

V. DISCUSSIÓ

1. ANÀLISI DELS PARÀMETRES ANATOMOPATOLÒGICS

Amb aquest estudi es pretén, fonamentalment, comparar les estratègies orientades a conèixer l'estat funcional d'un dels marcadors de pronòstic més rellevants del carcinoma colorectal: la p53. Tal i com hem exposat anteriorment (vegeu l'*Apartat 3.5 del Capítol I*), són diverses les aproximacions que poden utilitzar-se amb aquesta fi, i nosaltres hem volgut servir-nos de tres d'elles, cadascuna abordada amb una metodologia diferent. És així que hem pogut determinar l'estat de la proteïna p53 utilitzant tècniques d'immunohistoquímica, conèixer l'estat mutacional del gen *TP53* emprant tècniques dissenyades per a detectar i identificar mutacions puntuals, i predir la integritat del locus corresponent mitjançant assaigs de detecció de pèrdues al·lèliques.

Més enllà de l'objectiu principal, però igualment des de l'inici, es contemplà la possibilitat de relacionar el factor de pronòstic p53 amb paràmetres anatomopatològics també associats a la prognosi dels pacients: el nivell d'infiltració tumoral, l'estadi i l'afectació ganglionar. Fou la manca de disponibilitat d'aquestes dades d'alguns dels casos (p.e.: polipectomies endoscòpiques), el que ens dugué a imposar un criteri restrictiu del material d'estudi, seleccionant únicament peces de resecció quirúrgica, totes elles amb les dades necessàries completes. I és en conseqüència que, per a poder interpretar correctament la distribució de freqüències d'alguns dels paràmetres, cal tenir en compte aquest factor del mostreig. D'altra forma fora fàcil qualificar d'esbiaixat allò que, en realitat, correspon a una limitació inherent al material de partida.

1.1. Mida i grau histològic

El nostre grup de tumors abastà un rang de mides molt ampli, anant des de lesions d'escassament 1 cm fins als 18 cm. Cal fer notar, però, que la distribució de freqüències de la mida tumoral no fou exactament l'esperada d'aquesta magnitud. Els paràmetres biomètrics, tot i ésser continus la majoria d'ells, es representen com a discrets i solen ajustar-se a distribucions normals. En la nostra sèrie, la mida sembla seguir una distribució normal truncada per l'esquerra (vegeu el Gràfic 1 a l'*Apartat 1.1 del Capítol IV*). Això obeeix, probablement, als criteris de selecció de la mostra: recordem que els tumors no obtinguts per resecció quirúrgica foren exclosos de la sèrie, la majoria d'ells

corresponent a petits pòlips –aparentment benignes– amb àrees de transformació maligna, procedents de polipectomies endoscòpiques.

En relació al grau de diferenciació tumoral de la mostra, també pot apreciar-se un patró de distribució poc equitatiu entre grups, trobant-se els tumors de la segona categoria (grau 2) representats en escreix. En aquest cas, però, la causa del desequilibri no rau en el mostreig, sinó en la laxitud dels criteris de definició de la diferenciació (vegeu l'*Apartat 1.4.1 del Capítol I*).

1.2. Nivell d'infiltració, estadiatge i afectació ganglionar

Un cop més la distribució de freqüències d'un paràmetre anatomopatològic, com és en aquest cas el nivell d'infiltració tumoral, es veié parcialment afectada pel problema del mostreig. La representació dels tumors resultà desproporcionada en detriment de les categories 1 i 3, tal i com pot apreciar-se en el *Gràfic 4* de l'*Apartat 1.4 del Capítol IV*. Justifiquem aquesta conjuntura basant-nos en el fet que, afortunadament, molts tumors confinats a l'òrgan sense invasió són diagnosticats a partir de pòlips que no requereixen resecció quirúrgica. I donat que aquestes lesions corresponen a tumors pT_{is} o pT₁, la restricció dels criteris afavoreix la selecció dels tumors de major nivell d'infiltració.

Els arguments vàlids per la infiltració, ho són també per a l'estadiatge que, com ja hem explicat (vegeu l'*Apartat 1.4.2 del Capítol I*), és una classificació que combina la primera amb l'afectació ganglionar. La nostra sèrie mostrarà predomini de casos d'estadi III-IV, resultant del biaix en favor dels tumors més invasius i amb afectació ganglionar.

D'altra banda, val a dir que l'èxit en la detecció de metàstasis ganglionars és un fet que depèn, en gran part, de la cura en la dissecció de les peces de resecció quirúrgiques, doncs la probabilitat de trobar afectació neoplàstica creix en augmentar el nombre de ganglis dissecats. Els nostres resultats posaren de manifest la bona praxi amb la que es dugué a terme l'anàlisi macroscòpica dels tumors de la nostra sèrie; en comparar les mitjanes dels ganglis dissecats dels grups de tumors amb i sense afectació ($\bar{x} = 16,9$ i 15,6, respectivament), per separat, s'evidencià la seva dimensió i similitud.

2. ESTUDI DE L'ACUMULACIÓ DE LA PROTEÏNA P53

2.1. Particularitats de l'assaig immunohistoquímic

Molt probablement, la immunohistoquímica és la metodologia més implantada arreu per a la determinació de l'estat de p53. Hi ha en el mercat diversos anticossos monoclonals anti-p53 que reconeixen diferents epítops de la proteïna. Nosaltres vam utilitzar el clon PAb 1801 (p53 Ab-2, Oncogene Science Inc., Cambridge, MA), que reconeix un epítop resistent a la desnaturalització comprès entre els aminoàcids 32 a 79 (Banks *et al*, 1986), concretament del 46 al 55. Un dels motius d'aquesta elecció fou que, el PAb 1801, que reacciona de forma específica amb la p53 humana, ho fa tant amb la forma nadiua com amb la mutada, permetent detectar també les acumulacions de la proteïna produïdes per motius aliens a la mutació del seu gen (Purdie *et al*, 1991). És per aquest fet que molts autors el consideren com a un dels millors anticossos per a la localització antigènica de p53 (Bergh, 1997). Altres raons foren, a banda, l'aptitud d'aquest anticòs per a reaccionar en seccions de material fixat i inclòs en parafina, i la possibilitat d'acoblar tècniques de recuperació antigènica al procés dels teixits.

2.2. Resultats de l'assaig immunohistoquímic

Recordem que el percentatge de casos amb acumulació de p53 o amb "fenotip positiu" fou del 56%, front a un 44% sense acumulació o amb "fenotip negatiu" (vegeu l'*Apartat 2.1.1 del Capítol IV*). Els nostres resultats són similars als referits per altres grups en utilitzar el mateix anticòs primari per a l'estudi de tumors colorectals. En la Taula 16 podem veure reflectits, junt amb els nostres, els resultats d'alguns d'aquests treballs.

2.2.1. Consideracions sobre el patró d'acumulació de la proteïna p53

Abans d'iniciar aquest estudi, els nostres criteris de valoració de la positivitat IHQ es basaven en el supòsit –o més aviat, l'assumpció– que l'acumulació de la proteïna p53 seguia un patró homogeni de distribució. Cal matisar, però, que per homogeneïtat enteníem no solament que una sola secció de teixit tumoral era representativa de tota la mostra subjecte d'estudi, sinó que a més, aquesta secció tenia positivitat nuclear uniformement distribuïda o, altrament dit, difosa. La creença se sostenia en què la pràc-

Taula 16. Relació de treballs on es refereix un fenotip de p53 positiu per a tumors colorectals.

<i>Referència</i>	<i>Teixit</i>	<i>No. Tumors</i>	<i>Positivitat (%)*</i>
Bosari <i>et al</i> , 1994	parafinat	206	46
Nathanson <i>et al</i> , 1994	parafinat	84	62
Yamaguchi <i>et al</i> , 1992	parafinat	100	61
Yamaguchi <i>et al</i> , 1993	parafinat	203	61
Smith <i>et al</i> , 1996	congelat	100	62
Caldes <i>et al</i> , 1998	congelat	72	50
present treball	parafinat	100	56

* Positivitat referida sempre a assaigs en els que s'ha usat l'anticòs PAb 1801.

tica rutinària d'aquest assaig immunohistoquímic, tal i com s'havia realitzat des del començament en el propi laboratori, així ho suggeria –la immensa majoria dels casos presentava positivitat difosa–, i al fet de no haver parat esment en cap publicació que, fins el moment, hagués mencionat el contrari.

Aquest supòsit va portar, doncs, a un tipus de valoració que atribuïa percentatges de positivitat representatius de tota la secció estudiada, és a dir, una mena de mitjana de nuclis positius amb independència de quin fos el seu patró de distribució. D'aquesta manera, i donat que efectivament a la gran majoria de mostres la distribució de la positivitat era difosa, el percentatge assignat representava qualsevol àrea dins de la secció. Ara bé, en aquells casos en els quals el patró de positivitat nuclear no era homogeni, sinó que hi havia un petit –o petits– focus de nuclis reactius, la mitjana de la secció podia canviar radicalment el resultat; mostres amb positivitat nuclear focal (10%) eren valorades com a negatives (<10%) ja que les cèl·lules reactives es diluïen en la totalitat.

A propòsit d'aquest treball s'efectuà la revisió de la IHQ dels 100 casos estudiats, i d'ella en resultà que la focalització n'afectava 8 (8%). Aleshores, però, ja teníem

constància d'alguns treballs amb un objectiu similar al nostre on s'introduïa el concepte de focalització aplicada a l'acumulació de p53 (Cripps *et al*, 1994; Oyasu *et al*, 1995). Efectivament, existia un percentatge de casos –no especificat i del 7%, respectivament– en què la positivitat era focal i que eren valorats com a positius per coherència amb els resultats de l'estudi mutacional. En base a això vam decidir considerar el percentatge de positivitat nuclear del –o dels– focus com a resultat global de la secció. Així, les vuit mostres inicialment negatives (amb positivitat global <10%) van passar a ser positives.

2.2.2. Definició del límit de sensibilitat de la IHQ de p53

Com ja s'ha definit a l'*Apartat 2.1.3 del Capítol III*, el llindar a partir del qual es valorà la immunoreactivitat de la p53 en termes de positivitat fou del 10% de cèl·lules tumorals. Resulta difícil justificar aquest percentatge –en detriment d'altres– si admetem, d'entrada, l'arbitrarietat de la decisió. De fet, la bibliografia publicada al respecte contempla diferents límits en funció del tipus tumoral subjecte d'estudi i d'alguns aspectes metodològics. Així per exemple, si bé hi ha treballs sobre càncer colorectal en els que, emprant el mateix anticòs que nosaltres (PAb 1801), el límit se situa en el 10% (Caldes *et al*, 1998), n'hi ha d'altres que consideren que el fet d'incorporar recuperació antigènica a la IHQ de p53 pot fer augmentar la sensibilitat de la detecció fins al 5% (Battifora, 1994; Soong *et al*, 1996). En altres estudis realitzats en tumors urotelials hi ha més variabilitat, havent-se descrit llindres de sensibilitat des del 5% (Oyasu *et al*, 1995) fins al 20% (Lianes *et al*, 1994; Cordon-Cardo *et al*, 1994). Nosaltres pensem que aquesta diversitat de criteris tan sols pot explicar-se en base als resultats obtinguts per cadascun dels grups.

En aquest estudi, el límit de sensibilitat per a la IHQ de p53 –assumit en el transcurs de la llarga experiència de la pràctica rutinària– coincidia amb el percentatge a partir del qual la immunoreactivitat deixava de disminuir de forma progressiva per a donar pas a una positivitat afectant solament unes poques cèl·lules disperses (àdhuc inferior a l'1%). Malgrat que la significació biològica d'aquesta positivitat roman indeterminada, hi ha qui l'atribueix a una acumulació de la proteïna p53 nadiua propiciada per l'estrès microambiental al que es veuen sotmeses algunes cèl·lules tumorals aïllades (Soong *et al*, 1994). Així doncs, per sota d'aquest límit no està clar si la positivitat, tot i semblar

específica en el sentit que es localitza a nivell nuclear, respon efectivament a l'alteració de la proteïna p53. I, en el supòsit que fos real, dubtem de la significació clínica i, menys encara, de la connotació pronòstica que podria tenir una immunoreactivitat que afectés menys de l'1% de les cèl·lules tumorals. Amb tot el que s'ha exposat, vam optar per valorar de negatius els casos on s'evidenciava aquest tipus d'immunoreactivitat.

2.2.3. Subclassificació dels tumors amb fenotip de p53 negatiu

Un altre tema que enllaça amb la qüestió del límit de sensibilitat és la classificació dels tumors amb IHQ de p53 negativa. Ja hem comentat que aquest grup, que consta de 44 tumors, inclou dos tipus de mostres: les que tenen manca absoluta de cèl·lules positives o grup del 0% (29% del total de mostres), i les que presenten una positivitat inferior al límit de sensibilitat o grup de <10% (15% del total). Recordem, també, que les mostres que integren aquest darrer grup tenen, en realitat, una positivitat inferior a l'1%. Aquesta característica comuna a tot el grup de mostres, juntament amb el fet que la seva immunoreactivitat sigui dispersa no hauria –hores d'ara– de sorprendre ningú ja que, com hem explicat a l'apartat anterior, és fruit del criteri en base al qual es va definir el límit de sensibilitat. Tanmateix és ben cert que, *a priori*, no existia cap motiu que justificués la separació en dos grups diferents d'aquests dos tipus de tumors fenotípicament negatius. Però, com veurem més endavant, aquesta segregació està plenament justificada pels resultats de l'estudi mutacional.

3. ESTUDI DE L'ESTAT DEL GEN *TP53*: ANÀLISI MUTACIONAL

3.1. Particularitats de l'anàlisi mutacional del gen *TP53*

Les tècniques que es basen en la reacció en cadena de la polimerasa són susceptibles de promoure resultats falsos, positius i negatius. Aquesta realitat obeeix a diferents motius. D'una banda, les polimerases utilitzades per amplificar específicament determinades seqüències poden cometre errors en la replicació, la freqüència dels quals s'estima entre 10^{-4} i més de 2×10^{-3} pb (Eckert i Kunkel, 1991). També s'ha de contemplar el fet que

les grans delecions que comprenen els llocs d'unió als encebadors, queden emmascarades per la presència d'al·lels normals dins del tumor. I, per descomptat, cal tenir present que hi ha la possibilitat de contaminar les reaccions amb d'altres productes amplificats (Jackson *et al*, 1991).

3.1.1. Limitacions inherents al SSCP

La tècnica de SSCP està basada fonamentalment en la diferència de conformació que adopten fragments de DNA monocatenari d'igual longitud, en funció de quina sigui llur seqüència de nucleòtids. Aquesta propietat del DNA de cadena senzilla li confereix mobilitat diferencial, permetent l'assignació de diferents patrons a mostres de seqüència "normal" respecte a les que presenten alguna mutació (Orita *et al*, 1989). La característica més important del SSCP és, doncs, la capacitat que té per a discriminar fragments que difereixen únicament d'un nucleòtid en llur seqüència. I és aquest el motiu pel qual la combinació de la PCR amb el SSCP és tan recomanable com a mètode de cribratge de mutacions puntuals (Hayashi, 1991).

