

**DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I ANATOMIA PATOLÒGICA
FACULTAT DE MEDICINA
UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**PROGRAMA DE DOCTORAT
ANATOMIA PATOLÒGICA
Bienni 1997-1998**

**AVALUACIÓ DE LA UTILITAT COM A MARCADORS
PRONÒSTICS EN CÀNCER COLORECTAL DE P53, P21, P27 I
CICLINA E .**

Tesi presentada per Felip Vilardell Villellas
per a optar al grau de Doctor

Director de tesi
Dr. Gabriel Capellà Munar

Tutor
Prof. Dr. J. A. Bombí

Cap de Departament
Dr. Carles Enrich

Barcelona, Abril de 2005

Aquesta Tesi Doctoral ha estat possible gràcies a la concessió de la beca BEFI amb número d'expedient 01/9229, per part del "Instituto de Salud Carlos III".

“Només sé que no sé res”

Sòcrates.

AGRAÏMENTS

Vull donar les gràcies a totes les persones que amb la seva ajuda, el seu suport, i sobretot la seva amistat, han fet possible la realització d'aquesta tesi. Com que em resulta molt difícil establir jerarquies, i a més, no desitjo que ningú pugui sentir-se menyspreat, crec que el millor serà que dediqui unes paraules a cadascú de vosaltres per l'ordre cronològic en què ens vam conèixer.

Primera època, d'Anatomia Patològica al Laboratori vell:

El meu sincer i agraït record per a la Dra. **Carme Benasco**, que ja fa uns anys que després de molt patiment va conèixer El Qui És. Des de el primer dia de la meva residència, la seva relació amb mi va ser gairebé maternal. Gràcies per haver manifestat obertament els teus sentiments envers mi. Des de gairebé el primer dia, va pensar en possibles temes per a la realització de la meva tesi. Molt aviat va presentar-me al Dr. Víctor Moreno, que va ser qui va introduir-me en el tema de la p53. En els moments en què l'obtenció de la primera beca semblava més difícil d'aconseguir, em va ajudar a superar els obstacles burocràtics.

Moltes gràcies al Dr. **Roger Bernat Landoni** pel seu tracte amigable amb nosaltres els residents. Sempre hem parlat amb confiança, i va voler ser l'investigador principal durant la primera beca.

Dra. **Belem Lloberas**. Moltes gràcies per haver accedit a ser, sempre que ha calgut, el patòleg segon lector de les preparacions immunohistoquímiques d'aquesta tesi. Gràcies per haver estat tan accessible.

Olga Campos. Ens vam conèixer al poc temps de començar la meva residència. Recollir les mostres dels adenocarcinomes colorectals no sempre era una feina agradable, però tu vas fer que fos molt més entretingut. Segurament no ho recordaràs però, anys més tard, en una reunió del Laboratori, vas explicar coses de mi a un Cap de Servei que penso que van facilitar la meva permanència al laboratori. Moltes gràcies per la teva amistat, sinceritat i ajuda.

Esther Villalba. Moltes gràcies pels talls de parafina per a la immunohistoquímica, l'ajuda diària mentre feia les immunos, i per haver-me posat al dia de la música actual.

Dr. **Víctor Moreno**. Moltes gràcies per haver comptat amb mi des dels primers moments per a la avaluació de les primeres immunos sobre p53, per haver-me introduït en aquest tema, pels teus consells i la teva ajuda per a poder aconseguir la primera beca de l'hospital, per la calma que em vas transmetre en alguns moments de certa angoixa, per les orientacions que m'has donat en temes d'estadística i, sobretot, per haver-me presentat al Dr. Capellà.

Agnès Figueras. Ens vam conèixer també molt aviat, quan vaig començar la residència. Moltes gràcies per haver-me ensenyat els secrets de la immunohistoquímica i haver-me ensenyat a fer-la. Però sobretot, moltes gràcies per la teva, ja vella, amistat. Ha estat un plaer treballar amb una companya de feina com tu.

Prof. Dr. **Josep A. Bombí**. Moltes gràcies per haver organitzat cursos de doctorat adreçats a residents d'Anatomia Patològica, i haver acceptat ser el meu Tutor de tesi.

Dr. **Gabriel Capellà**. Moltes gràcies Gabi, per haver-me admès al teu Laboratori, el març de 2000. Per haver-me permès introduir-me en el món de la patologia molecular. Per haver estat i ser encara, un Cap amb qui es pot parlar. Per l'interès que vas posar a l'hora de demanar la segona beca, la beca BEFI que m'ha possibilitat poder realitzar aquesta tesi. Per haver confiat i haver-me donat confiança durant aquests anys en la meva feina, i per haver volgut ser el meu Director de Tesi.

Prof. Dr. **Oriol Bachs**. Moltes gràcies per haver acceptat ser co-director de la meua tesi, i haver-la supervisat en el transcurs de la seua realització.

Dr. **Miquel Àngel Peinado**. Moltes gràcies per les orientacions que vas donar-me per a la redacció del projecte de la primera beca, per ajudar-me a contactar per primera vegada via internet amb l' "Instituto de Salud Carlos III" , una tarda que no funcionava la xarxa des del nostre Laboratori i gairebé s'acabava el termini, i per fer-me veure que potser, no totes les mutacions de p53 tenien la mateixa importància.

Sara González. Muchas gracias Sara, por haber enseñado a un clásico patólogo "morfológico" como yo, la teoría y la práctica de la PCR, y por haberme supervisado directamente en los aspectos más prácticos, durante la realización de la parte más "molecular" de esta tesis.

Bibiana Esteve. Ja fa uns quants anys que vas abandonar el Laboratori i no sé si llegiràs això algun dia; però moltes gràcies per haver-me ensenyat a fer gels de poliacrilamida, el primer dia mateix de la meua estança al Laboratori. Moltes gràcies per les converses divertides que sovint teniem, per exemple sobre el teu poble, Beget, i la, al teu parer, massa corbada carretera que el meu pare i altres soldats van traçar quan feien la "mili", per anar de Camprodon a Beget.

Gemma Aiza. Moltes gràcies per haver guardat tan bé els DNA dels carcinomes recollits a Bellvitge, pels protocols d'extracció de DNA que m'has anat explicant, i per les ja més recents lliçons de "captura".

Cristina Rodríguez Merchant. També fa anys que vas marxar del Laboratori, però recordo que em vas ajudar en les meves primeres PCRs i a revelar i fer les fotos dels primers gels.

Mònica Grau. Moltes gràcies per la teua simpatia, alhora exigent. Em vas ensenyar molt bé, a fer uns gels de plata per a SSCP molt polits. Un dia, mentre m'explicaves una cosa, algú em va fer distreure i em vas esbrincar, però ara em fa gràcia recordar-ho.

Mar Varela. Ets molt competent en la teua feina i, sobretot, bona persona. Moltes gràcies per la teua ajuda en la resolució de petits problemes de la feina diària.

Neus Bayó. Estic encantat d'haver-te conegut. Moltes gràcies per la teua amistat, demostrada amb la paciència amb què has suportat durant tants dinars les meves converses sobre alguns temes que tant m'obsessionen. Ara ja deus saber que, en el fons, no sóc tan ferotge com inicialment et vaig semblar.

Mireia Menéndez. Ets una noia gairebé angelical, molt treballadora, i una excel·lent companya de treball.

Antònia Obrador. També va sorgir una bona amistat de bon començament. Ho hem passat bé mirant talls de tumors congelats al microscopi i alguna que altra hematoxilina. Moltes gràcies també, per les excel·lents ensaïmades de la teua terra amb què tantes vegades i tan generosament ens has obsequiat al laboratori.

Dra. **Gemma Tarafa**. Quan vaig arribar al Laboratori estaves passant una temporada a Yale, i després et vas centrar en la teua tesi, de manera que vam tardar a conèixer-nos. Però després va sorgir una amistat molt autèntica; ha estat una gran satisfacció per a mi treballar amb tu durant aquests anys i rebre els teus consells. Et desitjo que durant molts anys continuïs sent tan eficient com ara.

Dra. **Elisenda Vendrell**. Una amistat molt agradable la teua, des de fa temps. Moltes gràcies per les teves consultes sobre temes d'histologia i pels teus consells en els trams finals d'aquesta tesi.

Dr. **Jordi Frigola**. També eres fora quan vaig arribar, i després has tornat a marxar durant molt de temps, de manera que hem coincidit poc. Però recordo aquell dia que vam fer pràctica de captura al microscopi del Clínic. L'Eli, tu i jo pràcticament hem llegit les tesis al mateix temps.

Dr. **Ramon Alemany**. En tu he conegut el més genial biòleg del Laboratori, amb llarga experiència als USA, i alhora una persona molt senzilla. Moltes gràcies per la teva amistat i per les converses tant interessants durant molts dinars. I per haver-te apuntat a les festes que he fet a casa meva.

Dr. **Manel Cascalló**. Amb tu gairebé hauria de repetir el que li he dit al Ramon. Gràcies per tantes converses interessants que hem tingut, i et demano també perdó si he estat massa recurrent amb alguns temes meus.

Elisabet Guinó. Moltes gràcies Elisabet, per haver-me ensenyat a fons els secrets del programa SPSS, i pel molt que m'has ajudat amb tantes bases de dades. Sense aquesta ajuda no hauria estat possible arribar als resultats finals de la tesi.

Segona època, en el Laboratori nou:

Mar Muñoz. Gràcies per ser tan bona noia, per la teva educació i ... per les estupendes magdalenes que ens has portat tan sovint i que ens han ajudat a aguantar llargues tardes.

Jairo Rodríguez. Encantat d'haver-te conegut, defensor a la teva manera, de la nostra ciutat, Lleida.

Cristina Morales. Muchas gracias por la amabilidad que me has dispensado.

Raquel Cuesta. Moltes gràcies per la teva ajuda cada vegada que els termocicladors se'm resistien.

Josep Maria Pujal. Pont entre el nostre Laboratori i els mitjans de comunicació andorrans. Moltes gràcies per la teva ajuda en temes informàtics, tu que ets el "hacker" del Laboratori, però sobretot, per la teva amistat i el bon ambient de treball que has creat. Sempre estàs exultant d'energia; no sé com ho fas.

Yolanda Rubio. Moltes gràcies per la teva ajuda a l'hora de fer comandes i enviar missatges, en un Laboratori que cada vegada és més gran i de funcionament més complex.

Dr. **Alberto Villanueva**. Muchas gracias por haber puesto a mi servicio en innumerables ocasiones, tu larga experiencia norteamericana y haberme ayudado con ella, a preparar todo tipo de "buffers", alicuotar primers y por el desinterés con que me has dejado todo tipo de "kits" comerciales. También hemos mantenido conversaciones sobre muchos temas castellanos y manchegos interesantes.

Álvaro Aytés. Moltes gràcies per les converses tan interessants que hem tingut sobre el Pirineu, el Pallars, política, religió,..., però sobretot per la teva amistat honesta i sincera; encara que no ho diguis, el teu lema és ... "al pan, pan y al vino, vino, caiga quien caiga y le pese a quien le pese". Això té molt de valor.

Dr. **David G. Molleví**. Moltes gràcies David per la teva amistat i pel desinterès i entusiasme amb què has aplicat els teus coneixements d'edició informàtica de fotografia, en el disseny de les cobertes d'aquesta tesi, molt més vistoses, elegants i sofisticades del que les hauria fet jo.

Dra. **Mireia Morell**. Moltes gràcies Mireia, per tantes vegades que m'has ajudat en molts aspectes sense que t'ho hagués de demanar, per la teva amabilitat i la teva paciència amb mi. I per les vegades que m'has demanat assessorament histopatològic en els teus temes.

Dr. **Josep Balart**. Moltes gràcies pel teu tracte senzill, i pel sentit de minuciositat, rigor i detallisme que transmits, del qual sempre se n'acaba aprenent.

Alena Gros Vidal. Encantat estic d'haver-te conegut a tu, que ets el toc de bellesa exòtica catalana-txeco-colombiana-nordamericana del laboratori, a part de molt bona noia i una biòloga amb molta projecció. Gràcies pel teu suport anímic i per haver aguantat amb paciència els meus temes recurrents.

Ariane Pérez. Veritable enllaç entre la recerca i la premsa de divulgació científica. Moltes gràcies pel desinterès amb que m'has ajudat a buscar informació per la xarxa i a

fer alguns càlculs enrevessats. Hem mantingut moltes converses agradables durant els dinars i els cafès, i s'ha forjat una bona amistat.

Regina Mayor. Clase y distinción, en el trabajo y fuera de él. Muchas gracias por tu trato amable conmigo, y por los momentos que accediste a compartir con nosotros, las cenas, el voley-playa, la excursión a La Molina...

María Martínez. Moltes gràcies per la teva empena, dinamisme i amistat; per tenir controlat en tot moment, on es troba cada primer, cada marcador de pes molecular i cada reactiu, i deixar-los sempre ben preparats i aliquidats, la qual cosa resulta sempre de molta ajuda.

Dra. Berta Laquente. Procedente de la medicina asistencial, has querido conocer también, entre guardia y guardia, qué es esto de la investigación. Muchas gracias por tu simpatía, amabilidad, y esa sencillez no siempre fácil de hallar entre los clínicos.

Dra. Marta Pineda. Malgrat que hem coincidit durant relativament poc temps al laboratori, ha sorgit una bona amistat entre nosaltres. Gràcies per haver-me transmès les teves experiències de quan feies la tesi.

Laura Padullés. Una molt jove experta amb el microscopi de captura làser i posterior extracció de RNA. Moltes gràcies per la teva simpatia.

Gràcies a **Sònia Guedan, Jordi Martínez, Juan José Rojas i Ester Castellsagué** per haver-nos acompanyat a La Molina. Ho vam passar bé durant aquell sopar a casa meva.

Dr. Josep Maria Piulats. Moltes gràcies per ajudar-me a fer conèixer la nostra ciutat, Lleida, i les Terres de Ponent entre la gent del Laboratori.

Gemma Pueyo. Estava acabant d'escriure aquesta tesi i a punt de dipositar-la quan... inesperadament vas ser la darrera incorporació al Laboratori i... ens hem fet bons amics. Confio i espero que d'aquí uns pocs anys siguis tu qui estigui escrivint coses semblants a les que he plasmat en aquestes pàgines.

I no em queda més remei, si no vull que aquest apartat ocupi mitja tesi, que abreujar i agrair els bons moments que d'una manera o d'altra m'has donat, a tu...:

Glòria Julià, Joellen Klaustermeier, Mónica Oliveras, Elena, Vanessa, Dra. Laura Casadomé, Marta,...

... i a vosaltres que ja fa un temps que vau deixar el laboratori:

Nayana, Dr. Pere Jordi, Dr. Julio Diestra, Yolanda, Sonia, Laia, Paco, Galo, Sarah Guinot, Sandra, Laura Martín, Ana Pérez, Marga Majem, Jessica,...

... i la gent del COM: **Eva Valero, Mireia, Vanessa...** i que em perdonin si em descuido d'algú.

Al meu pare

A la meva mare

ÍNDEX

ÍNDEX

1. Introducció.....	9
1.1. Epidemiologia general del càncer colorectal.....	9
1.2. Patrons específics de presentació del càncer colorectal.....	10
1.3. Etiopatogènia del càncer colorectal.....	10
1.4. Lesions precursors del carcinoma colorectal.....	11
1.4.1. Criptes aberrants.....	11
1.4.2. Pòlips hiperplàstics.....	11
1.4.3. Pòlips adenomatosos o adenomes tubulars.....	12
1.4.4. Adenomes vellosos.....	12
1.5. Característiques clíniques del càncer colorectal.....	13
1.6. Anatomia patològica dels carcinomes colorectals.....	15
1.6.1. Trets macroscòpics.....	15
1.6.2. Trets microscòpics.....	15
1.6.3. Altres tipus histològics.....	17
1.6.3.1. Adenocarcinoma mucinós.....	17
1.6.3.2. Carcinoma de cèl.lules en anell de segell.....	18
1.6.3.3. Carcinomes amb diferenciació escamosa.....	18
1.6.3.4. Diferenciació focal tipus coriocarcinoma.....	19
1.6.3.5. Diferenciació endocrina.....	19
1.6.3.6. Miscel.lània.....	21
1.6.4. Estadiatge.....	21
1.6.4.1. TNM.....	21
1.6.4.2. Dukes-Astler-Coller.....	22
1.6.4.3. Jass.....	23
1.6.5. Gradació.....	24
1.6.6. Disseminació i metàstasis.....	24
1.6.7. Altres neoplàsies colorectals.....	24
1.7. Tractament del carcinoma de còlon i recte.....	25
1.8. Pronòstic del carcinoma de còlon i recte.....	26
1.9. Bases genètiques del carcinoma colorectal.....	29
1.9.1. Tipus de mutacions.....	29
1.9.2. Tipus de gens mutats.....	29
1.9.2.1. Oncogens.....	29
1.9.2.2. Gens supressors.....	30
1.9.2.3. Gens reparadors o mutadors.....	36
1.9.3. Genètica del carcinoma colorectal. Conclusions.....	37
1.10. Síndromes canceroses hereditàries.....	38
1.11. Cicle cel.lular i adenocarcinoma colorectal.....	39
1.11.1. Aspectes generals.....	39
1.11.2. Proteïnes que intervenen en el cicle cel.lular.....	41
1.11.2.1. CDKs.....	41
1.11.2.2. Inhibidors de les CDKs.....	46
1.11.3. Dinàmica del cicle cel.lular.....	51
1.11.4. Proteïnes reguladores del cicle cel.lular i càncer.....	53
2. Objectius.....	59
2.1 Hipòtesi.....	59
2.2. Objectiu general.....	59
3. Material i mètodes.....	63

3.1. Pacients i especimens tumorals.....	63
3.2. Anàlisi per tècniques moleculars del gen p53.....	64
3.2.1. Generalitats.....	64
3.2.2. Anàlisi de mutacions puntuals de p53.....	66
3.2.3. Anàlisi de LOH en p53.....	70
3.3. Immunohistoquímica.....	72
3.3.1. Immunohistoquímica sobre seccions histològiques completes.....	72
3.3.2. “Array” tissular (Tissue macroarray.....	74
3.4. Anàlisi estadístic.....	75
4. Resultats.....	79
4.1. Estudi mutacional de p53.....	79
4.1.1. Correlacions clínicopatològiques.....	80
4.1.2. Anàlisi de supervivència.....	80
4.2. Estudi mutacional especificant “hot spots” de p53.....	80
4.2.1. Correlacions clínicopatològiques.....	81
4.2.2. Anàlisi de supervivència.....	82
4.3. Sobreexpressió de p53.....	88
4.3.1. Correlacions clínicopatològiques.....	89
4.3.2. Anàlisi de supervivència.....	89
4.4. LOH de p53.....	90
4.5. P21.....	93
4.5.1. Expressió immunohistoquímica de p21.....	93
4.5.2. Correlacions clínicopatològiques.....	95
4.5.3. Anàlisis de supervivència amb p21.....	97
4.6. Anàlisi combinat de p53 i p21.....	97
4.7. Expressió de p27.....	102
4.7.1. Correlacions clínicopatològiques de p27.....	105
4.8. Correlacions entre p27 i p21.....	106
4.8.1. Anàlisis de supervivència amb les dues proteïnes Cip/Kip.....	108
4.9. Anàlisis de supervivència amb p53, p27 i p21.....	110
4.10. Cyclina E.....	113
4.10.1. Correlacions clínicopatològiques.....	113
4.10.2. Anàlisis univariant de supervivència per cyclina E.....	115
4.10.3. Anàlisi de supervivència univariant amb cyclina E i les proteïnes Cip/Kip.....	118
4.10.4. Anàlisi de supervivència univariant amb cyclina E i p53.....	125
4.11. Anàlisi de supervivència multivariant.....	126
4.11.1. Supervivència global.....	126
4.11.2. Supervivència lliure de malaltia.....	127
4.12. Valor pronòstic en la pràctica assistencial de l’estudi molecular i IHQ de p53, p21, p27 i cyclina E.....	130
4.12.1. p53.....	131
4.12.2. p21.....	132
4.12.3. p53 i p21.....	134
4.12.4. p27.....	134
4.12.5. Cyclina E.....	134
4.13. Anàlisi de predicció de resposta al tractament quimioteràpic.....	135
5. Discussió.....	141
6. Sumari.....	163

7. Conclusions.....	165
8. Bibliografia.....	169
9. Índex de figures.....	185

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Epidemiologia general del càncer colorectal

Els càncers de còlon i recte són la segona neoplàstia maligna més freqüent al món occidental, essent força comuna al Nord-oest d'Europa, Amèrica del Nord i altres zones anglo-saxones, i poc freqüent a l'Àfrica, Àsia i algunes parts de Sudamèrica (Berg JW *et al.*, 1974). Encara que les neoplàsties malignes de pulmó i mama siguin les més freqüents en els sexes masculí i femení respectivament, l'adenocarcinoma de còlon i recte és la neoplàstia interna més freqüent que afecta a ambdós sexes alhora, i per tant, la primera causa de mort per càncer als països occidentals. Són càncers característics dels països desenvolupats, en els quals s'observa un increment lent però constant en la seva incidència. Donat que una de cada vint persones desenvoluparà càncer de còlon, es tracta d'un problema de salut pública important.

Afecta per igual a homes i dones. Del conjunt del càncer colorectal en els homes, el de còlon representa el 60%. En les dones, el de còlon representa el 70%. Per tant, el càncer de còlon es dona amb més freqüència relativa en les dones que en els homes. Aquest càncer presenta una major incidència en les àrees urbanes respecte de les rurals, tant en homes com en dones. L'edat més freqüent de presentació del càncer colorectal és entre la cinquena i setena dècades de la vida, situant-se en el nostre territori l'edat mitjana d'incidència al voltant dels 68 anys en els homes i dels 70 anys en les dones. La distribució per edats és similar en ambdós sexes fins els 60 anys. A partir d'aquesta edat, continua creixent en el grup d'homes mentre que en les dones s'estabilitza. A mesura que el risc de càncer colorectal en un territori augmenta, el càncer de còlon augmenta la seva freqüència distanciant-se del de recte. En el sexe masculí, el càncer de còlon i recte representen el 8.2% i el 5.5% del conjunt de les neoplàsies excloent la pell. En les dones, aquests dos càncers representen el 10.5% i el 4.4% de les neoplàsies respectivament.

1.2. Patrons específics de presentació del càncer colorectal

El càncer de còlon pot ser esporàdic, hereditat o familiar. La forma esporàdica representa al voltant del 70% de carcinomes colorectals a la població.

Menys del 10% de malalts tenen una predisposició hereditària pel càncer de còlon. Entre aquestes síndromes de caràcter genètic s'inclouen aquelles en que l'aparició de pòlips són un tret essencial i aquelles que cursen sense poliposi. Pertanyen al primer grup la poliposi adenomatosa familiar (APC) i les síndromes amb pòlips hamartomatosos. Entre les segones citarem el càncer de còlon hereditari no poliposi (HNPCC o síndrome de Lynch) de tipus I i de tipus II.

El tercer i pitjor conegut tipus de càncer de còlon és aquell en el que dins d'una família, el càncer es presenta amb una freqüència superior a la del carcinoma considerat esporàdic però no encaixa perfectament amb el concepte de síndrome familiar.

1.3. Etiopatogènia del càncer colorectal

En l'etiologia i patogènia de l'adenocarcinoma colorectal hi intervenen factors ambientals i genètics. Nombrosos estudis epidemiològics suggereixen que determinats factors ambientals, majoritàriament de caire dietètic (Levin B *et al.*, 1992) juguen un paper molt important en el desenvolupament de càncer de còlon en la majoria d'individus. La incidència del càncer colorectal és elevada en els països industrialitzats, on es consumeix gran quantitat de carn, greix animal i glúcids refinats, aliments amb gran capacitat d'influència sobre la flora intestinal (Hill MJ *et al.*, 1974) i finalment sobre la composició química del contingut intraluminal. En aquests països es produeix a més una reducció proporcional de la ingesta de fibra vegetal. La importància de la fibra vegetal en la prevenció del càncer rauria en la seva capacitat de fixar en la llum del budell els àcids biliars i els carcinògens potencials, així com de modificar la flora fecal i accelerar el trànsit intestinal, amb el que es reduiria la concentració intraluminal de

carcinògens o cocarcinògens i disminuiria el temps de contacte de les mateixes amb la mucosa colònica. En un estudi de casos i controls realitzat a Mallorca la darrera dècada sobre càncer colorectal i dieta, el consum de carn va resultar ser un factor de risc important mentre que les verdures, especialment del tipus col, col de Brussel·les i bròquil, van resultar altament protectores. Aquest estudi posava de manifest l'efecte protector de la fibra i l'àcid fòlic i un risc augmentat en relació al consum de calories totals i colesterol (J.M. Borràs et al., 1992).

1.4. Lesions precursors del carcinoma colorectal

1.4.1. Criptes aberrants: Descrites inicialment en animals d'experimentació i posteriorment en persones. Poden identificar-se tenyint la mucosa colorectal amb blau de metilè i posteriorment per a observació amb lupa. Microscòpicament s'observen com criptes agrandades i amb canvis d'hiperplàsia i/o displàsia. Poden representar el canvi adenomatós més tempranament identificable, si bé el seu potencial maligne és motiu de controvèrsia.

1.4.2. Pòlips hiperplàstics: Són generalment sèssils i de menys de 5 mm de diàmetre, però poden ser més grans i pediculats. Microscòpicament, són característiques unes glàndules augmentades de mida i amb aspecte en "dents de serra". Les cèl·lules epitelials mostren nuclis petits, de disposició basal i amb abundant citoplasma amb mucina. Pot observar-se augment de l'índex mitòtic només a la base de les glàndules. A mesura que augmenta la mida del pòlip, apareixen canvis en l'arquitectura i diferenciació, increment de la secreció de CEA, canvis en l'expressió dels antígens de grup sanguini, disminució de la secreció de sialomucines i focus amb canvi adenomatós. El terme *adenoma serratum* fa referència a pòlips mixtes hiperplàstics-adenomatosos, amb un prominent aspecte en "dents de serra".

1.4.3. Pòlips adenomatosos o adenomes tubulars: La seva distribució al llarg del budell gruixut és força regular, amb un 40% localitzats al còlon dret, un 40% al còlon esquerre i un 20% al recte. La seva freqüència augmenta amb l'edat. Són més freqüents en blancs que en negres. Es detecta una certa predisposició familiar trasmesa amb caràcter autosòmic dominant. Poden ser sèssils o pediculats. La majoria són asimptomàtics però pot haver hemorràgia en cas de torsió del pedicle. Solen mesurar menys d'1 cm de diàmetre màxim però alguns poden ser prou grans com per a ocasionar canvis en l'hàbit intestinal o intussuscepció. Microscòpicament mostren un increment en el nombre de cèl.lules i glàndules per unitat d'àrea en comparació amb la mucosa normal. Els nuclis es mostren augmentats de mida, hiper Cromàtics i estratificats en menor o major grau, i s'observa un increment del nombre de mitosis, algunes de les quals poden ser atípiques. La producció de mucina sol estar disminuïda. No s'observen diferències morfològiques consistents entre adenomes polipoides, plans o deprimits. La transformació adenomatosa sol començar per la porció superficial de les glàndules. El 76% dels adenomes de més d'1 cm de diàmetre presenten zones amb arquitectura vellosa. Els pòlips adenomatosos amb una proporció equivalent d'àrees tubulars i velloses s'anomenen adenomes túbulovellosos. El grau de displàsia present en els adenomes pot ser gradada en lleu, moderada i severa; aquesta darrera equival al carcinoma intraepitelial (*carcinoma in situ* en sentit estricte). En les àrees més atípiques s'observa expressió de CEA.

Rarament, els adenomes tubulars poden exhibir formació morular, metaplàsia escamosa focal, augment de cèl.lules de Paneth, augment de cèl.lules neuroendocrines, focus de malacoplàquia, metaplàsia òssia i inclús ser receptors de metàstasis d'altres llocs.

1.4.4. Adenomes vellosos: Són un tipus relativament infreqüent de pòlips amb transformació adenomatosa, normalment en pacients de més edat, únics, de localització rectosigmoidea i sèssils. Si són de gran mida poden arribar a ocasionar depleció electrolítica i a ser

circumferencials. Són extremadament friables. El patró arquitectural microscòpic és papil·lar, i el d'expressió de mucines i CEA semblant al dels adenomes tubulars. Amb el temps, un alt percentatge d'adenomes vellosos (entre un 30% i un 70%) esdevé maligne. Quan això succeeix, la consistència indurada i ferma del carcinoma contrasta amb la consistència friable de la resta de l'adenoma.

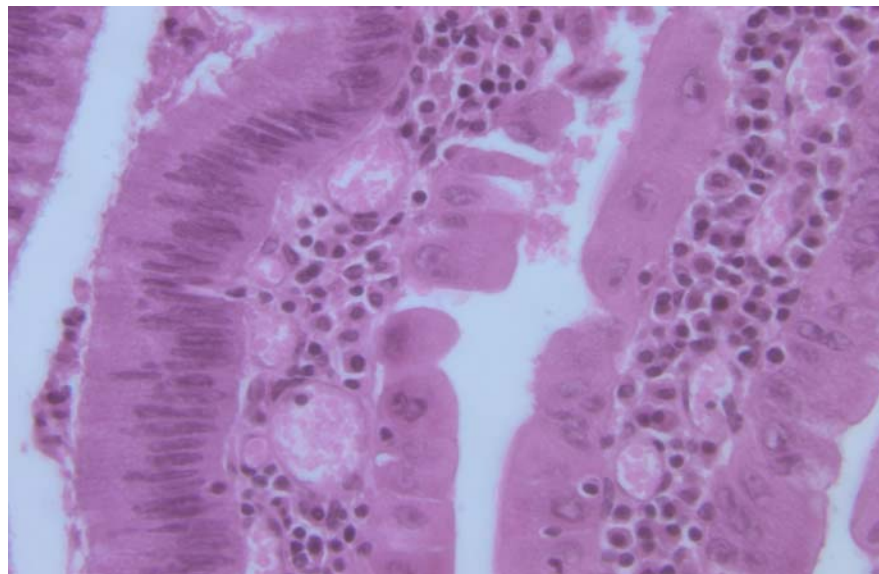


Fig.1. Adenoma túbulo-vellós. A la meitat esquerra de la imatge podem observar àrees de displàsia lleu-moderada, amb els nuclis de les cèl·lules epitelials amb la típica morfologia en "puro", disposats paral·lels entre ells i perpendiculars a la basal. Al centre i a la dreta, cèl·lules epitelials amb nuclis grans, atípics, desordenats i amb nuclèols prominents, corresponents a adenocarcinoma intraepitelial (hematoxilina-eosina, 60x).

1.5. Característiques clíniques del càncer colorectal

El càncer colorectal no acostuma a donar símptomes fins a fases avançades de creixement. La forma de debutar canvia segons quina sigui la seva localització. Els carcinomes del còlon esquerre es manifesten amb rectorràgies i/o canvis en l'hàbit deposicional (alternança de falsa diarrea amb constipació), condicionat per la reducció de la llum. Aquest creixement del tumor a nivell del còlon esquerre pot ocasionar un quadre agut d'obstrucció intestinal amb dolor còlic, distensió abdominal, vòmits i tancament intestinal. Els carcinomes del còlon dret acostumen a donar hemorràgia oculta i anèmia ferropènica normocítica-normocròmica secundària a aquest

sagnat crònic. L'obstrucció intestinal és rara en els tumors d'aquesta localització i especialment de cec, on poden assolir gran tamany i sagnar sense donar clínica oclusiva, excepte si afecten la vàlvula ileocecal. Un de cada quatre carcinomes cecals dona signes suggestius d'apendicitis. A vegades pot detectar-se una massa en l'exploració del quadrant inferior dret de l'abdomen. Poc freqüentment pot tenir lloc una perforació al lloc del tumor o bé al cec deguda a la distensió produïda per un carcinoma rectesigmoideu que oclueixi. El càncer de recte sol presentar una síndrome anorrectal, amb urgència rectal, tenesme i diarrea amb moc i sang. Quan la seva extensió supera la paret rectal, es poden presentar símptomes urinaris per invasió vesical, com hematúria i poliaquiúria. Si s'ha establert una fistula rectevesical, hi haurà neumatúria i infeccions urinàries recurrents. Ademés dels símptomes locals, el càncer colorectal origina símptomes generals com astènia, anorèxia, pèrdua de pes o febre tumoral. Per desgràcia, tots aquests símptomes esmentats solen ser indicatius de malaltia avançada i en els darrers anys molts esforços s'adrecen a detectar tumors en un estadi més precoç. Algunes d'aquestes mesures són la realització d'estudis proctosigmoidoscòpics (Gilbertsen VA *et al.* 1974) en homes i dones per sobre dels 40 anys, que han de permetre detectar al voltant d'un 50% de casos, o la detecció de sang oculta a femtes. L'antigen carcinoembrionari (CEA) (Thompson DMP *et al.* 1969) és un antigen relacionat amb el glicocàlix que ha estat detectat en el serum de pacients amb carcinoma colorectal en el 72% - 97% de casos. Desapareix després de la resecció del tumor i reapareix en cas de recidiva o metàstasi. Els valors de CEA solen ser superiors en casos d'infiltració transmural, en tumors poc diferenciats o en presència d'infiltració vascular, limfàtica o perineural (Zamcheck N *et al.* 1975). Altres carcinomes, com ara estòmac, pancreas, mama o pròstata, i malalties cròniques hepàtiques i renals poden donar alts nivells sèrics de CEA. Malgrat tot, aquest test sol ser negatiu durant els estadis inicials del carcinoma colorectal, i per tant no és un bon mètode de cribatge. La seva principal utilitat és la detecció precoç de metàstasis i com a indicador per a una cirurgia de segona mirada.

1.6. Anatomia patològica dels carcinomes colorectals

1.6.1. Trets macroscòpics

Al voltant d'un 50% dels carcinomes tenen lloc a l'àrea rectosigmoidea tot i que en les darreres dècades s'està observant un augment d'incidència al còlon dret (Cady B *et al.* 1993). Els carcinomes de còlon dret semblen ser més freqüents en gent d'edat avançada (Slater G *et al.* 1982), negres (Thomas CR *et al.* 1992) i en pacients amb malaltia diverticular (Stephansson T *et al.* 1993). Es troben carcinomes sincrònics en un 3% a un 6% de casos.

La majoria d'adenocarcinomes colorectals poden ser descrits macroscòpicament com a polipoids o ulcerats. Una variant d'aquests segons són els anomenats carcinomes plans i que es considera que s'originen "de novo" i no pas a partir de la degeneració d'un adenoma previ (Kuramoto S *et al.* 1989).

Al seccionar el tumor s'observa un teixit blanquinós, freqüentment amb una textura granular, que infiltra i reemplaça la pared del budell. El marge de creixement pot estar ben definit o mostrar projeccions digitiforms.

1.6.2. Trets microscòpics

El tumor maligne habitual al còlon i al recte és un adenocarcinoma moderadament diferenciat, necrotitzant en grau variable i amb major o menor secreció de mucina. Les cèl.lules tumorals són una combinació de cèl.lules columnars i caliciforms, amb ocasionals cèl.lules endocrines i més excepcionalment cèl.lules de Paneth. El carcinoma invariablement origina una reacció inflamatòria i desmoplàsica peritumoral, més prominent a nivell del seu marge de creixement. La majoria de cèl.lules inflamatòries són limfòcits T, però també hi són presents limfòcits B, cèl.lules plasmàtiques, histiòcits i cèl.lules dendrítiques. El tumor pot envair totes les capes de la paret intestinal, el teixit adipós perivisceral, espais perineurals i vasos. Rarament l'estroma peritumoral pot mostrar metaplàsia òssia.

Els límits del tumor poden mostrar focus d'adenoma residual, però és més corrent trobar a aquest nivell unes glàndules d'aspecte hiperplàstic, amb més cèl.lules caliciforms del normal i amb una secreció de mucina histoquímicament anòmala, el que s'anomena mucosa transicional. Això és probablement un canvi reactiu, també observable en el marge de creixement d'altres tumors, com poden ser limfomes o carcinomes metastàsics, i fins i tot en un contexte no neoplàstic.

Immunohistoquímicament, els adenocarcinomes colorectals són invariablement positius per a queratines. Un patró bastant comú és la positivitat per a queratina 20 i la negativitat per a queratina 7. Això és important en el diagnòstic diferencial entre adenocarcinoma colorectal i adenocarcinoma pulmonar. Els adenocarcinomes colorectals són positius per a CEA, fins al punt en que la negativitat del CEA en un adenocarcinoma fa improbable l'origen colorectal del mateix. Els anticossos monoclonals amb més sensibilitat i especificitat són aquells que reconeixen els epítops de grup 1 o 2 de la mol.lècula del CEA. La glicoproteïna associada a tumor (TAG-72), reconeguda per l'anticòs monoclonal B72.3 és present en més del 80% d'adenocarcinomes colorectals infiltrants (Klug T1 *et al.*, 1986) però també en la majoria de pòlips hiperplàstics i adenomes, i inclús rarament en la mucosa normal. També és present en càncer d'estómac, mama, pulmó, pròstata i ovari (Guadagni J *et al.*, 1991). L'evaluació de TAG-72 en serum de malalts amb carcinoma colorectal mostra una sensibilitat al voltant del 40% i sembla que el seu nivell sèric correlaciona amb l'estadi del tumor (Guadagni F *et al.*, 1996). Grizzle W *et al* (2001) consideren que TAG-72 detectat per l'anticòs CC49 pot ser el més útil i sensible dels antigens tumorals oncofetsals emprats com a marcadors moleculars en càncer colorectal. Un altre antigen identificat en teixit tumoral i serum d'alguns casos d'adenocarcinoma colorectal és l'anomenat antigen extern llarg (LEA). Els carcinomes de còlon freqüentment mostren pèrdua d'expressió dels isoantigens dels grups sanguinis i de HLA-A, B i C, sobretot quan són poc diferenciats. Aquest tumors adquireixen reactivitat per a l'antigen H de

grup sanguini. En la meitat de casos s'observa reactivitat pel component secretor de les immunoglobulines, particularment intensa en els tumors ben diferenciats. S'ha descrit l'expressió de novo d'un tipus específic de sialil-transferasa, fet que dona lloc a una excessiva sialilació de les glicoproteïnes de superfície cel·lular i que es reflecteix en anomalies en la unió de lectines. Un altre marcador consistentment expressat en el carcinoma colorectal, amb independència del grau de diferenciació és villina, una proteïna del citoesquelet associada amb els feixos de microfilaments axials dels microvilli. També es característic d'aquests tumors un augment en l'expressió de catepsina B, sobretot en els estadis avançats (Campo E *et al.*, 1994). Un percentatge no menyspreable de carcinomes colorectals mostren reactivitat immunohistoquímica per a HCG, sobretot els mucinosos i poc diferenciats. S'ha detectat fosfatasa alcalina placentària (PLAP) en al voltant d'un 10% de carcinomes colorectals.

Ultraestructuralment, una característica constant de l'adenocarcinoma colorectal és la presència de col·leccions prominents de microfilaments perpendiculars a la membrana cel·lular i que penetren la vora en raspall. Això també s'ha vist en adenocarcinomes de tipus intestinal gàstrics, de budell prim, bufeta biliar i pancreas.

1.6.3. Altres tipus histològics

1.6.3.1. Adenocarcinoma mucinós

És un tipus especial de carcinoma colorectal en el que es formen grans llacs de mucina extracel·lular barrejats amb col·leccions de cèl·lules tumorals. Per definició, aquests llacs constitueixen més del 50% de la massa tumoral. A vegades s'observa també formació de mucina intracel·lular que dona a les cèl·lules tumorals un aspecte en anell de segell, sense que s'hagi de confondre aquest tumor amb el carcinoma de cèl·lules en anell de segell o mucosecretor intracel·lular pur. El carcinoma mucinós representa un 15% del total de carcinomes colorectals i és més freqüent al recte. També s'associa amb més freqüència amb

adenomes que l'adenocarcinoma convencional i tendeix a presentar-se en un estadi més avançat. El seu pronòstic és una mica pitjor que el de l'adenocarcinoma convencional, almenys quan està localitzat al recte.

1.6.3.2. Carcinoma de cèl.lules en anell de segell

O tipus linitis plàstica, és una forma rara d'adenocarcinoma al còlon que normalment afecta persones d'edat més jove. Macroscòpicament sol presentar-se com a una infiltració difusa de la paret del budell, de forma semblant al seu homòleg gàstric, més habitual. També ha estat descrit originant-se a partir de pòlips adenomatosos. Les cèl.lules tumorals creixen de manera difusa, sense gairebé formació de glàndules. La major part de la mucina produïda és intracel.lular, l'acumul de la qual ocasiona un desplaçament del nucli i la típica forma en anell de segell de les cèl.lules. Aquest tumor té tendència a disseminar per la superfície peritoneal (carcinomatosi peritoneal) i a donar metàstasis als ganglis limfàtics i a l'ovari, més que no pas al fetge. El seu pronòstic és molt dolent. Abans de diagnosticar un carcinoma de cèl.lules en anell de segell primari colorectal, s'ha de pensar en la possibilitat que es tracti de la metàstasi d'un primari gàstric.

1.6.3.3. Carcinomes amb diferenciació escamosa

Més freqüent en els tumors localitzats al cec. En la majoria de casos el component escamós s'associa amb elements glandulars (*carcinoma adenoscamós*) però a vegades es diagnostiquen *carcinomes escamosos* purs. S'ha observat associació entre diferenciació escamosa en carcinoma colorectal i colitis ulcerosa. En els carcinomes escamosos localitzats al recte més distal s'ha de considerar que es tracti de la progressió o d'una metàstasi submucosa d'un carcinoma del canal anal.

1.6.3.4. Diferenciació focal tipus coriocarcinoma

També succeeix en carcinomes gàstrics i de bufeta biliar. Mitjançant immunohistoquímica es pot demostrar HCG en les cèl.lules tumorals. Més rarament tot el tumor pot tenir l'aspecte de coriocarcinoma. En canvi, és més habitual que adenocarcinomes convencionals expressin HCG.

1.6.3.5. Diferenciació endocrina

Pot manifestar-se de diferents maneres:

- Com a cèl.lules endocrines aïllades en un adenocarcinoma convencional, tret que presenten entre un 15% i un 40% dels tumors i que no fa canviar el comportament biològic dels mateixos (Bosman FT *et al.*, 1992). Es pot identificar mitjançant immunohistoquímica o tècniques d'hibridació per a marcadors neuroendocrins, com per exemple cromogranina.
- En forma de tumors amb una composició mixta, en que s'alternen àrees d'adenocarcinoma típic amb d'altres amb una clara diferenciació de tumor neuroendocrí (Hernández FJ *et al.*, 1969).
- En la forma de *carcinomes de cèl.lula petita* o en gra de civada ("oat-cell"), histològicament semblant al seu homonim pulmonar (Clery AP *et al.*, 1961). Ultraestructuralment mostren alguns grànuls secretors electrodensos al citoplasma, i des de'l punt de vista immunohistoquímic poden mostrar positivitat per diversos marcadors neuroendocrins com sinaptofisina o enolasa neural específica. En aquests tumors es poden trobar focus amb diferenciació glandular, amb o sense producció de mucina, així com diferenciació escamosa. La majoria de carcinomes de cèl.lula petita del còlon es localitzen al còlon dret. Alguns d'aquests carcinomes s'originen a partir d'adenomes, sobretot de tipus vellós. El pronòstic es molt dolent, amb metàstasis temperanes a ganglis i fetge.

- En forma de *carcinomes neuroendocrins* però amb un patró morfològic més organoide i compostos per unes cèl.lules més grans que els carcinomes neuroendocrins de cèl.lula petita. Han rebut la denominació, entre d'altres, de variant intermitja del carcinoma neuroendocrí de cèl.lula petita, carcinoma neuroendocrí d'alt grau, o la poc afortunada de carcinoide atípic (Gaffey MJ *et al.*, 1990).
- En forma de *tumors carcinoïdes*. Els tumors carcinoïdes poden aparèixer en qualsevol tram del còlon però són més freqüents al recte (Horn RC Jr *et al.*, 1949). Els localitzats al còlon solen ser grans, infiltrant profundament a través de la paret intestinal i afectant ganglis limfàtics regionals. Els localitzats al recte solen ser molt més petits, molts d'ells arrodonits, sense ulceració i mesurant menys de cinc mm de diàmetre. Les metàstasis ganglionars són molt menys freqüents, i solen donar-se en tumors de més de 2 cm de diàmetre. S'han reportat tumors carcinoïdes associats a colitis ulcerosa o a malaltia de Crohn, tendint en aquests casos a ser múltiples. També s'han reportat associats a carcinoïdes ovàrics. Però els carcinoïdes del còlon no solen produir la síndrome carcinoïde. Macroscòpicament poden ser plans, lleugerament deprimits o polipoides, però una de les característiques més típiques és el color groc que prenen després de fixar-se en formol. Microscòpicament apareix com a cordons de cèl.lules petites i uniformes infiltrant l'estroma, que poden associar-se a proliferació de micronius cel.lulars a les criptes. També pot trobar-se un component minoritari túbulo-acinar amb producció de mucina. Els carcinoïdes colorectals són consistentment positius amb la tinció de Grimelius o Sevier-Munger i es recorden carcinoïdes rectals argentafins. En quant a la immunohistoquímica, solen ser positius pels marcadors endocrins (enolasa neural específica, cromogranina, sinaptofisina) i per a una varietat d'hormones peptídiques, les més freqüents somatostatina, glucagon, substància P i pèptid YY, aquesta darrera especialment interessant perquè sol ser negativa en carcinoïdes d'altres

origens (Federspiel BH *et al.*, 1990). Altres pèptids demostrats en carcinoïdes són gastrina, colecistoquinina, calcitonina, motilina i polipèptid pancreàtic. Molts d'aquests tumors són polihormonals. Els carcinoïdes rectals poden també ser immunoreactius per CEA, gonadotropina coriònica humana i fosfatasa àcida prostàtica (però no pas per l'antigen prostàtic específic).

1.6.3.6. Miscel·lània

L'acúmul de glucogen en les cèl·lules tumorals els hi pot donar l'aspecte de *cèl·lules clares*. S'ha descrit un cas d'adenocarcinoma cecal amb *trets rabdoïdes*. Carcinoma *basaloïde o cloacogènic*, semblant al seu homòleg anal, probablement desenvolupat a partir de canvi metaplàsic.

1.6.4. Estadiatge

1.6.4.1. TNM

En principi, el càncer colorectal es pot estadiar mitjançant el sistema TNM. A diferència del que succeeix en altres territoris anatòmics, la T no fa referència a la mida del tumor sino a la profunditat d'infiltració. L'absència de tumor primari es classifica com a T0. En còlon, el terme *carcinoma in situ* (pTis) engloba el concepte de carcinoma intraepitelial (l'equivalent en sentit estricte al *carcinoma in situ* d'altres òrgans i que correspon a la displàsia severa) i el de carcinoma intramucós, que és aquell que infiltra només la làmina pròpia. Donat que al còlon els vasos limfàtics de la làmina pròpia es disposen immediàtament per sobre la *muscularis mucosae*, això fa que el carcinoma intramucós es comporti clínicament com un *carcinoma in situ*. PT1 són els tumors que envaeixen la submucosa, pT2 els que infiltren la *muscularis propria*, pT3 els que travessen tota la paret intestinal i infiltren fins la subserosa o els teixits periviscerals no peritonealitzats, i pT4 els que envaeixen altres estructures o òrgans (pT4a) o

perforen el peritoneu (pT4b). N fa referència a l'existència de metàstasis ganglionars i es classifica en pN0 (sense evidència de metàstasis ganglionars), pN1 (metàstasis en 1 a 3 ganglis limfàtics periviscerals), pN2 (metàstasis en 4 o més ganglis limfàtics periviscerals). Finalment, M fa referència a la presència de metàstasis visceral o a distància i es classifica en M0 o M1. La presència de metàstasis en ganglis limfàtics no regionals es considera pM1.

1.6.4.2. Dukes-Astler-Coller

En 1937 Dukes va proposar un sistema d'estadiatge pels carcinomes rectals que també pot aplicar-se als carcinomes de còlon. Avui dia encara és ampliament emprada per la seva relació directa amb el pronòstic. Els tumors amb estadi A només infiltren la paret intestinal mentre que els tumors amb estadi B infiltren més enllà de la paret intestinal. Si la serosa del budell o el teixit adipós subperitoneal no han estat infiltrats el tumor és encara un carcinoma amb estadi A de Dukes. Els tumors en estadi C són els que presenten metàstasis ganglionars. Posteriorment van aparèixer diverses modificacions d'aquest sistema d'estadiatge, la primera d'elles pel propi Dukes, que va subdividir l'estadi C entre aquells amb metàstasis als ganglis regionals o pericòlics (C1), i aquells amb metàstasis als ganglis associats a la lligadura dels grans vasos mesentèrics (C2). Més tard va ser afegida per altres autors una categoria D per a indicar la presència de metàstasis visceral.

Un sistema d'estadiatge diferent va ser proposat en 1954 per Astler i Coller basat en un esquema previ de Kirklin et al. Aquest sistema d'estadiatge d'Astler-Coller és molt emprat i útil però sovint referit impròpiament com a Dukes. És el sistema emprat a l'Hospital de Bellvitge i per tant a la nostra sèrie, i classifica els tumors en estadi A (limitat a la mucosa), B1 (infiltrant la capa muscular pròpia sense travessar-la completament), B2 (travessant completament la muscular pròpia), C1 (amb metàstasis ganglionars però limitat a la paret intestinal), C2 (amb metàstasis ganglionars i infiltració dels teixits periviscerals), D (amb metàstasis visceral).

