

## ALTERACIONS DEL CONTROL DEL CICLE CEL·LULAR EN NEOPLÀSIES HUMANES

ALFONS NADAL<sup>1</sup>, PEDRO JARES, PEDRO L. FERNÁNDEZ, M.<sup>a</sup> JESÚS REY, MAGDA PINYOL, LLUÍS HERNÁNDEZ, SÍLVIA HERNÁNDEZ, MAITE CAZORLA, ANTONIO CARDESA, ELÍAS CAMPO

*Anatomia Patològica. Hospital Clínic i Provincial i 'Hospital Casa de Maternitat.  
Universitat de Barcelona.*

Adreça per a la correspondència: Alfons Nadal. Anatomia Patològica. Hospital Clínic. Vil·larroel 170. 08036 Barcelona. Adreça electrònica: *anadal@medicina.ub.es*.

### INTRODUCCIÓ

Fins fa poc temps, els mecanismes que portaven un grup de cèl·lules de l'organisme a abandonar el comportament ordenat que caracteritza els teixits dels organismes pluricel·lulars i donar origen al càncer eren desconeguts. El descobriment del oncogenes virals (els *v-onc*) i les seves contrapartides cel·lulars (els *c-onc*) van donar les primeres pistes sobre les causes moleculars del càncer. En un primer moment es va creure que els *c-onc* eren gens inactius en el genoma normal i que la seva activació (per mutació o per inserció d'un promotor viral) conduïa al desenvolupament del càncer. Més endavant es va poder demostrar que els pretesos oncogenes cel·lulars són gens actius a les cèl·lules normals, sovint amb funcions fonamentals per al control de la proliferació cel·lular. Tot i que els oncogenes més coneguts formen part de les vies de transducció de senyals de l'ambient extracel·lular cap a l'interior del nucli (EGFR, PDGF, ras) o són factors de

transcripció coneguts (c-myc, c-fos, c-jun), recentment s'han acumulat evidències que les molècules directament implicades en el control del cicle cel·lular també participen en els processos de la transformació i la progressió neoplàstica (Hunter i Pines, 1994; Graña i Reddy, 1995; Hiram i Koeffler, 1995).

### EL CONTROL DEL CICLE CEL·LULAR

El cicle cel·lular representa el conjunt de processos que condueixen una cèl·lula a dividir-se, per donar origen a dues cèl·lules amb idèntica dotació genètica. En els organismes pluricel·lulars, la divisió de cada cèl·lula implica de retruc el conjunt de l'organisme. És per això que existeix un mecanisme de control molt fi que integra un conjunt de senyals, tant interns (de la pròpia cèl·lula) com externs (els factors de creixement, els nutrients, etc). Només si la resultat del conjunt de senyals és positiva, la

cèl·lula pren el compromís de dividir-se. Aquest compromís implica la preparació seqüencial dels elements necessaris per a la duplicació del DNA (fase G1), la síntesi del DNA pròpiament dita (fase S), la preparació dels elements mitòtics (fase G2) i la mitosi en si mateixa (fase M), que constitueixen les parts en què es divideix el cicle cel·lular. El terme seqüencial significa que per iniciar una de les fases cal que l'anterior s'hagi completat satisfactòriament. D'això se n'encarreguen un seguit de punts de control. Hi ha, però, un punt de control previ, aquell on la cèl·lula pren el compromís de dividir-se (Hartwell i Unger, 1977). Aquest punt es troba en algun lloc de la fase G1 i està sota el control de la proteïna del gen del retinoblastoma (pRb) (Pardee, 1989). Un cop superat aquest punt, la cèl·lula completa el cicle fins arribar a la divisió mitòtica, sempre que no es produeixi un accident que dispari l'alarma d'alguns dels punts de control a què hem fet referència abans (Hartwell i Weinert, 1989).

A diferència de la cèl·lula normal, la cèl·lula neoplàstica resulta insensible als senyals ambientals, de manera que la seva divisió es produeix de forma autònoma. Ara bé, això no és perquè apareguin vies de control del cicle prèviament inexistents, sinó per les alteracions que es produeixen en els mecanismes existents.

## Retinoblastoma

Ja hem dit que el punt crític per completar el cicle cel·lular es troba a la fase G1 i està sota el control de la proteïna del gen de la susceptibilitat del retinoblastoma. pRb és una fosfoproteïna intranuclear d'entre 105-115 kd que, ultra posseir una activitat com a factor de transcripció, exerceix el control sobre la progressió del cicle cel·lular mercès a la seva capacitat de «segrestar» factors de

transcripció necessaris per induir els elements que calen per a la síntesi del DNA. La seva estructura inclou una «butxaca d'unió» (en anglès *binding pocket*) amb la qual pot unir i inactivar factors de transcripció com c-myc i E2F (Helin *et al.*, 1992; Helin *et al.*, 1993). Molts elements necessaris per a la proliferació cel·lular tenen seqüències d'unió per E2F a les seves regions promotores (Dalton, 1992).

La capacitat de pRb d'unir i inactivar c-myc i E2F està regulada per fosforilació. pRb té diversos punts de fosforilació, alguns dels quals són a prop de la «butxaca d'unió». La fosforilació d'aquests punts inhibiria la capacitat d'unió de pRb a c-myc i E2F, cosa que els permetria exercir la seva funció. Durant la major part de la fase G1, pRb es manté hipofosforilat i segresta c-myc i E2F. Només en el moment en què la cèl·lula ha de superar el punt de control de G1 i progressar cap a la fase S es produeix la fosforilació de pRb i l'alliberament dels factors segrestats (Buchkovich *et al.*, 1989). El gen del retinoblastoma va ser el primer gen supressor descrit. El 1971, Knudson, basant-se en les observacions fetes sobre les formes hereditària i esporàdica del retinoblastoma, va proposar la hipòtesi dels dos impactes necessaris per anul·lar la funció dels gens supressors (Knudson, 1971). Segons aquest model, els malalts de retinoblastoma hereditari heretaven d'un dels seus progenitors un al·lel alterat del gen. La manca d'un al·lel de Rb no representa cap inconvenient per al desenvolupament embrionari. Durant la vida postembrionària, un accident genètic lesionaria l'al·lel sa (particularment a les cèl·lules retinals) i això causaria l'aparició del tumor. En les formes esporàdiques cal que els dos al·lells es lesionin abans que es pugui desenvolupar el retinoblastoma. Els carcinomes de paratiroides no expressen pRb, a diferència del que passa en els adenomes (els tumors benignes) (Cryns *et al.*, 1994).