Ara bé, malgrat les moltes virtuts atribuïbles al SSCP, també se l'hi reconeixen algunes limitacions, entre les quals volem destacar la dificultat d'optimitzar les condicions d'electroforesi i la seva escassa reproductibilitat. La primera d'elles resideix en la quantitat de paràmetres que determinen una cursa: diferència de potencial aplicada al gel o voltatge (V), intensitat del corrent aplicat o amperatge (mA), potència (W), temps de cursa (t), temperatura a la que es duu a terme l'electroforesi (T) i composició del gel (percentatge d'acrilamida i glicerol). Si per condicions de SSCP entenem una combinació determinada d'aquestes variables, és clar que n'hi pot haver un nombre il·limitat. Si a això s'afegeix que, en el cas del gen *TP53*, les mutacions en cada exó són potencialment moltes, pot intuir-se que calgui optimitzar més d'unes condicions per estar segurs de detectar totes les possibles alteracions.

Nosaltres, per a incrementar la capacitat de detecció de mutacions del nostre SSCP, vam decidir optimitzar tres condicions de cursa diferents que anomenàrem *ràpida*, *mitja* i *lenta* (vegeu l'*Apartat 2.2.4 del Capítol III*). Tot i això, les primeres proves realitzades

amb els productes amplificats de l'exó 4 del gen *TP53*, van resultar poc satisfactòries. El motiu era la manca de resolució d'un patró en bandes suficientment separades per a permetre la detecció d'anomalies de la mobilitat. Després de molts intents testant diferents condicions d'electroforesi, vam intuir que, potser, la mida del fragment (308 pb) resultava inapropiada pel nostre tipus d'assaig. De fet, coneixíem treballs d'autors que afirmaven que la sensibilitat del SSCP és del 70-95% per a productes de PCR fins a 200 pb i que davalla progressivament a mesura que la longitud del fragment s'aproxima als 400 pb (Hayashi, 1992; Grompe, 1993). Finalment, vam arribar a la conclusió que, molt probablement, aquest era el problema.

Per a resoldre la qüestió vam optar per a realitzar l'assaig de mobilitat de l'esmentat exó prèvia restricció enzimàtica del fragment d'amplificació (Iwahana *et al*, 1992). Amb aquesta idea, vam cercar dins de la seqüència del producte una diana per a un enzim que donés lloc a dos fragments de restricció de mides ben diferents. I efectivament, vam trobar-ne una per a l'enzim *AvaII* –5'-G G(A/T)CC-3'–, donant lloc a dos subfragments de 92 i 216 pb. D'aquesta forma aconseguíem optimitzar les tres condicions comunes per a tots 5 exons. Ara bé, l'execució sistemàtica de les tres curses no es dugué a terme per a totes les mostres. L'anàlisi preliminar dels resultats obtinguts amb els 50 primers casos demostrà que la cursa *lenta* no aportava res que no pogués ésser advertit amb les altres dues i, per tant, vam decidir discontinuar-la en els casos subsegüents.

L'escassa reproductibilitat atribuïda a l'assaig de SSCP es deu, principalment, a la dificultat de controlar la temperatura del gel durant la cursa (Hongyo *et al*, 1993). En el nostre cas això se solucionà amb la utilització de gels d'acrilamida prefabricats i del sistema GenePhor d'electroforesi amb control programable de temperatura (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Aquest sistema, que teòricament garanteix la reproductibilitat dels assaigs, ho fa també a la pràctica, tal i com vam tenir ocasió de comprovar al llarg de tot l'estudi. Efectivament, tots els casos de mobilitat anòmala es van repetir, al menys, en una de les tres condicions. Aquesta precaució sistemàtica va evitar la seqüenciació de productes de PCR que en realitat haguessin incorporat algun error durant el procés d'amplificació (en comptes de ser veritables alteracions). Malgrat ésser molt baixa –i més encara en comparació amb la Taq polimerasa convencional–, la

taxa d'error del sistema ExpandTM High Fidelity PCR (Boehringer Mannheim Corp. Indianapolis, IN) està en $8,5 \times 10^{-6}$ ó, dit d'altra forma, s'estima que un 2% dels fragments aproximadament de 200 pb poden contenir errors d'amplificació després de 30 cicles d'amplificació. Tot i aquesta probabilitat d'error certament petita, vam preferir actuar amb el màxim rigor.

3.1.2. Limitacions inherents a la seqüenciació directa

En qualsevol estudi mutacional, la limitació principal per a l'obtenció de resultats satisfactoris de la seqüenciació directa (Sanger *et al*, 1977) resideix en la naturalesa de les pròpies mostres. Com és sabut, tot DNA provinent d'una cèl·lula diploide té, al menys teòricament, igual representació de cadascun dels seus al·lels; així, una cèl·lula tumoral que presenta una mutació de *TP53* en un al·lel i reté el concomitant –en estat nadiu– posseeixen, solament, un 50% del DNA mutat. Ara bé, si en comptes de considerar una cèl·lula considerem un tumor, aquest percentatge pot disminuir considerablement.

Els tumors de la sèrie estaven constituïts, allora, per cèl·lules mutades i no mutades (p.e., cèl·lules estromals, vasculars, tumorals no mutades, etc...). Per aquest motiu, com major era el component de cèl·lules no mutades dins del tumor, major era la proporció de DNA normal que acompanyava el tumoral. En les primeres seqüenciacions, malgrat haver efectuat microdissecció, vam poder constatar que els tumors contenien una proporció inestimable, però en cap cas menyspreable, de DNA no mutat. Això dificultava la interpretació dels cromatogrames, ja que, en la majoria de casos la mutació es manifestava com a un petit pic compartint posició amb un altre de forma que, a cops, la seqüència ni tan sols reflectia el canvi. A més, l'alteració no sempre podia confirmar-se per l'altre sentit. Aquesta situació ens dugué a adoptar una estratègia, tan tediosa com extremadament útil, que fou l'aïllament de bandes de mobilitat anòmala del SSCP i la reamplificació del DNA –presumptivament mutat– obtingut de les mateixes. Per a això vam aprofitar els gels d'acrilamida de comprovació de cada SSCP amb anomalies. A expenses d'això, els resultats milloraren de forma notable. I fins a tal punt fou així que, en ocasions, les alteracions es reflectien com a pics que s'imposaven als nadius en la seqüència. No podem deixar de contemplar, però,

la possibilitat que en aquests casos la mutació anés acompanyada de la pèrdua de l'al·lel concomitant.

3.2. Resultats de l'anàlisi mutacional del gen *TP53*

3.2.1. Avaluació de la qualitat del DNA genòmic obtingut

En primer lloc, volem fer èmfasi en l'èxit que suposa que el 92% de casos (100/109 tumors inicialment seleccionats) superés el control de qualitat i l'amplificació de tots els exons del gen *TP53*, més encara quan cada cas suposà l'extracció de dues mostres (una normal i una tumoral). Per a poder valorar-ho, cal tenir en compte els publicats treballs al respecte, reflectint la dificultat que suposa l'estudi de material genòmic provinent de teixit fixat i/o inclòs en parafina (Mies *et al*, 1991; Whetsell *et al*, 1992; Howe *et al*, 1997). Durant el procés de fixació, el DNA es malmet de forma considerable, essent la degradació un factor que depèn principalment del fixador utilitzat i del temps de fixació. És pràcticament impossible obtenir DNA genòmic d'una qualitat raonable si el fixador és altre que la formalina tamponada –p.e. Bouin– (Herbert *et al*, 1989; Greer *et al*, 1991), i encara menys si el temps d'exposició al mateix és superior a 36 hores (Dubeau *et al*, 1986). Quant a la mida dels productes de PCR que poden ésser amplificats, està determinada per la longitud mitjana del DNA obtingut. Honma i col·laboradors posaren de manifest en el seu treball que el 78% dels espècimens estudiats permeté l'obtenció de productes de 120 pb, mentre que solament el 39% fou apte per a amplificar 374 pb (Honma *et al*, 1993). En aquest sentit, tot el nostre material tingué qualitat més que suficient, ja que permeté l'amplificació de productes fins a 308 pb.

Creiem també, sens dubte, que bona part de la qualitat obtinguda ha de ser atribuïda al procés de microdissecció, que permet obtenir de manera selectiva el material provinent de les àrees millor preservades. D'altra banda, no descartem la influència que el procés de purificació tingué sobre la correcta amplificació. Recordem que per a les nostres mostres, la mitjana dels índex DO_{260}/DO_{280} fou $\bar{x} = 1,58$ ($s = 0,13$), la qual cosa posa de manifest l'elevada puresa del material obtingut.

3.2.2. Subclassificació dels tumors amb genotip de TP53 positiu

Els resultats obtinguts de la nostra sèrie, en la línia dels descrits en altres treballs (Greenblatt *et al*, 1994; Cripps *et al*, 1994; Hartmann *et al*, 1995; Soong *et al*, 1996; Lenz *et al*, 1998), permeten afirmar que més de dos terços de les mutacions identificades en el càncer colorectal són de sentit erroni: concretament, un 70% fou de tipus M, mentre que el 30% restant (tipus no M) es repartí entre 15% de tipus N, 11% de tipus F, 3% de tipus D (2 delecions de 18 nt) i 1% de tipus S. Analitzem, però, més en detall el tipus de mutacions obtingudes en base als diferents criteris de classificació:

- *Per tipus de substitució generada*

De les 73 mutacions identificades en la nostra sèrie (corresponents a 68 casos), n'hi hagué 33 produïdes per transició de G:C a A:T afectant dinucleòtids CpG (45%), tal i com hem esmentat a l'*Apartat 2.2.3 del Capítol IV*. Les mutacions d'aquest tipus, junt amb les 14 que implicaren pèrdua o guany de material genètic –independentment del fet que això impliqués o no l'alteració de la pauta de lectura– sumen un total de 47 mutacions que, respecte les 73 identificades, representen un 67%. Segons la revisió efectuada per Greenblatt i col·laboradors l'any 1994, les transicions en llocs CpG, les delecions i les insercions comprenen aproximadament el 37% de totes les mutacions descrites al gen *TP53*. Els mateixos autors expliquen, però, que en alguns tipus de càncer –inclòs el colorectal– aquest conjunt d'alteracions pot superar el 45%. El fet que el tipus de mutació majoritària, és a dir, la transició de CpG a TpG es produeixi de forma espontània per desaminació de la 5-metilcisteïna, suggereix que els processos cel·lulars endògens –vs. els exògens– contribueixen en una fracció significativa a la formació d'aquests tipus de tumors (Harris, 1993; Cripps *et al*, 1994; Greenblatt *et al*, 1994; Hollstein *et al*, 1994). I els resultats obtinguts de la nostra sèrie, amb una taxa putativa de mutació espontània del 67%, corroboren aquesta observació pel càncer colorectal.

- *Per localització*

Com ja hem explicat anteriorment (vegeu l'*Apartat 3.1.2 del Capítol I*), les mutacions al gen *TP53* succeeixen majorment dins dels blocs II-V, que constitueixen la regió central

de la proteïna (Hollstein *et al*, 1991). La perfecta conservació que, des del punt de vista evolutiu, caracteritza els esmentats dominis suggereix que aquests contenen AA essencials per a la p53, l'alteració dels quals comportaria una pèrdua de la seva funció supressora. Paradoxalment, però, i segons la teoria de la selecció clonal, aquesta pèrdua de funció supressora comporta un guany de funció oncogènica, que es tradueix en un avantatge de creixement (Oren, 1992).

Recordem, també, que l'esmentada regió central de p53 correspon als exons 5-8 del gen codificant, amb un marcat predomini de mutacions de tipus M (79%) *vs.* la resta (de tipus no M) (Greenblatt *et al*, 1994). Els residus més afectats dins d'aquesta regió són, en concret, els que segueixen: 175, 245, 248, 273, 282 i 249. Cal fer notar que 5 d'ells –excepte el 249– contenen dinucleòtids CpG, susceptibles a la transició TpG.

Pel que respecta les mutacions identificades en la nostra sèrie de tumors, aquestes afectaren principalment els exons 5, 7 i 8. També, en concordança amb d'altres treballs publicats, els codons més afectats van ser el 273, 175, 248, 245 i 282 (en aquest ordre), no havent-se trobat cap mutació al codó 249. Conjuntament, el percentatge corresponent a aquests 5 punts calents de mutació representà el 42% de les totals, o el 61% respecte les de tipus M. Quant al fet que cap dels tumors de la nostra sèrie presentés mutació del codó 249, tot i haver-se descrit com un dels residus més sovintment afectat (Harris, 1996; Greenblatt *et al*, 1994; Caldes *et al*, 1998), pot explicar-se perquè l'alteració del mateix és una transversió de G:C a T:A. Aquest tipus de canvi no sol produir-se de forma espontània, sinó que està fortament associat a una presència en la dieta d'aflatoxina B₁, essent aquesta substància la causa principal de l'elevada incidència d'hepatocarcinoma en determinades poblacions que n'estan exposades (Greenblatt *et al*, 1994). Això, sumat a l'alt nombre de transicions de CpG en la nostra sèrie recolza encara més, si cap, l'origen endogen del càncer colorectal.

4. ACUMULACIÓ DE LA PROTEÏNA P53 VS. ESTAT MUTACIONAL DEL GEN

4.1. Comparació dels resultats d'IHQ amb els de SSCP/seqüenciació

Com a resultat de relacionar el fenotip i el genotip de p53 dels tumors que constitueixen la nostra mostra aparegueren una sèrie de grups, els quals analitzarem per separat per tal d'explicar-ne les discrepàncies. La freqüència de casos en cadascun d'aquests grups queda reflectida a la Taula 17.

Taula 17. Grups resultants de la relació fenotip/genotip de p53.

		genotip		
		<i>negatiu</i>	<i>positiu</i>	
fenotip	<i>negatiu</i>	27	17	44
	<i>positiu</i>	5	51	56
		32	68	100

- *Grup de fenotip 1/genotip 1*

Els 51 casos que integren aquest grup presentaren un total de 56 mutacions. D'aquests tumors, quaranta-tres (84%) resultaren tenir mutació simple de tipus M, cinc (10%) foren doblement mutats (2 d'ells M/M, 2 M/N i 1 M/F), dos (4%) presentaren deleció del mateix fragment de l'exó 5 i el darrer cas (2%) contingué una mutació de tipus N. Conèixer *a priori* el fet que la IHQ és capaç de detectar la gran majoria de mutacions de sentit erroni, però no les que comporten la formació de proteïnes truncades o aberrants (tipus N o F), ens permet donar per explicats els 48 casos que presenten, al menys, una mutació de tipus M. Quedarien, així, 3 casos per justificar: els dos tumors amb idèntica deleció i el cas de la mutació sense sentit (294 Glu>Stop).

L'esmentada deleció comportà la pèrdua de 18 nt en els dos tumors afectats. El fet que ambdós resultessin fenotípicament positius suggerí que, malgrat tractar-se d'una deleció, aquesta no podia comparar-se a la resta de les delecions identificades. Tot sembla indicar que els tumors amb delecions que preserven la pauta de lectura –mutants

de tipus D, que inclouen la pèrdua dels codons 175-180 que ens ocupa-, són immuno-reactius (Hartmann *et al*, 1995). Creiem que això podria respondre al fet de codificar monòmers que conserven íntegre el domini de tetramerització, donant lloc a proteïnes estables que s'acumulen en el nucli cel·lular, com les que tenen mutacions de tipus M.

Finalment, en relació al cas de mutació sense sentit, tenim que l'acumulació podria justificar-se per la presència d'una segona mutació de tipus M fora dels exons 4-8. El fet que l'esmentada mutació 294 (Glu>Stop) fos identificada en un altre cas en absència d'expressió recolzaria aquesta hipòtesi. Com també ho suggereix el fet que el tumor no hagués perdut l'al·lel concomitant. Val a dir, però, que l'ampliació de l'estudi a l'exó 9 (els encebadors del qual podeu trobar a la Taula 18) no va permetre aclarir el cas.

