

Lliçons al voltant de l'evolució dels marcadors tumorals

Discurs de presentació de Jaume Reventós Puigjaner
com a membre numerari de la Secció de Ciències
Biològiques, llegit el dia 21 de febrer de 2022



Institut
d'Estudis
Catalans

SECCIÓ
DE CIÈNCIES
BIOLÒGIQUES

Lliçons al voltant de l'evolució dels marcadors tumorals

Lliçons al voltant de l'evolució dels marcadors tumorals

Discurs de presentació de Jaume Reventós Puigjaner
com a membre numerari de la Secció de Ciències
Biològiques, llegit el dia 21 de febrer de 2022

Barcelona, 2023



Institut
d'Estudis
Catalans

SECCIÓ
DE CIÈNCIES
BIOLÒGIQUES

Biblioteca de Catalunya. Dades CIP

Reventós i Puigjaner, Jaume, autor

Lliçons al voltant de l'evolució dels marcadors tumorals. — Primera edició

Bibliografia

ISBN 9788499657295

I. Institut d'Estudis Catalans. Secció de Ciències Biològiques. II. Títol

1. Marcadors tumorals

616-006-074

© Jaume Reventós Puigjaner

© 2023, Institut d'Estudis Catalans, per a aquesta edició

Carrer del Carme, 47. 08001 Barcelona

Primera edició: desembre de 2023

Text revisat lingüísticament per la Unitat d'Edició del Servei Editorial de l'IEC

Disseny de la coberta: Azcunce | Ventura

Imatge de la coberta: *Suc 3*, pintura de Ferran Garcia Sevilla, propietat de la Fundació Privada Kàlida

Compost per fotocomposició gama, s. l.

Imprès a Service Point, FMI, SA

ISBN: 978-84-9965-729-5

Dipòsit Legal: B 20057-2023

DOI: 10.2436/10.1500.13.1



Aquesta obra és d'ús lliure, però està sotmesa a les condicions de la llicència pública de Creative Commons. Es pot reproduir, distribuir i comunicar l'obra sempre que se'n reconegui l'autoria i l'entitat que la publica i no se'n faci un ús comercial ni cap obra derivada. Es pot trobar una còpia completa dels termes d'aquesta llicència a l'adreça: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/deed.ca>.

El futur ja ha passat. Els científics no tendim a l'efusió. Ens sentim, en privat, emocionats per la nostra feina, però en públic emfatitzem —encertadament— l'escepticisme i la precaució. No obstant això, hi ha moments excepcionals en què l'escepticisme es deixa de banda, l'electricitat omple l'espai i un científic amb una passió ostensible i ulls brillants descriu, desvergonyidament, un canvi en el panorama que tindrà un sentit durador en el temps.

F. S. COLLINS,

The language of life: DNA and the revolution in personalized medicine, 2009.

1. PREÀMBUL

Em sento molt honorat de poder ser avui aquí amb tots vosaltres, com a conseqüència d'haver estat escollit membre numerari de la Secció de Ciències Biològiques del nostre Institut d'Estudis Catalans. Voldria, abans que res, donar les gràcies a tots els membres de la Secció per haver-me donat la seva confiança i també al Ple per haver acceptat d'admetre-m'hi. En particular, però, voldria fer palès el meu agraïment especial al bon amic Pere Puigdomènech, ja que amb ell vaig començar el meu periple per aquesta casa: primer, a la Societat Catalana de Biologia (SCB), com a sotspresident, essent-ne ell el president; després, en els meus dos mandats com a president de la SCB, i, finalment, com a membre numerari d'aquest Institut.

Arribat el moment de preparar la memòria d'aquest discurs de presentació, i observant el que heu fet els companys que m'heu precedit, he optat per mostrar-vos alguns exemples del treball de recerca realitzat durant els darrers trenta anys en el camp dels marcadors tumorals, però no com un recull exhaustiu de tot plegat, sinó com el fil conductor de reflexions al voltant de la recerca biomèdica, de la ciència en general i de la medicina en particular.

Com he dit, em centraré en l'àrea científica que ha ocupat la majoria d'aquests anys, a saber, la identificació de biomarcadors moleculars en diversos càncers, com una part del camí cap a l'assoliment d'una medicina cada vegada més objectiva, més científica, més eficient, més personalitzada i precisa, però també més hu-

mana i equitativa. Aquest no ha estat mai un camí fàcil, però sí apassionant i molt enriquidor, i val la pena visitar-lo per a poder-ne treure les conseqüències adients, amb profunda visió analítica i crítica, per tal que aquestes siguin útils per als que vinguin al darrere, i puguin, ells i nosaltres, ser capaços de millorar el nostre sistema de recerca biomèdica, docència, formació universitària, assistència mèdica i desenvolupament de la indústria innovadora en l'entorn de la salut, essent també nosaltres actors i observadors privilegiats de la gran revolució molecular dels darrers vuitanta anys, però també testimoniant els nous avenços tècnics que estan revolucionant la medicina i la recerca biomèdica ja en aquest primer terç del segle XXI, com són la bioinformàtica i la intel·ligència artificial. Tractaré aquests aspectes en el darrer terç del meu discurs, i faré èmfasi en el que podria ser la medicina en un futur no llunyà. Tot plegat ens ha de dur a una societat més sana, més justa, més equànime, on la malaltia vagi progressivament perdent l'impacte que té encara actualment.

Nogensmenys, el fet que lliga tot el meu discurs, i que sempre ha estimulat la meva curiositat, ha estat el procés de generar el coneixement en general, i el mèdic en particular. És a dir, la recerca biomèdica i la seva vinculació amb la pràctica mèdica assistencial, així com amb la formació dels metges (pregraduats i postgraduats). En altres paraules, el repte del coneixement fisiopatològic com a estímul de la curiositat innata que tots tenim i l'afany, sovint quasi esportiu, de millorar-lo i superar-lo (Bonatti, 1961). En llenguatge més col·loquial i actual, parlariem de la passió per situar-nos al límit del coneixement, o sigui, per descobrir. L'evolució de la tecnologia ens ha col·locat, òbviament, en un escenari difícil d'imaginar fa quaranta o cinquanta anys. Sovint sentim que la medicina, en els darrers anys, mereix ser reescrita en la seva totalitat, atès que l'augment del coneixement medicocientífic ha estat i continua sent de gran magnitud, i, per tant, les possibilitats diagnòstiques i terapèutiques actuals tenen poc a veure amb les de fa aquests pocs anys. No voldria oblidar-me, aquí, d'esmentar el poc (o molt poc) que com a societat hem avançat en la implantació de la medicina preventiva i en la prodigalitat dels hàbits saludables de la vida, si ho comparem amb el molt que sí que s'ha fet per la medicina curativa. També sembla clar que el motiu més important pel qual el que acabo de dir ha succeït són els interessos econòmics que hi ha al darrere de l'una i de l'altra. Sembla evident, per exemple, que la poca implantació en el nostre país de la molt saludable dieta mediterrània n'és un bon exemple, amb els conseqüents i gens desitjats augments de l'obesitat infantil i de la diabetis de tipus 2 en la nostra societat... també mediterrània, per cert...

Així doncs, em limitaré a brindar-vos alguns exemples, tant propis del nostre grup de recerca com d'altri, del que representen els marcadors tumorals, de llur identificació i de la implantació del seu ús al llarg de la història recent de la medicina, i de com constitueixen un bon model del que ha de ser la medicina plena-

ment científica en el seu camí cap a l'assoliment d'una salut futura, que serà digital, més justa i equitativa. M'agradaria presentar-vos aquests exemples que, crec que, es poden considerar quasi lliçons que la ciència ens brinda a nosaltres, usuaris, metges, científics i ciutadans també.

2. INTRODUCCIÓ: ENTENDRE COM PODRIA SER LA MEDICINA DEL FUTUR

La ciència és especial. Constitueix la millor manera de què disposem per a conèixer com funciona el món i tot el que hi ha en aquest... , cosa que ens inclou també a nosaltres.

W. F. BYNUM, *A little history of science*, 2012.

L'ésser humà té una gran complexitat, per la seva idiosincràsia particular, que l'ha dotat d'una increïble capacitat adaptativa a múltiples entorns permanentment canviants. Per tant, les variables que presenten els organismes superiors complexos, com són els humans, són molt difícils d'acotar, degut principalment a la seva extraordinària complexitat, però també a aquest entorn tan variable en el qual creixen i viuen. Nogensmenys, en cap cas, això no ens permet parlar de res que no sigui ciència mèdica. En organismes inferiors o menys complexos, la ciència ha arribat a nivells de coneixement absolut de llur funcionament, com ha succeït, per exemple, amb la fisiologia del bacteri *Mycoplasma pneumoniae* (Güell *et al.*, 2009). Com ja he esmentat abans, la biologia de sistemes ens permet, en models molt senzills, definir la totalitat de la regulació i coordinació de les funcions d'aquests. És molt probablement erroni dir que la ciència aconseguirà aquest nivell de coneixement de manera ràpida en els organismes superiors, però sí que és, sens dubte, el camí que la recerca en biomedicina ha de seguir. En algun moment futur, no sabem quan, aquesta disciplina emergent que es diu *biologia de sistemes* ha de conduir l'evolució de la ciència mèdica cap a la necessària medicina de sistemes, que haurà d'integrar totes les dades mèdiques d'un pacient buscant el valor afegit d'aquestes, estudiades conjuntament. La bioinformàtica i la intel·ligència artificial, de les quals parlarem al final d'aquesta memòria, ens comencen a apropar una mica a aquest nou tipus de medicina.

El gran desenvolupament de la recerca en biomedicina, a partir de la «revolució» molecular (que encara continua), ha estat i és, crec, el viatge més atractiu i estimulante que hom pugui viure. El mateix Picasso ens deia, com a pintor i captiu ell mateix de l'aprenentatge i l'experimentació permanents, que «l'aprenentatge constant era l'aventura més apassionant en la vida» (Reventós i Conti, 1973).

En l'inici del segle xx, moment en què la recerca creixia progressivament, els científics s'anaven especialitzant en les seves àrees del coneixement, a saber, els físics es dedicaven a la física; els químics, a la química; els biòlegs, a la biologia; els metges,

a la medicina, etc. No fou fins a la dècada de 1930, quan els químics i els físics, inicialment, es van anar interessant progressivament pels problemes plantejats per la biologia. La química estudiava la combinació de diferents substàncies o elements ja coneguts de la taula periòdica, però aquestes combinacions es demostrava que eren fonamentals, també, en el funcionament dels organismes vius (àrea d'estudi dels biòlegs). Els físics estudiaven la matèria i l'energia, però els éssers vius eren matèria i utilitzaven energia per a funcionar. El carboni, l'hidrogen, l'oxigen, el nitrogen, etc., eren actors fonamentals en la física, la química, la biologia, la medicina, etc.

La immunologia tenia ja en aquell moment un recorregut molt considerable, amb contribucions ben documentades des de l'edat antiga, però els descobriments de la immunització d'Edward Jenner, al segle XVIII, continuats per Louis Pasteur, al segle XIX, brindaven ja a la comunitat científica un coneixement de gran magnitud. El coneixement de les proteïnes també seguí una seqüència de descobriments de gran importància al llarg del segle XIX, i culminava, el 1926, amb la cristallització del primer enzim, una ureasa, per James B. Sumner, descoberta per la qual se li atorgà el Nobel de Química, l'any 1946, o amb els descobriments sobre els enllaços químics de Linus Pauling, el 1936, pels quals rebé, l'any 1954, també el seu primer Premi Nobel.

Durant els darrers vuitanta anys, hem pogut testimoniar descobriments importantíssims que ens obliguen a redefinir quasi tota la ciència mèdica. Entre els més rellevants, voldria esmentar el del fet que el DNA era responsable de l'herència, que feren Avery, MacLeod i McCarty, l'any 1944, a l'Institut Rockefeller de Nova York; el de la doble hèlix, que dugueren a terme Rosalind Franklin, Maurice Wilkins, James Watson i Francis Crick, l'any 1953, i pel qual van ser guardonats amb el Nobel el 1962, o l'establiment dels sistemes d'edició gènica pel sistema de CRISPR, el 2011, pel qual Jennifer A. Doudna i Emmanuelle Charpentier van rebre el Premi Nobel el 2020.

El gran desenvolupament de la bioinformàtica aporta la segona part fonamental a aquest creixement, i només ens queda continuar progressant en aquest sentit. L'aplicació àmplia de la intel·ligència artificial a la medicina (i a tot el coneixement científic actual), que està només començant, ens permet pensar en una gran inflexió positiva en la millora dels diagnòstics i en posteriors tractaments de les malalties. Avui, aquesta nova medicina s'ha batejat com a *medicina de precisió* o *medicina personalitzada*, però l'essència és sempre la mateixa, a saber, medicina basada en dades científiques demostrades (i com més dades tinguem de cada pacient i malaltia, millor medicina farem). Falta encara força temps per a arribar al coneixement total de les malalties i de llurs tractaments idonis, però estem avançant en la direcció correcta.

3. CERCA DE L'EVIDÈNCIA EN MEDICINA: L'EXEMPLE DELS MARCADORS DE LES MALALTIES

3.1. *El mètode científic*

Molts autors d'àmbits diversos i també científics han exposat, al llarg de molts anys, les seves definicions del que és el mètode científic. Tots estan d'acord, però, que aquest comença per la identificació d'un problema no resolt. L'anàlisi subsegüent d'aquest passa per deixar de costat els aspectes no essencials del problema en qüestió i per estudiar profundament els que pensem que sí que incideixen en la veritable essència del problema. Estudiades i agrupades ja totes aquestes dades, s'ha d'establir una línia de base que les relacioni de la manera més simple: un enunciat breu o una relació matemàtica. Això constitueix una hipòtesi. A partir d'aquesta última, i segurament gràcies a una unió de disciplines tècniques variades, els investigadors, mitjançant l'ús d'uns mètodes (coneguts o que també hauran de descobrir i posar a punt), dissenyen uns experiments per resoldre la pregunta inicial. Si els resultats d'aquests experiments condueixen a unes conclusions clares, la hipòtesi acaba confirmant-se i pot adquirir l'estatus de teoria o llei científica (Asimov, Najarian i Commoner, 1961).

3.2. *Els marcadors en biologia i medicina (biomarcadors): inicis i definició*

Actualment, és àmpliament acceptada la definició del National Cancer Institute dels Estats Units, que considera un *biomarcador* una «molècula biològica que es pot trobar a la sang, en fluids biològics i/o en teixits, la presència o l'absència (o una concentració més o menys important) de la qual és un signe d'un procés normal o anòmal, o bé d'un problema de salut». Alhora, un biomarcador ha de poder ser mesurat de manera objectiva com un indicador d'un estat, procés, progrés de malaltia o de resposta a una determinada teràpia (Biomarkers Definition Working Group, 2001).

Segons altres autors, la definició ha de fugir de la idea reduccionista que un biomarcador sigui exclusivament una molècula que es pugui detectar en els supòsits anteriorment esmentats. Per tant, ampliant la definició, podríem parlar d'una «característica» (sigui o no una molècula) objectivament mesurable, i donar així cabuda, també, a la semiologia clínica objectivable i mesurable, a les imatges radiològiques o d'altres tipus i, fins i tot, a pautes de comportament, si ens endinsem en la patologia psiquiàtrica. El terme *biomarcador molecular*, però, és molt ampli: inclou cèl·lules, proteïnes, hormones, enzims, molècules de tipus divers —com són els RNA o els microRNA (miRNA)—, gens amb les seves mutacions específiques, etc.

L'any 1963, l'investigador rus Yuri Semenovitch Tatarinov va aïllar el que es considera el primer marcador tumoral, utilitzat durant anys per al diagnòstic

del carcinoma hepatocel·lular, així com per a monitorar-ne la progressió, la presència de metàstasis i el pronòstic (vegeu-ne una revisió a Nikulina *et al.*, 2015).

L'any 1965, els investigadors Phil Gold i Samuel Freedman, de la Universitat McGill, a Montreal, van identificar una substància en la sang de pacients afectats de càncer de còlon —que normalment es trobava en teixits fetals—, que van anomenar *antigen carcinoembrionari* (CEA, de l'anglès *carcinoembryonic antigen*) (Gold i Freedman, 1965). Posteriorment, es van anar identificant altres marcadors per a altres càncers, com el CA 19-9 per als tumors de còlon i també de pàncrees, el CA 15-3 per al càncer de mama o el CA-125 per a tumors d'ovari. En la majoria dels casos, i com es va demostrar en estudis més extensos, aquests marcadors no han estat específics d'un únic tipus de tumor.

Per a estudiar-los i mesurar-los, s'han anat utilitzant al llarg dels anys una amplíssima sèrie de tècniques, com són encara els assajos immunològics, com el radioimmunoassaig (RIA), inventat el 1956 per Solomon Berson i Rosalyn Sussman Yalow (Berson *et al.*, 1956), pel qual li fou lliurat a Yalow el Nobel de Medicina o Fisiologia l'any 1977 (Berson, com en tants altres casos, no el pogué compartir amb Yalow perquè havia mort prèviament, el 1972). Aquest descobriment i el fet que els autors n'alliberessin la patent van donar lloc a una enorme proliferació de *kits* de RIA, que van permetre de manera ràpida l'establiment de sistemes de mesura de tot tipus de molècules importants per al coneixement de la fisiologia, la patologia i la medicina en general. En les dècades dels anys seixanta, setanta i vuitanta del segle passat, l'especialitat de l'endocrinologia en fou la més beneficiada, atès que s'havien identificat moltes hormones i es disposava també dels seus anticossos, que van permetre l'establiment d'aquest extens nombre de *kits* de RIA.

Com ja hem comentat, els biomarcadors poden ser de tipus molt divers i inclouen, més darrerament, les alteracions en les seqüències dels gens o mutacions. Això ha comportat el desenvolupament del seu estudi, a través de tota una sèrie d'assajos moleculars de mesures directes o indirectes de les alteracions en els àcids nucleics, amb la qual cosa s'ha arribat a tecnologies més precises, com són la seqüenciació gènica i, més recentment, aquesta, però feta massivament.

En els darrers anys, les anomenades *tècniques d'alt rendiment* (*high-throughput technologies*) ens proporcionen una gran informació respecte a nombrosos marcadors obtinguts en un espai de temps curt, motiu pel qual la valoració d'aquests es pot realitzar amb més eficiència i rapidesa. Entre aquestes tècniques d'alt rendiment trobarem, per exemple, la genòmica, que estudia les seqüències dels genomes dels organismes, amb les seves anomalies, com són les mutacions; la transcriptòmica, que s'ocupa de l'anàlisi dels transcrits específics de cada gen en cada teixit, i també de les seves mutacions o alteracions en els processaments alterna-

tius que donen lloc a RNA missatgers molt diversos; la metabolòmica, que analitza els diferents metabòlits que van apareixent al llarg de les diverses reaccions enzimàtiques, i també la proteòmica, que estudia els perfils de proteïnes resultants de les traduccions dels mRNA i també de les modificacions posttraduccionals a les quals aquestes preproteïnes estaran sotmeses.