## Complexos ciclines/cdk

De la fosforilació de pRb se n'encarreguen els complexos ciclines/cinases dependents de ciclines (ciclina/cdk), particularment els complexos ciclina D/cdk4 i ciclina E/cdk2. Aquests complexos es poden considerar holoenzims en què la subunitat catalítica és la cinasa i la subunitat reguladora és la ciclina (Matsushime *et al.*, 1992). L'activitat de la cinasa també es controla per fosforilació. CAK (*Cdk activating kinase*) fosforila la cdk per activar-la, mentre que Wee-1 i Mik-1 la fosforilen per inhibir-la. L'activitat fosfatasa de Cdc25 (de la qual es coneixen tres formes en mamífers, A, B i C) és necessària per a la seva activació, particularment per eliminar els fosfats incorporats per l'acció de Wee-1 o Mik-1 (Hirama i Koefler, 1995). En cèl·lules normals, els complexos ciclina/cdk inclouen altres elements, com PCNA i p21<sup>WAF1</sup>, mentre que en línies transformades es produeix una redistribució dels elements que els constitueixen que implica la desaparició de p21<sup>WAF1</sup> (Xiong *et al.*, 1993). *CCND1* és un oncogenè dèbil que es troba a la regió cromosòmica 11q13 i codifica la ciclina D1, que va ser identificada durant l'estudi de la inversió cromosòmica 11(q13;p15) característica dels adenomes de paratiroides (Motokura *et al.*, 1991). La regió 11q13 i el propi gen *CCND1* estan amplificats en diversos tumors humans, entre els quals s'inclouen carcinomes de mama i de la regió cervicofacial (Zhou *et al.*, 1988; Leonard *et al.*, 1991), i la translocació t(11;14)(q13;q32) s'havia identificat en alguns limfomes de fenotipus B (Tsujimoto *et al.*, 1984b).

Al seu torn, els complexos ciclina/cdk es regulen negativament per l'acció dels inhibidors de les cinases dependents de ciclines, dels quals se'n coneixen dues grans famílies, la de p21<sup>WAF1</sup>, que inclou p27<sup>Kip1</sup> i p57<sup>Kip2</sup> (El-Deiry *et al.*, 1993; Harper *et al.*,

1993; Polyak *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995), i la de p16<sup>INK4a</sup>, que es completa amb p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> i p19<sup>INK4d</sup>. Mentre que els primers formen part dels complexos actius i produeixen la inhibició per un canvi en l'estequiometria (augmentant el nombre de molècules d'inhibidors per complex), els segons s'uneixen a les cdk i n'impedeixen la unió a la subunitat reguladora, la ciclina (Serrano *et al.*, 1993; Hannon i Beach, 1994; Guan *et al.*, 1994; Guan *et al.*, 1996). p16<sup>INK4a</sup> es troba junt amb p15<sup>INK4b</sup> a 9p21, una regió delecionada freqüentment en tumors humans. p16<sup>INK4a</sup> s'ha vist mutat, delecionat o anul·lat per hipermetilació del seu promotor en un nombre important de tumors (Hunter i Pines, 1994; Hiramama i Koefler, 1995).

Anant més lluny en els mecanismes de control del cicle, trobem els elements que poden regular els inhibidors de les cdk. Mentre que no es coneixen gaire els mecanismes de regulació de la família INK4, se sap que p21<sup>WAF1</sup> respon a la inducció per p53 nadiua, però no mutant, i que participa en l'aturada de cicle que es produeix després de lesions del DNA (El-Deiry *et al.*, 1993; El-Deiry *et al.*, 1994), i tant p21<sup>WAF1</sup> com p27<sup>Kip1</sup> responen a la inducció pel TGF- $\beta$  (Reynisdottir *et al.*, 1995; Datto *et al.*, 1995). p53 és el gen supressor alterat amb més freqüència en els càncers humans (Hollstein *et al.*, 1991), normalment per mutació associada o no a la deleción de l'al·lel normal. Sovint, la presència de mutació s'acompanya d'una acumulació intranuclear de la proteïna que en permet la detecció per tècniques immunohistoquímiques (Iggo *et al.*, 1990).

## ALTERACIONS MOLECULARS DE REGULADORS DEL CICLE CEL·LULAR EN NEOPLÀSIES HUMANES

### Càncer de laringe

El càncer de laringe és una malaltia amb una elevada morbimortalitat, freqüent a la conca mediterrània (el nostre país pateix de les incidències més altes del món en càncer de laringe) i al sud del Brasil (World Health Organization, 1996).

L'anàlisi de l'expressió immunohistoquímica de p53 en els carcinomes de laringe demostra positivitat en més de la meitat dels casos (Maestro *et al.*, 1992; Boag *et al.*,

1993; Nadal *et al.*, 1995), encara que no s'associa a diferències ni en la supervivència, ni en l'interval lliure de malaltia després de la cirurgia, ni en el grau histològic del tumor, l'estadi de la malaltia, la ploïdia del DNA ni la fracció proliferativa (Nadal *et al.*, 1995). L'epiteli respiratori normal no mostra positivitat per p53, mentre que la positivitat augmenta progressivament en les mostres de metaplàsia escamosa (el teòric substrat d'origen del carcinoma escamós de la laringe), les displàsies de baix grau i els carcinomes *in situ* (Shin *et al.*, 1994; Pavelic *et al.*, 1994; Nadal *et al.*, 1995). Aquesta progressió indica que p53 participa en els mecanismes inicials del desenvolupament d'aquest ti-