El sistema d'estadiatge de Dukes modificat per Astler i Coller és considerat fins el moment actual el més simple i consistent com a indicador de pronòstic.

1.6.4.3. Jass

Un altre sistema d'estadiatge és el proposat per Jass, en el qual s'adjudica un punt si el tumor es infiltratiu en lloc d'expansiu, un altre punt si travessa tota la paret intestinal, un altre punt en absència d'infiltrat inflamatori limfoplasmocitari peritumoral "Crohn-like", i un punt en presència de metàstasis ganglionars. La màxima gradació final possible és per tant, IV. S'ha observat una bona concordància entre la presència d'un infiltrat limfoplasmocitari peritumoral i el fenotip mutador, amb alta inestabilitat de microsatèl.lits.

Estadi 0	Tis	N0	M0	
Estadi I	T1	N0	M0	Dukes A
	T2	N0	M0	Dukes A
Estadi II	T3	N0	M0	Dukes B
	T4	N0	M0	Dukes B
Estadi III	Qualsevol T	N1	M0	Dukes C
	Qualsevol T	N2	M0	Dukes C
Estadi IV	Qualsevol T	Qualsevol N	M1	Dukes D

Taula 1. Agrupament d'estadis en el carcinoma colorectal

1.6.5. Gradació

Microscòpicament, els adenocarcinomes colorectals poden ser gradats en ben diferenciats, moderadament diferenciats i poc diferenciats. La tendència actual és intentar disminuir la subjectivitat classificant-los únicament en dos graus, baix grau i alt grau, depenent de si hi ha més o menys d'un 50% de diferenciació glandular.

1.6.6. Disseminació i metàstasi

Els carcinomes plans mostren més tendència a infiltrar en profunditat i amb permeació limfovascular que els polipoides o clarament exofítics. Els llocs més habituals de metàstasi és als ganglis limfàtics locoregionals i al fetge. Altres llocs habitualment receptors de metàstasi són el peritoneu, els pulmons i els ovaris. La incidència de metàstasi ovàriques és prou elevada com per a justificar una ooforectomia bilateral profilàctica en dones postmenopàusiques al temps de la colectomia radical. Les metàstasi ovàriques poden simular molt bé un cistadenocarcinoma primari ovàric. Altres llocs més rars són el sistema nerviós central, ossos, testicles, úter i cavitat oral.

1.6.7. Altres neoplàsies colorectals

Els carcinomes no són els únics processos neoplàstics malignes existents a nivell colorectal. Escapa als objectius d'aquesta tesi una descripció detallada de tots els tumors que han estat reportats al còlon i al recte. Però a manera de recordatori direm que el còlon i el recte poden ser el lloc d'origen de:

- **Limfomes:** Gairebé sempre de tipus no-Hodgkin, i dins d'aquests poden ser de baix grau tipus MALT, de grau intermig (limfoma del mantell) i d'alt grau (limfoma anaplàsic de cèl.lula gran).

- **Pòlips limfoides:** De caràcter reactiu, localitzats sobretot al recte, constituïts per una hiperplàsia fol·licular reactiva, amb formació de centres germinals.
- **Histiocitosi X o granulomatosi de cèl·lules de Langerhans.**
- Ectàsies vasculars, **hemangiomes cavernosos** i **granulomes piogènics** o botriomicomes.
- **Angiosarcoma:** solitaris o multicèntrics, poden originar-se a partir de teixit de granulació al voltant d'un cos estrany, i poden ser ordinaris o de tipus epitelioides.
- **Sarcoma de Kaposi:** Clínicament pot simular una colitis ulcerosa, particularment en malalts amb SIDA.
- **Lipomes.**
- Tumors de múscul llis: Normalment al recte, on solen ser petits i benignes (**leiomiomes**). Més incidència de **leiomiomes** al còlon i en sentit proximal.
- **Ganglioneuromatosis difuses:** Esporàdiques o associades a malaltia de Von Recklinghausen o a la síndrome MEN IIB.
- **Melanoma:** Localització anorectal.
- **Histiocitoma fibrós maligne, xantogranuloma, carcinosarcoma i tumor de cèl·lules gegants.**
- **Metàstasis** d'altres primaris: Melanomes, carcinomes pulmonars, prostàtics i renals.

1.7. Tractament del carcinoma de còlon i recte

El tractament del carcinoma colorectal és la resecció quirúrgica, variant el tipus de resecció en funció de la localització del tumor. Ileocelectomia dreta és el tractament d'elecció en cec i còlon ascendent. La hemicolectomia esquerra per tumors de còlon esquerre i sigma, l'extensió de la qual dependrà del territori limfadenopàtic previsiblement afectat. Els tumors situats per sota de la reflexió peritoneal es tracten mitjançant resecció anterior baixa o amputació abdominoperineal

depenent de la distància del tumor a l'anus. En aquest sentit s'admet que per a tumors T1 o T2, un marge d'1 cm és suficient. En general, uns marges de resecció situats a més de 3 cm del tumor gairebé fan innecessari l'estudi microscòpic dels mateixos. El marge radial o circumferencial és especialment important en els carcinomes rectals. Els exàmens endoscòpics regulars durant el primer any post-cirurgia són importants per a la detecció de potencialment curables recidives. Fulguració, resecció transrectal endoscòpica i exèresi local són acceptables en tumors petits, superficials i ben diferenciats. Cada vegada es tendeix més a l'associació de quimio i radioteràpia pre o postoperatòria en carcinomes de còlon operables. Avui en dia les metàstasis úniques a distància, per exemple a fetge, poden beneficiar-se d'una exèresi quirúrgica.

1.8. Pronòstic del carcinoma de còlon i recte

La taxa crua de supervivència a 5 anys després de resecció curativa pel carcinoma colorectal oscil·la entre un 40% i un 60% en la majoria de grans sèries. Les recurrències locals i/o les metàstasis ganglionars regionals es presenten en al voltant del 90% dels casos que recauen i representen l'únic focus tumoral en la meitat d'aquests. El 71% de les recurrències apareixen dins els 2 primers anys després del tractament i el 91% ho fan dins els 5 anys.

Són factors pronòstics en el carcinoma colorectal:

- 1) *L'edat*: Els tumors que apareixen en edats extremes, molt joves o molt vells, s'associen a pitjor pronòstic. En el cas dels joves pot ser degut a demora en el diagnòstic, a una major proporció de tumors originats a partir d'una colitis ulcerosa, o a un major nombre d'adenocarcinomes de cèl·lules en anell de segell.
- 2) *Sexe*: Sembla que les dones tenen millor pronòstic.
- 3) *Localització*: Hi ha controvèrsia en la literatura. Es pot dir que hi ha una major incidència de recidives tardanes en tumors localitzats al colon esquerre.

- 4) *Multiplicitat de tumors*: Sembla no influir en la tasa de supervivència.
- 5) *Extensió local*: El pronòstic és excel·lent pels carcinomes microscòpics descoberts incidentalment sobre un pòlip i molt bo pels carcinomes limitats a la mucosa i submucosa. Entre els tumors amb metàstasis ganglionars, el pronòstic es pitjor per als que a més han travessat la paret intestinal. La invasió del peritoneu és *per se* un factor pronòstic més important que la presència de metàstasis ganglionars. La taxa de supervivència als 5 anys dels carcinomes amb invasió peritoneal i metàstasis visceralés és 0%.
- 6) *Mida*: A diferència del que succeeix en altres òrgans, en el còlon, la mida del tumor té poc valor pronòstic. Hi ha un cert grau de correlació entre mida tumoral i nombre de ganglis metastàsics però amb tantes excepcions que finalment la variable mida del tumor no és un indicador pronòstic fiable.
- 7) *Obstrucció*: Aquest tret s'ha mostrat com un indicador de pitjor pronòstic independent de l'estadi de Dukes en algunes sèries però no en altres.
- 8) *Perforació*: Correlaciona amb mal pronòstic. La invasió de la serosa peritoneal és un factor de molt mal pronòstic com ja s'ha comentat.
- 9) *Tipus histològic i grau*: Hi ha correlació entre el grau tumoral i el pronòstic. Pel que fa al tipus histològic, el carcinoma de cèl·lules en anell de segell i el carcinoma de cèl·lules en gra de civada mostren clarament un pitjor pronòstic que l'adenocarcinoma ordinari. Més controvèrsia pel que fa al carcinoma mucinos (Garcia-Peche P *et al.*, 1991).
- 10) *Cèl·lules neuroendocrines*: Discrepàncies entre diferents estudis.
- 11) *Antígens associats a mucines*: Els carcinomes colorectals que expressen els antígens associats a mucines Sialosyl-Tn i sialyl Lewis (Nakayama T *et al.*, 1995) desenvolupen un curs clínic més agressiu.
- 12) *Marges tumorals*: Els carcinomes amb patró de creixement expansiu tenen millor pronòstic que els carcinomes amb patró de creixement infiltratiu.

- 13) *Reacció inflamatòria peritumoral*: Quan és limfoplasmocitària amb aspecte “Crohn-like” sembla associar-se a millor pronòstic. En aquests casos és tinguda en compte en l'estadiatge segons el sistema Jass. Com ja s'ha comentat, s'associa al fenotip amb alta inestabilitat de microsatèl·lits (Jass JR., 1986) (Gafa R *et al.*, 2000).
- 14) *Invasió vascular i perineural*: En presència d'invasió venosa, la supervivència a 5 anys empitjora clarament. Aquesta troballa té més valor pronòstic quan es tracta de venes extramurals enlloc de venes de dins la paret intestinal. La invasió perineural és també un signe de malaltia avançada i usualment apareix acompanyada d'altres troballes patològiques adverses. La invasió de vasos limfàtics té menys importància, però és un factor de mal pronòstic quan és molt aparent i en pacients amb estadis avançats (Minsky B *et al.*, 1989).
- 15) *Afectació de ganglis limfàtics*: La taxa de supervivència als 5 anys disminueix clarament quan hi ha metàstasi als ganglis limfàtics. El pronòstic encara es pitjor si els ganglis afectats no són els immediats a la localització del tumor, i és ominós amb presència de metàstasi al gangli apical. El nombre de ganglis amb metàstasi també influeix. Menys del 10% de pacients amb metàstasi en més de sis ganglis limfàtics sobreviu més de 5 anys. Amb més de setze ganglis mesentèrics infiltrats la taxa de supervivència als 5 anys és 0. Més de sis ganglis limfàtics infiltrats no s'han reportat en tumors de menys de 2 cm de diàmetre màxim, i més de setze ganglis afectats tampoc s'han reportat en tumors menors de 3 cm de diàmetre (Cohen AM *et al.*, 1991).
- 16) *Estadi de Dukes*: Tant el sistema d'estadiatge original com les seves posteriors modificacions han demostrat ser poderosos indicadors del pronòstic dels pacients amb carcinoma colorectal. La taxa de supervivència als 5 anys és superior al 90% per als carcinomes amb estadi de Dukes A, es situa entre el 50% i el 65% en els Dukes B, i entre el 15% i el 25% per als Dukes C.

- 17) Resultats controvertits respecte al valor pronòstic de l'expressió de HCG, Ki-67 i p53.
- 18) Una sèrie de carcinomes colorectals amb expressió intensa de HLA-DR ha mostrat millor supervivència, fins hi tot amb un mateix estadi de Dukes.
- 19) En carcinomes amb història de recurrència s'han trobat més freqüentment mutacions de *K-ras* en certs codons.

1.9. Bases genètiques del carcinoma colorectal

1.9.1. Tipus de mutacions

Les mutacions genètiques poden dividir-se en germinals o somàtiques. Una mutació en un gen que es produeixi en l'òvul, espermatozou o zigot, sigui heredada o espontània, es transmetrà com a defecte congènit i podrà ser responsable d'un càncer hereditari. Totes les cèl.lules de l'organisme tindran una còpia mutada d'aquell gen. El càncer colorectal esporàdic és el resultat de l'acumulació de múltiples mutacions somàtiques en una cèl.lula.

1.9.2. Tipus de gens mutats

Els gens freqüentment mutats poden ser de tres tipus: oncogens, supressors o reparadors.

1.9.2.1. Oncogens

Els oncogens són gens normals, responsables de l'estimulació del creixement cel.lular controlat. Si una mutació afecta aquests gens, això donarà lloc a un creixement cel.lular incontrolat que finalment pot resultar en un càncer, per tant, actuen de forma dominant. Exemples d'oncogens són *myc*, *ras*, *src* o *erbB2*.

Oncogen ras

La família d'oncogens ras, localitzada al cromosoma 12, i que inclou H-ras, K-ras i N-ras, codifica per a unes proteïnes de 21 kd estructuralment relacionades que actuen com a transmissores fins al nucli de senyals extracel·lulars de creixement cel·lular. Aquestes proteïnes s'activen per farnesilació post-translacional. Adquireixen potencial transformador quan una mutació d'un sol aminoàcid té lloc a les posicions crítiques 12, 13 o 61 (Barbacid, 1987). La major part de mutacions de ras en tumors epitelials afecten a K-ras i gairebé tots els tumors involucrats són adenocarcinomes. En còlon, un 40-60% d'adenocarcinomes esporàdics tenen mutació de ras (Capellà et al., 1991) i aquesta sol ser un esdeveniment relativament precoç en el procés de carcinogènesi.

1.9.2.2. Gens supressors

Els gens supressors van ser descrits inicialment amb el nom d'antioncogens per Knudson, en un estudi sobre epidemiologia del retinoblastoma (Knudson AG Jr *et al.*, 1971). La seva funció normal es perd quan s'inactiven els dos al·lels del gen. Quan s'hereda una mutació en línia germinal d'un gen supressor, només cal una mutació somàtica de l'altra còpia del gen per a inactivar la seva funció. Quan inicialment les dues còpies d'un gen són normals, es requeriran dues alteracions mutacionals (o "hits") per a que es produeixi una pèrdua en la seva funció. Això explicaria el motiu pel qual els càncers que apareixen en el contexte d'una síndrome hereditària es manifesten a edats més tempranes, així com el caràcter recessiu dels gens supressors. Exemples de gens supressors són el gen del *retinoblastoma*, *p53*, *APC*, *MCC*, *DCC* o *STK11*.

Gen APC

El gen APC i el seu producte tenen un ampli ventall de funcions relacionades amb el control de la via **WNT**, de senyals de transducció, de l'adhesió, migració i apoptosi cel.lular, i també de la segregació dels cromosomes durant la mitosi. Relacionada amb la primera funció està la de inhibir β -catenina (Su LK *et al.*, 1993), proteïna reguladora de senyals de transducció i creixement cel.lular. En absència de senyal WNT, β -catenina és reclutada en un complex de destrucció format per APC, les proteïnes axina i conductina i glicogen sintasa kinasa 3 β (**GSK3 β**) (Hart MJ *et al.*, 1998). GSK3 β fosforila quatre residus crítics en posició N-terminal de β -catenina que la converteixen en diana per a ser ubiquitinitzada en un complex SCF i posteriorment degradada en el proteosoma. Les proteïnes d'enllaç amb DNA de la família del T-cell-factor (**TCF**) són reprimides per corepressors com ara Groucho. En presència d'un senyal WNT, el receptor d'aquest, Frizzled, formant complex amb Low-density lipoprotein-Receptor-related Protein **LRP6**, és activat, causant la inhibició de GSK3 β . La conseqüència és que β -catenina no pot ser preparada per a la destrucció i pot difondre al nucli, on actua com a coactivador de les proteïnes TCF. Les mutacions d'APC fan que β -catenina no sigui fosforilada i no pugui ser degradada pel proteosoma. Ademés de TCF, aquest acúmul de β -catenina també activa la transcripció de gens com l'oncogen c-myc i ciclina D1. Així doncs, mutacions d'APC ocasionen un increment en la proliferació epitelial que el que fa és augmentar la probabilitat de noves mutacions subsegüents en altres supressors, com p53, MCC o DCC. Donat que β -catenina no només és un transductor de senyals WNT, sino que ademés forma part de les *macula adherens*, on fa d'enllaç entre E-cadherina i β -catenina, APC pot també controlar l'adhesió cel.lular. Per tant, com a mutacions somàtiques, les mutacions d'APC són importants en les fases inicials de desenvolupament de l'anomenada via supressora de l'adenocarcinoma colorectal esporàdic i solen localitzar-se entre els codons 1286 i 1513, en l'anomenada "mutation cluster region" (**MCR**). Com a mutacions en linia germinal donen lloc a la poliposi

adenomatosa familiar, i es distribueixen per la meitat 5' del gen; i finalment, la mutació I1307K contribueix al desenvolupament de càncer familiar en jueus Ashkenazi (Laken SJ *et al.*, 1997). Si bé la majoria de carcinomes colorectals tenen mutacions d'APC, aquells amb APC intacte contenen altres mutacions, per exemple de β -catenina que afectin els seus llocs de fosforilació, o mutacions d'altres membres de la via WNT, com axina o conductina (Liu W *et al.* 2000).

Gen p53

Les alteracions del gen supressor tumoral **p53** (fig. 2), localitzat al braç curt del cromosoma 17 en la posició 17p13.1 (Benchimol *et al.*, 1985), han estat reportades en la majoria de neoplàsties humanes. P53 és un factor de transcripció que s'activa en presència de diversos insults a la cèl.lula, i que com a tal actua activant la transcripció d'altres gens reguladors que aturen el cicle cel.lular fins que el dany genòmic és reparat o bé, activant altres factors inductors d'apoptosi. La proteïna p53 és una proteïna de 53 kd que consta de 393 aminoàcids dividits en tres grans dominis: un domini central d'interacció amb el DNA de 200 aminoàcids, amb una superfície d'enllaç amb el DNA formada per dos llaços amb estructura de fulla plegada β (L2 i L3) i un llaç en α -hèlix; un domini de transactivació situat en posició N-terminal i un domini de tetramerització en posició C-terminal. El gen p53 consta de 11 exons i en ell s'han identificat cinc regions evolutivament conservades: regió I entre els codons 13-19, II entre els codons 120-143, III entre 172-182, IV entre els 238-259 i V entre 271-290. En aquestes regions evolutivament conservades es concentren la majoria de mutacions que es detecten en molts tumors humans (Hollstein *et al.*, 1991). Un 68% de les mutacions de p53 en el carcinoma colorectal es concentren en sis "hot spots" (Russo A *et al.*, 2002; Wong KB *et al.*, 1999) localitzats en els residus 175, 245, 248, 249, 273 i 282. Quan es produeix un dany en el DNA cel.lular, té lloc l'activació de diverses kinases, entre elles "ataxia telangiectasia-mutated" (**ATM**) i "ATM-RAD3-related" (**ATR**), que fosforilen posteriors kinases efectores com **CHK1**

i **CHK2**. ATM, ATR, CHK1 i CHK2 poden fosforilar i produir la dissociació del complexe p53-mdm2. P53 queda lliure i intervé aturant, mitjançant l'activació del gen p21, el cicle de divisió cel.lular, per a donar lloc a que el DNA alterat pugui ser reparat abans de la seva duplicació. P53 pot també estimular de manera directa o indirecta la reparació del DNA (F. Chang 1993, Harris C 1993, Marx J 1994). D'una banda, l'activació de p53 comporta l'activació d'un altre gen, conegut com a **GADD 45** (growth-arrest-and-DNA-damage-inducible) (Fornace *et al.*, 1989), que s'ha trobat formant complexes amb **PCNA**. El PCNA és requerit per al funcionament de la DNA polimerasa δ i per tant, és un component necessari de còpia del DNA i per a resintetitzar el DNA després de que el sistema d'excissió dels fragments alterats els hagi retirat. També p21 és capaç d'unir-se a PCNA e inhibir de manera més directa la replicació, además de la seva acció sobre les quinases dependents de ciclins. P53 pot induir de manera més directa la reparació del DNA interaccionant amb una proteïna coneguda com ERCC3, una de les diverses

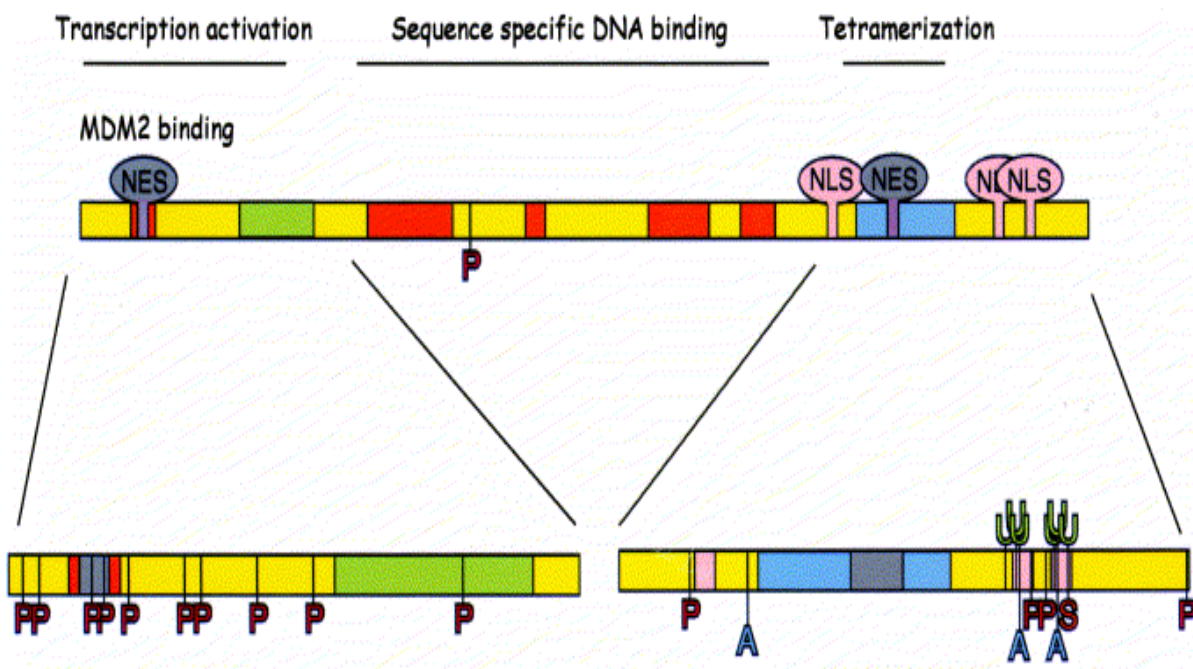


Fig.2. Estructura del gen i proteïna p53 amb els tres dominis.

molècules de reparació-excisió que juntes reconeixen i retiren els segments de DNA alterats (Harris C). Quan el dany genòmic és irreparable, p53 actua inhibint l'angiògenesi interaccionant amb **TSP-1** o bé, desencadenant l'apoptosi. Aquest segon efecte és mediat per activació transcripcional de mediadors com "P-53 up-regulated modulator of apoptosis" (**PUMA**), un membre de la família bcl-2 que actúa modulant l'activitat de la proteïna pro-apoptòtica Bax, i també com "P53-inducible gene 3" (**PIG3**).

P53 és una proteïna de vida mitja curta, aproximadament 6-20 min, de manera que no pot acumular-se en quantitats prou grans com per a ser detectable per mètodes immunohistoquímics. Tanmateix, la majoria de mutacions *missense* de p53 indueixen canvis que perllonguen la vida mitja de la proteïna fins a més de 6 hores (Levine *et al.*, 1991), de manera que la proteïna p53 mutada pot detectar-se sobreexpressada mitjançant immunohistoquímica (Van den Berg *et al.*, 1989). Cal recordar però, que p53 en estat normal o salvatge ("wild type") pot establir unions amb algunes proteïnes com SV40 large T antigen (Tan *et al.*, 1986), la proteïna cel.lular murine double minute-2 (**mdm-2**) (Wu *et al.*, 1993), la proteïna E1B de l'adenovirus (Sarnow *et al.*, 1982) o la proteïna E6 dels papil.lomavirus del tipus 16 i 18 (Scheffner *et al.*, 1990), donant lloc a l'acumulació i detecció de proteïna p53 no mutada (la proteïna E6 dels papil.lomavirus tipus 6 i 11 no té capacitat d'unió amb p53). Això també significa que tumors produïts per infeccions virals, com per exemple el càncer de cèrvix uterí, poden tenir els dos al.llels de p53 del tipus "wild type". En sarcomes de parts toves l'amplificació de mdm-2 i la seva interacció amb p53 crea una pèrdua de p53 funcional.

Además de les mutacions puntuals que poden afectar el gen p53, diversos treballs han enfocat l'estudi dels polimorfismes de p53 com a factors de risc pel desenvolupament de patologies malignes.

Cromosoma 18: DCC i Smad4

Un 70% de carcinomes colorectals mostren delecions al braç llarg del cromosoma 18. També es troben mutacions a aquest nivell en el 50% d'adenomes avançats. El gen Deleted in Colorectal Carcinoma (**DCC**) va ser el primer gen descrit en el braç llarg del cromosoma 18 com a gen supressor tumoral (Fearon ER. *et al.*, 1990). Es localitza a la banda 18q21.1 i està format per almenys 29 exons. El gen DCC codifica una proteïna de membrana semblanta a les mol.lècules d'adhesió N-CAM, i actúa com a receptor de membrana del factor quimioattractant axonal netrin-1. L'expressió de DCC s'ha vist reduïda o absent en carcinomes gàstrics (Yoshida Y *et al.* 1998), de pròstata (Gao X *et al.*, 1993), pàncrees (Simon B *et al.*, 1994), esòfag (Miyake S *et al.*, 1994), endometri (Gima T *et al.*, 1994), leucèmies (Miyake K *et al.* 1993) i tumors germinals (Murty VV *et al.*) i s'ha suggerit que la inactivació de DCC pot ser un factor important en el desenvolupament i/o progressió tumoral. La LOH del gen DCC en el carcinoma colorectal s'ha relacionat amb una major invasió de la paret còlica, major invasió vascular limfàtica i més capacitat metastàtica (Jen J *et al.*, 1994).

Troballes recents suggereixen que el gen DPC4/Smad 4 (deleted in pancreatic cancer), localitzat a la regió 18q21.1 i molt proper per tant al gen DCC, podria ser una diana molt important en les LOH d'aquest fragment de cromosoma, que fins fa poc es pensava que es limitaven a DCC .

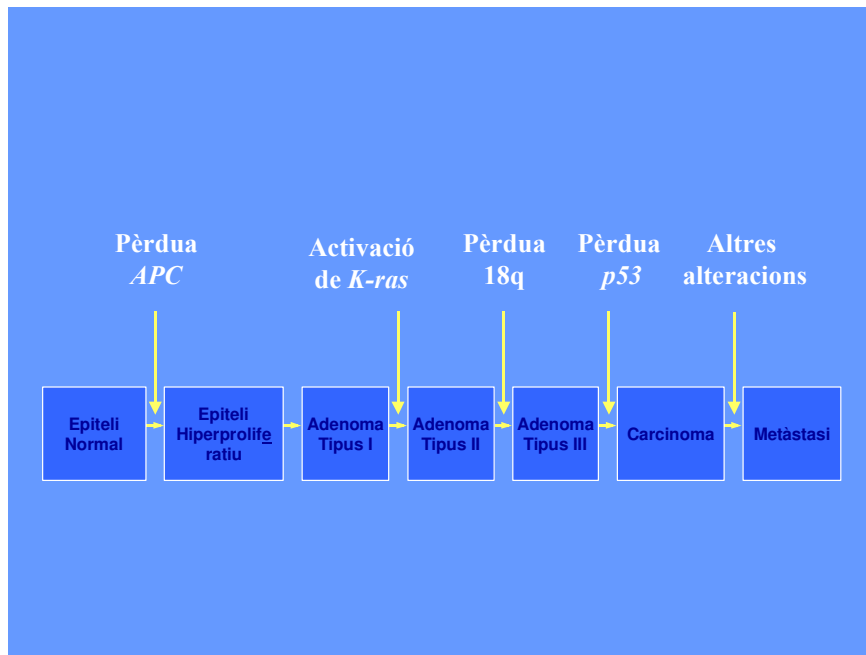


Fig. 3. Via supressora del carcinoma colorectal (modificat de Fearon *et al.*)

1.9.2.3. Gens reparadors o mutadors

El tercer grup de gens és el dels reparadors o “mismatch repair” (**MMR**), gens la funció dels quals és revisar i corregir errors de replicació del DNA. Defectes en els gens reparadors donen lloc al fenotip mutador, característic dels tumors amb inestabilitat de microsatèl·lits (MSI), que consisteix en l’acumulació de milers de mutacions somàtiques en seqüències de microsatèl·lits al llarg del genoma. El fenotip mutador porta a l’acumulació de mutacions oncogèniques en oncogens i supressors, com el gen del receptor II per a “transforming growth factor β ” (**TGF- β II**) o el del receptor per al factor de creixement “insuline-like” 2. Els gens reparadors són *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH3*, *hPMS1*, *hPMS2* i *hMSH6*. Molts loci amb microsatèl·lits han estat estudiats per a determinar quins són els més freqüentment afectats en aquests tumors. L’indicador més sensible de MSI és BAT26. Com que els laboratoris utilitzen un panell de diversos loci amb microsatèl·lits, la MSI és catalogada com a absent, baixa o alta depenent del nombre de loci en el panell que mostren inestabilitat. Entre un 10% i un 15%

d'adenocarcinomes esporàdics poden exhibir MSI, generalment baixa. Les mutacions en línia germinal d'un gen reparador típicament donen alta MSI, encara que les mutacions de *hMSH6* poden anar associades a baixa MSI.

1.9.3. Genètica del carcinoma colorectal esporàdic. Conclusions

Actualment s'ha arribat a una sèrie de conclusions pel que respecta a la patogènia dels càncers de còlon i recte esporàdics:

- 1) El càncer de còlon resulta de l'activació mutacional d'oncogens i de la inactivació de supressors.
- 2) Es requereixen almenys quatre o cinc mutacions en una cèl.lula per a ocasionar la seva transformació maligna.
- 3) El comportament biològic d'un tumor depèn més de l'acumulació de mutacions que de la seqüència en que aquestes s'han produït, si bé les mutacions d'APC solen ser un esdeveniment precoç mentre que les de p53 solen ser un esdeveniment tardà.
- 4) La via tumorigènica en els carcinomes amb fenotip mutador afecta a gens diferents que en els tumors originats a través de la via supressora (fig. 3).

Cal la mutació d'un oncogen (K-ras) i de tres supressors (APC, Smad4 i p53) per assegurar l'aparició d'un carcinoma colorectal esporàdic. El caràcter dominant o recessiu d'aquests gens prediu que es requereixen almenys set mutacions, una de l'oncogen i dues de cada supressor. Això es reflecteix en el llarg període de temps (20 a 40 anys) necessari per a que es completi tot el procés, des d'el focus de criptes aberrants (ACF) fins l'adenocarcinoma invasiu.

1.10. Síndromes canceroses hereditàries

Les síndromes canceroses hereditàries més comunes són la poliposi adenomatosa familiar i el càncer de còlon hereditari no poliposi (síndrome de Lynch). Aquestes dues síndromes són el resultat de mutacions de línia germinal del gen supressor APC en el cas de la primera i dels gens reparadors en el cas de la segona. En el càncer de còlon familiar en jueus Ashkenazi la mutació germinal probablement implicada és la I1307K APC. Aquesta predispesa a mutacions esporàdiques en llocs distants d'aquest gen en una fase més avançada del procés tumorigènic. En la poliposi adenomatosa familiar, les persones afectades desenvolupen de centenars a milers de pòlips colònics que presenten una taxa de malignització molt baixa, però que degut al seu nombre tan elevat, asseguren l'aparició d'un càncer de còlon a una edat molt jove. Un terç dels casos s'originen de novo.

En la síndrome de Lynch, els reparadors més comunment mutats són *hMLH1* o *hMSH2*. Anomalies en aquests gens donen lloc, com hem comentat abans, al fenotip mutador, caracteritzat per la presència d'instabilitat de microsatèl·lits. Les persones afectades tenen un risc molt alt de desenvolupar adenocarcinoma colorectal, però no presenten els centenars de pòlips típics de la poliposi adenomatosa familiar, sino només uns pocs però amb una probabilitat molt alta de malignització, fet que succeeix quan a la mutació inicial en gens reparadors s'afegeix una altra en el gen APC. Mentre que en el carcinoma esporàdic la degeneració d'un adenoma succeeix generalment al cap de 5-10 anys, en HNPCC aquesta progressió pot tenir lloc en només dos anys. Les persones amb mutació germinal de reparadors tenen un risc incrementat de patir carcinomes d'endometri, ovari, hepatobiliars, genitourinaris, pancreas i budell prim.

1.11. Cicle cel.lular i adenocarcinoma colorectal

1.11.1. Aspectes generals

El cicle cel.lular (fig.4) és el conjunt de processos ordenats mitjançant els quals una cèl.lula duplica el seu contingut i es divideix per donar lloc a dues cèl.lules filles genèticament idèntiques. En les cèl.lules eucariotes que es divideixen per mitosi consta d'interfase i mitosi, i pot ser dividit en quatre fases:

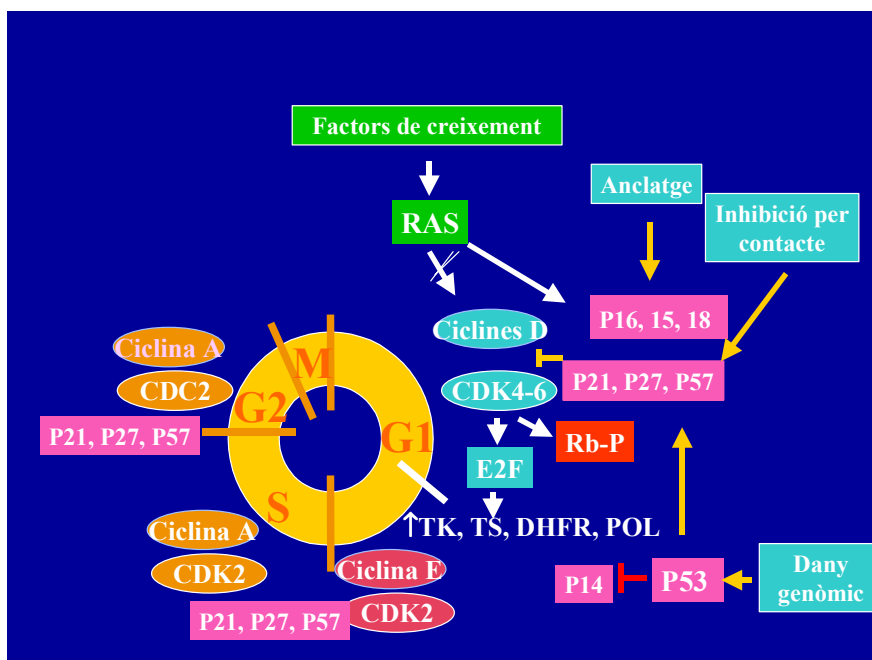


Fig. 4. Representació esquemàtica del cicle cel.lular

1. **Fase Gap 1 (G1).** La decisió de replicar-se és presa durant aquesta fase. Les cèl.lules sintetitzen molts dels factors i enzims que es requereixen per a la replicació. Hi ha un punt de restricció (R) després del qual el cicle no pot ser revertit. La cèl.lula ha d'assolir una certa mida per a poder entrar en procés de divisió. Les cèl.lules que no progressen pel cicle de divisió esdevenen quiescents (fase G0).

2. **Fase de síntesi (S)** o replicació del DNA. L'inici de la síntesi del DNA es produeix en diversos llocs, i el genoma és replicat.
3. **Fase Gap 2 (G2)**. La cèl.lula es prepara per a entrar en mitosi. Els cromosomes es condensen i es sintetitzen factors importants per a la mitosi.
4. **Fase de mitosi (M)**. Els cromosomes són segregats en les cèl.lules filles.

La cèl.lula pot estar també en un estat no ciclant o de quiescència, també anomenat **G0**. Aquest és l'estat en que es troben la majoria de les cèl.lules dels vertebrats. Algunes cèl.lules, com les neurones i les cèl.lules musculars estriades romanen sempre en aquest estat en un individu adult. La continuació o no del cicle està regulada per **senyals extracel.lulars**, com ara factors de creixement, interaccions cèl.lula-cèl.lula o adhesió a la matriu extracel.lular, i per **senyals intracel.lulars** que provenen dels anomenats **checkpoints** o sistemes de vigilància. Mentre que les cèl.lules normals són sensibles a tots els factors, les cèl.lules neoplàstiques poden créixer independentment d'aquests factors. Seran algunes proteïnes reguladores de la transició G1-S les que centraran l'atenció d'aquesta tesi.

L'estat de fosforilació de la proteïna del retinoblastoma (pRb) constitueix el primer **Punt de Restricció (R)** del cicle cel.lular, que és el que controla la transició entre la fase G1 i la fase S. Però pRb és important regulant no només la transició G1-S sino també la progressió a través de la fase S. Quan la cèl.lula supera aquest punt R es veu obligada a completar el cicle, que acaba amb la mitosi. La progressió del cicle cel.lular en cèl.lules eucariotes implica l'activació i desactivació seqüencial de diferents membres d'una família conservada de serina/treonina kinases anomenades kinases depenents de ciclins (CDKs). Per dur a terme la seva funció s'han d'unir a una ciclina. Les ciclins actuen com a inductors de les quinases. Es pot dir d'entrada, que la maquinària del cicle cel.lular és potencialment autònoma, essent les kinases clau **CDK1** i **CDK2**. La fosforilació de pRb, iniciada per CDK4/6 però completada per CDK2 (fig.5), deixa

lliure els factors de transcripció **E2F**. Els factors de transcripció E2F són una família de factors de transcripció constituïts per complexos binaris (Bandara *et al.*,1993; Girling *et al.*, 1993). Consten d'una subunitat **E2F** (E2F-1 a E2F-6, de les quals E2F-1, E2F-2 i E2F-3 interaccionen amb pRb) i d'un polipèptid **DP** (DP-1 i DP-2, fonamentalment DP-1). L'alliberament d'E2F permet la transcripció de gens necessaris per a la progressió cap a la fase S, entre ells el de la pròpia ciclina E.

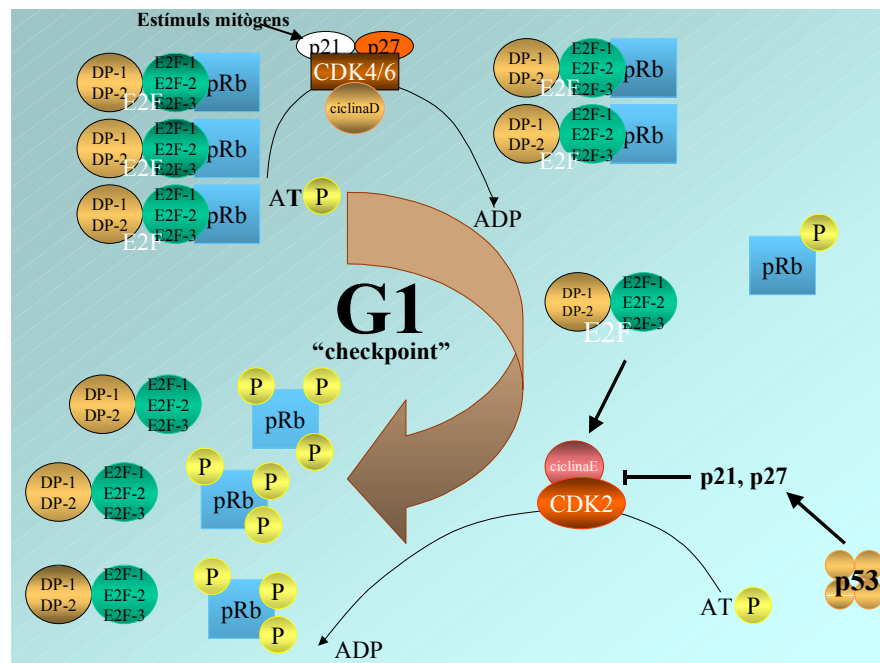


Fig. 5. Representació esquemàtica del "checkpoint" de G1.

1.11.2. Proteïnes que intervien en el cicle cel.lular

1.11.2.1. CDKs

La subunitat catalítica del complex quinasa és la Cdk. Catalitzen la transferència del fosfat γ d'una molècula d'ATP al grup $-OH$ de serines o treonines. Les Cdk són proteïnes d'uns 300 aminoàcids i presenten una similitud del 35-65% amb el prototipus **CDK2** (fig. 5). La unió amb

la ciclina té lloc a través d'una seqüència específica conservada en totes les Cdk, l'hèlix PSTAIRE, situada en un petit lòbul amino-terminal.

CDK1 s'associa a la ciclina B, i la seva activació inicia la mitosi. També s'uneix a la ciclina A i contribueix a la preparació per a la mitosi (Nigg EA, 1995).

CDK4/6, formant complexe amb les ciclines D, tenen com a principal funció la de servir d'enllaç regulador entre el cicle cel.lular potencialment autònom i els diferents estímuls mitogènics extracel.lulars. Aquests complexos ciclina D-CDK4/6 són activats per la quinasa activadora de CDK (**CAK**), complex format per CDK7, ciclina H i la proteïna MAT1 (Tassan JP, 1995), i donen lloc a una fosforilació inicial de Rb.

CDK5 regula la migració neuronal durant el desenvolupament del sistema nerviós central. S'expressa en cèl.lules post-mitòtiques del sistema nerviós i és necessària durant la diferenciació neuronal (Chae *et al*, 1997). Els cofactors d'aquesta kinasa són p35 i p39, proteïnes estructuralment semblants a les ciclines (Lew *et al*, 1994; Tsai *et al*, 1994).

CDK8 pot fosforilar el domini carboxi-terminal de la RNA polimerasa II (Tassan JP *et al*, 1995; Leclerc V *et al*, 1996). El seu cofactor és ciclina C.

L'activitat de les diferents CDKs no només depèn de la unió amb les seves ciclines i per tant dels nivells d'aquestes en cada moment del cicle, sino que ademés pot ser modificada per:

- a) fosforilacions activadores: catalitzades pel complex kinasa CAK en un T-loop carboxi-terminal de la Cdk, que en absència de ciclina bloqueja l'accés del substrat al solc actiu, són per tant necessàries per a la total activació del complexe ciclina-CDK.
- b) fosforilacions inhibidores: en la regió amino-terminal de Cdk, catalitzades abans de la mitosi per les kinases **Wee/Mik1** i **Myt1**.

- c) defosforilacions activadores: les fosfatases **CDC25A**, **CDC25B** i **CDC25C** eliminen les fosforilacions inhibidores abans esmentades. CDC25A s'expressa al final de G1 induïda per c-Myc, i defosforila els complexos ciclina A/E-CDK2 (Jinno *et al.*, 1994). CDC25B i CDC25C actuen sobre CDK1 en la regulació de la transició G2/M.
- d) unió amb inhibidors específics de les CDKs (CKIs): seran analitzats més endavant.
- e) per la diferent localització intracel.lular en cada moment dels complexos ciclina-quinasa: en farem menció al parlar de la funció de les diferents proteïnes.

CICLINA E-CDK2

La transició entre les fases G1 i S del cicle cel.lular és regulada fonamentalment per complexos ciclina E-CDK2, depenent fonamentalment de la presència de ciclina E-CDK2 lliure. Ciclina E té una funció molt important induïnt directament l'entrada a la fase S i l'inici de la replicació del DNA mitjançant l'activació de gens específics de la fase S com timidin kinasa b-myb o ciclina A (Chang *et al.*, 1995).

Altres events específics de la fase S regulats per ciclina E-CDK2 comprenen la modulació de la síntesi del DNA via **Cdc6** i **PCNA**, el reclutament de la polimerasa α o la càrrega de **MCM** i **Cdc45** en els llocs d'origen de replicació, l'activació de Cdc25A, la regulació de programes de transcripció via transcripció de factors com les proteïnes helix-loop-helix (HLH) **Id2** o **Id3**, el "BRG-1 associated factor" **BAF155** (component del complexe remodelador de la dependent d'ATP SWI/SNF), i la modulació de fenòmens d'ensamblatge a través de **SAP155/SF3b1** (Arata *et al.*, 2000; Coverley *et al.*, 2002; Deed *et al.*, 1997; Furstenthal *et al.*, 2001; Geng *et al.*, 2003; Hara *et al.*, 1997; Seghezzi *et al.*, 1998; Shanahan *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000; Zou *et al.*, 2000).

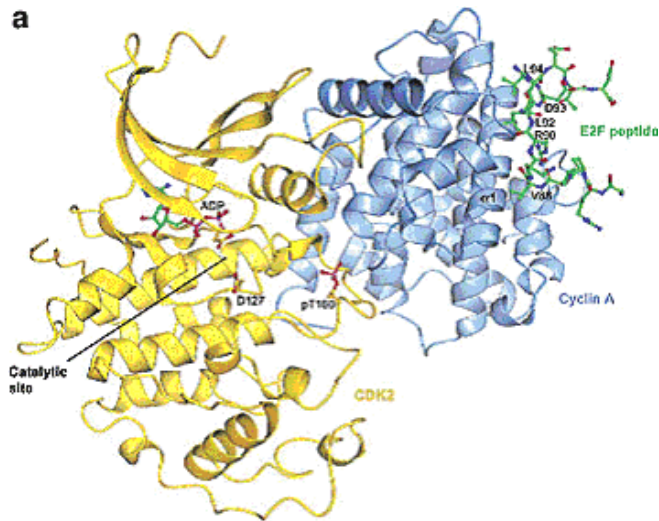


Fig 6. Estructura tridimensional del complexe CDK2-ciclina A unit a un pèptid de reclutament.

El gen de la proteïna ciclina E humana codifica diversos polipèptids amb un pes mol.lecular d'entre 39 i 52 kDa. La proteïna ciclina E “regular” conté un domini comprès entre els aminoàcids 129-215 anomenat “cyclin box”, la seqüència del qual està bastant conservada entre les diferents ciclins. Un grup d'aminoàcids hidrofòbics d'aquesta “cyclin box” sembla ser el responsable del reconeixement dels inhibidors (Adams *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1996) per part de ciclina A i probablement de totes les ciclins, incloent ciclina E. Més a davant de la “cyclin box” i en sentit C-terminal es troba un motiu de reconeixement de substrat, que és el que interacciona amb pRb (Kelly *et al.* 1998). Una seqüència de tipus PEST (rica en Prolina, glutamat, Serina i Treonina) a l'extrem C-terminal és la diana de les proteïnes degradadores (Rogers *et al.* 1986). Ademés de la forma regular de Ciclina E s'han descrit vuit variants amb diferent ensamblatge i amb capacitat per a produir isoformes de Ciclina E de diferent pes mol.lecular, i una altre isoforma amb 15 aminoàcids addicionals en posició N-terminal (Sewing *et al.*, 1994; Ohtsubo *et al.*, 1995; Mumberg *et al.*, 1997). Totes les variants que tinguin una “cyclin box” intacta podran activar CDK2. La localització nuclear de ciclina E depèn de

proteïnes com **importina- α** i **importina- β** i és assegurada per un senyal de localització nuclear bàsic (**NLS**) en la seqüència de ciclina E (Moore *et al.*, 1999). Donat que CDK2 és mancada de la seva pròpia seqüència de localització nuclear, depèn de la interacció amb ciclina E per a poder arribar al nucli. També les proteïnes Cip/Kip juguen un paper important per a la localització de les ciclins dins la cèl.lula. En presència de les dues proteïnes Cip/Kip, diverses ciclins, entre elles ciclina E es troben al nucli. Ciclina E també té funcions al citoplasma, com ara de regulació de la funció del centrosoma (Jackman *et al.*, 2002). La repressió del gen ciclina E durant les fases G2-M del cicle i també al començament de G1 és aconseguit per l'ensamblatge d'un complex multiproteïna format per pRb hipofosforilada, histona deacetilasa (**HDAC**) i el complex remodelador del nucleosoma **hSWI/SNF**, que és reclutat als factors de transcripció E2F units al promotor de ciclina E per a impedir la transcripció (Zhang *et al.*, 2000). Els nivells de ciclina E en les diferents fases del cicle es mantenen o redueixen per degradació de la proteïna en el **proteosoma 26S** post-ubiquitinació o modulant la seva estabilitat mitjançant modificacions post-traduccionals. La unió d'una cadena de ubiquitina al substrat requereix d'una sèrie de passos catalitzats per tres enzims (King *et al.*, 1996). Primer es produeix l'activació de la ubiquitina (petita proteïna monomèrica de 76 residus altament conservada evolutivament) a nivell C-terminal mitjançant un enllaç tioèster amb l'enzim **E1**. Seguidament l'enzim **E2** (proteïna transportadora de ubiquitina) s'encarrega de transferir la ubiquitina activada desde E1 fins a un residu lisina del substrat proteic, que està lligat a l'enzim **E3** (ubiquitina-proteïna ligasa E3). En el cas de ciclina E, com en altres ciclins, l'enzim E2 és CDC34 mentre que l'enzim E3 és el complex multiproteic SCF, format per les proteïnes p19^{SKP-1}, CDC53/Cullin, Rbx1/ROC1 i una proteïna F-box variable que pot ser Fbw7, hCdc4, p45^{Skp2} o Cullin3, (Winston *et al.*, 1999). Les proteïnes P19^{SKP-1} i F-box interaccionen a través del motiu F-box, mentre CDC53 uneix aquest complex a l'enzim E2, CDC34. La ciclina E

lliure és reclutada per p45^{Skp2} cap el complexe SCF, mentre que la ciclina E fosforilada o unida a CDK2 ho és per Fbw7/hCdc4.