Entre totes aquestes tècniques i molècules a mesurar com a biomarcadors de malalties, les proteïnes podrien tenir alguns avantatges considerables. La seva diversitat és molt més elevada que la del DNA o RNA, atesos els processaments alternatius (*alternative splicing*) dels mRNA o les modificacions posttraduccionals. En ambdós casos, i a partir d'un únic gen, es generen formes diverses de proteïnes: si el genoma humà està format per uns 20.300 gens, les possibles proteïnes originades a partir d'aquests gens podrien arribar a un nombre proper a 1,8 milions (Legrain, Aebersold i Archakov, 2011). Aquesta gran diversitat augmenta la possibilitat d'identificar proteïnes específiques com a marcadors de malalties o, fins i tot, combinacions vàries d'aquestes mateixes proteïnes que, valorades conjuntament, ens podrien donar una visió molt més precisa del problema de salut que vulguem avaluar, com podria ser el càncer, patologia prevalent en la qual s'han esmerçat grans quantitats d'esforços i de recursos de recerca. Aquest proteoma marcadors de malalties també el podem detectar en fluids biològics, com veurem més endavant, cosa que d'alguna manera podria facilitar-ne la detecció.

3.3. Classificació dels biomarcadors segons la seva aplicació

Atenent a la seva aplicació, podem classificar els marcadors en diferents categories, també avui àmpliament acceptades, a saber:

— *Marcadors de predisposició o de cribratge*: en aquest grup trobarem els marcadors que poden predir la probabilitat que un subjecte asimptomàtic pateixi una malaltia concreta, encara que no necessàriament la desenvolupi.

— *Marcadors de diagnòstic*: ens indiquen si un pacient està afectat o no d'una malaltia concreta. Un biomarcador de diagnòstic ha de ser capaç de determinar una malaltia específica de manera inequívoca, particularment en aquells pacients que no presenten símptomes.

— *Marcadors de pronòstic*: indiquen pronòstic, o sigui, ens assenyalen quin serà el curs o l'evolució d'un pacient ja diagnosticat d'una malaltia específica, normalment seguint el tractament habitual.

— *Marcadors predictius, o terapèutics o de resposta a tractament*: contribueixen a determinar quins pacients són susceptibles de beneficiar-se més de les diferents opcions terapèutiques.

3.4. Procés de descobriment de nous biomarcadors

Clàssicament, les fases de descobriment de nous biomarcadors (*biomarker pipeline*) són tres: fase de descobriment, fase de verificació i fase de validació, que tenen lloc abans de l'avaluació clínica final, que condueix a la implantació del nou biomarcador en la pràctica clínica, després de l'aprovació per les agències reguladores, com són l'Agència Europea del Medicament (EMA, de l'anglès European Medicines Agency), per als països d'Europa, o l'Administració d'Aliments i Fàrmacs (FDA, de l'anglès Food and Drug Administration), en el cas dels Estats Units d'Amèrica (Rifai, Gillete i Carr, 2006).

En la fase inicial o fase de descobriment, s'utilitzaran mètodes analítics diversos per a identificar noves molècules o biomarcadors de qualsevol tipus que estiguin diferencialment expressats en dos grups simples, amb la màxima homogeneïtat possible cadascun com podrien ser individus sans i pacients afectats d'una malaltia concreta. En aquesta fase inicial, el nombre de mostres analitzades acostuma a ser baix (de 5 a 10 mostres per grup), mentre que el nombre de molècules identificades com a expressades diferencialment pot situar-se entre desenes o centenars. En aquesta primera fase, l'error acostuma a ser elevat, sobretot degut a la suposada diferència en les molècules poc abundants, per la baixa precisió en la quantificació i també pel nombre reduït de mostres analitzades. Per això, en acabar aquesta primera fase de descobriment, les noves molècules s'anomenen *candidats a biomarcador*, però no encara *biomarcadors* (Rifai, Gillete i Carr, 2006).

La segona fase del procés de descobriment de biomarcadors o fase de verificació és de gran importància com a transició entre la fase inicial de descobriment i la fase final de validació (Parker i Borchers, 2014). L'objectiu principal d'aquesta fase és prioritzar, a partir de la llarga llista de candidats identificats en la primera fase de descobriment, aquells que tenen més probabilitat d'entrar en un assaig clínic i que, per tant, puguin justificar la gran inversió a fer per a participar en la darrera fase de validació. El nombre de candidats seleccionats serà, doncs, verificat en una àmplia quantitat de mostres (entre 30 i 100 mostres), i s'inclourà en aquesta ocasió més diversitat entre els casos i els controls, amb la finalitat de confirmar la sensibilitat del candidat al biomarcador i començar a determinar-ne l'especificitat. En aquesta fase es requerirà l'ús de tècniques quantitatives multiplexades.

La darrera fase o fase de validació requereix una gran inversió, a la vegada que un temps considerable. Se centra només en uns pocs candidats que hagin mostrat més possibilitats en la fase anterior i s'hauran de validar en un gran nombre de mostres (100 mostres, aproximadament). La composició del grup de mostres ha de reflectir tota la diversitat dels múltiples problemes de salut de la població objecte de l'estudi. En aquesta fase es requerirà també una quantificació absolutament precisa que permeti la comparació i diferenciació entre les variables que hi

pugui haver en les mostres analitzades (Parker i Borchers, 2014). Finalment, es procedirà a una darrera avaluació en un nombre elevat de mostres clíniques, abans de procedir a la sol·licitud de la llicència, que hauran d'atorgar les agències reguladores.

Malgrat els grans esforços fets pels investigadors i acadèmics i per la indústria, de les grans inversions acumulades en la cerca de nous marcadors, dels milers de publicacions científiques anunciant les identifications de marcadors en un extens reguitzell de malalties de tot tipus, molt pocs d'aquests candidats acaben rebent les aprovacions de les agències reguladores. En els darrers anys, només el Pro2PSA per al càncer de la pròstata, la proteïna E4 en combinació amb el CA-125 (ROMA) i OVA1 (panell de 5 proteïnes) per al càncer d'ovari i la degradació de la fibrina/fibrinogen per a monitorar la progressió del càncer colorectal han rebut l'aprovació de la FDA (Ioannidis, 2013).

3.5. *Característiques dels biomarcadors*

El biomarcador ideal seria el que puguem obtenir mantenint el màxim confort del pacient, és a dir, el que sigui no invasiu o mínimament invasiu, i sobretot, també, que mostri una bona especificitat, sensibilitat, reproductibilitat, objectivitat i que pugui ser fàcilment quantificable a un cost econòmic raonable.

Entenem per *sensibilitat* la capacitat de donar com a casos positius els casos realment malalts. La sensibilitat caracteritza la capacitat de la prova per a detectar la malaltia en subjectes malalts.

$$\text{Sensibilitat: } \frac{VP}{VP + FN},$$

en què VP serien els veritables positius i FN els falsos negatius.

Entenem per *especificitat* la capacitat de donar com a casos negatius els casos realment sans, és a dir, l'especificitat caracteritza la capacitat de la prova per a detectar l'absència de la malaltia en subjectes sans. L'especificitat d'una prova representa la probabilitat que un subjecte sa tingui un resultat negatiu en la prova.

$$\text{Especificitat: } \frac{VN}{VN + FP},$$

en què VN serien els veritables negatius i FP els falsos positius.

La sensibilitat és la fracció de veritables positius i l'especificitat és la fracció de veritables negatius. No obstant això, cada prova tindrà més o menys percentatge, tant en especificitat com en sensibilitat, depenent del punt de tall. El millor seria que no se superposessin i que, en fer un test, només obtinguéssim veritables posi-

tius i veraders negatius, però normalment no és així. Per això, l'important és conèixer l'especificitat i la sensibilitat de cada estimador que usem.

3.6. Mostres clíniques per a l'obtenció dels biomarcadors

Les mostres clíniques a partir de les quals obtindrem els biomarcadors són altament diverses, en funció del que es vulgui obtenir, a la vegada que si els marcadors del nostre interès són de diagnòstic precoç, de seguiment de l'evolució clínica dels pacients, de predicció de resposta a unes teràpies, etc., alguns tipus de mostres tindran avantatges o inconvenients si les comparem amb d'altres. Per això analitzarem, en primer lloc, les diferents mostres biològiques que es poden obtenir i, posteriorment, les correlacionarem amb la finalitat precisa per a la qual es vulgui disposar d'aquestes.

3.6.1. Mostres de teixit

Les mostres de teixit, ja siguin obtingudes per biòpsia o per cirurgia, són les més comunament utilitzades com a mostres clíniques per al procés de descoberta de nous biomarcadors. Un dels principals avantatges que trobarem en l'ús de mostres de teixit (per exemple, un teixit tumoral) és que la concentració dels eventuais marcadors serà probablement més elevada en aquest teixit afectat que la que podria trobar, per exemple, en un fluid biològic, en el qual els biomarcadors estarien probablement més diluïts. A més a més, en una mostra de teixit els biomarcadors es podran analitzar en el seu entorn cel·lular natural (utilitzant una sèrie de tècniques de mesura *in situ*), a la vegada que es podran comparar directament amb els valors del mateix teixit adjacent considerat «normal», que representarà el seu control apropiat. El fet de disposar de peces quirúrgiques, per exemple, de tumors extirpats també ens permet correlacionar els biomarcadors amb el teixit d'origen de manera fefaent. L'inconvenient més important que tindrem a l'hora de treballar amb aquest tipus de mostres és que s'han d'obtenir per processos invasius per al pacient. Això dificultarà molt la fase final de validació dels marcadors, en la qual el nombre de mostres ha de ser elevat. Un altre inconvenient que trobarem en aquestes mostres és la ja demostrada heterogeneïtat tissular (en l'exemple del càncer és un fet ben demostrat i que invalida molta recerca feta prèviament, quan es considerava els tumors com a entitats homogènies). En els darrers anys, l'ús de la microdissecció amb làser ha permès resoldre parcialment el problema de l'heterogeneïtat tumoral, i ha aconseguit dissecar i analitzar només les zones afectades per la malaltia del nostre interès, sense contaminar la mostra amb altres tipus cel·lulars. Aquesta tecnologia també ens permet disposar dels grans arxius de mostres de teixits en parafina dels serveis d'anatomia patològica

emmagatzemats als hospitals des de fa ja bastants anys (ho veurem més endavant, quan tractem la descoberta dels microRNA com a marcadors) (Gustafsson, Arentz, Hoffmann, 2015). De manera molt menys estesa que els bancs de mostres parafinades, molts hospitals han estat constituint en els darrers anys bancs de teixits d'interès congelats a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, fet que permet aplicar-hi tècniques no viables amb els blocs de parafina mantinguts a temperatura ambient.

3.6.2. Sang

El plasma i el sèrum sanguinis són les mostres més adients per a la identificació de biomarcadors, sobretot per la gran facilitat en la seva obtenció de manera mínimament invasiva, el que permetrà, també, analitzar els biomarcadors en diferents punts del procés biològic que ens interessi monitorar. Serà, doncs, la mostra més usada en les fases posteriors (verificació i validació) al descobriment dels biomarcadors. És ben sabut que la sang està en contacte amb tots els teixits de l'organisme. Això suposa que, a la sang, molt probablement hi trobarem els productes de secreció (proteïnes, principalment) de la majoria dels teixits. En el cas concret de les proteïnes, hem de saber que aquestes també presenten un gran problema, sobretot si llurs concentracions són baixes degut a l'elevat rang dinàmic, de més d'onze ordres de magnitud, quan ens referim a la seva abundància a la sang. La presència a la sang de proteïnes molt abundants, com és el cas de l'albumina, que és d'uns 35-50 mg/ml en un total de 70 mg/ml de proteïnes totals, pot emmascarar biomarcadors potencials, atès que els dilueix molt considerablement fins a rangs de ng/ml i fins i tot més (les citocines, per exemple, i moltes altres proteïnes estan presents a nivells de pg/ml) (Anderson i Anderson, 2002). El fet de trobar-les en sang dona un valor clínic molt important, ja que facilita la recerca del marcador tant en el cribratge poblacional com en el seguiment de malalts tractats.

3.6.3. Fluids proximals

A diferència del que passa amb la sang, els anomenats *fluids proximals* són biofluids en contacte directe amb els teixits i, en conseqüència, amb el lloc on es troba la malaltia. Això els converteix en una font molt atractiva, a partir de la qual es poden identificar nous biomarcadors, ja que, com que envolten tots els teixits afectats, de ben segur que els productes de secreció d'aquests passaran al fluid, on podran ser identificats (Rifai, Gillete i Carr, 2006).

Entre aquests fluids, hi ha el líquid cefalorraquídi, en el qual trobarem reflectida la fisiopatologia dels processos intracranials; la mateixa orina, on segurament podrem trobar marcadors de la patologia urològica i andrològica; el fluid ascític

abdominal, en què hi podria haver marcadors de càncer d'ovari, o el líquid amniòtic, en el cribratge maternofetal, etc. Altres líquids menys utilitzats fins al moment present, però que cada dia guanyen protagonisme en el món dels biomarcadors són, per exemple, la saliva, important en l'aïllament de marcadors dels càncers de cap i coll, les llàgrimes, etc. La utilització d'aquests fluids presenta també les seves limitacions, ja que les quantitats del líquid i també les concentracions dels eventuais marcadors poden ser molt baixes i, per tant, pot acabar sent difícil la identificació de bons marcadors. L'orina presenta uns avantatges oposats a aquests inconvenients, ja que es pot obtenir de manera no invasiva, en grans quantitats, i és, per tant, ideal per a totes les fases de desenvolupament d'un biomarcador. Els càncers de pròstata i de bufeta són les patologies principals en les quals s'utilitza l'orina per a identificar marcadors (en parlarem més endavant).

En la patologia ginecològica, principalment (però no exclusivament) uterina, i sobretot en el càncer d'endometri, s'utilitza àmpliament el líquid uterí, obtingut a través d'una biòpsia per aspiració amb una pipeta de Cornier per a identificar-hi marcadors de diferents tipus, però principalment genòmics i proteòmics (Pérez-Sánchez *et al.*, 2013) (en parlarem detalladament més endavant).

4. MARCADORS EN EL CÀNCER DE PRÒSTATA

4.1. *El model*

La pròstata és un òrgan d'estructura glandular i fibromuscular que se situa, en l'home, en la base de la pelvis, per sota de la bufeta urinària i travessant longitudinalment la uretra. Anatòmicament, a la pròstata es distingeixen tres zones: perifèrica (ZP), central (ZC) i de transició (ZT). La ZT representa el 20 % de la part glandular i està formada per un petit conjunt de conductes que procedeixen d'un mateix punt d'unió entre els segments proximal i distal de la uretra, que la travessa de dalt a baix. Aquí és on té lloc principalment la hiperplàsia benigna de pròstata (HBP). La ZC és la part menys abundant de la pròstata, representa un 5 % de la massa glandular i envolta els conductes ejaculadors. La ZC conté glàndules amb característiques morfològiques i histològiques que són absents en les altres dues zones. La ZP és la més abundant de la pròstata, conté el 75 % del teixit glandular i és on s'origina principalment el càncer (McNeal, 1968).

Histològicament també trobem una zona glandular i una de no glandular que se situen dintre de la càpsula prostàtica. La part glandular està constituïda per un epitelí glandular que forma àcins i conductes prostàtics, responsables de la funció prostàtica, que és la síntesi i l'acumulació del fluid prostàtic. Aquest s'expulsarà en el moment de l'ejaculació, conjuntament amb la resta de fluids seminals. El fluid prostàtic el fabriquen les cèl·lules secretores dels àcins i conductes de la regió glan-

dular. Els principals components del fluid prostàtic són l'antigen prostàtic específic (PSA, de l'anglès *prostate specific antigen*) i l'enzim PAP, produïts per cèl·lules secretores de totes les zones de la pròstata; el pepsinogen II i l'activador del plasminogen tissular, produïts normalment per la ZC, i la lactoferrina, que és produïda específicament per la ZC.

El PSA és una serina proteasa que fou identificada per primera vegada l'any 1966 en el líquid seminal, motiu pel qual en aquell moment fou anomenada *gamma seminoproteïna*. La seva rellevància com a marcador tumoral no fou establerta fins al 1979, quan es va poder determinar la seva especificitat de teixit. Posteriorment, la FDA en va aprovar el seu ús com a marcador de recurrència del càncer de pròstata en pacients en tractament. Actualment, s'utilitza com a marcador de diagnòstic, i els nivells de PSA sèrics superiors a 4 ng/ml es consideren indicadors de la necessitat de practicar una biòpsia prostàtica (Pienta, 2009).

El càncer de pròstata és actualment la segona causa de mort per càncer en els homes. En països desenvolupats representa un 15 % dels càncers dels homes, mentre que baixa fins a un 4 % en els països en desenvolupament. Dintre de la mateixa Europa conviuen grans diferències en les incidències regionals d'aquesta malaltia.

Des de la introducció del test de PSA sèric a final dels anys vuitanta del segle passat, la detecció de nous casos de càncer de pròstata augmentà sensiblement; aquests diagnòstics es feren, en moltes ocasions, en estadis més inicials del desenvolupament de la malaltia, i es podria dir que, essent tractats abans, molts d'aquests pacients tingueren una evolució millor. Nogensmenys, la mesura del PSA sèric ha mostrat també les seves limitacions, ja que li manca l'especificitat de diagnòstic i el valor pronòstic —és incapaç de distingir entre un càncer indolent i un de molt agressiu. A la vegada, quadres benignes d'inflamació, per exemple, com són la prostatitis o la mateixa HBP, poden mostrar també uns valors de PSA sèric altament elevats. Aquesta falta d'especificitat s'associa també amb l'augment de la negativitat d'un gran nombre de biòpsies prostàtiques i amb un sobrediagnòstic de molts tumors indolents o de baix grau, que aniran seguits d'un augment també considerable de tractaments excessius o sobretractaments (Carter *et al.*, 2012). El PSA, però, és específic de la patologia prostàtica. Cap altre càncer augmenta els nivells de PSA en sang.

Encara avui, i després de nombrosos assajos clínics aleatoris (Stattin *et al.*, 2014), el cribratge massiu del càncer de pròstata a través de les mesures de PSA sèric continua sent un tema força controvertit, motiu pel qual s'han anat introduint diverses modificacions a la mesura directa del PSA en el sèrum; entre les més habituals i més precises, hi trobaríem la mesura de la densitat del PSA, la de la ràtio entre el PSA lliure i el total, l'estimació de la velocitat d'augment del PSA o el temps de duplicació dels valors del PSA, etc. Totes aquestes mesures, no obstant això, presenten també llurs limitacions.

El tacte rectal (*digital rectal examination*) consisteix a realitzar la palpació directa de la pròstata, en concret de la zona perifèrica posterior, que és accessible per via rectal. Aquesta exploració permet obtenir una estimació bastant precisa de la grandària de la pròstata, així com de la textura de la seva superfície posterior (l'única accessible per via rectal). La presència en la palpació de zones de superfícies dures i irregulars seria indicadora de la possible existència d'un càncer en aquella zona (Basler, 2001). La sensibilitat del tacte rectal és també limitada, perquè no tots els càncers es manifesten amb una textura diferent a la del teixit prostàtic normal. També té una baixa precisió en la localització del tumor i està subjecta a una gran variabilitat interobservador, fins i tot entre uròlegs amb molta experiència (Smith i Catalana, 1995).

