos actual permite afirmar que dos tumores morfológicamente similares pueden comportarse con patrones biológicos de agresividad radicalmente opuestos. El autor se basa en la historia natural del carcinoma transicional de vejiga, así como en las alteraciones moleculares reconocidas en dichas lesiones, para proponer un nuevo modelo de progresión tumoral. Este modelo incorpora rutas divergentes que definen tumores de bajo estadio papilares superficiales frente a tumores planos (carcinoma *in situ*). En el primer caso, las alteraciones consisten en desbalances proliferativos, pero los mecanismos de control no permiten la expresión desmesurada de un fenotipo biológicamente agresivo; en el segundo caso, se producen mutaciones de genes reguladores esenciales que permiten la acumulación de otras aberraciones, que proporcionan un alto grado de inestabilidad génica y favorecen la expresión de un fenotipo altamente invasivo. Al mismo tiempo, se están desarrollando técnicas de laboratorio que detectan marcadores biológicos que se correlacionan con el comportamiento de los tumores, lo cual proporcionará nuevas guías para el diagnóstico temprano y para el diseño de regímenes terapéuticos.

Urinary bladder tumors

Current understanding indicates that two morphologically similar tumors may display patterns of biological behavior that involve radically different levels of aggressivity. The author proposes a new model of tumor progression based on the natural history of transitional carcinoma of the bladder as well as on known molecular changes involved in such lesions. The new model contemplates distinct pathways that define low-stage superficial papillary tumors and flat tumors (carcinoma *in situ*). In the first type, alterations consist of proliferative imbalances, but control mechanisms inhibit excessive expression of a biologically aggressive phenotype. In the second type, mutations take place in essential regulatory genes, allowing additional aberrations to accumulate and produce a high degree of genetic instability, favoring the expression of a highly invasive phenotype. Laboratory techniques are being developed to detect biological markers related to tumor behavior, to provide new guidelines for early diagnosis and the design of therapeutic protocols.

BIOLOGIA MOLECULAR DEL CÀNCER DE PÀNCREES

Gabriel Capellà i Félix Lluís*

El càncer es pot considerar com una malaltia genètica de les cèl·lules somàtiques¹. La transformació neoplàsica és el resultat de l'acumulació de diverses alteracions genètiques que comporten l'activació d'oncogens i la inactivació de gens supressors tumorals². Els oncogens són les formes activades de gens (protooncogens) que juguen un paper important en el control de la proliferació i la diferenciació cel·lular normal. La seva activació condiciona l'aparició de la neoplàsia de forma dominant. Els gens supressors tumorals regulen de forma negativa aquests processos i és l'absència de la seva funció, la seva inactivació, la que permet el desenvolupament de la neoplàsia. Són diverses les alteracions genètiques (per exemple, translocacions, amplificacions, delecions, mutacions puntuals) que poden donar com a resultat l'activació dels oncogens o en la inactivació dels gens supressors tumorals. Les mutacions puntuals (els canvis en la seqüència d'un sol parell de bases) són les que es troben amb una freqüència superior; a més, són les més subtils i, per tant, les més difícils de detectar.

El càncer de pàncrees (des d'ara, CP) exocrí és una neoplàsia freqüent en el nostre medi. La supervivència mitjana després del diagnòstic és de 6 mesos, i no ha variat en els últims 30 anys, fet pel qual, en l'actualitat, el CP és la quarta causa de mort per càncer en el món occidental³. En els últims anys s'ha començat a definir un perfil molecular multiseqüencial per a la tumorigènesi pancreàtica ductal en el qual es troben activats gens amb diferents funcions en el control de la diferenciació i la proliferació cel·lular. Així, el receptor per al factor de creixement epidèrmic (*epidermal growth factor receptor*) es troba sobreexpressat en molts d'aquests tumors⁴. A més, la majoria dels carcinomes del pàncrees exocrí (60-100%) contenen mutacions en el gen *K-ras*⁵, implicat en la traducció de senyals iniciada per aquest receptor. Dos gens supressors (*p53* i *p16*) que tenen un paper central en el control de la fase G1 del cicle cel·lular es troben inactivats en la majoria d'aquests tumors. El 30-70% dels CP tenen el gen *p53* inactivat^{6,7} i en el 80% dels casos⁸ el gen supressor *p16* no és funcional. Al-

tres vies que normalment inhibeixen el creixement de la cèl·lula normal també es troben alterades. Recentment, s'ha identificat un gen supressor localitzat en el cromosoma 18, el gen *DPC4*, que està implicat en el senyal de traducció iniciada pel factor inhibidor del creixement TGF- β , que està mutat en el 30% dels tumors pancreàtics⁹. Altres gens implicats en aquesta via de traducció i que contribueixen al control del cicle cel·lular (per exemple, *p15*) es troben alterats en un altre subgrup d'aquests tumors. L'objecte d'aquest manuscrit és revisar, de forma breu, algunes de les alteracions genètiques més rellevants en el càncer de pàncrees així com la utilitat de la detecció d'aquestes alteracions en la pràctica clínica.

Oncogen *K-ras*. Els tres membres de la família de protooncogens *ras* (*c-H-ras*, *N-ras*, *c-K-ras*) són els oncogens més freqüentment activats en tumors humans. Són gens altament conservats al llarg de l'evolució que codifiquen proteïnes de 185-186 aminoàcids lligats a la membrana (*p21*). Aquestes proteïnes, que posseeixen una alta afinitat per GTP i GDP, actuen com a mediadores del senyal entre receptors tirosina cinasa de la superfície cel·lular i la cascada de serina treonina cinasa i activen l'expressió de factors nuclears fonamentals en la regulació de la proliferació i la diferenciació cel·lulars. La translocació de les proteïnes *Ras* a la cara interna de la membrana plasmàtica és un factor crític a l'hora de poder realitzar la seva activitat biològica. L'associació amb la membrana és conseqüència de tres modificacions posteriors a la traducció (farnesilació, proteòlisi i carboximetilació). Aquestes modificacions augmenten la hidrofobicitat de les proteïnes i promouen la interacció específica entre les proteïnes *Ras* i les seves proteïnes reguladores.

El potencial maligne d'aquests oncogens s'activa per mitjà de mutacions puntuals (canvis d'una sola base) en els codons 12, 13 i 61, que condicionen canvis d'un sol aminoàcid en la seqüència de la proteïna. Aquestes mutacions motiven que les proteïnes quedin activades de forma constitutiva unida a GTP. Estudis previs han demostrat que la majoria (70-90%) dels carcinomes de pàncrees exocrí en l'home contenen una mutació en el codó 12 del gen *c-K-ras* (revisat en 5). Aquesta mutació es dona en els estadis precoços i tardans de la tumorigènesi pancreàtica. L'alta incidència de mutacions en els tumors del pàncrees exocrí suggereix que aquesta alteració podria ser

*Laboratori d'Investigació Gastrointestinal, Institut de Recerca, Hospital de Sant Pau, Barcelona

útil, a nivell clínic, com a marcador molecular tumoral a nivell tissular¹⁰. Tot i així, la detecció de l'alteració en lesions de potencial maligne no conegut (per exemple, hiperplàsia de cèl·lules mucinoses) n'ha qüestionat la utilitat¹¹.