1.11.2.2. Inhibidors de les CDKs

D'altra banda, l'activitat de les CDKs pot ser inhibida per dos grups d'inhibidors de les quinases, la família ink4 i la cip/kip.

INHIBIDORS INK4

Les proteïnes del grup **ink4** (p15^{inkB}, p16^{inkA}, p18^{ink4C} i p19^{ink4D}) s'uneixen només a les kinases CDK4/CDK6 però no a les ciclins i per tant actuen en la fase G1 temprana, dissociant complexos ciclinaD-CDK4/6 (Sherr *et al.*, 1999) i inhibint específicament l'activitat kinasa d'aquests complexos. Encara no es coneixen prou bé els senyals estimulants de la síntesi de INK4, però sembla clar que p15^{INK4b} és induït per **TGF-β** (Hannon and Beach, 1994). P16^{INK4a} s'acumula progressivament a mida que la cèl.lula envellaix (Alcorta *et al.*, 1996). Les proteïnes INK4 sobreexpressades aturen el cicle cel.lular en G1. La interpretació més simple és que la fosforilació de pRb és antagonitzada directament per l'efecte inhibidor de INK4 sobre ciclina D-CDK4. L'increment en la síntesi de INK4 resulta en la formació de complexos INK4-CDK4 amb la consegüent desestabilització de ciclina D. L'alliberament consegüent de les proteïnes Cip/Kip d'aquest reservori latent en complexos ciclina D-CDK4 ocasiona l'inhibició de ciclina E/A-CDK2 en el nucli i l'aturada del cicle.

INHIBIDORS CIP/KIP

Les proteïnes del grup cip/kip (p21^{waf1/cip1}, p27^{kip1} i p57^{kip2}) comparteixen una certa homologia de seqüència a nivell N-terminal, poden inhibir l'activitat d'un ventall més ampli de kinases, amb preferència per CDK2, i no són específiques d'una fase del cicle. Les proteïnes Cip/Kip no

dissocien complexos ciclina-CDK. Els estudis més recents mostren que si bé les proteïnes Cip/Kip són potents inhibidors de CDK2, en baixes quantitats actuen com a reguladors positius de CDK4 i CDK6, primerament actuant com un pont entre la ciclina D i la kinasa 4, facilitant l'ensamblatge dels complexos ciclina D-CDK4/6 a nivell citoplasmàtic. Treballs en els que s'ha investigat l'activitat específica dels complexos ciclina D-CDK4-p27/p21 *in vitro*, no han mostrat pas inhibició del complexe a una relació estequiomètrica de 1:1:1 (Zhang *et al.*, 1994); en canvi, amb aquesta mateixa proporció, p27 i p21 inhibeixen CDK2. Això no significa que proporcions més elevades de p21 o p27 no puguin, en determinades circumstàncies fisiològiques, inhibir l'activitat ciclina D-CDK4/CDK6. Però el que succeeix en principi, és que ciclina D-CDK4/6 actua segrestant proteïnes Cip/Kip sense veure's subjecta a inhibició per part d'aquestes. Ademés, les proteïnes Cip/Kip promouen l'activació dels complexos ciclina D-CDK4 dirigint-los cap al nucli (La-Baer *et al.*, 1997) i incrementant l'estabilitat de ciclina D. En absència de Cip/Kip, l'exportació de ciclina D1 cap al nucli és ineficient, i la ciclina D sobreexpressada al començament del cicle roman al citoplasma.

P21

P21^{cip-1} és com ja s'ha dit, un membre de la família de proteïnes inhibidores de les quinases (CIP/KIP) i un dels braços efectors de p53. Té dos dominis funcionalment ben definits. Mitjançant els residus 10-80 situats en posició N-terminal, interacciona amb complexos ciclina E/CDK2, ciclina A/CDK2^{18,19,23} i ciclina D1/CDK4 (Chen *et al.*, 1995). P21 té també un lloc d'unió amb **PCNA**, constituït pels residus 133-164 en posició C-terminal (Luo *et al.*, 1995; Nakanishi *et al.*, 1995), possibilitant que p21 pugui inhibir la progressió de la fase S, i per tant el creixement cel·lular, per inhibició de l'activitat de PCNA com a cofactor de la polimerasa. Quan es produeix un dany a nivell de l'ADN i l'expressió de p21 és induïda per p53 funcionant,

p21 ocasiona detenció del cicle cel.lular en G1 de manera sinèrgica amb **GADD45**, proteïna nuclear abans esmentada al parlar de p53 i amb la que p21 pot també interaccionar (Kearsey *et al.*, 1995). Aquesta activació de p21 per p53 requereix la intervenció de “Myc-interacting zinc-finger 1” (**Miz-1**) (Sakurai *et al.*, 2004). P21 pot ser activada també per **p16**, per la citoquina antimitogènica “transforming growth factor- β ” (**TGF- β**) (Seoane *et al.*, 2002), per l’activador de la proteïna kinasa C tetradecanoyl-phorbol acetat (**TPA**) via **AP-2**, o el receptor de la vitamina D3 i l’àcid retinoic (Liu *et al.*, 1996), entre d’altres mecanismes d’interacció cel.lular, afavorint la maduració, diferenciació i envelliment cel.lular. Mitjançant els factors de transcripció **Sp1** s’indueix p21 en resposta a diferents estímuls, com per exemple **BRCA-1**, **Ras**, el Ca^{2+} , el **butirat** o la **lovastatina**. **E2F-1** i **E2F-3** són inductors de la transcripció de p21 durant la transició G1/S (Hiyama *et al.*, 1998; Waga and Stillman, 1998). Més endavant, a l’explicar la dinàmica del cicle cel.lular, veurem que p21 té un paper important com a factor d’ensamblatge i estabilització dels complexos ciclina D1/CDK4 (Weiss *et al.*, 2000; LaBaer *et al.*, 1997; Dong *et al.*, 2004; Dupont *et al.*, 2003), dels quals promou la seva activitat. Per tant, p21 també pot ser localitzada al citoplasma. P21 bloqueja la interacció de ciclina D1 amb la proteïna exportadora CRM1, impedit la sortida de ciclina D1 del nucli (Alt JR *et al.*, 2002). P21 pot unir-se de manera directa també amb Calmodulina (Taulés *et al.*, 1999), essent aquesta interacció important per a la localització nuclear del comple ciclina D-CDK4. Diversos estudis suggereixen que p21 podria funcionar com a cofactor de transcripció, regulant indirectament l’activitat de “nuclear factor” **NF- κ B**, i interaccionant directament i inhibint la de “Signal transducers and activators of transcription” (**STAT**)-3, **Myc**, “CCAAT/enhancer-binding protein- α ” (**C/EBP α**) i E2F1 (Kitaura *et al.*, 2000; Coqueret *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 2001). Per tant, p21 pot inhibir l’E2F1 i la transcripció dependent d’aquest factor per una via independent de pRb. La expressió de p21 inhibeix també diversos gens implicats en la progressió del cicle cel.lular, com el gen de la DNA polimerasa α , topoisomerasa II, ciclina B1 i

CDK1 (Chang *et al.*, 2000). A través de STAT3, Myc i E2F, p21 pot inhibir gens més específicament implicats en respostes mitogèniques. Altres estudis han mostrat el paper de p21 com a mediador de l'efecte pro-proliferatiu del "insulin-like growth factor-1" (**IGF-1**) i del factor de transcripció **Ets-1** en diferents tipus cel·lulars. P21 interacciona també amb el domini CRD1 de la "CREB binding protein" (**CBP**)/**p300**, activant-la (Snowden *et al.*, 2000). Els coactivadors transcripcionals p300 i "C-AMP Response Element Binding protein" (CREB)-BP (CBP) són proteïnes altament homòlogues, contenen dominis histona acetiltransferasa (**HAT**) i interaccionen amb un ampli ventall de proteïnes d'unió amb DNA, incloent p53, la RelA (p65) NF-B subunitat, E2F, MyoD, AP-1, receptors nuclears, i moltes altres. L'activitat HAT de CBP és activada per Ciclina E-CDK2. CBP/p300 és requerida tant per a l'activitat d'E2F estimulants el cicle, com per a la de p53 i Myo D aturant-lo, de manera que CBP/p300 funciona com un regulador tant de la proliferació com de la inhibició del cicle. CRD1 és un domini de repressió transcripcional de p300, i la desrepressió de CRD1 per p21 activa p300. Tant p300 com CBP es troben freqüentment mutats en adenocarcinomes colorectals originats per la via mutadora, amb alta inestabilitat de microsatèl·lits (Ionov *et al.*, 2004). Altres proteïnes que poden interaccionar amb p21 i modular la seva capacitat de detenir el cicle cel·lular en G1 són **TOK-1**, **CARB** i **SET**. La isoforma α de Tok-1 pot interaccionar amb la regió carboxi-terminal de p21 i augmentar l'efecte inhibitori d'aquesta proteïna sobre CDK2. SET pot unir-se directament a p21 i revertir *in vitro* l'efecte inhibitori de p21 sobre l'activitat del complex ciclina E-CDK2.

Una altra funció de p21 que ha començat a ser reportada recentment és la de inhibició de l'apoptosi. P21 interacciona en el mitocondri amb procaspasa-3 inhibint l'activació de **caspsa-3/ CPP32** (membre de la família ICE, proteases que eliminen substrats en posició C-terminal a residus d'aspartat) per a resistir la mort cel·lular mediada per ligands i receptors de membrana Fas (Suzuki A *et al.*, 1998). El factor de transcripció **Myc** és en gran manera qui determina que p53aturi el cicle cel·lular via p21, o bé que indueixi l'apoptosi. Myc és un factor de transcripció

que promou el creixement i prolifерació cel.lular, i sota determinades condicions, l'apoptosi. En associació amb la proteïna **Max**, Myc s'uneix a una seqüència específica de DNA ("E box") i dirigeix l'activació transcripcional de diversos grups de gens, però inhibeix la transcripció d'altres gens, entre ells p21 (Seoane *et al.*, 2002). Myc és directament reclutat cap el promotor de p21 pel també factor de transcripció de p21 **Miz-1**. Miz-1 és un factor de transcripció amb domini de tipus POZ. Miz-1 s'inhibeix per interacció amb Myc i el reclutament de Myc al promotor de p21 per Miz-1 reprimeix la transcripció de p21 inclús en presència de p53. Per això Myc és en gran manera qui decanta el sentit de la funció de p53.

P21 pot ser fragmentada per acció de la caspasa-3/CPP32 (possiblement activada per la proteïna Bax) (Zhang *et al.*, 1999), resultant en la pèrdua d'un fragment de 52 aminoàcids en posició C-terminal que inclou el senyal de localització nuclear, la regió d'enllaç amb PCNA i un recentment identificat segon lloc d'unió a ciclines (Adams *et al.*, 1996). Aquesta p21 fragmentada per la caspasa-3 és relocalitzada cap al citoplasma, no pot unir-se a PCNA i per tant, no pot aturar el cicle cel.lular en G1. Tampoc pot impedir el procés d'apoptosi.

P21 pot també ser fosforilada per la proteïna kinasa Akt, resultant en supressió de la seva funció antiapoptòtica i inhibidora del cicle cel.lular (Zhou *et al.*, 2001). La via phosphatidylinositol-3-OH kinase (**PI3K**)/Akt es troba en la cascada efectora del receptor tirosin-kinasa ErbB2/HER2/neu, sobreexpressat o amplificat en alguns tumors, per exemple en al voltant d'un 30% de carcinomes ductals de mama.

Per immunohistoquímica, l'expressió de p21 sol ser nuclear i de distribució heterogènia, principalment en cèl.lules ben diferenciades.

P27

Respecte de p27 afegirem que P53, TGF- β o l'AMPc són inductors de p27, mentre que la seva transcripció està inhibida per c-Myc, però els mecanismes més importants de control de p27

tenen lloc a nivell de proteïna, per redistribució o per ubiquïtinització i degradació, la qual té lloc únicament al citoplasma. P27 pot interaccionar amb la proteïna mNPAP60 (Muller D *et al.*, 2000), associada al porus nuclear, facilitant l'entrada de ciclina D-CDK4 al nucli. Ademés, també bloqueja la interacció entre ciclina D1 i l'exportina CRM1, augmentant els nivells nuclears de ciclina D. Les funcions de p27 en el procés apoptòtic no es conèixen bé. Si bé la sobreexpressió de p27 pot induir protecció contra l'apoptosi, altres estudis han reportat efectes pro-apoptòtics (Philipp-Staheli *et al.*, 2001). Hi ha poca evidència de que p27 pugui regular factors de transcripció. En la fase G1 temprana, p27 inhibeix l'activitat del factor de transcripció **AP-1** interaccionant amb el seu cofactor **JAB1** i impedit l'activació de gens promotors del creixement. JAB1 es transloca al citoplasma afavorint la degradació de p27, però aquesta translocació citoplasmàtica de p27-JAB1 impedeix l'associació entre JAB1 i AP-1. Les proteïnes Cip/Kip no segueixen la teoria dels dos events de Knudson, dels gens supressors tumorals. Mentre que la pèrdua d'un al·lel de p27 s'ha reportat, la inactivació de les dues còpies del gen p27 és molt infreqüent. Experiments amb ratolins homozigots p27^{-/-} han mostrat propensió al desenvolupament d'adenomes hipofisaris, adenomes i adenocarcinomes intestinals i de pulmó, tumors ovàrics de cèl.lules de la granulosa, i diferents tipus de tumors uterins. Els ratolins heterozigots per p27^{+/-} han mostrat també la predisposició d'aquests animals a desenvolupar tumors, indicant que p27 és haplo-insuficient en la seva funció supressora tumoral (Fero *et al.*, 1998).

1.11.3. Dinàmica del cicle cel.lular

Quan una cèl.lula quiescent entra en cicle, els gens codificants de les ciclines D (D1, D2 i D3) són activats en resposta a senyals mitogèniques, i a continuació les ciclines D s'uneixen a les seves unitats catalítiques, CDK4 i CDK6. Llavors els complexos ciclina D-CDK entren al nucli de la cèl.lula on han de ser fosforilats per una kinasa activadora de les CDKs (CAK) (Sherr *et*

al., 1995) per poder fosforilar a la vegada altres substrats proteics. Els senyals mitogènics induïts per Ras promouen la transcripció de ciclina D1 via una cascada de kinases que depèn de l'actuació seqüencial de la serina/threonina kinasa **Raf-1**, que fosforila i activa les “mitogen-activated protein kinase” (MAPK) 1 i 2 (MEK1 i MEK2), i aquestes a la seva vegada fosforilen i activen les “extracel.lular signal-regulated protein kinases” (ERKs). La funció més reconeguda de les kinases dependents de ciclina D és la de fosforilar específicament pRb i en un lloc molt concret (característicament exclou la histona H1). Aquesta especificitat d'acció de CDK4 contrasta amb el ventall més ampli de substractes de CDK2, que pot fosforilar pRb, la histona H1, i la mateixa p27^{kip1}. El punt de vista generalment acceptat és que les CDK dependents de ciclina D inicien la fosforilació de pRb cap a la meitat de G1, alliberant l'E2F. E2F indueix la síntesi de ciclina E, que a la vegada estimula a CDK2 a completar el procés hiperfosforilant pRb en llocs addicionals (Matsushime *et al.*, 1994), creant un cercle viciós positiu que porta irreversiblement a la fase S. Al mateix temps, el segrest de proteïnes Cip/Kip produït per part dels complexos ciclina D-CDK4 produeix la desinhibició, i per tant facilita l'activació, dels complexos ciclina E-CDK2 la qual requereix tant la inactivació de les proteïnes Cip/Kip com de pRb, i per tant, depèn de l'activació prèvia de ciclina D/CDK4. Posteriorment, ciclina E-CDK2 facilita la seva pròpia activació perquè además d'hiperfosforilar pRb, també fosforila p27 a nivell del residu de threonina 187 i indueix la degradació d'aquesta proteïna Cip pel proteosoma 26S. Les mol.lècules residuals de p27 i p21 romanen unides als complexos ciclina D-CDK al llarg dels cicles subsegüents. Les CDKs dependents de ciclina A i ciclina B activades més tard durant el cicle de divisió cel.lular, mantenen pRb en una forma hiperfosforilada fins que les cèl.lules surten de la mitosi i pRb retorna a un estat hipofosforilat en la següent fase G1 (Ludlow *et al.*, 1990). És probable que la fosforilació-proteòlisi de ciclina E durant la fase S (Clurman *et al.*, 1996) juntament amb la degradació de ciclina A en G2 (King *et al.*, 1996), retornin el sistema al nivell basal. Per la seva banda, el remanent de proteïnes

Cip/Kip segrestades és alliberat quan els estímuls mitogènics ambientals desapareixen i la síntesi de ciclina D s'atura, resultant tot plegat en la inhibició de ciclina E-CDK2 i el consegüent arrest del cicle en G1.

1.11.4. Proteïnes reguladores del cicle cel·lular i càncer

Com ja s'ha comentat abans al parlar de p53, alteracions d'aquest gen supressor tumoral (el "guardià del genoma") han estat reportades en la majoria de neoplàsies humanes (Hollstein M *et al.*, 1991; Caron de Fromentel C *et al.*, 1992; Levine AJ *et al.*, 1993), ja siguin epitelials, mesenquimals, limfoides o del sistema nerviós central. Experiment efectuat amb ratolins carents de p53 han mostrat propensió per part d'aquests a desenvolupar limfomes, sarcomes indiferenciats, hemangiosarcomes i osteosarcomes, predisposició més elevada en homozigots que en ratolins amb un sol al·lel mutat de p53, indicant que la presència d'un sol al·lel normal de p53 té capacitat per a reduir la formació de tumors (Donehower *et al.*, 1992). Mutacions germinals de p53 donen lloc a la síndrome de Li-Fraumeni, d'herència autosòmica dominant. L'espectre de càncers en aquesta síndrome inclou carcinomes de mama, sarcomes de parts toves, tumors cerebrals, osteosarcoma, leucèmies i carcinoma de còrtex suprarenal entre d'altres. Es desenvolupen en edats molt tempranes, i múltiples tumors primaris simultanis són freqüents (Li *et al.*, 1992). Els membres d'una família que tingui aquesta síndrome, tenen un al·lel mutat de p53 i un al·lel salvatge. Tots els tumors que puguin presentar retenen l'al·lel mutat i perden el salvatge. Això s'explica, com s'ha comentat abans, per la hipòtesi dels dos "hits" de Knudson (1971). La majoria de mutacions germinals de p53 són de tipus *missense*.

Considerant les deu varietats més freqüents de càncer al món, alteracions en p53 es troben en el 45% dels pacients (Soussi T *et al.*, 1994). Almenys un 50% d'adenocarcinomes colorectals tenen una proteïna p53 mutada, generalment associada a pèrdua de l'altre al·lel. A més de les mutacions puntuals que poden afectar el gen p53, diversos treballs han enfocat l'estudi dels

polimorfismes de p53 com a factors de risc pel desenvolupament de patologies malignes. Els al·lels del polimorfisme localitzat al codó 72, a l'exó 4 de p53, codifiquen per a un residu d'arginina (CGC; Arg72) amb càrrega positiva, o per a un residu de prolina (CCC; Pro72) apolar. Ha estat reportada una associació significativa entre aquest polimorfisme al codó 72 i el risc de càncer, encara que els resultats en relació a la majoria de càncers, inclosos els de mama i els col·rectals no són conclouents. Aquest polimorfisme Arg/Pro es localitza en una regió rica en prolina, entre els residus 64-92, requerida per a la funció d'inducció d'apoptosi però no per a la de interrupció del cicle cel·lular. La proteïna p73, homòloga de p53, és capaç d'activar els promotors dependents de p53 i induir l'apoptosi en cèl·lules deficientes en p53. Una funció intacta de p73 és un determinant important de la sensibilitat de les cèl·lules canceroses als agents antineoplàstics. Alguns mutants de p53 poden unir-se a p73 i inactivar-la, especialment quan la mutació de p53 té lloc sobre l'al·lel Arg72 (Marin *et al.*, 2000). Aquestes mutacions de p53 estarien localitzades en els codons 173, 175, 176, 179, 220, 242, 245, 248, 249, 273 i 282, i són capaces de inhibir l'apoptosi induïda per p73, però amb més eficiència quan es localitzen en un al·lel Arg72. La inhibició de p73 per aquests mutants de p53 i per mutants de la pròpia p73 impedeix l'apoptosi i citotoxicitat induïda per molt quimioteràpics (Bergamaschi *et al.*, 2003). De manera que la presència d'aquestes mutacions en Arg72 s'ha correlacionat amb una pobre resposta al tractament quimioteràpic en càncer de cap i coll. Ademés, en diferents varietats de tumors s'ha reportat més freqüència de mutacions sobre l'al·lel Arg72 que sobre l'al·lel Pro72 (Tada *et al.*, 2001). En una sèrie de 162 carcinomes col·rectals, Langerod *et al.* van reportar el 2002 una freqüència dels al·lels Arg72 i Pro72 de 0.75 i 0.25 respectivament. La freqüència de mutacions de p53 en aquesta sèrie va ser de 48%, però no van trobar diferències en la freqüència de mutacions entre els dos al·lels, a diferència del que ells mateixos van observar en una altra sèrie de càncers de mama. Segons aquest treball, el polimorfisme al codó 72 pot afectar la funció de les mutacions de p53 en càncer de mama, però no en càncer col·rectal. Des

de 1989, un ampli cos de literatura s'ha anat ocupant dels aspectes biològics i alteracions de p53, romanent encara un cert grau de controvèrsia pel que fa al valor com a factor pronòstic de l'estudi de mutacions, sobreexpressió i pèrdues al·lèliques de p53 (Bertorelle R *et al.*, 1995; Dix B *et al.*, 1994; Kressner U *et al.*, 1999; Goh H-S *et al.*, 1995; Scott N *et al.*, 1991; Slebos RJC *et al.*, 1996; Smith D R *et al.*, 1996; Tomoda H *et al.*, 1995).

P21 ha estat també objecte de diverses publicacions referents al seu valor com a factor pronòstic al llarg de la passada dècada, amb conclusions igualment diverses. Així, alguns treballs no trobaren cap correlació clínico-patològica amb p21, ni entre p21 i p53, així com tampoc entre sobreexpressió o mutació de p53 i estadi o grau tumoral. D'altres reporten una correlació inversa entre l'expressió de p53 i la de p21, però no troben correlació entre l'expressió d'aquestes dues proteïnes i grau tumoral, estadi o supervivència. L'equip d'investigadors de Ropponen *et al.* (1999) reporten una correlació clarament inversa entre l'expressió detectada per immunohistoquímica de p53 i p21, correlació entre p21, Dukes i supervivència i correlació entre no detecció de p53 i millor supervivència. Per a Coqueret *et al.* (2003) i per a Shiohara *et al.*, el possible potencial pronòstic de p21 és poc clar comparat amb el de p27. Ratolins carents de p21 han mostrat només una propensió molt modesta per al desenvolupament de tumors (Deng *et al.*, 1995; Martin-Caballero *et al.*, 2001). Tampoc no queda encara clar que en cèl·lules tumorals p21 tingui localització citoplasmàtica. El fet de que el gen p21 no estigui mutat en càncers podria indicar que algunes activitats específiques de p21 poden ser importants per a la transformació cel·lular. P21 protegeix el carcinoma colorectal i el melanoma de l'apoptosi mediada per p53 i prostaglandina A2 (Gorospe *et al.*, 1996); L'associació dels holoenzims dependents de ciclina D i la funció antiapoptòtica podrien ser dues funcions importants de p21 durant la carcinogènesi.

Delecions, reordenaments o mutacions puntuals del gen de p27 són events molt rarament reportats en cànccers humans (Ponce-Castañeda MV *et al.*, 1995) (Kawamata N *et al.*, 1995), però alternativament les cèl.lules neoplàsiques poden esquivar l'acció inhibidora sobre el creixement cel.lular de p27 mitjançant metilació del promotor, afavorint de forma aberrant la seva degradació a nivell posttranscripcional, o relocalitzant-la en el citoplasma. Els nivells reduïts de p27 en càncer de còlon, pulmó no cèl.lula petita, gliomes i limfoma del mantell han estat atribuïts a increment en la degradació pel proteosoma 26 S (Esposito *et al.*, 1997; Loda *et al.*, 1997; Piva *et al.*, 1999; Chiarle *et al.*, 2000), mentre que en càncer sobre esòfag de Barrett, ovari, i alguns de còlon i mama s'ha observat relocalització de p27 al citoplasma (Ciaparrone *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998; Blain *et al.*, 2002). Així, s'ha trobat p27 citoplasmàtica en el 40% de cèl.lules de càncer de mama o còlon. Aquesta relocalització de p27 al citoplasma és induïda per la proteïna kinasa Akt per mitjà de la fosforilació del domini de localització nuclear de p27 (Viglietto *et al.*, 2002). També pot ser relocalitzada per la kinasa "human kinase interacting stathmin" (hKIS) (Boehm *et al.*, 2002). No es coneixen bé totes les implicacions d'aquesta relocalització de p27, però la conseqüència més simple és que la redistribució de p27 al citoplasma inicia la seva degradació i activa CDK2. S'ha pogut reportar en diferents estirps tumorals una correlació inversa entre expressió de p27 i grau tumoral, com per exemple en carcinoma colorectal i de mama (Fredersdorf S. *et al.*, 1997), gàstric (Mori M *et al.*, 1997), i d'altres.

El paper de ciclina E en el procés de tumorigènesi encara no és prou conegut. Ciclina E es troba expressada a uns nivells molt superiors als fisiològics en molts tumors, i el locus genòmic en el que ciclina E es localitza (19q12-q13) es troba freqüentment amplificat (Akama *et al.*, 1995; Demetrick *et al.*, 1995). Però donat que nivells alts de ciclina E no necessàriament correlacionen amb nivells alts d'activitat CDK2 (Sweeney *et al.*, 1998) ni amb alt índex

proliferatiu, la sobreexpressió per sí sola de ciclina E no sembla suficient per a la completa malignització d'una cèl.lula. La sobreexpressió de ciclina E ha estat reportada en diversos processos neoplàsics humans, per exemple en mama (Buckley MF *et al.*, 1993) (Keyomarsi K *et al.*, 1993), estòmac (Jiang W *et al.*, 1992), o còlon (Kitahara K *et al.*, 1995) (Yasui *et al.*, 1996), però mentre que en estòmac sembla associar-se a tumors molt invasius o metastàsics, en còlon s'associa a estats d'infiltració incipient a través de la *muscularis mucosae*. En aquests tumors, ha estat observada correlació directa entre els nivells de ciclina E i els dels inhibidors p21 i p27 (Akama *et al.*, 1995; Nakamura *et al.*, 1997; Yasui *et al.*, 1997).

OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

2.1. Hipòtesi

L'estudi per mitjans immunohistoquímics i moleculars d'algunes proteïnes reguladores del cicle cel.lular ha d'aportar informació pronòstica complementària i/o independent a l'estadi de Dukes.

2.2. Objectiu general

Identificació de perfils fenotípics en l'adenocarcinoma colorectal que puguin aportar informació pronòstica suplementària a l'estudi anàtomo-patològic habitual, mitjançant l'estudi amb tècniques moleculars i immunohistoquímiques de p53, p21, p27 i ciclina E, proteïnes implicades en el control del cicle cel.lular, principalment de la transició G1-S.

MATERIAL I MÈTODES

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. Pacients i especimens tumorals

Es va dur a terme un estudi hospitalari de casos i controls entre Gener de 1996 i Decembre de 1998 amb l'objectiu d'estudiar interaccions genoma-ambient en el desenvolupament del càncer colorectal. Els casos van ser pacients diagnosticats "de novo" d'adenocarcinoma colorectal i tractats a la Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge i es va seleccionar un cohort amb els primers 185 casos operats consecutivament i de forma electiva entre Gener de 1996 i Juliol 1997. Aquest cohort va ser seguit prospectivament per tal de determinar el valor pronòstic de diferents alteracions genètiques. 15 pacients operats d'urgència van ser exclosos. Es va disposar del consentiment escrit de tots ells per a participar i cedir mostres per a ser analitzades genèticament.

Els pacients comprenien 115 homes i 70 dones, amb un rang d'edat d'entre 30 i 98 anys, amb un promig d'edat de 67 anys. La distribució per estadis fou de 93 carcinomes amb estadi de Dukes A-B1-B2, 67 amb Dukes C1-C2 i 25 amb Dukes D. 114 dels adenocarcinomes es van localitzar al colon i 71 casos al recte. La intervenció quirúrgica va ser considerada curativa tant pel cirurgià com pel patòleg en 150 dels 185 pacients (81.0%) i paliativa en 36 casos. En cinc casos inicialment considerats curatius pel cirurgià es va detectar invasió microscòpica dels marges. Hi va haver recidiva en 22 (14.6%) dels casos curatius i en 10 (6.6%) d'aquests casos es van detectar metàstasis hepàtiques metacròniques. Les principals característiques es detallen a la taula 3.

78 (42.1%) pacients del cohort van rebre tractament quimioteràpic seguint els protocols standard. Quaranta de seixanta-quatre (62.5%) pacients amb estadi Dukes C i els Dukes B amb elevat risc de recurrència (27/73, 36.9%) van rebre el mateix tractament adjuvant: 5-FU més levamisole (injecció de 450 mg/m² en bolus de 5-FU els dies 1 a 5 amb repetició després de 4 setmanes més levamisole 50 mg 3 vegades al dia (oral) els dies 1 a 3 i 15 a 17 durant un any).

Les dades clíniques com desenvolupament de recidiva local, metàstasis a distància i mort van ser prospectivament enregistrades i recuperades de la nostra base de dades. Vam disposar de seguiment clínic per a tots els pacients, amb un promig de seguiment de 70.2 mesos (rang entre 64.5 i 75.9 mesos). La supervivència global (OS) i la supervivència lliure de malaltia (DFS) van ser calculades des de la data de la intervenció quirúrgica fins la de la mort, recidiva o darrera visita. La raó de supervivència global a 3 i 5 anys va ser de 70.7% i 64.3% respectivament. Tots els casos van ser estadiats anatomopatològicament mitjançant el sistema de Dukes modificat per Astler-Coller. Les peces quirúrgiques van ser immediatament transportades en gel després de la seva obtenció al Servei d'Anatomia Patològica. Mostres aparellades de mucosa normal i adenocarcinoma van ser congelades en nitrogen líquid dins les 2 hores posteriors a la seva resecció i emmagatzemades a -80°C . A continuació, les peces quirúrgiques van ser fixades en formol i incloses en parafina per al seu posterior examen anatomopatològic.

3.2. Anàlisi per tècniques moleculars del gen p53

3.2.1. Generalitats

Al moment d'iniciar l'estudi de p53, les mostres de tumor congelat estaven exhaurides en 30 casos. Es va realitzar l'extracció d'ADN a partir de les mostres congelades dels 170 casos restants, sense enriquiment en cèl.lules tumorals, seguint procediments estàndard amb fenol-cloroform. Les mutacions entre els exons 5 i 9 de p53 van ser detectades mitjançant reacció en cadena de la polimerasa (**PCR**), anàlisi dels polimorfismes conformacionals de les cadenes senzilles (**SSCP**) (Orita *et al.*, 1989) dels productes amplificats i seqüenciació directa dels productes de PCR. Es va fer servir DNA extret de línies cel.lulars MDA-MB-468 i KM12SM com a control negatiu. L'anàlisi de LOH en p53 va ser realitzat també per PCR-SSCP.

L'objectiu d'una PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) és obtenir un elevat nombre de còpies d'un fragment de DNA, sempre que coneguem una part de la seqüència de nucleòtids d'aquest.

Aquesta tècnica va ser ideada en 1989 por Kary B. Mullis. Per a la PCR s'empren dos oligonucleòtids sintètics d'uns 15-20 nucleòtids, complementaris als extrems de la regió que es vol amplificar. Aquests oligonucleòtids actuen com a cebadors ("primers") per a la síntesi del DNA, la qual és catalitzada per l'enzim *Taq polimerasa*, aïllada del bacteri *Thermophilus aquaticus*. Els tampons de PCR que s'empren normalment contenen KCl, Tris i MgCl₂. El MgCl₂ és el component amb més influència en l'especificitat i rendiment de la reacció, doncs els ions Mg²⁺ són cofactors de la polimerasa.

Hi ha tres fases o pasos principals en una PCR, repetits al llarg de 30 a 40 cicles. Normalment són realitzats en un ciclador automàtic capaç d'escalfar i refredar els tubs amb la reacció en intervals breus de temps:

1. DESNATURALIZACIÓ (94°C aproximadament): Durant aquesta fase la doble cadena del DNA es separa en dues cadenes senzilles aplicant temperatures de 90 a 95° C que produeixen la ruptura dels ponts d'hidrogen intercatenari.
2. HIBRIDACIÓ ("annealing") a 54° C aproximadament: Degut al moviment brownià, els cebadors es mouen al voltant de les cadenes senzilles del DNA motlle. Constantment s'originen i es trenquen enllaços iònics entre els cebadors i el DNA motlle. En els llocs on els cebadors encaixen exactament, aquests enllaços iònics duren una mica més, i en aquest petit tram bicatenari format (DNA motlle i cebador) la polimerasa pot acoplar-se i començar a copiar el DNA motlle. Una vegada hi ha introduïdes unes quantes bases noves, l'enllaç iònic entre el motlle i el cebador és tan fort que ja no es. La temperatura de fusió o annealing (T_m, "melting temperature") depèn de diversos factors i és relativament específica per cada cebador. Una fórmula senzilla per calcular la T_m és: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$. Sovint cal fer proves per a trobar la temperatura d'hibridació específica, doncs si la temperatura és massa baixa es produirà una unió inespecífica i si és molt alta no es produirà una unió completa.

3. **EXTENSIÓ a 72°C:** A aquesta temperatura, els cebadors situats en posicions que no encaixen exactament tornen a quedar lliures i no donaran extensió del fragment. En el lloc on ja hi ha introduïdes unes poques bases, les forces iòniques que atreuen els cebadors al motlle prevalen sobre les que trenquen aquestes atraccions. Durant aquest pas, la Taq polimerasa incorpora nucleòtids a l'extrem 3' del cebador en sentit 5' a 3', llegint el DNA motlle prèviament desnaturalitzat en sentit 3' a 5'. 72°C és la temperatura de màxima activitat de la Taq polimerasa.

Com que les dues cadenes són copiades durant una PCR, es produeix un increment exponencial del nombre de còpies del fragment de DNA.

3.2.2. Anàlisi de mutacions puntuals de p53

PCR

En el nostre cas es va procedir primerament a l'amplificació per PCR d'un fragment de 1987 parells de bases comprès entre la base **12979** en posició UP (U), situada a l'**exó 5**, i la base **14875** DOWN (D), localitzada a l'**exó 9**. La reacció de PCR es va dur a terme en un volum final de 25 µl, contenint 2.5 µl de Buffer 10x (Gibco^R), 3 µl de dNTPs 100 mM, 0.1 µl de cebador 12979 U, 0.1 µl de cebador 14875 D, 0.1 µl de polimerasa d'ADN 5 U/µl, 18.2 µl d'H₂O desionitzada i 1 µl d'ADN de la mostra. Després d'un temps de preescalfament d'un minut a 95°, els cicles tèrmics començaven amb la fase de desnaturalització durant un minut a 94°, seguida en segon lloc de la fase d'acoplament dels cebadors a 63° durant 45 segons, i es completaven amb la fase d'extensió a 72° durant un minut. Aquest cicle es va repetir 25 vegades. A continuació, el producte resultant d'aquesta primera PCR es va fer servir com a motlle per a amplificar separatament un fragment de 410 parells de bases que incloïa els exons 5 i 6, un altre fragment de 622 parells de bases que incloïa els exons 7 i 8, i un tercer de

788 que incloïa els exons 7 a 9. El medi de la reacció va ser el mateix per a les tres PCR i contenia 2.5 µl de Buffer 10x, 3 µl de dNTPs 100 mM, 0.2 µl de P µ32, 0.25 µl de polimerasa Taq, 18.05 µl d' H₂O, 0.5 µl de cada cebador i 0.5 µl del primer producte de PCR, en un volum final de 25 µl.

Taula 2. PCRs de p53: primers, condicions emprades i mida dels productes.

PCRs	CEBADORS	FRAGMENT	MESCLA DE REACCIÓ	CICLES I T _m
1^a PCR: EX. 5-9	12979 U 14875 D	1987 pb	1 µl DNA, 0.5 u <i>Taq</i> , 120 µM de cada dNTP, 0.4 µM de cada cebador	25 cicles, 63°C
2es PCRs “nested”	EX. 5-6 13054 U 13463 D	410 pb	0.5 µl producte PCR anterior 1 u <i>Taq</i>	35 cicles, 63°C
	EX. 7-8 13966 U 14587 D	622 pb	120 µM de cada dNTP 2 µM de cada cebador	35 cicles, 63°C
	EX. 9 13966 U 14753 D	788 pb	1-2 µCi [α- ³² P]dCTP	35 cicles, 60°C

Els cebadors van ser el **13054 U** i el **13463 D** per als exons 5-6, **13966 U** i **14587 D** per als exons 7-8 i **13966 U** i **14753 D** per als exons 7-9. El cicles tèrmics per a les dues primeres PCR “nested” van ser els mateixos utilitzats per a la PCR inicial, repetits 35 vegades. Per al tercer fragment es van seguir els mateixos cicles tèrmics que per a les dues primeres PCR “nested” però amb una temperatura d'acoplament dels cebadors de 60°. Totes les PCRs van ser comprovades en gels petits de poliacrilamida al 6% polimeritzada amb persulfat amònic (APS) al 10% i tetra-metiletlen-diamina (TEMED). En cada cas es carregaven 5 µl de producte amplificat amb 3 µl de LB (5% glicerol, 0.4% blau de bromofenol i 0.4% xilencianol). La mida

dels productes de PCR s'obtenia per comparació amb el marcador ϕ X174/Hae III (Stratagene), útil com a estàndard de cadenes dobles lineals d'entre 72 i 1353 parells de bases.

DIGESTIÓ DELS PRODUCTES DE PCR

Els productes de les PCR "nested" van ser sotmesos a digestió per mitjà d'**enzims de restricció** abans de ser carregats en gels de SSCP per a la detecció de les mutacions en l'ADN. Del fragment amb els exons 5 i 6, van ser obtinguts dos fragments digerits de 83 i 327 parells de bases utilitzant l'enzim Hpa II. El mateix enzim va ser emprat per a digerir el fragment amb els exons 7 i 8 en quatre fragments de 76, 102, 168 i 276 parells de bases respectivament. Finalment, el segment comprès entre els exons 7-9 va ser digerit mitjançant l'enzim Hha I en dos fragments de 240 i 548 parells de bases. El menor d'aquests dos fragments contenia sencer l'exó 9 juntament amb la segona meitat de l'exó 8 i l'intró intermedi. Totes les digestions van ser realitzades en un volum final de 20 μ l a partir de 5 μ l de producte de PCR i amb 5-10 unitats d'enzim de restricció en el tampó apropiat, deixant-se incubar tota la nit a 37°C.

SSCP

Es va continuar el procés amb la tècnica d'anàlisi de **SSCP**. Amb aquesta finalitat, 2 μ l de cada mostra, dissolts en tampó de càrrega desnaturalitzant DLB (93% formamida, 0.01M EDTA, 0.01M NaOH, 0.01% blau de bromofenol, 0.01% xilencianol) van ser escalfats a 95° durant 5 minuts, immediatament refredats en gel durant 3 minuts i sotmesos a electroforesi, primerament en un gel no desnaturalitzant de poliacrilamida al 6%, i segonament en un gel que contenia a més, un 5% de glicerol. Abans de carregar les mostres, els gels havien corregut durant 15 min a 55 W. Quan ja s'havien carregat les mostres, aquestes es deixaven entrar en el gel durant 12 min a 30 W, i després es corrien el temps adequat. Els fragments digerits corresponents als exons 5-6 i 7-8 van córrer durant 6 hores a 6 W en el primer gel, i durant 13

hores en el segon. Els fragments pertanyents als exons 7-9 van córrer durant 10 hores en el primer gel i 20 hores en el segon. El motiu de córrer a baixa potència era evitar l'escalfament del gel, que hauria pogut trencar els plegaments conformacionals que condicionen la mobilitat de les cadenes. Finalment els gels es passaven a un full de paper Whatman 3MM lleugerament més gran, s'assecaven al buit a 80°C i s'exposaven durant un o dos dies a una pel·lícula sensible als raigs X.

SEQÜENCIACIÓ

Les alteracions observades en els tumors respecte de les mostres control van ser confirmades per seqüenciació directa dels productes de les PCRs corresponents. Aquesta es va realitzar emprant el *kit* comercial ***AmpliCycle™ Sequencing Kit*** (Perkin Elmer), el qual no subministrava ni els *primers* ni el dNTP marcat radiactivament. Per exigència del *kit*, els productes de PCR a seqüenciar es diluïen en aigua entre 2 i 8 vegades segons la seva abundància en el gel de SSCP. En general, el cebador de seqüenciació era un dels dos (U o D) emprats en la PCR de la que procedia la mostra, essent seqüenciat el producte per l'extrem més proper a la zona alterada, el qual es deduïa segons el producte de digestió afectat en la SSCP. Per a cada mostra a seqüenciar es van preparar 4 reaccions de seqüenciació, una per nucleòtid. A cada un dels 4 tubs d'una mateixa mostra se li afegien 2 µl d'una de les mescles de dNTPs subministrades pel *kit* amb un acabador de cadena diferent (ddGTP, ddATP, ddTTP i ddCTP) i 6 µl d'una mescla de reacció que contenia 23 µl H₂O bidesionitzada, 4 µl ***Cycling Mix*** (barreja de tampó i enzim subministrada pel kit), 1 µl d'un dels dos *primers* a 20 µM de la PCR, 1 µl [α-³²P]dCTP o [α-³²P]dATP (3000Ci/mmol) a 10 µCi/µl (Amersham, Suecia), i 1 µl producte de PCR diluït. Aquesta reacció era sotmesa al mateix programa de cicles que la PCR de què procedia la mostra, encara que reduït a 30 cicles.

Els productes de seqüenciació van ser a continuació carregats en gels de SSCP desnaturalitzants. En aquest cas la solució del gel conté urea, amb l'objectiu d'anular els efectes conformacionals de les cadenes de DNA sobre la seva mobilitat electroforètica. El gel es pre-corrria durant uns minuts a 55 W. A 8 µl de la mostra se li afegien 4 µl de *Stop Solution* subministrada pel *kit*, o bé DLB; tot seguit, aquesta dilució es desnaturalitzava i se'n carregaven 2 µl. Les quatre reaccions de seqüència d'una mateixa mostra es carregaven sempre una al costat de l'altra, sense pous de separació entre elles, en l'ordre G-A-T-C. Molt sovint també es carregaven juntes les reaccions equivalents de mostres diferents en aquest mateix ordre. És a dir, si en un gel havíem de córrer al mateix temps 4 seqüenciacions iguals però de productes de PCR diferents, a més de carregar els grups de mostres G-A-T-C, carregàvem GGGGAAAATTTTCCCC. D'aquesta manera ràpidament es veia en quina mostra del grup hi havia una alteració de la seqüència respecte a la de les demés. Les mostres es corrien entre 2 i 6 hores, depenent de la distància entre la zona de la seqüència que ens interessava i el cebador. Els gels es revelaven de la mateixa manera com s'ha explicat.

3.2.3. Anàlisi de LOH en p53

Per a la detecció de pèrdues al·lèliques a nivell de p53 es començà amb l'extracció de l'ADN a partir de talls de 10 µm de mostres congelades i aparellades de mucosa normal i carcinoma dels diferents casos. Posteriorment es procedí a l'amplificació mitjançant PCR d'un fragment de 330 parells de bases localitzat entre les bases 12019 i 12349 de l'exó 4, on s'ubica el polimorfisme AA 72 Arg/Pro. Aquest polimorfisme es troba a la posició 12138 i consisteix en una transversió G-C. El medi de reacció d'aquesta PCR estava constituït per 5 µl de tampó Buffer 10x sense Mg⁺⁺ (Gibco^R), 5 µl de dNTPs 2 mM, 2.5 µl de MgCl₂ 50 mM (Gibco^R), 34.9 µl d'H₂O, 0.2 µl dels cebadors 11033 "UP" i 12349 "DOWN" a 100 µM, 0.2 µl d'ADN polimerasa Taq 5 U/µl (Gibco^R) i 2 µl d'ADN de la mostra. Els cicles tèrmics començaven, previ preescalfament de les

mostres a 95° durant un minut, amb una primera fase de desnaturalització d'un minut a 94°, seguida en segon lloc de la fase d'acoplament dels cebadors a 55° durant 45 segons, i es completaven amb la fase d'extensió a 72° durant 1 minut i 15 segons. Els cicles es repetia 35 vegades.

Les pèrdues d'heterozigositat van ser detectades carregant 4 µl del producte de PCR desnaturalitzat més 8 µl de blau DLB en gels de poliacrilamida al 10% no desnaturalitzants (acrilamida:bisacrilamida, 40: 1) de 0.8 mm de gruix. Després de córrer a 14 W durant 8 hores, les mostres eren fixades per immersió del gel en etanol al 10% durant 10 minuts, i tractades durant 3 minuts amb solució de HNO₃ a l'1%. A continuació es canviava l'àcid nítric per una altra solució de 2.02 g de nitrat de plata (AgNO₃) en 1 l d'H₂O durant 20 minuts. Finalment s'obtenia el revelat per mitjà d'una solució de 29.6 g de carbonat sòdic (Na₂CO₃) i 540 µl de formaldehid al 37% en 1 l d' H₂O desionitzada. El revelat s'aturava per immersió del gel en solució d'àcid acètic al 10% durant 10 minuts.

En tots els casos heterozigots per al polimorfisme 72 Arg/Pro es va procedir a un segon anàlisi comparatiu normal-tumor previ enriquiment en cèl.lules tumorals de les mostres corresponents als carcinomes, en aquest cas mostres parafinitzades. L'ADN va ser extret exclusivament de les zones tumorals mitjançant un equip d'extracció de Quiagen^R. A continuació, un fragment inicial de 492 parells de bases, comprès entre la base 11920 situada a l'exó 3 i la base 12412 localitzada a l'exó 4, va ser amplificat per mitjà d'una PCR. El medi de reacció d'aquesta estava constituït per 5 µl de tampó "Buffer Mg⁺⁺ free", 5 µl de dNTPs 2 mM, 5 µl de MgCl₂ 25 mM i 0.2 µl d'ADN polimerasa Taq 5 U/µl, tots aquests reactius de Promega^R. El medi de reacció es completava amb 1.2 µl de cada un dels cebadors a 20 µM, 27.4 µl d'H₂O bidestil.lada i 5 µl d'ADN de la mostra. Els cicles tèrmics van ser els mateixos que en les PCR prèvies augmentant el temps d'elongació fins a 2 minuts. A partir del producte d'amplificació obtingut, es va procedir a una segona PCR de l'exó 4, tal i com s'ha descrit anteriorment. El producte finalment

obtingut es va carregar en gels de SSCP iguals als anteriorment descrits i revelats igualment per tinció amb plata.

3.3. Immunohistoquímica

3.3.1. Immunohistoquímica sobre seccions histològiques completes

L'estudi per mitjà d'immunohistoquímica es va dur a terme a partir de seccions parafinitzades de 5 µm de gruix dels tumors. Les mostres van ser desparafinitzades mitjançant una bateria de quatre xilols (10 minuts per xilol) i rehidratades passant-les durant 15 minuts per una bateria de tres etanols absoluts (5 minuts en cada etanol), 15 minuts per tres alcohols de 96°, 5 minuts per un alcohol de 70° i 5 minuts en H₂O desionitzada. Després de la desparafinització es procedia al bloqueig de l'activitat peroxidasa endògena amb H₂O₂ al 3% durant 10 minuts, seguit d'un rentat de 5 minuts amb H₂O i de tres rentats de 5 minuts amb solució salina tamponada de fosfat (PBS) a 1/10. El desemascament antigènic s'obtenia autoclavant durant dos minuts les mostres en una olla a pressió. En el cas de les determinacions de p53, p21 i p27, la solució de desemascament antigènic era citrat sòdic a pH= 6. En el cas de la ciclina E va ser tampó d'etilén-diamino-tetraacètic (EDTA) a pH= 8.

Després de tres nous rentats amb PBS i incubació durant 2 hores amb normal serum GOAT a 1/5, es procedia a incubació de les preparacions a +4°C durant una nit amb l'anticòs primari.

La sobreexpressió de p53 es va detectar mitjançant anticòs monoclonal de ratolí IgG_{2a} DO-1 (Ab-6) d'OncogeneTM Research Products a una solució 1: 100. Aquest anticòs reconeix un epítop localitzat entre els aminoàcids 21 i 25 tant de la proteïna salvatge com de les formes mutades de p53. Cèl.lules d'adenocarcinoma ductal pancreàtic van ser processades durant cada immunotinció com a control positiu. Per a la detecció d'expressió de proteïna p21 es va utilitzar anticòs monoclonal de ratolí IgG₁, clona 6B6 de PharMingen^R. En aquest cas es van utilitzar seccions de carcinoma de cèl.lula transicional com a control positiu. La solució de treball de

l'anticòs anti p21 humana va ser 1: 20. L'expressió de proteïna p27 va ser demostrada per mitjà de l'anticòs monoclonal murí IgG₁, clona 57 de BD Transduction Laboratories, Lexington, KY.