- *Grup de fenotip 1/ genotip –*

Aquest grup, al que pertanyeren tan sols 5 casos, podria explicar-se de dues formes: per la possibilitat que alguna mutació corresponent a la regió estudiada escapés al SSCP, o bé, per la presència de mutacions fora dels exons 4-8.

Per tal de descartar la primera de les opcions, vàrem utilitzar un nou conjunt d'encebadors dels exons 5-8 que permetien abastar la totalitat de la zona codificant (vegeu la seqüència dels mateixos a la Taula 18). Això permeté identificar una mutació de sentit erroni en un dels tumors (255 Ile>Thr), que d'altra forma hauria passat desapercebuda. Amb aquesta modificació, la probabilitat d'atribuir les altres discrepàncies al SSCP es reduí al fet que les possibles mutacions no foren detectables, ja que s'han descrit algunes formes mutants que no donen lloc a patrons anòmals de mobilitat en gel (Hayashi, 1991). Dubtem que l'absència de mutacions en aquests casos sigui atribuïble a una manca de sensibilitat de la tècnica; el percentatge de positivitat immunohistoquímica associat a cada cas (20-45%) posa de manifest l'afectació d'un nombre de cèl·lules suficientment alt per a permetre la detecció (Wu *et al*, 1993b). Per tot el que hem exposat, ens inclinem més a pensar en la segona opció, tot i que l'ampliació de l'estudi a l'exó 9 tampoc no va revelar cap nova mutació.

Taula 18. Nous encebadors emprats per a l'amplificació dels exons 5-9 del gen *TP53*.

<i>Locus</i>	<i>Cebador</i>	<i>Seqüència</i>	<i>Mida (pb)</i>
<u>Exons de <i>TP53</i></u>			
Exó 5	P53E5 SE	5'-TTCACCTTGTGCCCTGACTT-3'	268
	P53E5 AN	5'-ACCAGCCCTGTCGTCTCTCC-3'	
Exó 6	P53E6 SE	5'-TTGCCCAGGGTCCCCAGGCC-3'	199
	P53E6 AN	5'-CTTAACCCCTCCTCCCAGAG-3'	
Exó 7	P53E7 SE	5'-CGCACTGGCCTCATCTTGGG-3'	185
	P53E7 AN	5'-CAGCAGGCCAGTGTGCAGGG-3'	
Exó 8	P53E8 SE	5'-GCCTCTTGCTTCTCTTTTCC-3'	209
	P53E8 AN	5'-CCCTTGGTCTCCTCCACCGC-3'	
Exó 9	P53E9 SE	5'-TTGCCTCTTTCCTAGCACTG-3'	104
	P53E9 AN	5'-CCCAAGACTTAGTACCTGAAG-3'	

- *Grup de fenotip –/genotip 1*

Els 17 casos dels que consta aquest grup correspongueren a 8 mutacions sense sentit, 7 alteracions de la pauta de lectura, una mutació de la correcta escissió intrònica i una altra de sentit erroni. Com fóra d'esperar (vegeu l'*Apartat 3.5.1* del *Capítol 1*), les 15 mutacions de tipus N i F resultaren negatives quant a l'expressió de la proteïna. Pel que fa a la mutació de tipus S, aquesta té a tots els efectes, el valor d'una mutació sense sentit, doncs la manca d'escissió de l'intró 7 –deguda a la substitució de T per G en posició 14410– donà lloc a una proteïna aberrant. Per tant, és lògic pensar que no induís l'acumulació d'aquest producte.

Diferent és el cas de la mutació de tipus M, tot i que la discrepància obtinguda fou similar a la d'altres casos prèviament descrits. Es tracta d'una substitució 273 (Arg>His), que juntament a les altres substitucions 273 i les 248 formen part de les mutacions conegudes amb el nom de *LFS-like* (Li-Fraumeni Sndrome-like) (Malkin *et al*, 1990; Srivastava *et al*, 1990). Hi ha dades publicades que demostren que aquestes mutacions, *in vitro*, donen lloc a proteïnes que no poden induir el canvi de conformació de la proteïna p53 nadiua (vegeu l'*Apartat 3.4.1* del *Capítol 1*) i, en conseqüència, aquesta no s'acumula (Milner i Medcalf, 1991). Així fou descrit, p.e. que la mutació

273 podia ésser detectada amb l'anticòs PAb 240 en provocar la substitució d'Arg>Cys, però no d'Arg>His (Levine *et al*, 1991). Alhora, un treball publicat per Bhatia i col·laboradors l'any 1993, posà de manifest que l'anàlisi mitjançant Western blot (PAb 240 i PAb 1801) d'algunes línies cel·lulars on s'havien identificat aquestes mutacions *LFS-like* no sempre era positiu. Els mateixos autors afirmaven que l'estabilització de p53 anava associada a homo- o hemizigosi –és a dir, a la mutació o deleció de l'al·lel concomitant, respectivament–, mentre que l'heterozigosi –o retenció de l'al·lel normal– portava a l'absència d'expressió de la proteïna. Creiem que, en conjunt, aquestes dades constituïrien una explicació raonable i suficient per a justificar el fenotip negatiu de la nostra mutació 273, màxim quan els resultats de la detecció de LOH en aquest cas foren negatius, suggerint la retenció de l'al·lel concomitant.

La nova conjuntura ens portà, doncs, a replantejar-nos part dels resultats obtinguts de la nostra sèrie, ja que dels 18 tumors amb mutació en els codons 273 i 248, únicament el cas discutit prèviament tingué fenotip negatiu. Ara bé, nosaltres ens centrarem de forma estricta en els 6 tumors que presentaren la mutació suposadament responsable del fenotip negatiu –la 273 (Arg>His)–, i ens limitarem a dir que, en les nostres mans, la resta dels tumors *LFS-like* evidencià l'estabilització de la proteïna p53. Afegirem que, dels 5 tumors que ens ocupen amb fenotip positiu, tres foren hemizigots (doncs presentaren pèrdua al·lèlica al locus TP53), el que justificaria el resultat obtingut. Per contra, els dos restants expressaren positivitats del 55 i 95%, que no deixaven cap dubte sobre l'especificitat de la reacció. Falta saber si entre les possibles causes de l'acumulació no hi hauria la coincidència en ambdós al·lells de la mateixa mutació (en homozigosi), o bé trobaríem una segona mutació de tipus M fora dels exons 4-8.

Amb tot, no sabem fins a quin punt fóra més raonable pensar que el nostre assaig *in vitro* comportés canvis en l'estructura de la p53 amb mutacions *LFS-like*, fent-la assequible a l'anticòs PAb1801; essent així, el fenotip negatiu s'explicaria per una pèrdua puntual d'antigeneïtat del tumor en qüestió.

- *Grup de fenotip –/genotip –*

Correspongueren a aquesta categoria 27 casos, dels quals 14 foren del grup del 0% i 13 de <10%. Quant als primers no hi hagué discrepància, donat que sabem que la proteïna p53 nadiua no s'acumula. Però, malgrat haver-los classificats com a negatius, voldríem discutir la causa de la reactivitat immunohistoquímica del 13 restants.

D'una banda tenim que l'escassa positivitat (<1% en aquest cas) no és un fet aïllat de la nostra sèrie, sinó que altres treballs han estat prèviament publicats en el mateix sentit. Així, cal recordar el treball que Soong i col·laboradors publicaren l'any 1996, on ja s'esmentava el fet que alguns tumors sotmesos a tècniques de recuperació antigènica –com és el nostre cas–, presentaven immunoreactivitat en algunes cèl·lules esparses, de manera ocasional (<5%). El mateix fenomen aparegué descrit en un altre treball (Cripps *et al*, 1994), en el qual únicament s'associà aquest tipus positivitat a tumors sense mutacions. I encara, més recentment –concretament a l'any 2000–, un treball publicat per Kaserer i col·laboradors esmentava el fet que la immunoreactivitat en cèl·lules esparses era significativament major en tumors colorectals que no presentaven mutacions de *TP53* vs. aquells que sí en tenien (Kaserer *et al*, 2000).

En la nostra sèrie, dels 18 tumors que resultaren genotípicament negatius malgrat tenir fenotip diferent de 0%, n'hi hagué 13 (72%) amb immunoreactivitat esparsa (<10%). Sorprenentment, la gran majoria dels tumors de genotip + (51/53) expressaren p53 en més del 10% de les cèl·lules, representant els 2 casos amb positivitat <10% el 4% dels tumors mutants. Malgrat aquesta troballa no té valor en termes de significació estadística –conseqüència de les reduïdes dimensions de la mostra–, les dades obtingudes suggereixen que la distribució de la positivitat esparsa en els tumors colorectals no es fruit de l'atzar. I això, unit al fet que cap de les dues mutacions identificades en els tumors amb expressió <10% podia ser responsable de l'acumulació de p53 –per tractar-se d'una mutació sense sentit, l'una, i d'una 273 Arg>His en heterozigosi, l'altre–, ens obliga a postular una hipòtesi alternativa. Creiem que la probabilitat de trobar-nos davant d'un problema d'escassa representació de la població cel·lular mutant és francament reduïda, a la vista dels resultats obtinguts per l'anteriorment esmentat grup de Kaserer: en el seu treball aquests autors fan l'estudi

mutacional específic de cèl·lules esparses obtingudes amb un microdissector làser, no detectant cap mutació en els exons del 4-9.

Hores d'ara, creiem que el més probable és que ens trobem davant d'un fenomen d'acumulació de la proteïna p53 nadiua estabilitzada per altres mecanismes, com ja han suggerit altres autors (Cripps *et al*, 1994). En l'esmentat supòsit, doncs, podem especular que el comportament d'aquests tumors, en termes de pronòstic, hauria de ser independent de l'acumulació.

4.2. Valoració de la IHQ com a mètode per a predir l'estat de p53

La detecció de proteïna p53 mitjançant tècniques d'IHQ s'ha associat a la presència de mutacions del gen *TP53* en un gran nombre d'estudis clínics. Hem après que mentre que la vida mitja de la proteïna nadiua és curta –normalment, menys de 30 min–, la majoria de mutacions puntuals que comporten la substitució d'aa (de sentit erroni) condueixen a l'estabilització del producte alterat i a la prolongació de la seva vida mitjana. I és precisament aquesta acumulació la que permet la immunolocalització microanatòmica en seccions de teixit tumoral (vegeu l'*Apartat 3.5.1 del Capítol I*). Ara bé, malgrat l'acceptació general que aquesta aproximació suposa un reflex de l'existència de mutacions subjacents (Iggo *et al*, 1990; Rodrigues *et al*, 1990; Cuningham *et al*, 1992), la manca d'immunoreactivitat nuclear per a la p53 no exclou l'absència de mutacions al seu gen. De fet, sabem que les mutacions sense sentit i les que alteren la pauta de lectura són responsables que alguns tumors produeixin trànscrips inestables o proteïnes anòmales que no s'acumulen, essent en conseqüència aquests fenotípicament negatius. S'estima que la contribució d'aquestes mutacions al total de les que afecten la p53 és aproximadament del 20% (Cripps *et al*, 1994; Jego *et al*, 1993).

D'altra banda, ja hem esmentat que no hi ha actualment cap mètode de detecció de mutacions de p53 que sigui considerat l'estàndard d'or. En el seu defecte, nosaltres hem pres la PCR-SSCP/seqüenciació com a referència, doncs alguns autors el consideren el millor dels mètodes per a identificar mutacions de p53 (Cordon-Cardo *et al*, 1994). Acceptat això, discutirem si la IHQ és capaç de substituir o no el mètode de referència.

4.2.1. Anàlisi ROC i regressió logística

La corba ROC, emprada per a determinar si la IHQ podia considerar-se una tècnica adient per a predir l'estat mutacional de *TP53* en tumors colorectals, permeté establir el llindar de sensibilitat de la tècnica en qualsevol punt entre el 2 i el 15% de positivitat. Dels resultats obtinguts en aplicar la regressió logística deduírem, però, que és millor prendre el 15% que el 10% escollit per nosaltres arbitràriament (vegeu l'*Apartat 2.2.2* d'aquest mateix capítol), doncs amb el primer s'assoleix un equilibri més raonable dels dos tipus d'error.

La regressió permeté també concloure que el model proporciona un ajust significatiu, amb una variabilitat explicada del 29,7% quan l'especificitat i la sensibilitat són del 84% i del 75%, respectivament.

4.2.2. Discordances fenotip/genotip: implicació pronòstica

La conclusió a la que hom arriba després d'efectuada l'anàlisi estadística, confirma allò que ja intuïem a primer cop d'ull: això és, que la IHQ no és un mètode òptim per a determinar l'estat de la proteïna p53. I creiem poder afirmar-ho en el sentit que l'especificitat i la sensibilitat estimades respecte la PCR-SSCP/seqüenciació estan, en el millor dels casos, lluny del que es considera clínicament acceptable (95%). És més, tot sembla indicar, que l'acumulació no és ni tant sols una variable predictiva de mutació que conserva la pauta de lectura, doncs presenta una taxa d'error que pot arribar a ser fins i tot del 21,9% (vegeu l'*Apartat 3.2* del *Capítol IV*).

Ara bé, per més que considerem la PCR-SSCP/seqüenciació com a mètode de referència, i després de revisar un per un els resultats dels casos de la nostra sèrie, creiem que fóra injust atribuir totes les discordances entre fenotip i genotip al fracàs de la IHQ. D'una banda, som els primers d'admetre el qualificatiu de "falsos negatius de la IHQ" que s'atribueix als tumors del grup de fenotip -/genotip 1, doncs la presència de mutació en aquests casos és indiscutible. Com també ho és que atribuir bon pronòstic a un tumor pel fet de ser fenotípicament negatiu és un greu error –més, si cap, del que pensàvem *a priori*–, doncs cal recordar que 17 dels 44 casos (39%) resultaren mutants.

Tanmateix, en cap cas no podem acceptar la consideració que, de “falsos positius de la IHQ”, es fa dels tumors del grup de fenotip 1/genotip –, ans al contrari, els considerem “falsos negatius del SSCP” (representen un 5% del total de la sèrie). Creiem que la immunoreactivitat d'aquests casos és específica i respon a l'existència de mutacions fora dels exons 4-8, a mutacions no detectables per SSCP per raons metodològiques (vegeu l'*Apartat 4.1* d'aquest mateix capítol), o bé a l'estabilització de la proteïna per motius al·liens a la mutació. I és en aquest sentit que volem donar a la IHQ dels tumors fenotípicament positius –grup que representa el 56% dels casos de la nostra sèrie– la importància que mereix. El pronòstic d'aquests casos hauria de ser independent del fet que s'identifiquessin o no mutacions en el tumor.

5. ESTUDI DE L'ESTAT DEL GEN *TP53*: ANÀLISI DE LA PÈRDUA AL·LÈLICA

5.1. Particularitats de la detecció de LOH al locus *TP53*

Tal i com hem explicat en detall en l'*Apartat 2.3* del *Capítol III*, la tècnica utilitzada per a la detecció de pèrdues al·lèliques al locus *TP53* es basà en l'anàlisi d'una seqüència microsatèl·lit –concretament, la *p53CA*–, la pèrdua de LOH de la qual es detectà com un canvi relatiu en la intensitat dels al·lells del tumor respecte al seu control normal. Tanmateix hem comentat que, inherent a la tècnica, els patrons electroforètics propis dels tumors inestables impediren la valoració de pèrdues a l'esmentat locus en determinats tumors.