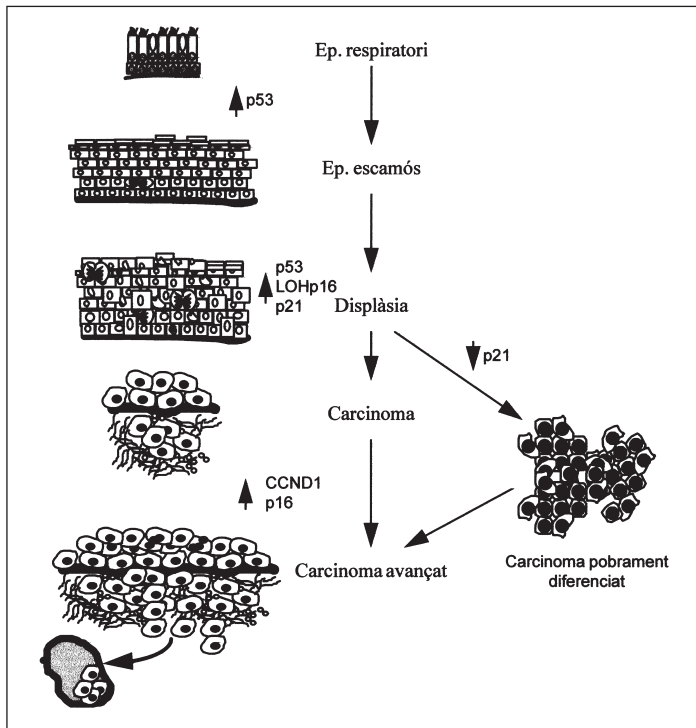


FIGURA 1. Model de la progressió del carcinoma escamós de laringe. A cada pas hi ha indicats els elements que pateixen alteracions. Les puntes de fletxa cap amunt indiquen que es produeix un augment ja sigui en el nombre de casos que mostren alteracions (p53: mutacions i/o sobreexpressió de p53; LOHp16: LOH de 9p21-23 on es troba p16; p16: mutacions de p16; CCND1: amplifiquació i sobreexpressió de CCND1) o bé en el nombre de cèl·lules que expressen un producte determinat (p21: expressió de p21<sup>WAF1</sup>). La punta de fletxa cap avall indica una disminució en el nombre de cèl·lules que expressen el producte.

pus de neoplàsies, però que un cop desenvolupat el carcinoma infiltrant no sembla participar a la progressió de la malaltia (figura 1).

Tot i que l'anàlisi immunohistoquímica de p53 s'ha considerat sovint útil per determinar l'existència de mutacions (Iggo *et al.*, 1990), aquest podria no ser el cas dels carcinomes escamosos de laringe, en els quals la sobreexpressió de p53 és més freqüent del que ho són les mutacions (Xu *et al.*, 1994; Nadal *et al.*, 1997). Això és encara més dramàtic si es té en compte que una bona part de les mutacions de p53 en els carcinomes de laringe no s'acompanyen de sobreexpressió proteica, ja que produeixen mutacions sense sentit o de canvi en el patró de lectura que són immunohistoquímicament negatives (Nadal *et al.*, 1997).

El possible paper de p53 en la progressió d'aquests tumors no sembla mitjançat per p21<sup>WAF1</sup>. L'expressió (proteica i de l'mRNA) d'aquest gen està relacionada amb la diferenciació escamosa, ja que els tumors pobrament diferenciats són característicament negatius per p21<sup>WAF1</sup>. En canvi, la resta de casos mostra nivells iguals o superiors d'expressió de mRNA i de proteïna de p21<sup>WAF1</sup> en els tumors respecte de l'epiteli escamós normal. En aquest, el compartiment que expressa p21<sup>WAF1</sup> es troba a la zona que separa el compartiment proliferatiu de les capes superiors més diferenciades. No hi ha relació entre l'expressió de p21<sup>WAF1</sup> i l'existència de mutacions de p53, ja que tumors amb expressió de p21<sup>WAF1</sup> tenen mutacions de p53, mentre que no es detecten mutacions de p53 en els exons cinc a nou en casos que no expressen p21<sup>WAF1</sup> (Nadal *et al.*, 1997). En els carcinomes escamosos de laringe p21<sup>WAF1</sup> no ha demostrat un efecte supressor, cosa lògica si tenim en compte la important expressió d'aquesta proteïna que es troba a la majoria dels tumors (Clayman *et al.*, 1996).

p21<sup>WAF1</sup> forma part dels complexos de ciclina D1/cdk4. L'amplificació gènica (entre 2 i 17 vegades la del teixit normal) de CCND1 es detecta en el 37 % dels carcinomes laringis, particularment en casos avançats (invasió local extensa, presència de metàstasis limfàtiques regionals i estadi avançat dels tumors). La sobreexpressió del mRNA de CCND1 es detecta en el 35 % dels casos i també es mostra associada a la invasió local avançada i a l'estadi avançat. En els carcinomes de laringe hi ha una molt bona correlació entre l'amplificació gènica i la sobreexpressió del mRNA de CCND1, de què es desprèn que CCND1 és la diana involucrada en l'amplificació de la regió 11q13 en els tumors humans (Jares *et al.*, 1994). Donada l'associació entre amplificació i sobreexpressió d'una banda i els estadis avançats de malaltia de l'altra, alguns autors han proposat que la detecció d'amplificació i/o sobreexpressió de CCND1 pot tenir valor de pronòstic en aquests tumors, encara que aquest valor potser no sigui independent, sinó degut a l'associació amb l'estadi avançat de la malaltia (Bellacosa *et al.*, 1996).

Es detecten mutacions de p16<sup>INK4a</sup> en un 22 % dels carcinomes. Aquestes mutacions s'acumulen majoritàriament a l'exó 2 de p16<sup>INK4a</sup>, encara que també se'n poden detectar a l'exó 1. Ultra les mutacions, es detecta hipermetilació del promotor de p16<sup>INK4a</sup> en alguns casos, mecanisme que pot explicar l'absència d'expressió de la proteïna. Tots els casos amb mutació gènica o hipermetilació del promotor mostren simultàniament pèrdua de l'heterozigosi (LOH) de la regió 9p21-23, que es detecta en gairebé la meitat del total dels casos. Alguns d'aquests casos podrien representar, de fet, delecions homozigòtiques de la regió on es troba p16<sup>INK4a</sup> (Reed *et al.*, 1996). La LOH de 9p21-23 s'associa a l'estadi avançat de la malaltia i a l'amplificació i/o sobreexpressió de CCND1. Com que la LOH és més freqüent que la mu-

tació i/o la hipermetilació del promotor de p16<sup>INK4a</sup> i, encara que estigui associada als estadis avançats de la malaltia, també es veu en tumors en estadis inicials, àdhuc en lesions preinvasives, sembla que la LOH de 9p21-23 precedeix la mutació o hipermetilació del promotor de p16<sup>INK4a</sup> (Van der Riet *et al.*, 1994). L'associació entre LOH de 9p21-23, amplificació i sobreexpressió de CCND1 i estadi avançat de la malaltia, suggereix una possible cooperació entre els dos fenòmens (alteració de p16<sup>INK4a</sup> i sobreexpressió de CCND1) en la progressió dels carcinomes de laringe. A més, les alteracions de p16<sup>INK4a</sup> combinades amb les de CCND1 passen en tumors en què no hi ha evidència d'alteracions de pRb, mentre que en els inhabituals casos amb pèrdua d'expressió de pRb no hi ha alteracions dels altres elements. En conjunt, doncs, la major part dels carcinomes de laringe mostren alteracions d'algun dels elements reguladors de la via Rb/CCND1/p16<sup>INK4a</sup> (Jares *et al.*, 1997a).