Taula 3. Particularitats dels diferents anticossos primaris utilitzats

Proteïna	Anticòs primari	Marca	Dilució	Control positiu
P53	Monoclonal IgG _{2a} DO-1 (Ab-6)	Oncogene TM Research Products	1: 100	Cel. carcinoma ductal pancrees
P21	Monoclonal IgG ₁ clona 6B6	PharMingen ^R	1: 20	Cèl. carcinoma urotelial
P27	Monoclonal IgG ₁ clona 57	BDTransduction Laboratories	1: 100	Cèl. mantell fol.licular
Ciclina E	Monoclonal IgG _{2b} clona HE12	Santa Cruz ^R	1: 40	Citotrofoblaste (placenta)

Igualment, les mostres van ser incubades tota una nit a +4°C a una solució de treball d'1: 100. El control positiu van ser les cèl.lules del mantell dels folícles d'amígdala faríngea. En aquesta immunohistoquímica en concret van servir de control intern les neurones del plexe mientèric d'Auerbach. Finalment, per a la determinació de ciclina E es va emprar anticòs monoclonal murí, isotipus IgG_{2b}, clona HE12 de Santa Cruz^R a una dilució d'1: 40. El teixit utilitzat com a control positiu va ser placenta, concretament les cèl.lules del citotrofoblaste. En tots els cassos, el control negatiu es va obtenir per omissió de l'anticòs primari corresponent.

Després de tres rentats de 5 minuts amb Tritó X-100 diluït al 0.2% en PBS, les mostres es van incubar durant 30 minuts a temperatura ambient amb l'anticòs secundari EnVision HRP de Dako^R. Finalment, després de tres rentats més amb Tritó X-100, es procedia al revelat amb

diaminobenzidina. La immunoreactivitat es va gradar avaluant la tinció nuclear d'almenys 500 cèl.lules tumorals en les àrees més representatives.

Es van considerar positius per a p53 aquells adenocarcinomes en els que es va detectar immunotinció per a l'esmentada proteïna en més d'un 20% de nuclis. Pel que fa a p21, p27 i ciclina E, els percentatges de tall es van situar en el 10%, 15% i 10% de nuclis tumorals respectivament. Per a gradar l'expressió de les diferents proteïnes analitzades vam escollir en cada cas el percentatge de tall que millor discriminava entre un grup de pacients amb bona supervivència i un altre amb baixa supervivència a les corbes de Kaplan-Meyer. En el cas de p53 i p21 els nostres percentatges de tall coincideixen amb els reportats en la majoria de treballs publicats.

3.3.2. "Array" tissular (Tissue macroarray)

S'ha fet servir el sistema de "arraying" tissular descrit per P.L. Fernández et al. Després de l'estudi immunohistoquímic amb seccions histològiques senceres, una secció de cada bloc va ser tenyida amb hematoxilina-eosina per a marcar tres àrees no necròtiques i morfològicament representatives dels tumors. De cada bloc de tumor es van prendre, mitjançant un punx per a biòpsies cutànies, dos cilindres tissulars de 2 mm de diàmetre, els quals van ser disposats ordenadament en un nou bloc de parafina. Els 200 casos van quedar finalment representats en set blocs de parafina, contenint cada bloc dos cilindres tissulars de trenta casos (Fig. 7).

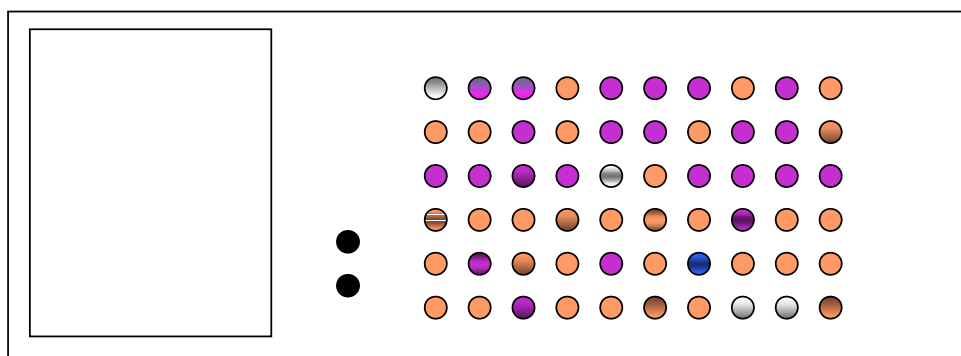


Fig. 7. Portaobjectes amb una secció de l'array tissular.

Les tincions immunohistoquímiques de p53, p21, p27 i ciclina E van ser realitzades tal i com s'acaba de descriure en l'apartat anterior en dues seccions de 5 µm de cada bloc del "tissue-array", distanciades entre elles un promig 30 nivells.

3.4. Anàlisi estadístic

Per als càlculs estadístics es va fer servir el programa informàtic Statistical Package for Social Science (SPSS). Les taules de contingència per a correlacions clinicopatològiques van ser analitzades per mitjà del test X^2 . Van ser considerats estadísticament significatius valors de "p" inferiors a 0.05. La supervivència global i la supervivència lliure de malaltia van ser calculades per mitjà del mètode de Kaplan-Meyer i anàlisi de log-rang. Per a l'anàlisi multivariable de supervivència es va aplicar el mètode de regressió de Cox.

RESULTATS

4. RESULTATS

4.1. Estudi mutacional de p53

La taula 4. mostra els resultats de l'estudi mutacional de p53. Hi havia mostres congelades disponibles en els 162 dels 185 casos inclosos. Es van obtenir resultats mutacionals vàlids en 139 tumors (85.8%), essent positius en 73 adenocarcinomes (45.0% dels casos). Hi va haver 3 tumors amb doble mutació, detectant-se en total 79 mutacions puntuals.

Taula 4. Característiques dels pacients i carcinomes amb mutacions de p53

	No. de Tumors	No. amb mutació	Mutacions en hot spots	p53 wt-no hs / hs (*) HR CI95%	p53 wt-no hs / hp L3-LSH (**) HR CI95%
Mida inicial mostra	185	73 (45.0%)	32 (19.7%)		
Sexe dels pacients					
Masculí	115(62.2%)	43 (50.0%)	16 (18.6%)	1	1
Femení	70(37.8%)	30 (56.6%)	16 (30.2%)	1.94 (0.87-4.33)	2.00 (0.83-4.80)
Localització dels tumors					
Recte	71(38.4%)	25 (51.0%)	12(24.5%)	1	1
Còlon esquerre	63(34.1%)	29 (64.4%)	10(22.2%)	1.10 (0.42-2.87)	1.18 (0.42-3.33)
Còlon dret	51(27.6%)	19 (42.2%)	10(22.2%)	0.97 (0.35-2.62)	0.85 (0.28-2.58)
Estadi de Dukes					
A / B1-B2	93(50.3%)	36 (49.3%)	11(34.4%)	1	1
C1-C2	67(36.2%)	27 (58.7%)	16(34.8%)	2.95 (1.22-7.15)	2.80 (1.08-7.22)
D	25(13.5%)	10 (50.0%)	5(25.0%)	1.84 (0.55-6.12)	1.25 (0.30-5.15)
Grau histològic					
Baix grau	160 (86.5%)	65 (89.0%)	27 (84.4%)	1	1
Alt grau	17 (9.2%)	8 (11.0%)	5 (15.6%)	1.99 (0.61-6.45)	1.98 (0.56-6.91)
NOE	8 (4.5%)				
Supervivència global (Crua)				Wt /no hs 1 Hot spot 1.69 (0.89 – 3.20)	wt/no hs 1 hs L3-LSH 1.97 (1.01 – 3.85)
Supervivència lliure de malaltia (Crua)				Wt /no hs 1 Hot spot 2.29 (1.07 – 4.91)	wt/no hs 1 hs L3-LSH 2.39 (1.08 – 5.30)
Supervivència global (Ajustada)				Wt /no hs 1 Hot spot 1.70 (0.88 – 3.27)	wt/no hs 1 hs L3-LSH 2.85 (1.36 – 5.78)
Supervivència lliure de malaltia (Ajustada)				Wt /no hs 1 Hot spot 2.09 (0.96 – 4.55)	wt/no hs 1 hs L3-LSH 2.25 (1.00 – 5.10)

(*) p53 salvatge o amb mutació no hot spot vs mutació hot spot

(**) p53 salvatge o amb mutació no L3-LSH vs mutació en L3-loop i LS α -hèlix

4.1.1. Correlacions clínico-patològiques

No es va observar correlació entre mutació puntual de p53, edat i sexe dels pacients, grau tumoral, invasió de vasos limfàtics i sanguinis, o estadi de Dukes. Considerant en un mateix grup els carcinomes rectals i aquells localitzats al còlon esquerre, les mutacions puntuals de p53 van ser una troballa més freqüent entre els tumors localitzats al còlon esquerre que entre els localitzats al còlon dret, resultant aquesta correlació gairebé significativa estadísticament, ($p=0.06$).

4.1.2. Anàlisi de supervivència

Els pacients amb mutació de p53 van mostrar una tendència a una menor supervivència global i lliure de malaltia, però no va ser estadísticament significativa.

4.2. Estudi mutacional específicant “hot spots” de p53

Trenta-tres de 79 (41.7%) mutacions de p53 es van localitzar en “hot spots” (taula 5). Set (8.8%) de les mutacions puntuals de la nostra sèrie es van localitzar al codó 175, 4 (5.0%) al codó 245, 6 (8.2%) al codó 248, 9 (12.2%) al codó 273 i 7 (9.6%) al codó 282. No hem detectat cap cas a la nostra sèrie amb mutació puntual als “hot spots” 143 i 249. D'altra banda, vam detectar mutacions repetides en altres codons. Quatre (5.3%) mutacions al codó 5, 3 (4.0%) mutacions al codó 7 i 3 (4.0%) al codó 158. Aquests tres codons no estan ubicats als dominis altament preservats i per tant no van ser considerats “hot spots”.

Taula 5. Mutacions “hot spot” de p53 –percentatge respecte del total de mutacions detectades –tipus de mutació –freqüència de cada tipus i canvi de base.

Codó	Freqüència	%	Tipus	Freqüència	Canvi
175	7	8.8%	transició	7	CGC-CAC
245	4	5.0%	transició	1	GGC-GAC
			transversió	3	GGC-GTC
248	6	8.2%	transició	5	CGG-TGG
			transició	1	CGG-CAG
273	9	12.2%	transició	6	CGT-TGT
			transició	2	CGT-CAT
			transversió	1	CGT-AGT
282	7	9.6%	transició	7	CGG-TGG

4.2.1. Correlacions clinicopatològiques

Si en lloc de considerar conjuntament totes les mutacions de p53 com hem fet abans, diferenciem entre les que es localitzen en “hot spots” i les que no, trobem algunes correlacions interessants. En primer lloc, es va observar correlació estadísticament significativa entre la presència de mutacions “hot spot” i l’edat dels pacients. El 65% (n=21) de pacients amb aquesta mena de mutacions puntuals tenia més de 70 anys ($p < 0.01$). També es va observar una bona correlació entre l’estadi de Dukes i l’estat mutacional de p53 si es distingeix entre mutacions en “hot spots” i mutacions fora d’aquests llocs, especialment si es prescindeix dels tumors amb p53 salvatge ($p = 0.02$). Es van detectar 0 mutacions “hot spot” en tumors Dukes A, 11 (13%) de mutacions “hot spot” entre els Dukes B, i 16 (34.7%) en tumors Dukes C. Es va observar la mateixa correlació agrupant els tumors amb p53 salvatge amb els que tenen mutacions “no hot spot” i comparant-los amb els tumors amb mutació “hot spot” ($p = 0.02$).

4.2.2. Anàlisi de supervivència

Quan l'estat mutacional de p53 es va dividir en proteïna salvatge, mutacions “no hot spot” i mutacions “hot spot”, els carcinomes amb mutacions “hot spot” van mostrar una tendència a presentar una menor supervivència global, mentre que els tumors amb altres mutacions de p53 van tendir a mostrar la millor supervivència global i aquells que no presentaren mutació una supervivència global intermitja ($P=0.08$)(Fig. 8). No hi ha diferències al comparar la supervivència dels carcinomes amb mutacions “hot spot” amb la dels tumors amb qualsevol altra tipus de proteïna p53, (Fig. 9). Finalment, quan dintre de les mutacions “hot spot” vam considerar només les que afecten el L3-loop i el motiu LSH, aquest grup va mostrar clarament pitjor supervivència global que els tumors amb qualsevol altra mutació de p53 o amb p53 “wild type” ($p= 0.04$) (Fig. 11).

Les corbes de supervivència lliure de malaltia dels tumors amb p53 salvatge i amb mutació “no hot spot” van ser coincidents (Fig. 8), essent els carcinomes amb mutació “hot spot” els que van mostrar pitjor supervivència lliure de malaltia ($p= 0.02$) (Fig 9). L'anàlisi va donar el mateix resultat quan vam comparar els carcinomes amb mutació en L3 o LSH amb la resta dels carcinomes (Fig. 11).

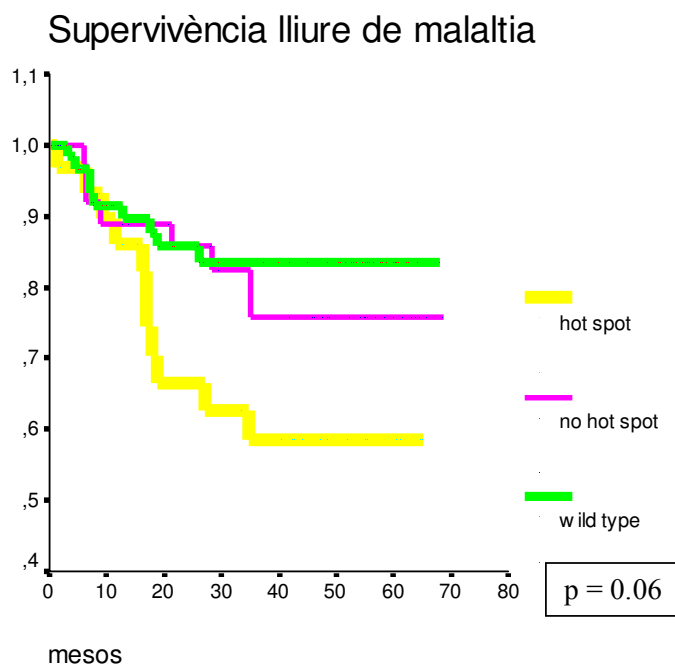
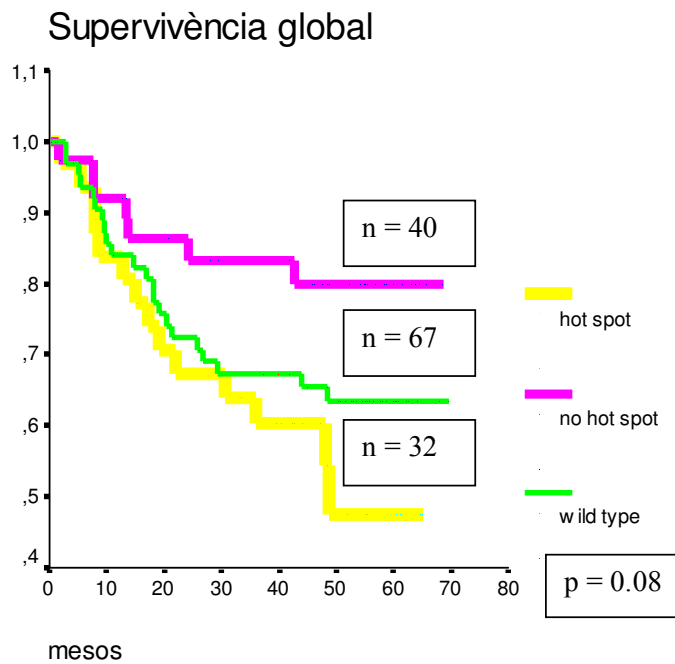


Fig. 8. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels tumors amb mutacions “hot spot”, mutacions “no hot spot” i proteïna p53 salvatge.

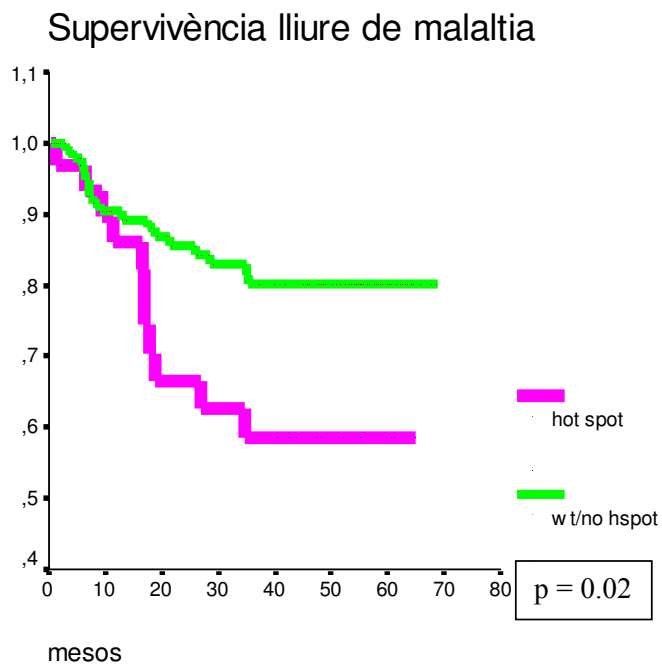
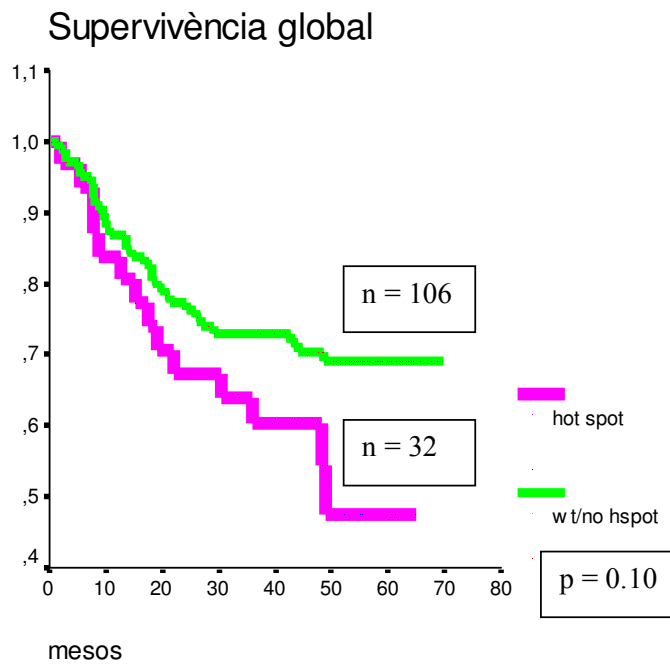


Fig. 9. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels tumors amb mutació “hot spot” de p53 i d’els tumors amb proteïna p53 “wild type” o amb mutació no “hot spot”(valors crus).

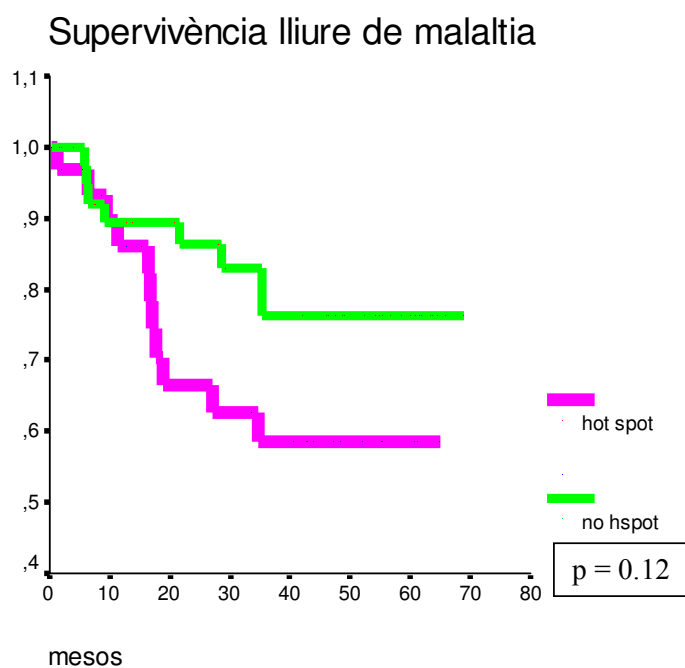
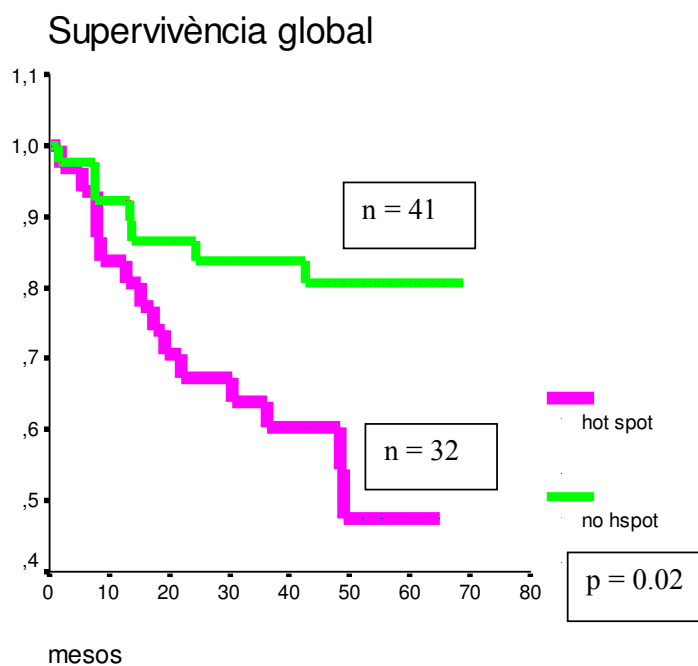


Fig. 10. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels tumors amb mutació “hot spot” de p53 comparades amb les dels tumors amb altres mutacions de p53 (valors crus).

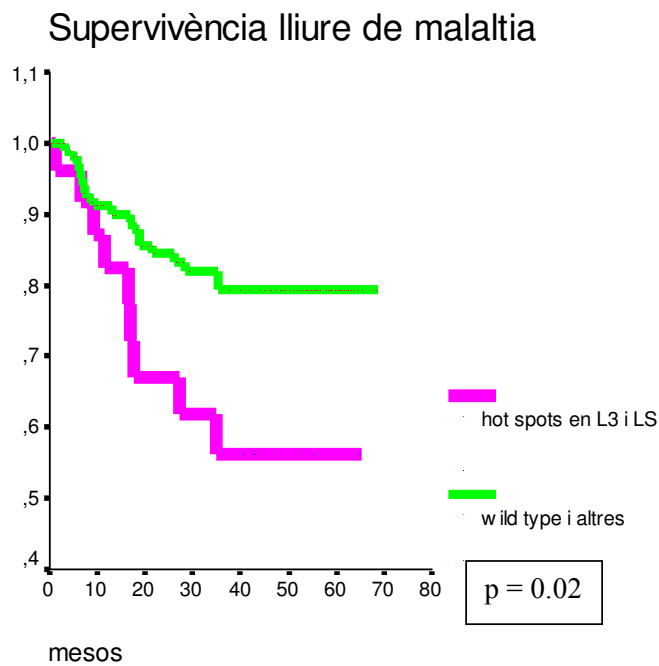
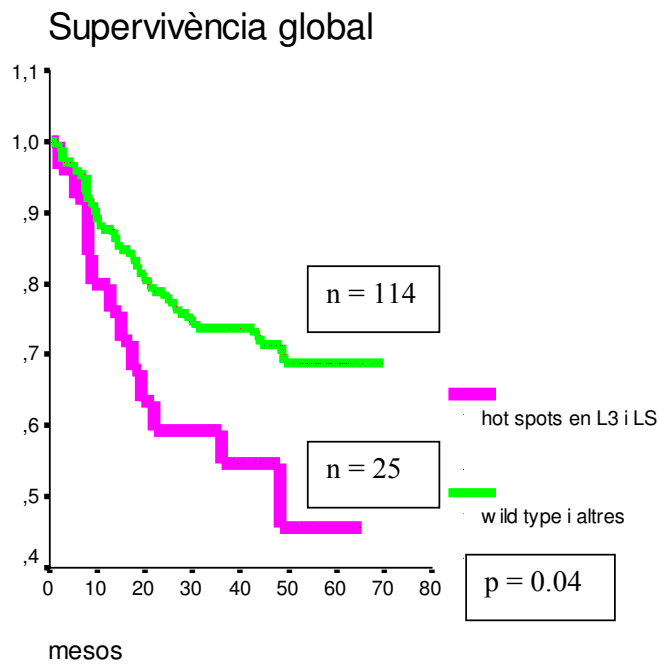


Fig. 11. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels tumors amb mutacions “hot spot” en L3-loop i en LS α -hèlix comparades amb la dels tumors amb altres mutacions de p53 (valors crus).

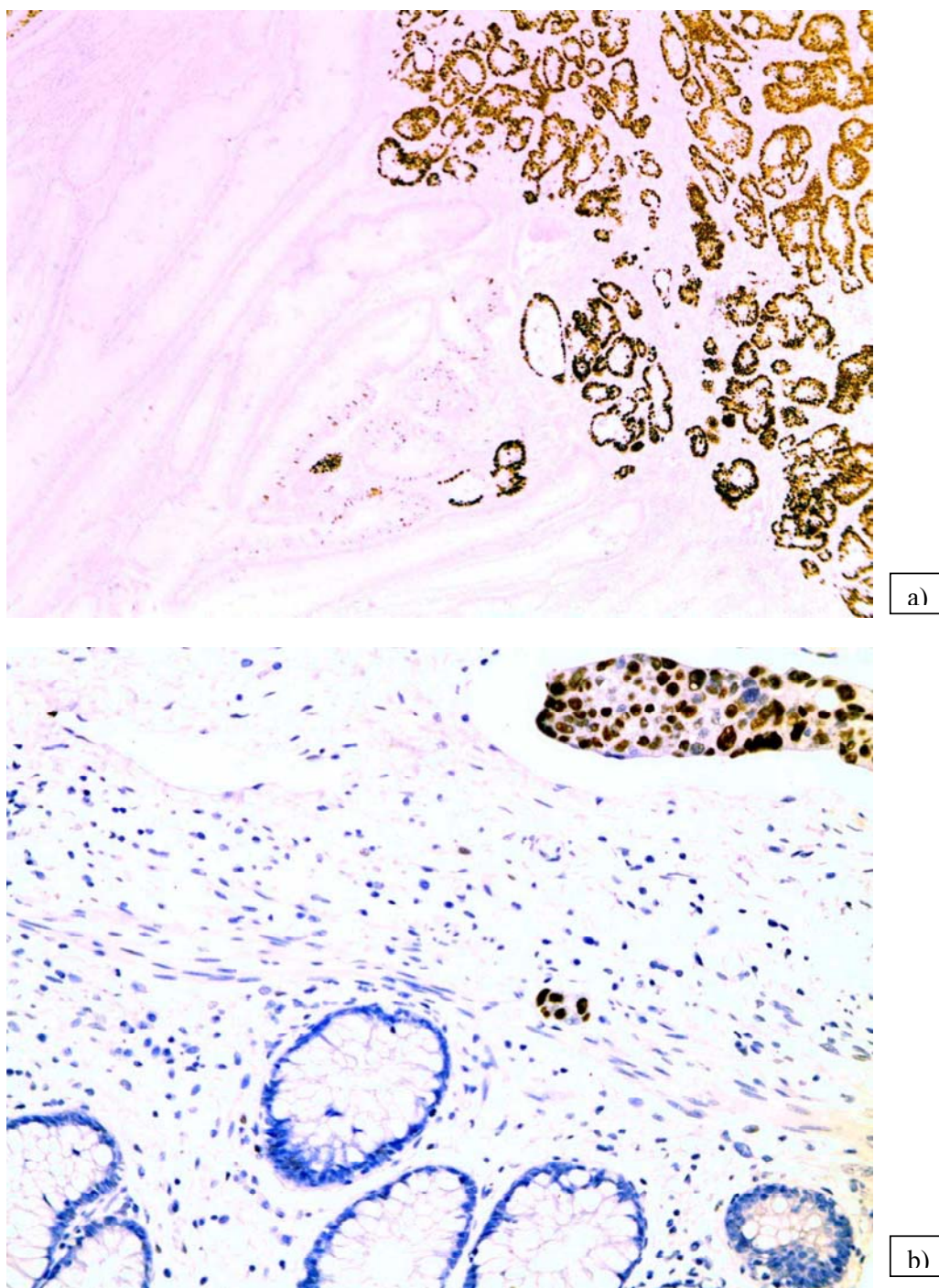


Fig. 12. a) Intensa expressió nuclear de p53 en un adenocarcinoma colorectal, que contrasta amb l'expressió més dèbil i ocasional en una àrea d'adenoma perifèric, i nul·la en glàndules arquitecturalment distorsionades però sense displàsia (10x); b) Dos èmbols carcinomatosos en l'interior de vasos limfàtics, amb intensa expressió de p53, en contrast amb la negativitat de l'epiteli de les criptes normals.

4.3. Sobreexpressió de p53

L'anàlisi immunohistoquímic de p53 (Fig. 12) va ser valorable en 176 casos (taula 6). Es va detectar sobreexpressió de p53 en 124 (70.4%) dels mateixos. En 93 casos (65,8%) els resultats de la tinció i l'anàlisi mutacional van ser concordants (64 positius i 29 negatius) (Taula 7).

Taula 6. Característiques dels pacients i carcinomes amb anàlisi d'expressió de p53

	p53 IHC + (>20%)	p53 IHC - (<20%)	χ^2 "p"	HR	IC 95%
Mida inicial mostra	124/176 (70.4%)	52/176 (29.5%)			
Sexe dels pacients					
Masculí	75 (70.1%)	32 (29.9%)	0.51		
Femení	49 (71.0%)	20 (29.0%)			
Localització del tumor					
Recte	48 (71.6%)	19 (28.4%)	0.84		
Còlon esquerre	42 (67.7%)	20 (32.3%)			
Còlon dret	34 (72.3%)	13 (27.7%)			
Estadi de Dukes					
A / B1-B2	56 (62.2%)	34 (37.8%)	0.02	1	
C1-C2	51 (82.3%)	11 (17.7%)			2.81 (1.29-6.13)
D	17 (70.8%)	7 (29.2%)			1.47 (0.55-3.92)
Grau histològic					
Baix grau	107 (69.5%)	47 (30.5%)	0.13		
Alt grau	14 (87.5%)	2 (12.5%)			
NOE	3 (2.4%)				

Va trobar-se sobreexpressió de proteïna sense mutació gènica en 34 (25.5%) dels carcinomes, i mutació sense expressió de p53 en 10 (7.5%) de casos. La correlació entre estat mutacional i sobreexpressió de p53 va ser, no obstant, estadísticament significativa ($p < 0.01$). Nou de les 10 mutacions sense expressió de proteïna (90% de les mateixes) estaven localitzades fora dels "hot spot".

4.3.1. Correlacions clínicopatològiques

No es va observar correlació entre sobreexpressió de p53 i edat o sexe dels pacients, localització del tumor, o invasió limfàtica i/o sanguínia. Es va observar una tendència a la correlació entre alt grau tumoral (adenocarcinomes poc diferenciats) i sobreexpressió de p53 però no va arribar a ser estadísticament significativa ($p= 0.11$). Sí es va observar una correlació estadísticament significativa entre la immunoexpressió de p53 i l'estadi de Dukes, tant si aquest es divideix en tres categories (A-B1-B2, C1-C2, D) com en dues categories (A-B1-B2, C1-C2-D) (taula 6), amb $p= 0.02$ i 0.01 respectivament.

Taula 7. Taula de contingència P53 IHQ * P53 mutacions

	Mutacions p53		Total
	-	+	
P53 IHQ >20%	27	10	37
<20%	34	62	96
Total	61	72	133

$P= 0.00$

4.3.2. Anàlisi de supervivència

En l'anàlisi de supervivència univariant no es va observar correlació entre sobreexpressió de p53 i supervivència. Aquesta és per tant, una variable que no farem servir en posteriors anàlisis de supervivència. Sí es va trobar però, correlació significativa al restringir l'anàlisi de supervivència global als tumors Dukes C ($p= 0.02$).

4.4. LOH de p53

També vam voler analitzar la pèrdua d'heterozigositat dels tumors. Noranta-i-un (52.9%) tumors van ser homozigots per a l'al·lel guanina (G) en la posició 12138 (exó 4) de p53, 10 (5.8%) van ser homozigots per a l'al·lel citosina (C) i 69 (40.1%) dels casos van ser heterozigots i per tant, informatius. Es va detectar pèrdua d'heterozigositat (LOH) en 44 (63.7%) dels 69 casos informatius: 42 (60.8%) van perdre l'al·lel C (Fig. 13) i 2 (2.9%) van perdre l'al·lel G. A més, en dos casos es va trobar mutació a l'exó 4. No es va trobar cap correlació estadísticament significativa entre els diferents paràmetres clinicopatològics i LOH de p53. Es va observar una major freqüència de mutacions de p53 en els tumors GG (Arg72) que en els CC (Pro72) o GC (taula 8). Sumant els tumors heterozigots als CC es va mantenir la mateixa tendència. No es van observar tendències diferents en les supervivències global i lliure de malaltia entre tumors homozigots i heterozigots, ni dintre d'aquests, entre tumors amb o sense pèrdua al·lèlica.

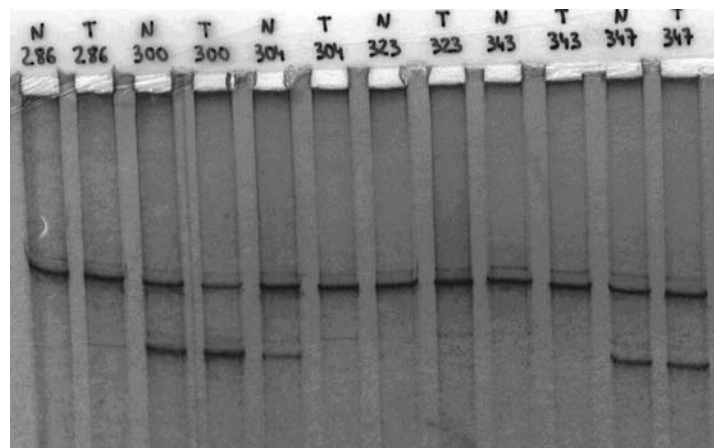


Fig. 13. Gel de SSCP en el que s'observa pèrdua de l'al·lel citosina en el carcinoma amb número d'identificació 304, respecte del seu corresponent epiteli normal.

Taula 8. Taula de contingència GG_GCCC * P53 mut

	P53 mut		Total
	Wt	mut	
GG_GCCC GG	43	60	103
GC/CC	18	10	28
Total	61	70	131

p= 0.03

Tampoc es van observar tendències diferents en les supervivències global i lliure de malaltia entre els tumors amb al.lels codificants per arginina (GG) i els tumors amb al.lel codificant per prolina (GC, CC). Posteriorment vam comparar la supervivència dels carcinomes amb mutacions de p53 que en estudis previs s'han mostrat com inhibidores de p73 amb la dels carcinomes amb altres mutacions. Aquestes mutacions inhibidores de p73 estarien localitzades segons s'ha reportat a la literatura en els codons 173, 175, 176, 179, 220, 242, 245, 248, 249, 273 i 282 de p53. Els tumors amb aquestes mutacions van mostrar una tendència a una pitjor supervivència global (p=0.07) que els tumors amb altres mutacions, que va fer-se significativa en l'anàlisi multivariant (p= 0.04, HR 2.66, IC95% 1.02-6.76). Al repetir aquesta anàlisi en el grup de tumors GG (Arg), els carcinomes amb aquestes mutacions van tendir a una pitjor supervivència global (p= 0.08). En canvi, en el grup de tumors GC-CC no es va observar aquesta tendència. També dins el grup de tumors GG va ser clarament pitjor la supervivència global dels carcinomes amb mutacions "hot spot" de p53 que la dels carcinomes amb mutacions "no hot spot" (p= 0.02). Per últim, dins del grup de tumors GG, aquells amb mutació en L3 i LSH van mostrar pitjor supervivència global que els tumors amb p53 salvatge o amb altres mutacions (p= 0.03)(Fig. 14). Aquesta correlació va ser més clara

al estratificar per Dukes ($p < 0.01$). En canvi, no es va poder observar correlació dins el grup GC-CC.

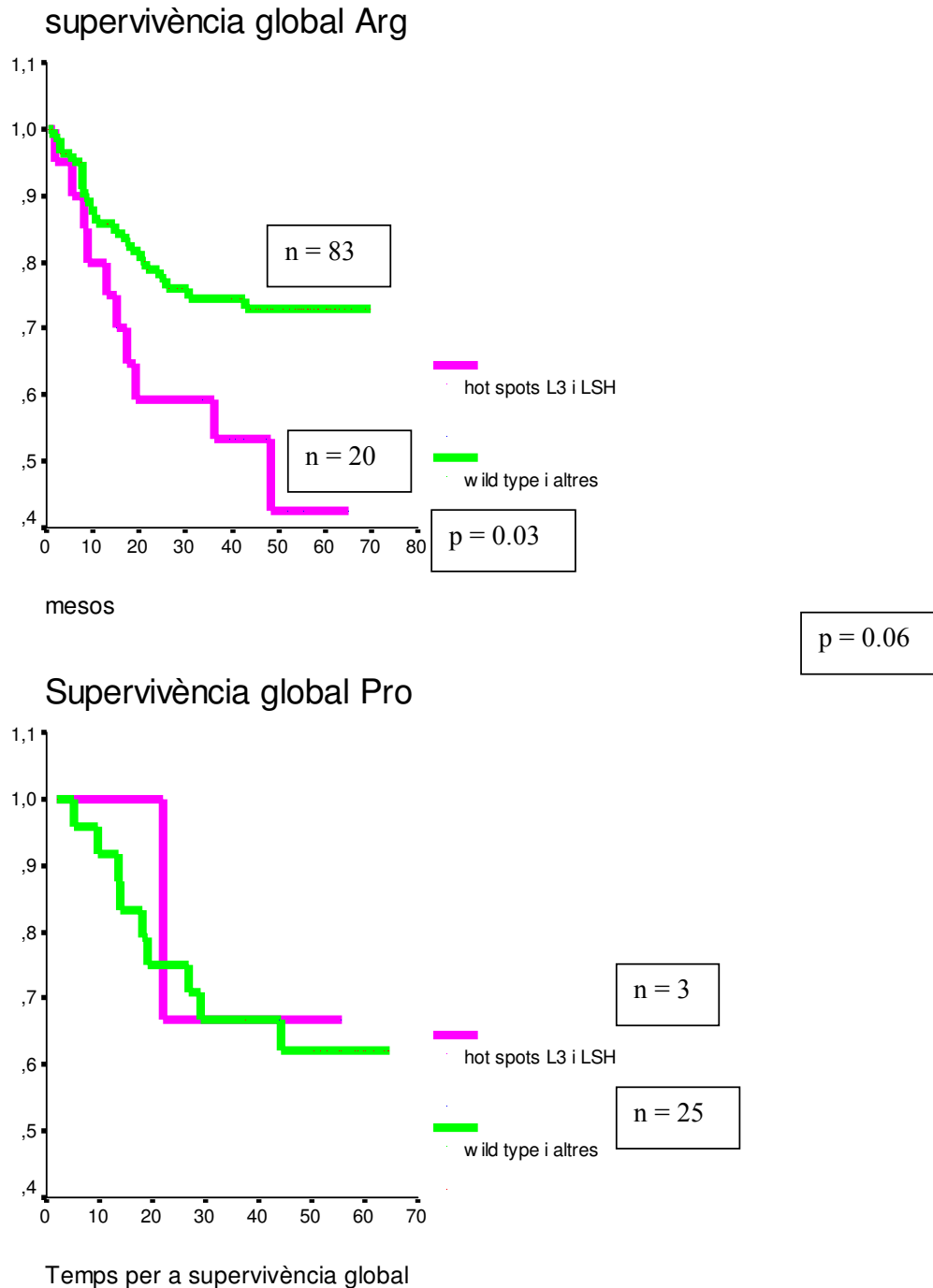


Fig. 14. Corbes de supervivència global dels tumors amb mutacions “hot spot” en L3-loop i en LS α -hèlix comparades amb la dels tumors amb altres mutacions de p53 (valors crus), estratificant segons la presència de l'al·lel Arg o Pro.

4.5. P21

4.5.1. Expressió immunohistoquímica de p21

Amb l'estudi immunohistoquímic de p21 (Fig. 15) sobre seccions histològiques senceres van ser obtinguts resultats vàlids en 177 dels 185 tumors de la sèrie (95.7% dels casos). Mitjançant el "tissue-array" (Fig. 16) es van poder obtenir resultats vàlids de p21 en un 66.5% (123/185) dels casos. Els resultats obtinguts a partir de seccions senceres i dels cilindres hístics ordenats van ser coincidents en 91 casos (73.9%) i divergents en 28 casos (25.2%) (Taula 9).

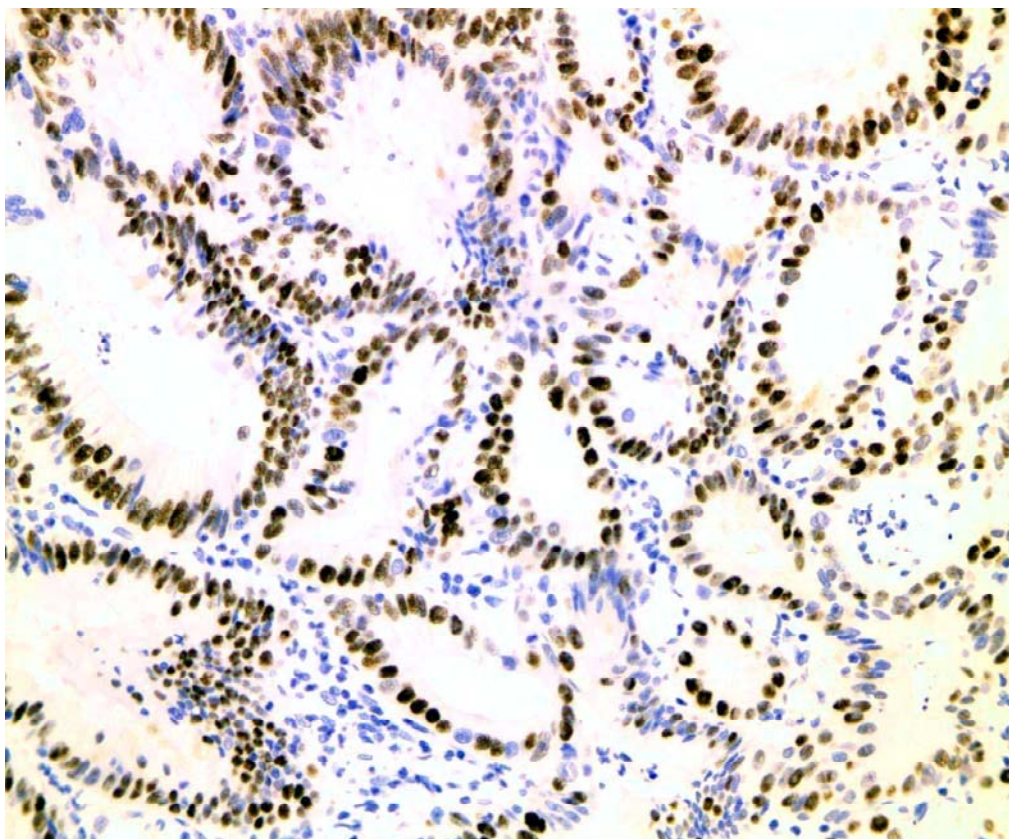


Fig. 15. Imatge a 20x d'un adenocarcinoma colorectal de baix grau amb expressió de p21 en més d'un 10% de nuclis.

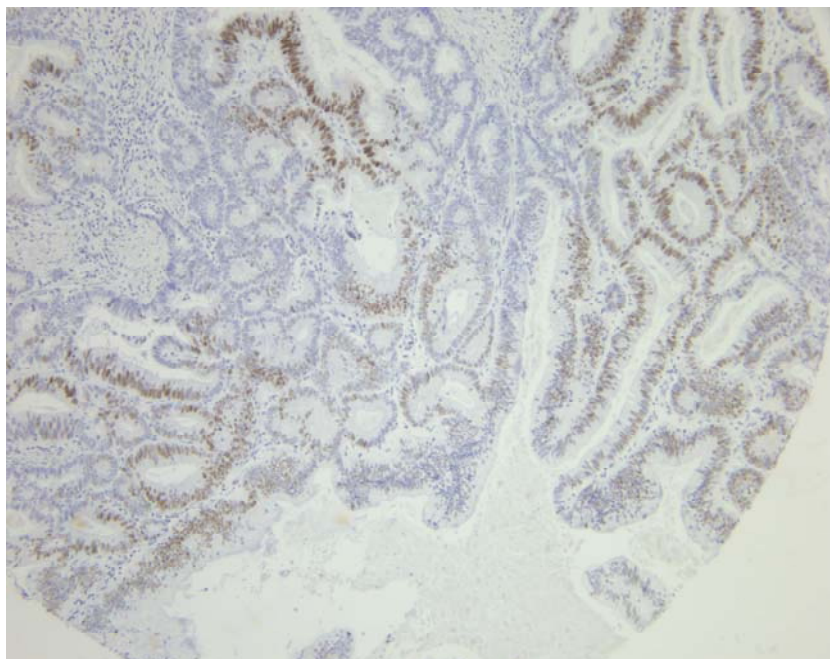


Fig. 16. Imatge a 10x d'una secció del tissue array mostrant un tru-cut d'adenocarcinoma colorectal de baix grau amb expressió de p21 en més d'un 10% de nuclis.

Com pot observar-se en la taula 10, 16 casos avaluats com positius sobre talls sencers van resultar negatius en el "tissue array", mentre que 12 tumors que havien estat considerats negatius en seccions senceres, van resultar positius amb l'arranjament tissular. a efectes de correlacions estadístiques els tumors que presentessin un resultat positiu en 1 dels anàlisis van ser considerats com positius. Van ser considerats negatius per p21 els tumors negatius tant en seccions senceres com en array. Combinant els resultats obtinguts a partir de seccions senceres amb els de l'array, vam disposar de resultats vàlids en 181 dels 185 casos de la sèrie, dels quals 104 (56.2%) van ser negatius per a p21 (taula 9), mentre que en el 41.6% restant (77 de 181) es va considerar que s'expressava la proteïna.

Taula 9. Taula de contingència entre p21 valorada en seccions completes comparada amb p21 valorada mitjançant seccions de l'array tissular.

		P21 array		Total
		< 10%	>10%	
P21 seccions	<10%	65	12	77
	>10%	16	26	42
Total		81	38	119

4.5.2. Correlacions clínicopatològiques

No es va observar correlació entre expressió de p21 i variables clíniques i patològiques com edat i sexe dels pacients, localització del tumor o invasió vascular. Es va observar una tendència amb el grau de diferenciació tumoral ($p= 0.07$), i una correlació clara entre p21 i la T de l'estadiatge TNM ($p< 0.01$) (taula 10). No es va observar correlació entre l'expressió de p21 i l'estadi de Dukes.

Taula 10. Característiques dels pacients i carcinomes amb expressió de p21

	P21 IHC (+)	p21 IHC (-)	χ^2 “p”	HR	IC 95%
Nombre de casos	77/181 (42.5%)	104/181 (57.4%)			
Sexe dels pacients			0.42		
Masculí	47 (41.6%)	66 (58.4%)			
Femení	30 (44.1%)	38 (55.9%)			
Localització del tumor			0.49		
Recte	25 (37.3%)	42 (62.7%)			
Còlon esquerre	30 (47.6%)	33 (52.4%)			
Còlon dret	22 (43.1%)	29 (56.9%)			
Estadi de Dukes			0.47		
A / B1-B2	42 (45.7%)	50 (54.3%)			
C1-C2	27 (42.2%)	37 (57.8%)			
D	8 (32.0%)	17 (68.0%)			
pT			0.003	1	3.38 (1.52-7.50)
pT1+pT2	22 (66.7%)	11 (33.3%)			
pT3+pT4	55 (37.2%)	93 (62.8%)			
Grau histològic			0.25		
Baix grau	69 (43.7%)	89 (56.3%)			
Alt grau	5 (29.4%)	12 (70.6%)			

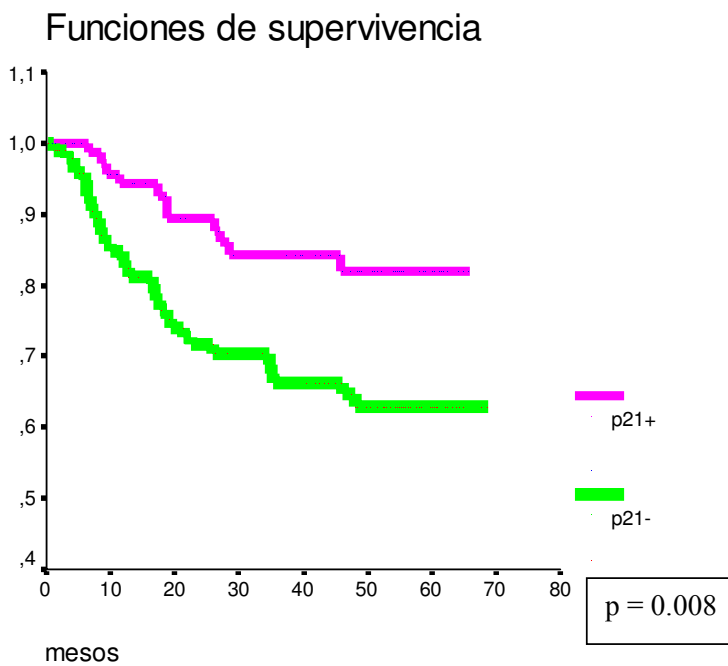
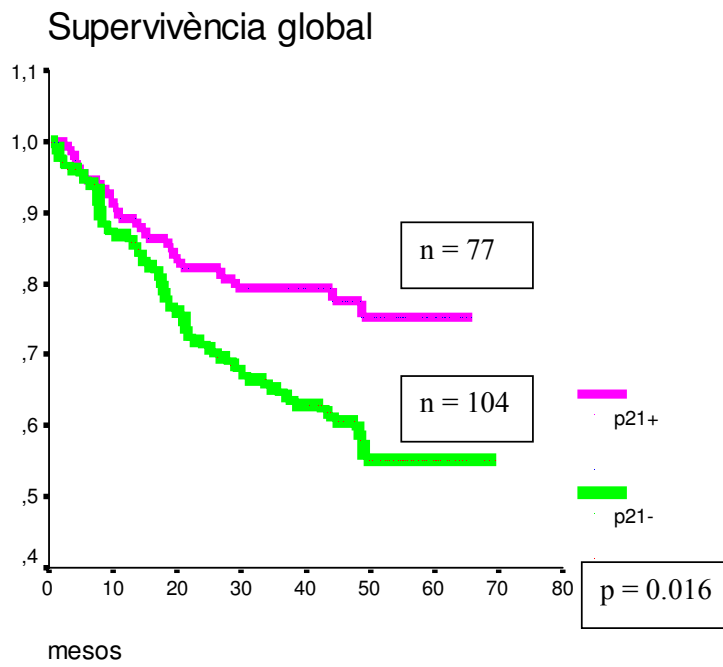


Fig. 17. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels tumors amb elevada expressió de p21 i dels tumors amb pèrdua d'expressió de l'esmentada proteïna (valors crus).