Dins de la nostra sèrie, la presència d'inestabilitat es posà de manifest en 8 tumors (8%), la qual cosa restringí la valoració de pèrdues al·lèliques a 92 dels 100 tumors analitzats. Però, més enllà de la limitació metodològica que suposa la presència del fenotip inestable en certs tumors, hi hagué d'altres raons que portaren a excloure'ls del nostre estudi de LOH; la presència d'inestabilitat genòmica generalitzada en el càncer colorectal caracteritza un grup de tumors amb un fenotip mutador (Thibodeau *et al*, 1993; Aaltonen *et al*, 1993). Els tumors que posseeixen l'esmentat fenotip solen tenir una incidència de mutacions a *TP53* i a *c-K-RAS* significativament menor, es localitzen

a còlon proximal, són freqüentment de tipus mucinós o poc diferenciat, tenen un contingut de DNA normal (diploide), es presenten com a tumors localitzats sense metàstasis i els pacients tenen una supervivència major que els afectats de carcinomes clàssics (Ionov *et al*, 1993; Kim *et al*, 1994; Kahlenberg *et al*, 1996; Konishi *et al*, 1996; Losi *et al*, 1997; Edmonston *et al*, 2000; Watanabe *et al*, 2001).

Totes aquestes característiques clinicopatològiques coincideixen amb les observades en els carcinomes sorgits en el context de la síndrome de Lynch (HNPCC), també de fenotip mutador (Aaltonen *et al*, 1994). I, de fet, en tots ells hi ha descrita la presència de mutacions puntuals als gens de reparació d'errors (vegeu l'*Apartat 2.2 del Capítol I*), que situen aquests tipus de tumors colorectals en una via alternativa de progressió tumoral. Essent com és doncs, poc rellevant el paper de p53 en els mateixos, tampoc no hi ha arguments per a recolzar el paper pronòstic de les pèrdues al·lèliques al seu locus.

5.2. Resultats de l'anàlisi de la pèrdua al·lèlica al locus TP53

5.2.1. Grau d'informativitat

Un factor tingut en compte alhora d'escollir la metodologia per a valorar les pèrdues al·lèliques al locus TP53, fou el grau d'informativitat: l'heterozigositat que els autors referien per a l'aproximació escollida en aquest cas era molt alta (78%, 7/9 casos) respecte, p.e. exemple, el 41,5% (56/135 casos) que s'obtenia en aplicar una estratègia similar que utilitzava la PCR-SSCP per a analitzar un polimorfisme a l'intró 2 de *TP53* (Oliva *et al*, 1995).

Com ja hem esmentat a l'*Apartat 2.4 del Capítol IV*, en el nostre estudi dels 92 casos que no presentaren inestabilitat al locus TP53, n'hi hagué 82 on s'evidencià llur condició d'heterozigots pel polimorfisme p53CA; en aquests, cadascun dels al·lèls de la mostra no tumoral migrà a una posició diferent en el gel. Donat que solament dins del grup d'heterozigots poden posar-se de manifest canvis relatius d'intensitat dels dos al·lèls –tumor vs. normal–, aquests casos es consideraren informatius. Així, equiparant l'heterozigositat constitutiva a la informativitat (Kern *et al*, 1989), podem dir que de la

nostra sèrie de 100 tumors el 82% foren informatius, un percentatge molt similar al descrit en la cita original (78%) del mètode emprat (Jones i Nakamura, 1992).

5.2.2. Pèrdua d'heterozigositat

Dels resultats obtinguts en analitzar la pèrdua al·lèlica al locus TP53 dels nostres casos se'n desprèn que el 63% manifestà pèrdua d'heterozigositat. Aquest percentatge no està lluny del 70-80% descrit en altres treballs publicats prèviament, com hem esmentat a la *Introducció* (Fearon *et al*, 1987; Vogelstein *et al*, 1988). Cal fer notar, també, que la presència de LOH en la nostra sèrie afectà principalment els tumors que tenien mutacions al mateix locus de l'al·lel concomitant (85%). Aquesta troballa recolza la hipòtesi segons la qual, si bé una primera mutació de *TP53* –principalment, de tipus puntual– contribueix directament a la progressió tumoral, la pèrdua subsegüent de l'al·lel concomitant proporciona un avantatge addicional que afavoreix la selecció de la població cel·lular en qüestió (Oren, 1992). Això succeeix a expenses de l'efecte dominant negatiu que la proteïna p53 mutada exerceix sobre la nadiua (vegeu l'*Apartat 3.4.1 del Capítol 1*): la darrera, tot i trobar-se representada en menor proporció entre els heterozigots, conserva una resta d'activitat antiproliferativa endògena, que no cedeix fins a la inactivació total de l'al·lel que la codifica. Per tant, una manera de garantir aquesta inactivació és, sens dubte, la deleció del locus intacte.

5.3. Estadi tumoral i afectació ganglionar vs. pèrdua al·lèlica al locus TP53

Atesos els valors de significació obtinguts de l'anàlisi estadística, podem afirmar que hi hagué una relació de dependència significativa entre la presència de pèrdua al·lèlica al locus TP53 i les variables estadi tumoral i afectació ganglionar. De fet, la troballa no hauria de sorprendre'ns, ans al contrari, dóna sentit a la hipòtesi de les dues mutacions (Knudson, 1985) en el context de la p53. Si abans demostràvem que, entre els tumors amb mutacions al gen *TP53*, hi hagué una clara tendència a perdre l'al·lel concomitant –malgrat l'efecte negatiu dominant–, la informació addicional de la que ara disposem ens permet especular la finalitat d'aquest fenomen. La independència que la pèrdua de 17p resultà tenir de la infiltració tumoral en la nostra sèrie, situa aquest marcador lluny de l'òrbita dels determinants de l'agressivitat tumoral. Amb més motiu, doncs, que les

pèrdues depenguessin de l'estadi i de l'afectació ganglionar –essent el primer conseqüència de la segona– suggereix que, molt probablement, la pèrdua al·lèlica és un dels mecanismes d'adquisició del potencial metastàtic en els tumors colorectals.

6. ESTAT MUTACIONAL DEL GEN *TP53* VS. PÈRDUA AL·LÈLICA AL SEU LOCUS

6.1. Comparació dels resultats del SSCP/seqüenciació amb els de LOH

L'anàlisi comparativa dels resultats d'ambdues tècniques solament va poder incloure els 82 casos amb heterozigositat constitutiva, és a dir, informatius per al locus *TP53*. La següent taula resumeix la relació entre genotip i LOH de tots els casos (Taula 19):

Taula 19. Grups resultants de la relació genotip/LOH de *TP53*

		genotip		
		<i>negatiu</i>	<i>positiu</i>	
LOH	<i>negatiu</i>	14	16	30
	<i>positiu</i>	8	44	52
		22	60	82

- *Grup de genotip 1/ LOH 1*

Pertanyen al mateix 44 casos amb mutació al gen *TP53* i pèrdua al·lèlica concomitant. Segons el nostre estudi, sembla que el 54% dels tumors colorectals gaudiren d'un important avantatge selectiu de creixement gràcies a una manca absoluta d'activitat antiproliferativa endògena de p53 nadiua.

- *Grup de genotip 1/ LOH -*

Dins de la nostra sèrie de tumors, foren 16 els mutants del gen *TP53* que retingueren l'al·lel concomitant (27%). Tretze d'aquests cursaren amb alteracions de tipus M ó D,

mentre que els 3 restants presentaren mutacions de tipus N. Val a dir, però, que 2 dels casos corresponents al primer grup resultaren ésser doblement mutats, acompanyant-se l'alteració M d'un altra de tipus F ó N. La naturalesa de les darreres donà peu a pensar que, difícilment, les dues mutacions succeïen dins del mateix al·lel, doncs aquesta situació no reporta cap avantatge proliferatiu als tumors que les presenten; tanmateix, lamentablement, no hi ha forma de saber si les mutacions es produïren cadascuna en un al·lel o bé pertanyien a clons tumorals diferents. Amb tot, el baix percentatge d'immunopositivitat obtingut en ambdós casos (del 20 i el 25%, respectivament) ens decantaria en favor de la segona opció.

El grup de genotip 1/ LOH -, constitueix l'exemple clàssic dels tumors en els quals la p53 està sotmesa a l'efecte negatiu dominant de la proteïna mutada. És lògic doncs, pensar, que aquests tumors posseeixen ja d'entrada un avantatge de creixement respecte els no mutats, amb independència de quin sigui l'estat de l'al·lel concomitant. Ara bé, nosaltres tenim dubtes que els tumors que presenten mutacions sense sentit en un al·lel, conservant l'altre intacte, puguin gaudir del mateix avantatge selectiu, doncs en aquests casos no hauria de produir-se l'efecte negatiu dominant; tal cosa solament pot succeir si la proteïna mutada conserva íntegre el domini d'oligomerització (Shaulian *et al*, 1992; Wang *et al*, 1994). I, és obvi que les proteïnes aberrants o truncades abans de l'esmentat domini, de cap manera no poden conservar-lo. En aquests casos, la mutació –per ella mateixa– no hauria de ser suggestiva de l'estat funcional de la proteïna, ja que dependria de l'estat al·lèlic del tumor.

- *Grup de genotip –/ LOH 1*

Solament 8 dels 22 tumors sense evidència de mutació a *TP53* pertanyen al present grup. Aquesta fracció, corresponent al 10% dels tumors de la nostra sèrie, constitueix un fenomen poc habitual, ja que la pèrdua cromosòmica sol ser una alteració relativament tardana i posterior a la inactivació per mutació puntual de l'al·lel concomitant (Howe i Guillem, 1997).

Hi hauria més d'una hipòtesi per a poder explicar aquest fet: 1) que a 17p s'hi trobés algun altre gen supressor, tal i com han suggerit alguns autors que treballen en càncer de

mama (Coles *et al*, 1990) o de fetge (Fugimori *et al*, 1991); 2) que la reducció al 50% de l'expressió del gen *TP53* conferís la cèl·lula un avantatge selectiu de creixement, tal i com ha estat prèviament descrit en hepatocarcimes (Oda *et al*, 1992); i 3) la possibilitat que aquests tumors presentessin mutacions a *TP53* fora de la regió rastrejada mitjançant el SSCP (exons 4-8). Aquesta darrera hipòtesi no pot ésser descartada malgrat el fenotip de 7 dels 8 casos fóra negatiu, doncs fóra de la regió dels exons 5-8 hi ha un predomini de mutacions que no conserven la pauta de lectura (Harris, 1996).

- *Grup de genotip -/LOH -*

Els 14 tumors que integren aquest grup (17%) vindrien a representar la fracció de la nostra sèrie lliure d'alteracions de la p53. A la pràctica, un dels 14 casos cursà amb fenotip positiu, la qual cosa suggerí la presència d'una mutació de tipus M o D fora dels exons estudiats (4-9).

6.2. Valoració de la conveniència de conèixer l'estat al·lèlic de *TP53*

Com hem vist a l'*Apartat 2.1.2 del Capítol I*, la pèrdua al·lèlica de la regió 17p13 és una de les alteracions genètiques més freqüents en el carcinoma de còlon i recte, i sol acompanyar-se de mutacions puntuals a l'al·lel no delecionat (Baker *et al*, 1989). Tanmateix, sabem que aquest mecanisme obeeix la teoria clàssica de les dues mutacions formulada per Knudson, base de la inactivació dels gens supressors tumorals. Per això, tractant-se mutació i pèrdua de fenòmens diferents, de cap manera no podem plantejar-nos la LOH com a estratègia indirecta alternativa a l'estudi d'alteracions de p53, capaç de suplir les aproximacions a la proteïna (IHQ) i al gen (PCR-SSCP/seqüenciació).

Ara bé, tot i entenent que la informació obtinguda mitjançant la detecció de LOH no és redundant ans al contrari, complementària a la de la resta de tècniques, cal determinar si aquesta representa un valor afegit al pronòstic del nostres tumors. Som conscients que, per manca de dades relatives al seguiment dels pacients, no podem afirmar categòricament res. I, malgrat tot, els resultats demostrant la tendència dels mutants a perdre l'al·lel concomitant juntament amb el fet que la pèrdua de 17p s'associa a tumors

amb afectació ganglionar i pitjor estadi, suggereixen que aquest factor és un important determinant de la capacitat metastàtica dels tumors colorectals.

Aquesta especulació es recolza en les dades d'altres treballs prèviament publicats que, com nosaltres, demostren que la pèrdua al·lèlica de 17p en càncer colorectal està lligada a l'estadi tumoral (Kern *et al*, 1989; Laurent-Puig *et al*, 1992). Àdhuc hi ha indicis que aquest marcador és un factor de pronòstic –amb independència de l'estadi– superior a les mutacions de *TP53* (Hamelin *et al*, 1994).

7. PROPOSTA D'APROXIMACIÓ METODOLÒGICA A L'ESTAT DE P53

Després d'analitzades totes i cadascuna de les dades obtingudes mitjançant les tres tècniques, tornem altre cop a l'origen de la qüestió, que és la necessitat de protocolitzar l'estudi d'un marcador pronòstic del carcinoma colorectal, com la p53. I possiblement, allò que més cridi l'atenció a primera vista sigui l'escassa coincidència dels resultats obtinguts reflex, al nostre entendre, de la manca d'uniformitat dels paràmetres a mesurar. En aquest sentit, per tant, caldria diferenciar entre les tècniques dissenyades per a conèixer cadascun dels esdeveniments necessaris per a la total inactivació de la proteïna p53, això és: 1) les mutacions puntuals o micromutacions –insercions o delecions– que afecten un dels al·lèls en primera instància, i es posen de manifest per tècniques d'IHQ i/o PCR-SSCP/seqüenciació; i 2) les pèrdues al·lèliques, normalment sobrevingudes al primer succés, i que es detecten mitjançant la determinació de LOH al locus corresponent. Creiem que, en definitiva, la consecució de l'objectiu passa per establir quin és l'abordatge correcte del primer esdeveniment, i per determinar si l'estudi del segon pot aportar informació pronòstica als tumors colorectals.

7.1. Abordatge de la primera alteració per a la inactivació del gen supressor *TP53*

La nostra reflexió parteix de la base que la PCR-SSCP/seqüenciació és la tècnica de referència per a l'abordatge de p53 (vegeu l'*Apartat 4.2* d'aquest mateix capítol). I, de

fet, els resultats del nostre estudi la confirmen com a la millor de les tècniques per a detectar mutacions, doncs el 68% dels casos de la sèrie foren positius segons la mateixa *vs.* el 56% dels detectats mitjançant la IHQ. Amb tot, les nostres reticències vers la utilització de la SSCP ja han quedat paleses a l'*Apartat 4.2.2* d'aquest mateix capítol, en haver analitzat les discordances fenotip/genotip. Sabem que una tècnica de referència és, per definició, la més sensible i específica de les possibles; però alhora creiem que si aquesta ha de ser aplicada de forma rutinària ha de ser –a banda d'assequible, parlant en termes econòmics– reproduïble, i ha de permetre la interpretació de resultats amb certa facilitat. En el cas de la PCR-SSCP/seqüenciació, això solament és possible en laboratoris molt especialitzats, amb personal altament qualificat i entrenat a propòsit.