**Càncer de mama**

El càncer de mama presenta algunes diferències amb els carcinomes laringis. Per una part, el tipus histològic és diferent (diferenciació glandular en lloc d'escamosa), a què s'afegeix que és una lesió sensible a l'estímul hormonal. Així no ens ha d'estranyar que trobem algunes diferències en les alteracions dels elements reguladors del cycle cel·lular entre les dues neoplàsies. La sobreexpressió de CCND1 es pot detectar en el 40 % dels carcinomes (tant en l'àmbit proteic com de mRNA) i aquesta expressió s'associa a l'expressió de receptors estrogènics en els tumors. Aquesta relació es reforça pel fet que, entre els casos en què no es detecta sobreexpressió de CCND1, la manca d'expressió de receptors estrogènics s'acompanya d'una important regulació a la baixa de CCND1

(nivells inferiors al 50 % de l'expressió del teixit no tumoral, figura 2) (Jares *et al.*, 1997b).

La manca d'expressió de pRb es detecta en un 25 % dels tumors, i aquesta negativitat s'associa a una superior capacitat proliferativa mesurada segons la fracció de cèl·lules en fase S i també a una regulació a la baixa de CCND1 entre els casos sense sobreexpressió, fet que confirma l'existència *in vivo* del *loop* regulador demostrat *in vitro* entre CCND1 i Rb (Bartkova *et al.*, 1994; Lukas *et al.*, 1994; Muller *et al.*, 1994; Bates *et al.*, 1994).

L'expressió de p21<sup>WAF1</sup> només es detecta en la meitat dels carcinomes de mama (particularment els de tipus ductal) mentre que els lobel·lars són característicament negatius. L'expressió de p21<sup>WAF1</sup> es troba ja en lesions intraductals, mentre que els epitelis normals són negatius o, com a molt, mostren alguna cèl·lula positiva aïllada. Entre els carcinomes ductals infiltrants, l'expressió de p21<sup>WAF1</sup> s'associa a la pitjor diferenciació histològica i, particularment, a l'escassa formació d'estructures pròpiament ductals. L'expressió de p21<sup>WAF1</sup> s'associa també a una proliferació cel·lular superior, encara que

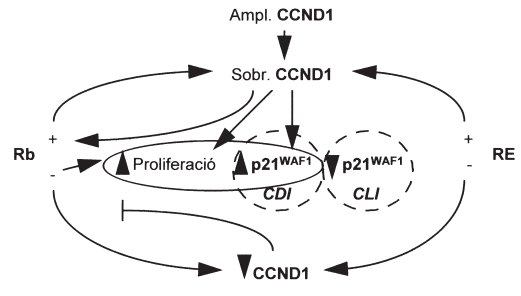


FIGURA 2. Relacions entre els elements implicats en el control del cycle cel·lular en el càncer de mama. Les fletxes indiquen associació per inducció, mentre que els cercles indiquen associació directament relacionable a través d'altres elements presents a l'esquema (línies contínues) o no (línies discontinues). En particular, a la dreta es representa el bucle de regulació existent entre Rb i CCND1, que desapareix quan es negativitza pRb. Els caps de fletxa cap amunt indiquen augment d'expressió, cap avall indiquen disminució de l'expressió. RE: receptors estrogènics; CDI: Carcinoma ductal infiltrant; CLI: Carcinoma lobel·lar infiltrant.

aquest fet pot estar relacionat amb la mala diferenciació histològica (els tumors més pobrament diferenciats són més proliferants). L'anàlisi de la sobreexpressió immunohistoquímica de p53 demostra independència entre les dues proteïnes i suggereix que en els carcinomes de mama, tal i com passava en els de laringe, l'expressió de p21<sup>WAF1</sup> està regulada per mecanismes independents de p53. L'expressió de p21<sup>WAF1</sup> també s'associa a l'expressió de CCND1, cosa que suggereix que pot participar a la modulació d'aquesta ciclina (Rey *et al.*, 1998).

### Síndromes limfoproliferatius

Els reordenaments cromosòmics són alteracions freqüents en els limfomes, ja que el procés de reordenament dels gens de les immunoglobulines i del receptor de les cèl·lules T implica el trencament i la unió en punts diferents de la molècula del DNA (Potter, 1992). El resultat d'aquest reordenament és sovint l'aposició d'un gen amb activitat oncogènica junt amb la regió reguladora del gen de les cadenes pesades de les immunoglobulines. D'aquesta manera, en els limfomes de Burkitt és freqüent la translocació t(8;14)(q24;q32) que activa l'oncogen *c-myc* (Dalla-Favera *et al.*, 1982), mentre que en els limfomes fol·liculars és característica la translocació t(14;18)(q32;q21) que activa *bcl-2* (Tsujiimoto *et al.*, 1984a). La translocació t(11;14)(q13;q32) i també el reordenament de la regió *bcl-1* (que és la contrapartida molecular de l'alteració citogenètica representada per aquesta translocació) havien estat identificades en un petit percentatge de limfomes de cèl·lules B (Tsujiimoto *et al.*, 1984b). La caracterització de l'anomenat limfoma de cèl·lules del mantell (MCL, *Mantle Cell Lymphoma*), un limfoma de cèl·lules B originat en limfòcits que encara no han tingut

contacte amb l'antigen (els limfòcits *naïve* en anglès) va permetre associar aquesta translocació amb aquesta entitat clinicopatològica. Ja que CCND1 es troba a 11q13, no ha d'estranyar ningú que es pensés que la translocació t(11;14) induís la sobreexpressió de CCND1 en aquells casos de MCL en què s'identifica el reordenament i/o la translocació, cosa que passa fins en el 55 % dels casos. La sobreexpressió del mRNA de CCND1 és un fenomen molt específic dels MCL, mentre que és excepcional en altres tipus de processos limfoproliferatius (figura 3). Només la leucèmia de cèl·lules piloses mostra expressió de CCND1 amb nivells inferiors als dels MCL, i sense mostrar la translocació t(11;14) (Bosch *et al.*, 1994; Bosch *et al.*, 1995).