El receptor per al factor de creixement epidèrmic (EGFR). Els factors de creixement regulen, entre altres funcions, la proliferació cel·lular per mitjà de la unió complexa amb receptors específics en la membrana cel·lular. Aquests receptors posseeixen una porció extracel·lular que s'uneix al lligand, una altra de transmembranosa que l'ancora a la cèl·lula i una de tercera intracel·lular, que en molts casos té activitat tirosina cinasa. Comparteixen aquestes característiques els receptors per al factor de creixement epidèrmic (*epidermal growth factor* o EGF), el factor de creixement dels fibroblasts (*fibroblast growth factor* o FGF), i el factor de creixement derivat de les plaquetes (*platelet-derived growth factor* o PDGF), a més de dos receptors més relacionats amb l'EGF denominats c-erb B-2 i c-erb B-3. El receptor per a EGF és una proteïna important que controla nombrosos processos biològics en la cèl·lula ductal pancreàtica. L'EGF i el factor de creixement transformador alfa (*transforming growth factor-alfa* o TGF- α) són els seus dos lligands més ben coneguts. L'EGFR sembla jugar un paper important en el càncer de pàncrees en trobar-se sobreexpressat en el 30-50% dels tumors primaris i de línies cel·lulars tumorals pancreàtiques. A més, aquesta sobreexposició s'ha trobat en les cèl·lules ductals presents en espècimens de pacients afectats de pancreatitis crònica. Mentre que el nivell d'expressió d'EGFR és baix en la cèl·lula pancreàtica normal, en cèl·lules tumorals existeix la sobreexposició simultània d'EGF/TGF α i d'EGFR, fet que suggereix l'existència d'una estimulació autocrina en aquestes cèl·lules tumorals⁶. Encara es desconeix de quina manera la sobreexposició de l'EGFR contribueix a la promoció i el desenvolupament neoplàsic¹. L'amplificació gènica i el reordenament del locus EGFR són alteracions freqüents en alguns tumors. Per contra, en el CP, l'amplificació del gen és rara fet pel qual la sobreexposició d'aquest gen és el resultat d'una regulació a l'alça de la seva expressió.

Gen supressor p53. El gen supressor p53 és el gen que amb més freqüència es troba alterat en els tumors humans. La proteïna P53, un factor de transcripció nuclear, desenvolupa un paper molt important en la regulació del cicle cel·lular, ja que promou la parada del cicle cel·lular en la fase G1. Aquesta parada permet a la cèl·lula la posada en marxa dels mecanismes encarregats de reparar els danys produïts en el DNA o, si no n'hi ha, incloure la cascada apoptòtica. D'aquesta manera, impedeix que les alteracions quedin fixades en el genoma de la cèl·lula; per aquests motius, es considera que la proteïna P53 fa un paper de semàfor cel·lular. El dany en el DNA, diferents situacions d'estrès cel·lular i altres estímuls, incrementen l'expressió de la proteïna P53, la qual, de forma directa, induïx la transcripció de diferents gens que codifiquen

proteïnes implicades en el control del cicle cel·lular (per exemple, p21) o en la reparació del DNA (per exemple, GADD45). Les cèl·lules amb la funció p53 alterada o absent no frenen en fase G1 després de l'exposició a diferents agents genotòxics, fet pel qual acumulen múltiples mutacions que poden conduir a la transformació neoplàstica.

El gen p53 necessita que s'inactivin, en la majoria dels casos, les dues còpies del gen. Els mecanismes més freqüents d'inactivació són les mutacions més puntuals i/o les pèrdues al·lèliques. Entre el 30 i el 70% dels carcinomes de pàncrees contenen mutacions en el gen p53^{6,7}. Les mutacions en el gen p53 que amb més freqüència es detecten en els carcinomes de pàncrees (més del 90%) són substitucions de bases (*missense mutations*) que es localitzen en els dominis conservats de la proteïna (exons 5-8) i que comporten la substitució d'un aminoàcid per un altre; aquests canvis poden ser tant transicions (canvi d'una pirimidina per una altra) com transversions (canvi d'una pirimidina per una purina o viceversa). Aproximadament el 30% de totes les mutacions en els tumors de pàncrees són transicions: aquest valor és un punt mig entre l'alta proporció detectada en el càncer de còlon i recte (70%) i la baixa incidència reportada en els carcinomes de pulmó. A diferència dels tumors de còlon i recte, en els tumors de pàncrees existeix una proporció significativa de *mutacions intragèniques frameshift*, la majoria de deleccions que es detecten en regions riques en GpC o homocopolímers⁷.

Gen supressor p16. La progressió durant el cicle cel·lular està regulada per una família de proteïnes complexes: les cinases dependents de ciclines (*cyclin-dependent kinases* o CDKs), que contribueixen a la formació de diversos punts de control o *checkpoints* definits (revisat en 12). Els complexos CDKs estan formats per una subunitat catalítica amb activitat cinasa i una subunitat reguladora anomenada ciclina. En les cèl·lules humanes s'han descrit múltiples CDKs implicades en el control del cicle cel·lular. L'activació de la CDK4 per la ciclina D1 determina la progressió en G1 després de produir-se la hiperfosforilació de la proteïna del retinoblastoma (Rb). El complex CDK2/ciclina E també participa en la fase G1. La progressió en la fase S i l'entrada en la fase M necessita, respectivament, els complexos CDK2/Ciclina A i CDC2/Ciclina B (186, 187). La inactivació de les CDKs pot donar-se per diferents mecanismes com són: regulació a la baixa dels nivells de la proteïna, per fosforilació i defosforilació, o per interacció amb proteïnes inhibidores de cinases dependents de ciclines (*cyclin-dependent inhibitors*, CKIs). Aquestes CKI són un conjunt de proteïnes CDK / ciclines, que inhibeixen així la progressió durant la fase G1. El gen p16 (*p16^{INK4}*, CDK4I, CDKN2 o MTS1) localitzat en el cromosoma 9, 9p21, és un inhibidor específic de les CDK4 i les CDK6. Aquest gen supressor es caracteritza perquè, en moltes ocasions, es produeix la inactivació dels seus dos al·lèls per pèrdua en l'homozigosi. Les dades de què es disposa indiquen que la inactivació del gen p16 és específica de teixit i diversos

tipus de tumors (esòfag, melanomes, carcinomes de pulmó) presenten una alta freqüència de mutacions. A més, s'han detectat alteracions en la línia germinal d'aquest gen en alguns pacients amb melanoma familiar. En el 80% dels adenocarcinomes de pàncrees, així com en línies cel·lulars, s'han detectat alteracions en aquest gen. Mentre que la incidència de mutacions en el gen p16 en carcinomes de pàncrees és molt elevada, existeixen poques evidències d'expressió anormal del producte del gen del retinoblastoma en aquests tumors. Aquesta relació inversa entre l'estat mutacional del p16 i del Rb és lògica, ja que tots dos formen part de la mateixa via de control del cicle cel·lular.