4.5.3. Anàlisi de supervivència amb p21

Amb dades crues, els tumors amb menys d'un 10% de nuclis positius per a p21 van mostrar pitjor supervivència global que els carcinomes amb alta expressió de p21 ($p=0.016$) (Fig. 17). A l'estratificar per l'estadi de Dukes dividit en tres categories, la significació es perd. Els tumors amb expressió de p21 inferior al 10% de nuclis, van mostrar un escurçament de la supervivència lliure de malaltia estadísticament significatiu ($p < 0.01$), mantenint-se el nivell de significació a l'estratificar per edat, sexe, localització del tumor o estadi de Dukes, i també al limitar l'anàlisi als carcinomes Dukes A-B ($p < 0.01$).

4.6. Anàlisi combinada de p53 i p21

Malgrat ser p21 un dels braços efectors de p53, no hi ha una correlació inversa entre expressió de p21 i mutació o sobreexpressió de p53, com ha estat reportat en altres tumors. La sobreexpressió de p53 havia correlacionat amb l'estadi de Dukes. Quan es consideren conjuntament hi ha una major proporció de tumors positius per a p53 i negatius per a p21 en els estadis avançats ($n=45$, 52.9%).

Per a les anàlisis de supervivència univariants (Fig. 18 i 19), considerant simultàniament mutacions de p53 així com la seva ubicació o no en "hot spots" i l'expressió de p21, es va prendre inicialment com a categoria de referència la constituïda pels adenocarcinomes amb p53 salvatge o amb mutació "no hot spot" i que alhora conservaven l'expressió de p21. En l'anàlisi univariant, aquest grup de tumors va mostrar millor supervivència global (log rang 0.07). Aquest nivell de significació es va perdre al estratificar per estadi de Dukes ($p=0.10$). Finalment, els carcinomes amb p53 salvatge o sense mutació en L3-loop i LSH i expressió elevada de p21 van mostrar millor supervivència global que els carcinomes amb qualsevol altre perfil (Fig. 19).

Taula 11. Anàlisi combinada de p53 i p21.

	p53 wt / no hp p21 +	p53 wt / no hp p21 -	p53 hp p21 +	p53 hp p21 -	X ² "p"
Nombre de casos	46/138 (33.3%)	60/138 (43.5%)	13/138 (9.4%)	19/138 (13.8%)	
Sexe dels pacients					
Home	29 (33.7%)	41 (47.7%)	8 (9.3%)	8 (9.3%)	0.23
Dona	17 (32.7%)	19 (36.5%)	5 (9.6%)	11 (21.2%)	
Localització del tumor					
Recte	16 (33.3%)	20 (41.7%)	6 (12.5%)	6 (12.5%)	0.82
Còlon esquerre	16 (35.6%)	19 (42.2%)	2 (4.4%)	8 (17.8%)	
Còlon dret	14 (31.1%)	21 (46.7%)	5 (11.1%)	5 (11.1%)	
Estadi de Dukes					
A/B1-B2	26 (36.1%)	35 (48.6%)	5 (6.9%)	6 (8.3%)	0.22
C1-C2	15 (32.6%)	15 (32.6%)	7 (15.2%)	9 (19.6%)	
D	5 (25.0%)	10 (50.0%)	1 (5.0%)	4 (20.0%)	
Grau histològic					
Baix grau	44 (35.5%)	53 (42.7%)	11 (8.9%)	16 (12.9%)	0.40
Alt grau	2 (14.3%)	7 (50.0%)	2 (14.3%)	3 (21.4%)	

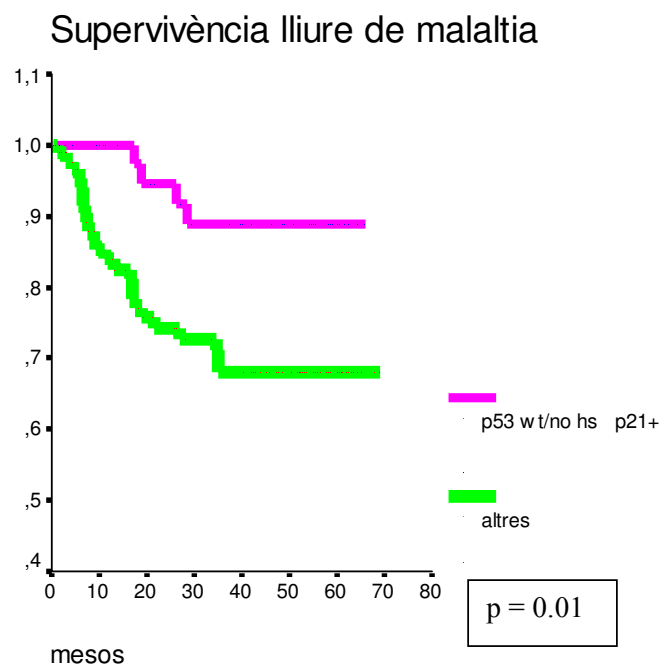
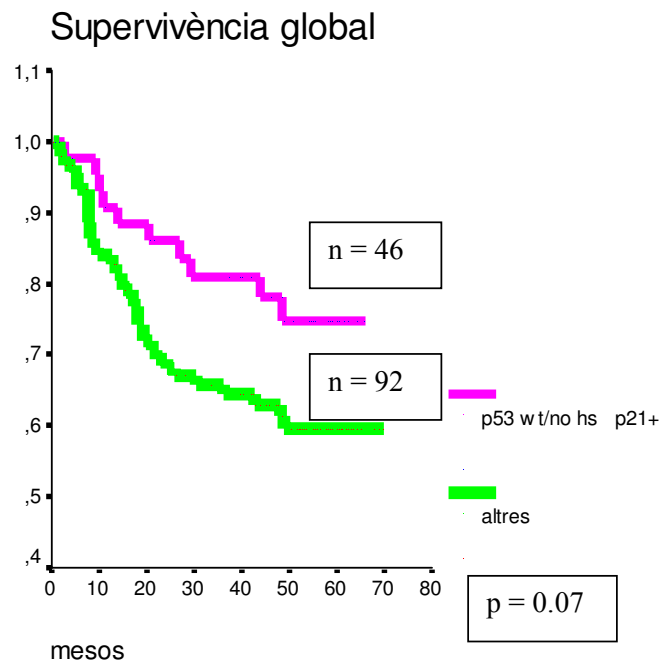


Fig. 18. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels carcinomes amb p53 salvatge o mutada fora de “hot spots” i elevada expressió de p21, comparats amb els carcinomes amb qualsevol altre perfil (dades crues).

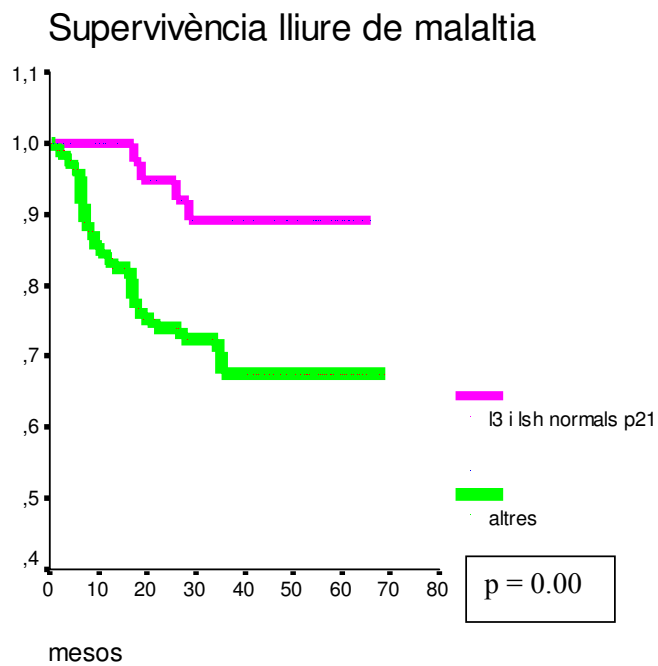
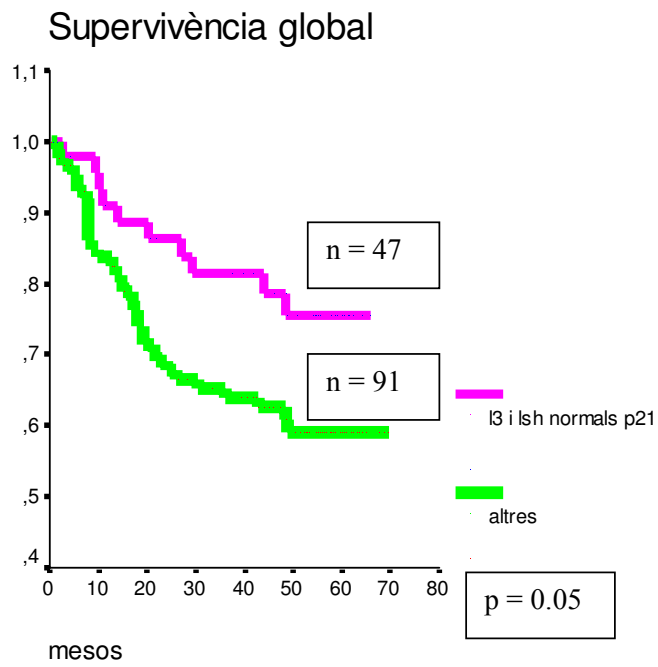


Fig. 19. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels carcinomes amb p53 salvatge o sense mutació en L3-loop i LSH i expressió elevada de p21 comparats amb carcinomes amb qualsevol altre perfil (dades crues).

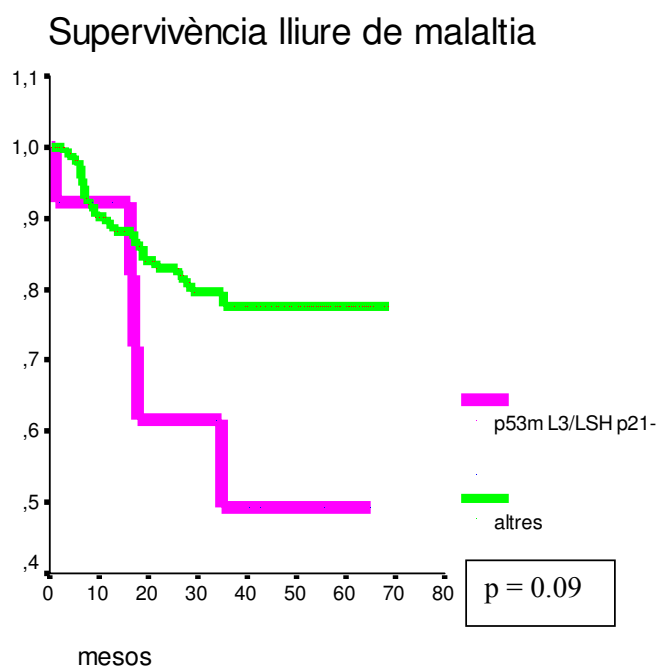
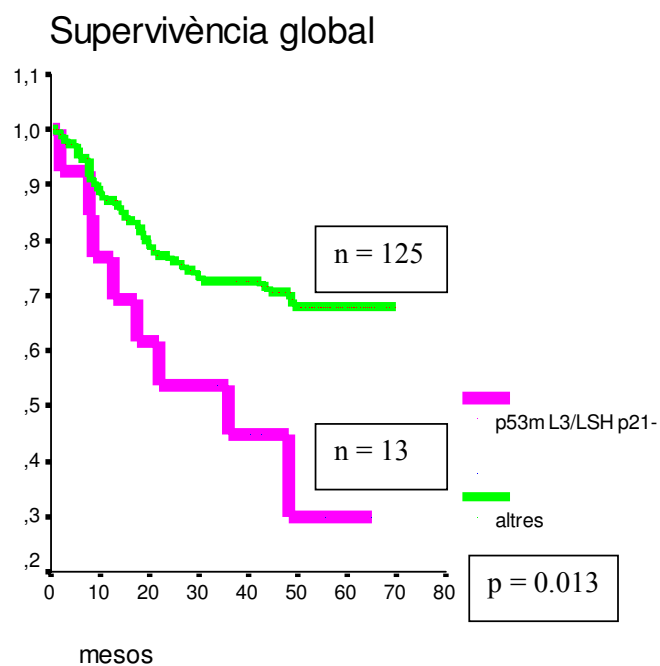


Figura 20. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels tumors amb mutació en L3 o LSH i amb pèrdua de p21, comparats amb els altres perfils. Els resultats són equivalents ajustant per l'estadi de Dukes.

Al estratificar per Dukes el valor del log rang va empitjorar lleugerament fins a 0.09, observant-se que el test conserva millor el seu valor pronòstic en el grup de carcinomes amb estadi de Dukes avançat. Pel que fa a la supervivència lliure de malaltia, els adenocarcinomes inclosos en la categoria de referència (“wild type”/mutació no hot spot p21+) (Fig. 18) van presentar clarament una millor supervivència lliure de malaltia, amb un log rang estadísticament significatiu ($p < 0.01$) que es va mantenir estratificant per edat, sexe, localització o estadi de Dukes. Aquest log rang va ser fins i tot inferior al comparar la supervivència lliure de malaltia dels carcinomes positius per a p21 i amb p53 “wild type” o amb mutació fora de L3 i LSH amb la de tots els demés carcinomes (Fig. 19).

Al repetir les anàlisis univariants agafant com a categoria de referència el perfil teòricament advers, és a dir, els carcinomes amb mutació “hot spot” de p53 i pèrdua d’expressió de p21, aquests tumors van mostrar pitjor supervivència global que tots els altres perfils agrupats, amb $p = 0.01$ (Fig. 20). Aquests resultats van ser idèntics excloent com a “hot spots” les mutacions L2, és a dir, considerant com a categoria de referència els tumors amb mutació de p53 en L3 i LSH i manca de p21. Aquests resultats van ser equivalents al estratificar per Dukes. En canvi, les corbes per a supervivència lliure de malaltia no van ser estadísticament significatives.

4.7. Expressió de p27

Avaluant l’expressió de p27 a partir de seccions histològiques convencionals (Fig. 21) es van obtenir resultats vàlids en 177 dels 185 tumors de la sèrie (95.7% dels casos), mentre que els resultats vàlids obtinguts amb el “tissue-array” (Fig. 21b) van ser 136 (73.5%), dels quals 104 (76.4%) van ser coincidents amb l’anàlisi immunohistoquímica prèvia de p27 (Taula 12). Vint-i-dos tumors que havien estat considerats positius per

p27 en seccions convencionals, van resultar negatius amb la nova tècnica, mentre que 9 casos negatius per p27 en seccions histològiques convencionals, van mostrar elevada expressió d'aquesta proteïna en els cilindres del "tissue-array". De la mateixa manera que amb p21, els casos amb resultat positiu amb almenys una de les dues metodologies van ser considerats positius. Combinant aquests dos mètodes es van obtenir resultats correctes d'immunotinció amb p27 en 178 casos (96.2%), dels quals 135 (73.0%) van ser considerats positius. Tots els resultats es van repetir només amb les dades de seccions completes no havent-hi diferències.



Fig. 21. Intensa expressió de p27 en un adenocarcinoma papil·lar ben diferenciat (20 x)

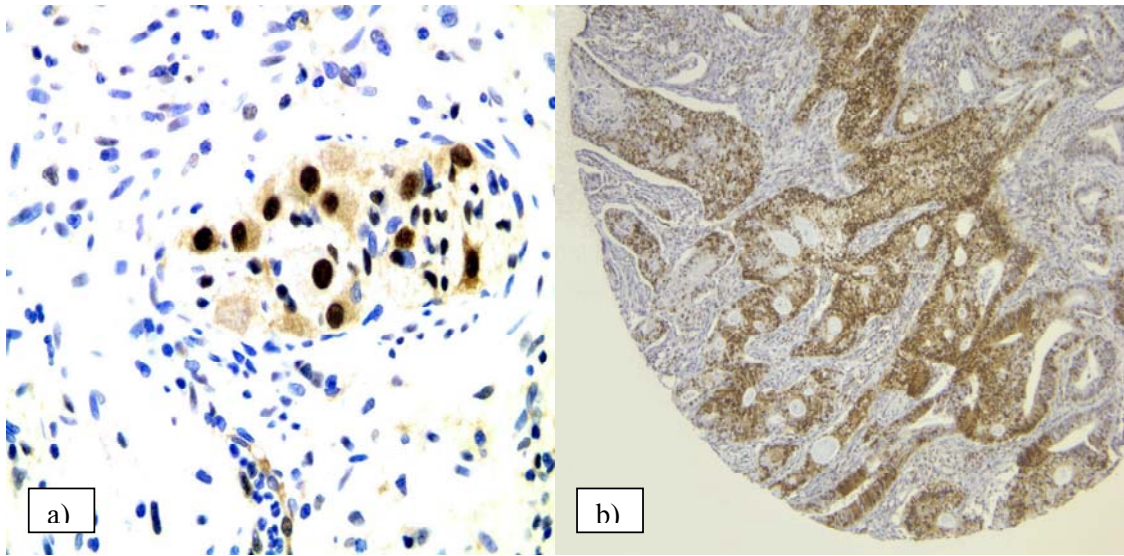


Fig. 22. a) Intensa expressió de p27 en nuclis neuronals del plexe mientèric d'Auerbach, útil com a control intern positiu (40 x).
 b) Imatge a 10x d'una secció del tissue array mostrant un tru-cut d'adenocarcinoma colorectal de baix grau amb elevada expressió de p27.

Taula 12. Taula de contingència entre p27 valorada en seccions completes comparada amb p27 valorada mitjançant seccions de l'array tissular.

		P27 array		Total
		<15%	>15%	
P27 seccions	<15%	27	9	36
	>15%	22	77	99
Total		49	86	135

4.7.1. Correlacions clínico-patològiques de p27

No es va observar correlació entre expressió de p27 i edat dels pacients o localització dels tumors al còlon o recte. Noranta-tres (68.9%) dels adenocarcinomes positius per a p27 van ser diagnosticats en homes (taula 13), mentre 25 (58.1%) dels tumors amb poca

Taula 13. Característiques dels pacients i carcinomes amb expressió de p27

	P27 IHC (+)	p27 IHC (-)	χ^2 “p”	HR	IC95%
Nombre de casos	135/178 (75.8%)	43/178 (24.1%)			
Sexe dels pacients					
Masculí	93 (83.8%)	18 (16.2%)		1	
Femení	42 (62.7%)	25 (37.3%)	0.001	0.32 (0.16 – 0.66)	
Localització del tumor					
Recte	51 (77.3%)	15 (22.7%)	0.75	1	
Còlon esquerre	45 (72.6%)	17 (27.4%)		0.77 (0.34 – 1.73)	
Còlon dret	39 (78.0%)	11 (22.0%)		1.04 (0.43 – 2.52)	
Estadi de Dukes					
A / B1-B2	74 (82.2%)	16 (17.8%)	0.02	1	
C1-C2	47 (74.6%)	16 (25.4%)		0.63 (0.29 – 1.39)	
D	14 (56.0%)	11 (44.0%)		0.27 (0.10 – 0.71)	
Grau histològic					
Baix grau	119 (76.8%)	36 (23.2%)	0.57	1	
Alt grau	12 (70.6%)	5 (29.4%)		0.72 (0.24 – 2.19)	

expressió d'aquesta proteïna afectaven dones ($p < 0.01$). No es va observar correlació entre l'expressió de p27 i la profunditat d'infiltració tumoral. En canvi, l'expressió de p27 va correlacionar amb l'estadi de Dukes ($p = 0.03$; taules 13 i 14). Vint-i-set (62.8%) dels carcinomes amb escassa expressió de p27 tenien un estadi de Dukes alt (C1-C2-D) en el moment del diagnòstic, mentre que 74 (54.8%) dels carcinomes p27 positius era Dukes A o B. Separant els Dukes C dels Dukes D (Taula 16) onze (25.6%) dels 36

carcinomes amb pèrdua d'expressió de p27 tenia metàstasi sincrònica, en front d'un 10.4% de tumors positius per l'esmentada proteïna (p= 0.02).

Taula 14. Correlació entre Dukes i expressió de p27

	Dukes			Total
	A-B1-B2	C1-C2	D	
p27 < 15%	16	16	11	43
p27 > 15%	74	47	14	135
Total	90	63	25	178

P = 0.02

4.8. Correlacions entre p27 i p21

Malgrat la manca de correlació entre la profunditat d'invasió tumoral i la immunoexpressió de p27, l'anàlisi combinat de l'expressió de les dues proteïnes Cip/Kip sí va mostrar correlació estadísticament significativa amb la T del TNM (p= 0.01). Només 39 (26.4%) dels adenocarcinomes T3+T4 conservaven l'expressió de les dues proteïnes; 109 (el 73.6%) restant havia perdut l'expressió d'almenys una d'elles. Trenta-sis (64.3%) dels carcinomes amb elevada expressió tant de p21 com de p27 tenien un baix estadi de Dukes (A-B1-B2). D'altra banda, 69 (77.5%) dels carcinomes amb estadi de Dukes C1, C2 o D havien perdut l'expressió d'alguna de les dues proteïnes. Per tant, malgrat que l'expressió de p21 per sí sola no correlacionava amb l'estadi de Dukes, sí es va observar correlació estadísticament significativa entre l'expressió de p21 i p27 valorades conjuntament i l'estadi de Dukes (p= 0.01).

Taula 15. Característiques dels pacients i carcinomes amb expressió de p27 i p21

	P21 i p27 IHC (+)	χ^2 "p"	HR	IC 95%
Nombre de casos	56/181 (30.9%)			
Sexe dels pacients				
Masculí	40 (35.4%)	0.09		
Femení	16 (23.5%)			
Localització del tumor				
Recte	18 (26.9%)	0.60		
Còlon esquerre	22 (34.9%)			
Còlon dret	16 (31.4%)			
Estadi de Dukes				
A / B1-B2	36 (39.1%)	0.02	1	
C1-C2	17 (26.6%)			0.56 (0.28-1.12)
D	3 (12.0%)			0.21 (0.05-0.76)
Grau histològic				
Baix grau	50 (31.6%)	0.23		
Alt grau	3 (17.6%)			

Separant els Dukes D dels Dukes C, 22 (88%) dels carcinomes amb metàstasis visceralis havien perdut l'expressió d'una de les dues proteïnes, mentre només 3 (12%) dels carcinomes amb metàstasis visceralis mantenien l'expressió tant de p21 com de p27. Aquest test també va ser estadísticament significatiu, amb $p=0.02$ (taula 15).

4.8.1. Anàlisi de supervivència amb les dues proteïnes Cip/Kip

Amb dades crues, els carcinomes amb menys d'un 15% de nuclis positius per p27 van mostrar clarament una pitjor supervivència global en l'anàlisi univariant, essent el resultat estadísticament significatiu ($p= 0.01$). Estratificant per Dukes, no existeix correlació entre immunoreacció per p27 i supervivència global. Excloent de l'anàlisi de supervivència els tumors amb estadi de Dukes C-D i aplicant-lo només als carcinomes Dukes A-B, tampoc es va evidenciar correlació entre expressió de p27 i supervivència global. El nivell d'expressió de p27, contràriament al que succeïa amb el de p21, no va ser un bon marcador de supervivència lliure de malaltia. En les anàlisis de supervivència univariants considerant conjuntament l'expressió de les dues proteïnes Cip/Kip, els carcinomes amb pèrdua d'expressió de p27 o p21 van mostrar clarament una pitjor supervivència global i lliure de malaltia que els carcinomes que van mantenir una elevada expressió de les dues proteïnes. El valor del log rang va ser estadísticament significatiu en ambdós anàlisis, amb $p < 0.01$ (Fig. 23), mantenint-se significatiu en l'anàlisi de supervivència global a l'estratificar per localització del tumor, edat, sexe o estadi de Dukes dividit en dues categories (A-B1-B2/C1-C2-D), però no a l'estratificar per l'estadi de Dukes dividit en tres categories (A-B1-B2/C1-C2/D). En l'anàlisi de supervivència lliure de malaltia, el log rang va mantenir-se significatiu ($p= 0.02$) fins i tot estratificant per l'estadi de Dukes dividit en tres categories.

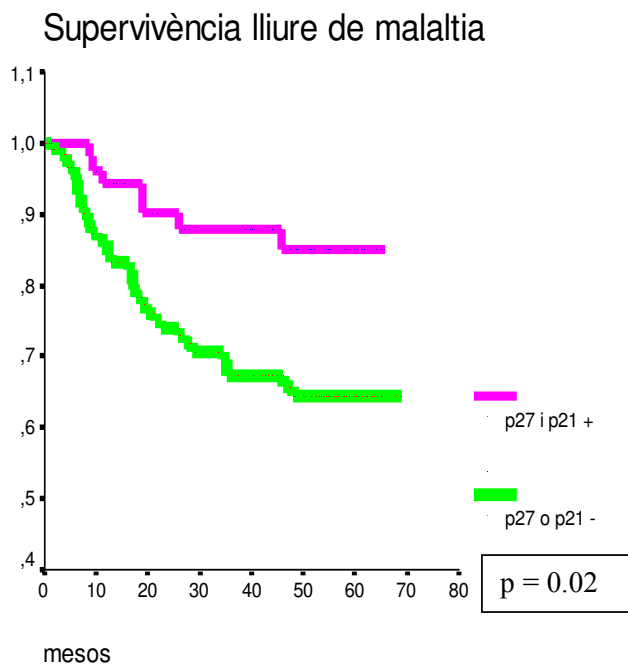
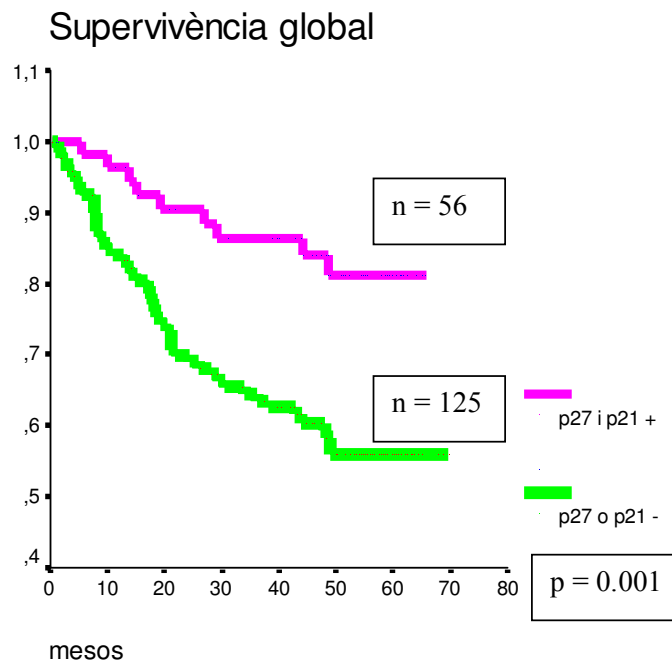


Fig. 23. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels adenocarcinomes amb ambdues proteïnes Cip/Kip positives comparades amb les dels tumors amb pèrdua d'expressió d'alguna d'elles (dades crues).

4.9. Anàlisi de supervivència amb p53 i p27 i p21

En l'anàlisi de supervivència univariant (Fig. 24 i 25), considerant d'una banda l'estatus mutacional de p53 dividit en proteïna salvatge, amb mutació "no hot spot" i amb mutació "hot spot", i de l'altra l'expressió de p27, vam observar que els adenocarcinomes amb p53 salvatge o "no hot spot" i amb expressió elevada de p27 mostraven la millor supervivència global amb dades crues que no es va confirmar després de la estratificació per Dukes ($p=0.13$).

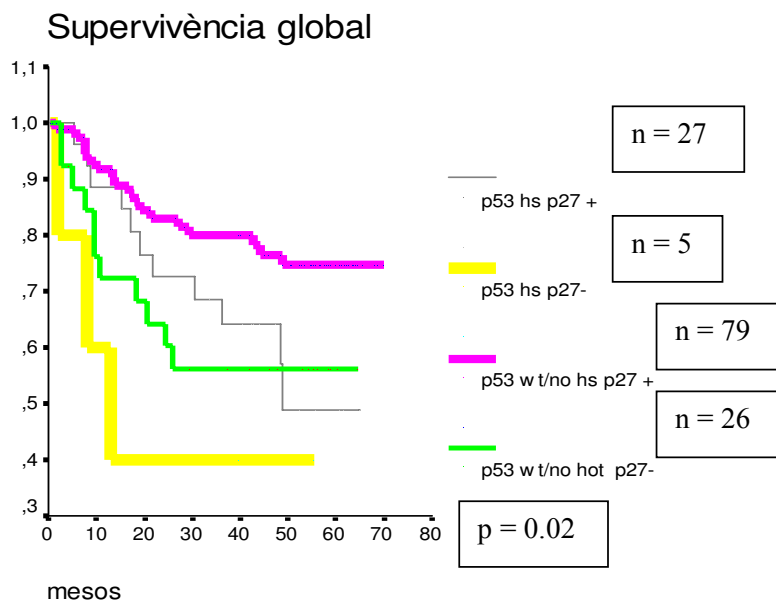


Fig. 24. Corbes de supervivència global dels tumors amb p53 salvatge o "no hot spot" i expressió elevada de p27; dels carcinomes amb p53 salvatge o "no hot spot" negatius per a p27; dels tumors amb mutació "hot spot" de p53 i alta expressió de p27; i dels tumors amb mutació "hot spot" de p53 i poca expressió de p27 (dades crues).

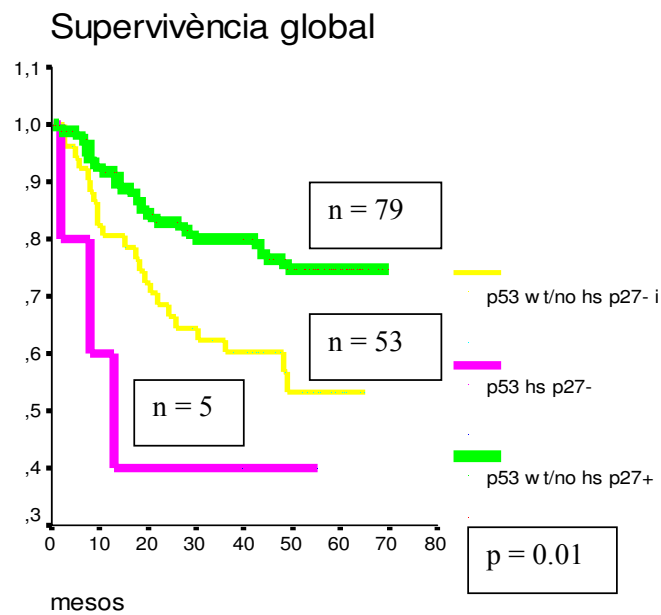


Fig. 25. Corbes de supervivència global dels tumors amb p53 salvatge o “no hot spot” i expressió elevada de p27; dels carcinomes amb p53 salvatge o “no hot spot” negatius per a p27 o amb mutació “hot spot” de p53 i alta expressió de p27; els carcinomes amb mutació “hot spot” de p53 i poca expressió de p27 (dades crues).

Finalment, els carcinomes amb mutació de p53 en els “hot spots” de L3 i LS α -hèlix i pèrdua simultània d’expressió d’alguna de les proteïnes Cip/Kip, van mostrar, en l’anàlisi univariant, tendència a una pitjor supervivència global i lliure de malaltia que els altres fenotips agrupats, amb $p = 0.020$ i 0.009 respectivament (Fig. 26). Aquest test es va mantenir estadísticament significatiu a l’estratificar per Dukes.

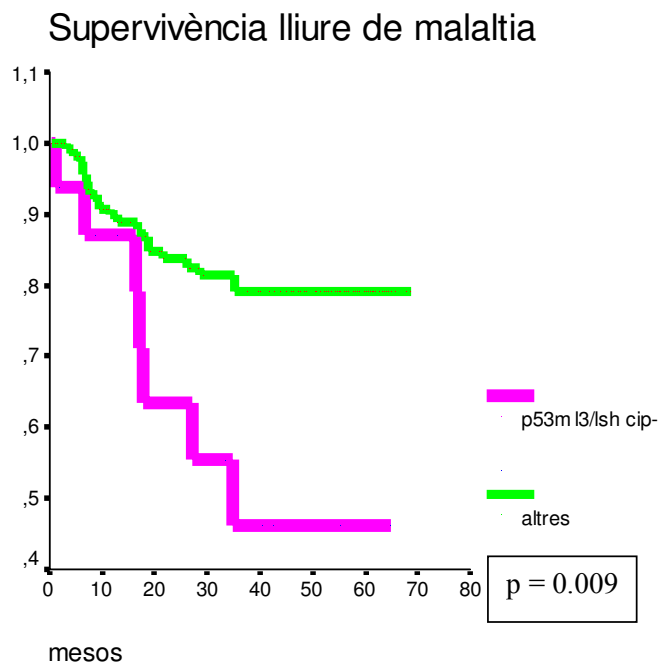
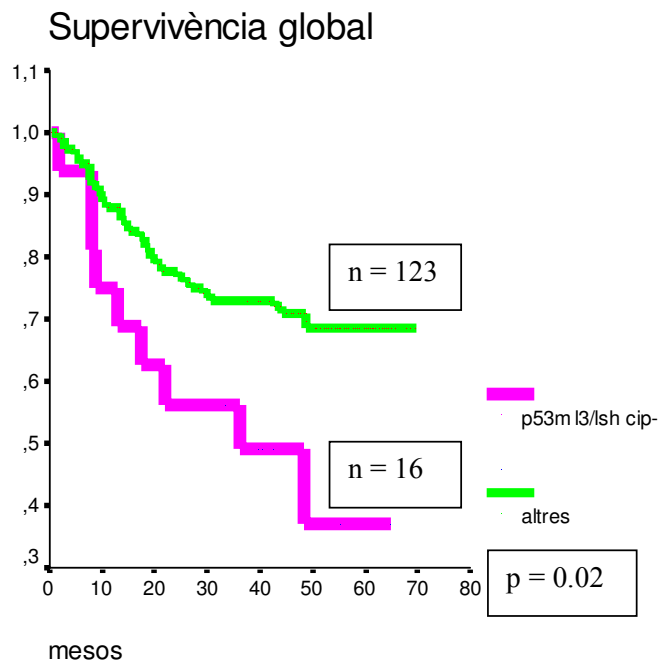


Fig. 26. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels carcinomes amb mutació de p53 en L3 o LSH i pèrdua d'expressió d'alguna de les proteïnes Cip/Kip, comparats amb els altres perfils tumorals (dades crues).

4.10. Ciclina E

4.10.1. Correlacions clínico-patològiques

Es van obtenir resultats vàlids d'expressió de ciclina E en 175 casos (taula 16). La intensitat de tinció va ser gradada -, +, ++. A més, vam avaluar el percentatge de nuclis positius. L'epiteli normal no va mostrar expressió de ciclina E mentre que l'epiteli adenomatós va mostrar una certa positivitat per a aquesta proteïna, però sempre situada al voltant d'un 5% de nuclis positius. D'altra banda, només sis tumors (3.4% de casos) van ser totalment negatius, però vam considerar positius els tumors amb immunoreactivitat en més d'un 12% de nuclis (80, 45.7%). No es va trobar correlació estadísticament significativa entre expressió de ciclina E i variables clínico-patològiques com edat, sexe, localització del tumor, profunditat d'infiltració o estadi de Dukes. En referència a la profunditat d'invasió, el percentatge més elevat de tumors positius per a ciclina E es va observar en el grup de tumors pT1, amb un 66.7% de casos positius, encara que el valor de "n" en aquest grup és massa baix, amb només sis casos. En quant a l'estadi de Dukes (taula 16), i dividint aquest en tres categories (A-B1-B2, C1-C2 i D), es va observar una lleuger predomini de tumors Dukes A-B negatius per a ciclina E (48, 54.5%) i una proporció més clara de tumors Dukes C positius per l'esmentada proteïna (33, 53.2%), però una majoria força clara (n=18, 72%) de carcinomes Dukes D no van expressar ciclina E (p=0.10). En canvi, sí que es va observar una correlació entre expressió de ciclina E i presència de metàstasis viscerals (pM) (p= 0.05). Divuit (72.0%) dels tumors amb metàstasi visceral al moment del diagnòstic expressaven ciclina E en menys del 12% de nuclis tumorals (taula 16).

Es va observar una correlació directa entre el percentatge d'expressió de ciclina E i el de p21 (taula 17)(p= 0.04). Seixanta (63.2%) dels carcinomes amb poca expressió de

ciclina E van ser també negatius per a p21, mentre que 40 (50.6%) dels tumors amb elevada expressió de p21 també van expressar ciclina E.

Taula 16. Característiques dels pacients i carcinomes amb expressió de ciclina E

	Ciclina E IHC (+)	Ciclina E IHC (-)	χ^2 "p"	HR IC95%
Nombre de casos	80/175 (45.7%)	95/175 (57.3%)		
Sexe dels pacients				
Masculí	48 (60.0%)	60 (63.2%)	0.39	
Femení	32 (40.0%)	35 (36.8%)		
Localització del tumor				
Recte	26 (40.0%)	39 (60.0%)	0.49	
Còlon esquerre	31 (50.0%)	31 (50.0%)		
Còlon dret	23 (47.9%)	25 (52.1%)		
Estadi de Dukes				
A / B1-B2	40 (45.5%)	48 (54.5%)	0.10	
C1-C2	33 (53.2%)	29 (46.8%)		
D	7 (28.0%)	18 (72.0%)		
pM				
pM0	73 (91.3%)	77 (81.1%)	0.05	1
pM1	7 (8.8%)	18 (18.9%)		
Grau histològic				
Baix grau	119 (76.8%)	36 (23.2%)	0.04	1
Alt grau	12 (70.6%)	5 (29.4%)		

Taula 17. Taula de contingència entre expressió de ciclina E i expressió de p21.

	Ciclina E		Total
	<12%	>12%	
P21 < 10%	60	39	99
>10%	35	40	75
Total	95	79	174

p = 0.04

4.10.2. Anàlisi univariant de supervivència per a ciclina E

No es va observar correlació entre intensitat d'expressió de ciclina E i supervivència global o lliure de malaltia. Els carcinomes amb expressió de ciclina E en més d'un 12% de nuclis tumorals van mostrar millor supervivència global que aquells amb un percentatge inferior de nuclis immunoreactius ($p < 0.01$), però aquest nivell de significació es va perdre al estratificar per Dukes ($p = 0.11$) (Fig. 27).

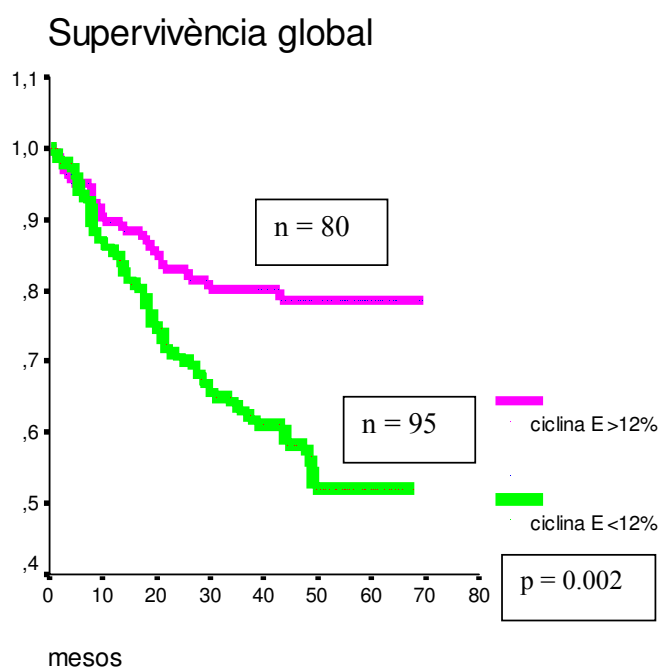


Fig. 27. Supervivència global dels tumors amb elevada expressió de ciclina E comparada amb la dels tumors amb poca expressió de ciclina E.

A continuació vam avaluar conjuntament percentatge de nuclis positius i intensitat d'expressió i vam dividir els tumors en tres categories: Carcinomes amb intensitat d'expressió ++ o +++, carcinomes amb intensitat + en més d'un 12% de nuclis, i carcinomes amb menys d'un 12% de nuclis positius. En l'anàlisi univariant per a supervivència global, els carcinomes amb expressió dèbil de ciclina E en més d'un 12% de nuclis van mostrar la millor supervivència, els carcinomes amb expressió molt

intensa (++, +++) van mostrar una supervivència força pitjor, i els carcinomes del grup amb expressió nul·la o dèbil en menys del 12% de nuclis van mostrar la pitjor supervivència ($p < 0.01$) (Fig. 28). En conjunt el grup de tumors amb expressió dèbil en més d'un 12% de nuclis va mostrar una millor supervivència global, ($p < 0.01$, 0.02 estratificant per Dukes) (Fig. 29).

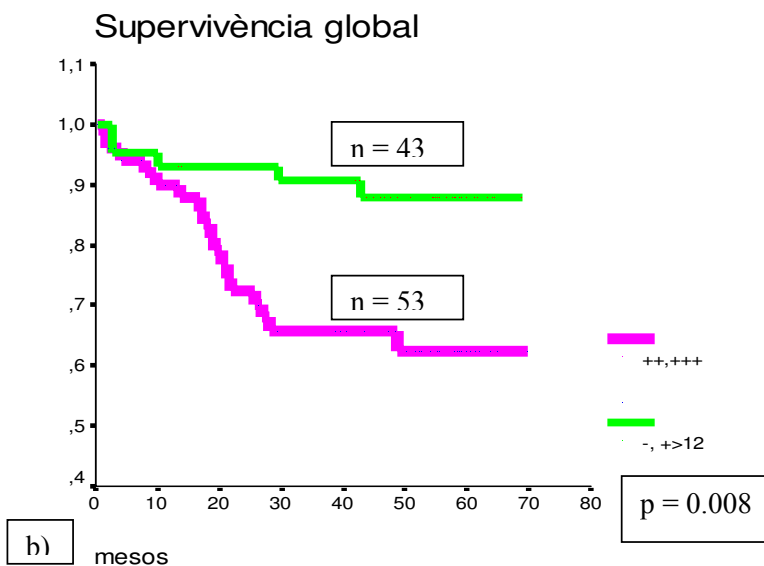
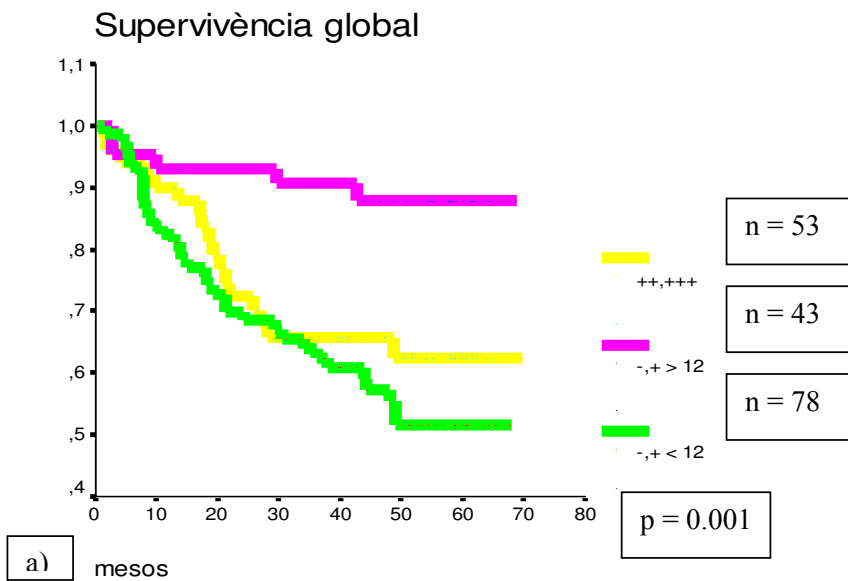


Fig. 28. a) Corbes de supervivència global dels carcinomes amb intensitat d'expressió ++ o +++, dels carcinomes amb intensitat + en més d'un 12% de nuclis, i carcinomes totalment negatius o + en menys d'un 12% de nuclis; b) El mateix test suprimint els cassos amb expressió nul·la o molt dèbil (dades crues).

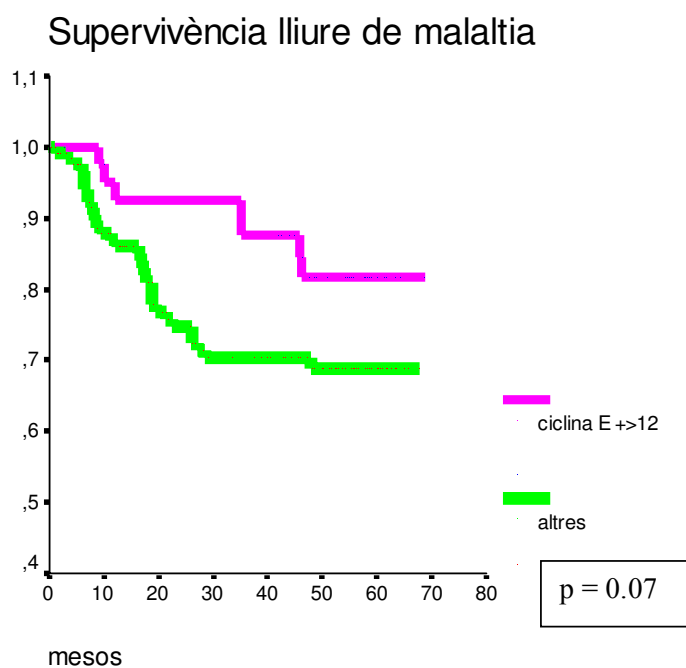
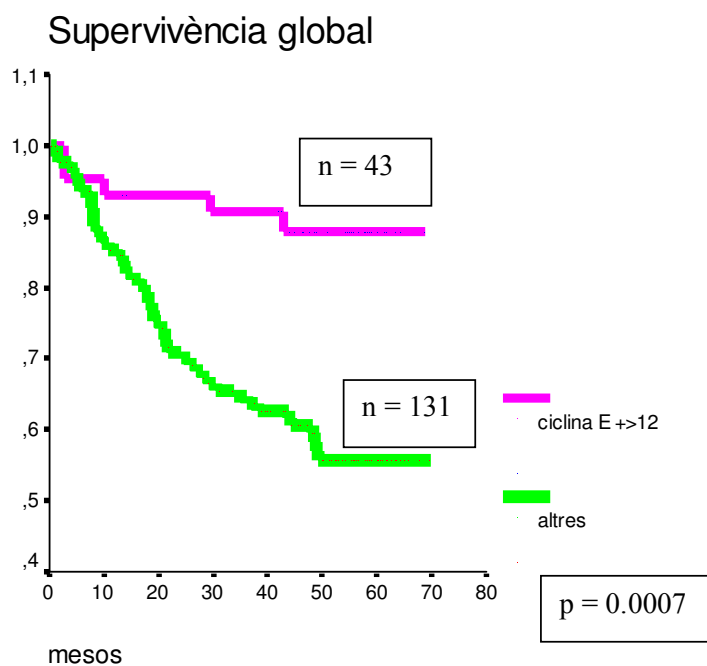


Fig. 29. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels carcinomes amb expressió dèbil (+) de ciclina E en més d'un 12% de nuclis comparats amb els altres perfils d'expressió de ciclina E (dades crues).