La biòpsia prostàtica guiada per ecografia transrectal amb anestèsia local es considera, ara, la prova diagnòstica definitiva del càncer de pròstata. Aquesta prova té molts avantatges, si la comparem amb altres sistemes d'imatge, ja que no s'irradia el pacient, el cost és baix i la proximitat de la zona perifèrica posterior de la pròstata es troba just davant del recte, per la qual cosa l'accés és fàcil i precís. Des de la primera descripció, l'any 1989, el conegut esquema de «sextants» de Hodge, la tècnica ha anat millorant i modificant-se per a augmentar-ne l'especificitat. De les sis punxades inicials (apical, mitjana i basal, a dreta i esquerra), s'ha anat augmentant, primer, a dotze i, després, a divuit. Actualment, hi ha assaigs clínics amb moltes més punxades, amb la finalitat de disminuir o d'eliminar els falsos negatius.

El tractament del càncer de pròstata depèn de la presentació de la malaltia, en particular, de l'estadiatge i del grau del tumor, així com també de l'edat del pacient, de les comorbiditats, les preferències personals, etc. En la majoria dels casos, el càncer de pròstata és d'evolució lenta, i, si és diagnosticat molt aviat, la prostatectomia radical és un tractament d'eficàcia elevada, sobretot quan és òrgan confinat, o sigui, que no ha excedit els límits de la càpsula. En moltes ocasions, principalment en pacients d'edat avançada i en els casos de tumors poc agressius, la vigilància activa pot ser el tractament d'elecció a seguir. En resum, en els càncers de pròstata localitzats, aproximadament en el 29 % es fa una vigilància activa, un altre 33 % es beneficia de la radioteràpia, mentre que en el 38 % dels casos es procedeix a fer una prostatectomia radical.

En els casos de presentació avançada, amb afectació de nòduls limfàtics i metastasis òssies, com que és totalment ineficient la prostatectomia radical, es procedeix a tractar els pacients amb teràpies combinades, que inclouen l'ablació androgènica, també la radioteràpia i la quimioteràpia, quan aquests tumors ja deixen de respondre a la castració química (o ablació androgènica) i es converteixen en androgen-independents. En aquests casos, en el termini de dos anys, la majoria desenvoluparan metastasis òssies. Amb la finalitat de proporcionar elements ob-

jectius que ajudin els metges en la presa de decisions, es considera crític poder disposar de bons marcadors que ajudin a diferenciar els tumors agressius que desenvoluparan metàstasis dels que són indolents, i que, en moltes ocasions, no necessitarien cap tractament (Mitin *et al.*, 2013).

4.2. *Marcadors de morfologia: l'índex de Gleason en el càncer*

Els marcadors morfològics, en la majoria dels casos, són probablement els que s'utilitzen des de fa més temps. Són ben conegudes les tècniques de tinció tissular amb hematoxilina i eosina. La primera fou introduïda ja l'any 1865 per Böhmer i el 1875 també per Fischer. Deu anys més tard, Wossowzky va començar a fer servir la mescla d'hematoxilina i eosina com a mètode de tinció dels teixits, per a poder, així, estudiar-ne l'estructura microscòpica.

El microscopi ja havia estat inventat a mitjan segle XVI, concretament l'any 1538, per Zacharias Janssen, als Països Baixos. Al llarg dels segles següents, molts investigadors van anar modificant i millorant aquests microscopis inicials, entre ells, el mateix Galileu, que l'utilitzà en els seus estudis sobre la natura. Més tard, també l'anglès Robert Hooke va realitzar diversos experiments que va publicar en el seu llibre *Micrographia* (1665), amb tots els dibuixos de les seves observacions. També a mitjan segle XVII, Anton van Leeuwenhoek, comerciant holandès, va fer servir microscopis de fabricació pròpia per a descriure protozous, bacteris, glòbuls rojos, espermatozous, etc. Tot i no pertànyer a cap estament professional relacionat amb la medicina o la biologia, se'l considera, encara ara, el fundador de la bacteriologia.

La conjunció de les tincions tissulars per hematoxilina i eosina i la seva observació amb microscopis cada vegada més perfeccionats va permetre que els morfòlegs poguessin estudiar els teixits, les formes d'aquests, etc., de manera ja molt acurada, i anar correlacionant les diferents entitats patològiques amb les seves estructures microscòpiques. Aquest fou el naixement de l'especialitat mèdica coneguda com a *anatomia patològica* o *anatomopatologia*. La paraula *patologia* procedeix del grec, 'estudi' (*logos*) 'del patiment o dany' (*pathos*). El metge italià Giovanni Battista Morgagni es considera el fundador de l'anatomia patològica moderna, i la seva obra *De sedibus et causis morborum per anatomen indagatis* (1761) (Morgagni, 1820) és una de les més importants dins del camp de la literatura mèdica. En aquesta obra s'emfatitza no solament en l'estudi de la forma de la malaltia (o morfologia, *anatomen indagatis*), sinó també en l'estudi de la causa (*de sedibus et causis*).

He volgut fer esment d'aquestes «velles» tècniques per a fer palesa la seva total vigència en el procés diagnòstic actual. En cap cas la morfologia, entesa de la mateixa manera que es va entendre fa dos segles i mig, ha deixat de ser indispensable.

El millor exemple que continua sent d'ús diari dels patòlegs és l'índex de Gleason, indicatiu del grau histològic, utilitzat com a marcador de pronòstic del carcinoma de la pròstata.

Donald F. Gleason (1920-2008) fou un metge i patòleg nord-americà format a la Universitat de Minnesota, i que ocupa un lloc rellevant en la història de la medicina i de la patologia, degut a la descripció que va fer del marcador morfològic que, des de 1966 fins als nostres dies, permet determinar de manera molt precisa l'evolució d'un carcinoma de pròstata. L'any 1962, quan Gleason treballava al Minneapolis VA Medical Center, el cap del Servei d'Urologia, George Mellinger, que liderava, a més a més, un consorci urològic de catorze hospitals nord-americans, demanà a Gleason que intentés desenvolupar un sistema per a mesurar l'evolució del càncer de pròstata, atès que no existia cap marcador que pogués predir si aquell tumor seria agressiu, molt agressiu, si es disseminaria ràpidament o si, al contrari, seria indolent i d'evolució molt lenta i/o no invasiva. Aquesta manca de criteris pronòstics objectius, ja en aquell moment, va confondre els uròlegs en la determinació de quin havia de ser el tractament més adient. Encara que existissin ja sistemes de classificació dels tumors, aquests no suggerien cap orientació terapèutica basada en elements objectius.

En un període inicial de quatre anys, Gleason va poder establir, el 1966, el que és conegut com a *índex de Gleason*, que, únicament amb marcadors de morfològia, estableix una puntuació predictiva molt precisa de l'evolució que seguirà aquell tumor (Gleason, 1966). Gleason va suggerir analitzar dues zones diferents del tumor (per a ser més representatiu de tot el tumor) i atorgar a cada zona una puntuació de l'1 (arquitectura normal de la pròstata) fins al 5 (màxima desestructuració de l'arquitectura prostàtica). Per tant, la puntuació aniria des de 2 punts (1 + 1), que significaria estructura normal, fins a 10 punts (5 + 5), que voldria assenyalar la presència de la màxima destrucció de la pròstata normal, o sigui, pitjor pronòstic o càncer més agressiu i més baixa probabilitat de sobreviure. Gleason va establir el seu índex analitzant les imatges patològiques de les mostres quirúrgiques de 270 pacients amb càncer de pròstata, i correlacionant directament les troballes estructurals amb les dades clíniques d'evolució, sobretot les de supervivència. Aquest estudi inicial de 1966 fou corroborat per ell mateix i el seu grup, posteriorment, en una cohort de més de 4.000 pacients, però també ho ha estat per grups de patòlegs de tot el món en els anys següents. L'índex de Gleason es va anar utilitzant a discreció dels uròlegs, fins que l'any 1987 la majoria d'experts de tot el món en van recomanar obertament el seu ús. Això va coincidir amb l'aparició de la mesura del PSA a la sang, que semblava, en aquell moment, que implicaria el final de l'ús de l'índex de Gleason, atès que la mesura d'un marcador en sang per un mètode immunològic semblava més ràpida i econòmica. El resultat fou tot el contrari: l'ús de l'índex de Gleason i del test de mesura del PSA es van

complementar i esdevingueren, conjuntament, el mètode d'elecció en el pronòstic del càncer de pròstata.

És important esmentar la total vigència de l'índex de Gleason, que es continua utilitzant a tots els centres que avaluen patologia prostàtica.

4.3. *Anàlisi de l'expressió gènica diferencial en càncer: els inicis*

En l'inici d'aquesta memòria, hem donat una definició àmpliament acceptada de *biomarcador*. El definim com la característica que es pot mesurar objectivament i que ens indica la presència o l'absència, en l'organisme que estem estudiant, d'un fenomen biològic normal o patològic (malaltia), o que ens pot assenyalar, també, si hi ha una bona o mala resposta farmacològica davant d'un tractament administrat, etc. Aquesta definició inclou la presència o l'absència de qualsevol molècula de tipus divers que es correlacioni amb l'existència d'un fenotip precís, que pot ser, en oncologia molecular, la presència o l'absència d'un tumor.

Acabant quasi el primer quart del segle XXI, tenim ja diferents tècniques d'alt rendiment (genòmica, transcriptòmica, proteòmica, metabolòmica, etc.) que ens permeten analitzar massivament la presència en mostres biològiques de moltes molècules diverses (biomarcadors), les quals ens indiquin la presència o no de la malaltia que estem estudiant. Trenta anys enrere, quan encara no disposàvem de les tècniques esmentades, els procediments per a aïllar aquests biomarcadors eren més artesanals i complicats.

Com ja hem explicat anteriorment, l'origen dels tumors sòlids, per exemple, consisteix en la transformació neoplàsica d'alguna cèl·lula, que abandona el seu fenotip epitelial per endegar una transició epitelial-mesenquimàtica (TEM) i entra en una successió de mitosis repetides tot obviant els mecanismes de control del cicle cel·lular. Les causes d'aquest procés són múltiples (i no les esmentarem, ja que no formen part d'aquest discurs), però en la majoria dels casos redundaran en un genotip «tumoral» i, per tant, en una expressió gènica diferencial anormal i responsable del fenotip transformat o fenotip tumoral.

De manera que la successió seria que la transformació neoplàsica consisteix en una sèrie de canvis moleculars que porten a una divisió (o multiplicació) descontrolada de la cèl·lula (ja sigui epitelial o mesenquimàtica), que té com a conseqüència el creixement de les cèl·lules —que arriben a constituir una massa tumoral. La TEM s'adquireix per la necessitat d'invasió dels teixits normals que envolten el tumor.

En l'exemple anterior, hem parlat de les modificacions morfològiques o arquitecturals que apareixen en l'evolució del càncer de pròstata, i hem revisat el que és l'índex de Gleason i la seva validesa, encara actualment, en l'establiment del pronòstic d'aquest tipus de càncer. Ara volem presentar-vos alguna de les estratè-

gies emprades en el passat per a aïllar i analitzar els transcrits que apareixen en cèl·lules transformades (o canceroses) comparant-los amb els transcrits que apareixen en cèl·lules no transformades (o normals).

Les mostres de teixit s'obtenen mitjançant la cirurgia, ja sigui prostatectomia radical (per a obtenir teixit de càncer de pròstata), adenomectomia (per a obtenir teixit d'HBP, que es podrà utilitzar com a control), cistoprostatectomia (per a obtenir teixit normal, també de control) o extracció d'òrgans *post mortem* (per a obtenir també teixit prostàtic normal). Les mostres són congelades en espera de l'estudi anatomopatològic posterior. Aquest es farà sobre talls transversals seriatos de tota la superfície de la pròstata per a localitzar, mitjançant la tinció amb hematoxilina i eosina, la zona precisa on es troba el tumor (farem servir una plantilla de plàstic transparent per a ubicar les diferents seccions de teixit analitzades i poder retrobar, posteriorment, la zona tumoral en el bloc de teixit congelat). Una vegada identificades les mostres tumorals en els blocs congelats, procedirem a l'extracció de l'RNA total de mostres aparellades de tumor i teixit no tumoral adjacent, a través d'algun dels mètodes clàssics. Per a l'obtenció posterior dels mRNA, utilitzem un *kit* de purificació comercial que combina les propietats de tiocianat de guanidina (GTC, de l'anglès *guanidine thiocyanate*) amb la selectivitat de l'oligo (dT)-cel·lulosa. L'ús d'una solució rica en GTC garanteix una inactivació ràpida de les RNasa endògenes i, àdhuc, la perfecta preservació dels mRNA. La síntesi final del DNA complementari (cDNA) es duu a terme mitjançant una retrotranscripció per l'enzim retrotranscriptasa MoMLV, utilitzant com a encebador un oligo (dT).

L'anàlisi posterior dels cDNA expressats diferencialment es farà mitjançant una electroforesi comparativa de tots els cDNA obtinguts després de ser marcats arbitràriament amb P33 dATP, a través d'una reacció en cadena de la polimerasa amb transcriptasa inversa (RT-PCR, de l'anglès *reverse transcription-polymerase chain reaction*), que utilitza com a encebador un únic nucleòtid a l'atzar fet a baixa temperatura, que ens permetrà obtenir un patró de bandes reproduïbles en les mostres a comparar (es coneix, en terminologia anglosaxona, com a *RNA-based arbitrarily-primed PCR* o *RAP*, o simplement com a *differential display*). Aquests productes es resoldran en una electroforesi de 6 % d'acrilamida i urea 8M i, després de ser assecats, seran revelats per exposició a un film sensible. La radiografia ens permetrà identificar les bandes diferencials i, prèvia superposició d'aquesta al gel assecat, podrem identificar la ubicació de les bandes d'interès i retallar-les amb un bisturí. Les posteriors elució, subclonació, transformació bacteriana i obtenció massiva del DNA clonat ens permetran acabar la seva seqüenciació i arribar a conèixer el gen o els gens sobreexpressats o infraexpressats en les mostres tumorals quan són comparades amb les no tumorals.

Aquest procediment ens va permetre, l'any 1997, aïllar un nou gen, que vam anomenar *proteïna sobreexpressada en càncer de pròstata* (PTOV1, de l'anglès

prostate-tumor overexpressed 1) (Benedict *et al.*, 2001), i des de llavors i al llarg de tots els anys posteriors s'ha pogut demostrar, pel nostre grup i per d'altres, que és un gen altament expressat en els càncers de pròstata més agressius i amb pitjor pronòstic clínic. També se sobreexpressa en els tumors resistents a la quimioteràpia, principalment als taxans. El PTOV1 indueix la TEM i promou la sobreexpressió d'altres gens, com són el c-Jun, l'Snail1 i la proteïna vimentina, i la infiltració del tumor als teixits veïns. La seva expressió també indueix l'aparició de metàstasis (Cánovas *et al.*, 2017).

4.4. Identificació de marcadors en l'orina: un recurs important per a diagnosticar patologies de la pròstata

Com ja hem comentat anteriorment, els nivells sèrics elevats de PSA, conjuntament amb un tacte rectal positiu, ens indicaran amb molta probabilitat la presència d'un càncer de pròstata (CP). El diagnòstic serà posteriorment confirmat mitjançant una biòpsia prostàtica guiada per ecografia transrectal. L'avaluació d'aquests dos marcadors constitueix, bàsicament, el cribratge del CP al qual tots els homes d'edat superior als cinquanta anys sense antecedents familiars haurien de sotmetre's anualment. És un mètode considerat molt efectiu, a pesar que les causes de l'elevació del PSA sèric poden ser degudes també a la presència d'una HBP considerable o també a una prostatitis crònica. La conclusió és que només entre un 30 % i un 40 % de pacients avaluats així acabaran sent diagnosticats de CP per biòpsia. Aquests pacients hauran de ser biopsiats repetidament si mostren de manera persistent nivells sèrics de PSA elevats. Això és el que s'anomena *dilema del PSA*.

Des de fa ja bastants anys es coneix que les cèl·lules de la pròstata es poden obtenir de l'orina dels pacients, si prèviament es practica el que s'anomena *massatge prostàtic*, que no és altra cosa que exercir una pressió sistemàtica a la zona perifèrica de la pròstata mitjançant la pràctica d'un tacte rectal. Aquesta tècnica va permetre encetar una nova via de diagnòstics de patologies prostàtiques; s'intentava identificar productes varis de la glàndula correlacionant llur presència i variacions quantitatives amb les patologies que s'havien d'estudiar, i es podien obtenir fàcilment grans quantitats d'orina de manera no invasiva. El gen de l'antigen del càncer de pròstata 3 (PCA3, de l'anglès *prostate cancer antigen 3*), aïllat prèviament en teixit de CP, va ser utilitzat inicialment com a marcador de CP en cèl·lules prostàtiques aïllades en les orines dels pacients, i es va aconseguir una sensibilitat i especificitat millors que les que presentava el PSA tot sol. Posteriorment, el nostre grup va poder millorar la sensibilitat i l'especificitat del test combinant diversos biomarcadors en una PCR multiplexada, seguint el que ja s'havia practicat en diversos tests de caracterització dels CP en mostres de teixit (Rigau *et al.*, 2010).

Atesa la gran importància que els falsos negatius i falsos positius tenen en el camp de l'oncologia, el nostre objectiu fou intentar millorar aquests paràmetres i aconseguir un test d'orina multiplexat de CP en el qual es pogués augmentar l'especificitat, mantenint la mateixa sensibilitat que el test del PSA, i poder determinar quins pacients serien susceptibles de ser biopsiats. A la vegada, evitant aquest gran nombre de biòpsies innecessàries, s'obtidria un estalvi econòmic important en el cost sanitari actual.

Tal com hem comentat anteriorment, atesa la multifocalitat i l'heterogeneïtat del CP, el fet de multiplexar diferents biomarcadors permet incrementar l'especificitat sense perdre sensibilitat en el diagnòstic del CP. Mitjançant una anàlisi transcriptòmica per PCR quantitativa (qPCR, de l'anglès *quantitative polymerase chain reaction*) multiplexada, de 154 mostres (37 % amb CP) de sediments d'orines de pacients obtingudes després d'un massatge prostàtic, vam determinar la utilitat de tres biomarcadors de CP: l'antigen de membrana específic de la pròstata (PSMA, de l'anglès *prostate-specific membrane antigen*), present en les cèl·lules epitelials de la pròstata; la proteïna G associada amb receptors d'odorants (PSGR, de l'anglès *prostate-specific G-protein-coupled receptor*), també sobreexpressada en CP, i el ja esmentat PCA3 (RNA no codificant específic de la pròstata). Els resultats demostren que quan fixem la sensibilitat al 34 %, l'especificitat no supera el 17 % si observem cada biomarcador de manera individual. La utilitat dels tres marcadors millora notablement quan estudiem una subpoblació que presenta nivells de PSA en sang d'entre 4-10 ng/ml i no tenim informació d'una biòpsia prèvia («zona grisa del PSA»), en què, si es fixa la sensibilitat al 96 %, l'especificitat és del 50 %.

