



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Departament de Ciències Morfològiques**

**Unitat d'Anatomia Patològica**

**PROGRAMA DE DOCTORADO**

**ANATOMÍA PATOLÓGICA**

***Valoración de la expresión inmunohistoquímica en microarrays tisulares de  
RACK1, 4ebp1, p53 y Ki-67 en tumores colorrectales con correlación clínico  
patológica***

**TESIS**

*presentada por*

**PAUL AUGUSTO ESPINOZA MADRID**



*Realizada en el Departamento de Anatomía Patológica  
del Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona*

*Bajo la dirección de:*

**DR. SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL AGÜERAS**

**DRA. MIRIAM CUATRECASAS I FREIXAS**

**BARCELONA, ENERO 2016**

*A Silvia y Paul*

*Por las mejores épocas*

*A Augusto y Zoila, mis padres*

*Por el mejor regalo*

*A María Isabel Rodríguez*

*Por la confianza*

*“La naturaleza encuentra por si misma las vías; queda sin enseñanza, nada ha aprendido y sin embargo, cumple su labor”.*

*Hipócrates*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis directores de tesis, **Dr. Santiago Ramón y Cajal Agüeras** y **Dra. Miriam Cuatrecasas i Freixas**. Es difícil entrar en detalles, de momento solo diré gracias por todo y espero demostrar lo agradecido que estoy con el paso del tiempo.

Cuando inicié este trabajo sabía que me enfrentaba a un camino lleno de vicisitudes, no solo por la complejidad, la intensidad y la duración del mismo, sino también por la melancolía que provoca el estar lejos de casa, y que vuelve más difícil el día a día. Es por ello, que los agradecimientos van dirigidos de una manera particular a los facultativos, técnicos y administrativos que sin tener relación directa con este trabajo también han contribuido, a veces de manera casi anónima, fortaleciéndome en los momentos más difíciles y/o haciendo esa parte que ha permitido que esta tesis llegue a su final. A ellos, mis más cariñosos agradecimientos, las más sinceras muestras de respeto y admiración.

A mis compañeros de Residencia, **Maite Salcedo, Silvia Planas y Elena Martínez** y de manera muy especial a **Vicente Peg Cámara**, gracias por ayudarme en todo momento.

## **INTRODUCCIÓN**

### **I.1. CÁNCER COLORECTAL. EPIDEMIOLOGÍA**

#### **Incidencia y mortalidad**

El carcinoma colorectal (CCR) es la tercera neoplasia en frecuencia en la población mundial y comprende casi el 15% de todos los nuevos cánceres (Luk GD, 1993). La incidencia es más alta en los países occidentales. En Europa es la tercera neoplasia en frecuencia, después del cáncer de pulmón y próstata en hombres y la segunda después del de mama en mujeres (Jensen et al, 1990). Aunque la incidencia y tasa de mortalidad ha disminuido un 30-40% desde 1975 debido a una combinación de factores, que incluyen una mayor dieta, el cribado poblacional y mejores tratamientos (Howlader 2010 Miller 2013; Phipps 2012; Siegel 2012; Levin 2008), sigue representando la segunda causa de muerte por cancer en el mundo occidental, tanto en hombres como en mujeres.(Siegel 2013) Su elevada incidencia hace que se considere uno de los problemas de salud pública más importante en oncología en el mundo occidental.

En España se diagnostican 26.000 casos nuevos anuales y se producen unas 12.000 muertes por esta neoplasia. La supervivencia a los 5 años se sitúa alrededor del 50%. Dentro del contexto europeo, Cataluña presenta una elevada incidencia (4.000 casos anuales; 20-30 casos/100.000 habitantes) y una mayor prevalencia sobretudo en hombres, más elevada si se compara con el conjunto de los registros españoles, con un incremento anual del 3,5% en hombres y un 2,7% en mujeres (Borràs et al. Med Clin (Barc). 2008; 131:58-62). El CCR ha representado la segunda causa de muerte por cáncer en Cataluña, tanto en hombres como en mujeres, después del cáncer de pulmón y de mama respectivamente, con 1.900 defunciones/año (Esteve J, 1993; Castells A, 2000a). La tendencia reciente indica una clara estabilización de la mortalidad en hombres y un descenso en mujeres (Borràs et al. Med Clin (Barc). 2008;131:58-62)