4.10.3. Anàlisi de supervivència univariant amb ciclina E i les proteïnes Cip/Kip

Considerant conjuntament l'expressió de p21 i p27 tal i com s'ha explicat anteriorment, així com el percentatge d'expressió nuclear de ciclina E, els carcinomes amb expressió elevada d'ambdues proteïnes Cip/Kip i que alhora expressaven ciclina E en més del 12% de nuclis van mostrar la millor supervivència global, mentre que els carcinomes amb pitjor supervivència van ser els que havien perdut l'expressió de p21 o p27 i a més expressaven ciclina E en menys del 12% de nuclis ($p < 0,01$). Els resultats van ser semblants pel que respecta a supervivència lliure de malaltia però sense arribar a la significació estadística ($p = 0.058$) (Fig. 30 i 31).

A continuació vam prendre en consideració el percentatge i intensitat d'expressió de ciclina E. Prescindint en un primer moment dels tumors amb expressió nul·la (-) o molt dèbil ($+ < 12\%$) de ciclina E, els carcinomes amb expressió dèbil (+) de ciclina E en més d'un 12% de nuclis i que alhora conservaven una expressió elevada tant de p21 com de p27 van mostrar la millor supervivència global ($p = 0.02$), mentre que el grup amb pitjor supervivència global va ser el dels tumors amb expressió intensa de ciclina E (++, +++) i pèrdua d'expressió d'alguna de les dues proteïnes cip/kip (Fig. 32). La supervivència global i lliure de malaltia dels carcinomes amb expressió intensa (++, +++) de ciclina E i pèrdua d'expressió d'alguna de les proteïnes inhibidores Cip/Kip va ser significativament pitjor que la dels altres carcinomes agrupats ($p < 0.01$ i $p = 0.01$ respectivament) (Fig. 33).

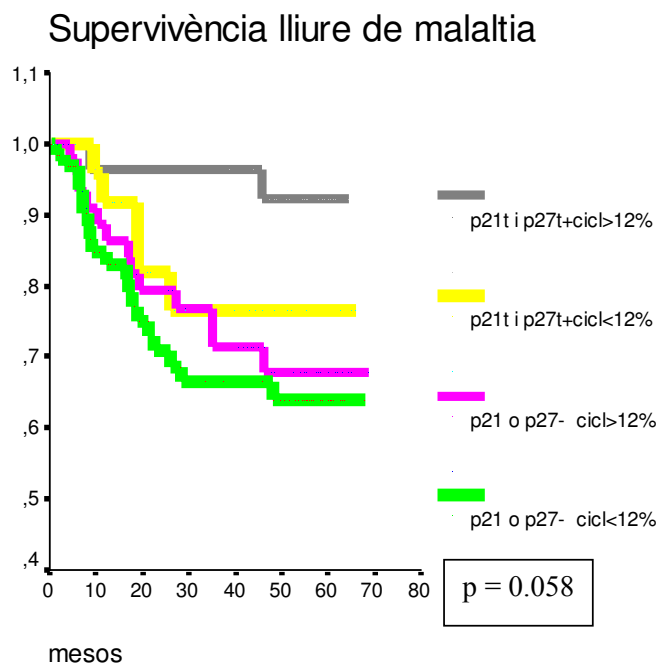
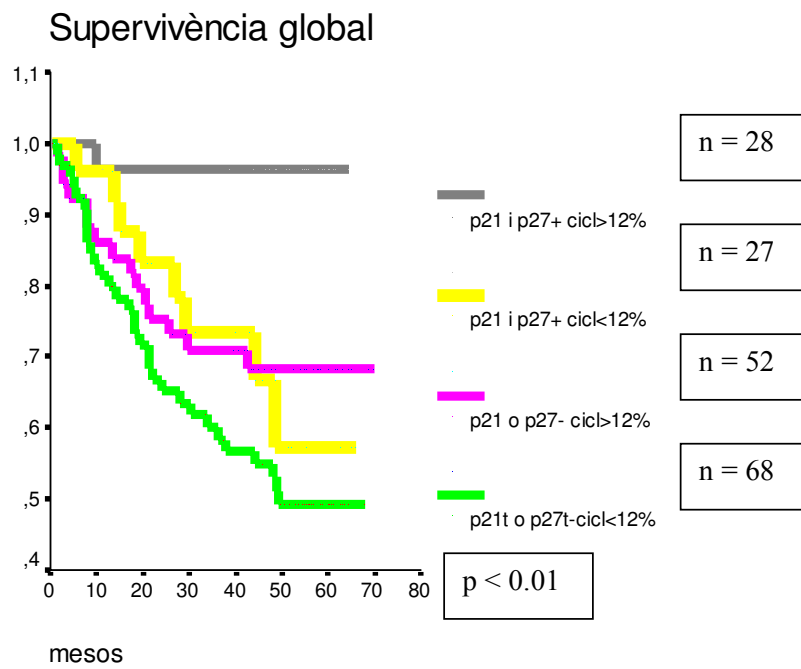


Fig. 30. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia per a p21, p27 i percentatge d'expressió nuclear de ciclina E.

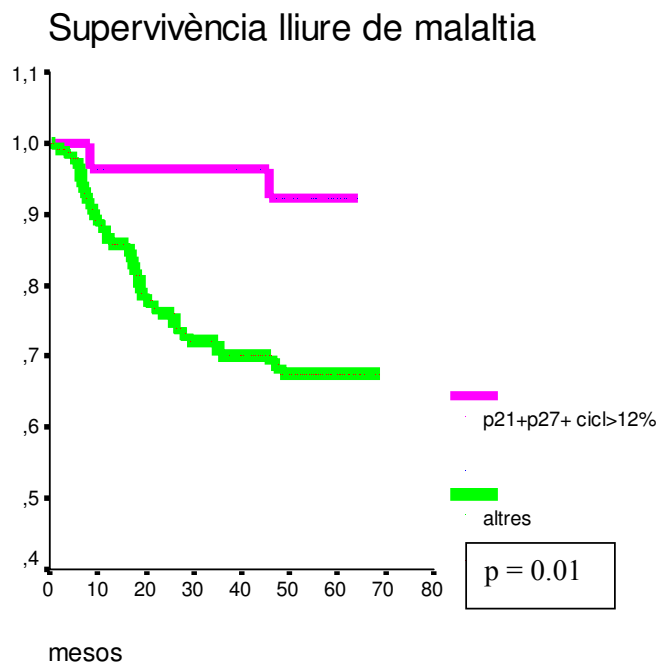
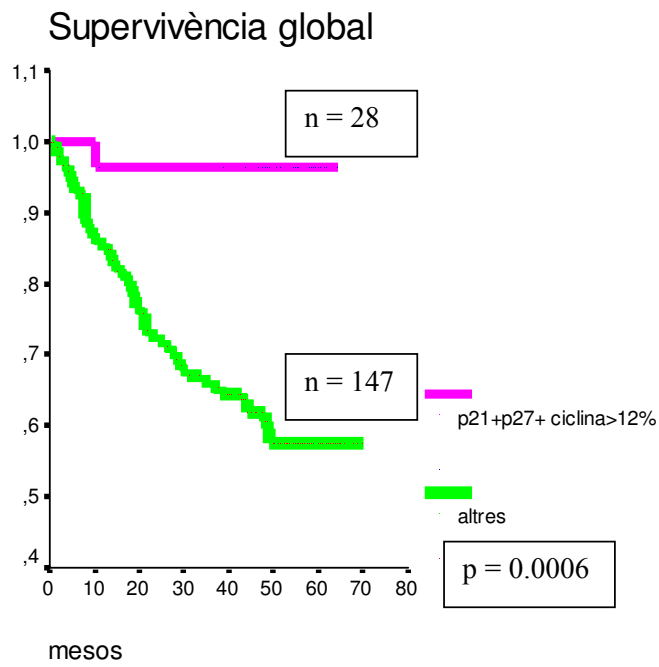


Fig. 31. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia comparant els tumors positius per les dues proteïnes Cip/Kip i amb expressió de ciclina E en més del 12% de nuclis amb els altres grups de tumors (dades crues).

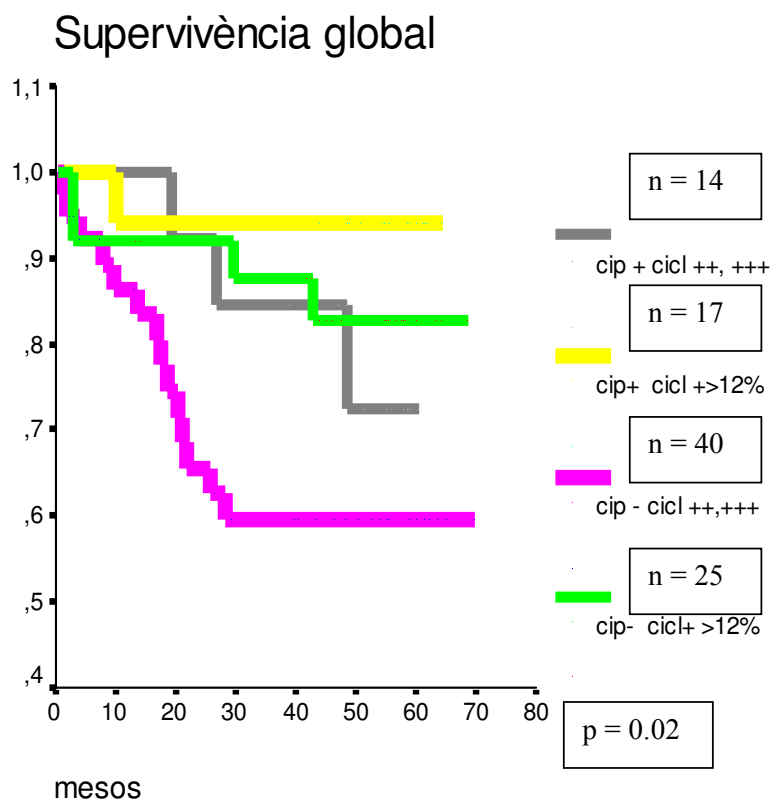


Fig. 32. Corbes de supervivència global per a p21, p27 i expressió de ciclina E avaluada tenint en compte intensitat i percentatge de immuntinció (tumors amb expressió de ciclina E nul.la o molt dèbil exclosos).

Finalment, incloent en aquestes darreres anàlisis els carcinomes amb expressió nul.la o molt dèbil de ciclina E, vam observar que aquests tumors, quan a més havien perdut l'expressió d'alguna de les proteïnes Cip/Kip, eren els que presentaven pitjor supervivència global ($p < 0.01$) (fig. 34).

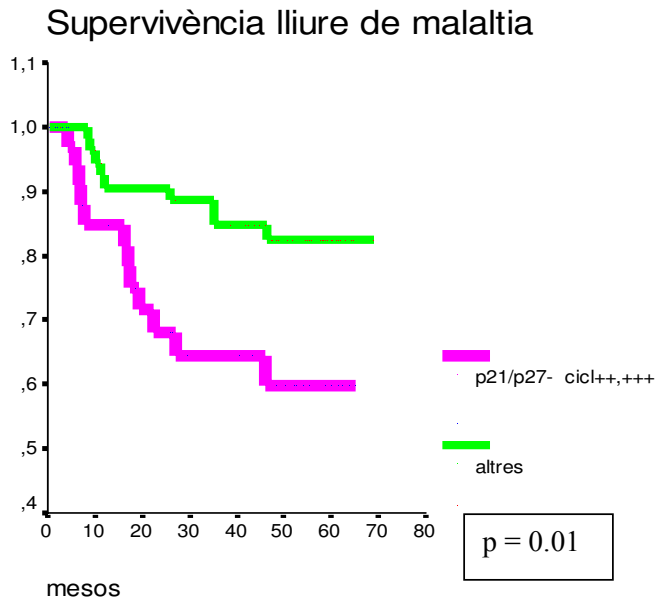
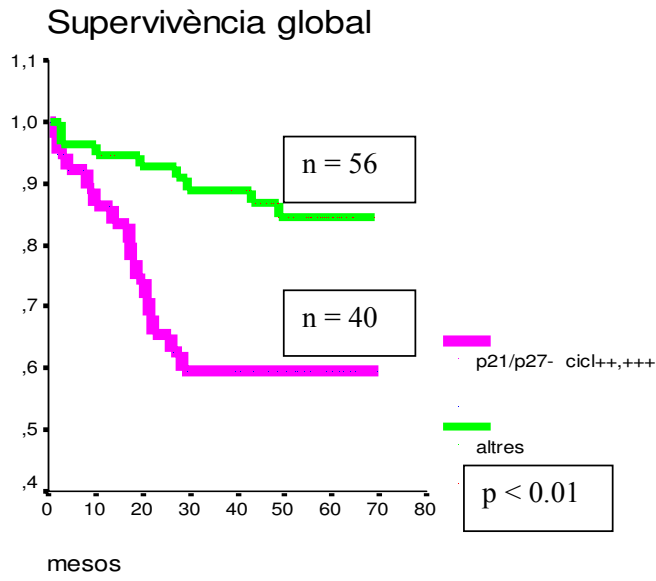


Fig. 33. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels tumors positius per a les dues proteïnes Cip/Kip i amb expressió intensa de ciclina E comparats amb els altres grups de tumors.

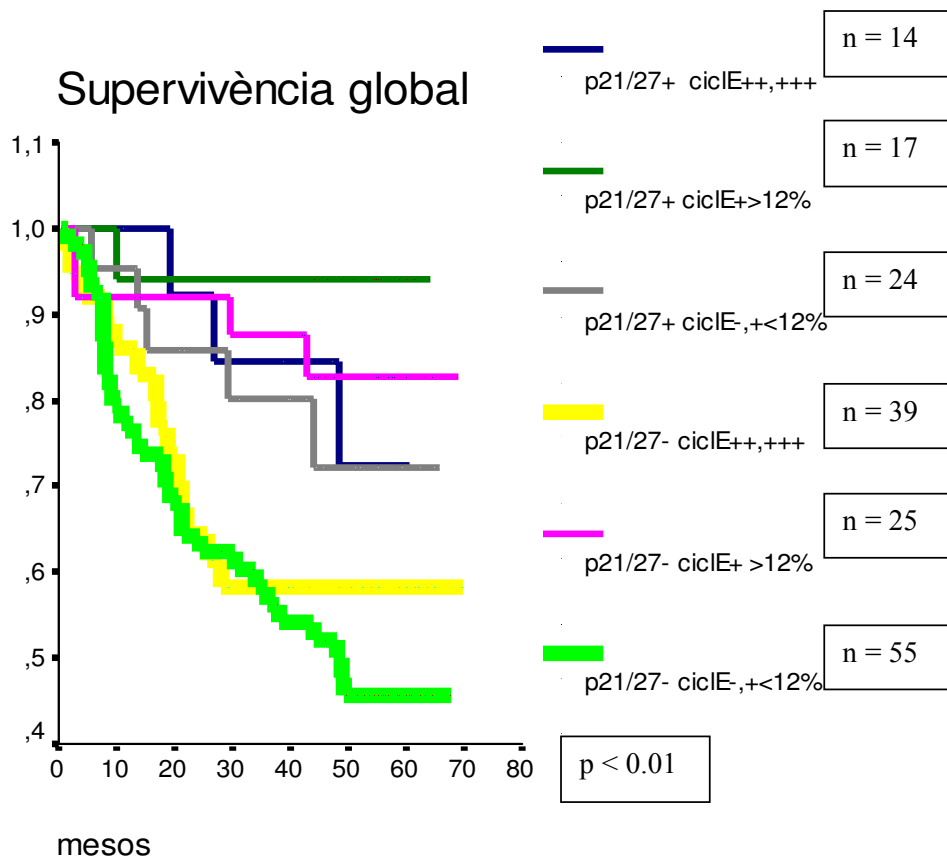


Fig. 34. Corbes de supervivència global per a p21, p27 i expressió de ciclina E avaluada tenint en compte intensitat i percentatge de immunotinció (tots els grups inclosos).

Els carcinomes amb pèrdua d'expressió de p21 o p27 i amb expressió molt dèbil (-, + < 12%) o molt intensa (++,+++) de ciclina E, van mostrar agrupats, pitjor supervivència global i pitjor supervivència lliure de malaltia que tots els altres perfils immunohistoquímics junts (fig. 35).

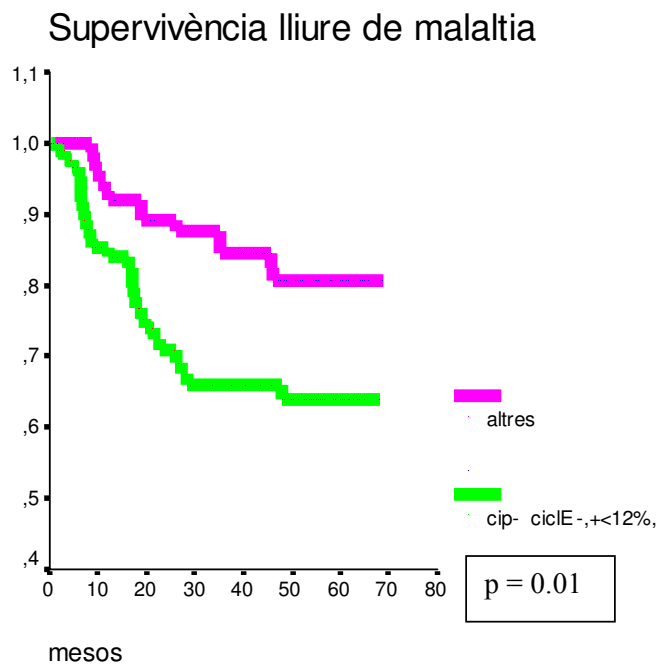
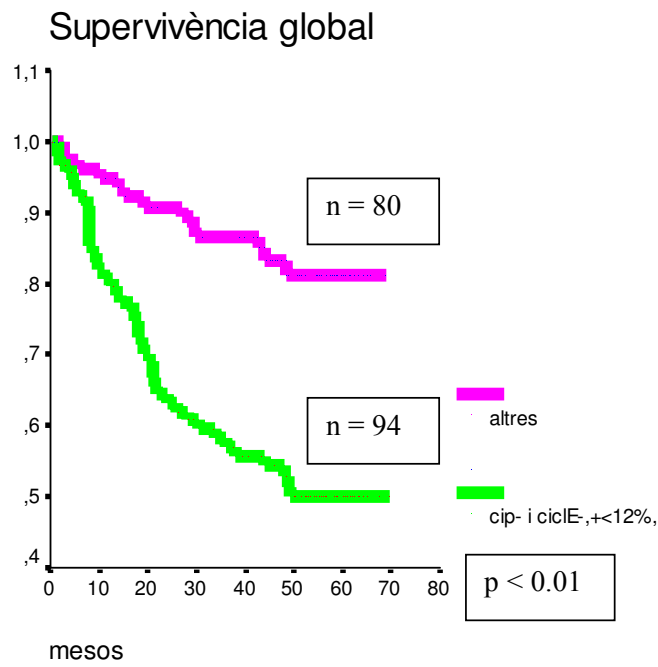


Fig 35. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia pels carcinomes amb pèrdua d'expressió de p21 o p27 i expressió molt dèbil o molt intensa de ciclina E, comparats amb tots els altres carcinomes (dades crues).

4.10.4. Anàlisi de supervivència univariant amb ciclina E i p53

Avaluant ciclina E segons el percentatge d'expressió nuclear, vam observar en el grup de tumors amb expressió de ciclina E inferior a un 12% de nuclis, una clara millor supervivència global i lliure de malaltia entre els tumors amb p53 "wild type" o amb mutació "no hot spot" que en aquells amb mutació en un "hot spot", tot i que aquesta diferència, amb $p= 0.10$ i $p= 0.06$ respectivament, no arribava a ser estadísticament significativa (fig. 36). Avaluant ciclina E segons les tres categories que hem vingut utilitzant al combinar percentatge de nuclis positius amb intensitat d'expressió, vam observar que, entre els carcinomes amb expressió intensa de ciclina E tenien pitjor supervivència global els tumors amb mutació "hot spot" de p53 que els que tenien p53 "wild type" o amb mutació "no hot spot", encara que aquest resultat tampoc no va ser estadísticament significatiu ($p= 0.17$). Ni entre els carcinomes amb expressió dèbil ($>12\%$) de ciclina E, ni entre aquells amb expressió nul.la o molt dèbil de la mateixa proteïna no es van observar diferències dependents de l'estat mutacional de p53, així com tampoc no es van observar agrupant aquest segon grup de carcinomes amb els que expressaven intensament ciclina E.

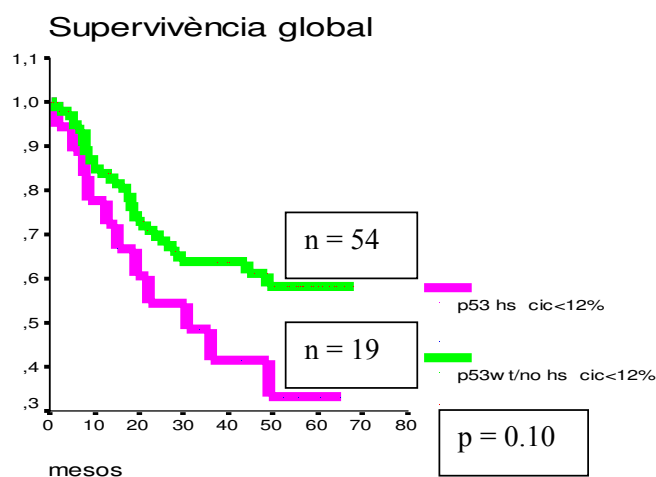


Fig 36. Corbes de supervivència global dels tumors amb ciclina E < 12% de nuclis positius en funció de l'estat mutacional de p53.

4.11. Anàlisi de supervivència multivariant

4.11.1 Supervivència Global

Respecte a la supervivència global, en l'anàlisi de supervivència multivariant (taula 18), en el qual es va introduir l'estadi de Dukes, els carcinomes amb mutació de p53 en L3 o LSH van mostrar una pitjor supervivència global mentre que p21 sola va perdre la significació. En canvi, l'anàlisi combinat de mutació de p53 en L3 i LSH i pèrdua d'expressió de p21, es va mostrar informatiu ($p < 0.01$). Finalment, vam prendre com a categoria de referència els adenocarcinomes amb mutació de p53 en L3 i LSH i pèrdua d'expressió de p21 i p27. Al comparar-los contra tots els altres perfils agrupats van mostrar clarament una pitjor supervivència global, amb $p < 0.01$.

L'anàlisi multivariant per a supervivència global va reforçar la tendència observada en l'univariant pel que fa al valor pronòstic de les mutacions de p53 que afecten la funcionalitat de p73 comparades amb les altres mutacions de p53. Els carcinomes amb aquestes mutacions van mostrar pitjor supervivència global que els carcinomes amb altres mutacions, amb $p = 0.04$, un HR de 2.66, i un IC 95% de 1.02-6.76. Finalment, dins el grup de tumors GG, els tumors amb mutacions en L3 i LSH van mostrar pitjor supervivència global que els tumors amb p53 salvatge o amb altres mutacions, amb $p = 0.004$, un HR de 3.33, i un IC 95% de 1.45-7.62.

En l'anàlisi multivariant per a supervivència global amb ciclina E, valorant únicament el percentatge d'expressió nuclear, es va perdre el nivell de significació estadística al comparar els carcinomes amb expressió de ciclina E en més d'un 12% de nuclis, amb els carcinomes amb expressió de l'esmentada proteïna inferior a aquest percentatge, amb $p = 0.14$, un HR de 0.62 i un interval de confiança al 95% de 0.33-1.17. Valorant també la intensitat d'expressió, els tumors amb expressió dèbil de ciclina E en més d'un

12% de nuclis van mostrar millor supervivència global que els carcinomes amb expressió nul.la (-, + < 12%) o molt intensa (++,+++)
(p= 0.03).

Considerant l'expressió de p21 i p27, i el percentatge d'expressió nuclear de ciclina E, el grup de carcinomes positius per ambdues proteïnes Cip/Kip i que alhora expressaven ciclina E en més del 12% de nuclis, es va mostrar en l'anàlisi multivariant per a supervivència global com un factor protector estadísticament significatiu (p= 0.02).

4.11.2. Supervivència lliure de malaltia

En l'anàlisi multivariant de supervivència lliure de malaltia (taula 18), la pèrdua d'expressió de **p21** es va mostrar com un marcador pronòstic independent, amb una p = 0.01. El grup de tumors amb mutacions en L3 o LSH de **p53** va mostrar també una pitjor supervivència lliure de malaltia (p= 0.05). El perfil d'adenocarcinomes amb p53 salvatge o amb mutació "no hot spot" i amb expressió simultània de p21 es va mantenir com a predictor independent de millor supervivència lliure de malaltia, amb una p= 0.01. Els carcinomes amb mutació de p53 en L3 i LSH i pèrdua d'expressió de p21 i p27, es van mostrar com un factor de mal pronòstic (p= 0.03).

En l'anàlisi multivariant de supervivència lliure de malaltia, l'expressió de les dues proteïnes Cip/Kip va mantenir un cert grau de significació estadística, amb p= 0.02.

Valorant conjuntament la intensitat i el percentatge de nuclis, i suprimint el grup de tumors amb expressió quasi nul.la (-, + < 12%), les diferències entre els carcinomes amb expressió dèbil de ciclina E en més d'un 12% de nuclis i els carcinomes amb expressió molt intensa (++, +++
) van fregar la significació estadística, amb p= 0.06, mostrant-se l'expressió intensa de ciclina E respecte a l'expressió dèbil en més d'un 12% com un factor de risc amb un HR de 2.57 i un IC al 95% de 0.93-7.10.

Considerant l'expressió de p21 i p27, i el percentatge d'expressió nuclear de ciclina E, el grup de carcinomes positius per ambdues proteïnes Cip/Kip i que alhora expressaven ciclina E en més del 12% de nuclis, es va mostrar com un grup amb comportament favorable en l'anàlisi de supervivència lliure de malaltia, amb $p=0.03$.

En l'anàlisi multivariant, els carcinomes amb pèrdua d'expressió de p21 o p27 i amb expressió molt dèbil (-, + < 12%) o molt intensa (++,+++) de ciclina E, van mostrar al agrupar-los pitjor supervivència lliure de malaltia, amb $p=0.03$ (Fig. 37).

Taula 18. Anàlisi multivariant per a supervivència global i lliure de malaltia.

Variable	Supervivència global	Supervivència lliure de malaltia
P53 wt // mut	P = 0.43 HR 1.27 (0.69 - 2.33)	P = 0.16 HR 1.77 (0.79 - 3.94)
P53 mutació no hot spot // mut hot spot	P = 0.02 HR 3.06 (1.19 - 7.83)	P = 0.18 HR 1.86 (0.73 - 4.72)
P53 wt-no hot spot // mut hot spot	P = 0.11 HR 1.70 (0.88 - 3.27)	P = 0.06 HR 2.09 (0.96 - 4.55)
P53 wt-mut noL3-LSH // mut L3-LSH	P = 0.005 HR 2.81 (1.36 - 5.78)	P = 0.05 HR 2.25 (1.00 - 5.10)
P21-	P = 0.13 HR 1.54 (0.87 - 2.74)	P = 0.01 HR 2.38 (1.19 - 4.75)
P53 mut L3-LSH p21- // altres	P = 0.004 HR 3.27 (1.47 - 7.26)	P = 0.09 HR 2.29 (0.86 - 6.10)
P21+ i p27+ // p21 o p27-	P = 0.13 HR 0.56 (0.27 - 1.18)	P = 0.02 HR 0.38 (0.17 - 0.88)
P53 mut L3-LSH p21 o p27- // altres	P = 0.007 HR 2.93 (1.34 - 6.39)	P = 0.03 HR 2.66 (1.10 - 6.43)
Ciclina E >12% // <12%	P = 0.14 HR 0.62 (0.33 - 1.17)	P = 0.09 HR 0.57 (0.29 - 1.10)
Ciclina E +>12% // -□+<12%□++□+++	P = 0.03 HR 0.36 (0.14 - 0.93)	P = 0.09 HR 0.49 (0.21 - 1.11)
Ciclina E >12% p21+ p27+ // altres	P = 0.02 HR 0.10 (0.01 - 0.76)	P = 0.03 HR 0.20 (0.05 - 0.86)
Dukes A-B1-B2 C1-C2 D	P = 0.00 HR 2.52 (1.28 - 4.99) HR 19.62 (9.72 - 39.61)	P = 0.08 HR 2.00 (1.07 - 3.76) HR 1.77 (0.51 - 6.14)

wt: "wild type"; mut: mutació;

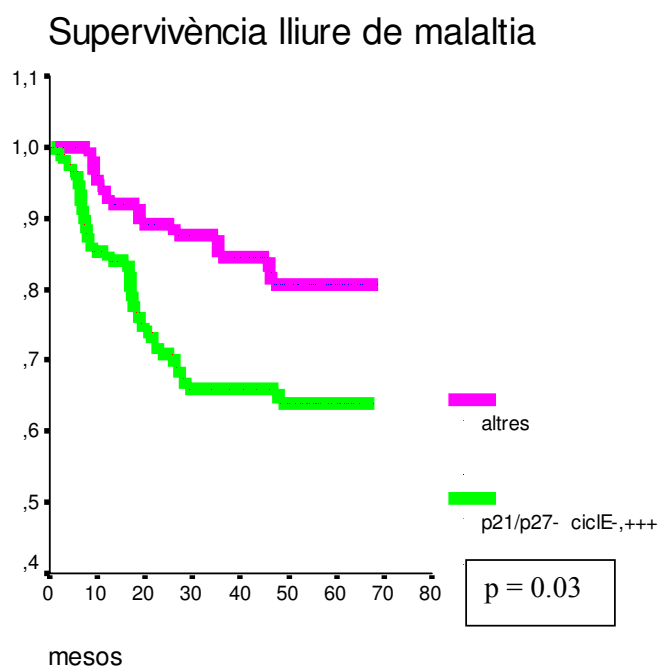
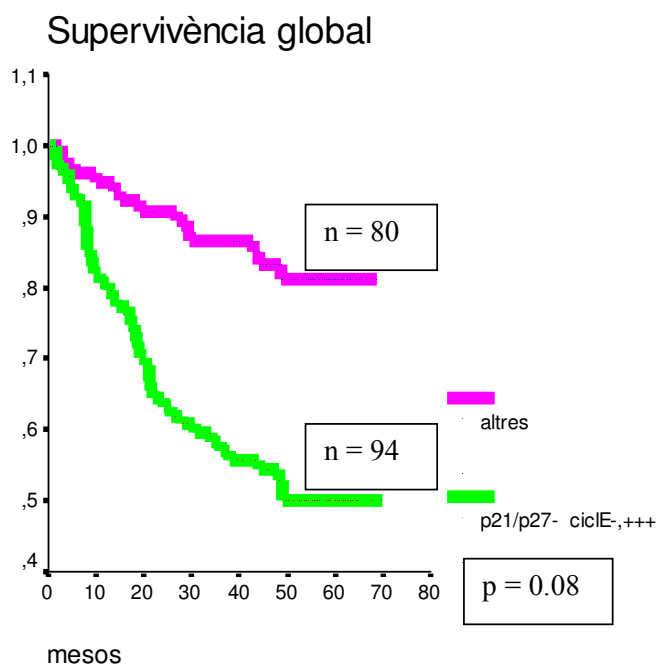


Fig. 37. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia, ajustades per Dukes, dels carcinomes amb pèrdua d'expressió de p21 o p27 i amb expressió molt dèbil (-, + < 12%) o molt intensa (++,+++) de ciclina E, comparats amb els altres perfils agrupats.

4. 12. Valor pronòstic en la pràctica assistencial de l'estudi molecular i IHQ de p53 p21 p27 i ciclina E

Per a l'estudi del valor pronòstic que les anàlisis realitzades al llarg d'aquesta tesi poden tenir a la pràctica assistencial, es van repetir les anàlisis de supervivència restringint la sèrie de casos a aquells en que l'exèresi quirúrgica havia estat completa. Aquesta sèrie de 146 tumors, a la que podem anomenar R0 (taula 20), exclou els adenocarcinomes amb estadi de Dukes D i aquells en els que l'exèresi quirúrgica ha resultat incompleta.

Taula 20. Característiques clínico-patològiques dels diferents patrons d'expressió de proteïnes obtinguts a partir de la sèrie R0.

	No. de Tumors	Mutacions de p53	Mutacions en hot spots	Expressió p21	Expressió p27	Expressió p21 i p27	Expressió Cyclina E
Sèrie R0	146	59 (45.0%)	25 (19.0%)	65/142	112/139	51/142	68/136
Sexe dels pacients							
Masculí	90(61.6%)	34 (52.3%)	12 (18.5%)	42 (47.7%)	75 (87.2%)	36 (40.9%)	41 (49.4%)
Femení	56(38.3%)	25 (56.8%)	13 (29.5%)	23 (42.6%)	37 (69.8%)	15 (27.8%)	27 (50.9%)
Localització							
Recte	62(42.4%)	21 (50.0%)	10 (23.8%)	23 (39.7%)	44 (77.2%)	17 (29.3%)	25 (44.6%)
Còlon esquerre	46(31.5%)	23 (71.9%)	7 (21.9%)	26 (56.5%)	38 (84.4%)	22 (47.8%)	24 (53.3%)
Còlon dret	38(26.0%)	15 (42.9%)	8 (22.9%)	16 (42.1%)	30 (81.1%)	12 (31.6%)	19 (54.3%)
Estadi de Dukes							
A / B1-B2	87(59.6%)	33 (48.5%)	10 (14.7%)	41 (47.7%)	70 (83.3%)	35 (40.7%)	37 (45.1%)
C1-C2	59(40.4%)	26 (63.4%)	15 (36.6%)	24 (42.9%)	42 (76.4%)	16 (28.6%)	31 (57.4%)

Taula 21. Anàlisi de supervivència amb la sèrie de carcinomes ressecats amb finalitat curativa

variable	Supervivència global	Supervivència Lliure de malaltia
P53 wt/no hs Hot spot	Wt/no hs 1	Wt/no hs 1
	Hot spot 2.22 (0.87-5.68)	Hot spot 1.92 (0.81-4.53)
P53 wt/no hs mL3-LSH	Wt/no hs 1	Wt/no hs 1
	mL3-LSH 2.69 (1.03-7.01)	mL3-LSH 2.23 (0.92-5.37)
P21	P21+ 1	P21+ 1
	P21- 2.42 (1.02-5.78)	P21- 2.24 (1.07-4.69)
Ciclina E	-, + <12% 1	-, + <12% 1
	++, +++ 4.92 (1.15-21.02)	++, +++ 1.98 (0.81-4.85)

4.12.1. p53

Dins d'aquesta sèrie de 146 carcinomes R0, es va poder analitzar l'estat mutacional de p53 en 131 tumors, obtenint-se resultats vàlids en 109 tumors. Al comparar en una anàlisi univariant, la supervivència dels carcinomes amb mutacions "hot spot" va continuar essent pitjor ($p=0.03$), significació que es va perdre en el multivariant (Fig. 38), $p=0.09$ per a la variable analitzada, però amb $p=0.19$ per a l'estadi de Dukes.

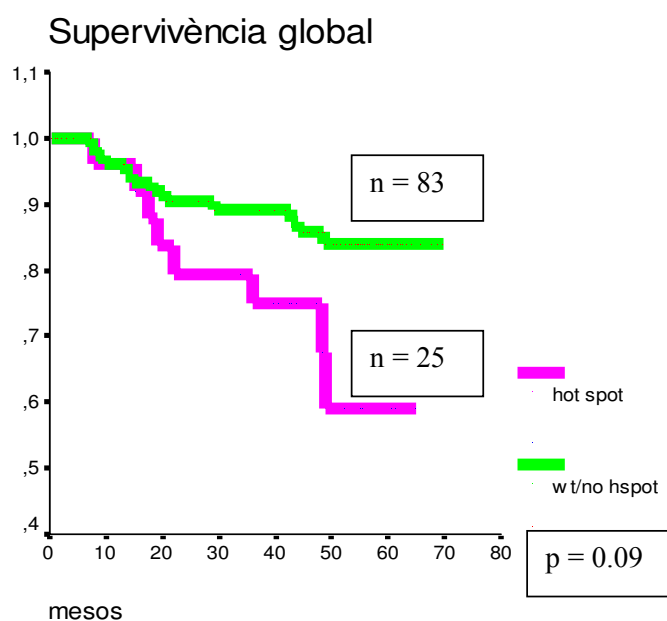


Fig. 38. Supervivència global, ajustada per Dukes, dels carcinomes amb mutació "hot spot" de p53, comparada amb la dels carcinomes amb qualsevol altra proteïna p53.

Finalment, les mutacions “hot spot que afecten el L3-loop i el motiu LSH, van mostrar una clara tendència cap a pitjor supervivència global que, es va mantenir en l’anàlisi multivariant ($p= 0.04$) (Fig. 39). Respecte a la supervivència lliure de malaltia, la significació no es va mantenir en l’anàlisi multivariant.

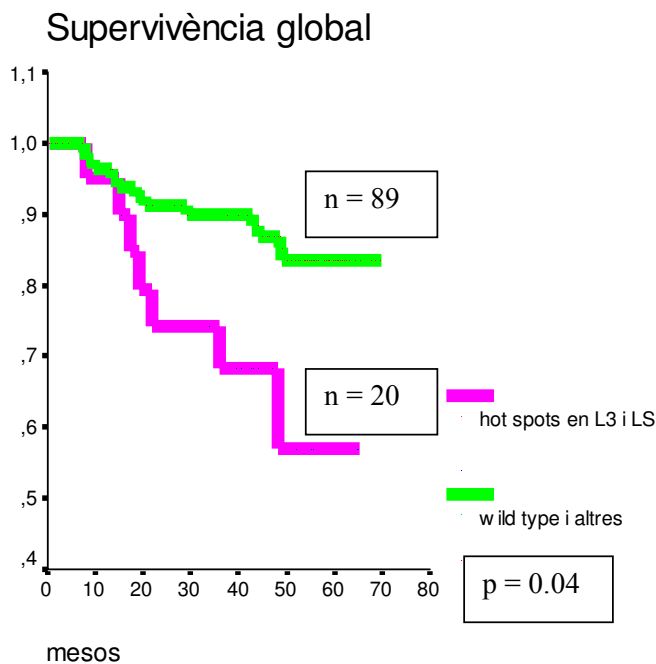


Fig. 39. Supervivència global dels carcinomes amb mutació de p53 en els “hot spot” de L3 i LSH, comparada amb la dels carcinomes amb qualsevol altra proteïna p53 (ajustat per Dukes)

4.12.2. p21

Al repetir l’anàlisi multivariant per a supervivència global (Fig. 40), la pèrdua d’expressió de p21 sí es va mantenir com un factor de risc ($p= 0.04$). També va ser el mateix per la supervivència lliure de malaltia.

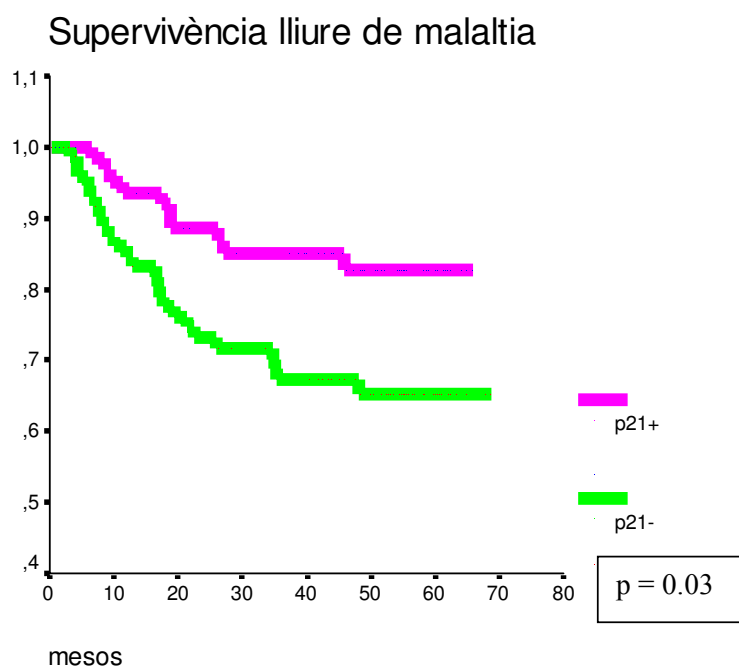
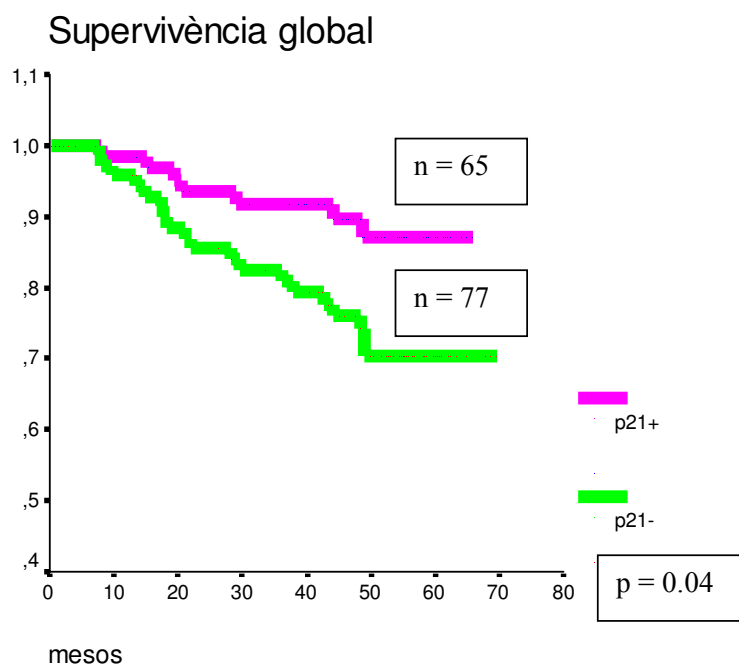


Fig. 40. Supervivència global i lliure de malaltia dels carcinomes amb elevada expressió de p21, comparada amb la dels carcinomes amb pèrdua d'expressió de p21 (ajustades per Dukes).

4.12.3. p53-p21

Dins d'aquesta sèrie de 146 adenocarcinomes R0, es va disposar de resultats vàlids pel que fa a mutacions de p53 i expressió de p21 en 108 tumors, dels quals només 9 tenien a la vegada, mutació de p53 en L3 i LSH i manca d'expressió de p21. Aquest número de casos és massa reduït com per poder realitzar anàlisis de supervivència que puguin resultar fiables. En l'anàlisi univariant de supervivència global, aquests tumors van mostrar una tendència a pitjor supervivència, amb $p= 0.03$. En l'anàlisi multivariant, aquests test va fregar la significació estadística, amb $p= 0.06$.

4.12.4. p27

En la sèrie de 146 adenocarcinomes R0 es va disposar de resultats vàlids d'expressió de p27 en 139 casos, dels quals, 112 van mantenir una elevada expressió d'aquesta proteïna, mentre que 27 la van perdre. No es va observar correlació entre expressió de p27 i supervivència.

4.12.5. Ciclina E

Es va disposar de resultats vàlids pel que fa a ciclina E en 135 casos, dels quals 56 van ser totalment negatius o van expressar ciclina E dèbilment (+) en menys d'un 12% de nuclis, 35 tumors la van expressar dèbilment (+) en més d'un 12% de nuclis, i 45 adenocarcinomes van expressar intensament ciclina E.

Els carcinomes amb expressió dèbil de ciclina E en més d'un 12% de nuclis, van ser marcadors de millor supervivència global (Fig. 41) tant en l'anàlisi univariant ($p= 0.02$) com en l'anàlisi multivariant ($p= 0.03$).

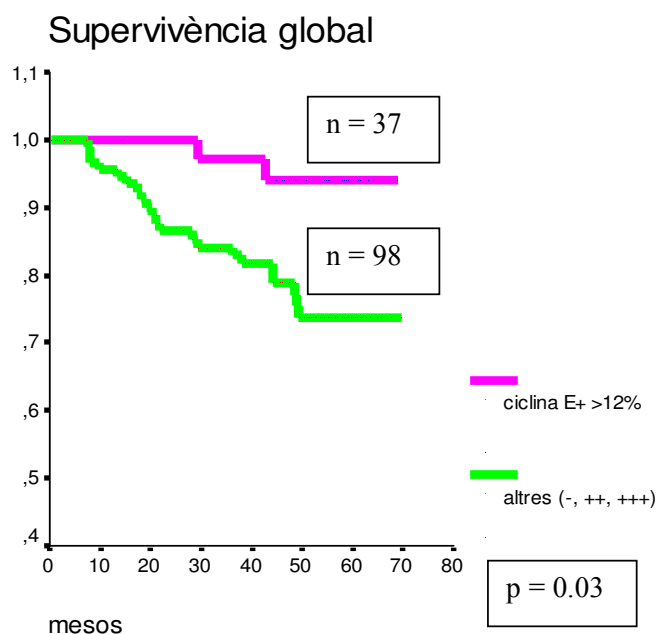


Fig. 41. Corbes de supervivència global dels carcinomes que expressen ciclina E dèbilment en més d'un 12% de nuclis, comparats amb els carcinomes amb expressió nul·la o molt intensa (ajustades per Dukes).

4. 13. Anàlisi de predicció de resposta al tractament quimioteràpic

En ser una sèrie històrica amb un llarg seguiment vam poder avaluar la utilitat del marcador com a predictor de resposta al tractament. Setanta-vuit dels 185 pacients (42,16%) de la sèrie completa van rebre quimioteràpia en el decurs del tractament. D'aquests, els tumors amb elevada expressió de **p21** van mostrar al estratificar per Dukes, una tendència gairebé significativa a una millor supervivència global ($p= 0.06$) (Fig. 42) i una clara millor supervivència lliure de malaltia ($p= 0.006$). Dels 92 tumors restants que no van rebre quimioteràpia, els positius per p21 van mostrar una millor supervivència global ($p= 0.048$) que no es va mantenir estratificant per Dukes. No es va observar correlació estadísticament significativa amb supervivència lliure de malaltia.

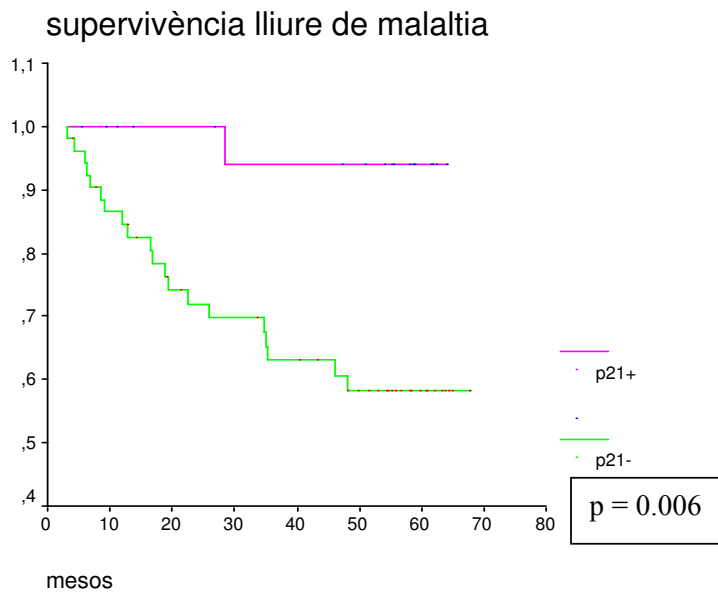
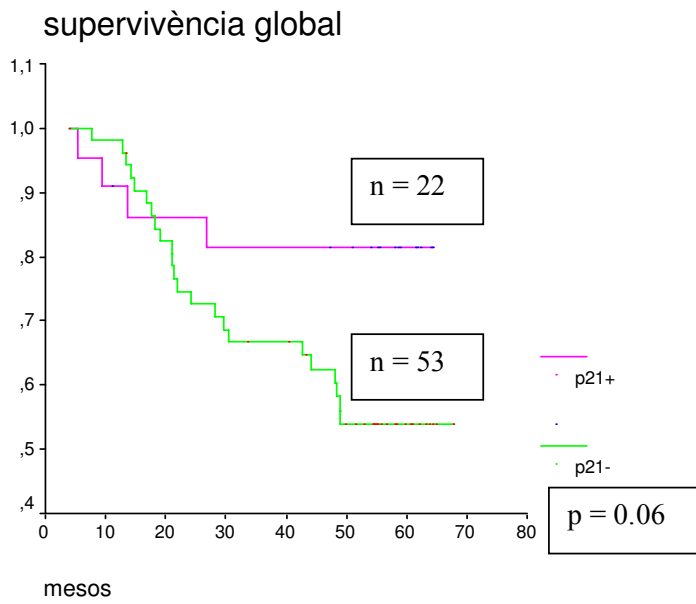


Fig. 42. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels pacients que han rebut quimioteràpia, en funció de l'expressió de p21, ajustades per Dukes.

L'anàlisi immunohistoquímica de p53 no va mostrar valor com a factor predictor de resposta al tractament amb quimioteràpia.

Els tumors tractats amb quimioteràpia no van mostrar diferències estadísticament significatives en supervivència global i lliure de malaltia que es podessin relacionar amb l'expressió de p27 o d'ambdues proteïnes cip/kip, o amb la pèrdua d'expressió d'alguna d'elles. En canvi, entre els tumors que no van rebre quimioteràpia, l'expressió de p27 va correlacionar amb una millor supervivència lliure de malaltia ($p = 0.04$ estratificant per Dukes), però no amb supervivència global ($p = 0.001$ en l'anàlisi crua, però $p = 0.13$ ajustant per Dukes)(Fig. 43). Dins d'aquest mateix grup de tumors que no van rebre quimioteràpia, l'expressió d'ambdues proteïnes cip/kip va ser un factor de bon pronòstic per a supervivència global, amb $p = 0.04$ al ajustar per Dukes.