Els resultats obtinguts demostren que la combinació de diferents biomarcadors proporciona més especificitat a la prova diagnòstica, sense comprometre el valor de sensibilitat del test. Aquesta prova de cribratge, juntament amb els valors de PSA en sang i del tacte rectal, podria ajudar a determinar amb més especificitat quins pacients s'hauran de sotmetre al cribratge definitiu de CP, mitjançant la biòpsia prostàtica, fet que es traduiria en un cribratge més acurat, que, alhora, permetria una reducció en el nombre de biòpsies molt significativa (34 %) i suposaria una millora qualitativa en la vida del pacient —ja que el procediment de la biòpsia prostàtica és dolorós i provoca un malestar important en el pacient—, així com un estalvi econòmic molt rellevant per al sistema de salut (Rigau *et al.*, 2011).

Amb aquests resultats, vam procedir al disseny del test de qPCR multiplexada per a la seva comercialització. Els valors de sensibilitat i d'especificitat eren sensiblement superiors als de l'únic test existent en aquell moment, que es basava també en una qPCR, però d'un únic marcador (PCA3). La mínima coincidència entre ambdues patents, però, va acabar impeding la comercialització del nostre test, tot i ser més sensible i específic que el de PCA3.

4.5. *Descobriments dels microRNA: aire fresc en el camp dels biomarcadors en oncologia*

El descobriment dels microRNA (miRNA) al principi dels anys noranta del segle passat en el *Caenorhabditis elegans* va iniciar una nova etapa en la recerca en càncer, degut a les noves aplicacions, tant en el diagnòstic com en les teràpies, que ben aviat es van poder establir (Lee, Feinbaum i Ambros, 1993).

Inicialment, els miRNA no es van considerar uns actors biològics amb rols importants, sobretot quan es comparaven amb els RNA missatgers (mRNA). Els miRNA constitueixen una classe d'RNA molt abundants, d'una longitud mitjana de 22 bp, que són transcrits però no traduïts en proteïnes (miRNA Base Release). Apareixen molt conservats en l'evolució i la seva funció sembla de regulació de l'expressió gènica, i representen un nou nivell de control dels mecanismes de transmissió de senyals implicats en múltiples funcions cel·lulars. Així doncs, l'expressió anòmla dels miRNA podria tenir un impacte considerable en diversos processos de la biologia cel·lular que poden ser deleteris, i contribuir en el desenvolupament de malalties com el mateix càncer.

Els miRNA exerceixen la seva regulació negativa tant per la via de degradació dels mRNA diana, quan s'uneixen a aquests en una complementarietat quasi perfecta, o per repressió postranscripcional de l'expressió de gens diana, quan s'hi uneixen per complementarietat imperfecta. També s'ha pogut demostrar que els miRNA podrien actuar com a activadors de l'expressió gènica interaccionant amb regions complementàries dels promotors, de les regions codificants, així com en els 3'-UTR dels mRNA diana. Cada miRNA pot regular diversos mRNA, i aquells són sovint millors dianes de les drogues que els mateixos gens o proteïnes (Yekta, Shih i Bartel, 2004).

Fins avui, s'han pogut determinar moltes expressions aberrants o mutacions d'miRNA en càncer, cosa que suggereix que aquests poden, doncs, actuar com a oncogens o com a gens supressors de tumors. El primer descobriment d'un miRNA implicat en un càncer humà fou l'any 2002, quan es va correlacionar el rol dels miR-15a i miR-16-1 amb la leucèmia limfoide crònica. Nombrosos estudis han pogut correlacionar també la implicació de diversos miRNA amb la resistència a les drogues en els tractaments de quimioteràpia en el càncer (Calin i Croce, 2006a).

Tècnicament, és també molt rellevant esmentar que els miRNA són altament resistents a la degradació pels enzims RNAsa, fet que els fa mantenir-se molt estables en mostres de teixits exposades, a la vegada que també en mostres antigues parafinades. Aquest és un detall important perquè, a causa d'aquesta característica, s'han pogut dur a terme molts estudis amb mostres tumorals d'arxius en parafina, correlacionant la presència d'alguns miRNA amb l'evolució clínica que el

pacient va tenir. Coneixent, doncs, la implicació d'aquests miRNA precisos, es pot, prospectivament, utilitzar aquesta informació per a predir l'evolució de nous pacients (Calin i Croce, 2006b).

És ben sabut que els pacients afectats d'un càncer i que no el superen, en un 95 % dels casos és a causa de les metàstasis. L'aparició d'aquestes, principalment en els ossos, en els pacients afectats de CP representa una complicació molt greu i actualment sense cap tractament eficaç; sorgeixen en un 70 % dels pacients amb CP metastàtic. Quan el tumor esdevé androgen-independent, és a dir, que no respon a la privació androgènica, el procés de disseminació s'instaura ràpidament i els ossos són una destinació important de les cèl·lules tumorals. Aquest tipus de tumor és multifocal, amb una heterogeneïtat cel·lular, amb perfils genètics diferents en les soques de cèl·lules metastàtiques, que tindran un gran impacte en l'eficiència de la quimioteràpia posterior. Les metàstasis òssies tenen conseqüències devastadores per als pacients, com són dolor, hipercalcèmia, síndromes de compressió nerviosa, etc., i aquests tumors esdevenen totalment incurables (Weilbaecher, Guise i McCauley, 2011).

Les cèl·lules tumorals circulants que originen les metàstasis ho podran fer amb més o menys eficàcia en funció del microentorn que trobin, que pot ser favorable o no a l'ancoratge i la posterior multiplicació d'aquestes (teoria de *seed and soil*, 'llavor i sòl', de Paget). Assumint que les cèl·lules disseminades responsables de la generació de les metàstasis en el moll de l'os provenen dels tumors primaris, les estratègies de selecció clonal en models preclínic de CP poden contribuir a generar coneixement útil per a abordar, posteriorment, els possibles tractaments de les metàstasis amb més eficàcia.

Com hem explicat al principi d'aquest capítol, els miRNA són importants reguladors de l'expressió gènica i tenen la capacitat de regular molts gens a la vegada i redirigir diverses vies biològiques. Ja hem comentat que aquests miRNA estan apareixent com a eines de gran importància en el diagnòstic, pronòstic i tractament de pacients amb càncer. La mateixa desregulació de l'expressió de diversos miRNA en cèl·lules canceroses pot modular en sentit positiu o negatiu la progressió dels tumors, incloent-hi també el desenvolupament de les metàstasis òssies.

Diferents estudis, entre els quals el nostre, han permès identificar soques de cèl·lules de CP implicades en el desenvolupament de metàstasis òssies en models preclínic. Mitjançant injeccions intracardíaques de cèl·lules de CP en animals d'experimentació, es van poder seleccionar les que originaven les metàstasis amb més eficàcia, i, en un estudi posterior d'expressió gènica amb tècniques d'alt rendiment, es van seleccionar miRNA implicats en el desenvolupament de les metàstasis òssies en CP. L'evidència dels nous rols d'aquests miRNA permet suggerir el disseny de nous tractaments dirigits, que probablement puguin arribar a ser més eficaços que els actuals (Olivan *et al.*, 2021).

5. MARCADORS DEL CÀNCER D'ENDOMETRI

5.1. *El model*

L'úter és l'òrgan reproductor cabdal en les femelles i fa la funció d'albergar els embrions al llarg de tot el procés de gestació. Té una coberta externa serosa (perimetri), la qual recobreix totalment l'estructura muscular principal (miometri), que, en condicions d'absència de gravidesa, romandrà encongida i replegada sobre si mateixa —mostrarà la mida d'un puny tancat. Les seves parets són gruixudes i tenen una gran capacitat de distensió per a poder incloure un fetus al llarg de tota la gestació; per tant, adquirirà una grandària i un pes considerables segons l'espècie. L'úter està recobert interiorment per un epitel·li o endometri, on pròpiament niarà l'embrió. Aquest epitel·li és altament canviant al llarg del cicle menstrual (des de la seva total destrucció durant la menstruació fins a la nova reconstrucció, en només dues setmanes, que el deixa preparat per a la nidificació del nou embrió), gràcies a la regulació a la qual està sotmès per les hormones ovàriques de la reproducció (estrògens i progestàgens, principalment). Aquesta ràpida reconstrucció en només dues setmanes fa palesos uns canvis massius en l'expressió gènica en un espai de temps molt curt, cosa que, en molts aspectes, s'assembla també al creixement neoplàsic dels tumors.

El càncer uterí fou descrit per primera vegada per un metge bizantí d'Alexandria anomenat Paul d'Aegina (625-690), el qual, en un compendi de set llibres de medicina, feia, per l'època, una descripció exhaustiva del càncer en general, però del d'úter i de mama en particular. En aquell moment, aquest autor ja va descriure l'extirpació de l'úter com a teràpia contra la patologia tumoral.

En l'actualitat, el càncer d'endometri és la quarta neoplàsia més freqüent en la dona en els països desenvolupats i el primer càncer més comú en el tracte genital femení. La incidència mundial s'acosta als dos-cents mil nous casos diagnosticats cada any. A l'Hospital Vall d'Hebron, on hem dut a terme principalment els nostres estudis, se'n diagnostiquen uns vuitanta nous casos anualment. Tot i aquesta alta incidència, aquest tipus de càncer mostra una baixa mortalitat (15 % dels casos diagnosticats), degut principalment a la seva detecció precoç, associada a la presència d'una metrorràgia. Aquesta detecció precoç i el fet que l'edat més freqüent de presentació sigui durant la menopausa, fa que la histerectomia o l'extirpació quirúrgica de l'úter sigui una teràpia d'elecció altament curativa, llevat dels casos en els quals s'hagi pogut produir ja una disseminació a distància. El 97 % de tots aquests tumors s'originen a partir de les glàndules de l'endometri, motiu pel qual reben el nom de *carcinomes*. El carcinoma d'endometri es classifica segons el tipus histològic, i el tipus I o endometriode (per la seva semblança amb l'endometri normal) és el més freqüent (85 %), mentre que el 15 % restant o de tipus II o no endometriode agrupa el carcinoma papil·lar serós i el de cèl·lules clares, prin-

principalment. El carcinoma endometrioides és hormonodependent i normalment ve precedit per una hiperplàsia simple i complexa. El de tipus II o no endometrioides no és hormonodependent ni està precedit per lesions preneoplàsiques precursors (Esteller i Reventós, 1996). Aquest model, anomenat *dualístic*, ha estat àmpliament acceptat i continua sent vigent, encara que, amb l'acabament, el 2013, del projecte Atlas del Genoma del Càncer (TCGA, de l'anglès The Cancer Genome Atlas), molts nous elements moleculars basats en la seqüenciació dels gens implicats en la carcinogènesi del càncer d'endometri van permetre la realització d'una nova classificació més precisa, sobretot en la consideració de la presa de decisions terapèutiques. Les anàlisis del TCGA, basades principalment en la seqüenciació de la majoria dels gens coneguts pel fet d'estar mutats en el càncer d'endometri, i centrades principalment en els de tipus endometrioides i serosos, evidencien més heterogeneïtat de la malaltia, amb la identificació de quatre subgrups diferents moleculars i la proposta d'una nova classificació basada en una caracterització genòmica completa de tots els subtipus de càncer d'endometri. En concret, es van estudiar 373 casos de càncer d'endometri genòmicament, transcriptòmicament i també amb la definició dels seus perfils proteòmics (Cancer Genome Atlas Research Network *et al.*, 2013).

Els quatre subgrups moleculars definits pel TCGA són els següents:

— POLE ultramutat (*POLE ultramutated*): aquest és el grup més petit (10 %, aproximadament, dels càncers d'endometri endometrioides). Es caracteritza per mutacions en el domini exonucleasa de POLE. Amb una càrrega alta de mutacions i un pronòstic excel·lent. Al voltant del 60 % dels POLE ultramutats són endometrioides de grau alt.

— Inestabilitat de microsatèl·lits (*microsatellite instability*): aquest grup es caracteritza per la presència de metilació del promotor d'MLH1 i també un grau alt de mutacions. Els tumors són preferentment endometrioides i el gen PTEN és el més comunament mutat. El pronòstic és menys bo que en els POLE o intermedi.

— Baix nombre de còpies (*copy-number-low*): s'inclouen aquí els tumors endometrioides de graus 1 o 2, amb baixa capacitat de mutació, i afecta també, majoritàriament, el gen PTEN. Pronòstic intermedi.

— Elevat nombre de còpies (*copy-number-high*): en aquest grup trobem els tumors serosos. La mutació principal és en el gen TP53 i el pronòstic és dolent.

Com ja hem comentat, el càncer d'endometri es detecta, generalment, en fases inicials, quan el tumor està encara confinat exclusivament a la cavitat uterina. Tot i així, un percentatge considerable de pacients presenten recurrència, fins i tot anys després del seu primer tractament. És per això que és molt important poder establir amb precisió quins serien els millors marcadors de pronòstic i de predicció de resposta als tractaments, amb la finalitat de poder fer la millor i més apropiada selecció, tant dels tractaments primaris com dels coadjuvants.

Els factors de pronòstic del càncer d'endometri s'han dividit clàssicament en intrauterins i extrauterins. Els intrauterins, o simplement, uterins, són principalment el tipus histològic, el grau histològic, la profunditat de la invasió del miometri, la invasió vascular, la implicació del coll uterí, la ploïdia i l'estatus dels receptors hormonals. Entre els factors extrauterins més importants trobem la citologia peritoneal positiva, la disseminació anaxial, les metàstasis limfàtiques regionals (ganglis pelvians i paraaòrtics) i les metàstasis peritoneals. Tots aquests factors estan recollits en l'escala FIGO i orienten adequadament pel que fa al pronòstic.

Els factors pronòstics adients per a procedir a fer un estadiatge correcte d'un tumor i determinar el risc de recurrència de cada pacient s'han d'avaluar abans, durant i després del tractament quirúrgic. L'extensió de la cirurgia es decidirà basant-nos en un estadiatge prequirúrgic (tipus histològic i grau del tumor, profunditat de la invasió del miometri i extensió del tumor al coll uterí), així com també es tindrà en compte l'estat general mèdic de la pacient. L'estadiatge final del tumor es determinarà sempre després de la cirurgia i s'anomena *estadiatge clínic/patològic* (vegeu la revisió a Esteller, Xercavins i Reventós, 1999).

Són d'importància cabdal totes les exploracions que s'inclouen en l'avaluació de la pacient abans del tractament o dels tractaments, com ara la història familiar completa, l'exploració clínica exhaustiva, les ecografies transvaginals o transrectals, així com les anàlisis patològiques (grau i tipus histològic) de les biòpsies practicades per histeroscòpia o per aspiració. Aquesta darrera és de gran importància, degut a la facilitat amb la qual es pot realitzar, de manera mínimament invasiva —només amb una sedació lleugera—, sense provocar lesions tissulars i en entorn primari. L'inconvenient de la biòpsia per aspiració és que, en alguns casos, el material obtingut pot arribar a ser insuficient o dubtosament informatiu. La biòpsia per histeroscòpia, també per via vaginal, és dirigida directament cap al punt de l'endometri suposadament patològic, en el qual s'origina el sagnat. Per tant, en aquest sentit, l'obtenció del teixit cancerós serà precisa, sota control òptic, i no a l'atzar com en la biòpsia per aspiració.

Al llarg de tots els anys durant els quals hem desenvolupat els nostres estudis, han anat apareixent nous marcadors de diagnòstic, de pronòstic i de predicció de resposta als tractaments. Les anàlisis moleculars, sobretot de seqüenciació massiva, han permès avançar en la millora de la classificació dels diferents tipus de tumors. L'exemple del TCGA que hem revisat breument ens ho demostra. Tot i així, el cert és que pocs o quasi cap d'aquests marcadors són altament informatius, i la cerca constant de nous biomarcadors continua estant sempre molt justificada per a la millora del diagnòstic, del tractament i de l'evolució de les nostres pacients.

5.2. Anàlisi de l'expressió diferencial en el càncer d'endometri mitjançant l'ús de bioxips d'expressió

Els avenços en el coneixement de les bases moleculars de la transformació neoplàsica, que es produeixen gràcies a l'evolució ràpida de les tecnologies d'anàlisi cel·lulars i moleculars, estan permetent en els darrers anys redefinir el que és íntimament la malaltia oncològica, atenent, sobretot, als mecanismes descrits i a les molècules implicades en últim terme, als canvis fenotípics i bioquímics del càncer.

Les anàlisis de l'expressió diferencial les trobem entre les estratègies de recerca més utilitzades en les fases inicials dels amplis estudis moleculars, i han pogut dur-se a terme en la majoria dels sistemes biològics, incloent-hi tots els tipus de tumors que afecten els humans. Inicialment, la tecnologia emprada era lenta i quasi artesanal, limitada a poques mostres, però la implantació progressiva de les anomenades *tècniques d'alt rendiment* ha precipitat la vasta ampliació del coneixement fisiopatològic molecular, amb la identificació d'actors implicats en la transformació neoplàsica que podrien (o no) ser marcadors de la malaltia o també, en el millor dels escenaris possibles, dianes terapèutiques que, si s'aconsegueix anul·lar-les, podria fer pensar en una aturada de la progressió de la malaltia. El que sí que és clar és que el primer pas a seguir davant de qualsevol malaltia (com és el cas del càncer) és procedir a la identificació dels actors importants que en són responsables.

En aquest primer exemple us presentem l'anàlisi d'expressió diferencial en el càncer d'endometri de tipus endometrioid (EEC, de l'anglès *endometrioid endometrial carcinoma*) utilitzant bioxips de cDNA amb 8.345 seqüències, la majoria corresponents a gens coneguts. Es va comparar l'expressió de tots aquests gens mitjançant una hibridació diferencial entre quatre EEC i dos *pools* d'endometris atròfics normals i dos d'endometris normals proliferatius (Planagumà *et al.*, 2004). La utilització d'aquests dos *pools* ha servit per a obtenir la línia d'expressió bàsica de l'endometri no tumoral postmenopàusic i de l'endometri no tumoral premenopàusic. Per a eliminar també els falsos positius, en la comparació entre l'endometri normal proliferatiu i l'atròfic, els gens amb valors entre 1,25x i 0,75x es van descartar.

En l'anàlisi d'expressió gènica diferencial comparativa entre cada mostra d'EEC i les d'endometri atròfic, les mostres que es troben entre 1,25x en el rang superior i 0,75x en el rang inferior es van considerar com a nivells basals. Una vegada processat i escanejat el filtre d'hibridació, vam poder identificar 53 seqüències de cDNA ($P < 0,05$), que corresponien al 0,63 % de la totalitat de les seqüències presents en el filtre (vegeu resultats complets a Planagumà *et al.*, 2004).