Alteracions en la traducció de senyals de TGF-beta: els gens Smad4 (DPC4) i p15. La resistència a l'acció inhibidora del TGF-beta és una característica comuna a moltes cèl·lules tumorals. Recentment s'ha descrit en el cromosoma 18 (18p21.1) l'existència del gen *Smad4* (DPC4), candidat a gen supressor tumoral, que presenta delecions en homozigosi en el 30 % dels tumors pancreàtics. Aquest gen pertany a la família dels gens *Smad*, proteïnes que juguen un paper fonamental en la via de transmissió del senyal iniciat per la unió del TGFβ1 amb el seu receptor, que posseeix activitat serina treonina cinasa. S'han identificat, com a mínim, tres membres més d'aquesta família de gens en humans dels quals es desconeix si estan alterats en el CP.

El gen supressor p15, un altre gen implicat en la traducció de senyals iniciada per TGF-beta, es troba inactivat en una proporció significativa d'aquests tumors. En resposta a la TGF-beta les concentracions de p15, un inhibidor dels complexos ciclines / CDKs, està elevada. El gen p15 es localitza en la regió 9p21, prop del gen p16. Atès que les delecions homozigòtiques en el gen p16 s'estenen, amb freqüència, fins a la zona del gen p15¹², es pensa que la deleció simultània dels dos gens podria ser molt freqüent. Tot i així, la incidència real d'alteracions en aquest gen encara no ha estat establerta.

Diagnòstic molecular del càncer de pàncrees

La localització retroperitoneal del CP motiva una simptomatologia tardana i, a vegades, inespecífica que en dificulta el diagnòstic. Els mètodes de diagnòstic per la imatge (l'ecografia o la tomografia computada [TC]), que permeten la identificació de masses pancreàtiques, són els que proporcionen una major eficàcia diagnòstica quan se sospita CP. Tan l'ecografia com la TC permeten la punció-aspiració percutània de qualsevol massa pancreàtica i l'obtenció d'un material que possibilita un diagnòstic histològic definitiu en una proporció important d'aquests pacients.

Mutacions en el gen K-ras en punció-aspiració-biòpsia de masses pancreàtiques. El material obtingut per mitjà de pun-

ció-aspiració-biòpsia percutània de tumors pancreàtics és la primera mostra que s'obté d'aquest tumor i, sovint, és l'únic teixit disponible per a realitzar l'estudi histopatològic. Malgrat l'alta sensibilitat de l'examen citològic del material fresc i en bloc cel·lular, el citopatòleg no sempre pot proporcionar un diagnòstic definitiu.

A l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau s'ha analitzat la utilitat de les mutacions en el gen K-ras en el material obtingut de puncions aspiracions pancreàtiques amb guia ecogràfica o TC de masses pancreàtiques en 93 malalts atesos en l'esmentat centre entre gener de 1985 i desembre de 1991 (51 homes, 42 dones; edat mitjana 62,1 + 13,3 anys). El diagnòstic morfològic es va dur a terme per mitjà d'una extensió convencional i bloc cel·lular. Les mutacions en el gen c-K-ras (codon 12) es detecten per mitjà de la tècnica de RELP/PCR que permet de detectar la mutació encara que només sigui present en el 25% dels al·lèls analitzats. El diagnòstic de càncer de pàncrees es va establir si: a) hi havia biòpsia quirúrgica positiva per a carcinomes o tumors amb conegut potencial maligne (per exemple, adenomes), i/o b) mort durant el primer any des del diagnòstic amb evolució clínica compatible amb càncer terminal. El seguiment clínic va ser complet en tots els malalts. En 76 dels 93 malalts (81,7%) es va confirmar l'existència de neoplàsia. En 4 malalts es va diagnosticar tumors endocrins. En 13 casos (17%) el diagnòstic final va ser malaltia no neoplàsica (pancreatitis crònica amb masses quístoses en cinc, quists de desaparició espontània en sis i pseudoquists en dos).

La citologia va identificar cèl·lules malignes en 46 casos sense falsos positius i 43 casos es van dictaminar com a negatius (17 veritables negatius o VN, i 26 falsos negatius o FN, 15 dels quals amb cèl·lules atípiques). Es va poder extreure DNA per a realitzar l'anàlisi de les mutacions en 88 dels 93 casos (94%). La mutació es va detectar en 42 casos (41 carcinomes i 1 cistoadenoma). 46 casos van ser negatius (17 VN i 29 FN). L'anàlisi de la mutació va contribuir al diagnòstic, en confirmar la presència de cèl·lules neoplàsiques, en 15 casos (13,9%): 7 de 15 citologies sospitoses, 3 de 22 citologies negatives i 3 dels 4 casos que el patòleg va considerar no valorables. Aquests resultats, obtinguts d'una sèrie àmplia, suggereixen que la detecció de mutacions en l'oncogen K-ras pot ser útil com a marcador tumoral a nivell tissular, ja que pot millorar l'eficàcia diagnòstica de la citologia en l'anàlisi morfològica de les puncions-aspiracions-biòpsies de masses pancreàtiques, sense falsos positius. Aquesta tècnica estaria indicada quan la citologia mostra la presència de cèl·lules atípiques o aparentment benignes. En la sèrie estesa no s'han detectat mutacions en aspiracions amb hiperplàsia de cèl·lules mucinoses, una entitat patològica de potencial maligne desconegut¹¹ tal com ha estat prèviament descrit en FNA¹² o secrecions pancreàtiques¹². Aquestes diferències poden ser a causa del tipus de població inclòs en els diferents estudis. La interpretació dels resultats de l'anàlisi molecular ha de tenir sempre en compte la resta de la informació clínica del pacient.

Mutacions en el gen K-ras en altres mostres biològiques: suc pancreàtic, sang perifèrica i femtes. El diagnòstic primerenc del CP necessita exploracions més sensibles i entre les que tenen un major potencial destaca l'estudi citològic del suc pancreàtic obtingut durant la colangiopancreatografia retrògrada (CPRE). La sensibilitat de la CPRE amb estudi citològic del suc pancreàtic és del 76% i augmenta fins al 90% quan el tumor està localitzat en el cap de la glàndula. Aquesta tècnica comporta una alternativa diagnòstica en els casos en què no és possible obtenir una punció citològica o una biòpsia del tumor.