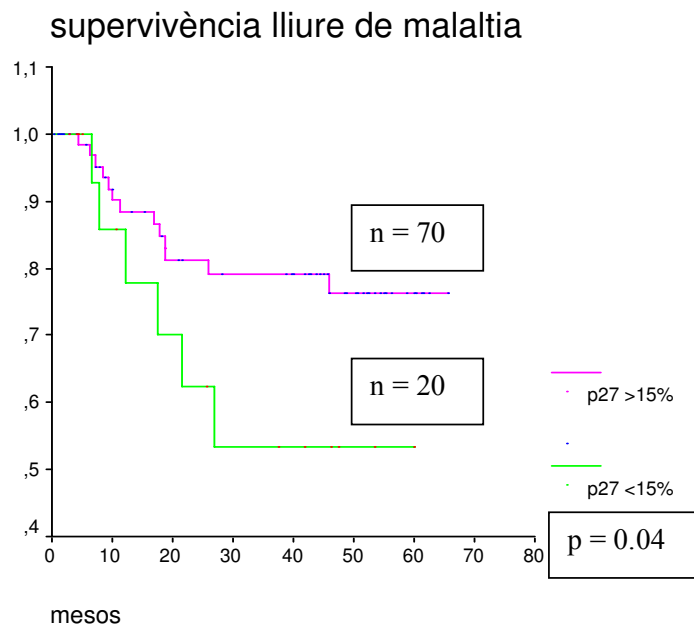


Fig. 43. Supervivència lliure de malaltia dels pacients que no van rebre quimioteràpia, en funció de l'expressió de p27, ajustada per Dukes.

DISCUSSION

5. DISCUSSIÓ

P53

Des de 1989, un dens cos de literatura ha estat publicat al voltant de p53. Nombrosos treballs s'han centrat en la seva estructura, tant a nivell de gen com a nivell de proteïna. Altres articles s'han centrat en l'estudi de les seves funcions biològiques, en la determinació i estudi de les possibles mutacions, en la detecció per mitjans immunohistoquímics de la proteïna p53, etc. Tota aquesta literatura conté però, molts resultats contradictoris que fan difícil extreure conclusions clares respecte del valor pronòstic de les diferents alteracions de p53 en els tumors sòlids en general i en els tumors colorectals en particulars.

Hem detectat mutacions de p53 en 51.1% dels casos i sobreexpressió d'aquesta proteïna en el 68.9% dels mateixos. Hem considerat "hot spots" les mutacions de p53 més freqüents a la nostra sèrie que, a més, estiguessin localitzades en els dominis evolutivament conservats del gen p53. Aquestes han estat cinc mutacions reportades a la literatura com a "hot spots" i localitzades als codons 175, 245, 248, 273 i 282. Una sisena mutació "hot spot" reportada a la literatura és la localitzada al codó 249, de la que no en tenim cap cas a la nostra sèrie. No hem observat una correlació clara entre mutació de p53 i estadi de Dukes si l'estat mutacional de p53 ha estat dividit únicament en proteïna salvatge o proteïna mutada, observació aquesta en coincidència amb Guirlando, Slebos o Hamelin *et al.* D'altra banda, s'ha observat una correlació més clara entre l'estadi tumoral i l'estat mutacional de p53 quan la distinció entre mutacions "hot spot" i "no hot spot" s'ha pres en consideració. En aquest sentit, la correlació més clara amb estadi tumoral es va observar comparant directament mutacions "hot spot" contra mutacions "no hot spot". De manera semblant, HS Goh *et al.* van reportar una clara correlació entre mutacions puntuals en els dominis evolutivament conservats del gen p53 i la invasió de ganglis limfàtics (estadi C de Dukes), mentre les mutacions ubicades fora d'aquelles regions mostraven una molt menor taxa de metàstasis ganglionars.

Mentre que diversos treballs publicats (Goh *et al.*, Hamelin *et al.*) han mostrat una clara correlació entre estat mutacional de p53 i supervivència sense distingir entre tipus de mutació, nosaltres només hem pogut observar una tendència cap a una pitjor supervivència global i lliure de malaltia per als pacients amb adenocarcinomes amb mutació de p53. En canvi, sí hem observat diferències més clares, en l'anàlisi multivariant, quan establim com a grup els tumors amb mutacions "hot spot". Tot indica que, sembla més important que hi hagi una mutació en un "hot spot" que la simple existència d'una mutació en p53. Una explicació amb base biològica per a aquestes observacions pot ser que els cinc codons "hot spots" codifiquen per a la seqüència específica del domini d'interacció amb el DNA de la proteïna p53. El nucli central del domini d'interacció amb el DNA de p53 té 200 aminoàcids i inclou quatre dels cinc dominis altament conservats entre espècies. Dins d'aquesta regió hi ha una superfície d'unió amb el DNA formada per dos llaços amb estructura β -plegada (L2 i L3) i un llaç amb estructura α -hèlix (LSH). El llaç L2, codificat pels codons 163-195, és important per a l'estabilitat configuracional de la part central de la proteïna, mentre que el llaç L3 (codons 236-251) i el motiu LSH (codons 273-286) contacten directament amb el DNA. Els llaços L2 i L3 estan mancats d'una estructura secundària regular i són estabilitzats mitjançant coordinacions de zinc i interaccions de cadenes laterals. El codó "hot spot" 175 codifica per al llaç L2, els codons 245 i 248 ho fan per al llaç L3, i els codons 273 i 282 codifiquen per al motiu LSH. Els "hot spots" 248 (L3) i 282 (LSH) són per tant "mutants de contacte". El hot spot 175 és degut a la seva posició en L2 un mutant "estructural" o "configuracional". Però els "hot spots" 245, 248, 249 (L3) i 273 (LSH) són, de fet, mutants combinats de "contacte" i "configuracionals", malgrat la seva posició en L3 i LSH. Tant les mutacions del codó 245 com les del 249 eliminen les interaccions entre cadenes laterals i les mediades per zinc. El "hot spot" 248 també distorsiona l'estructura de L2 i L3 i d'altres regions distants com els llaços L1 o hèlix 2. El "hot spot" 273 crea alteracions en l'entorn químic local, amb canvis químics en els residus 281, 282, 285 i 286.

Per tant, és versemblant que mutacions puntuals en aquests “hot spots” puguin tenir més repercussió en la funció de la proteïna p53 que la que puguin tenir altres mutacions, la majoria d’aquestes localitzades fora dels dominis abans esmentats.

Una explicació a la dèbil correlació observada en la nostra sèrie entre supervivència i presència o no de mutacions de p53 sense altres especificacions, podria ser una simple qüestió de mida mostral i d’espectre de mutacions. A la nostra sèrie, només un 44.4% (32/72) de les mutacions de p53 detectades es van localitzar en “hot spots”. A més, a la nostra sèrie, el 82.5% de les mutacions “no hot spot” (33/40) es van localitzar fora dels dominis evolutivament conservats. Tampoc no tenim cap de les mutacions minoritàries però funcionalment rellevants de p53, com ara la 143, la 179 o la 281. A la nostra sèrie tampoc no hi va haver cap cas amb mutació en el “hot spot” 249, i només hi va haver quatre casos amb mutació al “hot spot” 245 i sis al “hot spot” 248. En el treball de Goh *et al.* 27 dels 53 casos de la sèrie tenien una mutació de p53 localitzada en un “hot spot”, però altres 14 casos tenien una mutació “no hot spot” també localitzada en els dominis evolutivament conservats. En una sèrie publicada per R Hamelin *et al.*, només 20 de les 42 mutacions de p53 eren “hot spots”, però 11 d’aquestes mutacions estaven localitzades als codons 245, 248 i 249, que com hem comentat abans, són codons amb gran repercussió sobre l’estructura i funció de la proteïna. A més, en aquesta sèrie hi havia moltes mutacions “no hot spot” als codons 135, 173, 176, 178, 241 o 253, també localitzats en els dominis conservats. En S Tórtola *et al.* 60 % (38/63) de les mutacions exòniques de p53 eren “hot spots”, 12 d’elles localitzades als codons 245, 248 i 249. El treball publicat per A Russo *et al.* en 2002 està en la línia de les nostres observacions, fins i tot és més restrictiu ja que només atorguen valor pronòstic a les mutacions que afecten L3 i no a les que afecten altres regions conservades. En aquest sentit, hem pogut observar que dintre del conjunt de mutacions “hot spot”, les que afecten L3-loop i LSH semblen tenir més influència en el pronòstic dels tumors. Comparant la supervivència global dels carcinomes amb mutacions en aquests codons amb la

dels carcinomes amb proteïna p53 salvatge o amb altres mutacions de p53, els carcinomes amb mutacions en L3 o LSH van mostrar pitjor supervivència global en l'anàlisi multivariant. De fet, la màxima diferència es va observar al comparar directament la supervivència global d'aquests tumors amb la dels tumors amb altres mutacions de p53.

Taula 22. Comparació entre diferents treballs on s'analiza el valor pronòstic de p53.

Anàlisi de p53	"n"	R0	Dukes D	teixit	tècnica	hot spots	correlacions	valor pronòstic
Bell S <i>et al.</i> , 1993	100	?	no	congelat	IHQ		cap	NS
Scott N <i>et al.</i> , 1991	52	?	no	congelat	IHQ		còlon esquerre	NS
Tomoda H <i>et al.</i> , 1995	144	101	sí	parafina	IHQ		Dukes C	NS
Goh HS <i>et al.</i> , 1995	192	sí	sí	congelat	PCR	sí	Dukes C	p < 0.05
Hamelin R <i>et al.</i> , 1994	85	no	sí	?	PCR	no	còlon esquerre	p < 0.05
Russo A <i>et al.</i> , 2002	160	no	sí	congelat	PCR	sí	còlon esquerre	p < 0.05
Tórtola S <i>et al.</i> , 1999	132	sí	sí	congelat	PCR	175/273	còlon esquerre	p < 0.05
Bertorelle R <i>et al.</i> , 1995	83		sí	congelat	IHQ/PCR	no	IHQ Dukes CD	no analitzat
Dix B <i>et al.</i> , 1994	109		no	paraf/cong	IHQ/PCR	175/248	no estudiades	no analitzat
□ressner U <i>et al.</i> , 1999	189	no	sí	congelat	IHQ/PCR	dominis	còlon esquerre	PCR p < 0.05
Smith DR <i>et al.</i> , 1996	100	?	sí	congelat	IHQ/PCR	no	no estudiades	p < 0.05

Respecte a la IHQ, l'expressió de p53 va ser nuclear en tots els casos de la nostra sèrie. No es va objectivar expressió de p53 en mucosa histològicament normal. En setanta-nou (45%) adenocarcinomes es va trobar sobreexpressió de p53 en més del 90% de nuclis, i en 36 (20.5%) va ser nul·la. Tots els altres percentatges d'expressió van ser minoritaris. Ni l'anticòs emprat (DO-7), ni el punt de tall fixat (20%) solen variar en els diferents treballs publicats. Contràriament als estudis publicats per Ropponen *et al.*, Slebos *et al.*, o Guirlando *et al.* (veure taula 24), l'anàlisi de p53 per mitjà únicament immunohistoquímic va correlacionar bé amb l'estadi de Dukes a la nostra sèrie, però no va ser un bon marcador de supervivència global, aspecte en el que coincideixen la majoria de treballs publicats per diferents autors (Tomoda *et al.*, Scott *et al.*, Smith *et al.*, □ressner *et al.* o Zirbes *et al.*). Bertorelle *et al.*, de la mateixa manera que nosaltres, troben una clara correlació entre sobreexpressió immunohistoquímica de

p53 i l'estadi de Dukes dividit en dues categories (A-B/C-D) però sobretot amb l'estadi de Dukes C. Aquests autors, després d'haver provat dividint l'expressió de p53 en tres grups segons percentatge de tinció nuclear, finalment estableixen el punt de tall en el 10% de nuclis, mentre que nosaltres i la majoria d'autors l'estableixen en el 20%. Soussi T i Beroud C, en una revisió publicada el 2001, arriben a afirmar directament que en l'estudi de p53 en vistes al seu valor com a factor pronòstic, només s'hauria de realitzar l'anàlisi molecular. Rosati *et al.*, estudiant únicament per immunohistoquímica p53, p27, β i-67, bcl-2 i timidilat sintasa, en una sèrie de 103 carcinomes colorectals sense estadi Dukes D, van concloure que només p53 i β i-67 donaven informació pronòstica independent sobre supervivència global. En el nostre estudi, prescindint dels carcinomes Dukes D, vam observar en l'anàlisi univariant una pitjor supervivència global per part dels tumors que sobreexpressaven p53, però sense arribar a la significació estadística ($p= 0.103$). No es pot descartar que amb major mida de mostra ho haguéssim trobat. Únicament vam observar una clara correlació entre sobreexpressió de p53 i pitjor supervivència global al restringir l'anàlisi als carcinomes Dukes C. Per tant, aquest grup de tumors, els Dukes C, és l'únic en què l'anàlisi immunohistoquímic de p53 pot afegir informació sobre pronòstic, segons el nostre estudi.

És ben conegut que la correlació entre mutació i sobreexpressió de p53 no és exacta, essent del 65% a la nostra sèrie. Hi pot haver diverses raons, prèviament assenyalades a la literatura, que expliquin aquesta correlació inexacta entre els dos mètodes d'anàlisi de p53. Aquestes poden ser que, normalment, l'anàlisi mutacional de p53 es limita a l'estudi dels exons 5-9, i per tant, deixa de banda mutacions localitzades en altres exons. La majoria de mutacions de p53 localitzades en els exons 4, 9 i 10 són *nonsense*, per tant, no detectables per immunohistoquímica. En aquest sentit cal destacar que alguns treballs amb càncer de pulmó (Schiller JH *et al.*, 2001) han assenyalat manca de correlació de p53 amb supervivència quan

l'estudi de mutacions s'havia limitat als exons 5-8, i en canvi, bona correlació quan l'anàlisi mutacional s'havia fet extensiu a tots els exons codificants. També pot ser deguda a que la proteïna p53 salvatge pot estabilitzar-se, i per tant sobreexpressar-se, per interacció amb altres proteïnes, com per exemple mdm-2 (Momand *et al.*, 1992). És important destacar que, al distingir entre mutacions "hot spot" i "no hot spot", només una de les 32 mutacions "hot spot" (3.1%) no va donar lloc a sobreexpressió de proteïna. Aquestes 31 mutacions "hot spot" poden ser considerades mutacions "missense", amb acumulació de proteïna en el nucli de les cèl·lules tumorals. La majoria (90.9%) de mutacions de p53 sense acumulació de proteïna (mutacions "nonsense") van ser mutacions localitzades fora dels "hot spots". U □ressner *et al.*, van reportar correlació entre mutació "missense" i localització en regions conservades de p53, però inesperadament, atorguen valor pronòstic a les mutacions localitzades fora dels dominis conservats (□ressner *et al.*, 1999).

Podem concloure doncs que l'anàlisi IHQ de p53, encara que correlaciona bé amb l'estadi de Dukes, no té valor pronòstic. En canvi, l'anàlisi mutacional de p53 prenent en consideració les mutacions en els "hot spots", i especialment en els localitzats a nivell de L3 i LSH, aporta informació pronòstica estadísticament significativa en l'anàlisi multivariant per a supervivència global, tant en la sèrie completa com en la sèrie R0.

El polimorfisme localitzat en l'aminoàcid 72 de la cadena peptídica de p53 (Arg/Pro) consisteix en una transversió G-C en posició 12138, localitzada a l'exó 4 del gen de p53. S'ha suggerit que aquest polimorfisme podria ser un factor de risc per desenvolupar un tumor o bé podria, un cop desenvolupat el tumor, influir en la seva progressió. L'estudi a gran escala del polimorfisme 72 de p53 en tumors humans com ara en còlon i recte, hauria de permetre la detecció d'un possible biaix en la freqüència d'algun dels dos al·lels respecte a la població normal. Per exemple, s'ha reportat en càncer de pell no melanoma una major freqüència de

mutacions de p53 sobre l'al.lel Arg72 que sobre el Pro72 (Marin M *et al.*, 2000). Mentre que la freqüència de l'al.lel Pro (CC,GC) entre la població nòrdica gira al voltant del 17%, en països de l'Àfrica subsahariana és d'un 63% (Beckman G *et al.*, 1994), de manera que s'ha especulat sobre un possible efecte protector de l'al.lel Pro72 en càncer de pell. També ha estat reportat que la variant Arg72 (GG) és més sensible a la degradació induïda per la proteïna E6 del virus del papilloma humà que la variant Pro (Storey A *et al.*, 1998), la qual cosa pot ser important en la gènesi de càncers cervicals o de cap i coll.

Un estudi de casos i controls realitzat per Gemignani *et al.* en 2004 a partir de mostres de l'Hospital de Bellvitge, en el que s'estudiaven dos polimorfismes de p53 entre ells l'Arg72Pro, no va mostrar diferències significatives en la distribució dels dos al.lels entre el grup control i el grup de carcinomes. Els dos grups van ser majoritàriament homozigots per a Arg i molt minoritàriament homozigots per a Pro. Dins del grup de casos, els percentatges de distribució dels dos al.lels van ser molt semblants als que hem trobat a la nostra sèrie. Per tant, en càncer de còlon i recte no sembla que hi hagi cap biaix en la freqüència dels dos al.lels respecte a la població normal. Dels 172 tumors de la nostra sèrie en què es va poder analitzar l'exó 4 de p53, 91 (52.9%) van ser homozigots GG (Arg), mentre que només 10 (5.8%) ho van ser per CC (Pro). Aquesta distribució és semblant a la que van trobar en tot l'estudi. Respecte a les pèrdues al.lèliques, seixanta-nou (40.1%) dels casos van ser informatius (teixit normal heterozigot), dels quals 42 (respecte a 69) adenocarcinomes presentaven pèrdua de l'al.lel C respecte al teixit normal, mentre que només dos carcinomes van mostrar respecte al teixit normal, pèrdua de l'al.lel G. Els vint-i-cinc adenocarcinomes restants dels seixanta-nou casos informatius no van patir pèrdua al.lèlica. Si tenim en compte el genotip somàtic als adenocarcinomes de la nostra sèrie, sumant els casos no informatius homozigots GG amb els casos amb pèrdua de l'al.lel C, tenim 133 (77.3%) tumors amb l'al.lel Arg davant de 37 (21.5%) tumors amb l'al.lel Pro (GC + CC + LOH G). Es va observar una major freqüència de mutacions de p53 en els tumors Arg72

que en els Pro72, coincidint amb el que s'ha observat en carcinomes escamosos de vulva o de cap i coll (Marin *et al.*, 2000). Aquesta correlació contrasta amb la informació reportada per Langerod A (Langerod A *et al.*, 2002), els quals troben correlació entre freqüència de mutacions i al·lel del polimorfisme en càncer de mama, però no en càncer de còlon i recte. Les diferències de supervivència global entre els tumors amb mutacions en L3 i LSH i els tumors amb p53 amb altres mutacions o “wild type” van tendir a ser més grans en presència de l'al·lel Arg. Al avaluar el valor pronòstic de les mutacions de p53 que, segons s'ha reportat en la literatura, afecten més la funció del gen p73, vam observar en l'anàlisi multivariant una pitjor supervivència global per als carcinomes amb aquestes mutacions en comparació amb els carcinomes amb altres mutacions. El subgrup de tumors GG (Arg), els carcinomes amb aquestes mutacions van tendir a una pitjor supervivència global. Aquests resultats anirien en la línia dels reportats per Marin *et al.* i confirmen que part de la informació pronòstica de p53 pot venir determinada pel genotip tumoral i la seva repercussió sobre la proteïna p73.

P21

Un dels nostres objectius en aquest estudi ha estat investigar el valor pronòstic de la via p53-p21 en càncer colorectal. Han estat també nombrosos els treballs que han tractat sobre aquest tema en càncer de còlon, analitzant correlacions entre l'expressió immunohistoquímica d'ambdues proteïnes, entre l'expressió de p21 i l'estat mutacional de p53, o el valor pronòstic de totes aquestes variables, però freqüentment sense especificar en el cas dels estudis de supervivència, entre mutacions de p53 en “hot spots” i mutacions en altres localitzacions. La taula 22 mostra un resum d'alguns d'aquests treballs.

La immunotinció per p21 va ser nuclear tant en mucosa normal com tumoral. S'ha de destacar que, en els adenocarcinomes, aquesta expressió nuclear de p21 va tendir a ser escassa i de distribució heterogènia, sovint en grups de cèl·lules tumorals, i més freqüent en les zones

superficials i millor diferenciades dels tumors. Contràriament al baix valor pronòstic de l'anàlisi IHQ de p53, l'expressió de p21 detectada per aquest mètode va esdevenir un clar factor pronòstic per a supervivència lliure de malaltia en l'anàlisi multivariant. S'ha de destacar que p21, va mostrar tenir valor pronòstic independent si es prescindia dels carcinomes amb metàstasi visceral (Dukes D). Aquest resultat contrasta amb el reportat per autors com Slebos *et al.*, els quals només observen una tendència a millor supervivència global entre els tumors que expressen p21, però sense ser estadísticament significativa; en canvi, és força coincident amb l'obtingut per Pasz- \square alczak *et al.*, els quals afirmen que l'expressió de p21 s'associa a mal pronòstic en l'anàlisi univariant, tot i que perd valor pronòstic independent en l'anàlisi multivariant. Nosaltres però, creiem que p21 pot ser molt útil com a factor pronòstic de supervivència global i lliure de malaltia.

En aquest sentit, treballs com els de Ropponen *et al.*, o Zirbes *et al.*, són més contundents al conferir a p21 valor pronòstic per a supervivència global independentment de l'estadi de Dukes sense matisos, però en aquests treballs no queda clar si les anàlisis multivariants per supervivència global han estat efectuades ajustant per l'estadi de Dukes dividit en dues (A-B1-B2/C1-C2-D) o en tres categories (A-B1-B2/C1-C2/D). Resultats semblants a aquests darrers són els que reporten Chapusot *et al.*, dividint l'estadi de Dukes en dues categories. A aquest respecte hem d'emfatitzar el fet que totes les anàlisis multivariants que hem descrit en aquesta tesi s'han fet sempre ajustant per l'estadi de Dukes dividit en tres categories, és a dir, diferenciant els tumors amb metàstasis ganglionars dels tumors amb metàstasis viscerales. I cal dir que els resultats poden ser clarament influïts per aquesta anàlisi. Tant pel que fa a p21 com els que comentarem més endavant respecte p27, els resultats són encara més clars atorgant valor pronòstic independent a cadascuna de les proteïnes Cip/ \square ip, si s'ajustava per Dukes dividit en dues categories.

Taula 24. Comparació entre diferents treballs publicats sobre correlació entre p53 i p21

	Slebos et al Br J cancer 1996	Girlando et al Arch 1999	Ropponen et al Br J Cancer 1999	Dogliani et al J Pathology 1996	Chapusot et al Pathol Biol 2001	Valassiadou et al Clin Cancer Res 1997
Tipus	retrospectiu 1983-1987	prospectiu 1996-1999	retrospectiu 1976-1986	retrospectiu	prospectiu 1995-1996	retrospectiu 1990-1994
Nº	46 ca (*)	103 ca	162 ca	38 ca 15 ad (**)	35 ca	52 ca 4 ad
Mètode	DNA parafina Pcr ex 5-8 p53 ihq p53 DO7 ihq p21 Ab- LOH p17 X ² i χ^2 aplan-M	DNA parafina pcr-sscp ex 5-8 p53 ihq p53 DO7 ihq p21 EA10 X ² i Sidak test	DNA parafina ihq AP-2 ihq p53 DO7 ihq p21 NCL X ² i Cox test	talls parafin ihq χ^2 i-67/Mib- ihq p53 DO7 ihq p21 X ²	congelat/ parafina pcr-sscp ex 5-9 p53 hot spots p53 ihq p53 DO7 ihq p21 SX118 X ² , χ^2 aplan-M,Cox	parafina ihq p53 DO7 p21 Ab-1 OP64 Bcl-2 MO887 Mdm-2 Ab-1 Op46 X ²
Resultats:						
P21:	+ en 35% tumors + nuclear tall al 10% nuclis	+ en 39% tumors + només nuclear tall al 10% heterogènia, clonal més en superfície	+ en 25%;0 en 25% + només nuclear tall al 10% + = cèl.lula madura	+ en 50% tumors + només nuclear tall al 10% heterogènia, clonal superficial	+ en 71% tumors mediana de +: 11% heterogènia mucosa normal +	+ en 86% carcinomes + nuclear heterogènia superficial >25% nuclis en 5 casos + 100% adenomes (5%-25% nuclis)
Correlació p21:	no	no	amb Dukes i Supervivència	amb Dukes	amb l'edat >/< 70 a amb l'estadi tumoral	- -
Supervivència:						
	Millor en p21+ però No sign. Estadística	-	millor en p21+ "p" significativa	cal més recerca	millor en p21+ "p" significativa	- -
P53:	+ en 46% tumors + només nuclear tall no mencionat	+ en 58% tumors + només nuclear tall al 40%	+ en 53% tumors + només nuclear tall al 20%	+ en 42% tumors + només nuclear tall al 50%	+ en 59% tumors mínim 29% nuclis +	+ en 67% carcinomes gradació 0, <5%, 5-25%, 25-50%,>50%
correlació p53:	mida tumor amb res		amb supervivència	no comentada	amb còlon esquerre no correlació amb Dukes	-
supervivència:						
	menor si mutació de p53 no significació estadística	mutació de p53 més sensibilitat a QT i RT	millor si p53- "p" significativa	no comentada	no comentada	No estableix correlació pronòstica
Correlació ihq p53-p21:						
	No	inversa	molt inversa	inversa	no inversa	no inversa

(*) carcinoma
(**) adenoma

Al limitar les anàlisis de supervivència amb p21 als carcinomes que havien rebut quimioteràpia, vam observar que l'expressió de p21 es mantenia com un factor de bon pronòstic en supervivència global, però sobretot en supervivència lliure de malaltia, mentre que en el grup de pacients que no havia rebut quimioteràpia les correlacions entre p21 i les supervivències global i lliure de malaltia es perdien clarament al estratificar per Dukes. Aquesta observació fa pensar que p21 pot ser un bon factor predictor de resposta al tractament amb quimioteràpia, conclusió a la qual també arriben Cheng *et al.* (1999). Publicacions com la de Geller *et al.*, (2004) segons la qual p21 és un mediador important de l'acció citotòxica dels inhibidors de timidilat-sintasa en cèl.lules de carcinoma colorectal, ens poden ajudar a entendre els resultats de les nostres observacions. Per tant, creiem que p21 podria ser utilitzat com a factor per a seleccionar quimioteràpia.

P53 i P21

Donat que p21 és un dels braços efectors de p53 en la seva funció d'interrupció del cicle cel.lular en G1, vam voler estudiar la possible correlació existent entre la expressió de p21 i la sobreexpressió o presència de mutacions de p53, així com el valor pronòstic de l'estudi combinat d'ambdues proteïnes. Contràriament a alguns treballs prèviament reportats com els de Doglioni *et al.*, Girlando *et al.*, Pasz-□ alczak *et al.*, o Ropponen *et al.*, i en coincidència amb Chapusot *et al.*, Slebos *et al.*, o Valassiadou *et al.*, no hem observat correlació entre sobreexpressió de p53 i expressió de p21, ni tampoc entre l'estat mutacional de p53 i p21, inclús parant atenció als "hot spots". Alguns dels diversos mecanismes d'activació de p21 comentats a la introducció, independents de p53, poden ser importants en els càncers de còlon i recte.

Combinant expressió de p21 i estat mutacional de p53, els adenocarcinomes amb p53 salvatge o amb mutació "no hot spot" i que alhora conservaven l'expressió de p21, van

presentar clarament una millor supervivència lliure de malaltia. Un resultat molt semblant a aquest, fins i tot una mica més clar es va obtenir al considerar mutacions “hot spot” de p53 únicament les localitzades en L3 i LSH. Quan enlloc d’agafar com a categoria de referència per a l’anàlisi de supervivència el perfil teòricament més favorable, vam agafar el perfil “a priori” més negatiu, al comparar-lo amb els altres, vam observar que aquest el perfil tumoral, caracteritzat per mutació de p53 en els “hot spots” de L3 o LS α -hèlix i pèrdua d’expressió de p21 era un marcador de mal pronòstic en l’anàlisi multivariant per a supervivència global. Per tant, creiem que la combinació de mutació de p53 en L3 i LSH i pèrdua de p21 resulta d’utilitat perfilant un grup de carcinomes amb clar mal pronòstic. Però com comentarem més endavant, no hem pogut demostrar que en la sèrie R0, l’anàlisi combinada d’aquestes dues proteïnes aportí més informació pronostica pràctica que les anàlisis de les dues proteïnes per separat.

P27

Les conclusions sobre p27 i càncer colorectal reportades a la literatura (Taula 25) són, una vegada més, força variades i estan plenes de matisos, però tendeixen a coincidir en atorgar mal pronòstic a la pèrdua d’aquesta proteïna. Tenjo *et al.* van reportar correlació entre pèrdua d’expressió de p27 i pitjor pronòstic en els carcinomes de còlon i recte (Tenjo *et al.*, 2000). Thomas G *et al.* (1998), en una sèrie molt petita i retrospectiva, van trobar associació entre pèrdua d’expressió de p27 i desenvolupament de metàstasis. Per la seva part Manne U *et al.* (2004) només van observar correlació entre expressió de p27 i supervivència en els tumors amb estadi avançat, no pas en els estadis incipients, i en canvi Belluco C *et al.* van reportar que l’absència de proteïna p27 prediu mal pronòstic en pacients amb carcinoma colorectal amb estadi I-III. Li GQ *et al.* (2004), en una sèrie de 40 carcinomes sense tumors Dukes D no van trobar correlació entre p27 i supervivència. Els nostres resultats han mostrat que la pèrdua d’expressió de p27, si bé no va correlacionar amb una pitjor supervivència lliure de malaltia sí

que ho va fer amb una pitjor supervivència global. Malgrat això, el seu valor com a marcador pronòstic independent continua essent motiu de controvèrsia, ja que la seva potència en l'anàlisi multivariant varia al ajustar per l'estadi de Dukes segons es divideixi aquest en 2 o 3 categories. De fet, l'expressió de p27 va correlacionar clarament amb un alt estadi de Dukes, especialment amb l'estadi de Dukes D i amb pM1, és a dir, amb la presència de metàstasis viscerals. No podem precisar doncs, si aquest resultat és degut pròpiament al valor pronòstic de p27 o a la influència de l'estadi de Dukes D.

Taula 25. Comparació entre diferents treballs sobre correlació p27

Autors	disseny	"n"	R0	Dukes D	teixit	anticòs	correlacions	pronòstic
Belluco	prospectiu	124	sí	no	parafina	Transduction	grau, Dukes	p < 0.05
Cheng JD <i>et al</i>	retrospectiu	66	no	sí	parafina	Transduction	□i-67	NS
Fredersdorf S <i>et al.</i>	retrospectiu	80	?	sí	?	propí	Dukes	no avaluat
Li GQ <i>et al.</i>	prospectiu	40	?	no	parafina	?	grau, Dukes C	NS
Manne U <i>et al.</i>	retrosp/aleatori	206	no	sí	parafina	Novocastra	grau	en Dukes C
Palmqvist R <i>et al.</i>	retrospectiu	89	sí	no	parafina	Transduction	inversa amb pT	p < 0.05
Rosati G <i>et al</i> (*)	retrospectiu	103	sí	no	parafina	Dako	Dukes C	NS
Tenjo T <i>et al.</i>	prospectiu	171	sí	sí	parafina	Transduction	pT, Dukes C, D	p < 0.05
Thomas GV <i>et al</i>	retrospectiu	36	no	sí	parafina	Transduction	Dukes D	p < 0.05
Yao J <i>et al</i>	retrospectiu	136	?	sí	parafina	Transduction	cap	sí (dada crua)

(*) Només Dukes B i C

Excloent de l'anàlisi de supervivència els tumors amb estadi de Dukes C-D i aplicant-lo només als carcinomes Dukes A-B, no vam constatar correlació entre expressió de p27 i supervivència global, coincidint la nostra observació amb la de Manne U *et al* (2004) i amb la de Schwandner *et al* (2002). Per tant, creiem que l'anàlisi d'expressió de p27 per mitjà immunohistoquímics no sembla tenir per ell mateix, valor pronòstic independent al de l'estadi de Dukes. Finalment, vam veure que l'expressió de p27 correlacionava amb una millor

supervivència lliure de malaltia en el grup de tumors que no havia rebut tractament amb quimioteràpia, tot suggerint que p27 podria ser útil com a marcador de resistència al tractament quimioteràpic.

P21 i P27

Donat que p21 i p27 són membres d'una mateixa família d'inhibidors de les quinases dependents de ciclins, vam voler estudiar si l'anàlisi conjunt d'ambdues proteïnes aporta més informació pronòstica que el de les dues proteïnes per separat. L'anàlisi combinat de p21 i p27 va mostrar, tant en l'anàlisi de supervivència univariant com en la multivariant si es prescindeix dels tumors Dukes D, que l'expressió d'ambdues proteïnes correlaciona amb una bona supervivència global, mentre que la pèrdua d'una sola de les dues proteïnes empitjora significativament el pronòstic. Amb tots els tumors inclosos, aquest segueix sent un bon test predictor de supervivència lliure de malaltia, i fins i tot de supervivència global si s'ajusta per l'estadi de Dukes dividit en dues categories (A-B1-B2/C1-C2-D), però en aquest cas, novament no queda clar si és pel valor intrínsec de les dues proteïnes o per influència dels tumors Dukes D. En tot cas, no hi ha diferències de supervivència entre la pèrdua d'una de les dues proteïnes i la pèrdua de les dues alhora.

Quan es va restringir l'anàlisi als tumors amb estadi de Dukes A-B, la correlació amb supervivència lliure de malaltia també es va mantenir. Per tant, pensem que en tumors amb estadi de Dukes baix, l'estudi immunohistoquímic combinat de p21 i p27 podria ser útil com a factor predictor de recidiva. Schwandner *et al.* (2002), després d'estudiar p21 i p27 en una sèrie de 97 carcinomes de recte Dukes A-B, van reportar que en l'anàlisi univariant, l'estadiatge tumoral i p21 eren els únics factors predictors de supervivència lliure de malaltia, però només l'estadiatge ho va ser per a supervivència global. En l'anàlisi multivariant fet per aquests autors, només l'estadiatge era un bon predictor tant per supervivència global com lliure de malaltia.

Aquest resultat coincideix amb el que hem comentat abans, quan hem parlat de l'estudi de supervivència només amb p21 i limitat als carcinomes de còlon i recte Dukes A-B (encara que en el nostre cas, el test de supervivència global va atansar-se més al nivell de significació) però difereix en quant a la valoració conjunta de les dues proteïnes.

CICLINA E

Respecte al valor de ciclina E com a factor pronòstic vam observar una correlació inversa entre el percentatge d'expressió nuclear d'aquesta proteïna i la supervivència global. De forma inesperada, els carcinomes amb immunoreacció per a ciclina E en més d'un 12% de nuclis van mostrar millor supervivència global que els carcinomes amb un percentatge d'expressió nuclear inferior a aquest llindar. Si bé la sobreexpressió de ciclina E ha estat considerada un marcador de mal pronòstic en diferents càncers humans, el valor pronòstic de la sobreexpressió de ciclina E sembla ser dependent del tipus de teixit. Per exemple, la pèrdua d'expressió de ciclina E s'ha associat amb mal pronòstic en carcinoma urotelial (Imai T *et al.*, 2001). Els nivells elevats de ciclina E en càncer de còlon podrien ser deguts més a inhibició de la via ubiquitin-proteasoma que a increment en els nivells de mRNA (Clurman BE *et al.*, 1996; Imai T *et al.*, 1996; Renyifo M *et al.*, 2001; Sutter T *et al.*, 2002). De fet, l'amplificació del gen de ciclina E és un esdeveniment important en alguns càncers, però no en càncer colorectal (Iitahara M *et al.*, 1995), on només s'observa ocasionalment. L'augment d'activitat de CD42 observat en càncer colorectal sembla més degut a disminució de p27 i p21 que a increment de ciclina E (Renyifo M *et al.*, 2001). D'altra banda, s'ha observat en càncer colorectal la presència d'isoformes de baix pes molecular de ciclina E, però que no semblen ser el resultat de formes alternatives de "splicing" del mRNA (Sutter T *et al.*, 2002). Yasui *et al.* va reportar en 1996 en una sèrie de més de 400 pacients, una correlació inversa entre la sobreexpressió de ciclina E i l'estadi tumoral, de manera que la sobreexpressió de ciclina E podria predir un comportament favorable

en carcinoma colorectal. En la seva sèrie l'expressió de ciclina E en tumors Dukes-Astler C o D va ser més baixa que en estadis inferiors. Aquesta observació suggeria que la sobreexpressió de ciclina E en càncer colorectal podria contribuir a la progressió i invasió incipient del carcinoma a través de la *muscularis mucosae*. Els nostres resultats semblen confirmar els de Yasui *et al.* donat que vam observar el percentatge més elevat de tumors positius per a ciclina E en el grup de tumors pT1 (n = 6), encara que sense arribar a una associació significativa. En canvi, la correlació entre disminució de l'expressió de ciclina E i presència de metàstasis viscerales (pM) va ser clara. Concretament, 18 (72.0%) dels 25 tumors amb metàstasi visceral al moment del diagnòstic tenien una expressió baixa de ciclina E. Un altre treball amb resultats en aquesta línia és el de Jia-Qing Li *et al.*, els quals van reportar que en el procés carcinogenètic, l'expressió de CD42 i ciclina E va augmentar de manera significativa; comparant el carcinoma primari amb els focus tumorals metastàsics als ganglis, ciclina E va romandre sense canvis però CD42 va augmentar considerablement; finalment, comparant el tumor primari amb les metàstasis hepàtiques, ciclina E va disminuir i CD42 es va reduir gairebé a zero. No són els càncers de còlon i recte els únics en què s'han trobat indicis de correlació inversa entre ciclina E i pronòstic. Takano Y *et al.*, van reportar en carcinoma gàstric, tant en l'anàlisi univariant com en la multivariant, que la sobreexpressió de ciclina E correlacionava amb diferenciació i bon pronòstic, atribuint-lo a un possible acúmulo de formes inactives de complexes ciclina E/CD42. Aquesta correlació entre ciclina E i diferenciació sembla coherent amb la nostra evidència de correlació entre ciclina E i p21.

Un treball que pot ajudar a entendre aquest resultat aparentment contradictori entre percentatge d'expressió nuclear de ciclina E i supervivència global és el publicat per Minella A *et al.* en 2002. En aquest, els autors van reportar que p53 i p21 actuen conjuntament per a evitar la deregulació de ciclina E-CD42. Es requeriria doncs, la pèrdua d'activitat de la via p53-p21 per a que alteracions en ciclina E tinguessin un efecte perniciosos. A aquest respecte, i avaluant

ciclina E segons el percentatge d'expressió nuclear, vam observar en el grup de tumors amb pèrdua d'expressió de ciclina E, una tendència cap a una millor supervivència global si p53 era "wild type" o amb mutació "no hot spot" que si tenia mutació en un "hot spot. De fet, la supervivència global en el grup de tumors amb poca expressió de ciclina E seguia sent pitjor que en el grup amb elevada expressió d'aquesta proteïna encara que aquest test s'estratificués segons l'estat mutacional de p53, o segons el nivell d'expressió de p21. Per tant, nosaltres no hem pogut demostrar dependència entre ciclina E i p53 o p21. El mateix va succeir avaluant ciclina E segons les tres categories que hem vingut utilitzant al combinar percentatge de nuclis positius amb intensitat d'expressió, de manera que entre els carcinomes amb expressió intensa de ciclina E vam observar una tendència cap a una pitjor supervivència global en presència de mutació "hot spot" de p53 que amb p53 "wild type" o amb mutació "no hot spot". Ni entre els carcinomes amb expressió dèbil (>12%) de ciclina E, ni entre aquells amb expressió nul·la o molt dèbil de la mateixa proteïna no es van observar diferències dependents de l'estat mutacional de p53, així com tampoc no es van observar agrupant aquest segon grup de carcinomes amb els que expressaven intensament ciclina E.

Malgrat tot el que acabem de comentar, vam intentar buscar un model d'expressió de ciclina E que s'ajustés al que es podia esperar "a priori" de l'estudi d'aquesta proteïna en quant a pronòstic. Amb aquesta finalitat vam avaluar ciclina E segons percentatge i intensitat d'expressió i vam dividir els tumors en les tres categories esmentades a l'apartat de resultats. Ajustant per Dukes i exclouent els carcinomes Dukes D, aquest pot ser un test amb valor pronòstic per a supervivència global. Els carcinomes amb expressió nul·la o molt intensa de ciclina E van mostrar pitjor supervivència global que els carcinomes amb expressió dèbil de ciclina E en més d'un 12% de nuclis. Afegir a aquesta anàlisi la d'expressió combinada de p21 i p27, gairebé no fa millorar el valor pronòstic per a supervivència global, però sí millora el valor

pronòstic per a supervivència lliure de malaltia. En qualsevol cas, encara considerem prematura l'aplicació d'aquesta anàlisi en la pràctica assistencial.

Pel que fa a la tècnica de l'array de teixits per a avaluar immunohistoquímica, cal tenir en compte que la pèrdua de cilindres de biòpsia durant el procés tècnic es situa al voltant del 25-30% de la mostra (Fernández PL *et al*). En el nostre cas, la pèrdua de mostra ha estat del 23.16% amb p27 (136 sobre 177 casos valorables sobre secció completa) i del 30.5% amb p21 (123 sobre 177 casos valorables sobre secció completa). Creiem que aquesta pèrdua de mostra pot no repercutir quan es tracta d'una proteïna amb expressió força generalitzada però sí que influeix en el resultat d'anàlisis basats en proteïnes d'expressió tan irregular com p21.

Com hem comentat en l'apartat de resultats, 16 i 22 tumors que havien estat considerats positius per p21 i p27 respectivament sobre talls sencers, van resultar negatius en el "tissue-array". En aquests casos, creiem que la pròpia heterogeneïtat dels carcinomes, pot haver fet coincidir zones amb poca expressió d'aquestes proteïnes amb els fragments representats en l'array. D'altra banda, 12 i 9 tumors considerats negatius per p21 i p27 respectivament en seccions senceres, van resultar positius amb l'arranjament de teixit. En aquests casos l'explicació pot ser semblant, però es tractaria d'heterogeneïtat entre diferents blocs de parafina d'un mateix tumor. Tampoc podem excloure la possibilitat de fallada de la tècnica sobre les seccions histològiques convencionals, malgrat que la mostra emprada com a control positiu hagués donat expressió correctament. Aquests tumors els vam considerar positius; només vam considerar negatius els tumors amb manca d'expressió amb les dues tècniques, la convencional i la de l'array. Com hem esmentat a l'apartat de resultats, les anàlisis amb els resultats combinats, van reforçar en tots els casos les tendències prèviament observades a partir de teixit sencer.

SÈRIE R0

Fins aquí, hem analitzat tota la informació que les diferents proteïnes estudiades ens podien proporcionar sobre el comportament biològic de la sèrie completa de carcinomes. Amb l'objectiu de valorar més clarament el valor de la informació sobre pronòstic que l'estudi d'aquestes proteïnes pot aportar en la pràctica assistencial, vam limitar la sèrie de casos als tumors operats amb finalitat curativa i en què la resecció quirúrgica va ser completa. Malgrat la reducció del poder estadístic de moltes de les anàlisis prèvies (especialment de p27 i p21 valorades conjuntament) deguda principalment a la disminució del número de casos, la determinació d'expressió de p21 mitjançant immunohistoquímica, així com l'estudi de les mutacions "hot spot" que afecten el L3-loop i el motiu LSH de p53, es van mantenir com uns bons marcadors pronòstics de supervivència global en l'anàlisi multivariant. I cal remarcar que, fins i tot la comparació entre la supervivència global dels tumors amb mutacions "hot spot" de p53 i la dels tumors amb p53 salvatge o amb altres mutacions, tot i no arribar a ser estadísticament significativa en l'anàlisi multivariant, va ser més informativa que l'estadi de Dukes en aquesta anàlisi.

CONCLUSIONS

6. SUMARI

1. L'anàlisi per immunohistoquímica de p53 en càncer colorectal, correlaciona bé amb l'estadi de Dukes però no dóna informació pronòstica.
2. De les tècniques d'anàlisi genòmic de p53 esmentades en aquesta tesi, només l'anàlisi de l'estat mutacional dels codons 245, 248, 273 i 282 té, en supervivència global, valor pronòstic independent de l'estadi de Dukes.
3. En adenocarcinomes colorectals ressecats amb finalitat curativa, l'anàlisi per immunohistoquímica de p21 és per si mateixa, un bon factor pronòstic per a supervivència global i lliure de malaltia, i podria ser un factor predictor de resposta al tractament amb quimioteràpia.
4. L'expressió de p27 analitzada mitjançant immunohistoquímica mostra una forta correlació amb supervivència global, però no té valor pronòstic independent al de l'estadi de Dukes.
5. Calen més estudis, i un millor coneixement de les interaccions i funcions de ciclina E per poder assumir el possible valor pronòstic per a supervivència global, de l'estudi immunohistoquímic d'aquesta proteïna.

Conclusions

7. CONCLUSIONS

A partir dels resultats obtinguts en aquesta tesi podem concloure:

1. En càncer de còlon i recte, l'anàlisi mitjançant tècniques moleculars dels codons **245**, **248**, **273** i **282** de **p53**, aporta informació pronòstica sobre supervivència global amb independència de l'estadi de Dukes.
2. L'estudi de **p21** mitjançant immunohistoquímica en carcinomes colorectals completament ressecats, és un mètode d'anàlisi relativament senzill i econòmic, el qual proporciona informació pronòstica amb independència de l'estadi de Dukes, i que podria ser utilitzat en la pràctica assistencial com a complement de l'estudi anatomopatològic habitual.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1) Adams PD, Sellers WR, Sharma SK, Wu AD, Nalin CM, Kaelin WG Jr (1996). Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol Cell Biol* Dec; 16(12):6623-33.
- 2) Akama Y, Yasui W, Yokozaki H, Kuniyasu H, Kitahara K, Ishikawa T, Tahara E (1995). Frequent amplification of the cyclin E gene in human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* Jul; 86(7):617-21.
- 3) Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* Nov 26; 93(24):13742-7.
- 4) Alt JR, Gladden AB, Diehl JA (2002). p21(Cip1) Promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. *J Biol Chem* Mar 8; 277(10):8517-23.
- 5) Arata Y, Fujita M, Ohtani K, Kijima S, Kato JY (2000). Cdk2-dependent and -independent pathways in E2F-mediated S phase induction. *J Biol Chem* Mar 3; 275(9):6337-45.
- 6) Bacchi CE, Gown AM (1991). Distribution and pattern of expression of villin, a gastrointestinal-associated cytoskeletal protein, in human carcinomas. A study employing paraffin-embedded tissue. *Lab invest* 64: 418-424.
- 7) Bandara LR, Buck VM, Zamanian M, Johnston LH, La Thangue NB (1993). Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. *EMBO J* Nov; 12(11):4317-24.
- 8) Barbacid M (1987). Ras genes *Annu Rev Biochem* 56:779-827.
- 9) Beckman G, Birgander R, Sjalander A, Saha N, Holmberg PA, Kivela A, Beckman L (1994). Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* Sep-Oct 44(5):266-70.
- 10) Bell SM, Scott N, Cross D, Sagar P, Lewis FA, Blair GE, Taylor GR, Dixon MF and Quirke P. (1993). Prognostic value of p53 overexpression and c-Ki-ras gene Mutations in Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 104: 57-64.
- 11) Belluco C, Esposito G, Bertorelle R, Del Mistro A, Fassina A, Vieceli G, Chieco-Bianchi L, Nitti D, Lise M (1999). Absence of the cell cycle inhibitor p27Kip1 protein predicts poor outcome in patients with stage I-III colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. Jan-Feb;6(1):19-25.
- 12) Benchimol S, Lamb P, Crawford LV, Sheer D, Shows TB, Bruns GA, Peacock J (1985). Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somat Cell Mol Genet* Sep; 11(5):505-10.
- 13) Berg JW, Howell MA. (1974). The geographic pathology of bowel cancer. *Cancer* 34:807-814.
- 14) Bergamaschi D, Gasco M, Hiller L, Sullivan A, Syed N, Trigiant G, Yulug I, Merlano M, Numico G, Comino A, Attard M, Reelfs O, Gusterson B, Bell AK, Heath V, Tavassoli M, Farrell PJ, Smith P, Lu X, Crook T (2003). p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell* Apr; 3(4):387-402.
- 15) Bertorelle R, Esposito G, Del Mistro A, Belluco C, Nitti D, Lise M and Chieco-Bianchi. (1995). Association of p53 gene and protein alterations with metastases in colorectal cancer. *Am J Surg Path* 19(4): 463-471.