### **I. 2. FACTORES DE RIESGO DEL CCR**

#### **I. 3. A. Factores geográficos, socioeconómicos, dietéticos y raciales**

Los principales factores de riesgo del CCR son la edad ( $\geq 50$  años), determinados hábitos dietéticos (consumo de carne roja, de carne procesada) y de estilo de vida (consumo de alcohol superior a 30 gramos diarios y de tabaco), así como los antecedentes familiares de CCR. (Wynder EL et al, 1967 y Trock B et al, 1990). El consumo de pescado y la ingesta de calcio, de leche y derivados lácteos en

cantidades relevantes, el tratamiento hormonal sustitutivo y los anticonceptivos orales se ha observado que ejercen un efecto protector frente a este tumor. El ejercicio físico también es un factor protector del cáncer de colon, pero no del de recto. La ingesta de fibra se ha relacionado como agente protector en algunos estudios, pero con resultados controvertidos. Los antecedentes familiares son un factor de riesgo del CCR, especialmente importante cuando se habla de los síndromes polipósicos adenomatosos y hamartomatosos, y del síndrome de Lynch. El número de familiares afectados, el grado de parentesco y la edad de diagnóstico del CCR determinan el riesgo de desarrollar este cáncer y, por tanto, la estrategia de cribado a seguir. Así, los grupos de alto riesgo de CCR no son el objetivo de los programas de cribado y detección precoz de CCR y deben ser valorados en las clínicas de alto riesgo hospitalarias. Los programas de cribado periódico se recomiendan en la población de riesgo medio, a partir de los 50 años. Las tasas de incidencia más altas del CCR corresponden a las áreas económicamente más desarrolladas del mundo occidental; Estados Unidos, Canadá, Australia, Nueva Zelanda y el noroeste del continente europeo (Hill et al, 1971). Las diferencias más destacables son la baja tasa observada en Japón (Beart RW, 1984) y en poblaciones de raza negra en África sub-sahariana. Los emigrantes japoneses a Estados Unidos adquieren dentro de la misma generación tasas mucho más altas que las de su país de origen. Además los hijos de emigrantes de países europeos de bajo riesgo tienen tasas igual de altas que otros blancos estadounidenses. Estos datos apoyan que las causas de diferencias internacionales son en gran parte factores dietéticos o ambientales y no sólo genéticos (Sugarbaker et al, 1984).

### **I. 3. B. Edad y sexo**

La incidencia del CCR aumenta exponencialmente con la edad. En áreas de alto riesgo, se observa un predominio del cáncer de colon en el sexo femenino antes de los 60 años. En la mayoría de los registros de cáncer, el cáncer de recto es más frecuente en el sexo masculino en todas las edades. Ajustado por edades y localizaciones la proporción de carcinomas es similar en ambos sexos (Eide TJ, 1986). En España, la incidencia por sexos es muy similar, con afectación máxima a partir de los 65 años (Carda P 1989).

### **I. 3. C. Relación entre el colon y el recto**

Al parecer existe un acusado paralelismo entre las incidencias del cáncer de colon y de recto en las diferentes poblaciones. En la década de los 70 se evidenció que la incidencia de los cánceres de colon y de recto se fue invirtiendo de un predominio del

carcinoma rectal al colónico. Se desconoce la causa de este cambio de incidencia. Estudios recientes han demostrado un desplazamiento proximal altamente significativo en la localización del CCR en las dos últimas décadas (Kee FB, 1992).

#### **I. 4. D. Ambientales, dietéticos y hábitos personales**

##### ***Ambiente intestinal***

El papel del medio colónico en la carcinogénesis del CCR se estableció por la obvia asociación entre la dieta y CCR. Aunque la dieta en si no contenga carcinógenos irrefutablemente demostrados, se ha elaborado una hipótesis de que la dieta es una fuente de sustancias en principio inócuas pero que pueden ser metabolizadas "in situ" por las bacterias del colon convirtiéndolas en agentes mutágenos/carcinógenos (Hill MJ et al, 1975). El tránsito fecal es importante en la génesis del CCR (Rainey JB et al, 1983). Experimentos con ratones libres de gérmenes, o la supresión de la flora intestinal determina una considerable disminución del número de tumores comparado con los animales convencionales (Goldin BR et al, 1981).

La distribución del cáncer a lo largo del colon se relaciona con la existencia de unos factores formados por la acción de bacterias intestinales, los cuales se irán concentrando a lo largo del tránsito colónico. Estos factores son principalmente los fecapentanos, los 3-cetoesteroides, aminas heterocíclicas (producto de pirolisis), los ácidos biliares y otras sustancias que se forman por acción bacteriana a expensas de un pH favorable especialmente en el ciego (Bruce WR, 1987).