La sensibilitat de la CPRE amb estudi citològic del suc pancreàtic es pot també incrementar si es complementa amb l'estudi genètic de la detecció de mutacions del gen K-ras. S'ha avaluat, de forma preliminar, la utilitat diagnòstica de la detecció de mutacions en suc pancreàtic en 28 pacients utilitzant tècniques convencionals. Mentre que la citologia només va identificar cèl·lules malignes en 3 dels 13 carcinomes estudiats, les tècniques convencionals van detectar mutacions en 9 de 13. L'anàlisi molecular va aportar informació clínica addicional i decisiva en dos d'aquests casos. En uns altres dos casos es va detectar la mutació en absència d'una altra evidència de neoplàsia; el seguiment d'aquests pacients ens ajudarà a interpretar aquests resultats. Finalment, en 7 casos de patologia pancreàtica no maligna ni la citologia ni l'anàlisi molecular van obtenir falsos positius.

Quan es tracta de detectar cèl·lules neoplàsiques en presència d'una quantitat important de cèl·lules normals són necessàries tècniques de detecció de major sensibilitat. Amb aquesta finalitat s'han desenvolupat diferents metodologies d'alta sensibilitat per a la detecció de mutacions basada en modificacions de la tècnica original de la PCR o en la combinació de tècniques de detecció de mutacions amb immunoextracció de cèl·lules tumorals. Utilitzant aquestes tècniques d'alta sensibilitat en suc pancreàtic s'ha millorat la sensibilitat al diagnòstic fins al 90%. Tot i així, es detecten les mutacions en una proporció elevada (3 de 7) de pacients diagnosticats de pancreatitis crònica. L'especificitat de les mutacions en els gens *ras* per al teixit tumoral ha estat qüestionada per la detecció de mutacions en secrecions pancreàtiques de pacients amb hiperplàsia de cèl·lules mucinoses, una entitat clinicopatològica associada a la pancreatitis crònica i el potencial maligne de la qual és encara desconegut. En aquests pacients, la detecció de mutacions no és indicativa de malaltia neoplàsica. Tot i així, és possible que ens proporcioni informació sobre el subgrup de pacients afectats de pancreatitis crònica que presenten un risc augmentat de desenvolupar neoplàsia. Finalment és important de recordar que per mitjà d'aquestes tècniques ha estat possible de detectar mutacions en mostres obtingudes de forma no invasiva: s'han detectat mutacions en cèl·lules circulants en sang perifèrica, i fins i tot en plasma de pacients afectats de càncer de pàncrees fet que obre la possibilitat de confirmar el diagnòstic de neoplàsia de

pàncrees en presència de masses pancreàtiques sense necessitat de practicar una punció¹³. A més, és possible de detectar aquestes mutacions en cèl·lules exfoliades del conducte pancreàtic identificades en les femtes d'aquests pacients, fet que constitueix una nova opció per al diagnòstic no invasiu¹⁴.

En resum, la detecció de mutacions en el gen K-ras ha obert el camí del diagnòstic molecular del càncer de pàncrees: a) pot complementar el diagnòstic citològic clàssic en el material obtingut per mitjà de punció-aspiració-biòpsia de masses pancreàtiques; b) permet, en un subgrup d'aquests pacients, un diagnòstic precoç del càncer de pàncrees; c) és la primera alternativa real al diagnòstic no invasiu de la malaltia per mitjà de la detecció de mutacions en sang perifèrica. Finalment, és important de recordar que aquests estudis estan en constant evolució i que les mutacions, en un determinat context clínic, poden no estar indicant la presència de neoplàsia (benigna o maligna), sinó que poden permetre la identificació d'aquells pacients amb pancreatitis crònica amb un risc superior de desenvolupar carcinomes de pàncrees.

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. Stoler AB. Genes and Cancer. *Br Med Bull* 1991; 47: 64-75.
2. Fearon E, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
3. Silverberg E, Lubera JA. Cancer statistics 1989. *Ca-A Cancer Journal for clinicians* 1989; 39: 3-20.
4. Korc M, Chandrasekar B, Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, Beger HG. Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer: is associated with concomitant increases in the levels of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *J Clin Invest* 1992; 90: 1352-1360.
5. Shibata D, Capellà G, Peruchio M. Mutational activation of the K-ras gene in human pancreatic carcinoma. *Baillière's Clin Gastroenterol* 1991; 4: 151-159.
6. Scarpa A, Capelli P, Mukai K, Zamboni G, Uda T, Iacono C et al. Pancreatic carcinomas frequently show p53 gene mutations. *Am J Pathol* 1993; 142: 1534-1543.
7. Redston MS, Caldas C, Seymour AB, Hruban RH, da Costa LT, Yeo CJ et al. p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res* 1994; 54: 3025-3033.
8. Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB et al. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 1994; 8: 27-32.
9. Han SA, Schutte M, Shamsul Hoque ATM, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozemblum E et al. Smad4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996; 271: 350-353.
10. Villanueva A, Reyes G, Cuatrecasas M, Martínez A, Enll N, Lerma F et al. Diagnostic utility of K-ras mutations in fine needle aspirates of pancreatic masses. *Gastroenterology* 1996; 110: 1587-1598.
11. Yanagisawa A, Ohkate K, Ohashi K, Hori M, Kitagawa T, Sugano H et al. Frequent c-Ki-ras oncogene activation in mucous cell hyperplasias of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Res* 1993; 53: 953-956.
12. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1994; 267: 1672-1677.
13. Tada M, Omata M, Kawai S, Saisho H, Ohto M, Saiki RK et al. Detection of ras gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1993; 53: 2472-2474.
14. Caldas C, Hahn SA, Hruban RH, Redston MS, Yeo CJ, Kern SE. Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Res* 1994; 54: 3568-3573.

CÁNCER DE PÁNCREES

La detecció de mutacions en el gen *K-ras* ha obert el camí del diagnòstic molecular del càncer de pàncrees: *a)* pot complementar el diagnòstic citològic clàssic en el material obtingut per mitjà de punció-aspiració-biòpsia de masses pancreàtiques; *b)* permet, en un subgrup d'aquests pacients, un diagnòstic primerenc del càncer de pàncrees; *c)* és la primera alternativa real al diagnòstic no invasiu de la malaltia per mitjà de la detecció de mutacions en sang perifèrica. Es recorda que aquests estudis estan en constant evolució i que les mutacions, en un determinat context clínic, poden no estar indicant la presència de neoplàsia (benigna o maligna), sinó que poden permetre la identificació d'aquells pacients amb pancreatitis crònica amb un risc superior de desenvolupar carcinomes de pàncrees.

CÁNCER DE PÁNCREAS

La detección de mutaciones en el gen *K-ras* ha abierto el camino de diagnóstico molecular del cáncer de páncreas: *a)* puede complementar el diagnóstico citológico clásico en el material obtenido mediante punción aspiración-biopsia de masas pancreáticas; *b)* permite, en un subgrupo

de estos pacientes, un diagnóstico temprano del cáncer de páncreas, y *c)* es la primera alternativa real al diagnóstico no invasivo de la enfermedad mediante la detección de mutaciones en sangre periférica. Se recuerda que estos estudios están en constante evolución y que las mutaciones, en un determinado contexto clínico, pueden no estar indicando la presencia de neoplasia (benigna o maligna), sino que pueden permitir la identificación de aquellos pacientes con pancreatitis crónica con un mayor riesgo de desarrollar carcinomas de páncreas.