Entre els gens sobreexpressats, hi trobem el RUNX1/AML1 (*runx-related transcription factor 1 / acute myeloid leukemia 1*), que és un oncogen àmpliament

descriu per la seva implicació en la leucèmia mieloide aguda. Aquest gen es troba freqüentment translocat en la leucèmia. RUNX1/AML1 té un rol molt important en la regulació de l'expressió de gens diversos implicats en el desenvolupament de les cèl·lules hemopoètiques, i la seva disfunció desregula els mecanismes de proliferació i diferenciació cel·lulars. La funció de RUNX1/AML1 com a estimulador de la transició de la fase G1 a la S havia estat demostrada ja prèviament per Bernardin i Friedman (2002). Aquests autors també van demostrar que RUNX1/AML1 activava la transcripció de diversos gens crítics en la transició G1-S. La sobreexpressió de la protooncoproteïna RUNX1/AML1 en cèl·lules NIH3T3 va demostrar una inducció de la transformació neoplàsica. Finalment, Ramaswamy *et al.* (2003) van poder caracteritzar RUNX1/AML1 com un dels disset gens associats a una signatura molecular inductora de metastasis en càncers com els de mama, d'ovari i d'úter.

Per a confirmar i validar els resultats del bioxip, es van analitzar a continuació els nivells d'expressió del gen RUNX1/AML1 en un panel de trenta EEC, mitjançant una PCR quantitativa en temps real. El panel de les mostres tumorals incloïa EEC des de baix nivell infiltrant fins als de màxim nivell infiltrant, el que ens permetria no únicament validar els resultats de la sobreexpressió de RUNX1/AML1 a EEC, sinó també definir els nivells d'expressió gènica en funció de l'estadiatge del tumor. Els resultats van confirmar la sobreexpressió de RUNX1/AML1 en els EEC analitzats, quan aquesta va ser normalitzada amb els nivells d'expressió en els endometris atrofics i en els proliferatius. Els màxims nivells d'expressió corresponien als EEC de l'estadi IB, que són els tumors amb una infiltració del miometri de més del 50 %, mentre que aquests nivells eren inferiors en els EEC amb mínima infiltració del miometri (menys del 50 %). Curiosament, també mostraven alts nivells d'expressió els EEC que, tot i ser menys invasius en l'àmbit del miometri, sí que havien envaït el coll de l'úter.

Posteriorment, els nivells d'RNA sobreexpressats en els EEC es van corroborar en l'àmbit de la proteïna per transferència Western. La conclusió fou que els nivells de la proteïna RUNX1/AML1 es correlacionaven amb els nivells d'RNA, a la vegada que també mostraven la seva sobreexpressió quan es comparava amb els endometris atrofics (Abal *et al.*, 2006).

L'anàlisi de l'expressió de la proteïna també es va avaluar *in situ* amb la tecnologia d'immunohistoquímica en bioxips de teixit (TMA, de l'anglès *tissue microarray technology*). En aquest cas, es van confeccionar els bioxips amb mostres incloses en parafina d'endometris atrofics, d'hiperplàsies simples i complexes i d'EEC. En els endometris atrofics no es va detectar tinció nuclear positiva per RUNX1/AML1. En referència a les mostres d'EEC, la tinció positiva de RUNX1/AML1 era molt positiva en les glàndules epitelials, mentre que era negativa en el compartiment estromal. Aquest és un resultat important, perquè en determina

clarament l'origen específicament epitelial i n'exclou la possible contribució de l'estroma en els estudis inicials amb RNA total obtingut d'homogenats d'EEC. A una magnificació de seixanta augments, es pot apreciar més tinció citoplasmàtica, a més a més d'una lleugera tinció nuclear puntual. La tinció citoplasmàtica d'aquest factor de transcripció ens suggereix l'existència d'una acumulació de proteïna citoplasmàtica que serà eventualment translocada al nucli, on ha d'exercir la seva funció. El marcatge positiu nuclear reforça el rol de factor de transcripció prèviament descrit per RUNX1/AML1 en altres sistemes (el domini Runt seria el responsable de la unió al DNA i també de l'heterodimerització amb altres proteïnes complementàries, com PEBP2beta/CBFbeta. Aquests resultats suggereixen que el trànsit de RUNX1/AML1 entre el nucli i el citoplasma pot representar un nivell addicional de regulació en l'EEC).

En el bioixip de teixit, quan es compara la tinció de la proteïna RUNX1/AML1 en l'endometri atrofí, la hiperplàsia simple, la hiperplàsia complexa i l'EEC, que són entitats patològiques seqüencials, es pot observar una gradació en augment, des de la negativitat quasi absoluta —en el cas de l'endometri atrofí—, fins a una màxima expressió —en el cas dels EEC. Aquesta gradació correspon a l'augment de l'expressió de RUNX1/AML1, a mesura que el procés de tumorogènesi progressa des de l'endometri atrofí, passant per la hiperplàsia simple i la complexa, fins a arribar al carcinoma (Planagumà *et al.*, 2004).

En conclusió, l'estratègia presentada en aquest treball, a més d'ajudar-nos a entendre la tumorogènesi de l'endometri, ens aporta nova informació respecte als que podrien ser nous gens diana o també eines útils en el diagnòstic d'aquest càncer. El fet que aquest gen estigui associat als esdeveniments inicials de la infiltració del miometri suggereix que RUNX1/AML1 podria esdevenir un nou marcador de pronòstic i/o una nova diana terapèutica per a millorar el curs clínic de les pacients amb EEC.

5.3. Diagnòstic molecular del càncer d'endometri

Com hem comentat anteriorment, el càncer d'endometri debuta habitualment amb la presència d'un sagnat vaginal, que, en dones postmenopàusiques, orienta ràpidament cap a aquesta patologia. Hem explicat quin és el protocol diagnòstic a seguir davant d'aquesta situació, i, entre d'altres, es preveu de manera immediata la biòpsia per aspiració per a obtenir teixit de l'endometri que es pugui analitzar. La biòpsia per aspiració és una exploració mínimament invasiva, en la qual no es produeix cap lesió tissular, motiu pel qual no caldrà disposar de proves de coagulació de la pacient, i es pot realitzar en un entorn no quirúrgic. El procediment consisteix en la introducció d'una cànula de plàstic per via vaginal fins al mateix fons de l'úter. A través d'aquesta cànula, que es connecta a un aspirador,

s'extreu tot el que hi hagi de detritus cel·lulars dintre de l'úter que resulten de la descamació de l'epiteli de l'endometri. Hi trobarem també hematies, degut al sagnat de la paret, així com altres tipus cel·lulars. L'anàlisi posterior d'aquesta mostra per un patòleg expert pot permetre la identificació de teixit de l'endometri tumoral o en procés de transformació (amb l'aparició, per exemple, de canvis hiperplàsics, etc.). El resultat també pot ser totalment negatiu, i que no es trobi cap anomalia morfològica en l'aspirat o, senzillament, que no s'hagi pogut obtenir prou material intrauterí per a ser analitzat.

Des dels anys noranta del segle passat, podem anar trobant nombrosos estudis que han cercat l'aïllament de nous marcadors moleculars en peces quirúrgiques de tot tipus, incloent-hi els càncers i, en particular, en els tumors extirpats de qualsevol tipus. L'endometri no n'ha estat cap excepció, com hem explicat en el punt anterior, i el nostre grup, com molts d'altres, hem intentat identificar transcrits diferencialment expressats en els tumors en ser comparats amb el teixit sa. Al nostre laboratori vam procedir a comparar mostres de carcinomes d'endometri amb teixit de l'endometri normal, i així vam poder identificar molts nous marcadors expressats diferencialment en tumors, no en teixit sa. L'expressió d'aquests nous candidats a marcadors tumorals fou també confirmada en l'àmbit de la proteïna a través de tècniques d'immunohistoquímica i de transferència Western (vegeu-ne detalls a Colás *et al.*, 2011).

Posteriorment, vam investigar si aquesta expressió diferencial observada en teixit de carcinoma d'endometri es podia trobar igualment en el teixit obtingut mitjançant la biòpsia per aspiració. Novament, les mostres tumorals ($n = 26$) procedien de carcinomes d'endometri i d'altres tumors de l'endometri de tipus II que foren comparats amb mostres de donants sanes ($n = 24$, incloent-hi endometris atrofics, endometris normals de dones postmenopàusiques amb pòlips i altres mostres de dones premenopàusiques consistents en endometris en fase secretora i proliferativa del cicle menstrual). Els resultats van confirmar l'expressió diferencial en les mostres d'aspirats entre pacients amb carcinoma d'endometri i donants sanes. La sensibilitat i l'especificitat de cada nou marcador van ser avaluades per la mesura de l'àrea sota la corba de rendiment diagnòstic (AUC ROC) per cada gen, en els aspirats i en mostres quirúrgiques. Els resultats confirmaren la validesa de la utilització de les mostres d'aspirats per a avaluar l'estat dels marcadors seleccionats (Colás *et al.*, 2011) i, en conseqüència, la viabilitat d'un test de diagnòstic molecular de carcinoma d'endometri que valorés l'expressió dels marcadors prèviament identificats en mostres quirúrgiques, però mesurant-los en les mostres dels aspirats uterins. Aquesta podria ser la millor opció per a avançar cap a un diagnòstic precoç, que es podria encetar ja en el mateix moment del primer contacte entre la pacient i el metge, ja que la biòpsia per aspiració és, com hem explicat prèviament, mínimament invasiva i no produeix cap lesió. En el supòsit de poder

obtenir aquest diagnòstic amb les mostres dels aspirats, es podrien reduir les exploracions i intervencions múltiples que normalment es fan en les pacients per arribar al diagnòstic final.

Així doncs, mitjançant l'ús de la PCR quantitativa en mostres d'RNA extretes de mostres d'aspirats uterins, es van mesurar els nivells d'expressió dels vint gens identificats prèviament i implicats en els canvis morfològics del càncer d'endometri (Colás *et al.*, 2011).

Es van crear cinc algorismes basats en combinacions de cinc gens i es va investigar la capacitat de cadascun d'aquests de diagnosticar el càncer d'endometri, en un assaig clínic prospectiu, amb cegament doble i multicèntric, en el qual es van reclutar 514 pacients que presentaven un sagnat uterí anormal. El càncer d'endometri es va diagnosticar en 60 de les 514 pacients (12 %). Les anàlisis moleculars es van realitzar en les mostres dels aspirats uterins i els resultats es van comparar amb els diagnòstics histològics finals obtinguts de les biòpsies per aspiració, o de les biòpsies per histerectomies o de les peces quirúrgiques extirpades per cirurgia. L'algoritme número 5 va resultar el millor classificador en els estudis de cas-control i validació; va tenir una sensibilitat del 81 %, una especificitat del 96 %, un valor predictiu positiu (VPP) del 75 % i un valor predictiu negatiu (VPN) del 97 % (Pérez-Sánchez *et al.*, 2013). La combinació de tots aquests paràmetres amb els resultats del diagnòstic histològic millorava els resultats presentats, i feia augmentar la sensibilitat fins al 91 %, l'especificitat fins al 97 %, el VPP fins al 79 % i el VPN fins al 99 %, i els casos que podien ser diagnosticats per aspiració uterina augmentaven del 76 % al 93 % en combinar-los amb el test molecular. Així doncs, la incorporació d'aquest diagnòstic molecular ha permès incrementar la fiabilitat dels diagnòstics negatius, reduir la necessitat de practicar histeroscòpies i ajudar a identificar casos addicionals.

6. MARCADORS DE CÀNCER D'OVARI

6.1. *El model*

El càncer d'ovari és el cinquè càncer més freqüent del tracte ginecològic, a la vegada que el més letal en les dones de l'hemisferi occidental. Les estadístiques més recents dels Estats Units, per exemple, comptabilitzen uns 25.000 casos nous de càncer d'ovari diagnosticats anualment en aquell país, al mateix temps que unes 15.000 pacients moren d'aquesta malaltia (Bray *et al.*, 2018). El mal pronòstic d'aquest tumor es deu principalment a tres motius: al seu inici insidiós i asimptomàtic, que n'endarrereix sempre el diagnòstic; a la manca de mètodes mínimament invasius per a diagnosticar la malaltia quan ens trobem en els estadis inicials de l'aparició d'aquesta semiologia, ja definida com a insidiosa, i, finalment, a l'ad-

quisició notòria d'una gran resistència al tractament quimioteràpic després d'una bona resposta inicial.

Davant d'una exploració clínica sospitosa, l'ecografia transvaginal i la determinació de l'antigen CA-125 (Bast *et al.*, 1983) en la sang de la pacient constitueixen les proves que es practiquen per a precisar el diagnòstic. Nogensmenys, el diagnòstic final sempre es farà amb la cirurgia. Si en el moment de la intervenció quirúrgica i de la posterior anàlisi anatomopatològica es conclou que la malaltia està confinada en el mateix ovari (estadi I), la supervivència als cinc anys excedeix el 90 %; malauradament, només un 15 % de totes les pacients es troben en aquesta situació. La gran majoria (80 %) són diagnosticades en els estadis III i IV, moments en els quals ja presenten metàstasi a distància i, a pesar de la bona resposta inicial a la quimioteràpia observada, la supervivència és aquí ja molt baixa (Bray *et al.*, 2018). En els casos de càncer d'ovari ja avançat, la resistència a la quimioteràpia primària (basada en platí) apareix en la majoria de les pacients (70 %) durant el tractament (Markman i Bookman, 2000). La majoria de les pacients recidiven al cap de dos o tres anys del primer tractament quimioteràpic, i els tractaments posteriors amb altres drogues (topotecan, doxorubicina, gemcitabina, paclitaxel, docetaxel, etc.) són sensiblement menys eficaços que la quimioteràpia primària. Malauradament, hem d'admetre que en els darrers trenta anys cap agent quimioteràpic ha demostrat eficàcia notòria després del tractament inicial amb platí. En conclusió, creiem que fora important poder discriminar entre les pacients que es beneficiaran del tractament quimioteràpic i les que no ho faran, ja que això podria tenir implicacions clíniques en el curs de l'evolució de la malaltia.

El coneixement de les bases moleculars de la transformació neoplàsica d'aquest i d'altres tumors ens permetria als metges poder orientar més racionalment les teràpies a administrar, a la vegada que contribuiria a un disseny millor de les noves estratègies terapèutiques. Els darrers avenços en les tecnologies moleculars i, en particular, les d'alt rendiment —com la genòmica, la transcriptòmica, la proteòmica, la metabolòmica, etc.—, però també l'epigenètica i el progrés en tecnologies més antigues encara que molt vigents —com la mateixa bioquímica, la immunologia o les anàlisis morfològiques diverses, etc.—, ens permetran, amb tota certesa, progressar en un millor coneixement de les malalties i també en la seva curació.

6.2. *Perfils proteòmics en sang: una solució possible per al càncer d'ovari?*

Com ja hem avançat, la falta d'especificitat de tota la semiologia associada al càncer d'ovari ocasiona sempre un gran retard en el seu diagnòstic. Hi ha, doncs, una gran necessitat de descobrir biomarcadors específics del càncer d'ovari que

ens puguin permetre un diagnòstic més avançat en el temps, i, a la vegada, millorar les taxes de supervivència. A més a més, el càncer d'ovari presenta una gran heterogeneïtat intertumoral i intratumoral, amb diverses anomalies genètiques molt diferents les unes de les altres, així com respostes molt variades als tractaments. L'eventual descobriment de marcadors de predicció millors ens permetria, almenys, poder identificar si les pacients es beneficiaran o no de certes teràpies (Roett i Evans, 2009).

Com ja hem dit en la introducció d'aquest capítol, el CA-125 és el marcador més conegut i utilitzat en el càncer d'ovari (Bast *et al.*, 1983). La seva determinació en sang perifèrica és molt útil i informativa per a monitorar la resposta al tractament. Aquest marcador també es volia fer servir per al cribratge de la malaltia, però la seva baixa sensibilitat —ja que la seva expressió només augmenta en menys del 50 % dels càncers d'ovari en estadis inicials— i també la baixa especificitat —ja que aquesta expressió augmenta també en malalties ginecològiques benignes, com són, per exemple, l'endometriosi o, fins i tot, d'altres de fora del tracte ginecològic, per exemple, al pulmó, la mama i la pròstata (Roett i Evans, 2009)— fan que el CA-125 no sigui un bon marcador de cribratge. L'ús sistemàtic de les mesures de CA-125 en pacients amb antecedents familiars de càncer d'ovari no ha aconseguit reduir-ne la mortalitat. Així doncs, i com a mesura per a millorar-ne el cribratge, les determinacions dels valors de CA-125 són més informatives quan ens referim als canvis en el temps que en els valors absoluts en moments concrets. Al llarg dels darrers anys, altres marcadors com l'OVX1, l'M-CSF, el CA-15-3 i el CA-19-9 han estat proposats en articles acadèmics. Només l'OVX1, que és un marcador de les mucines, ha pogut demostrar un cert potencial diagnòstic (Osman *et al.*, 2008).

Malgrat l'interès creixent i constant per a identificar biomarcadors sèrics de qualsevol malaltia, la veritat és que han estat molt pocs els nous marcadors apareguts i validats en els darrers anys. En aquesta última dècada, si més no, hem experimentat un gran desenvolupament de tecnologies analítiques d'alt rendiment, com són les tècniques de l'espectrometria de masses, de bioxips, de seqüenciació massiva, etc., que hem de pensar que sí que ens permetran abordar noves estratègies d'identificació de marcadors, però que estaran probablement orientades a la determinació de grans grups de molècules més que no pas a marcadors individuals, com ho entenem en un sentit clàssic.

En les darreres dues dècades, han proliferat els estudis que tracten d'identificar grups de marcadors de càncer d'ovari utilitzant les esmentades tècniques d'alt rendiment. El més notable fou l'encapçalat pels investigadors Emmanuel Petricoin i Lance Liotta, del National Cancer Institute dels Estats Units, en el qual presentàvem un perfil proteòmic en sèrum capaç de discriminar les pacients afectades de càncer d'ovari de les dones control normals amb una sensibilitat i

especificitat properes al 100 %, i, per tant, útil en el cribratge d'aquesta malaltia (Petricoin *et al.*, 2002).

El perfil proteic sèric, sobretot pel que fa a les proteïnes de baix pes molecular, reflecteix l'estat patològic dels òrgans i pot ajudar en la detecció primerenca dels càncers. Les tècniques de proteòmica d'alt rendiment, a saber, la ionització-desorció amb làser assistida per una matriu amb l'analitzador de masses de temps de vol (MALDI-TOF, de l'anglès *matrix-assisted laser desorption and ionisation time-of-flight*) i la ionització per desorció amb làser sobre superfícies reforçades amb l'analitzador de masses de temps de vol (SELDI-TOF, de l'anglès *surface-enhanced laser desorption and ionisation time-of-flight*), poden analitzar amb precisió els perfils proteics en aquests rangs. Degut als milers de proteïnes detectades, els mètodes analítics bioinformàtics han hagut de posar-se a punt per poder estudiar els resultats. Aquests autors van analitzar perfils proteòmics sèrics de pacients ja diagnosticades de càncer d'ovari, tant en estadis inicials com en tumors ja disseminats (*training set*, $n = 50$), i els van comparar amb les mateixes anàlisis proteòmiques fetes en mostres de dones control (voluntàries sanes, pacients amb patologia ginecològica benigna, etc.), també amb una $n = 50$. L'algoritme iteratiu utilitzat va aconseguir discriminar completament la presència de l'absència del càncer. El patró establert es va fer servir per a classificar un grup de 116 mostres anonimitzades, entre les quals hi havia 50 pacients amb càncer d'ovari i 66 dones sanes o amb patologia ginecològica benigna. D'aquests 66 casos, 63 van ser identificats com a no portadores d'un càncer. Aquest resultat ens dona una sensibilitat del 100 % (95 % CI 93-100), una especificitat del 95 % (87-99) i un valor predictiu positiu del 94 % (84-99).