Dins dels MCL es poden distingir dues formes (típica i blàstica) segons la morfologia, capacitat proliferativa i curs de la malaltia. Sorprenentment, els nivells de sobreexpressió de CCND1 en els MCL no mostren relació ni amb la capacitat proliferativa dels tumors ni amb el curs clínic de la malaltia. Sabent que pRb és la diana d'actuació dels com-

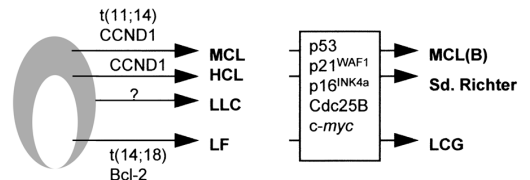


FIGURA 3. Els diferents tipus de limfomes B s'originen de diferents compartiments del fol·licle limfoide normal. El centre germinal (blanc) dona origen als limfomes fol·liculars (LF) caracteritzats per la translocació t(14;18) i l'expressió de Bcl-2, mentre que el mantell fol·licular (gris) dona lloc als limfomes de cèl·lules del mantell (MCL) portadors de la translocació t(11;14) i amb sobreexpressió de CCND1 i a les leucèmies limfocítiques cròniques (LLC) i leucèmies de cèl·lules piloses (HCL), aquestes darreres amb menor sobreexpressió de CCND1, no associada a la translocació. Alteracions en p53, p21<sup>WAF1</sup> o p16<sup>INK4a</sup>, o en Cdc25B i *c-myc* participen en la transformació cap a formes més agressives com les variants blàstiques (B), la síndrome de Richter o els limfomes de cèl·lules grans (LCG).

plexos ciclina D1/*cdk4*, es podria plantejar l'hipòtesi que en les formes blàstiques (amb una capacitat proliferativa superior i un curs clínic molt més agressiu) s'afegís una lesió de pRb que expliqués per què unes formes de MCL proliferaven més sense mostrar nivells superiors de CCND1, però aquest no sembla el cas, ja que l'anàlisi immunohistoquímica de l'expressió de pRb resulta positiva en tots els casos, amb una important correlació positiva amb la proliferació tumoral. Les formes blàstiques mostren les positivitats més altes (amb una mitjana del 31 % de cèl·lules positives en comparació al 10 % de les formes típiques). Tampoc es detecten alteracions genètiques estructurals de Rb. Així, en els MCL, a diferència del que passa en diferents tumors sòlids, l'expressió de pRb està regulada normalment en relació amb l'activitat proliferativa dels tumors i la sobreexpressió de CCND1 pot participar en la superació del fre proliferatiu produït per pRb en aquests tumors (Jares *et al.*, 1996).

L'absència de relació entre els nivells de CCND1 i la fracció proliferativa dels MCL es pot explicar per alteracions en altres elements implicats en el control del cycle cel·lular. Les mutacions de p53 en limfomes es detecten sobretot en limfomes d'alt grau (formes agressives) (Villuendas *et al.*, 1993; Adamson *et al.*, 1995) i també estan descrites associades a la progressió tumoral en limfomes centrefol·liculars i limfocítics. La sobreexpressió immunohistoquímica de p53 es detecta exclusivament en les formes agressives de MCL, sovint associada a mutacions de sentit erroni. Els casos amb p53 mutant mostren una supervivència inferior a la dels casos sense mutació, encara que no és diferent de la resta de formes agressives. Per tant, tot i que les mutacions de p53 no són un fenomen freqüent entre els MCL (representen un 7 % dels casos), estan associades a les formes més agressives de la malaltia (Hernandez *et al.*, 1996).

Les alteracions de p21<sup>WAF1</sup> i p16<sup>INK4a</sup> en els MCL es troben entre les formes agressives, per pèrdua d'expressió associada o no a deleció genètica. L'expressió de p21<sup>WAF1</sup> és independent de la presència de mutacions de p53, ja que casos amb mutacions de p53 expressen normalment tant p21<sup>WAF1</sup> com p16<sup>INK4a</sup>, mentre que els casos amb alteracions d'aquests dos gens tenen p53 nadiua. Les formes típiques expressen ambdós gens, sense evidència de delecions ni mutacions. En resum, la progressió a formes agressives dels LCM s'associa a alteracions (en aparença mútuament excloents) de p53, p21<sup>WAF1</sup> i p16<sup>INK4a</sup> (Pinyol *et al.*, 1997). L'associació entre alteracions de p53, p21<sup>WAF1</sup> i p16<sup>INK4a</sup> i formes agressives de limfoma no és exclusiva dels MCL, sinó que es pot identificar també en la transformació de limfomes fol·liculars o de leucèmies limfocítiques cròniques. La participació en la transformació a formes agressives també es veu en les fosfatases activadores de *cdk*. L'expressió alta de Cdc25B és més freqüent entre els limfomes més agressius (limfomes de cèl·lules grans, síndrome de Richter, limfomes de Burkitt o limfomes limfoblàstics) que en les formes més indolents (leucèmia limfocítica crònica, limfomes fol·liculars, leucèmia de cèl·lules piloses, MCL) i s'associa a la capacitat proliferativa dels tumors. També s'associa a la sobreexpressió de *c-myc*, fet que suggereix una possible cooperació entre aquests dos elements en el fenomen de la transformació a formes agressives de limfoma (Hernández *et al.*, 1998).

En resum, es troben evidències d'alteracions en els mecanismes reguladors del cycle cel·lular en diferents tipus de càncers humans, encara que participin en el desenvolupament o la progressió de manera diferent per a cada tumor. Les alteracions de p53 i p16<sup>INK4a</sup> poden representar fenòmens inicials en la progressió del carcinoma de laringe, mentre que en els limfomes B es re-



lacionen amb l'adquisició d'un fenotipus més agressiu de la malaltia. A l'inrevés, l'increment d'expressió de CCND1 que sembla implicat en la patogènesi dels MCL com a mecanisme inicial, es troba en els carcinomes laringis com un fenomen tardà, propi de malaltia avançada. La sobreexpressió de CCND1 respon a mecanismes diferents en els diferents tumors; mentre en el càncer de laringe és deguda a l'amplificació gènica, en els MCL és deguda al reordenament genètic. En canvi, en el càncer de mama, múltiples mecanismes (amplificació gènica, acció de pRb i dels receptors d'estrògens, però no el reordenament) contribueixen a la sobreexpressió de CCND1. p21<sup>WAF1</sup>, a diferència dels inhibidors de cinases de la família INK4, sembla relacionat més directament amb la diferenciació cel·lular dels carcinomes que amb la pròpia proliferació, encara que costa de creure que els dos fenòmens no estiguin íntimament relacionats.