CANCER OF THE PANCREAS

The detection of *K-ras* gene mutations opened the way toward the molecular diagnosis of pancreatic cancer. Molecular diagnosis *a)* can be used to complement traditional cytologic diagnosis of specimens obtained by needle or aspiration biopsy of pancreatic masses, *b)* allows early diagnosis of pancreatic cancer in some patients, and *c)* is the first truly non invasive diagnostic alternative for this disease, based on detecting mutations in peripheral blood. Research is evolving continuously and mutations in a specific clinical setting may not indicate the presence of neoplasia (benign or malignant) but rather may screen for patients with chronic pancreatitis or greater risk of developing carcinoma of the pancreas.

BASES MOLECULARS DEL CÀNCER DE MAMA

Pedro L. Fernández*

El carcinoma mamari és un problema mèdic d'especial rellevància en el nostre entorn, no només per la seva incidència sinó també per les connotacions personals i socials que implica. Això ha portat al fet que s'hagi incrementat l'esforç investigador per a intentar de descobrir-lo el més precoçment possible i a tractar-lo de la manera més efectiva. Noves tècniques analítiques i d'imatge, i innovadors règims quimioteràpics i radioteràpics, han produït un gran avenç en aquest sentit. Però no hi ha dubte que per a progressar en el coneixement d'aquest i d'altres processos neoplàstics s'ha de buscar el coneixement dels més íntims processos cel·lulars alterats en la neoplàsia, que és on la investigació bàsica estableix els fonaments per a avanços en altres camps.

Avui se sap que existeixen alteracions moleculars a diferents nivells i en diferents aspectes biològics de la cèl·lula. Per exemple, coneixem que gran part de l'agressivitat de les cèl·lules malignes depèn de la seva capacitat per a interaccionar amb la matriu extracel·lular (MEC) i que això ho aconsegueix desenvolupant mecanismes d'ancoratge (receptors de membrana) i sistemes enzimàtics de degradació d'aquesta MEC (metalloproteinases, catèpsines, etc.). Però és ben conegut que una de les característiques bàsiques de les cèl·lules neoplàstiques és la seva gran capacitat de proliferació i si s'anàlitzem les alteracions genètiques que contínuament es descriuen en aquestes cèl·lules (oncogens, gens supressors) resulta evident que la majoria d'elles afecten els mecanismes reguladors del cicle cel·lular o els gens que controlen la mort cel·lular programada (apoptosi).

Mecanismes reguladors del cicle cel·lular

El control del cicle cel·lular i, per tant, de la proliferació es deu a un sistema complex de reguladors que actuen en diferents fases de l'esmentat control. Un dels moments més importants del cicle cel·lular és el de la decisió d'avançar des de la fase premitòtica G1 a la fase de síntesi (fase S) i començar la duplicació del material genètic. Segons estudis recents, un dels reguladors negatius crítics en aquest punt és el producte del gen de la susceptibilitat al retinoblastoma (Rb), la inactivació homozigòtica del qual, segons el model de Knudson¹,

podria alliberar la proliferació cel·lular i permetria el desenvolupament neoplàstic. És per això que es considera un gen supressor. El Rb és expressat per tots els teixits, la seva quantitat no sembla variar durant el cicle cel·lular; la seva activitat inhibidora és inversa al seu estat de fosforilació; per tant, la forma hipofosforilada és la que exerceix l'acció inhibidora sobre la progressió del cicle cel·lular². El grau de fosforilació del Rb és al seu torn regulat per un complex de diverses proteïnes la influència del qual l'augmenta i, per tant, en disminueix l'activitat. El complex abans esmentat el conformen les cinases ciclíniques independents (cdks), les ciclíniques de tipus D, l'antigen nuclear de cèl·lules proliferants (PCNA) i, probablement, altres reguladors recentment descoberts com ara el p16 (MTS1) i el p21 (WAF1)³. Aquests dos últims semblen actuar inhibint la capacitat fosforilativa del complex cdk/ciclina D/PCNA, fet pel qual també es consideren gens supressors. En canvi, un increment de l'activitat de la ciclina D1, integrant del complex i actualment considerada un regulador amb capacitat oncogènica⁴, és capaç d'induir una acceleració del cicle cel·lular. Però l'anterior esquema d'efectes resulta en excés simplista a causa de la probable existència entre ells de retroalimentació (*regulatory loops*) que permeten l'activitat moduladora recíproca. Aquest és el cas del Rb, l'activitat de la qual és controlada per cdk/D1 de la forma abans esmentada i que, al seu torn, sembla intervenir regulant l'estabilitat d'aquest complex⁵.

Alteracions de qualsevol d'aquests i d'altres reguladors del sistema de control del cicle cel·lular són potencials causes de proliferació incontrolada i, per tant, de desenvolupament neoplàstic.

Control de l'apoptosi cel·lular

L'apoptosi o "mort cel·lular programada" és un procés fisiològic que regula la població cel·lular en els teixits normals i neoplàstics, i l'alteració de la qual podria donar lloc també a una acumulació cel·lular anòmla. El p53 és un gran supressor alterat amb freqüència en un gran nombre de càncers humans⁶ i sembla actuar com a inductor de l'apoptosi en cèl·lules el DNA de les quals ha estat danyat⁷, fet que podria compensar alteracions del Rb que portin a la proliferació cel·lular incontrolada⁸. A més, el p53 sembla exercir un important paper en la regulació del cicle cel·lular, que podria estar mitjançat per la proteïna p21 l'expressió de la qual controla, i que la faria estar en l'en-

*Departament d'Anatomia Patològica
Hospital Clínic, Barcelona

creuament entre els dos mecanismes que controlen la població de cèl·lules dels teixits.

Un altre gen relacionat amb l'apoptosi és el *bcl-2*, l'activació del qual es va descobrir inicialment en limfomes foliculars i que ocorria per una translocació (14:18)¹⁷. L'expressió de la proteïna codificada per aquest gen inhibeix l'apoptosi cel·lular; s'ha plantejat, a més, que l'activitat apoptòtica de p53 estaria mitjançada per una inhibició de *bcl-2*¹³.

Alteracions de gens reguladors de la proliferació cel·lular en tumors mamaris

En els últims anys s'han descrit alteracions en la majoria dels gens abans esmentats en tumors de diferents òrgans, entre ells la mama, i probablement tindran una estreta relació amb el desenvolupament de les seves neoplàsies.