La nostra conclusió és que, donat que la PCR-SSCP/ no és capaç de detectar totes les alteracions de p53 (especialment, quan s'estudien únicament els exons de 5-8), cal servir-se d'altres tècniques per a complementar les mancances de la de referència. En aquest sentit pensem que la IHQ pot resultar útil per al cribratge, malgrat no ésser aparentment una variable capaç de predir totes les mutacions que conserven la pauta de lectura –és a dir, les M i D– de la nostra classificació. Apuntem, doncs, que una bona estratègia consistiria en cribrar tots els casos mitjançant IHQ per a detectar acumulació: arribats aquest punt, els casos fenotípicament positius no requeririen cap altre estudi addicional, doncs el coneixement del tipus de mutació no s'ha demostrat, per ara, lligat a una significació pronòstica diferent. Els casos negatius, en canvi, haurien d'abordar-se mitjançant la PCR-SSCP/seqüenciació, que permetria destriar els casos no mutants dels que presentessin alteracions amb afectació de la pauta de lectura (per a nosaltres, les mutacions de tipus N, F ó S).

7.2. Abordatge de la segona alteració per a la inactivació del gen supressor *TP53*

Hem après que la mutació i la pèrdua de *TP53*, tot i estar relacionades, són fenòmens que pertanyen a coordenades d'espai i temps diferents dins del procés evolutiu del càncer colorectal. El primer d'ells afecta –resultat de la combinació de les tècniques d'IHQ i PCR-SSCP/seqüenciació aplicades a la nostra sèrie –, més del 70% dels casos estudiats. I ho fa amb independència del grau histològic, del nivell d'infiltració i de l'estadi tumoral, la qual cosa demostra la importància que la p53 té en el procés de la

gènesi d'aquesta neoplàsia. El segon fenomen, per contra, sí es troba lligat a l'estadi tumoral, molt probablement com a conseqüència de la dependència de l'afectació ganglionar. Aquesta troballa, unida a les d'altres autors que es pronuncien en el mateix sentit, suggereix que les pèrdues de 17p són un factor clau per a l'adquisició del potencial metastatitzant en la neoplàsia colorectal (Kern *et al*, 1989; Laurent-Puig *et al*, 1992).

Nosaltres creiem que tot el que s'ha exposat fins ara porta, necessàriament, a plantejar-se la LOH no com a estratègia indirecta alternativa a l'estudi d'alteracions de la p53, sinó com a tècnica complementària. I pensant que voler saber quin és l'estat al·lèlic de *TP53* té sentit en termes de pronòstic, no podem deixar d'incorporar la detecció de LOH al locus TP53 com a part del nostre protocol d'aproximació a l'estat de p53.

VI. CONCLUSIONS

Assolits els objectius específics, les conclusions derivades del present treball són les següents:

- La PCR-SSCP/seqüenciació és el mètode més sensible dels emprats per a l'estudi d'alteracions del gen *TP53*, permetent la detecció d'un nombre major de mutacions que el mètode alternatiu (la IHQ). Aquesta propietat, unida a la seva total especificitat, ratifica aquesta tècnica com a mètode de referència en la neoplàsia colorectal. Malgrat tot, les dificultats que comporta l'aplicació de la PCR-SSCP/seqüenciació a finalitats assistencials fan recomanable la utilització d'estratègies alternatives.
- La IHQ no pot considerar-se una estratègia alternativa al mètode de referència per a detectar alteracions del gen *TP53* en la neoplàsia colorectal. Els resultats obtinguts així ho demostren, doncs la sensibilitat i l'especificitat del mètode, en el millor dels casos, és del 75% i el 84% respectivament, lluny del que es considera clínicament acceptable (95%). Això es tradueix, a la pràctica, que la IHQ és responsable d'un 17% de falsos negatius, percentatge que significa que el 39% dels tumors colorectals fenotípicament negatius és susceptible de ser mal classificat de no mutant.
- La IHQ és, en canvi, un mètode extremadament útil per al cribratge d'alteracions al gen *TP53*, malgrat l'acumulació no hagi demostrat ésser una variable predictiva de les mutacions que conserven la pauta de lectura, en la neoplàsia colorectal. En aquest sentit, l'ampliació de l'estudi mutacional mitjançant l'aplicació de tècniques de PCR-SSCP/seqüenciació als tumors de fenotip positiu no aportaria informació addicional amb significació pronòstica.
- Com a conseqüència d'aplicar la regressió logística als resultats obtinguts per a determinar si la IHQ proporcionava un model que s'ajustés al mètode de referència –representat per la PCR-SSCP/seqüenciació–, en resultà que el llindar de sensibilitat més adient per als estudis d'acumulació és el 15% de nuclis immunoreactius, doncs permet d'assolir l'equilibri més raonable entre els dos tipus d'error (fals positiu i fals negatiu).

- La detecció de LOH al locus TP53 ha de plantejar-se, necessàriament, com una tècnica complementària en l'abordatge de l'estat de la p53, però mai com a estratègia indirecta per a detectar les alteracions del seu gen. Malgrat haguem demostrat que hi ha una tendència dels tumors colorectals amb mutacions al gen *TP53* a perdre l'al·lel concomitant ($p = 0,004$, prova exacta de Fisher), no s'ha d'oblidar que un 20% dels casos estudiats presentà mutacions en absència de pèrdua al·lèlica, mentre que un altre 10% presentà pèrdua en absència de mutació.
- La relació de dependència demostrada entre la pèrdua al·lèlica de *TP53* i l'estadi tumoral, probablement conseqüència d'una dependència paral·lela de l'afectació ganglionar, suggereix que la primera és un fenomen clau per a l'adquisició de potencial metastatitzant en els tumors colorectals. Donada la implicació pronòstica que comporta aquesta afirmació, creiem que el protocol d'aproximació a l'estat de la p53 ha d'incloure la detecció de LOH al locus TP53.

VII. BIBLIOGRAFIA

A

Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, *et al.* Clues of the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; *260*: 812-816

Aaltonen LA, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen H, Jass JR, Green JS, Lynch HT, Watson P, Tallqvist G, Juhola M, *et al.* Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1994; *54*: 1645-1648

Aarnio M, Salovaara R, Aaltonen LA, Mecklin JP, Jarvinen HJ. Features of gastric cancer in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Int J Cancer* 1997; *74*: 551-555

Agresti A. Loglineal models. A: Categorical data analysis. New York: John Wiley & Sons 1990a; 130-135

Agresti A. Models for binary response variables. A: Categorical data analysis. New York: John Wiley & Sons 1990b; 85-109

Akerley WL 3rd, Moritz TE, Ryan LS, Henderson WG, Zacharski LR. Racial comparison of outcomes of male Department of Veterans Affairs patients with lung and colon cancer. *Arch Intern Med* 1993; *153*: 1681-1688

Andre T, Louvet C, Raymond E, Tournigand C, de Gramont A. Bimonthly high-dose leucovorin, 5-fluorouracil infusion and oxaliplatin (FOLFOX3) for metastatic colorectal cancer resistant to the same leucovorin and 5-fluorouracil regimen. *Ann Oncol* 1998; *9*: 1251-1253

Armitage NC, Robins RA, Evans DF, Turner DR, Baldwin RW, Hardcastle JD. The influence of tumour cell DNA abnormalities on survival in colorectal cancer. *Br J Surg* 1985; *72*: 828-830

Arribas R, Capella G, Tortola S, Masramon L, Grizzle WE, Perucho M, Peinado MA. Assessment of genomic damage in colorectal cancer by DNA fingerprinting: prognostic applications. *J Clin Oncol* 1997; *15*: 3230-3240

Arrowsmith CH, Morin P. New insights into p53 function from structural studies. *Oncogene* 1996; *12*: 1379-1385

Aschele C, Debernardis D, Casazza S, Antonelli G, Tunesi G, Baldo C, Lionetto R, Maley F, Sobrero A. Immunohistochemical quantitation of thymidylate synthase expression in colorectal cancer metastases predicts for clinical outcome to fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999; *17*: 1760-1770

Ashcroft M, Vousden KH. Regulation of p53 stability. *Oncogene* 1999; *18*: 7637-7643

Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology (ADASP). Recommendations for the reporting of resected large intestinal carcinomas. *Hum Pathol* 1996; 27: 5-8

Astler VB, Collier FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954; 139: 846-852

B

Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, *et al.* Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 217-221

Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 1990b; 249: 912-915

Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1990a; 50: 7717-7722

Banks L, Matlashewski G, Crawford L. Isolation of human-p53-specific monoclonal antibodies and their use in the studies of human p53 expression. *Europ J Biochem* 1986; 159: 529-534

Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M. mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J* 1993; 12: 461-468

Barbacid M. *ras* genes. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 779-827

Battifora H. p53 immunohistochemistry: a word of caution. *Hum Pathol* 1994; 25: 435-437

Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J, Reingold A, Manos MM. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 1991; 265: 472-477

Beart RW Jr, van Heerden JA, Beahrs OH. Evolution in the pathologic staging of carcinoma of the colon. *Surg Gynecol Obstet* 1978; 146: 257-259

Begg CB. Biases in the assessment of diagnostic tests. *Stat Med* 1987; 6: 411-423

Ben-Josef E, Court WS. Whole abdominal radiotherapy and concomitant 5-fluorouracil as adjuvant therapy in advanced colon cancer. *Dis Colon Rectum* 1995; 38: 1088-1092

Bergh J. Determination and use of p53 in the management of cancer patients with special focus on breast cancer- A review. A: Klijn JGM, ed. Prognostic and predictive value of p53. Amsterdam: Elsevier Science BV 1997; 35-50

Bhatia K, Goldshmidts W, Gutierrez M, Gaidano G, Dalla-Favera R, Magrath I. Hemi- or homozygosity: a requirement for some but not other p53 mutant proteins to accumulate and exert a pathogenetic effect. *FASEB J* 1993; 7: 951-956

Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P, Lucibello FC, Murday VA, Rider SH, Scambler P, *et al.* Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 1987; 328: 614-616

Børresen A-L, Hovig E, Smith-Sørensen B, Malkin D, Lystad S, Andersen TI, Nesland JM, Isselbacher KJ, Friend SH. Constant denaturant gel electrophoresis as a rapid screening technique for p53 mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8405-8409

Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B. Prevalence of *ras* gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987; 327: 293-297

Bosari S, Viale G, Bossi P, Maggioni M, Coggi G, Murray JJ, Lee AKC. Cytoplasmic accumulation of p53 protein: an independent prognostic indicator of colorectal adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 681-687

Bottger A, Bottger V, Sparks A, Liu WL, Howard SF, Lane DP. Design of a synthetic Mdm2-binding mini protein that activates the p53 response in vivo. *Curr Biol* 1997; 7: 860-869

Bourdon JC, Deguin-Chambon V, Lelong JC, Dessen P, May P, Debuire B, May E. Further characterisation of the p53 responsive element--identification of new candidate genes for trans-activation by p53. *Oncogene* 1997; 14: 85-94

Broders AC. The microscopic grading of cancer. A: Pack GT, Livingstone EM, eds. *Treatment of cancer and allied diseases Vol 1*. New York: Hoeber PB, Inc 1940

Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, *et al.* Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994; 368: 258-261

Burmer GC, Loeb LA. Mutations in the KRAS2 oncogene during progressive stages of human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2403-2407

Bussey HJR. Polyposis syndromes. A: Morson BC, ed. *The pathogenesis of colorectal cancer*. Philadelphia: WB Saunders 1978; 81-94

C

Cady B, Persson AV, Monson DO, Maunz DL. Proceedings: Changing patterns of colorectal carcinoma. *Cancer* 1974; 33: 422-426

Caldes T, Iniesta P, Vega FJ, Juan Cde, López JA, Díaz-Rubio E, Fernández C, Cerdán J, Balibrea JL, Benito M. Comparative survival analysis of p53 gene mutations and protein accumulation in colorectal cancer. *Oncology* 1998; *55*: 249-257

Campo E. Mecanismos moleculares de la transformación y progresión del carcinoma colorrectal. *Med Clin (Barc)* 1996; *107*: 669-676

Caron de Fromentel C, Soussi T. TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 1992; *4*: 1-15

Carson DA, Lois A. Cancer progression and p53. *Lancet* 1995; *346*: 1009-1011

Chang F, Syrjänen S, Tervahauta A, Syrjänen K. Tumorigenesis associated with the p53 tumour suppressor gene. *Br J Cancer* 1993; *68*: 653-661

Chen CY, Oliner JD, Zhan Q, Fornace AJ Jr, Vogelstein B, Kastan MB. Interactions between p53 and MDM2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; *91*: 2684-2688

Chen PL, Chen YM, Bookstein R, Lee WH. Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 1990; *250*: 1576-1580

Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994; *265*: 346-355

Clark JL, Berger SH, Mittelman A, Berger FG. Thymidylate synthase gene amplification in a colon tumor resistant to fluoropyrimidine chemotherapy. *Cancer Treat Rep* 1987; *71*: 261-265

Cohen PR, Kohn SR, Kurzrock R. Association of sebaceous gland tumors and internal malignancy: the Muir-Torre syndrome. *Am J Med* 1991; *90*: 606-613

Colditz GA, Cannuscio CC, Frazier AL. Physical activity and reduced risk of colon cancer: implications for prevention. *Cancer Causes Control* 1997; *8*: 649-667

Coles C, Thompson AM, Elder PA, Cohen BB, Mackenzie IM, Cranston G, Chetty U, Mackay J, Macdonald M, Nakamura Y, *et al.* Evidence implicating at least two genes on chromosome 17p in breast carcinogenesis. *Lancet* 1990; *336*: 761-763

Copur S, Aiba K, Drake JC, Allegra CJ, Chu E. Thymidylate synthase gene amplification in human colon cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil. *Biochem Pharmacol* 1995; *49*: 1419-1426

Cordon-Cardo C, Dalbagni G, Saez GT, Oliva MR, Zhang Z-F, Rosai J, Reuter VE, Pellicer A. p53 mutations in human bladder cancer: genotypic versus phenotypic patterns. *Int J Cancer* 1994; *56*: 347-353

Cox LS, Lane DP. Tumor suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage. *BioEssays* 1995; *17*: 501-508

Cripps KJ, Purdie CA, Carder PJ, White S, Komine K, Bird CC, Wyllie AH. A study of stabilisation of p53 protein versus point mutation in colorectal carcinoma. *Oncogene* 1994; 9: 2739-2743

Crissman JD, Zarbo RJ, Ma CK, Visscher DW. Histopathologic parameters and DNA analysis in colorectal adenocarcinomas. *Pathol Annu* 1989; 24: 103-147

Cunningham J, Lust JA, Schaid DJ, Bren GD, Carpenter HA, Rizza E, Kovach JS, Thibodeau SN. Expression of p53 and 17p allelic loss in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1992; 52: 1974-1980

Cutait R, Alves VA, Lopes LC, Cutait DE, Borges JL, Singer J, da Silva JH, Goffi FS. Restaging of colorectal cancer based on the identification of lymph node micrometastases through immunoperoxidase staining of CEA and cytokeratins. *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 917-920

D

D'Avanzo B, La Vecchia C, Franceschi S, Gallotti L, Talamini R. Cigarette smoking and colorectal cancer: a study of 1,584 cases and 2,879 controls. *Prev Med* 1995; 24: 571-579

Day DW, Morson BC. The adenoma-carcinoma sequence. A: Morson BC, ed. *The pathogenesis of colorectal cancer*. Philadelphia: WB Saunders 1978; 58-71

Dayal Y, DeLellis RA. El tubo digestivo. A: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, eds. *Patología estructural y funcional (Vol 2)*. Madrid: McGraw-Hill – Interamericana de España SA 1990; 873-957