Aquests resultats es van aconseguir disminuint al màxim el nombre de biomarcadors sense reduir ni la sensibilitat ni l'especificitat. El test, anomenat *Ova-Check R*, és un immunoassaig multiplexat que mesura 11 marcadors en el sèrum (CA-125, CA-19-9, proteïna C reactiva, receptor del factor de creixement epidèrmic, mioglobina, proteïna inflamàtori 1 alfa dels macròfags, interleucina 6, interleucina 18, tenascina C i apolipoproteïnes A1 i CIII). El test, tot i obtenir la marca CE, no està encara autoritzat per la FDA i actualment es troba en un assaig clínic de gran abast per a confirmar-ne els resultats (Petricoin *et al.*, 2002).

6.3. Cerca de marcadors de càncer d'ovari en líquid ascític: nova estratègia a tenir en compte?

Com hem anat veient, el desenvolupament insidiós del càncer d'ovari planteja moltes dificultats per a poder-ne fer un diagnòstic precoç fiable. Això fa que, malauradament, aquests siguin tumors de diagnòstic tardà, quan, en la majoria dels casos, ja s'han disseminat per òrgans veïns, en primera instància, i a més distàn-

cia, progressivament. Aquestes metàstasis es generen principalment per via transcel·lònica, hematògena i limfàtica. A diferència del que passa en altres carcinomes, la via hematògena és poc habitual en el càncer d'ovari, mentre que la limfàtica ràpidament envaeix els ganglis pelvians i paraaòrtics. La via transcel·lònica és potser la més freqüent, i és la responsable de la gran morbiditat i mortalitat, atès que afecta diversos òrgans vitals dintre de l'abdomen, incloent-hi els sistemes gastrointestinal i genitourinari. Al voltant d'un 70 % dels casos de les pacients laparotomitzades presenten metàstasis peritoneals, que afecten, inicialment, els òrgans adjacents, com són les trompes de Fal·lopi, l'úter, els òrgans annexos contralaterals i, ocasionalment, el recte, la bufeta de l'orina i la mateixa paret pelviana (Roett i Evans, 2009).

Durant aquest procés de disseminació, moltes cèl·lules de l'epiteli ovàric tumoral s'aniran exfoliant cap a la cavitat abdominal, i, després d'un període en el qual la majoria d'aquestes moriran per apoptosi, deguda a la pèrdua de les relacions de contacte necessàries per a la supervivència, d'altres, una minoria, aniran entrant en un procés de transició epitelial-mesenquimàtica (TEM) i es reagruparan constituint esferoides o agregats cel·lulars. Aquest és un procés també sotmès a l'apoptosi en aquest entorn hostil, però ara més favorable a la supervivència. Alguns d'aquests agregats, ja amb fenotip mesenquimàtic, són els que podran reimplantar-se a la paret abdominal, passant ara pel canvi invers o transició mesenquimàtica-epitelial (TME), i constituir les diverses metàstasis que habitualment s'identifiquen en el moment de la cirurgia (carcinomatosi peritoneal) (Christiansen i Rajasekaran, 2006).

Ambdós processos descrits, TEM i TME, tenen lloc en un medi líquid que es va instaurant en l'entorn de l'abdomen, que es coneix com a *líquid ascític* o, simplement, *ascites*. Aquest líquid ascític és objecte d'un intens estudi per molts investigadors d'arreu del món, ja que obre noves vies d'identificació de marcadors tumorals (o, sovint, també d'alguns marcadors de teixit ovàric tumoral ja coneguts, però no útils per a embastar estratègies de diagnòstic precoç), atès que el líquid ascític és accessible i es pot obtenir amb relativa facilitat (Rynne-Vidal *et al.*, 2017).

La identificació de noves molècules, per exemple, vinculades amb TEM i TME també permeten suggerir la utilització de noves drogues dirigides contra aquestes i aturar la disseminació abdominal (Kipps, Tan i Kaye, 2013).

7. LA SALIVA COM A FONT DE BIOMARCADORS TUMORALS

Des de fa ja un nombre considerable d'anys, la saliva ha estat un biofluid intensament estudiat com a font de biomarcadors de patologies diverses. La saliva és un fluid complex que recull secrecions, principalment de les glàndules salivals que, a la vegada, emmagatzemen substàncies que circulen per la sang. Es podria

concloure que la composició de la saliva reflecteix la de la sang, però en concentracions molt més atenuades. Per tant, de ben segur que les molècules presents en la sang, com són proteïnes, DNA, RNA, etc., les podrem trobar també en la saliva.

Com ja hem comentat, la disponibilitat dels assajos immunològics, els radio-immunoassaigs en particular i d'altres van permetre, ja en els anys setanta i vuitanta del segle passat, la identificació de múltiples molècules (inicialment hormones esteroidals i d'altres) (Berson *et al.*, 1956). En l'actualitat, gràcies a la disponibilitat de les tècniques d'alt rendiment, com l'espectrometria de masses, la cromatografia de gasos, els xips d'expressió, etc., la saliva és extensament estudiada en un ampli reguitzell de malalties, i se n'obtenen resultats molt informatius, per exemple, en els perfils hormonals de la reproducció, quan, en lloc de mesurar una hormona esteroïdal en particular, podem obtenir, pel mateix cost, un ampli perfil de la majoria de les hormones del cicle reproductiu d'una pacient, per exemple (Gómez-Gómez *et al.*, 2020).

El càncer no n'és una excepció, i en els darrers cinc o set anys han proliferat els estudis d'aïllament de marcadors de tumors diversos en saliva. La disponibilitat de les noves tècniques d'alt rendiment, com la genòmica, la proteòmica, la seqüenciació de propera generació (NGS, de l'anglès *next generation sequencing*), etc., estan permetent identificar noves molècules expressades diferencialment en diversos tumors quan es comparen amb els teixits sans i emprendre el procés de classificar aquestes molècules com a marcadors tumorals, si compleixen els requisits ja explicats a l'inici d'aquest manuscrit. Com hem comentat també, són d'interès especial els perfils proteòmics, els transcrits d'mRNA, els RNA no codificants (NcRNA), etc.

Els tumors de cap i coll són inicialment els més estudiats, amb resultats molt positius. Sistemàticament, però, s'han anat buscant i identificant marcadors en la majoria dels altres tumors, amb resultats molt diversos (Majem *et al.*, 2015). El càncer d'ovari, que, com ja hem explicat, té una complexitat considerable, no n'ha estat una excepció. El laboratori del doctor David T. Wong, de la Universitat de Califòrnia a Los Angeles (UCLA), va identificar diversos marcadors de càncer d'ovari, que malauradament no han estat encara aprovats per la FDA (Wong, 2015).

8. ESTRUCTURACIÓ DE DADES MÈDIQUES I INTEL·LIGÈNCIA ARTIFICIAL

La intel·ligència artificial (IA) és prou complexa de definir avui en dia, per la qual cosa no n'existeix una definició única, formal i universalment acceptada per tothom. S'ha definit de moltes maneres, però, en general, estariem tots d'acord si diguéssim que és un conjunt de tècniques de computació que s'assemblen a processos associats amb la intel·ligència humana, com són el raonament, l'aprenen-

tatge, l'adaptació, la comprensió sensorial i també la interacció. La Comissió Europea l'ha definit com un conjunt de sistemes de programari i de maquinari dissenyats per humans que, davant d'un objectiu complex, actuen en la dimensió física o digital: percebent el seu entorn, a través de l'adquisició i la interpretació de dades estructurades o no estructurades; analitzant el coneixement; processant la informació derivada d'aquestes dades, i donant respostes a quines serien les millors accions a emprendre per a assolir un objectiu concret.

Tot i que es considera que la IA, com a disciplina acadèmica, neix l'any 1956, ha passat per cicles en què ha estat més reconeguda i s'hi han dipositat moltes expectatives i per èpoques en què l'interès per la disciplina ha minvat. Els factors clau per al ressorgiment, o millor dit, l'explosió de la IA que estem presenciant ara serien, al nostre entendre, els que expliquem en els apartats següents.

8.1. *El creixement extraordinari de la quantitat de dades disponibles*

El creixement exponencial de la quantitat de dades disponibles és conseqüència del gran desenvolupament en els darrers cinquanta anys de la ciència i la tecnologia. En tots llurs àmbits, el progrés ha estat enorme, i la generació de milers de noves dades ha estat i continua sent la tònica general en totes les disciplines del coneixement. Si ens cenyim a l'àmbit de la biologia i la medicina, veurem que hem pogut ser testimonis d'un gran desenvolupament de la biologia molecular i cel·lular, de la immunologia, de la química de proteïnes, etc., però també de les tecnologies d'anàlisi, que han esdevingut, com s'anomenen ara, *d'alt rendiment* (genòmica, proteòmica, metabolòmica, etc.).

Avui en dia, disposar de dades mèdiques de manera estructurada és indispensable per a poder aplicar-hi tècniques d'IA i extreure'n el màxim rendiment. Malauradament, en els entorns mèdics, clínics i també biomèdics de la majoria dels països que hem estudiat, la situació actual està lluny del que es consideraria òptim. Actualment, els centres sanitaris i les empreses estan construint els seus repositoris de dades per aplicar-los, posteriorment, solucions d'IA, i així fragmentar-los, amb la qual cosa perdran la potència que podrien tenir en el supòsit de ser grans i no fragmentats. Aquests repositoris grans, internacionals i no fragmentats haurien de garantir sempre el seu ús universal a tots els investigadors, metges i treballadors de la salut, i assegurar també un ús anonimitzat i confidencial del tractament de les dades clíniques dels pacients, fent un ús confidencial, que respecti, els principis de la protecció de les dades i que segueixi, evidentment, les regulacions d'ús legals i ètiques prèviament acordades pels grups d'experts internacionals. També haurien de potenciar l'equitat en l'assistència sanitària i potenciar el paper de la ciutadania en el maneig de la seva salut, assegurant la preparació dels professionals, la interoperabilitat dels sistemes i avaluant permanentment els resultats.

8.2. *Els avenços en la potència i capacitat dels sistemes de computació i d'emmagatzematge*

La capacitat informàtica ha evolucionat de manera espectacular i ha brindat als usuaris una potència de càlcul incomparable amb la que estava disponible pocs anys enrere, que anomenem *computació d'alt rendiment* (*high-performance computing*). La capacitat de computació es mesura en flops (*floating-point operations per second*), que és una unitat de mesura informàtica que s'utilitza per a conèixer el rendiment d'un ordinador. Avui en dia, l'ordinador més potent del món és el Fugaku, al Japó, amb una potència màxima de 537 petaflops, seguit del Summit, de l'Oak Ridge National Laboratory, a Tennessee (Estats Units), amb una potència màxima de 200 petaflops; aquest darrer espera assolir una potència d'1,5 exaflops al llarg d'aquest any. A Catalunya disposem de l'ordinador Mare Nostrum, ubicat al Barcelona Supercomputing Center, amb una potència màxima de 10 petaflops, que el situa en la posició 74, encara que actualment es troba en via d'ampliació. De mitjana i amb visió de futur, podríem dir que la capacitat informàtica global s'anirà duplicant aproximadament en períodes de dos anys. Es pot veure el darrer rànquing mundial de potència d'ordinadors, de novembre de 2021, a <https://www.top500.org/lists/top500/2021/11/>. Es calcula que la implantació progressiva de la informàtica quàntica permetrà pràcticament doblar la capacitat de computació cada dos anys.

També és cert que en tot el que es refereix a les dades mèdiques de pacients, les nostres administracions duen un retard considerable pel que fa a l'estructuració de les dades. En els països on la cura de la salut és responsabilitat d'entitats públiques, aquests no han instaurat, en general, uns sistemes de recollida estructurada d'aquestes dades, cosa que avui representa un inconvenient important per al seu ús i accés de qualsevol tipus. Hi ha excepcions, com pot ser el Regne Unit, on el National Health Service (NHS) sí que ha tingut cura que la recollida i l'emmagatzematge siguin ben estructurats i facilitin, en conseqüència, l'ús posterior d'aquestes dades a través dels múltiples algorismes d'intel·ligència artificial. En el cas de Catalunya, per exemple, hi ha un extens repositori d'imatges mèdiques, radiografies principalment, però també tomografies axials computaritzades, ressonàncies magnètiques nuclears, etc., però són de difícil accés per als recercadors i metges en general. Més complexa és la situació de les dades mèdiques clíniques dels pacients que estan recollides en diversos sistemes informàtics no necessàriament compatibles en llurs interconnexions. Aquestes mancances dificulten enormement la recuperació d'aquestes dades per a la recerca. El nou Pla Director de Sistemes d'Informació preveu resoldre aquesta mancança en els propers anys (Generalitat de Catalunya, Departament de Salut, 2021).

8.3. La investigació i el desenvolupament de nous algoritmes i mètodes d'aprenentatge automàtic

Aquest tercer factor, la investigació i el desenvolupament de nous algoritmes i mètodes d'aprenentatge automàtic (*machine learning*), és una conseqüència lògica dels dos precedents, ja que la millora en la potència de computació, a més de la gran disponibilitat de dades de tot tipus, estimulen l'augment de la recerca de qualitat dels algoritmes. Com ja hem esmentat prèviament, els investigadors dedicats des de fa molt de temps a la IA han pogut accelerar la seva recerca perquè disposen de les condicions idònies per a dur-la a terme amb satisfacció.

Així doncs, a mode de resum, és important entendre bé que la conjunció dels tres darrers aspectes comentats, a saber, l'augment exponencial de dades mèdiques, l'increment de la capacitat de computació i el creixement del nombre i de la qualitat dels nous algoritmes d'IA, ens porta a la situació actual de poder dissenyar una utilització conjunta de les dades de manera ràpida i eficient per a construir una medicina personalitzada millor i més equitativa, a la vegada que, després de la posada en marxa inicial, també ha de ser econòmicament menys costosa (<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.00984/full>).

8.4. Aplicacions de la IA en la salut

Les eines d'IA actualment disponibles són ja molt nombroses. S'utilitzen per a la millora de l'atenció dels pacients, per a facilitar les tasques dels metges, infermeres i del personal administratiu dels centres sanitaris, així com per a guanyar en eficiència i precisió en els resultats que es volen obtenir. Això també es refereix a tota la recerca biomèdica feta als instituts de recerca, així com també als hospitals i centres d'assistència primària. Els algoritmes ajuden a entendre o a extreure conclusions sobre malalties en un temps molt reduït, a suggerir un diagnòstic i un tractament pertinent, a fer una gestió millor dels centres sanitaris i a accelerar i facilitar la recerca biomèdica molecular i cel·lular.

El Programa per la Promoció i el Desenvolupament de la Intel·ligència Artificial en el Sistema de Salut de Catalunya (Generalitat de Catalunya, Departament de Salut, 2021) agrupa les aplicacions de la IA en la salut en quatre àmbits:

- *Assistencial*: tractament d'imatge mèdica digital, tractament de dades clíniques, processament del llenguatge natural (PLN) i anàlisi de dades òmiques.
- *Salut pública*: promoció i prevenció de la salut i vigilància epidemiològica.
- *Administració i gestió de recursos*: optimització en la gestió de recursos sanitaris, gestions administratives.
- *Recerca biomèdica, bàsica, translacional, clínica i epidemiològica*.

En qualsevol cas, hem de dir que el Programa per la Promoció i el Desenvolupament de la Intel·ligència Artificial en el Sistema de Salut de Catalunya constitueix una declaració d'intencions d'actuacions molt completa en tots els àmbits de la salut a desenvolupar en els propers anys (<https://iasalut.cat/programa-salut-ia/>).

Podríem considerar, si més no, que la verticalitat dels plantejaments de les aplicacions de la IA en el programa esmentat pot no aprofitar els veritables avantatges que la transversalitat de l'accés a totes les dades mèdiques dels ciutadans aportaria a la millora de la medicina i de la salut en general. Aquest seria un tema fonamental que hauria de ser considerat amb prioritat en el moment d'embastar les polítiques d'IA en qualsevol àmbit o entorn geogràfic.

8.5. Creació i ús de repositoris holístics de dades de pacients, coneguts com a bessons digitals

L'holisme, tal com el definia Aristòtil, és la concepció filosòfica que considera un camp d'estudi particular com un tot que agrupa més informació i supera la suma de les parts. Aquest pensament, també anomenat *sistèmic*, s'oposaria al reduccionisme o a l'individualisme metodològic. En biologia tenim molts exemples de diferents estudis globals de sistemes biològics, que des de fa ja una munió d'anys agrupem sota la denominació *biologia de sistemes*. En aquests casos, hem pogut demostrar fefaentment com diferents molècules conegudes per intervenir en diverses reaccions en els organismes vius ho fan també, a la vegada i de manera creuada, en altres reaccions diferents de les inicialment conegudes (Güell *et al.*, 2009). En la majoria dels casos, els millors exemples de biologia de sistemes els trobem en organismes elementals i poc complexos (sovint unicel·lulars), encara que la disponibilitat actual de tecnologies més avançades, sobretot les d'alt rendiment, permet anar avançant en organismes més complexos. Aquest seria el cas quan estenem el concepte *biologia de sistemes* a la medicina (el terme ja encunyat és *medicina de sistemes*). Nogensmenys, la complexitat d'aquesta medicina de sistemes adquireix unes dimensions molt difícils d'acotar degut al nombre de variables a estudiar i a les nombrosíssimes interrelacions que podríem suggerir. Les modificacions de l'entorn en el qual es mouen els éssers humans afegeixen també un grau altíssim de dificultat (temperatura, humitat, pressió, etc.).

El concepte *bessó digital* (*digital twins*) no és nou. Es tracta d'elaborar una rèplica virtual en temps real de qualsevol objecte físic d'interès i poder simular, així, el seu comportament en qualsevol situació en la qual, de manera real, aquest objecte hagi de funcionar i ser d'utilitat. El seu ús ens hauria de permetre detectar encerts i defectes virtualment, és a dir, prèviament a la seva utilització en la vida real. En l'àmbit de la indústria es fa servir des de fa ja molts anys, amb la finalitat d'ajudar a predir i optimitzar els diferents sistemes de producció o de qualsevol

altre tipus en què la indústria estigui implicada. En conseqüència, també ens ha d'indicar les possibles millores i correccions a dur a terme. Tots coneixem sistemes de simulació en qualsevol àmbit industrial, o de construcció d'edificis, aeronàutic, d'energia, etc. Sorprenentment, en medicina sovint hem de recórrer al sistema d'assaig-error, sense pensar que potser hauríem pogut simular prèviament una actuació mèdica en particular i conèixer-ne les conseqüències abans d'aplicar-la al pacient real. Evidentment, recórrer a l'assaig-error (per exemple, l'aplicació en oncologia d'un tractament no provat, en el cas que els tractaments previs *ad hoc* hagin fracassat) es justifica pel fet que no hi hagi cap alternativa per a aquell pacient. Actualment, però, els sistemes de salut comencen ja a utilitzar amb molta força i empena aquesta poderosa eina digital per a la millora de l'atenció als pacients.