Se sap que en carcinomes mamaris existeixen fortes mutacions i delecions del gen *Rb* i del p53, així com activació del *bcl-2*^{13,15}. El significat pronòstic o terapèutic de les alteracions de *Rb* en tumors mamaris no és clar encara, si bé s'ha pogut comprovar que es relaciona amb una activitat proliferativa tumoral significativament augmentada¹⁶. L'expressió immunohistoquímica de p53, a causa de l'existència d'un producte anòmal i inactiu d'aquest gen, s'ha valorat per alguns com a factor de pronòstic de mala evolució¹⁷. Sembla ser que la inactivació d'aquest gen supressor podria ser clau en els primers moments de la transformació neoplàsica mamària en immortalitzar les cèl·lules i permetre l'acumulació posterior d'anomalies genètiques. L'expressió tumoral de *bcl-2* s'ha correlacionat amb una millor resposta al tractament hormonal¹⁸. De la mateixa manera, s'han observat anomalies en forma d'amplificació gènica i sobreexpressió de la ciclina D1 en un percentatge significatiu de tumors mamaris, amb possibles repercussions pronòstiques^{19, 20}. S'ha hipotetitzat fins i tot que la sobreexpressió d'aquest gen podria ser un possible mecanisme de resistència al tractament antiestrogènic. Atès que els nivells basals de la ciclina D1 estan probablement subjectes a la inducció estrogènica²¹, el tractament antiestiroideu és probable que exerceixi una funció antiproliferativa en disminuir-los. En aquells casos en què el gen d'aquesta ciclina estigui sobreexpressat, per exemple per l'amplificació, l'augment d'aquest estimador de proliferació cel·lular sobrepassaria la capacitat de bloqueig del tractament²². Recentment, s'ha plantejat, a més, que la sobreexpressió del gen de la ciclina D1 podria ser el mediador en alguns casos, com en línies cel·lulars murines d'epiteli mamari transformat, de l'acció del oncogen *ras*²³, fet amb el qual aquest regulador del cycle cel·lular podria situar-se en l'encreuament de diversos mecanismes oncogènics.

Més escassa és la informació que es disposa dels gens supressors p16 i p21. Recentment s'ha descrit la freqüent delecció homozigòtica del primer en línies cel·lulars de múltiples ti-

pus de carcinomes, entre ells el de mama, així com en tumors primaris^{22, 24}, mentre que els coneixements sobre alteracions de p21 pràcticament es limiten a estudis *in vitro*^{5, 11}.

Un altre oncogen que fa anys va despertar gran interès com a predictor d'agressivitat biològica en càncers mamaris va ser el *neu* (*c-erbB2*). La proteïna codificada per aquest gen es localitza en la membrana de les cèl·lules i sembla estar relacionada amb la motilitat cel·lular en expressar-se en els pseudòpodes i, més indirectament, amb la proliferació. Inicialment es va postular que la seva sobreexpressió en carcinomes axil·lars sense metàstasi podria detectar una població que necessita una agressivitat terapèutica superior, però avui es pensa que no serveix per a predir de forma independent d'altres paràmetres. Més recentment, es planteja que la seva determinació podria ser útil per a predir la resposta a certs tractaments (veure revisió a 25).

El gen *BRCA1* sembla intervenir en el 80-90% de casos de càncer d'ovari i mamaris familiars, en els quals actua com a un gen supressor que està alterat en línia germinal d'aquests pacients. El *BRCA2* es comporta de manera similar, però a més es veu alterat en casos esporàdics i en carcinomes de mama masculins. La possibilitat de detectar aquestes anomalies en membres de famílies amb aquest tipus de càncers s'ha plantejat insistentment, però un triatge sistemàtic és encara prematur, atès que es plategen problemes pràctics a causa de la mesura i la varietat de possibles mutacions dels gens esmentats, les quals no totes són de significat conegut²⁶⁻²⁸.

Hipòtesis i perspectives en l'estudi dels mecanismes reguladors del cycle cel·lular

Atès que l'estudi dels mecanismes carcinogènics *in vivo* és als seus inicis, encara manca una visió global de les alteracions d'aquest complex sistema regulador en neoplàsies humanes. Es desconeix, per tant, si les anomalies fins ara descrites en neoplàsies mamàries i que afecten a diferents moduladors del cycle cel·lular, són suficients per se per a la transformació i la progressió neoplàsica o, com se sospitava, coincideixen i cooperen en aquest procés escalonat des de les lesions hiperplàsiques a les lesions preinvasives (carcinoma *in situ*) i invasives. De forma resumida, es creu que la primera fase de la transformació neoplàsica, tant en carcinomes mamaris com en d'altres models tumorals, consistiria en la inactivació de gens supressors (*Rb*, p53, *BRCA1*, *BRCA2*) que, sense produir canvis somàtics, donarien lloc a una proliferació incontrolada i a una inestabilitat genètica (gran freqüència d'altres anomalies per pèrdua dels mecanismes de control de la integritat genòmica). Aquesta primera fase estaria facilitada en aquells subjectes que ja hereten anomalies d'algun gen supressor en les seves cèl·lules normals (línia germinal). La sumació d'altres alteracions com l'activació oncogènica (*myc*, ciclina D1, *neu*, etc.) podrien ser els desencadenants definitius de la transfor-

mació maligna de les cèl·lules, que adquirien canvis fenotípics d'agressivitat (receptors de membrana, protasa) i permetrien la invasió local i disseminació metastàsica.

Si s'assumeix l'estadi incipient d'aquests estudis, és lògic admetre la incertesa no només sobre el significat biològic, sinó també sobre la possible utilitat clínica pràctica (diagnòstica, predictiva i terapèutica) que l'avaluació de la majoria dels elements abans citats pot aportar en el maneig dels pacients. En qualsevol cas, el coneixement dels factors que controlen el cicle cel·lular, encara que en fase preliminar, és prometedor des del punt de vista clínic. La seva aplicació en aspectes tan importants com conèixer el risc de la població, la seva relació amb factors clinicopatològics ja estudiats en el càncer de mama, el seu possible valor pronòstic sobre l'agressivitat tumoral i la seva potencial influència en l'elecció del tractament i en la resistència a fàrmacs és probable que determinin canvis en el maneig d'aquesta malaltia en un futur pròxim.