##### ***Ácidos biliares***

El aumento del consumo de grasas da lugar al incremento de la producción de ácidos biliares, dando como resultado un incremento de la concentración colónica de ácidos biliares conjugados que son desconjugados. Los ácidos biliares primarios se convierten por deshidroxilación en las formas secundarias de los ácidos biliares (ácido desoxicólico y ácido litocólico), los cuales actúan sobre las células induciendo su proliferación (Hill MJ et al, 1971 y Wargovich MJ et al, 1983).

##### ***Antraquinonas***

Se encuentran presentes en muchos de los laxantes de uso común. Estudios con animales de experimentación han demostrado que tienen actividad genotóxica y mutágena (Wolfle D et al, 1990). En seres humanos, la melanosis coli se produce por el uso excesivo de laxantes que contienen antraquinonas. En éstas personas se ha

documentado un incremento en la incidencia de neoplasias colorrectales, tanto de adenomas como de carcinomas (Siegers CP et al, 1993).

### **Grasas**

Datos epidemiológicos, indican que el consumo de grasa animal en la dieta se asocia a un incremento de la presencia de CCR, existiendo una correlación lineal entre la grasa consumida y la mortalidad por este tumor en diferentes países (Caroll KK et al, 1975).

Las dietas ricas en grasas contienen cantidades más elevadas de aminas heterocíclicas (a partir de las proteínas de la carne) y de facilitadores como consecuencia de la cocción a temperaturas altas (la cocción con grasa genera una temperatura más alta que cuando se cocina con agua) (Potter JD, 1993). La grasa actúa incrementando la producción de ácido biliar, y en último término aumenta la exposición de la mucosa intestinal a los efectos tóxicos, tróficos y facilitadores de los ácidos biliares (especialmente, secundarios) (Wynder et al, 1977). Las dietas con aceites de pescado parecen tener efecto protector sobre el cáncer de colon (Bartam et al, 1993).

### **Fecapentanos**

En 1977, se describieron como mutágenos presentes en las heces de las personas sanas y que su actividad mutágena disminuía con la dieta rica en fibra y se incrementa con las comidas grasas. Se producen por acción de la flora anaerobia, probablemente a partir de los triglicéridos (Bruce WR et al, 1977).

### **Cetoesteroides**

Existen estudios que sugieren que el colesterol podría actuar como agente carcinógeno en algunas circunstancias (Hieger I, 1958), siendo especialmente demostrativo el que para ejercer su acción carcinogénica, sea precisa la actuación de tres enzimas, dos de las cuales se encuentran habitualmente presentes en las bacterias intestinales y la tercera se ha encontrado en proporciones relativamente altas en pacientes afectados de CCR (Hill MJ et al, 1975 y Hill MJ, 1975).

### **Fibra dietética**

La hipótesis de que una dieta rica en fibra puede proteger frente al CCR fue propuesta por Burkitt y Trowell (Burkitt DP y Trowell HC, 1975) en 1969 tras la observación clínica de que el CCR era raro en las poblaciones negras africanas, cuyas dietas eran ricas en alimentos ricos en fibra, comparada con los blancos que consumían una dieta



con escasa cantidad de fibra. Posteriormente, diferentes estudios epidemiológicos analíticos han demostrado la asociación entre la fibra y un menor riesgo de padecer CCR (West et al, 1989 y Vogel et al, 1989). Aunque se han publicado muchos trabajos sobre el tema, no todos han podido demostrar esta relación. Uno de los hechos que hace difícil la consistencia de esta asociación, se basa en que la fibra no es una entidad química específica sino que está constituida por un grupo de diferentes componentes que tienen en común su origen vegetal y la resistencia a la acción de las enzimas humanas.

Diversos tipos de fibras tienen distintas propiedades fisicoquímicas y pueden influir en el medio del colon y en su epitelio de diversas formas. El mecanismo por el cual la fibra protege a la mucosa colorrectal contra el cáncer aún no está claro. Se han propuesto las siguientes hipótesis: 1) reducción del tiempo de tránsito en el colon, disminuyendo la exposición de la mucosa colorrectal a los agentes carcinógenos presentes en la luz colónica, 2) fijación y dilución de los agentes carcinógenos lumbinales neutralizando sus efectos 3) cambios en la flora bacteriana lo cual condiciona alteraciones en el metabolismo de los ácidos biliares, 4) disminución del pH intraluminal determinando a desionización del potencial dañino de los ácidos grasos libres y ácidos biliares.