- 16) Blain SW, Massague J (2002). Breast cancer banishes p27 from nucleus. *Nat Med* Oct; 8(10):1076-8.
- 17) Bleday R, Song J, Walker ES, Salcedo BF, Thomas P, Wilson RE, Chen LB, Steele G Jr (1986). Characterization of a new monoclonal antibody to a cell surface antigen on colorectal cancer and fetal gut tissues. *Cancer* 57:433-440.
- 18) Boehm M, Yoshimoto T, Crook MF, Nallamshetty S, True A, Nabel GJ, Nabel EG (2002). A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression. *EMBO J* Jul 1; 21(13):3390-401.
- 19) Buckley MF, Sweeney KJE, Hamilton JA, Sini RL, Manning DL, Nickolson RI, deFazio A, Watts CKW, Musgrove EA and Sutherland RL. (1993). Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene* 8: 2127-2133.
- 20) Cady B, Stone MD, Wayne J: Continuing trends in the prevalence of right-sided lesions among colorectal carcinomas. *Arch Surg* 128;505-509, 1993.
- 21) Campo E, Muñoz J, Miquei R, Palacin A, Cardesa A, Sloane BF, Emmert-Buck MR (1994). Cathepsin B expression in colorectal carcinomas correlatos with tumor progression and shortened patient survival. *Am J Pathol* 145:301-309.
- 22) Campo E, Palacín A, Benasco C, Quesada E, Cardesa A (1987). Human Chorionic gonadotropin in colorectal carcinoma. An immunohistochemical study. *Cancer* 59:1611-1616.
- 23) Capellà G, Cronauer-Mitra S, Peinado MA, Perucho M (1991). Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors. *Environ Health Perspect* Jun; 93:125-31.
- 24) Connelly JH, Robey-Cafferty SS, Cleary KR (1991). Mucinous carcinomas of the colon and rectum. An analysis of 62 stage B and C lesions. *Arch Pathol Lab Med*:1022-1025.
- 25) Caron de Fromental C and Soussi T. (1992). TP53 tumour suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chrom Cancer* 4: 1-15.
- 26) Chae T, Kwon YT, Bronson R, Dikkes P, Li E, Tsai LH (1997). Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron* Jan;18(1):29-42.
- 27) Chang BD, Watanabe K, Broude EV, Fang J, Poole JC, Kalinichenko TV, Roninson IB (2000). Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 11; 97(8):4291-6.
- 28) Chang F, Syrjanen S, Kurvinen K, Syrjanen K (1993). The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. *Am J Gastroenterol*. Feb; 88(2):174-86.
- 29) Chen J, Saha P, Kornbluth S, Dynlacht BD, Dutta A (1996). Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1. *Mol Cell Biol* Sep;16(9):4673-82.
- 30) Chen J, Jackson PK, Kirschner MW, Dutta A (1995). Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature* Mar 23; 374(6520):386-8.
- 31) Cheng JD, Werness BA, Babb JS and Meropol NJ (1999). Paradoxical correlations of cyclin-dependent kinase inhibitors p21waf1/cip1 and p27kip1 in metastatic colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 5:1057-1062.
- 32) Chiarle R, Budel LM, Skolnik J, Frizzera G, Chilosi M, Corato A, Pizzolo G, Magidson J, Montagnoli A, Pagano M, Maes B, De Wolf-Peeters C, Inghirami G (2000). Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood* Jan 15; 95(2):619-26.

- 33) Ciaparrone M, Yamamoto H, Yao Y, Sgambato A, Cattoretti G, Tomita N, Monden T, Rotterdam H, Weinstein IB (1998). Localization and expression of p27KIP1 in multistage colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* Jan 1; 58(1):114-22.
- 34) Clery AP, Dockerty MB, Waugh JM (1961). Small-cell carcinoma of the colon and rectum. A clinicopathologic study. *Arch Surg* 83:164-172.
- 35) Clurman BE, Sheaff RJ, Thress K, Groudine M, Roberts JM (1996). Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev* Aug 15; 10(16):1979-90.
- 36) Cohen AM, Tremterra S, Candela F, Thaler HT, Sigurdson ER (1991). Prognosis of node-positive colon cancer. *Cancer*. Apr 1; 67(7):1859-61.
- 37) Coqueret O (2003). New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* Feb; 13(2):65-70.
- 38) Coqueret O, Gascan H (2000). Functional interaction of STAT3 transcription factor with the cell cycle inhibitor p21WAF1/CIP1/SDI1. *Biol Chem* Jun 23; 275(25):18794-800.
- 39) Cordon-Cardo C. (1995). Mutations of cell cycle regulators: biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* 147: 545-560.
- 40) Coverley D, Laman H, Laskey RA (2002). Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation. *Nat Cell Biol* Jul;4(7):523-8.
- 41) Deed RW, Hara E, Atherton GT, Peters G, Norton JD (1997). Regulation of Id3 cell cycle function by Cdk-2-dependent phosphorylation. *Mol Cell Biol* Dec; 17(12):6815-21.
- 42) Demetrick DJ, Matsumoto S, Hannon GJ, Okamoto K, Xiong Y, Zhang H, Beach DH (1995). Chromosomal mapping of the genes for the human cell cycle proteins cyclin C (CCNC), cyclin E (CCNE), p21 (CDKN1) and KAP (CDKN3). *Cytogenet Cell Genet*; 69(3-4):190-2.
- 43) Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* Aug 25; 82(4):675-84.
- 44) Dix B, Robbins P, Carrello S, House A and Iacopetta B. (1994). Comparison of p53 gene mutation and protein overexpression in colorectal carcinomas. *Br. J. Cancer* 70: 585- 590.
- 45) Doglioni C, Pelosio P, Laurino L, Macri E, Meggiolaro E, Favretti F and Barbareschi M. (1996). P21^{WAF1/CIP1} expression in normal mucosa and in adenomas and adenocarcinomas of the colon: its relationship with differentiation. *J. Pathol* 179: 248-253.
- 46) Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* Mar 19; 356(6366):215-21.
- 47) Dong Y, Chi SL, Borowsky AD, Fan Y, Weiss RH (2004). Cytosolic p21Waf1/Cip1 increases cell cycle transit in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal* Feb; 16(2):263-9.
- 48) Dukes CE. (1932). The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol* 35: 323- 332.
- 49) Dupont J, Karas M, LeRoith D (2003). The cyclin-dependent kinase inhibitor p21CIP/WAF is a positive regulator of insulin-like growth factor I-induced cell proliferation in MCF-7 human breast cancer cells. *J Biol Chem* Sep 26; 278(39):37256-64.

- 50) El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW and Vogelstein B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppressor. 1993; Cell 75: 817-825.
- 51) El-Deiry WS, Tokino T and Waldman T, (1995). Topological control of p21^{WAF1/CIP1} expression in normal and neoplastic tissues. Cancer Res 55: 2910-2919.
- 52) Ernst C, Thurin J, Atkinson B, Wurzel H, Herlyn M, Stromberg N, Civin C, Koprowski H (1984). Monoclonal antibody localization of A and B isoantigens in normal and malignant fixed human tissues. Am J Pathol 117:451-461.
- 53) Esposito V, Baldi A, De Luca A, Groger AM, Loda M, Giordano GG, Caputi M, Baldi F, Pagano M, Giordano A (1997). Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. Cancer Res Aug 15; 57(16):3381-5.
- 54) Esteban JM, Paxton R, Mehta P, Battifora H, Shively JE. (1993). Sensitivity and specificity of Gold types 1 to 5 anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibodies. Immunohistologic characterization in colorectal and normal tissues. Hum Pathol 24:322-328.
- 55) Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, et al. (1990). Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. Science 247 (4938): 49-56.
- 56) Fero ML, Randel E, Gurley KE, Roberts JM, Kemp CJ (1998). The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. Nature Nov 12; 396(6707):177-80.
- 57) Fornace AJ Jr, Nebert DW, Hollander MC, Luethy JD, Papanthasiou M, Fargnoli J, Holbrook NJ (1989). Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. Mol Cell Biol Oct; 9(10):4196-203.
- 58) Fredersdorf S, Burns J, Milne AM, Packham G, Fallis L, Gillet CE, Royds JA, Peston D, Hall PA, Hanby AM, Barnes DM, Shousha S, O'Hare MJ, Lu X. (1997). High level expression of p27 (kip 1) and cyclin D1 in some human breast cancer cells: Inverse correlation between the expression of p27 (kip 1) and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers. Proc Natl Acad Sci USA 94: 6380-6385.
- 59) Furstenthal L, Kaiser BK, Swanson C, Jackson PK (2001). Cyclin E uses Cdc6 as a chromatin-associated receptor required for DNA replication. J Cell Biol. Mar 19; 152(6):1267-78.
- 60) Gafa R, Maestri I, Matteuzzi M, Santini A, Ferretti S, Cavazzini L, Lanza G (2000). Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability. Cancer. Nov 15; 89(10):2025-37.
- 61) Gaffey MJ, Mills SE, Lack EE (1990). Neuroendocrine carcinoma of the colon and rectum. A clinicopathologic, ultrastructural, and immunohistochemical study of 24 cases. Am J Surg Pathol 14:1010-1023.
- 62) Gao X, Honn KV, Grignon D, Sakr W, Chen YQ. Frequent loss of expression and loss of heterozygosity of the putative tumor suppressor gene DCC in prostatic carcinomas. 1993. Cancer Res. Jun 15; 53(12): 2723-7.
- 63) Garcia-Peche P, Vazquez-Prado A, Fabra-Ramis R, Trullenque-Peris R (1991). Factors of prognostic value in long-term survival of colorectal cancer patients. Hepatogastroenterology. Oct; 38(5):438-43.
- 64) Garin Chesa P, Rettig WJ, Melamed MR (1986). Expression of cytokeratins in normal and neoplastic colonic cells. Implications for cellular differentiation and carcinogenesis. Am J Surg Pathol 10: 829-835.

- 65) Geller JI, Szekely-Szucs K, Petak I, Doyle B, Houghton JA (2004). P21Cip1 is a critical mediator of the cytotoxic action of thymidylate synthase inhibitors in colorectal carcinoma cells. *Cancer Res.* Sep 1;64(17):6296-303.
- 66) Gemignani F, Moreno V, Landi S, Moullan N, Chabrier A, Gutierrez-Enriquez S, Hall J, Guino E, Peinado MA, Capella G, Canzian F (2004). A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. *Oncogene.* 2004 Mar 11;23(10):1954-6.
- 67) Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Schneider JE, Bhattacharya S, Rideout WM, Bronson RT, Gardner H, Sicinski P (2003). Cyclin E ablation in the mouse. *Cell.* Aug 22; 114(4):431-43.
- 68) Gilbertsen VA, Nelms JM. (1978). The prevention of invasive cancer of the rectum. *Cancer* 41: 1137-1139.
- 69) Gilbertsen VA. (1974). Proctosigmoidoscopy and polypectomy in reducing the incidence of rectal cancer. *Cancer* 34: 936-939.
- 70) Gima T, Kato H, Honda T, Imamura T, Sasazuki T, Wake N. DCC gene alteration in human endometrial carcinomas. *Int J Cancer.* 1994 May 15; 57 (4): 480-5.
- 71) Girlando S, Slomp P, Caffo O, Amichetti M, Togni R, Dvornik G, Tomio L, Galligioni E, Dalla Palma P and Barbareschi M. (1999) p21 Expression in colorectal carcinomas: a study on 103 cases with analysis of p53 gene mutation/ expression and clinic- pathological correlations. *Virchow Arch* 435: 559-565.
- 72) Girling R, Partridge JF, Bandara LR, Burden N, Totty NF, Hsuan JJ, La Thangue NB (1993). A new component of the transcription factor DRTF1/E2F. *Nature* Sep 30; 365(6445):468.
- 73) Goh H-S, Yao J and Smith D.R. (1995). P53 point mutation and survival in colorectal cancer patients. *Cancer Res* 55: 5217- 5221.
- 74) Gorospe M, Wang X, Guyton KZ, Holbrook NJ (1996). Protective role of p21(Waf1/Cip1) against prostaglandin A2-mediated apoptosis of human colorectal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* Dec; 16(12):6654-60.
- 75) Grizzle WE, Manne U, Jhala NC, Weiss HL (2001). Molecular characterization of colorectal neoplasia in translational research. *Arch Pathol Lab Med* Jan; 125(1):91-8.
- 76) Guadagni F, Roselli M, Amato T, Cosimelli M, Mannella E, Tedesco M, Grassi A, Casale V, Cavaliere F, Greiner JW, et al (1991). Clinical evaluation of serum tumor-associated glycoprotein-72 as a novel tumor marker for colorectal cancer patients. *J Surg Oncol Suppl* 2:16-20.
- 77) Guadagni F, Roselli M, Cosimelli M, Spila A, Cavaliere F, Tedesco M, Arcuri R, Abbolito MR, Casale V, Pericoli MN, Vecchione A, Casciani CU, Greiner JW, Schlom J (1996). Correlation between tumor-associated glycoprotein 72 mucin levels in tumor and serum of colorectal patients as measured by the quantitative CA 72-4 immunoassay. *Cancer Res* Nov 15; 56(22):5293-8.
- 78) Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. 1996. *Science.* Jan 19; 271 (5247): 350-3.
- 79) Hamelin R, Laurent- Puig P, Olschwang S, Jego N, Asselain B, Remvikos Y, Girodet J, Salmon R. J and Thomas G. (1994). Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 106: 42-48.
- 80) Hannon GJ, Beach D (1994). P15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* Sep 15; 371(6494):257-61.

- 81) Hara E, Hall M, Peters G (1997). Cdk2-dependent phosphorylation of Id2 modulates activity of E2A-related transcription factors. *EMBO J* Jan 15; 16(2):332-42.
- 82) Harris TE, Albrecht JH, Nakanishi M, Darlington GJ (2001). CCAAT/enhancer-binding protein- α cooperates with p21 to inhibit cyclin-dependent kinase-2 activity and induces growth arrest independent of DNA binding. *J Biol Chem* Aug 3; 276(31):29200-9.
- 83) Harris CC, Hollstein M (1993). Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* Oct 28; 329(18):1318-27.
- 84) Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P (1998). Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 β . *Curr Biol* May 7; 8(10):573-81.
- 85) Heichman KA and Roberts JM. (1994). Rules to replicate by. *Cell* 79: 557-562.
- 86) Hengst L and Reed SI. (1996). Translation control of p27^{kip-1} accumulation during the cell cycle. *Science* 271: 1861-1864.
- 87) Hernández FJ, Reid JD (1969). Mixed carcinoid and mucus-secreting intestinal tumors. *Arch Pathol* 88:489-496.
- 88) Hickey WF, Seiler MW (1981). Ultrastructural markers of colonic adenocarcinoma. *Cancer* 47:140-145.
- 89) Hill MJ. (1974). Bacteria and the etiology of colonic cancer. *Cancer* 34: 815-818.
- 90) Hiyama H, Iavarone A, Reeves SA (1998). Regulation of the cdk inhibitor p21 gene during cell cycle progression is under the control of the transcription factor E2F. *Oncogene* Mar 26;16(12):1513-23.
- 91) Hock YL, Scott KW, Grace RH (1993). Mixed adenocarcinoma/carcinoid tumour of large bowel in a patient with Crohn disease. *J Clin Pathol* 46:183-185.
- 92) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B and Harris CC. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53.
- 93) Horn RC Jr (1949). Carcinoid tumors of the colon and rectum. *Cancer* 2:819-837.
- 94) Horny H-P, Horst H-A. (1987). Lymphoreticular infiltrates in adenocarcinoma of the large intestine. *Pathol Res Pract* 182: 222-227.
- 95) Hunter T and Pines J. (1994). Cyclins and cancer II: cyclin D and cdk inhibitors come of age. *Cell* 79: 573-582.
- 96) Ionov Y, Matsui S, Cowell JK (2004). A role for p300/CREB binding protein genes in promoting cancer progression in colon cancer cell lines with microsatellite instability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 3; 101(5):1273-8.
- 97) Itoh F, Hinoda Y, Ohe M, Ohe Y, Ban T, Endo T, Imai K, Yachi A. Decreased expression of DCC mRNA in human colorectal cancers. 1993. *Int J Cancer*. Jan 21; 53 (2): 260-3.
- 98) Jackman M, Kubota Y, den Elzen N, Hagting A, Pines J (2002). Cyclin A- and cyclin E-Cdk complexes shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *Mol Biol Cell* Mar; 13(3):1030-45.
- 99) Jass JR (1986). Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J Clin Pathol*. Jun; 39(6):585-9.
- 100) Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu ZF, Levitt RC, Sistonen P, Kinzler KW, Vogelstein B, Hamilton SR (1994). Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med*. Jul 28; 331(4):213-21.
- 101) Jiang W, Kahn CM, Tomita N, Zhang YJ, Lu SH and Weinstein IB. (1992). Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. *Cancer Res* 52: 2980-2983.

- 102) Jinno S, Suto K, Nagata A, Igarashi M, Kanaoka Y, Nojima H, Okayama H (1994). Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *EMBO J* Apr 1;13(7):1549-56.
- 103) Kaplan EL and Meier P (1958). Non parametric estimation from incomplete observation. *J Am Stat Assoc* 53: 457-481.
- 104) Kawamata N, Morosetti R, Miller CW, Park D, Spirin K, Nakamati T, Takeuchi S, Hatta Y, Simpson J, Wilczynski S, Lee Y, Bartram C and Koeffler H. (1995). Molecular analysis of the cyclin dependent kinase inhibitor p27/kip1 in human malignancies. *Cancer Res* 55: 2266-2269.
- 105) Kearsey JM, Coates PJ, Prescott AR, Warbrick E, Hall PA (1995). Gadd45 is a nuclear cell cycle regulated protein which interacts with p21Cip1. *Oncogene* Nov 2; 11(9):1675-83.
- 106) Kelly BL, Wolfe KG, Roberts JM. Identification of a substrate-targeting domain in cyclin E necessary for phosphorylation of the retinoblastoma protein (1998). *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 3; 95(5):2535-40.
- 107) Keyomarsi K and Pardee AB (1993). Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 90: 1112-1116.
- 108) Keyomarsi K, O'Leary N, Molnar G, Lees E, Fingert HJ and Pardee AB. (1994). Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Res* 54: 380-385.
- 109) King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW (1996). How proteolysis drives the cell cycle. *Science* Dec 6; 274(5293):1652-9.
- 110) Kitahara K, Yasui W, Kuniyasu H, Yokozaky H, Akama Y, Yunotani S, Hisatsugu T and Tahara E (1995). Concurrent amplification of cyclin E and cdk2 genes in colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 62: 25-28.
- 111) Kitaura H, Shinshi M, Uchikoshi Y, Ono T, Iguchi-Arigo SM, Ariga H (2000). Reciprocal regulation via protein-protein interaction between c-Myc and p21(cip1/waf1/sdi1) in DNA replication and transcription. *J Biol Chem* Apr 7; 275(14):10477-83.
- 112) Klug TL, Sattler MA, Colcher D, Schlom J (1986). Monoclonal antibody immunoradiometric assay for an antigenic determinant (CA 72) on a novel pancreatic carcinoma antigen (TAG-72). *Int J Cancer* Nov 15; 38 (5):661-9.
- 113) Knoblich JA, Sauer K, Jones L, Richardson H, Saint R and Lehner CF. (1994). Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* 77: 107-120.
- 114) Knudson AG Jr (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* Apr; 68 (4):820-3.
- 115) Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge SJ, Nishimoto T, Morgan DO, Franza BR and Roberts JM (1992). Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science (Wash.)* 257: 1689-1694.
- 116) Kuramoto S, Oohara T (1989). Flat early cancers of the large intestine. *Cancer* Aug 15; 64 (4):950-5.
- 117) LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* Apr 1; 11(7):847-62.
- 118) Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, Oddoux C, Ostrer H, Giardiello FM, Hamilton SR, Hampel H, Markowitz A, Klimstra D, Jhanwar S, Winawer S, Offit K, Luce MC, Kinzler KW, Vogelstein B (1997). Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nat Genet. Sep; 17(1):79-83.*

- 119) Langerod A, Bukholm IR, Bregard A, Lonning PE, Andersen TI, Rognum TO, Meling GI, Lothe RA and Borresen-Dale A-L (2002). The TP53 Codon 72 polymorphism may affect the function of TP53 mutations in breast carcinomas but not in colorectal carcinomas. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 11: 1684-1688.
- 120) Leclerc V, Leopold P (1996). The cyclin C/Cdk8 kinase. *Prog Cell Cycle Res.* 2:197-204.
- 121) Levin B. (1992). Nutrition and colorectal cancer. *Cancer* 70: 1723-1726.
- 122) Levine AJ, Perry ME, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M and Welsh D (1994). The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *Br. J. Cancer* 69: 409-416.
- 123) Lew J, Huang QQ, Qi Z, Winkfein RJ, Aebersold R, Hunt T, Wang JH (1994). A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* Sep 29; 71(6496):423-6.
- 124) Li FP, Garber JE, Friend SH, Strong LC, Patenaude AF, Juengst ET, Reilly PR, Correa P, Fraumeni JF Jr (1992). Recommendations on predictive testing for germ line p53 mutations among cancer-prone individuals. *J Natl Cancer Inst* Aug 5; 84(15):1156-60.
- 125) Li JQ, Miki H, Ohmori M, Wu F, Funamoto Y (2001). Expression of cyclin E and cyclin-dependent kinase 2 correlates with metastasis and prognosis in colorectal carcinoma. *Hum Pathol.* Sep;32(9):945-53.
- 126) Li GQ, Zhang HF (2004). Mad2 i p27 expression profiles in colorectal cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 10(21): 3218-3220.
- 127) Listrom MB, Little JV, McKinley M, Fenoglio-Preiser CM (1989). Immunoreactivity of tumor-associated glycoprotein (TAG-72) in normal, hyperplastic, and neoplastic colon. *Hum Pathol* 20:994-1000.
- 128) Liu M, Iavarone A, Freedman LP (1996). Transcriptional activation of the human p21(WAF1/CIP1) gene by retinoic acid receptor. Correlation with retinoid induction of U937 cell differentiation. *J Biol Chem* Dec 6; 271(49):31723-8.
- 129) Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M (1997). Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* Feb; 3(2):231-4.
- 130) Loy TS, Cataluce RD (1994). Utility of cytokeratin immunostaining in separating pulmonary adenocarcinomas from colonic adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol* 102:764-767.
- 131) Ludlow JW, Glendening CL, Livingston DM, DeCarprio JA (1993). Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* Jan; 13(1):367-72.
- 132) Luo Y, Hurwitz J, Massague J (1995). Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* May 11; 375(6527):159-61.
- 133) Manne U, Jhala NC, Jones J, Weiss HL, Chatla C, Meleth S, Suarez-Cuervo C and Grizzle WE (2004). Prognostic significance of p27^{kip-1} expression in colorectal adenocarcinomas is associated with tumor stage. *Clin Cancer Res* 10:1743-1752.
- 134) Marin MC, Jost CA, Brooks LA, Irwin MS, O'Nions J, Tidy JA, James N, McGregor JM, Harwood CA, Yulug IG, Vousden KH, Allday MJ, Gusterson B, Ikawa S, Hinds PW, Crook T, Kaelin WG Jr (2000). A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat Genet* May;25(1):47-54.

- 135) Martin-Caballero J, Flores JM, Garcia-Palencia P, Serrano M (2001). Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res* Aug 15; 61(16):6234-6238.
- 136) Marx J (1994). New link found between p53 and DNA repair. *Science* Nov 25; 266(5189):1321-2.
- 137) Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato JY (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* Mar; 14(3):2066-76.
- 138) Minsky B, Mies C (1989). The clinical significance of vascular invasion in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* Sep; 32(9):794-803.
- 139) Mitra J, Day CH Y, Somasundaram K, El-Deiry W, Satyamoorthy K, Herlyn M and Enders G. (1999). Induction of p21^{WAF1/CIP1} and Inhibition of Cdk2 Mediated by the Tumor Suppressor p16^{INK4a}. *Mol. Cell. Biol.* 19 (5): 3916- 3928.
- 140) Miyake K, Inokuchi K, Dan K, Nomura T. 1993. Alterations in the deleted in colorectal carcinoma gene in human primary leukemia. *Blood.* Aug 1; 82 (3): 927-30.
- 141) Miyake S, Nagai K, Yoshino K, Oto M, Endo M, Yuasa Y (1994). Point mutations and allelic deletion of tumor suppressor gene DCC in human esophageal squamous cell carcinomas and their relation to metastasis. *Cancer Res.* Jun 1; 54 (11): 3007-10.
- 142) Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell.* Jun 26; 69(7):1237-45.
- 143) Moore JD, Yang J, Truant R, Kornbluth S (1999). Nuclear import of Cdk/cyclin complexes: identification of distinct mechanisms for import of Cdk2/cyclin E and Cdc2/cyclin B1. *J Cell Biol* Jan 25; 144(2):213-24.
- 144) Mori M, Mimori K, Shiraiishi T, Tanaka S, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T (1997). P27 expression and gastric carcinoma. *Nat Med* 3 (6): 593.
- 145) Mumberg D, Wick M, Burger C, Haas K, Funk M, Muller R (1997). Cyclin ET, a new splice variant of human cyclin E with a unique expression pattern during cell cycle progression and differentiation. *Nucleic Acids Res* Jun 1; 25(11):2098-105.
- 146) Murty VV, Li RG, Houldsworth J, Bronson DL, Reuter VE, Bosl GJ, Chaganti RS. 1994. Frequent allelic deletions and loss of expression characterize the DCC gene in male germ cell tumors. *Oncogene.* Nov; 9 (11): 3227-31.
- 147) Muller D, Thieke K, Burgin A, Dickmanns A, Eilers M (2000). Cyclin E-mediated elimination of p27 requires its interaction with the nuclear pore-associated protein mNPAP60. *EMBO J* May 15; 19(10):2168-80.
- 148) Nakamura M, Katano M, Fujimoto K, Morisaki T (1997). A new prognostic strategy for gastric carcinoma: mRNA expression of tumor growth-related factors in endoscopic biopsy specimens. *Ann Surg* Jul; 226(1):35-42.
- 149) Nakanishi M, Robetorye RS, Pereira-Smith OM, Smith JR (1995). The C-terminal region of p21SDI1/WAF1/CIP1 is involved in proliferating cell nuclear antigen binding but does not appear to be required for growth inhibition. *J Biol Chem.* Jul 21; 270(29):17060-3.
- 150) Nakayama T, Watanabe M, Katsumata T, Teramoto T, Kitajima M (1995). Expression of sialyl Lewis(a) as a new prognostic factor for patients with advanced colorectal carcinoma. *Cancer.* Apr 15; 75(8):2051-6.
- 151) Nigg EA (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays.* 1995 Jun;17(6):471-80.

- 152) Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* May; 15(5):2612-24.
- 153) Ordóñez NG, Luna MA (1984). Choriocarcinoma of the colon. *Am J Gastroenterol* 79:39-42.
- 154) Pagano M, Draetta G and Jansen-Durr P. (1992). Association of cdk2 kinase with the transcription factor E2F during S phase. *Science* 255: 1144-1147.
- 155) Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Sal GD, Chau V, Yew PR, Draetta GF & Rolfe M. (1995). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269: 682-685.
- 156) Palmqvist R, Stenling R, Öberg A and Landberg G (1999). Prognostic significance of p27^{kip1} expression in colorectal cancer: a clinico-pathological characterization. *J Pathol* 188:18-23.
- 157) Pasz-Walczak G, Kordek R, Faflik M. (2001). Inverse correlation between P53 and P21 (WAF1)-immunopositivity and between P21 (WAF1). *Pathol Res Pract.* 197(10):683-9.
- 158) Philipp-Staheli J, Payne SR, Kemp CJ (2001). p27(Kip1): regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer. *Exp Cell Res Mar* 10; 264(1):148-68.
- 159) Piva R, Cancelli I, Cavalla P, Bortolotto S, Dominguez J, Draetta GF, Schiffer D (1999). Proteasome-dependent degradation of p27/kip1 in gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* Jul; 58(7):691-6.
- 160) Ponce-Castañeda MV, Lee M, Latres E, Polyak K, Lacombe L, Montgomery K, Mathew K, Krauter K, Sheinfeld J, Massague J and Cordon-Cardo (1995). P27^{kip-1}: Chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumours. *Cancer Res* 55: 1211-1214.
- 161) Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV and Lane DP (1990). P53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci* 87: 7555-7559.
- 162) Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* Oct 17; 234(4774):364-8.
- 163) Ropponen KM, Kellokoski JK, Lipponen P, Pietilainen T, Eskelinen M, Alhava E and Kosma V-M (1999) p21/ WAF1 expression in human colorectal carcinoma: association with p53, transcription factor AP-2 and prognosis. *Br J Cancer* 81(1): 133-140.
- 164) Rosai J (1996). *Ackerman's Surgical Pathology*. Vol 1:768-781.
- 165) Rosati G, Chiacchio R, Reggiardo G, De Sanctis D, Manzione L. (2004). Thymidylate synthase expression, p53, bcl-2, Ki-67 and p27 in colorectal cancer: relationships with tumor recurrence and survival. *Tumor Biology* 25:258-263.
- 166) Russo A, Migliavacca M, Zanna I, Valerio MR, Latteri MA, Grassi N, Pantuso G, Salerno S, Dardanoni G, Albanese I, La Farina M, Tomasina RM, Gebbia N and Bazan V. (2002). P53 mutations in L3-loop zinc-binding domain, DNA-ploidy, and S phase fraction are independent prognostic indicators in colorectal cancer: A prospective study with a five-year follow-up. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 11: 1322-1331.
- 167) Sakurai T, Itoh K, Higashitsuji H, Nagao T, Nonoguchi K, Chiba T, Fujita J (2004). A cleaved form of MAGE-A4 binds to Miz-1 and induces apoptosis in human cells. *J Biol Chem* Apr 9;279(15):15505-14.

- 168) Sarnow P, Ho Y. S, Williams J and Levine A.J. (1982). Adenovirus E1b-58 kd tumor antigen and SV-40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 28: 387-394.
- 169) Sata T, Roth J, Zuber C, Stamm B, Heitz PU (1991). Expression of alpha 2,6-linked sialic acid residues in neoplastic but not in normal human colonic mucosa. A lectin-gold cytochemical study with *Sambucus nigra* and *Maackia amurensis* lectins. *Am J Pathol* 139:1435-1448.
- 170) Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ and Howley PM. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus 16 or 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63: 1129-1136.
- 171) Schiller JH, Adak S, Feins RH, Keller SM, Fry WA, Livingston RB, Hammond ME, Wolf B, Sabatini L, Jett J, Kohman L, Johnson DH (2001). Lack of prognostic significance of p53 and K-ras mutations in primary resected non-small-cell lung cancer on E4592: a Laboratory Ancillary Study on an Eastern Cooperative Oncology Group Prospective Randomized Trial of Postoperative Adjuvant Therapy. *J Clin Oncol* 15;19(2): 448-57
- 172) Schoentag R, Williams V, Kuhns W (1984). The distribution of blood group substance H and CEA in colorectal carcinoma. *Cancer* 53:503-509.
- 173) Schwandner O, Bruch HP, Broll R. (2002). P21, p27, cyclin D1, and p53 in rectal cancer: immunohistology with prognostic significance? *Int J Colorectal Dis.* Jan;17(1):11-9.
- 174) Schwandner O, Bruch HP, Broll R. (2002). Univariate analysis showed that gender, UICC stage, p21 and p27 were significantly associated with the incidence of distant metastases. *Eur Surg Res.* Nov-Dec;34(6):389-96.
- 175) Scott N, Sagar P, Stewart J, Blair GE, Dixon MF and Quirke P. (1991). p53 in colorectal cancer: clinicopathological correlation and prognostic significance. *Br J Cancer* 63: 317-319.
- 176) Seghezzi W, Chua K, Shanahan F, Gozani O, Reed R, Lees E (1998). Cyclin E associates with components of the pre-mRNA splicing machinery in mammalian cells. *Mol Cell Biol* Aug; 18(8):4526-36.
- 177) Seoane J, Le HV, Massague J (2002). Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* Oct 17; 419(6908):729-34.
- 178) Sweeney KJ, Swarbrick A, Sutherland RL, Musgrove EA (1998). Lack of relationship between CDK activity and G1 cyclin expression in breast cancer cells. *Oncogene.* Jun 4; 16(22):2865-78.
- 179) Sewing A, Ronicke V, Burger C, Funk M, Muller R (1994). Alternative splicing of human cyclin E. *J Cell Sci* Feb;107 (Pt 2):581-8.
- 180) Shanahan F, Seghezzi W, Parry D, Mahony D, Lees E (1999). Cyclin E associates with BAF155 and BRG1, components of the mammalian SWI-SNF complex, and alters the ability of BRG1 to induce growth arrest. *Mol Cell Biol* Feb; 19(2):1460-9.
- 181) Sherr CJ and Roberts JM. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9: 1149-63.
- 182) Sherr CJ (1995). Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression. *Proc Assoc Am Physicians* Jul; 107(2):181-6.
- 183) Shiohara M, el-Deiry WS, Wada M, Nakamaki T, Takeuchi S, Yang R, Chen DL, Vogelstein B, Koeffler HP (1994) Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood* Dec 1; 84(11):3781-4.

- 184) Simon B, Weinel R, Hohne M, Watz J, Schmidt J, Kortner G, Arnold R. Frequent alterations of the tumor suppressor genes p53 and DCC in human pancreatic carcinoma. 1994. *Gastroenterology*. Jun; 106 (6): 1645-51.
- 185) Singh SP, Lipman J, Goldman H, Ellis FH Jr, Aizenman L, Cangi MG, Signoretti S, Chiaur DS, Pagano M, Loda M (1998). Loss or altered subcellular localization of p27 in Barrett's associated adenocarcinoma. *Cancer Res* Apr 15; 58(8):1730-5.
- 186) Slater G, Papatestas AE, Tartter PI, Mulvihill M, Aufses AH Jr: Age distribution of right- and left-sided colorectal cancers. *Am J Gastroenterol* 77: 63-66, 1982.
- 187) Slebos RJC, Baas IO, Clement M, Polak M, Mulder J-W, Van den Berg FM, Hamilton SR and Offerhaus GJA (1996) Clinical and pathological associations with p53 tumour- suppressor gene mutations and expression of p21^{WAF1/Cip1} in colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 74: 165-175.
- 188) Smith DM, Haggitt RC (1984). The prevalence and prognostic significance of argyrophil cells in colorectal carcinomas. *Am J Surg Pathol* 8:123-128.
- 189) Smith DR, Ji C-Y and Goh H-S. (1996). Prognostic significance of p53 overexpression and mutation in colorectal adenocarcinomas. *Br. J. Cancer* 74: 216-223.
- 190) Snowden AW, Anderson LA, Webster GA, Perkins ND (2000). A novel transcriptional repression domain mediates p21(WAF1/CIP1) induction of p300 transactivation. *Mol Cell Biol* Apr; 20(8):2676-86.
- 191) Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory J and Schlichtholz B. (1994). Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int. J. Cancer* 57: 1-9.
- 192) Stephansson T, Ekblom A, Sparen P, Pahlman L: Increased risk of left sided colon cancer in patients with diverticular disease. *Gut* 34: 499-502, 1993.
- 193) Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* May 21; 393(6682):229-34.
- 194) Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW (1993). Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* Dec 10; 262(5140):1734-7.
- 195) Suzuki A, Tsutomi Y, Akahane K, Araki T, Miura M (1998). Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. *Oncogene* Aug 27;17(8):931-9.
- 196) Symonds DA, Vickery AL Jr (1976). Mucinous carcinoma of the colon and rectum. *Cancer* 37:1891-1900.
- 197) Tada M, Furuuchi K, Kaneda M, Matsumoto J, Takahashi M, Hirai A, Mitsumoto Y, Iggo RD, Moriuchi T (2001). Inactivate the remaining p53 allele or the alternate p73? Preferential selection of the Arg72 polymorphism in cancers with recessive p53 mutants but not transdominant mutants. *Carcinogenesis* Mar; 22(3):515-7.
- 198) Takano Y, Kato Y, van Diest PJ, Masuda M, Mitomi H, Okayasu I. (2000) Cyclin D2 overexpression and lack of p27 correlate positively and cyclin E inversely with a poor prognosis in gastric cancer cases. *Am J Pathol*. Feb;156(2): 585-94.
- 199) Tan TH, Wallis J, Levine AJ (1986). Identification of the p53 protein domain involved in formation of the simian virus 40 large T-antigen-p53 protein complex. *J Virol*. 1986 Sep;59(3):574-83.

- 200) Tassan JP, Jaquenoud M, Fry AM, Frutiger S, Hughes GJ, Nigg EA (1995). In vitro assembly of a functional human CDK7-cyclin H complex requires MAT1, a novel 36 kDa RING finger protein. *EMBO J* Nov 15; 14(22):5608-17.
- 201) Taules M, Rodriguez-Vilarrupla A, Rius E, Estanyol JM, Casanovas O, Sacks DB, Perez-Paya E, Bachs O, Agell N (1999). Calmodulin binds to p21(Cip1) and is involved in the regulation of its nuclear localization. *J Biol Chem* Aug 27; 274(35):24445-8.
- 202) Tenjo T, Toyoda M, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T, Tanaka K, Ohtani M, Nohara T, Kawasaki H, Tanigawa N (2000). Prognostic significance of p27^{kip1} protein expression and spontaneous apoptosis in patients with colorectal adenocarcinomas. *Oncology* 58:45-51.
- 203) Thomas CR Jr, Jarosz R, Evans N: Racial differences in the anatomical distribution of colon cancer. *Arch Surg* 127: 1241-1245, 1992.
- 204) Thomas GV, Szigeti K, Murphy M, Draetta G, Pagano M and Loda M. (1998). Down-regulation of p27 is associated with development of colorectal adenocarcinoma metastases. *Am J Pathol* 153: 681-687.
- 205) Thompson DMP, Krupcey J, Freedman SO, Gold P. (1969). The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Proc Natl Acad Sci USA* 64: 161-167.
- 206) Tomoda H and Kakeji Y. (1995). Immunohistochemical analysis of p53 in colorectal cancer regarding clinicopathological correlation and prognostic significance. *J S Onc* 58: 125-128.
- 207) Tsai LH, Delalle I, Caviness VS Jr, Chae T, Harlow E (1994). p53 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* Sep 29; 371(6496):419-23.
- 208) Tsihlias J, Kapusta L and Slingerland J. (1999). The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu Rev Med* 50: 401-23.
- 209) Van den Berg FM, Tigges A, Schipper M, Den Hartogjager C, Kroes W and Walboomers J. (1989). Expression of the nuclear oncogene p53 in colon tumours. *J Pathol* 157; 193-199.
- 210) Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, Califano D, Vinci F, Chiappetta G, Tsihchis P, Bellacosa A, Fusco A, Santoro M (2002). Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* Oct; 8(10):1136-44.
- 211) Waga S, Stillman B (1998). Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 modulates the DNA primer-template recognition complex. *Mol Cell Biol* Jul; 18(7):4177-87.
- 212) Watanabe H, Tokuyama H, Ohta H, Satomura Y, Okai T, Ooi A, Mai M, Sawabu N (1990). Expression of placental alkaline phosphatase in gastric and colorectal cancers. An immunohistochemical study using the prepared monoclonal antibody. *Cancer* 66;2575-2582.
- 213) Weiss RH, Joo A, Randour C (2000). p21(Waf1/Cip1) is an assembly factor required for platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem* Apr 7; 275(14):10285-90.
- 214) Winston JT, Chu C, Harper JW (1999). Culprits in the degradation of cyclin E apprehended. *Genes Dev* Nov 1; 13(21):2751-7.
- 215) Wong KB, DeDecker BS, Freund SMV, Proctor MR, Bycroft M and Fersht AR. (1999). Hot-spot mutants of p53 core domain evince characteristic local structural changes. *Proc. Natl. Acad. Sci* 96: 8438-8422.

- 216) Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* Jul; 7(7A):1126-32.
- 217) Yao J, Eu KW, Seow-Choen F, Cheah PY (2000). Down-regulation of p27 is a significant predictor of poor overall survival and may facilitate metastasis in colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 89:213-216.
- 218) Yasui W, Kudo Y, Semba S, Yokozaki H, Tahara E (1997). Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is associated with advanced stage and invasiveness of gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* Jul; 88(7):625-9.
- 219) Yasui W, Ayhan A, Kitadai Y, Nishimura K, Yokozaki H, Ito H and Tahara E. (1996). Increased expression of p34^{cdc2} and its kinase activity in human gastric and colonic carcinoma. *Int. J. Cancer* 53: 36-41.
- 220) Yasui W, Kuniyasu H, Yokozaky H, Semba S, Shimamoto F and Tahara E. (1996). Expression of cyclin E in colorectal adenomas and adenocarcinomas: correlation with expression of Ki-67 antigen and p53 protein. *Virchows Arch* 429: 13-19.
- 221) Yoshida Y, Itoh F, Endo T, Hinoda Y, Imai K. (1998). Decreased DCC mRNA expression in human gastric cancers is clinicopathologically significant. *Int J Cancer* 79 (6): 634-9.
- 222) Zamcheck N, Doos WG, Prudente R, Lurie BB, Gottlieb LS. (1975). Prognostic factors in colon carcinoma. Correlation of serum carcinoembryonic antigen level and tumor histopathology. *Hum Pathol* 6: 31-45.
- 223) Zhang HS, Gavin M, Dahiya A, Postigo AA, Ma D, Luo RX, Harbour JW, Dean DC (2000). Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* Mar 31; 101(1):79-89.
- 224) Zhang H, Xiong Y, Beach D (1993). Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Biol Cell* Sep;4(9):897-906.
- 225) Zhang Y, Fujita N, Tsuruo T (1999). Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene* Feb 4; 18(5):1131-8.
- 226) Zirbes TK, Baldus SE, Moenig SP, Nolden S, Kunze D, Shafizadeh ST, Schneider PM, Thiele J, Hoelscher AH, Dienes HP (2000). *Int J Cancer*. Jan 20;89(1):14-8.
- 227) Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC (2001). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* Mar; 3(3):245-52.
- 228) Zou L, Stillman B (2000). Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. *Mol Cell Biol* May; 20(9):3086-96.

ÍNDIX DE FIGURES

ÍNDIX DE FIGURES

Fig. 1. Adenoma túbulo-vellós.....	13
Fig. 2. Estructura del gen i proteïna p53 amb els tres dominis.....	33
Fig. 3. Via supressora del carcinoma colorectal (de Fearon et al.).....	36
Fig. 4. Representació esquemàtica del cicle cel.lular.....	39
Fig. 5. Representació esquemàtica del “checkpoint” de G1.....	41
Fig. 6. Estructura tridimensional del complex CDK2-ciclina A.....	44
Fig. 7. Portaobjectes amb una secció de l’array tissular.....	74
Fig. 8. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels tumors amb mutacions “hot spot”, mutacions “no hot spot” i proteïna p53 salvatge.....	83
Fig. 9. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels tumors amb mutació “hot spot” de p53 i dels tumors amb proteïna p53 “wild type” o amb mutació no “hot spot”(valors crus).....	84
Fig. 10. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels tumors amb mutació “hot spot” de p53 comparades amb les dels tumors amb altres mutacions de p53 (valors crus).....	85
Fig. 11. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels tumors amb mutacions “hot spot” en L3-loop i en LS α -hèlix comparades amb la dels tumors amb altres mutacions de p53 (valors crus).....	86
Fig. 12. a) Intensa expressió nuclear de p53 en un adenocarcinoma colorectal, que contrasta amb l’expressió més dèbil i ocasional en una àrea d’adenoma perifèric, i nul.la en glàndules arquitecturalment distorsionades però sense displàsia (10x); b) Dos èmbols carcinomatosos en l’interior de vasos limfàtics, amb intensa expressió de p53, en contrast amb la negativitat de l’epiteli de les criptes normals.....	87
Fig. 13. Gel de SSCP en el que s’observa pèrdua de l’al.lel citosina en el carcinoma amb número d’identificació 304, respecte del seu corresponent epiteli normal.....	90
Fig. 14. Corbes de supervivència global dels tumors amb mutacions “hot spot” en L3-loop i en LS α -hèlix comparades amb la dels tumors amb altres mutacions de p53 (valors crus), estratificant segons la presència de l’al.lel Arg o Pro.....	92
Fig. 15. Imatge a 20x d’un adenocarcinoma colorectal de baix grau amb expressió de p21 en més d’un 10% de nuclis.....	93

Fig. 16. Imatge a 10x d'una secció del tissue array mostrant un tru-cut d'adenocarcinoma colorectal de baix grau amb expressió de p21 en més d'un 10 % de nuclis.....	94
Fig. 17. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels tumors amb elevada expressió de p21 i dels tumors amb pèrdua d'expressió de l'esmentada proteïna (valors crus).....	96
Fig. 18. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels carcinomes amb p53 salvatge o mutada fora de "hot spots" i elevada expressió de p21, comparats amb els carcinomes amb qualsevol altre perfil (dades crues).....	99
Fig. 19. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels carcinomes amb p53 salvatge o sense mutació en L3-loop i LSH i expressió elevada de p21 comparats amb carcinomes amb qualsevol altre perfil (dades crues).....	100
Fig. 20. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels tumors amb mutació en L3 o LSH i amb pèrdua de p21, comparats amb els altres perfils. Els resultats són equivalents ajustant per l'estadi de Dukes.....	101
Fig. 21. a) Intensa expressió de p27 en un adenocarcinoma papil.lar ben diferenciat (20 x).....	103
Fig. 22. a) Intensa expressió de p27 en nuclis neuronals del plexe mientèric d'Auerbach, útil com a control intern positiu (40 x).b) Imatge a 10x d'una secció del tissue array mostrant un tru-cut d'adenocarcinoma colorectal de baix grau amb elevada expressió de p27.....	104
Fig. 23. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels adenocarcinomes amb ambdúes proteïnes Cip/Kip positives comparades amb les dels tumors amb pèrdua d'expressió d'alguna d'elles (dades crues).....	109
Fig. 24. Corbes de supervivència global dels tumors amb p53 salvatge o "no hot spot" i expressió elevada de p27; dels carcinomes amb p53 salvatge o "no hot spot" negatius per a p27; dels tumors amb mutació "hot spot" de p53 i alta expressió de p27; i dels tumors amb mutació "hot spot" de p53 i poca expressió de p27 (dades crues).....	110
Fig. 25. Corbes de supervivència global dels tumors amb p53 salvatge o "no hot spot" i expressió elevada de p27; dels carcinomes amb p53 salvatge o "no hot spot" negatius per a p27 o amb mutació "hot spot" de p53 i alta expressió de p27; els carcinomes amb mutació "hot spot" de p53 i poca expressió de p27 (dades crues).....	111

Fig. 26. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels carcinomes amb mutació de p53 en L3 o LSH i pèrdua d'expressió d'alguna de les proteïnes Cip/Kip, comparats amb els altres perfils tumorals (dades crues).....	112
Fig. 27. Supervivència global dels tumors amb elevada expressió de ciclina E comparada amb la dels tumors amb poca expressió de ciclina E.....	115
Fig. 28. a) Corbes de supervivència global dels carcinomes amb intensitat d'expressió ++ o +++, dels carcinomes amb intensitat + en més d'un 12% de nuclis, i carcinomes totalment negatius o + en menys d'un 12% de nuclis; b) El mateix test suprimint els cassos amb expressió nul.la o molt dèbil (dades crues).....	116
Fig. 29. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels carcinomes amb expressió dèbil (+) de ciclina E en més d'un 12% de nuclis comparats amb els altres perfils d'expressió de ciclina E (dades crues).....	117
Fig. 30. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia per a p21, p27 i percentatge d'expressió nuclear de ciclina E.....	119
Fig. 31. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia comparant els tumors positius per les dues proteïnes Cip/Kip i amb expressió de ciclina E en més del 12% de nuclis amb els altres grups de tumors (dades crues).....	120
Fig. 32. Corbes de supervivència global per a p21, p27 i expressió de ciclina E avaluada tenint en compte intensitat i percentatge de immunotinció (tumors amb expressió de ciclina E nul.la o molt dèbil exclosos).....	121
Fig. 33. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels tumors positius per a les dues proteïnes Cip/Kip i amb expressió intensa de ciclina E comparats amb els altres grups de tumors.....	122
Fig. 34. Corbes de supervivència global per a p21, p27 i expressió de ciclina E avaluada tenint en compte intensitat i percentatge de immunotinció (tots els grups inclosos)....	123
Fig 35. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia pels carcinomes amb pèrdua d'expressió de p21 o p27 i expressió molt dèbil o molt intensa de ciclina E, comparats amb tots els altres carcinomes (dades crues).....	124
Fig 36. Corbes de supervivència global dels tumors amb ciclina E < 12% de nuclis positius en funció de l'estat mutacional de p53.....	125
Fig. 37. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia, ajustades per Dukes, dels carcinomes amb pèrdua d'expressió de p21 o p27 i amb expressió molt dèbil (-, + < 12%) o molt intensa (++,+++) de ciclina E, comparats amb els altres perfils agrupats.....	129

Fig. 38. Supervivència global, ajustada per Dukes, dels carcinomes amb mutació “hot spot” de p53, comparada amb la dels carcinomes amb qualsevol altra proteïna p53....	131
Fig. 39. Supervivència global dels carcinomes amb mutació de p53 en els “hot spot” de L3 i LSH, comparada amb la dels carcinomes amb qualsevol altra proteïna p53 (ajustat per Dukes).....	132
Fig. 40. Supervivència global i lliure de malaltia dels carcinomes amb elevada expressió de p21, comparada amb la dels carcinomes amb pèrdua d’expressió de p21 (ajustades per Dukes).....	133
Fig. 41. Corbes de supervivència global dels carcinomes que expressen ciclina E dèbilment en més d’un 12% de nuclis, comparats amb els carcinomes amb expressió nul·la o molt intensa (ajustades per Dukes).....	135
Fig. 42. Corbes de supervivència global i lliure de malaltia dels pacients que han rebut quimioteràpia, en funció de l’expressió de p21, ajustades per Dukes.....	136
Fig. 43. Supervivència lliure de malaltia dels pacients que no van rebre quimioteràpia, en funció de l’expressió de p27, ajustada per Dukes.....	137