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820-823.
2. Mittnacht S, Weinberg RA. G1/S phosphorylation of the retinoblastoma protein is associated with an altered affinity for the nuclear compartment. *Cell* 1991; 65: 381-393.
3. Xiong Y, Zhang H, Beach D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 1992; 71: 505-514.
4. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/cdk4. *Nature* 1993; 366: 704-707.
5. Pines J. P21 inhibits cyclin shock. *Nature* 1994; 369: 520-521.
6. Pines J. P21 inhibits cyclin shock. *Nature* 1994; 369: 520-521.
7. Xiong Y, Connolly T, Futchner B, Beach D. Human D-type cyclin. *Cell* 1991; 65: 691-699.
8. Bates S, Parry D, Bonetta L, Vousden K, Dickson C, Peters G. Absence of cyclin D/cdk complexes in cells lacking functional retinoblastoma protein. *Oncogene* 1994; 9: 1.633-1.640.
9. Donehower L, Bradley A. The tumor supresor p53. *Biochem Biophys Acta* 1993; 1.155: 181-205.
10. Lowe SW, Schmitt EM, Schmitt SW, Osborne BA, Jacks T. P53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993; 362: 847-849.
11. White E. P53, guardian of RB. *Nature* 1994; 371: 21-22.
12. Li Y, Jenkins CW, Nichols MA, Xiong Y. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* 1994; 9: 2.261-2.268.
13. Ngan BY, Chen-Levy Z, Weiss LM, Warnke RA, Cleary ML. Expression in non-Hodgkin's lymphoma of the bcl-2 protein associated with the t(14; 18) chromosomal translocation. *N Engl J Med* 1988; 318: 1.628-1.644.
14. Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croce CM. Down-regulation of bcl 2 by P53 in breast cancer cells. *Cancer Res* 1994; 54: 2.095-2.097.
15. Tang A, Varley J, Charabarty S, Murphree L, Fung Y-KT. Structural rearrangement of the retinoblastoma gene in human breast carcinoma. *Science* 1988; 242: 263-266.
16. Sawan A, Randall B, Angus B, Wright C, Henry JA, Ostrowski J et al. Retinoblastoma and P53 gene expression related to relapse and survival in human breast cancer: an immunohistochemical study. *J Pathol* 1992; 168: 23-28.
17. Jares P, Rey MJ, Fernández PL, Campo E, Nadal A, Muñoz M et al. Cyclin D1 and retinoblastoma gene expression in human breast carcinoma: Correlation with tumor proliferation and estrogen receptor status. *J Pathol* 1997; 182: 160-166.
18. Friedrichs K, Gluba S, Eidmann, Jonat W. Overexpression of p53 and prognosis in breast cancer. *Cancer* 1993; 72: 3.641-3.647.
19. Gee JM, Robertson JFR, Ellis IO, Willsher P, McClelland RA, Hoyle HB et al. Immunohistochemical localization of BCL-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. *Int J Cancer* 1994; 59: 619-628.
20. Schuurig E, Verhoeven F, van Tinteren H, Peterse JL, Nunnink B, Thunnissen BJM et al. Amplification of genes within the chromosome 11q13 region is indicative of poor prognosis in patient with operable breast cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 5.229-5.234.
21. Buckley MF, Sweeney JKE, Hamilton JA, Sini RL, Manning DL, Nicholson RI et al. Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene* 1993; 8: 2.127-2.133.
22. Sutherland RL, Watts CKW, Musgrove EA. Cyclin gene expression and growth control in normal and neoplastic human breast epithelium. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1993; 47: 1-6.
23. Filmus J, Robles AI, Shi W, Wong MJ, Colombo LL, Conti CJ. Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. *Oncogene* 1994; 9: 3.627-3.633.
24. Kamb A, Giris NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264: 436-440.
25. Okamoto A, Demetrick DJ, Spillare EA, Hagiwara K, Hussain SP, Bennet WP, et al. Mutations and altered expression of p16INK4 in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11.045-11.049.
26. De Potter CR, Schelhou A-M. The neu-protein and breast cancer. *Virchows Arch* 1995; 426: 107-115.
27. Miki J, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshamank K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266: 66-71.
28. Wooster R, neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, et al. Localisation of a breast cancer susceptibility gene BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994; 265: 2.088-2.096.
29. Szabo CI, King MC. Inherited breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* 1995; n.º especial 4: 1.811-1.817.

CÀNCER DE MAMA

En els carcinomes de mama es donen mutacions i delecions freqüents del gen Rb i p53, així com l'activació de *bcl-2*. Concretament, les alteracions de Rb s'han relacionat amb una activitat proliferativa tumoral significativament augmentada; l'expressió immunohistoquímica de p53, deguda a la presència d'un producte anòmal i inactiu d'aquest gen, s'ha valorat per alguns com a un factor pronòstic de mala evolució i, per últim, l'expressió tumoral de *bcl-2* s'ha correlacionat amb una millor resposta al tractament hormonal. Així mateix, s'han observat anomalies, en forma d'amplificació gènica i sobreexposició, de la ciclina D1 en un percentatge significatiu de tumors mamaris; s'ha postulat que la sobreexposició d'aquest gen podria constituir un possible mecanisme de resistència al tractament antiestrogen i, a més, podria ser el mediador de l'acció del oncògen *ras*. El gen *brca1* sembla intervenir en el 80-90% de casos de càncer d'ovari i mama familiars, i el *brca2*, a més, està alterat en casos esporàdics i en càncer de mama masculí; això fa útil el seu estudi en famílies afectades d'aquest tipus de càncer. En el futur, el coneixement d'aquestes anomalies i la seva repercussió sobre el cicle cel·lular permetran valorar el risc de la població i el pronòstic sobre l'agressivitat tumoral, així com la seva influència en l'elecció del tractament i en la resistència als fàrmacs utilitzats.

CÁNCER DE MAMA

En carcinomas de mama existen frecuentes mutaciones y deleciones del gen Rb y p53, así como activación de *bcl-2*. Concretamente, las alteraciones de Rb se han relacionado con una actividad proliferativa tumoral significativamente aumentada; la expresión inmunohistoquímica de p53, debida a la existencia de un producto anómalo e inactivo de este gen, se ha valorado por algunos como factor pronóstico de mala evolución y, por último, la expresión tumoral de *bcl-2* se ha correlacionado con una mejor respuesta al tratamiento hormonal. Asimismo, se han observado anomalías, en forma de amplificación génica y sobreexposición, de la ciclina D1 en un porcentaje significativo de tumores mamarios; se ha postulado que la sobreexposición de este gen podría constituir un posible mecanismo de resistencia al tratamiento antiestrogénico y, además, podría ser el mediador de la acción del oncogén *ras*. El gen *brca1* parece intervenir en el 80-90% de casos de cáncer de ovario y mama familiares y el *brca2*, además, está alterado en casos esporádicos y en cáncer de mama masculino; ello hace útil su estudio en familias afectas de este tipo de cáncer. En el futuro, el conocimiento de estas anomalías y su repercusión sobre el ciclo celular permitirán valorar el riesgo de la población y el pronóstico sobre la agresividad tumoral, así como su influencia en la elección del tratamiento y en la resistencia a los fármacos utilizados.