Així, podem concloure que les alteracions dels elements implicats en el control del cicle cel·lular participen de manera general en el desenvolupament i la progressió de la majoria de les neoplàsies humanes, però la seva participació específica en cada procés és diferent a causa de les diferències intrínseques als tipus de teixit i a l'ambient en què s'originen els diferents tumors.

## AGRAÏMENTS

Els treballs recollits en aquesta revisió han estat finançats en part pels ajuts SAF 96/61 de la CICYT, Marató TV3-Càncer, 1996SGR 00056 de la Generalitat de Catalunya i la Fundació Rius i Virgili.

## BIBLIOGRAFIA

- ADAMSON, D. J.; W. D. THOMPSON; A. A. DAWSON; B. BENNETT; N. E. HAITES (1995). «P53 mutation and expression in lymphoma». *Br. J. Cancer*, núm. 72, pàg. 150-154.
- BARTKOVA, J.; J. LUKAS; H. MULLER; D. LUTZHOFT; M. STRAUSS; J. BARTEK (1994). «Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer». *Int. J. Cancer*, núm. 57, pàg. 353-361.
- BATES, S.; D. PARRY; L. BONETTA; K. VOUSDEN; C. DICKSON; G. PETERS (1994). «Absence of cyclin D/cdk complexes in cells lacking functional retinoblastoma protein». *Oncogene*, núm. 9, pàg. 1633-1640.
- BELLACOSA, A.; G. ALMADORI; S. CAVALLO; G. CADONI; J. GALLI; G. FERRANDINA; G. SCAMBIA; G. NERI (1996). «Cyclin D1 gene amplification in human laryngeal squamous cell carcinomas: Prognostic significance and clinical implications». *Clin Cancer Res*, núm. 2, pàg. 175-180.
- BOAG, G.; C. S. LEE; D. CHARALAMBOUS; J. RODE (1993). «p53 expression in laryngeal carcinoma». *Pathology*, núm. 25, pàg. 394-397.
- BOSCH, F.; P. JARES; E. CAMPO; A. LÓPEZ-GUILLERMO; M. A. PIRIS; N. VILLAMOR; D. TASSIES; E. S. JAFFE; E. MONTERRAT; C. ROZMAN; *et al.* (1994). «PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma». *Blood*, núm. 84, pàg. 2726-2732.
- BOSCH, F.; E. CAMPO; P. JARES; S. PITTALUGA; J. MUNOZ; I. NAYACH; M. A. PIRIS; C. DEWOLF-PEETERS; E. S. JAFFE; C. ROZMAN; *et al.* (1995). «Increased expression of the PRAD-1/CCND1 gene in hairy cell leukaemia». *Br. J. Haematol.*, núm. 91, pàg. 1025-1030.
- BUCHKOVICH, K.; L. A. DUFFY; E. HARLOW (1989). «The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle». *Cell*, núm. 58, pàg. 1097-1105.
- CLAYMAN, G. L.; T. J. LIU; S. M. OVERHOLT; S. R. MOBLEY; M. WANG; F. JANOT; H. GOEFFERT (1996). «Gene therapy for head and neck cancer. comparing the tumor suppressor gene p53 and a cell cycle regulator waf1/cip1 (p21)». *Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg.*, núm. 122, pàg. 489-493.
- CRYNYS, V. L.; A. THOR; H. J. XU; S. X. HU; M. E. WIERMAN; A. L. JR. VICKERY; W. F. BENEDICT; ARNOLD, A. (1994). «Loss of the retinoblastoma tumor-suppressor gene in parathyroid carcinoma». *N. Engl. J. Med.*, núm. 330, pàg. 757-761.
- DALLA-FAVERA, R. M. BREGNI; J. ERIKSSON; D. PATTERSON; R. C. GALLO; C. M. CROCE (1982). «Human *c-myc* oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, núm. 79, pàg. 7824-7827.
- DALTON, S. (1992). «Cell cycle regulation of the human *cdc2* gene». *EMBO J.*, núm. 11, pàg. 1797-1804.