De Gramont A, Vignoud J, Tournigand C, Louvet C, Andre T, Varette C, Raymond E, Moreau S, Le Bail N, Krulik M. Oxaliplatin with high-dose leucovorin and 5-fluorouracil 48-hour continuous infusion in pretreated metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33: 214-219

Del Regato JA, Spjut HJ, Cox JD. Cancer of the digestive tract: large bowel. A: Harshberger SE, Kasper R, eds. *Ackerman & del Regato's Cancer. Diagnosis, treatment and prognosis (6a edición)*. St. Louis: The CV Mosby Company 1985; 530-569

Denoix PF. French Ministry of Public Health National Institute of Hygiene. Monograph No 4. Paris: 1954

Derynck R, Gelbart WM, Harland RM, Heldin CH, Kern SE, Massague J, Melton DA, Mlodzik M, Padgett RW, Roberts AB, Smith J, Thomsen GH, Vogelstein B, Wang XF. Nomenclature: vertebrate mediators of TGFbeta family signals. *Cell* 1996; 87: 173

Diller L, Kassel J, Nelson CE, Gryka MA, Litwak G, Gebhardt M, Bressac B, Ozturk M, Baker SJ, Vogelstein B, et al. p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 5772-5781

Dubeau L, Chandler LA, Gralow JR, Nichols PW, Jones PA. Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens. *Cancer Res* 1986; *46*: 2964-2969

Duesberg P, Rausch C, Rasnick D, Hehlmann R. Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; *95*: 13692-13697

Dukes CE. Histologic grading of rectal carcinoma. *Proc R Soc Med* 1937; *30*: 371

Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol* 1932; *35*: 323-332

Dwight RW, Higgins GA, Keehn RJ. Factors influencing survival after resection in cancer of the colon and rectum. *Am J Surg* 1969; *117*: 512-522

E

Eckert KA, Kunkel TA. The fidelity of DNA polymerases used in the polymerase chain reactions. A: McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR, eds. *PCR: A practical approach*. New York: Oxford University Press 1991; 225-245

Edmonston TB, Cuesta KH, Burkholder S, Barusevicius A, Rose D, Kovatich AJ, Boman B, Fry R, Fishel R, Palazzo JP. Colorectal carcinomas with high microsatellite instability: defining a distinct immunologic and molecular entity with respect to prognostic markers. *Hum Pathol* 2000; *31*: 1506-1514

Ehrlich M, Zhang XY, Inamdar NM. Spontaneous deamination of cytosine and 5-methylcytosine residues in DNA and replacement of 5-methylcytosine residues with cytosine residues. *Mutat Res* 1990; *238*: 277-286

El-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* 1992; *1*: 45-49

El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. *WAF1*, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; *75*: 817-825

Elias JM. Cell proliferation indexes: a biomarker in solid tumors. *Biotech Histochem* 1997; *72*: 78-85

Eliyahu D, Michalovitz D, Eliyahu S, Pinhasi-Kimhi O, Oren M. Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; *86*: 8763-8767

Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 1996; *274*: 1664-1672

Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Hoodless P, Kim H, Tsui LC, Bapat B, Gallinger S, Andrulis IL, Thomsen GH, Wrana JL, Attisano L. *MADR2* maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 1996; 86: 543-552

F

Farmer G, Bargonetti J, Zhu H, Friedman P, Prywes R, Prives C. Wild-type p53 activates transcription in vitro. *Nature* 1992; 358: 83-86

Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, *et al.* Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990; 247: 49-56

Fearon ER, Hamilton SR, Vogelstein B. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* 1987; 238: 193-197

Fearon ER, Jones PA. Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. *FASEB J* 1992; 6: 2783-2790

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767

Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE. Other tumours of the large intestine: epithelial tumours (Part 1). A: Whitehead R, ed. *Gastrointestinal and oesophageal pathology* (2a edició). Hong Kong: Churchill Livingstone 1995; 885

Fields S, Jang SK. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 1990; 249: 1046-1049

Filipe MI. Mucous secretion in rat colonic mucosa during carcinogenesis induced by dimethylhydrazine. A morphological and histochemical study. *Br J Cancer* 1975; 32: 60-77

Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*. 1989; 57: 1083-1093

Finlay CA. The mdm-2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 301-306

Fischer SG, Lerman LS. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 1579-1583

Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75: 1027-1038

Flaman JM, Frebourg T, Moreau V, Charbonnier F, Martin C, Chappuis P, Sappino AP, Limacher IM, Bron L, Benhattar J, *et al.* A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; *92*: 3963-3967

Forrester K, Almoguera C, Han K, Grizzle WE, Perucho M. Detection of high incidence of *K-ras* oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 1987; *327*: 298-303

Friedman PN, Kern SE, Vogelstein B, Prives C. Wild-type, but not mutant, human p53 proteins inhibit the replication activities of simian virus 40 large tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; *87*: 9275-9279

Fritz A, Percy C, Jack A, Shanmugaratnam K, Sobin L, Parkin DM, Whelan S. International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O): World Health Organization (3a edició). Geneva, 2000

Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Willett WC. Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N Engl J Med* 1999; *340*: 169-176

Fujimori M, Tokino T, Hino O, Kitagawa T, Imamura T, Okamoto E, Mitsunobu M, Ishikawa T, Nakagama H, Harada H, *et al.* Allelotype study of primary hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1991; *51*: 89-93

Fukuoka M, Negoro S, Niitani H, Furue H, Hasegawa K, Hara Y, Hara N, Taguchi T. A phase I study of weekly administration of CPT-11 in lung cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 1990; *17*: 993-997

G

Gabriel WB, Dukes CE, Bussey HJR. Lymphatic spread in cancer of the rectum. *Br J Surg* 1935; *23*: 395-413

Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane DP. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J* 1990; *9*: 1595-1602

Gardner EJ. Follow-up study of a family group exhibiting dominant inheritance for a syndrome including intestinal polyps, osteomas, fibromas and epidermoid cysts. *Am J Hum Genet* 1962; *14*: 376-390

Garfinkel L, Mushinski M. U.S. cancer incidence, mortality and survival: 1973-1996. *Stat Bull Metrop Insur Co* 1999; *80*: 23-32

Gastrointestinal Tumor Study Group. Adjuvant therapy of colon cancer: results of a prospectively randomized trial. *N Engl J Med* 1984; *310*: 737-743

Generalitat de Catalunya. L'impacte del càncer en la població catalana. A: Pla director d'oncologia a Catalunya: 2001-2004 (1a edició). Barcelona: Departament de Sanitat i Seguretat Social 2001; 9-28

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; *133*: 1710-1715

Ginsberg D, Mechta F, Yaniv M, Oren M. Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; *88*: 9979-9983

Go VLW, Zamcheck N. The role of tumor markers in the management of colorectal cancer. *Cancer* 1982; *50*: 2618-2623

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; *54*: 4855-4878

Greenson JK, Isenhardt CE, Rice R, Mojzisek C, Houchens D, Martin EW Jr. Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Duke's B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. Correlation with long-term survival. *Cancer* 1994; *73*: 563-569

Greer CE, Lund JK, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR Methods Applic* 1991; *1*: 46-50

Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, *et al.* Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991; *66*: 589-600

Grompe M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genet* 1993; *5*: 111-117

Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Eng J Med* 2000; *342*: 69-77

Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer* 1997; *21*: 233-300

H

Haenszel W, Kurihara M. Studies of Japanese migrants. I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *J Natl Cancer Inst* 1968; *40*: 43-68

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. *Science* 1996; *271*: 350-353

Halazonetis TD, Davis LJ, Kandil AN. Wild-type p53 adopts a mutant-like conformation when bound to DNA. *EMBO J* 1993; *12*: 1021-1028

Halazonetis TD, Kandil AN. Conformational shifts propagate from the oligomerization domain of p53 to its tetrameric DNA binding domain and restore DNA binding to select p53 mutants. *EMBO J* 1993; *12*: 5057-5064

Hamelin R, Laurent-Puig P, Olschwang S, Jego N, Asselain B, Remvikos Y, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G. Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1994; *106*: 42-48

Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S, Riboli E, Nakamura S, Hainaut P, Rubio CA, Sobin LH, Fogt F, Winawer SJ, Goldgar DE, Jass JR. Carcinoma of the colon and rectum. A: Hamilton SR, Aaltonen LA, eds. World Health Organization classifications of tumours. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. Lyon: IARC Press 2000; 105-119

Hamilton SR. Molecular genetics of colorectal carcinoma. *Cancer* 1992; *70*: 1216-1221

Han KA, Kulesz-Martin MF. Alternatively spliced p53 RNA in transformed and normal cells of different tissue types. *Nucleic Acids Res* 1992; *20*: 1979-1981

Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 1982; *143*: 29-36

Harlow E, Williamson NM, Ralston R, Helfman DM, Adams TE. Molecular cloning and in vitro expression of a cDNA clone for human cellular tumor antigen p53. *Mol Cell Biol* 1985; *5*: 1601-1610

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; *75*: 805-816

Harris CC. *p53*: At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science* 1993; *262*: 1980-1981

Harris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* 1996; *88*: 1442-1455

Hartmann A, Blaszyk H, McGovern RM, Schroeder JJ, Cunningham J, De Vries EM, Kovach JS, Sommer SS. p53 gene mutations inside and outside of exons 5-8: the patterns differ in breast and other cancers. *Oncogene* 1995; *10*: 681-688

Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997; *387*: 296-299

Hayashi K, Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* 1993; *2*: 338-346

- Hayashi K. PCR-SSCP: a method for detection of mutations. *Genet Anal Tech Appl* 1992; 9: 73-79
- Hayashi K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl* 1991; 1: 34-38
- Hemminki A, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen H, Salovaara R, Nystrom-Lahti M, de la Chapelle A, Aaltonen LA. Loss of the wild type MLH1 gene is a feature of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 1994; 8: 405-410
- Herbert DJ, Nishiyama RH, Bagwell CB, Munson ME, Hitchcox SA, Lowett EJ 3rd. Effects of several commonly used fixatives on DNA and total nuclear protein analysis by flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 1989; 91: 535-541
- Hill MJ. Cereals, cereal fibre and colorectal cancer risk: a review of the epidemiological literature. *Eur J Cancer Prev* 1998; 7 (Supl 2): S5-10
- Hinds P, Finlay C, Levine AJ. Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J Virol* 1989; 63: 739-746
- Hiort O, Wodtke A, Struve D, Zöllner A, Sinnecker GHG. Detection of point mutations in the androgen receptor gene using non-isotopic single strand conformation polymorphism analysis. *Hum Mol Genet* 1994; 13: 1163-1166
- Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sørliie T, Hovig E, Smith-Sørensen B, Montesano R, Harris CC. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 3551-3555
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53
- Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 1997; 420: 25-27
- Hongyo T, Buzard GS, Calvert RJ, Weghorst CM. 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 3637-3642
- Honma M, Ohara Y, Murayama H, Sako K, Iwasaki Y. Effects of fixation and varying target length on the sensitivity of polymerase chain reaction for detection of human T-cell leukemia virus type I proviral DNA in formalin-fixed tissue sections. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1799-1803
- Howe JR, Guillem JG. The genetics of colorectal cancer. *Surg Clin North Am* 1997; 77: 175-195
- Howe JR, Klimstra DS, Cordon-Cardo C. DNA extraction from paraffin-embedded tissues using a salting-out procedure: a reliable method for PCR amplification of archival material. *Histol Histopathol* 1997; 12: 595-601

Hoyheim B, Nakamura Y, White R. A BamHI polymorphism is detected by a genomic p53 clone. *Nucleic Acids Res* 1989; *17*: 8898

Huang J, Seow A, Shi CY, Lee HP. Colorectal carcinoma among ethnic Chinese in Singapore: trends in incidence rate by anatomic subsite from 1968 to 1992. *Cancer* 1999; *85*: 2519-2525

Hupp TR, Lane DP. Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr Biol* 1994; *4*: 865-875

Hupp TR, Meek DW, Midgley CA, Lane DP. Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* 1992; *71*: 875-886

I

Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990; *335*: 675-679

Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; *363*: 558-561

Ishioka C, Frebourg T, Yan YX, Vidal M, Friend SH, Schmidt S, Iggo R. Screening patients for heterozygous p53 mutations using a functional assay in yeast. *Nat Genet* 1993; *5*: 124-129

Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 1986; *320*: 84-85

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. *Int J Cancer* 1993; *53*: 260-263

Iwahana H, Yoshimoto K, Itakara M. Detection of point mutations by SSCP of PCR-amplified DNA after endonuclease digestion. *Biotechniques* 1992; *12*: 64

J

Jackson DP, Hayden JD, Quirke P. Extraction of nucleic acid from fresh and archival material. A: McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR, eds. *PCR: A practical approach*. New York: Oxford University Press 1991; 29-50

Jacoby RF, Llor X, Teng BB, Davidson NO, Brasitus TA. Mutations in the K-ras oncogene induced by 1,2-dimethylhydrazine in preneoplastic and neoplastic rat colonic mucosa. *J Clin Invest* 1991; *87*: 624-630

Jansson A, Sun XF. Ki-67 expression in relation to clinicopathological variables and prognosis in colorectal adenocarcinomas. *APMIS* 1997; *105*: 730-734

Jass JR, Sobin LH. *Histological Typing of Intestinal Tumours: World Health Organization (2a edició)*. Berlin: Springer-Verlag, 1989

Jayaraman L, Prives C. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by short single strands of DNA requires the p53 c-terminus. *Cell* 1995; *81*: 1021-1029

Jeffrey PD, Gorina S, Pavletich NP. Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* 1995; *267*: 1498-502

Jego N, Thomas G, Hamelin R. Short direct repeats flanking deletions, and duplicating insertions in p53 gene in human cancers. *Oncogene* 1993; *8*: 209-213

Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu ZF, Levitt RC, Sistonen P, Kinzler KW, Vogelstein B, Hamilton SR. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994; *331*: 213-221

Jenkins JR, Rudge K, Currie GA. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* 1984; *312*: 651-654

Jernvall P, Makinen MJ, Karttunen TJ, Makela J, Vihko P. Loss of heterozygosity at 18q21 is indicative of recurrence and therefore poor prognosis in a subset of colorectal cancers. *Br J Cancer* 1999; *79*: 903-908

Jessurun J, Romero-Guadarrama M, Manivel JC. Medullary adenocarcinoma of the colon: clinicopathologic study of 11 cases. *Hum Pathol* 1999; *30*: 843-848

Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Primary vs. secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities—balanced rearrangements vs. genomic imbalances? *Genes Chromosomes Cancer* 1996; *16*: 155-163

Jones MH, Nakamura Y. Detection of loss of heterozygosity at the human TP53 locus using a dinucleotide repeat polymorphism. *Genes Chromosomes Cancer* 1992; *5*: 89-90

K

Kahlenberg MS, Stoler DL, Basik M, Petrelli NJ, Rodriguez-Bigas M, Anderson GR. p53 tumor suppressor gene status and the degree of genomic instability in sporadic colorectal cancers. *J Natl Cancer Inst* 1996; *88*: 1665-1670

Kaserer K, Schmaus J, Bethge U, Migschitz B, Fasching S, Walch A, Herbst F, Teleky B, Wrba F. Staining patterns of p53 immunohistochemistry and their biological significance in colorectal cancer. *J Pathol* 2000; *190*: 450-456

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; *51*: 6304-6311

Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ Jr. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 1992; 71: 587-597

Kawazuma Y, Tanaka H, Tsukuma H, Ajiki W, Oshima A. Improvement of survival over time for colon cancer patients by anatomical sub-sites. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 705-710

Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS, Culotti JG, Tessier-Lavigne M. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 1996; 87: 175-185

Kent TH, Mitros FA. Polyps of the colon and small bowel, polyp syndromes and polyp-carcinoma sequence. A: Norris HT, ed. *Pathology of the colon, small intestine and anus*. New York: Churchill Livingstone 1983; 167-199

Kern SE, Fearon ER, Tersmette KWF, Enterline JP, Leppert M, Nakamura Y, White R, Vogelstein B, Hamilton SR. Allelic loss in colorectal carcinoma. *JAMA* 1989; 261: 3099-3103

Kern SE, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Seymour A, Kinzler KW, Vogelstein B. Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science* 1992; 256: 827-830

Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1994; 145: 148-156

Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D, *et al.* Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991a; 253: 661-665

Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hamilton SR, Hedge P, Markham A, *et al.* Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 1991b; 251: 1366-1370

Kirklin JW. Roentgenologic diagnosis of gastric cancer. *Wisconsin Med J* 1949; 48: 811-814

Knekt P, Hakama M, Jarvinen R, Pukkala E, Heliövaara M. Smoking and risk of colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998; 78: 136-139

Knudson AG Jr, Hethcote HW, Brown BW. Mutation and childhood cancer: a probabilistic model for the incidence of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 5116-5120

Knudson AG. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 1985; 45: 1437-1443

Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Muraoka M, Onda A, Okumura Y, Kishi N, Iwama T, Mori T, Koike M, *et al.* Molecular nature of colon tumors in hereditary

nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology* 1996; *111*: 307-317

Koss LG, Czerniak B, Herz F, Wersto RP. Flow cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors: a critical appraisal. *Hum Pathol* 1989; *20*: 528-548

Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 1997; *387*: 299-303

Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; *89*: 7491-7495

L

Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massagué J. Partnership between DPC4 and Smad proteins in TGF- signalling pathways. *Nature* 1996; *383*: 832-836

LaMont JT, O’Gorman TA. Experimental colon cancer. *Gastroenterology* 1978; *75*: 1157-1169

Lane DP, Benchimol S. p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev* 1990; *4*: 1-8

Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979; *278*: 261-263

Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; *358*: 15-16

Lanza G, Matteuzzi M, Gafa R, Orvieto E, Maestri I, Santini A, del Senno L. Chromosome 18q allelic loss and prognosis in stage II and III colon cancer. *Int J Cancer* 1998; *79*: 390-395

Laurent-Puig P, Olschwang S, Delattre O, Remvikos Y, Asselain B, Melot T, Validire P, Muleris M, Girodet J, Salmon RJ, *et al.* Survival and acquired genetic alterations in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1992; *102*: 1136-1141

Leach FS, Nicolaidis NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomaki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, *et al.* Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993a; *75*: 1215-1225

Leach FS, Tokina T, Meltzer P, Burrell M, Oliner JD, Smith S, Hill DE, Sidransky D, Kinzler ZW, Vogelstein B. p53 mutation and mdm-2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1993b; *53*: 2231-2234

Leichman CG. Thymidylate synthase as a predictor of response. *Oncology* 1998; *12*: 43-47

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396: 643-649

Lenz HJ, Hayashi K, Salonga D, Danenberg KD, Danenberg PV, Metzger R, Banerjee D, Bertino JR, Groshen S, Leichman LP, Leichman CG. p53 point mutations and thymidylate synthase messenger RNA levels in disseminated colorectal cancer: an analysis of response and survival. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1243-1250

Leppert M, Dobbs M, Scambler P, O'Connell P, Nakamura Y, Stauffer D, Woodward S, Burt R, Hughes J, Gardner E, *et al.* The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5. *Science* 1987; 238: 1411-1413

Levi R, Randimbison L, La Vecchia C. Trends in subsite distribution of colorectal cancers and polyps from the Vaud cancer registry. *Cancer* 1993; 72: 46-70

Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-456

Lianes P, Orlow I, Zhang Z-F, Oliva MR, Sarkis AS, Reuter VE, Cordon-Cardo C. Altered patterns of MDM2 and TP53 expression in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1325-1330

Liefers GJ, Cleton-Jansen AM, van de Velde CJ, Hermans J, van Krieken JH, Cornelisse CJ, Tollenaar RA. Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998; 339: 223-228

Lindblom A, Tannergard P, Werelius B, Nordenskjold M. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nat Genet* 1993; 5: 279-282

Linos DA, O'Fallon WM, Thistle JL, Kurland LT. Cholelithiasis and carcinoma of the colon. *Cancer* 1982; 50: 1015-1019

Linzer DIH, Levine AJ. Characterization of a 54 Kdalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979; 17: 43-52

Litt M, Luty JA. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 397-401

Liu B, Parsons SM, Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomaki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nature Med* 1996; 2: 169-174

Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty TD. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 1992; 70: 923-935

Lockhart-Mummery HE, Dukes CE. The precancerous changes in the rectum and colon. *Surg Gynec Obstet* 1928; 48: 591

Loeb LA. Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 5059-5063

Losi L, Ponz de Leon M, Jiricny J, Di Gregorio C, Benatti P, Percesepe A, Fante R, Roncucci L, Pedroni M, Benhattar J. *K-ras* and *p53* mutations in hereditary non-polyposis colorectal cancers. *Int J Cancer* 1997; 74: 94-96

Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993; 104: 1535-1549

M

Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, et al. Germ line *p53* mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990; 250: 1233-1238

Marra G, Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1114-1125

Martín Andrés A, Luna del Castillo, J de D. El test χ^2 y sus aplicaciones. A: *Bioestadística para las Ciencias de la Salud* (4a edición). Madrid: Ediciones Norma SA 1999b; 345-350

Martín Andrés A, Luna del Castillo, J de D. Intervalos de confianza y de aceptación. A: *Bioestadística para las Ciencias de la Salud*. Madrid: Ediciones Norma SA 1999c; 152-153

Martín Andrés A, Luna del Castillo, J de D. Tests de homogeneidad con dos muestras. A: *Bioestadística para las Ciencias de la Salud* (4a edición). Madrid: Ediciones Norma SA 1999a; 270-274

Martín Andrés A, Luna del Castillo, J de D. Tests de homogeneidad con dos muestras. A: *Bioestadística para las Ciencias de la Salud* (4a edición). Madrid: Ediciones Norma SA 1999d; 279

Martinez J, Georgoff I, Martinez J, Levine AJ. Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive *p53* protein. *Genes Dev* 1991; 5: 151-159

Martinez-Lopez E, Abad A, Font A, Monzo M, Ojanguren I, Pifarre A, Sanchez JJ, Martin C, Rosell R. Allelic loss on chromosome 18q as a prognostic marker in stage II colorectal cancer. *Gastroenterology* 1998; 114: 1180-1187

- Massague J, Hata A, Liu F. TGF- β signaling through the Smad pathway. *Trends Cell Biol* 1997; 7: 187-192
- Matsumine A, Senda T, Baeg GH, Roy BC, Nakamura Y, Noda M, Toyoshima K, Akiyama T. MCC, a cytoplasmic protein that blocks cell cycle progression from the G₀/G₁ to S phase. *J Biol Chem* 1996; 271: 10341-10346
- McBride OW, Merry D, Givol D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 130-134
- McCormick D, Chong H, Hobbs C, Datta C, Hall PA. Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. *Histopathology* 1993; 22: 355-360
- McCormick F. Ras GTPase activating protein: signal transmitter and signal terminator. *Cell* 1989; 56: 5-8
- McDaniel T, Carbone D, Takahashi T, Chumakov P, Chang EH, Pirolo KF, Yin J, Huang Y, Meltzer SJ. A polymorphism in intron 6 of p53 detected by digesting PCR products with *MspI*. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 4796
- McLeod HL, Murray GI. Tumour markers of prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999; 79: 191-203
- McMichael A, Giles G. Colorectal cancer. A: Doll R, Fraumeni J Jr, Muir C, eds. *Trends in cancer incidence and mortality*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1994; 77-98
- Mercer WE, Shields MT, Amin M, Sauve GJ, Appella E, Romano JW, Ullrich SJ. Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6166-6170
- Mercer WE, Shields MT, Lin D, Appella E, Ullrich SJ. Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating-cell nuclear antigen expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1958-1962
- Michalovitz D, Halevy O, Oren M. p53 mutations: gains or losses? *J Cell Biochem* 1991; 45: 22-29
- Mies C, Houldsworth J, Chaganti RSK. Extraction of DNA from paraffin blocks for Southern blot analysis. *Am J Surg Pathol* 1991; 15: 169-174
- Miller C, Mohandas T, Wolf D, Prokocimer M, Rotter V, Koeffler HP. Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature* 1986; 319: 783-784
- Milner J, Chang YS, Medcalf EA, Wang Y, Eckhart W. Partially transformed T3T3 cells express high levels of mutant p53 in the 'wild-type' immunoreactive form with defective oligomerization. *Oncogene* 1993; 8: 2001-2008

- Milner J, Cook A, Sheldon M. A new anti-p53 monoclonal antibody, previously reported to be directed against the large T antigen of simian virus 40. *Oncogene* 1987; *1*: 453-455
- Milner J, McCormick F. Lymphocyte stimulation: concanavalin A induces the expression of a 53K protein. *Cell Biol Int Rep* 1980; *4*: 663-667
- Milner J, Medcalf EA. Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* 1991; *65*: 765-774
- Milner J. A conformation hypothesis for the suppressor and promoter functions of p53 in cell growth control and in cancer. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1991; *245*: 139-145
- Mitelman F. Catalogue of chromosome aberrations in cancer (5a edició). Johansson B, Mertens F. New York: Wiley-Liss, 1994
- Miyaki M, Seki M, Okamoto M, Yamanaka A, Maeda Y, Tanaka K, Kikuchi R, Iwama T, Ikeuchi T, Tonomura A, *et al.* Genetic changes and histopathological types in colorectal tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 1990; *50*: 7166-7173
- Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1992; *1*: 229-233
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992; *69*: 1237-1245
- Monod J, Changeux JP, Jacob F. Allosteric proteins and cellular control systems. *J Mol Biol* 1963; *6*: 306-329
- Mori M, Mimori K, Inoue H, Barnard GF, Tsuji K, Nanbara S, Ueo H, Akiyoshi T. Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1995; *55*: 3417-3420
- Morson BC, Dawson IMP. Adenomas and the adenoma-carcinoma sequence. A: *Gastrointestinal Pathology* (2a edició). Oxford: Blackwell Scientific Publications 1979; 615-647
- Morson BC. Notes on the pathology of carcinoma of the large intestine. *Natl Cancer Inst Monogr* 1967; *25*: 287-298
- Moskaluk CA, Kern SE. Cancer gets Mad: DPC4 and other TGFbeta pathway genes in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1996; *1288*: M31-33
- Mosner J, Mummenbrauer T, Bauer C, Sczakiel G, Grosse F, Deppert W. Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *EMBO J* 1995; *14*: 4442-4449

Muleris M, Salmon RJ, Zafrani B, Girodet J, Dutrillaux B. Consistent deficiencies of chromosome 18 and of the short arm of chromosome 17 in eleven cases of human large bowel cancer: a possible recessive determinism. *Ann Genet* 1985; 28: 206-213

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Meth Enzymol* 1987; 155: 335-350

Murphree AL, Benedict WF. Retinoblastoma: clues to human oncogenesis. *Science* 1984; 223: 1028-1033

N

Nathanson SD, Linden MD, Tender P, Zarbo RJ, Jacobson G, Nelson LS. Relationship among p53, stage and prognosis of large bowel cancer. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 527-534

Nelson RL, Dollear T, Freels S, Persky V. The relation of age, race, and gender to the subsite location of colorectal carcinoma. *Cancer* 1997; 80: 193-197

Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, *et al.* Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994; 371: 75-80

Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991; 253: 665-669

Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23-28

O

O'Brien MJ, O'Keane JO, Zauber A, Gottlieb LS, Winawer SJ. Precursors of colorectal carcinoma. Biopsy and biologic markers. *Cancer* 1992; 70: 1317-1327

Obuchowski N. Nonparametric analysis of clustered ROC curve data. *Biometrics* 1997; 53: 567-578

Oda T, Tsuda H, Scarpa A, Sakamoto M, Hirohashi S. p53 gene mutation spectrum in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1992; 52: 6358-6364

Offit K. Genetic prognostic markers for colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 124-125

Ogunbiyi OA, Goodfellow PJ, Herfarth K, Gagliardi G, Swanson PE, Birnbaum EH, Read TE, Fleshman JW, Kodner IJ, Moley JF. Confirmation that chromosome 18q allelic loss in colon cancer is a prognostic indicator. *J Clin Oncol* 1998; *16*: 427-433

Okamoto M, Sato C, Kohno Y, Mori T, Iwama T, Tonomura A, Miki Y, Utsunomiya J, Nakamura Y, White R, *et al.* Molecular nature of chromosome 5q loss in colorectal tumors and desmoids from patients with familial adenomatous polyposis. *Hum Genet* 1990; *85*: 595-599

Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; *358*: 80-83

Oliva MR, Saez GT, Latres E, Cordon-Cardo C. A new polymorphic site in intron 2 of TP53 characterizes LOH in human tumors by PCR-SSCP. *Diagn Mol Pathol* 1995; *4*: 54-58

Oren M. p53: the ultimate tumor suppressor gene? *FASEB J* 1992; *6*: 3169-3176

Oren M. Relationship of p53 to the control of apoptotic cell death. *Semin Cancer Biol* 1994; *5*: 221-227

Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; *5*: 874-879

Oyasu R, Nan L, Szumel RC, Kawamata H, Hirohashi S. p53 gene mutations in human urothelial carcinomas: analysis by immunohistochemistry and single-strand conformation polymorphism. *Modern Pathol* 1995; *8*: 170-176

P

Palombo F, Gallinari P, Iaccarino I, Lettieri T, Hughes M, D'Arrigo A, Truong O, Hsuan JJ, Jiricny J. GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science* 1995; *268*: 1912-1914

Papadopoulos N, Nicolaides NC, Liu B, Parsons R, Lengauer C, Palombo F, D'Arrigo A, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW, *et al.* Mutations of GTBP in genetically unstable cells. *Science*. 1995; *268*: 1915-1917

Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, *et al.* Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994; *263*: 1625-1629

Papathanasiou MA, Kerr NC, Robbins JH, McBride OW, Alamo IJ, Barrett SF, Hickson ID, Fornace AJ Jr. Induction by ionizing radiation of the *gadd45* gene in cultured human cells: lack of mediation by protein kinase C. *Mol Cell Biol* 1991; *11*: 1009-1016

Parada LF, Land H, Weinberg RA, Wolf D, Rotter V. Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 1984; *312*: 649-651

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* 1993; *54*: 594-606

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999; *49*: 33-64

Parks TG. Extracolonic manifestations associated with familial adenomatous polyposis. *Ann R Coll Surg Engl* 1990; *72*: 181-184

Parsons R, Li GM, Longley MJ, Fang WH, Papadopoulos N, Jen J, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B, Modrich P. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell* 1993; *75*: 1227-1236

Paulovich AG, Toczyski DP, Hartwell LH. When checkpoints fail. *Cell* 1997; *88*: 315-321

Peinado MA, Malkhosyan S, Velazquez A, Perucho M. Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; *89*: 10065-10069

Petrowsky H, Sturm I, Graubitz O, Kooby DA, Staib-Sebler E, Gog C, Kohne CH, Hillebrand T, Daniel PT, Fong Y, Lorenz M. Relevance of Ki-67 antigen expression and K-ras mutation in colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol* 2001; *27*: 80-87

Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C, DePinho RA. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 1998; *92*: 713-723

Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst* 1999; *91*: 916-932

Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. *APC* mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; *359*: 235-237

Pricolo VE, Finkelstein SD, Hansen K, Cole BF, Bland KI. Mutated p53 gene is an independent adverse predictor of survival in colon carcinoma. *Arch Surg* 1997; *132*: 371-375

Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol* 1999; *187*: 112-126

Purdie CA, O'Grady J, Piris J, Wyllie AH, Bird CC. p53 expression in colorectal tumors. *Am J Pathol* 1991; *138*: 807-813

Q

Quirke P, Dixon MF, Clayden AD, Durdey P, Dyson JE, Williams NS, Bird CC. Prognostic significance of DNA aneuploidy and cell proliferation in rectal adenocarcinomas. *J Pathol* 1987; *151*: 285-291

R

Raycroft L, Wu HY, Lozano G. Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science* 1990; *249*: 1049-1051

Ries L, Kosary CL, Hankey BF, *et al.* SEER cancer statistics review 1993-1995. Bethesda: National Cancer Institute, 1998

Riggins GJ, Thiagalingam S, Rozenblum E, Weinstein CL, Kern SE, Hamilton SR, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. Mad-related genes in the human. *Nat Genet* 1996; *13*: 347-349

Riley RS. Cellular proliferation markers in the evaluation of human cancer. *Clin Lab Med* 1992; *12*: 163-199

Robbins P. p53 and breast cancer. *Int J Surg Pathol* 1996; *4*: 93-110

Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; *87*: 7555-7559

Rovinski B, Benchimol S. Immortalization of rat embryo fibroblasts by the cellular p53 oncogene. *Oncogene* 1988; *2*: 445-452

Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S, Polakis P. Association of the *APC* gene product with beta-catenin. *Science* 1993; *262*: 1731-1734

S

Sahin AA, Ro JY, Brown RW, Ordonez NG, Cleary KR, el-Naggar AK, Wilson P, Ayala AG. Assessment of Ki-67-derived tumor proliferative activity in colorectal adenocarcinomas. *Mod Pathol* 1994; *7*: 17-22

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* (2a edición). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; *74*: 5463-5467

Santi DV, McHenry CS, Sommer H. Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry* 1974; *13*: 471-481

Sarnow P, Ho YS, Williams J, Levine AJ. Adenovirus E1b-58Kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54Kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 1982; *28*: 387-394

Sasaki S, Masaki T, Umetani N, Futakawa N, Ando H, Muto T. Characteristics in primary signet-ring cell carcinoma of the colorectum, from clinicopathological observations. *Jpn J Clin Oncol* 1998; *28*: 202-206

Sato T, Kazino Y. Ras in signal transduction. *Cancer* 1992; *3*: 169-177

Savage C, Das P, Finelli AL, Townsend SR, Sun CY, Baird SE, Padgett RW. *Caenorhabditis elegans* genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; *93*: 790-794

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley P. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; *63*: 1129-1136

Schlötterer C, Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res* 1992; *20*: 211-215

Sekelsky JJ, Newfels SJ, Raftery LA, Chartoff EH, Gelbart WM. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapeptidic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1995; *139*: 1347-1358

Shaulian E, Zauberman A, Ginsberg D, Oren M. Identification of a minimal transforming domain of p53—negative dominance through abrogation of sequence-specific DNA binding. *Mol Cell Biol* 1992; *12*: 5581-5592

Sheldon CA, McKinley CR, Hartig PR, Gonzalez R. Carcinoma at the site of ureterosigmoidostomy. *Dis Colon Rectum* 1983; *26*: 55-58

Shetye J, Mathiesen T, Fagerberg J, Rubio C. Ear tumours induced by experimental carcinogenesis in the rat: excision prevents early death. *Int J Colorectal Dis* 1994; *9*: 125-127

Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, Malkhosyan S, Perucho M. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumor genesis that persists after transformation. *Nature Genet* 1994; *6*: 273-281

Shibata D, Reale MA, Lavin P, Silverman M, Fearon ER, Steele G Jr, Jessup JM, Loda M, Summerhayes IC. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1996; *335*: 1727-1732

Shibata DK, Arnheim N, Martin WJ. Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J Exp Med* 1988; *167*: 225-230

Shivapurkar N, Huang L, Ruggeri B, Swalsky PA, Bakker A, Finkelstein S, Frost A, Silverberg S. *K-ras* and *p53* mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors from colon cancer patients. *Cancer Lett* 1997; *115*: 39-46

Shively JE, Beatty JD. CEA-related antigens: molecular biology and clinical significance. *Crit Rev Oncol Hematol* 1985; *2*: 355-399

Sigurdson ER. Surgical palliation of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer* 1995; *19*: 348-359

Skibber JM, Hoff PM, Minsky BD. Cancer of the rectum (capítol 33.8). A: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles and practice of oncology* (6a edició). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001; 1271-1319

Smit VT, Cornelisse CJ, De Jong D, Dijkshoorn NJ, Peters AA, Fleuren GJ. Analysis of tumor heterogeneity in a patient with synchronously occurring female genital tract malignancies by DNA flow cytometry, DNA fingerprinting, and immunohistochemistry. *Cancer* 1988; *62*: 1146-1152

Smith DR, Ji CY, Goh HS. Prognostic significance of p53 overexpression and mutation in colorectal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 1996; *74*: 216-223

Smith RG. Southwestern internal medicine conference: hereditary predisposition to colorectal cancer: new insights. *Am J Med Sci* 1994; *308*: 295-308

Solomon E, Voss R, Hall V, Bodmer WF, Jass JR, Jeffreys AJ, Lucibello FC, Patel I, Rider SH. Chromosome 5 allele loss in human colorectal carcinomas. *Nature* 1987; *328*: 616-619

Soong R, Robbins PD, Dix BR, Grieu F, Lim B, Knowles S, Williams KE, Turbett GR, House AK, Iacopetta BJ. Concordance between p53 protein overexpression and gene mutation in a large series of common human carcinomas. *Hum Pathol* 1996; *27*: 1050-1055

Soussi T, May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J Mol Biol* 1996; *260*: 623-637

Soussi T. The p53 tumour suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. A: Klijn JGM, ed. *Prognostic and predictive value of p53*. Amsterdam: Elsevier Science BV 1997; 3-21

Soussi T. The p53 tumour suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. A: Hanski C, Scherübl H, Mann B, eds. *Colorectal cancer: new aspects of molecular biology and immunology and their clinical applications*. New York: The New York Academy of Sciences 2000; 121-139

Spjut H, Estrada RG. The significance of epithelial polyps of the large bowel. *Pathol Annu* 1977; *12* (Part 1): 147-170

Srivastava S, Zou ZQ, Pirolo K, Blattner W, Chang EH. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 1990; *348*: 747-749

Steinbeck RG, Heselmeyer KM, Neugebauer WF, Falkmer UG, Auer GU. DNA ploidy in human colorectal adenocarcinomas. *Anal Quant Cytol Histol* 1993; *15*: 187-194

Stenger JE, Mayr GA, Mann K, Tegtmeyer P. Formation of stable p53 homotetramers and multiples of tetramers. *Mol Carcinog* 1992; *5*: 249-253

Steward, HL. Geographic pathology of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1971; *28*: 25-28

Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 1993; *262*: 1734-1737

Subler MA, Martin DW, Deb S. Modulation of cellular and viral promoters by mutant human P53 proteins found in tumor cells. *J Virol* 1992; *66*: 164-170

T

Tada M, Iggo RD, Ishii N, Shinohe Y, Sakuma S, Estreicher A, Sawamura Y, Abe H. Clonality and stability of the p53 gene in human astrocytic tumor cells: quantitative analysis of p53 gene mutations by yeast functional assay. *Int J Cancer* 1996; *67*: 447-450

Tait DM, Nahum AE, Meyer LC, Law M, Dearnaley DP, Horwich A, Mayles WP, Yarnold JR. Acute toxicity in pelvic radiotherapy; a randomised trial of conformal versus conventional treatment. *Radiother Oncol* 1997; *42*: 121-136

Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS, Schutte M, Hahn SA, Overhauser J, Willson JK, Markowitz S, Hamilton SR, Kern SE, Kinzler KW, Vogelstein B. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet* 1996; *13*: 343-346

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; *260*: 816-819

Troisi RJ, Freedman AN, Devesa SS. Incidence of colorectal carcinoma in the U.S.: an update of trends by gender, race, age, subsite, and stage, 1975-1994. *Cancer* 1999; *85*: 1670-1676

Turcot J, Depres JP, St Pierre F. Malignant tumors of the central nervous system associated with familial polyposis of the colon: report of two cases. *Dis Colon Rectum* 1959; *2*: 465-468

U

UICC (International Union Against Cancer). Colon and Rectum. A: Hermanek P, Hutter RVP, Sobin LH, Wagner G, Wittekind C, eds. TNM atlas: illustrated guide to the TNM/pTNM classification of malignant tumours (4a edició). Heidelberg: Springer-Verlag 1997; 99

Ullrich SJ, Mercer WE, Appella E. Human wild-type p53 adopts a unique conformational and phosphorylation state *in vivo* during growth arrest of glioblastoma cells. *Oncogene* 1992; 7: 1635-1643

V

Vasen HF, Wijnen JT, Menko FH, Kleibeuker JH, Taal BG, Griffioen G, Nagengast FM, Meijers-Heijboer EH, Bertario L, Varesco L, Bisgaard ML, Mohr J, Fodde R, Khan PM. Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* 1996; 110: 1020-1027

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319: 525-532

Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R. Alleloty of colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 207-211

Vogelstein B, Kinzler K. P53 function and dysfunction. *Cell* 1992; 70: 523-526

W

Wainscoat JS, Fey MF. Assessment of clonality in human tumors: a review. *Cancer Res.* 1990; 50: 1355-1360

Wang P, Reed M, Wang Y, Mayr G, Stenger JE, Anderson ME, Schwedes JF, Tegtmeier P. p53 domains: structure, oligomerization, and transformation. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 5182-5191

Wang Y, Prives C. Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. *Nature* 1995; 376: 88-91

Wang Y, Reed M, Wang P, Stenger JE, Mayr G, Anderson ME, Schwedes JF, Tegtmeier P. p53 domains: identification and characterization of two autonomous DNA-binding regions. *Genes Dev* 1993; 7: 2575-2586

Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, Benson AB 3rd, Hamilton SR. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2001; *344*: 1196-1206

Waterman JLF, Shenk JK, Halazonetis TD. The dihedral symmetry of the p53 tetramerization domain mandates a conformation switch upon DNA binding. *EMBO J* 1995; *14*: 512-519

Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer* 1993; *71*: 677-685

Weber JC, Nakano H, Bachellier P, Oussoultzoglou E, Inoue K, Shimura H, Wolf P, Chenard-Neu MP, Jaeck D. Is a proliferation index of cancer cells a reliable prognostic factor after hepatectomy in patients with colorectal liver metastases? *Am J Surg* 2001; *182*: 81-88

Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989; *44*: 388-396

Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular basis of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 1989; *49*: 3713-3721

Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; *248*: 76-79

Whetsell L, Maw G, Nandon N, Ringer DP, Schaerfer FV. Polymerase chain reaction microanalysis of tumors from stained histological slides. *Oncogene* 1992; *7*: 2355-2361

Wikman FP, Lu ML, Thykjaer T, Olesen SH, Andersen LD, Cordon-Cardo C, Orntoft TF. Evaluation of the performance of a p53 sequencing microarray chip using 140 previously sequenced bladder tumor samples. *Clin Chem* 2000; *46*: 1555-1561

Willett CG, Fung CY, Kaufman DS, Efrid J, Shellito PC. Postoperative radiation therapy for high-risk colon carcinoma. *J Clin Oncol* 1993; *11*: 1112-1117

Wilmink AB. Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1997; *40*: 483-493

Winawer SJ, Zauber AG, Gerdes H, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Bond JH, Wayne JD, Schapiro M, Panish JF, *et al.* Risk of colorectal cancer in the families of patients with adenomatous polyps. National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1996; *334*: 82-87

Wiseman LR, Adkins JC, Plosker GL, Goa KL. Oxaliplatin: a review of its use in the management of metastatic colorectal cancer. *Drugs Aging* 1999; *14*: 459-475

Wolkowicz R, Peled A, Elkind NB, Rotter V. Augmented DNA-binding activity of p53 protein encoded by a carboxyl-terminal alternatively spliced mRNA is blocked by p53 protein encoded by the regularly spliced form. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; *92*: 6842-6846

Wood DA, Robbins GF, Zippin C, Lum D, Stearns M. Staging of cancer of the colon and cancer of the rectum. *Cancer* 1979; 43: 961-968

Wu JK, Ye Z, Darras BT. Sensitivity of single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis in detecting p53 point mutations in tumors with mixed cell populations. *Am J Hum Genet* 1993b; 52: 1273-1275

Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 1993a; 7: 1126-1132

Wynder EL. The epidemiology of large bowel cancer. *Cancer Res* 1975; 35: 3388-3394

Wynford-Thomas D. P53 in tumour pathology: can we trust immunocytochemistry? *J Pathol* 1992; 166: 329-330

X

Xiao G, Chicas A, Olivier M, Taya Y, Tyagi S, Kramer FR, Bargonetti J. A DNA damage signal is required for p53 activate *gadd45*. *Cancer Res* 2000; 60: 1711-1719

Y

Yamaguchi A, Kurosaka Y, Fushida S, Kanno M, Yonemura Y, Miwa K, Miyazaki I. Expression of the p53 protein in colorectal cancer and its relationship to short term prognosis. *Cancer* 1992; 70: 2778-2784

Yamaguchi A, Nakagawara g, Kurosaka Y, Nishimura G, Yonemura Y, Miyazaki I. p53 immunoreaction in endoscopic biopsy specimens of colorectal cancer, and its prognostic significance. *Br J Cancer* 1993; 68: 399-402

Yin Y, Tainsky MA, Bischoff FZ, Strong LC, Wahl GM. Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell* 1992; 70: 937-948

Z

Zakut-Houri R, Bienz-Tadmor B, Givol D, Oren M. Human p53 cellular tumor antigen: cDNA sequence and expression in COS cells. *EMBO J* 1985; 4: 1251-1255

Zambetti GP, Bargonett J, Walker K, Prives C, Levine AJ. Wild-type p53 mediates positive regulation of gene expression through a specific DNA sequence element. *Genes Dev* 1992; 6: 1143-1152

Zambetti GP, Levine AJ. A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *FASEB J* 1993; 7: 855-865

Zhan Q, Bae I, Kastan MB, Fornace AJ Jr. The p53-dependent gamma-ray response of GADD45. *Cancer Res* 1994; 54: 2755-2760

Zwacka RM, Dunlop MG. Gene therapy for colon cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12: 595-615

VIII. ADDENDA

Plàcids i clars són aquests dies
d'una tardor fecunda, amb tants projectes
com fulles perden els pollancs de coure
de vora el riu.

S'encalma el temps, s'encalmen
els sentits i la veu; però són clares
les deus dels sentiments sota les dunes
dels somnis i dels anys.

Aviat serà hivern i encendrem foc;
s'escurçaran encara més els dies
i en pur silenci esperarem aquells
que han de venir de lluny per escalfar-nos
les mans i el cor amb les seves paraules.

En ells i amb ells la vida continua.

Miquel Martí i Pol de *Primer llibre de Bloomsbury*.

A en Manel Guix.