En l'entorn de la salut, podríem definir un *bessó digital* com un repositori estructurat de totes les dades mèdiques d'una persona recollides durant tota la vida d'aquesta, i que duria associat unes eines d'IA capaces d'interrogar les dades esmentades de manera permanent sobre qualsevol aspecte relacionat amb la salut d'aquell subjecte. Com a exemples obvis, podem pensar que un bessó digital podria utilitzar-se per a definir la viabilitat de segons quins procediments a practicar en un pacient concret i la predicció del curs clínic que aquell pacient seguirà. En el supòsit que arribéssim a incloure dades específiques socials i de comportament, els bessons digitals serien de gran utilitat en la gestió i el tractament dels pacients amb malalties cròniques, i en aspectes de salut poblacional; també servirien per a determinar la teràpia adient en cada pacient, etc. Vegem, a continuació, alguns d'aquests exemples més detalladament.

8.5.1. Predicció de la viabilitat d'una intervenció i de l'evolució clínica posterior

Els bessons digitals poden tenir uns rols decisius en la predicció del curs clínic que seguirà un pacient després d'una intervenció, per exemple, en el cas d'un pacient amb fallada cardíaca que desenvolupa una arrítmia i que és candidat a una teràpia de resincronització cardíaca (TRC). Aquesta teràpia resincronitza el cor del pacient mitjançant la col·locació d'un petit marcapàs. La col·locació dels cables del marcapàs ha de ser molt precisa. Degut a diverses característiques del cor d'aquests pacients, en un 50 % dels casos, el procediment no té èxit. La utilització d'un bessó digital del pacient en qüestió (que inclogui la informació detallada de la ressonància magnètica, de l'electrocardiograma, de la pressió arterial, etc.) facilitarà als cardiòlegs la col·locació idònia dels elèctrodes, mitjançant una experimentació prèvia virtual en diverses posicions, tot plegat fet abans que la intervenció real comenci.

8.5.2. Gestió de la cronicitat en pacients en entorns socials complexos

L'augment de l'esperança de vida ha estat (i continua sent) un gran avenç de la nostra medicina des de fa ja un bon grapat d'anys. Nogensmenys, l'allargament de la vida comporta, inexorablement també, l'aparició de patologies múltiples associades amb l'envelliment, a la vegada que les condicions de vida de la població de la tercera edat no són sempre les millors a causa dels costos elevats i sovint també de l'aïllament familiar. En la gestió de les patologies cròniques, és de gran importància conèixer la situació social i econòmica dels pacients, on viuen, amb qui viuen, com viuen, de quins recursos disposen, qui es responsabilitza dels incapacitats, etc., en resum, quina és la qualitat de vida d'aquells pacients. En aquest context, el bessó digital ha d'incloure totes aquestes dades, a més de totes les fisiopatològiques i també de comportament per a poder, amb aquesta informació, ajudar el pacient i també el metge responsable, i també en benefici del sistema de salut. Pensem només en exemples de malalties prevalents i cròniques, com poden ser la diabetis o les malalties renals. En aquest darrer cas, s'estima que entre un 10 % i un 15 % de la població mundial pot acabar patint malalties renals de tipus diversos i que requereixin un control molt estricte en tots els àmbits, per a no arribar a una insuficiència renal seriosa que duria el pacient a la diàlisi permanent o al trasplantament de l'òrgan, amb un cost i un risc elevats en ambdós casos. Les variables a controlar en aquest darrer cas, per exemple, són nombrosíssimes i d'alt cost per al sistema de salut. Un bessó digital adient podria incorporar tots els paràmetres a considerar (avaluació clínica permanent, patologia, analítica bioquímica, règim dietètic, medicació, exercici, entorn social, situació familiar i cura del pacient, etc.) de manera permanent i aquests podrien ser contrastats en cada moment i al llarg del temps per les eines d'IA que els interrelaciona creuadament, a la vegada que els posa en constant relació/comparació amb les mateixes interaccions idèntiques que tenen lloc en el context de tota la població mundial que pateix la mateixa malaltia.

8.5.3. Ajuda a la presa de decisions en teràpies complexes: l'exemple del càncer

Essent el càncer una malaltia també de gran complexitat i, en molts casos, encara lluny de ser resolta, els bessons digitals estan ocupant ja un lloc prevalent en la presa de decisions en els tractaments de pacients amb tot tipus de càncers.

El gran desenvolupament tecnològic en la seqüenciació gènica que hem pogut veure en les darreres dècades ha permès, entre d'altres, estudiar molt més detalladament i de manera personalitzada els tumors, que prèviament eren considerats homogenis dintre dels respectius tipus histològics. Aquesta suposada homogeneïtat assumida al llarg de bastants anys ha generat dintre de la comunitat científica

una gran munió de dades difícils d'interpretar i que, durant els anys recents d'evolució de les tècniques d'anàlisi molecular, s'ha pogut comprovar que eren errònies. Avui en dia, encara ens trobem amb un percentatge prou baix (33 %) de pacients que responen als tractaments de quimioteràpia abans que aquesta s'hagi redissenyat seguint la informació de la seqüenciació massiva del DNA dels tumors. Al voltant de 200.000 pacients moren anualment a Europa a causa dels efectes adversos de les drogues utilitzades en quimioteràpia. Aquesta informació molecular que, principalment, s'està obtenint gràcies a la seqüenciació del DNA dels tumors, està reconduint la medicina oncològica cap a una personalització que preveu que les drogues utilitzades siguin adients al metabolisme dels pacients en concret que es volen tractar.

La informació de les seqüències del DNA tumoral emmagatzemada en múltiples repositoris d'arreu del món representa, doncs, un actiu de gran magnitud per a avançar cap a la medicina personalitzada i, en el cas que ens ocupa, cap a l'oncologia personalitzada. Aquest seria l'exemple més conegut de maneig de les dades massives, en el qual les aplicacions informàtiques s'utilitzen per a comparar les seqüències amb els tumors del mateix tipus existents en aquestes bases de dades, també amb els assaigs clínics realitzats, etc., buscant-hi paral·lelismes, i, posteriorment, s'administrarà la droga que millors resultats hagi donat. Això és el que IBM du a terme amb el seu supercomputador Watson i també el National Cancer Institute (NCI) amb el seu programa National Cancer Institute Molecular Analysis for Therapy Choice (NCI-MATCH).

Les seqüències del DNA tumoral no són, però, les úniques variables que determinen la bona o mala resposta dels pacients als tractaments que se'ls administra. Tots els pacients són diferents, fins i tot encara que comparteixin les mateixes seqüències de DNA (o les mateixes mutacions) en els seus tumors respectius, però poden tenir un transcriptoma diferent, a més de tenir metabolismes diferents vinculats amb interaccions amb altres cèl·lules veïnes, etc. Les drogues utilitzades en quimioteràpia són també entitats moleculars que interactuen diferentment en les mateixes malalties i en pacients aparentment similars. Atenent, doncs, al fet que, com diem, tots els individus són diferents, l'estratègia més raonable que proposem, principalment, els inventors dels bessons digitals seria crear models de pacients digitals, per poder provar *in silico* en aquests models les diferents drogues susceptibles de tenir uns bons efectes sobre els tumors en qüestió, i excloure així les drogues que puguin tenir efectes secundaris deleteris per als pacients.

En resum, i com ja hem comentat, el gran augment de la computació d'alt rendiment (HPC, de l'anglès *high-performance computing*) experimentat en els dos darrers anys permet ja la instauració de repositoris holístics de dades mèdiques, inicialment de manera vertical, en els casos de malalties complexes amb necessitats terapèutiques urgents (com els casos que veiem en oncologia i que ja hem

exposat), però avançant cap a un model general de medicina, en el qual aquests repositoris haurien de crear-se per a cada individu en el moment del seu naixement i anar-se nodrint progressivament al llarg de tota la vida amb les dades mèdiques que s'anessin generant. Voldríem introduir aquí el procés d'apoderament i assumpció de corresponsabilitat progressius en tot el que fa referència a la salut que els mateixos pacients han d'anar assumint i que ha de contribuir, també, a la millora de la seva salut. Ens referim a l'eina de l'Internet de les coses (IoT, de l'anglès *Internet of things*), que progressivament deixarà de ser un entreteniment per passar a ser un veritable sistema de recollida de dades mèdiques dirigit pels mateixos pacients (corresponsabilitzant-los, així, del control de la seva salut). De fet, i per centrar aquesta informació únicament en aspectes mèdics rellevants per a la salut dels ciutadans, s'ha encunyat ja el terme *Internet de les coses mèdiques* (IoMT, de l'anglès *Internet of medical things*) per substituir la IoT (Lin i Wu, 2022). Amb l'abaratiment de l'electrònica i les tecnologies de la informació, en els darrers anys han anat proliferant els petits «aparells» d'ús individual portables (*wearables*), que permanentment recullen dades mèdiques, de comportament, d'activitat física, etc., dels subjectes que el porten en alguna part del seu cos (polseres intel·ligents, anells, rellotges, xips diversos, etc.). Certament, aquestes dades que es van recollint actualment no s'integren sistemàticament en cap repositori connectat amb les dades mèdiques «oficials» de cada individu, per la qual cosa es perd una gran quantitat d'informació de gran vàlua, que podria enriquir substancialment l'historial mèdic de cada ciutadà. Avui, els grans consorcis que treballen en la utilització de les dades mèdiques amb l'objectiu de millorar l'assistència, així com els instituts de recerca, les empreses informàtiques i d'IA, etc., estan tots desenvolupant aplicacions informàtiques capaces de recollir i d'integrar totes les dades que es recopilen per aquesta via, de manera compatible amb els repositoris mèdics dels sistemes de salut.

En el disseny futurista de com podria ser l'assistència sanitària en una societat avançada (vegeu Health Care Compact for Europe, www.healthcarecompactforeurope.eu), és a dir, humana, universal, equitativa, tecnològica, científica, personalitzada, preventiva, etc., els bessons digitals, com a repositoris holístics de les dades mèdiques dels ciutadans, hi ocuparan un lloc principal, atès que han de ser la clau que dirigeixi el gir que s'ha de fer cap a aquesta medicina més justa i equitativa, i també, una vegada instaurada, menys costosa.

9. EPÍLEG

Acabant aquest discurs de presentació a l'Institut d'Estudis Catalans (IEC), voldria pensar que els exemples que us he exposat sobre la meua experiència com a metge dedicat a la recerca en l'àrea dels marcadors tumorals han estat d'utilitat,

tant pel coneixement intrínsec científic propi dels exemples com per la informació del context històric que, crec que, també ens han d'aportar, així com per les perspectives de futur que les noves disciplines tecnològiques obren en l'àrea de la salut. Igualment, com deia al principi, només podem parlar de ciència biomèdica (clínica, translacional, bàsica, epidemiològica, computacional o digital, etc.), i els marcadors de les malalties són un bon exemple, des de fa almenys cinquanta anys, de la contribució molt considerable a l'apropament de la ciència i la medicina. La història de la medicina ens il·lustra amb tota riquesa de detalls d'aquest trànsit cap al coneixement científic i, actualment, ens trobem en el moment en què la nostra civilització disposa del màxim o millor coneixement que hagi pogut tenir mai. Una altra cosa és que sapiguem aplicar-lo de la manera més generosa, equitativa i adient per a fer progressar el món cap al benestar i la salut de tota la població mundial.

L'acte mèdic és, per damunt de tot, un acte humà que té com a finalitat resoldre un problema humà: la malaltia. El pacient afectat per una malaltia, des de l'inici, té un patiment íntim en forma d'angoixa que necessita, d'entrada, un guariment íntim i humà, que el metge ha de liderar cap a la seva consecució. El bon professional de la medicina sabrà molt bé tot el que haurà de fer per aconseguir aquest guariment (Vilardell, 2009). El gran progrés de la ciència biomèdica està facilitant l'assoliment de l'esperada disminució de l'impacte de la malaltia en la societat, i això ha de ser un motiu de satisfacció de tota la ciutadania. La medicina ha de ser equitativa, i sovint veiem que la gran tecnificació dels diagnòstics més avançats és costosa i no arribarà mai a tothom. Aquest és un fet que s'hauria de revertir. La salut digital planteja una homogeneïtzació de les dades mèdiques de tots els ciutadans, mitjançant la qual, i dintre d'un sistema públic de salut, ens situa a tots en el mateix nivell. Són ben sabuts i extensament discutits els aspectes ètics i legals que l'ús de les dades personals dels pacients comporten, però pensem que els experts són capaços de regularitzar aquesta utilització en benefici de tothom, però de les persones malaltes per sobre de tot. Els pacients a qui hem consultat en aquest sentit sempre han respost que el que més desitgen és curar-se i que posarien les seves dades a disposició dels científics, si això representés un avenç en la curació de les malalties.

La pandèmia de la covid-19 que estem vivint està posant-nos a prova en diversos aspectes, com a persones, com a ciutadans d'un país o d'un continent, o potser, millor dit, d'un planeta únic. Aquesta pandèmia també ha accelerat i ha desenvolupat la recerca, no exclusivament en tot el que es refereix a la infecció per si mateixa, sinó també en les malalties infeccioses en general i en tecnologies digitals, amb la millora del monitoratge, les prediccions i les intervencions davant dels grans riscos ecològics planetaris. En el si de la Comissió Europea, s'ha creat una iniciativa per a desenvolupar un model digital de la Terra, que s'anomena

Destination Earth (DestinE), i que no és altra cosa que un bessó digital del nostre planeta amb alta precisió. En el context de l'eix del discurs, hem parlat de les òmiques, de tota la ciència informàtica, de la transformació digital, de la IA, etc., que en totes les dimensions de les nostres vides ja ens estan influïent en un sentit o un altre. La IA ja integra sinergies de tot el que acabem de comentar amb el bessó digital Destination Earth, i apareix una nova àrea d'estudi i de treball que anomenem *genòmica de salut planetària (planetary health genomics)*. L'anàlisi i actuació globals utilitzant la transformació digital i tot el coneixement científic disponible, de ben segur, també ens permetran dissenyar eines més robustes per a afrontar futures pandèmies i altres amenaces, així com construir una societat més resilient al segle XXI (Geanta *et al.*, 2021).

10. AGRAÏMENTS

En llengua anglesa s'ha popularitzat la frase «Last but not least» quan ens volem referir al fet que, el que es digui en darrer lloc no és, en cap cas, el menys important. Amb tota seguretat, pel que fa a la recerca que us acabo d'explicar, hauríem d'invertir aquest ordre, ja que el reconeixement a les persones que han fet possible tots aquests nombrosos anys de recerca és, certament, la part més important. Sense elles, res del que us he presentat no s'hauria pogut dur a terme.

Començant pels més joves, els que han estat en primera línia, la llista esdevindria inacabable i probablement hi faltarien molts dels importants, ja que aquests han estat molt nombrosos. Parlo dels doctorants, estudiants de mestratge, de grau, tècnics, estudiants d'estiu, estudiants internacionals, secretaris, administratius, voluntaris, etc.

També han passat pel laboratori molts becaris postdoctorals i altres investigadors, també els visitants d'altres països, que han anat progressivament establint els seus llocs de treball, i han pogut romandre permanentment en el grup. Aquests també han tingut uns rols de màxima rellevància en tota la recerca presentada. No voldria oblidar l'estament clínic, que sempre ha fet costat a la nostra recerca i ha entès com s'havia de dur a terme; sense la gran i generosa col·laboració entre ells i nosaltres, no s'haurien pogut assolir els objectius plantejats. Molts d'ells, fins i tot, han experimentat un gir en llurs carreres i s'han incorporat temporalment al grup per a adquirir una formació sòlida en recerca.

Només faré referència explícita als mentors que, des de lideratges i funcions diversos, m'han ajudat i guiat al llarg de la meua carrera. Molt breument, vull recordar els amics doctors Sergi Erill —del Departament de Farmacologia de la Universitat Autònoma de Barcelona—, amb qui vaig començar el meu camí en la recerca; Carmen Conde i Àngel Ballabriga —de l'Hospital Infantil Vall d'Hebron—, que van conduir la meua recerca en moments difícils en l'entorn hospita-

lari i durant el període de formació MIR en bioquímica; José Sáez, director de Recerca a l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) de Lió (França), on vaig fer, sota la seva direcció, el meu doctorat; C. Wayne Bardin, director de departament a The Rockefeller University (Nova York), on vaig fer una estada postdoctoral, i Jon W. Gordon, del Departament de Biologia Molecular del Mount Sinai School of Medicine, també de Nova York, on vaig ser *assistant professor* abans de retornar a Catalunya. Fou també gràcies als doctors Àngel Ballabriga i Xavier Trias que fou possible la creació d'un gran departament de recerca a l'Hospital Vall d'Hebron, la Unitat de Recerca Biomèdica, que fou l'embrió del que actualment és el Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR).

També agraeixo al bon amic Ferran Garcia Sevilla, pintor de prestigi reconegut, el fet de cedir-me l'ús del seu quadre *Suc 3* per a il·lustrar aquest text, així com als grans amics científics la revisió i correcció d'aquest text. A tots, moltes gràcies.

Finalment, vull recordar tota la meva família, que m'ha ajudat sempre en tot, i en particular, els meus fills, l'Arnau i la Berta, per la seva comprensió i resiliència, però també pel suport tots aquests anys en què la meva dedicació a la recerca els restava estones de vida familiar; la meva companya, l'Esther, per ser sempre a prop donant el suport necessari en cada moment, i, finalment, els pares, per ser els iniciadors d'aquest periple i donar-li tot el suport mentre van ser-hi presents.