BREAST CANCER

Mutations and deletions of the Rb and p53 genes, as well as activation of *bcl-2*, are common phenomena in breast cancers. Specifically, changes in Rb have been related to significantly increased tumor proliferation activity; the immunohistochemical expression of p53 has been interpreted by some to be a factor indicating poor prognosis, due to an anomalous inactive product of the gene; and finally, the tumor expression of *bcl-2* has been related to better response to hormone treatment. Likewise, anomalies in the form of amplification and overexpression of the D1 cyclin gene has been demonstrated in a significant percentage of breast tumors, and it has been postulated that the overexpression of this gene may explain resistance to antiestrogenic treatment and, further, that it might mediate the activation of the *ras* oncogene. The *brca1* gene seems to intervene in 80 to 90% of familial ovarian and breast cancers, while *brca2* is altered in sporadic cases and in breast cancer in men, such that the study of this gene in families affected by such cancers might be useful. Further knowledge of such alterations and their impact on the cell cycle will allow us to assess population risk and predict tumor aggressivity, as well as influence choice of treatment and aid understanding of drug resistance.

Vida Acadèmica

Durant el primer semestre de l'any 1998 s'han desenvolupat les següents activitats acadèmiques:

Lliçó inaugural de curs, a càrrec de l'acadèmic numerari Dr. Josep Laporte i Salas, amb el tema: "La salut a Catalunya a tombant de segle" (25 de gener)

Actes de recepció dels acadèmics numeraris doctors Ricard Castillo i Cofiño (8 de febrer), Josep M. Mascaró i Ballester (29 de març) i Francesc M. Doménech i Tornè (24 de maig)

Sessió de lliurament del premi de la Societat Catalana de Trasplantaments al Dr. Vicenç Martí i Claramunt (17 de març)

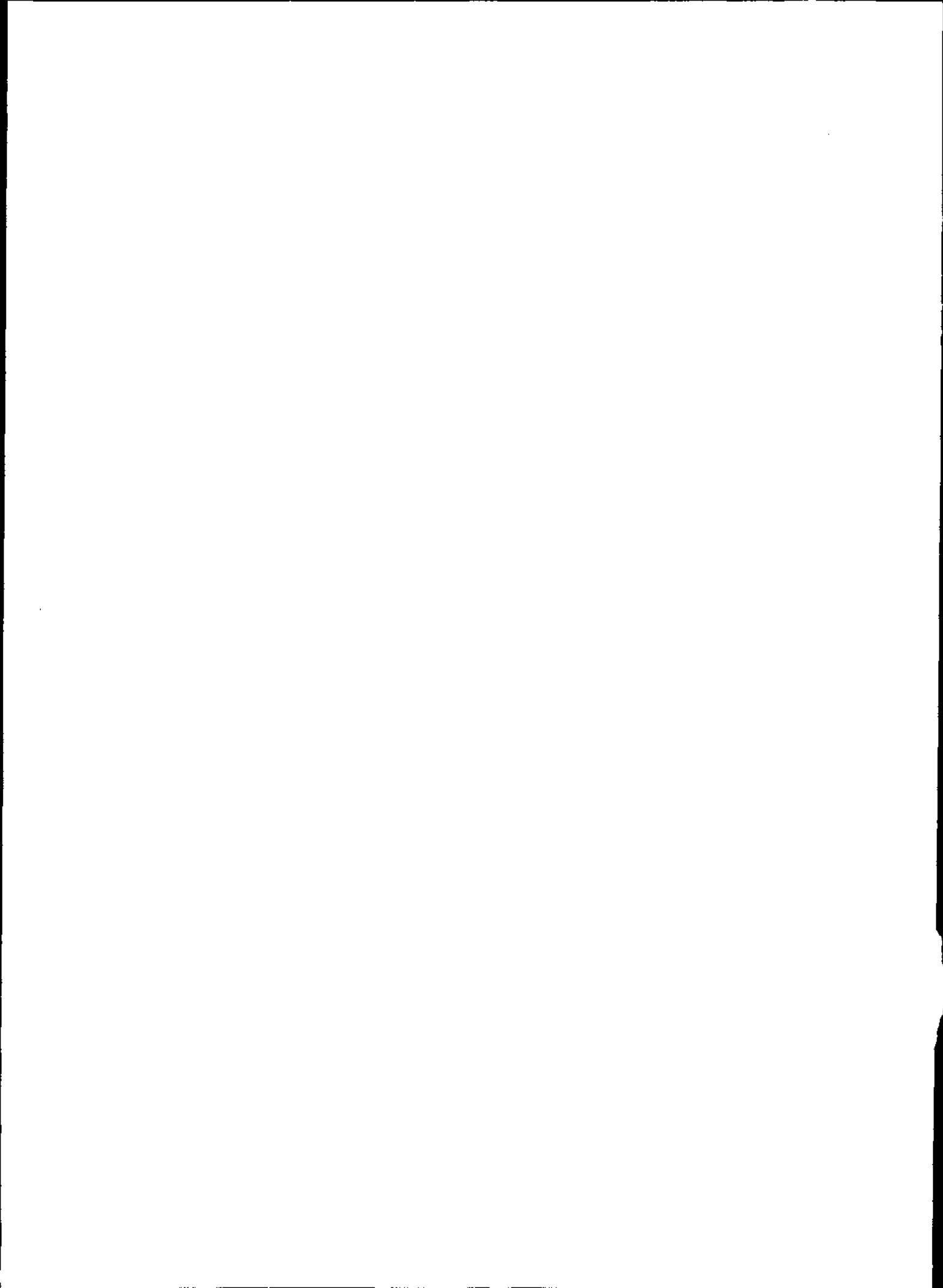
I Col·loqui del curs 1998, sobre "Medicaments genèrics", coordinat per l'acadèmic numerari Dr. Josep A. Salvà i Miquel (24 de març)

II Curs sobre "L'humanisme en medicina", dirigit pel Dr. Antoni Caralps i Riera, acadèmic numerari (27 de març)

Col·loqui hispanomexicà sobre "Arrels de l'activitat mental", dirigit pels doctors Francesc Garcia-Valdecasas i Hugo Aréchiga (31 de març i 1 d'abril)

Conferència extraordinària pel Dr. José Alberto Costa e Silva, director de la Divisió de Salut Mental de l'OMS sobre el tema "Programa de la OMS para la promoció de la Salut Mental" (2 d'abril)

II Col·loqui dels curs 1998, sobre el tema "Importància del diagnòstic precoç en psiquiatria", coordinat pels doctors Carles Ballús i Edelmirra Doménech, acadèmics numeraris (21 d'abril).



La Fundació Pere Virgili dóna suport a la publicació de la Revista de la Reial Acadèmia de Medicina de Catalunya

Membres Honorífics de la Fundació

Almirall Prodesfarma S.A.
Col·legi Oficial de Metges de Barcelona
Fundació Uriach 1838
Grup Ferrer Internacional S.A.
Grup Novartis a Espanya
Laboratorios Menarini S.A.
Laboratoris del Dr. Esteve S.A.
Química Farmacéutica Bayer S.A.

Protectors de la Fundació

Grup Bristol Myers Squibb
Laboratoris Astra
Laboratoris Fardi S.A.
Sanofi Winthrop S.A.