- DATTO, M. B.; Y. LI; J. F. PANUS; D. J. HOWE; Y. XIONG; X. F. WANG (1995). «Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, núm. 92, pàg. 5545-5549.
- EL-DEIRY, W.; J. W. HARPER; P. M. O'CONNOR; V. E. VELCULESCU; C. E. CANMAN; J. JACKMAN; J. A. PIETENPOL; M. BURRELL; D. E. HILL; Y. WANG; K. G. WIMAN; W. E. MERCER; M. B. KASTAN; K. W. KOHN; S. J. ELLEDGE; K. W. KINZLER; B. VOGELSTEIN (1994). «WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis». *Cancer Res*, núm. 54, pàg. 1169-1174.
- EL-DEIRY, W. S.; T. TOKINO; V. E. VELCULESCU; D. B. LEVY; R. PARSONS; J. M. TRENT; D. LIN; W. E. MERCER; K. W. KINZLER; B. VOGELSTEIN (1993). «WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression». *Cell*, núm. 75, pàg. 817-825.
- GRAÑA, X.; E. P. REDDY (1995). «Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)». *Oncogene*, núm. 11, pàg. 211-219.
- GUAN, K. L.; C. W. JENKINS; Y. LI; M. A. NICHOLS; X. WU; C. L. O'KEEFE; A. G. MATERA; Y. XIONG (1994). «Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4b/MTS2- related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function». *Genes Dev.*, núm. 8, pàg. 2939-2952.
- GUAN, K. L.; C. W. JENKINS; Y. LI; C. L. O'KEEFE; S. NOH; X. WU; M. ZARIWALA; A. G. MATERA; Y. XIONG (1996). «Isolation and characterization of p19INK4d, a p16-related inhibitor specific to CDK6 and CDK4». *Mol. Biol. Cell*, núm. 7, pàg. 57-70.
- HANNON, G. J.; D. BEACH (1994). «p15INKB is a potential effector of TGF- $\beta$ -induced cell cycle arrest». *Nature*, núm. 371, pàg. 257-261.
- HARPER, J. W.; G. R. ADAMI; N. WEI; K. KEYOMARSI; S. J. ELLEDGE (1993). «The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases». *Cell*, núm. 75, pàg. 805-816.
- HARTWELL, L. H.; M. W. UNGER (1977). «Unequal cell division in *Saccharomyces cerevisiae* and its implications for the control of cell division». *J. Cell Biol.*, núm. 75, pàg. 422-435.
- HARTWELL, L. H.; T. A. WEINERT (1989). «Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events». *Science*, núm. 246, pàg. 629-633.
- HELIN, K.; J. A. LEES; M. VIDAL; N. DYSON; E. HARLOW; A. FATTAYEY (1992). «A cDNA encoding a pRb-binding protein with properties of the transcription factor E2F». *Cell*, núm. 70, pàg. 337-350.
- HELIN, K.; E. HARLOW; A. FATTAYEY (1993). «Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein». *Mol. Cell Biol.*, núm. 13, pàg. 6501-6508.
- HERNÁNDEZ, L.; T. FEST; M. CAZORLA; J. TERUYA-FELDSTEIN; F. BOSCH; M. A. PEINADO; M. A. PIRIS; E. MONTSERRAT; A. CARDESA; E. S. JAFFE; E. CAMPO; M. RAFFELD (1996). «p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas». *Blood*, núm. 87, pàg. 3351-3359.
- HERNÁNDEZ, S.; L. HERNÁNDEZ; S. BEÀ; M. CAZORLA; P. L. FERNÁNDEZ; A. NADAL; J. MUNTANÉ; C. MALLOFRÉ; E. MONTSERRAT; A. CARDESA; E. CAMPO (1998). «Cdc25 cell cycle activating phosphatases and c-myc expression in human non-Hodgkin's lymphomas». *Cancer Res*, núm. 58, pàg. 1762-1767.
- HIRAMA, T.; H. P. KOEFFLER (1995). «Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer». *Blood*, núm. 86, pàg. 841-854.
- HOLLSTEIN, M.; D. SIDRANSKY; B. VOGELSTEIN; C. C. HARRIS (1991). «p53 mutations in human cancers». *Science*, núm. 253, pàg. 49-53.
- HUNTER, T.; J. PINES (1994). «Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age». *Cell*, núm. 79, pàg. 573-582.
- IGGO, R.; K. GATTER; J. BARTEK; D. LANE; A. L. HARRIS (1990). «Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer». *Lancet*, núm. 335, pàg. 675-679.
- JARES, P.; E. CAMPO; M. PINYOL; F. BOSCH; R. MIQUEL; P. L. FERNÁNDEZ; M. SÁNCHEZ-BEATO; F. SOLER; A. PÉREZ-LOSADA; I. NAYACH; C. MALLOFRÉ; M. A. PIRIS; E. MONTSERRAT; A. CARDESA (1996). «Expression of retinoblastoma gene product (pRb) in mantle cell lymphomas. Correlation with cyclin D1 (PRAD1/CCND1) mRNA levels and proliferative activity». *Am. J. Pathol.*, núm. 148, pàg. 1591-1600.
- JARES, P.; P. L. FERNÁNDEZ; A. NADAL; M. CAZORLA; L. HERNÁNDEZ; M. PINYOL; S. HERNÁNDEZ; J. TRASERRA; A. CARDESA; E. CAMPO (1997a). «P16MTS1/CDK4I mutations and concomitant loss of heterozygosity at 9p21-23 are frequent events in squamous cell carcinoma of the larynx». *Oncogene*, núm. 15, pàg. 1445-1453.
- JARES, P.; M. J. REY; P. L. FERNÁNDEZ; E. CAMPO; A. NADAL; M. MUÑOZ, C. MALLOFRÉ; J. MUNTANÉ; I. NAYACH; J. ESTAPÉ; A. CARDESA (1997b). «Cyclin D1 and retinoblastoma gene expression in human breast carcinoma: correlation with tumour proliferation and oestrogen receptor status». *J. Pathol.*, núm. 182, pàg. 160-166.
- JARES, P.; P. L. FERNÁNDEZ; E. CAMPO; A. NADAL; F. BOSCH; G. AIZA; I. NAYACH; J. TRASERRA; A. CARDESA (1994). «PRAD-1/Cyclin D1 gene amplification correlates with messenger RNA overexpression and tumor progression in human laryngeal carcinomas». *Cancer Res*, núm. 54, pàg. 4813-4817.
- KNUDSON, A. G. (1971). «Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma». *Proc Natl Acad Sci USA*, núm. 68, pàg. 820-823.
- LEE, M. H.; I. REYNISDOTTIR; J. MASSAGUÉ (1995). «Cloning