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

- ABAL, M.; PLANAGUMÀ, J.; GIL-MORENO, A.; MONGE, M.; GONZÁLEZ, M.; BARÓ, T.; GARCÍA, Á.; CASTELLVÍ, J.; RAMÓN Y CAJAL, S.; XERCAVINS, J.; ALAMEDA, F.; REVENTÓS, J. «Molecular pathology of endometrial carcinoma: Transcriptional signature in endometrioid tumors». *Histol. Histopathol.*, 21 (2) (febrer 2006), p. 197-204. DOI: 10.14670/HH-21.197. PMID: 16329044.
- ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G. «The human plasma proteome history, character and diagnostic prospects». *Mol. Cell. Proteomics*, 1 (novembre 2002), p. 845-867. DOI: 10.1074/mcp.r200007-mcp200. PMID: 12488461.
- ASIMOV, I.; NAJARIAN, H. H.; COMMONER, B. «Modern biology». *Science*, 134 (3484) (6 octubre 1961), p. 1020-1024. DOI: 10.1126/science.134.3484.1020-a. PMID: 17787771.
- BASLER, J. «The digital rectal examination in prostate cancer screening». A: THOMPSON, I. M.; RESNICK, M. I.; KLEIN, E. A. (ed.). *Prostate cancer screening*. Totowa, NJ: Humana Press, 2001, p. 91-96.
- BAST, R. C. Jr.; KLUG, T. L.; ST. JOHN, E.; JENISON, E.; NILOFF, J. M.; LAZARUS, H.; BERKOWITZ, R. S.; LEAVITT, T.; GRIFFITHS, C. T.; PARKER, L.; ZURAWSKI, V. R. Jr.; KNAPP, R. C. «A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer». *N. Engl. J. Med.*, 309 (15) (13 octubre 1983), p. 883-887. DOI: 10.1056/NEJM198310133091503. PMID: 6310399.
- BENEDIT, P.; PACIUCCI, R.; THOMSON, T. M.; VALERI, M.; NADAL, M.; CÀCERES, C.; TORRES, I. de; ESTIVILL, X.; LOZANO, J. J.; MOROTE, J.; REVENTÓS, J. «PTOV1, a novel

- protein overexpressed in prostate cancer containing a new class of protein homology blocks». *Oncogene*, 20 (12) (2001), p. 1455-1464.
- BERNARDIN, F.; FRIEDMAN, A. D. «AML1 stimulates G1 to S progression via its transactivation domain». *Oncogene*, 21 (20) (9 maig 2002), p. 3247-3252. DOI: 10.1038/sj.onc.1205447. PMID: 12082641.
- BERSON, S. A.; YALOW, R. S.; BAUMAN, A.; ROTHSCCHILD, M. A.; NEWERLY, K. «Insulin-I131 metabolism in human subjects: Demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects». *J. Clin. Invest.*, 35 (2) (febrer 1956), p. 179-190.
- BIOMARKERS DEFINITION WORKING GROUP. «Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework». *Clin. Pharmacol. Ther.*, 69 (març 2001), p. 89-95.
- BONATTI, W. *Le mie montagne*. Bolonya: Zanichelli, 1961.
- BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. «Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries». *CA Cancer J. Clin.*, 68 (6) (novembre 2018), p. 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492. [EPUB: 12 setembre 2018. *Erratum in: CA Cancer J. Clin.*, 70 (4) (juliol 2020), p. 313. PMID: 30207593]
- BYNUM, W. F. *A little history of science*. New Haven, CT: Yale University Press, 2012.
- CALIN, G. A.; CROCE, C. M. «MicroRNA-cancer connection: The beginning of a new tale». *Cancer Res.*, 66 (15) (1 agost 2006a), p. 7390-7394. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0800. PMID: 16885332.
- «MicroRNA signatures in human cancers». *Nat. Rev. Cancer*, 6 (11) (novembre 2006b), p. 857-866. DOI: 10.1038/nrc1997. PMID: 17060945.
- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK; KANDOTH, C.; SCHULTZ, N.; CHERNIACK, A. D.; AKBANI, R.; LIU, Y.; SHEN, H.; ROBERTSON, A. G.; PASHTAN, I.; SHEN, R.; BENZ, C. C.; YAU, C.; LAIRD, P. W.; DING, L.; ZHANG, W.; MILLS, G. B.; KUCHERLAPATI, R.; MARDIS, E. R.; LEVINE, D. A. «Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma». *Nature*, 497 (7447) (2 maig 2013), p. 67-73.
- CÁNOVAS, V.; LLEONART, M.; MOROTE, J.; PACIUCCI, R. «The role of prostate-tumor overexpressed 1 in cancer progression». *Oncotarget*, 8 (7) (2017), p. 12451-12471.
- CARTER, H. B.; PARTIN, A. W.; WALSH, P. C.; TROCK, B. J.; VELTRI, R. W.; NELSON, W. G.; COFFEY, D. S.; SINGER, E. A.; EPSTEIN, J. I. «Gleason score 6 adenocarcinoma: Should it be labeled as cancer?». *J. Clin. Oncol.*, 30 (35) (10 desembre 2012), p. 4294-4296.
- CHRISTIANSEN, J. J.; RAJASEKARAN, A. K. «Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis». *Cancer Res.*, 66 (17) (1 setembre 2006), p. 8319-8326. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0410. PMID: 16951136.
- COLÁS, E.; PÉREZ, C.; CABRERA, S.; PEDROLA, N.; MONGE, M.; CASTELLVÍ, J.; EYZA-GUIRRE, F.; GREGORIO, J.; RUIZ, A.; LLAURADÓ, M.; RIGAU, M.; GARCÍA, M.; ERTEKIN, T.; MONTES, M.; LÓPEZ-LÓPEZ, R.; CARRERAS, R.; XERCAVINS, J.; ORTEGA, A.; MAES, T.; ROSELL, E.; DOLL, A.; ABAL, M.; REVENTÓS, J.; GIL-MORENO, A. «Molecular markers of endometrial carcinoma detected in uterine aspirates». *Int. J. Cancer*, 129 (10) (15 novembre 2011), p. 2435-2444. DOI: 10.1002/ijc.25901. [EPUB: 8 abril 2011. *Erratum in: I. J. Cancer*, 130 (12) (15 juny 2012), p. E4. PMID: 21207424]

- COLLINS, F. S. *The language of life: DNA and the revolution in personalized medicine*. Nova York: Harper, 2009.
- GENERALITAT DE CATALUNYA. DEPARTAMENT DE SALUT. *Programa per la promoció i el desenvolupament de la intel·ligència artificial al Sistema de Salut de Catalunya* [en línia], 2021. <<https://iasalut.cat/wp-content/uploads/2021/09/ProgramaSalutIA.pdf>>.
- ESTELLER, M.; REVENTÓS, J. «Introduction to molecular biology of endometrial cancer». *Med. Clín.* [Barcelona], 107 (5) (29 juny 1996), p. 175-177.
- ESTELLER, M.; XERCAVINS, J.; REVENTÓS, J. «Advances in the molecular genetics of endometrial cancer». *Oncol. Rep.*, 6 (6) (novembre-desembre 1999), p. 1377-1382.
- GEANTA, M.; TANWAR, A. S.; LEHRACH, H.; SATYAMOORTHY, K.; BRAND, A. «Horizon scanning: Rise of planetary health genomics and digital twins for pandemic preparedness». *OMICS* (1 desembre 2021). DOI: 10.1089/omi.2021.0062. [EPUB prèvia a la impressió. PMID: 34851750]
- GLEASON, D. F. «Classification of prostatic carcinomas». *Cancer Chemother. Rep.*, 50 (3) (març 1966), p. 125-128.
- GOLD, P.; FREEDMAN, S. O. «Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques». *J. Exp. Med.*, 121 (3) (1 març 1965), p. 439-462. DOI: 10.1084/jem.121.3.439.
- GÓMEZ-GÓMEZ, A.; MIRANDA, J.; FEIXAS, G.; ARRANZ BETEGON, A.; CRISPI, F.; GRATA-CÓS, E.; POZO, O. J. «Determination of the steroid profile in alternative matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry». *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 197 (març 2020), p. 105520. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2019.105520. [EPUB: 4 novembre 2019. PMID: 31698034]
- GÜELL, M.; NOORT, V. van; YUS, E.; CHEN, W. H.; LEIGH-BELL, J.; MICHALODIMITRAKIS, K.; YAMADA, T.; ARUMUGAM, M.; DOERKS, T.; KÜHNER, S.; RODE, M.; SUYAMA, M.; SCHMIDT, S.; GAVIN, A. C.; BORK, P.; SERRANO, L. «Transcriptome complexity in a genome-reduced bacterium». *Science*, 326 (2009), p. 1268-1271.
- GUSTAFSSON, O. J.; ARENTZ, G.; HOFFMANN, P. «Proteomic developments in the analysis of formalin-fixed tissue». *Biochim. Biophys Acta.*, 1854 (6) (juny 2015), p. 559-580. DOI: 10.1016/j.bbapap.2014.10.003. [EPUB: 12 octubre 2014. PMID: 25315853]
- IOANNIDIS, J. P. A. «Biomarkers failures». *Clin. Chem.*, 59 (2013), p. 202-204.
- KIPPS, E.; TAN, D. S.; KAYE, S. B. «Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: New avenues for therapy and research». *Nat. Rev. Cancer*, 13 (4) (abril 2013), p. 273-282. DOI: 10.1038/nrc3432. [EPUB: 21 febrer 2013. PMID: 23426401; PMCID: PMC4673904]
- LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. «The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*». *Cell*, 75 (5) (3 desembre 1993), p. 843-854.
- LEGRAIN, P.; AEBERSOLD, R.; ARCHAKOV, A. «The human proteome project: Current state and future directions». *Mol. Cell. Proteomics*, 10 (7) (2011).
- LIN, B.; WU, S. «Digital transformation in personalized medicine with artificial intelligence and the Internet of medical things». *OMICS*, 26 (2) (febrer 2022), p. 77-81. DOI: 10.1089/omi.2021.0037. [EPUB: 21 abril 2021. PMID: 33887155]
- MAJEM, B.; RIGAU, M.; REVENTÓS, J.; WONG, D. T. «Non-coding RNAs in saliva: Emerging

- biomarkers for molecular diagnostics». *Int. J. Mol. Sci.*, 16 (4) (17 abril 2015), p. 8676-8698. DOI: 10.3390/ijms16048676. PMID: 25898412; PMCID: PMC4425103.
- MARKMAN, M.; BOOKMAN, M. A. «Second-line treatment of ovarian cancer». *Oncologist*, 5 (1) (2000), p. 26-35. DOI: 10.1634/theoncologist.5-1-26. PMID: 10706647.
- MCNEAL, J. E. «Regional morphology and pathology of the prostate». *Am. J. Clin. Pathol.*, 49 (1968), p. 347-357.
- MITIN, T.; BLUTE, M.; LEE, R.; EFSTATHIOU, J. «Management of lymph node-positive prostate cancer: The role of surgery and radiation therapy». *Oncology (Williston Park)*, 27 (7) (juliol 2013), p. 647-655. PMID: 23977759.
- MORGAGNI, G. B. *De sedibus et causis morborum per anatomen indagatis: Libris quinque: in quibus continentur dissectiones et animadversiones propemodum innumerae, medicis, chirurgis, anatomicis profuturae* [en línia]. Vol. 1. 9a ed. a cura de F. Chaussier i N. P. Adelon. Lutetiae, apud M. C. Compère, 1820. 645 p. <<https://bipadi.ub.edu/digital/collection/atlesmed/id/20309>> [Consulta: 21 gener 2020]. [En llatí]
- NIKULINA, D.; TEREITYEV, A.; GALIMZYANOV, K.; JURISČIĆ, V. «Fifty years of discovery of alpha-fetoprotein as the first tumor marker». *Srp. Arh. Celok. Lek.*, 143 (1-2) (gener-febrer 2015), p. 100-104. DOI: 10.2298/sarh1502100n. PMID: 25845261.
- OLIVAN, M.; GARCIA, M.; SUÁREZ, L.; GUIU, M.; GROS, L.; MÉNDEZ, O.; RIGAU, M.; REVENTÓS, J.; SEGURA, M. F.; TORRES, I. de; PLANAS, J.; CRUZ, X. de la; GOMIS, R. R.; MOROTE, J.; RODRÍGUEZ-BARRUECO, R.; SANTAMARIA, A. «Loss of microRNA-135b enhances bone metastasis in prostate cancer and predicts aggressiveness in human prostate samples». *Cancers* [Basel], 13 (24) (9 desembre 2021), p. 6202.
- OSMAN, N.; O'LEARY, N.; MULCAHY, E.; BARRETT, N.; WALLIS, F.; HICKEY, K.; GUPTA, R. «Correlation of serum CA125 with stage, grade and survival of patients with epithelial ovarian cancer at a single centre». *Ir. Med. J.*, 101 (8) (setembre 2008), p. 245-247. PMID: 18990955.
- PARKER, C. E.; BORCHERS, C. H. «Mass spectrometry based biomarker discovery, verification, and validation-quality assurance and control of protein biomarker assays». *Mol. Oncol.*, 8 (2014), p. 840-858.
- PÉREZ-SÁNCHEZ, C.; COLÁS, E.; CABRERA, S.; FALCÓN, O.; SÁNCHEZ-DEL-RÍO, A.; GARCÍA, E.; FERNÁNDEZ-DE-CASTILLO, L.; MURUZABAL, J. C.; ÁLVAREZ, E.; FIOL, G.; GONZÁLEZ, C.; TORREJÓN, R.; MORAL, E.; CAMPOS, M.; REPOLLÉS, M.; CARRERAS, R.; JIMÉNEZ-LÓPEZ, J.; XERCAVINS, J.; AIBAR, E.; PERDONES-MONTERO, A.; LALANNE, E.; PALICIO, M.; MAES, T.; ROSELL-VIVES, E.; NIETO, C.; ORTEGA, A.; PEDROLA, N.; LLAURADÓ, M.; RIGAU, M.; DOLL, A.; ABAL, M.; PONCE, J.; GIL-MORENO, A.; REVENTÓS, J. «Molecular diagnosis of endometrial cancer from uterine aspirates». *Int. J. Cancer*, 133 (10) (15 novembre 2013), p. 2383-2391. DOI: 10.1002/ijc.28243. [EPUB: 21 juny 2013. PMID: 23649867]
- PETRICOIN, E. F.; ARDEKANI, A. M.; HITT, B. A.; LEVINE, P. J.; FUSARO, V. A.; STEINBERG, S. M.; MILLS, G. B.; SIMONE, C.; FISHMAN, D. A.; KOHN, E. C.; LIOTTA, L. A. «Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer». *Lancet*, 359 (9306) (16 febrer 2002), p. 572-577. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)07746-2. PMID: 11867112.
- PIENTA, K. J. «Critical appraisal of prostate-specific antigen in prostate cancer screening: 20 years later». *Urology*, 73 (2009), p. S11-20.

- PLANAGUMÀ, J.; DÍAZ-FUERTES, M.; GIL-MORENO, A.; ABAL, M.; MONGE, M.; GARCÍA, A.; BARÓ, T.; THOMSON, T. M.; XERCAVINS, J.; ALAMEDA, F.; REVENTÓS, J. «A differential gene expression profile reveals overexpression of RUNX1/AML1 in invasive endometrioid carcinoma». *Cancer Res.*, 64 (24) (15 desembre 2004), p. 8846-8853. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2066. PMID: 15604243.
- RAMASWAMY, S.; ROSS, K. N.; LANDER, E. S.; GOLUB, T. R. «A molecular signature of metastasis in primary solid tumors». *Nat. Genet.*, 33 (1) (gener 2003), p. 49-54. DOI: 10.1038/ng1060. [EPUB: 9 desembre 2002. PMID: 12469122]
- REVENTÓS I CONTI, J. *Picasso i els Reventós*. Barcelona: Gustavo Gili, 1973.
- RIFAI, N.; GILLETE, M. A.; CARR, S. A. «Protein biomarker discovery and validation: The and uncertain path to clinical utility». *Nat. Biotechnol.*, 24 (2006), p. 971-983.
- RIGAU, M.; MOROTE, J.; MIR, M. C.; BALLESTEROS, C.; ORTEGA, I.; SÁNCHEZ, A.; COLÁS, E.; GARCIA, M.; RUIZ, A.; ABAL, M.; PLANAS, J.; REVENTÓS, J.; DOLL, A. «PSGR and PCA3 as biomarkers for the detection of prostate cancer in urine». *Prostate*, 70 (16) (1 desembre 2010), p. 1760-1767.
- RIGAU, M.; ORTEGA, I.; MIR, M. C.; BALLESTEROS, C.; GARCIA, M.; LLAURADÓ, M.; COLÁS, E.; PEDROLA, N.; MONTES, M.; SEQUEIROS, T.; ERTEKIN, T.; MAJEM, B.; PLANAS, J.; RUIZ, A.; ABAL, M.; SÁNCHEZ, A.; MOROTE, J.; REVENTÓS, J.; DOLL, A. «A three-gene panel on urine increases PSA specificity in the detection of prostate cancer». *Prostate*, 71 (16) (desembre 2011), p. 1736-1745.
- ROETT, M. A.; EVANS, P. «Ovarian cancer: An overview». *Am. Fam. Physician*, 80 (6) (15 setembre 2009), p. 609-616. PMID: 19817326.
- RYNNE-VIDAL, A.; AU-YEUNG, C. L.; JIMÉNEZ-HEFFERNAN, J. A.; PÉREZ-LOZANO, M. L.; CREMADES-JIMENO, L.; BÁRCENA, C.; CRISTÓBAL-GARCÍA, I.; FERNÁNDEZ-CHACÓN, C.; YEUNG, T. L.; MOK, S. C.; SANDOVAL, P.; LÓPEZ-CABRERA, M. «Mesothelial-to-mesenchymal transition as a possible therapeutic target in peritoneal metastasis of ovarian cancer». *The Journal of Pathology*, 242 (2) (juny 2017), p. 140-151. DOI: 10.1002/path.4889. [EPUB: 3 abril 2017. PMID: 28247413; PMCID: PMC5468005]
- SMITH, D. S.; CATALONA, W. J. «Interexaminer variability of digital rectal examination in detecting prostate cancer». *Urology*, 45 (1995), p. 70-74.
- STATTIN, P.; CARLSSON, S.; HOLMSTRÖM, B.; VICKERS, A.; HUGOSSON, J.; LILJA, H.; JONSSON, H. «Prostate cancer mortality in areas with high and low prostate cancer incidence». *J. Natl. Cancer Inst.*, 106 (3) (març 2014), p. dju007. DOI: 10.1093/jnci/dju007. [EPUB: 7 març 2014. Erratum in: *J. of the Natl. Cancer Inst.*, 106 (8) (agost 2014), p. dju193. (DOI: 10.1093/jnci/dju193. PMID: 24610909; PMCID: PMC3982781)]
- TROTABAS, G. «The digital twin in healthcare: What it is and why it matters». *LinkedIn*, (10 abril 2019). Disponible en línia a: <<https://www.linkedin.com/pulse/digital-twin-healthcare-what-why-matters-ghada-trotabas>> [Consulta: 15 gener 2021].
- VILARDELL, M. *Ser metge: L'art i l'ofici de curar*. Barcelona: Plataforma, 2009.
- WEILBAECHER, K. N.; GUISE, T. A.; MCCAULEY, L. K. «Cancer to bone: A fatal attraction». *Nat. Rev. Cancer*, 11 (6) (juny 2011), p. 411-425.
- WONG, D. T. «Salivary extracellular noncoding RNA: Emerging biomarkers for molecular

diagnostics». *Clin. Ther.*, 37 (3) (1 març 2015), p. 540-551. DOI: 10.1016/j.clinthera.2015.02.017. [EPUB: 18 març 2015. PMID: 25795433; PMCID: PMC4395471]
УЕКТА, S.; SHIH, I. H.; BARTEL, D. P. «MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA». *Science*, 304 (5670) (23 abril 2004), p. 594-596. DOI: 10.1126/science.1097434. PMID: 15105502.