- of p57kip2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution». *Genes Dev.*, núm. 9, pàg. 639-649.
- LEONARD, J. H.; KEARSLEY; G. CHENEVIX-TRENCH; *et al.* (1991). «Analysis of gene amplification in head-and-neck squamous-cell carcinomas». *Int J Cancer*, núm. 48, pàg. 511-515.
- LUKAS, J.; H. MULLER; J. BARTKOVA; D. SPITKOVSKY; A. A. KJERULFF; P. JANSEN-DURR; M. STRAUSS; J. BARTEK (1994). «DNA tumor virus oncoproteins and retinoblastoma gene mutations share the ability to relieve the cell's requirement for cyclin D1 function in G1». *J. Cell Biol.*, núm. 125, pàg. 625-638.
- MAESTRO, R.; R. DOLCETTI; D. GASPAROTTO; C. DOGLIONI; S. PELUCCHI; L. BARZAN; E. GRANDI; M. BOIOCCHI (1992). «High frequency of p53 gene alterations associated with protein overexpression in human squamous cell carcinoma of the larynx». *Oncogene*, núm. 7, pàg. 1159-1166.
- MATSUSHIME, H.; M. E. EWEN; D. K. STROM; J. Y. KATO; S. K. HANKS; M. F. ROUSSEL; C. J. SHERR (1992). «Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/CDK4) for mammalian D type G1 cyclins». *Cell*, núm. 71, pàg. 323-334.
- MOTOKURA, T.; T. BLOOM; H. G. KIM; H. JUPPNER; J. V. RUDERMAN; H. M. KRONENBERG; A. ARNOLD (1991). «A novel cyclin encoded by BCL1-linked candidate oncogene». *Nature*, núm. 350, pàg. 512-515.
- MULLER, H.; J. LUKAS; A. SCHNEIDER; P. WARTHOF; J. BARTEK; M. EILERS; M. STRAUSS (1994). «Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, núm. 91, pàg. 2945-2949.
- NADAL, A.; E. CAMPO; J. PINTO; C. MALLOFRÉ; A. PALACÍN; C. ARIAS; J. TRASERRA; A. CARDESA (1995). «p53 expression in normal, dysplastic, and neoplastic laryngeal epithelium. Absence of a correlation with prognostic factors». *J. Pathol.*, núm. 175, pàg. 181-188.
- NADAL, A.; P. JARES; M. CAZORLA; P. L. FERNÁNDEZ; X. SANJUAN; L. HERNÁNDEZ; M. PINYOL; M. ALDEA; C. MALLOFRÉ; J. MUNTANÉ; E. CAMPO; J. TRASERRA; A. CARDESA (1997). «p21<sup>WAF1/Cip1</sup> expression is associated with cell differentiation but not with p53 mutations in squamous cell carcinoma of the larynx». *J. Pathol.*, núm. 183, pàg. 156-163.
- PARDEE, A. B. (1989). «G1 events and regulation of cell proliferation». *Science*, núm. 246, pàg. 603-608.
- PAVELIC, Z. P.; Y. LI; P. J. STAMBROOK; J. S. McDONALD; E. MUNK-WINKLAND; K. PAVELIC; S. DACIC; Z. DANILOVIC; L. PAVELIC; R. E. MUGGE; K. WILSON; C. NGUYEN; J. L. GLUCKMAN (1994). «Overexpression of p53 protein is common in premalignant head and neck lesions». *Anticancer Res*, núm. 14, pàg. 2259-2266.
- PINYOL, M.; L. HERNÁNDEZ; M. CAZORLA; M. BALBÍN; P. JARES; P. L. FERNÁNDEZ; E. MONTSERRAT; A. CARDESA; C. LÓPEZ-OTÍN; E. CAMPO (1997). «Deletion and loss of expression of p16<sup>INK4a</sup> and p21<sup>Waf1</sup> genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas». *Blood*, núm. 89, pàg. 272-280.
- POLYAK, K.; M. H. LEE; H. ERDJUMENT-BROMAGE; A. KOFF; J. M. ROBERTS; P. TEMPST; J. MASSAGUÉ (1994). «Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular anti-mitogenic signals». *Cell*, núm. 78, pàg. 59-66.
- POTTER, M. (1992). «Pathogenetic mechanisms in B-cell non-Hodgkin's lymphomas in humans». *Cancer Res.*, núm. 52, pàg. 5522s-5528s.
- REED, A. L.; J. CALIFANO; P. CAIRNS; W. H. WESTRA; R. M. JONES; W. KOCH; S. AHRENDT; Y. EBY; D. SEWELL; H. NAWROZ; J. BARTEK; D. SIDRANSKY (1996). «High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4a) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma». *Cancer Res.*, núm. 56, pàg. 3630-3633.
- REY, M. J.; P. L. FERNÁNDEZ; P. JARES; M. MUÑOZ; A. NADAL; N. PEIRÓ; I. NAYACH; C. MALLOFRÉ; J. MUNTANÉ; E. CAMPO; J. ESTAPÉ; A. CARDESA (1998). «p21<sup>WAF1/Cip1</sup> is associated with cyclin D1<sup>CND1</sup> expression and tubular differentiation but is independent of p53 overexpression in human breast carcinoma». *J. Pathol.*, núm. 184, pàg. 265-271.
- REYNISDOTTIR, I.; K. POLYAK; A. IAVARONE; J. MASSAGUÉ (1995). «Kip/Cip and INK4 CDK inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta». *Genes Dev.*, núm. 9, pàg. 1831-1845.
- SERRANO, M.; G. J. HANNON; D. BEACH (1993). «A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/cdk4». *Nature*, núm. 366, pàg. 704-707.
- SHIN, D. M.; J. KIM; J. Y. RO; J. HITTELMAN; J. A. ROTH; W. K. HONG; W. N. HITTELMAN (1994). «Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis». *Cancer Res.*, núm. 54, pàg. 321-326.
- TSUJIMOTO, Y.; L. R. FINGER; J. YUNIS; P. C. NOWELL; C. M. CROCE (1984a). «Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation». *Science*, núm. 226, pàg. 1097-1099.
- TSUJIMOTO, Y.; J. YUNIS; L. ONORATO-SHOWE; J. ERIKSSON; P. C. NOWELL; C. M. CROCE (1984b). «Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation». *Science*, núm. 224, pàg. 1403-1406.
- VAN DER RIET, P.; H. NAWROZ, R. H. HRUBAN; R. CORIO; K. TOKINO; W. KOCH; D. SIDRANSKY (1994). «Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression». *Cancer Res.*, núm. 54, pàg. 1156-1158.
- VILLUENDAS, R.; M. A. PIRIS; P. ALGARA; M. SÁNCHEZ-BEA-

- TO; L. SÁNCHEZ-VERDE; J. C. MARTÍNEZ; J. L. ORRADRE; P. GARCÍA; C. LÓPEZ; P. MARTÍNEZ (1993). «The expression of p53 protein in non-Hodgkin's lymphomas is not always dependent on p53 gene mutations». *Blood*, núm. 82, pàg. 3151-3156.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1996). *World Health Statistics Annual 1995*. Genève: World Health Organization.
- XIONG, Y.; H. ZHANG; D. BEACH (1993). «Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation». *Genes and Dev.*, núm. 7, pàg. 1572-1583.
- XU, L.; Y. CHEN; A. G. HUVOS; I. M. ZLOTOLOW; W. J. RETTIG; L. J. OLD; P. GARIN-CHESA (1994). «Overexpression of p53 protein in squamous cell carcinomas of head and neck without apparent gene mutations». *Diagn Mol Pathol.*, núm. 3, pàg. 83-92.
- ZHOU, D. J.; G. CASEY; M. J. CLINE (1988). «Amplification of human int-2 in breast cancers and squamous carcinomas». *Oncogene*, núm. 2, pàg. 279-282.