Un estudio epidemiológico que correlaciona el peso de las heces con la incidencia del CCR en distintos países, pone de manifiesto un fuerte vínculo negativo entre ambos factores, es decir, a menor volumen de heces, mayor incidencia de CCR (Cumings JH et al, 1992).

Para algunos autores la disminución del riesgo de CCR se ha asociado al consumo de verduras (Steinmetz et al, 1991 y Lampe et al, 1992), superior al de fibra, cereales o fruta; siendo un hallazgo no limitado a verduras específicas o a grupos de verduras (Potter JD, 1993). Además, independientemente del efecto de la fibra, las verduras contienen una gran cantidad de sustancias, tanto micronutrientes como carotenoides y ascorbato, como no nutrientes, caso de los fenoles, los flavonoides, los isocianatos y los indoles, con distintas y potentes propiedades anticarcinógenas (Fearon ER y Volgenstein B, 1990).

### ***Proteínas***

El contenido de proteínas en la dieta también se ha asociado a un aumento del riesgo de CCR. Esta relación se ha establecido especialmente con la carne roja. El mecanismo por el cual una dieta de alto contenido proteico puede incrementar el riesgo de CCR no está claro. Se ha propuesto la acción de mutágenos producidos durante la cocción de los productos con proteína animal, y la aparición de sustancias

citólíticas que se originan por la transformación de las hemoporfirinas de la carne que llevan a cabo las bacterias del colon (Giovannucci E et al, 1994).

### **Productos de la pirolisis y aminas heterocíclicas**

Desde la década de los setentas se ha descrito la presencia de mutágenos (piridoimidazol, quinolina, piridina, benzoxacina) en el pescado y la carne asada, originados a partir de la pirolisis de las proteínas, o de los aminoácidos durante la cocción de los alimentos (Sugimura T, 1985 y Commoner BW et al, 1978).

### **Calcio**

Se ha propuesto que el calcio disminuye el riesgo de CCR a través de su unión a los ácidos biliares y ácidos grasos, disminuyendo así la exposición a estas sustancias potencialmente tóxicas y carcinógenas (Garland et al, 1991 y Van der Meer et al, 1991). Además el calcio puede disminuir directamente la proliferación celular (Potter JD, 1993; Lointier et al, 1991 y Barsoum et al, 1992).

### **Metales trazadores**

En la última década el papel que juegan los metales trazadores se ha hecho más importante en estudios *in vitro* y clínicos en oncología. Estudios clínicos sostienen que la deficiencia de selenio puede jugar un papel en la oncogénesis (Willett W C, 1986) y que la abundancia geográfica del selenio está relacionada indirectamente con tasas más bajas de mortalidad de cáncer (Shamberger et al, 1991 y Jacobbs MM, 1977).

### **Vitaminas**

- **Vitamina A.** El consumo de ésta vitamina y/o de sus precursores dietéticos se asocia a una reducción de CCR (Birt DF, 1989). La vitamina A podría actuar como antioxidante bloqueando la formación de radicales libres (Troll W, 1991).

- **Vitamina C.** Se ha descrito una asociación negativa entre el consumo de esta vitamina y el riesgo de CCR. (Stemmermann et al, 1990; Heilbrun et al, 1989 y Potter et al, 1986).

- **Vitamina D.** Se ha demostrado que junto con el calcio posee efectos antiproliferativos sobre el epitelio del colon, tanto cuando se trata de mucosa normal como adenomatosa (Kleinbeuker J et al, 1995).

- **Vitamina E.** Es una vitamina liposoluble con acción “depredadora” de los radicales libres y acción antioxidante lipídico. Se ha propuesto que estas propiedades podrían ser origen de una actividad antitumoral (Chen L H, 1988).

Un estudio prospectivo encuentran que el riesgo disminuido de padecer cáncer de colon con suplementos de vitaminas A y C sólo es significativamente estadístico en mujeres (Shibata et al, 1992). También se ha descrito que los suplementos de vitaminas A, C y E son efectivos para reducir las alteraciones de la cinética celular que indican una condición preneoplásica (Paganelli et al, 1992).

### ***Hierro***

En su condición de catión bivalente, contribuye a la síntesis de radicales hidroxilo y otros oxidantes a partir de los superóxidos y peróxidos (Nelson RL, 1992). Los humanos absorbemos menos del 10% del hierro que ingerimos. El resto del hierro de la dieta permanece en la luz colónica por un largo periodo de tiempo junto a los lípidos, en consecuencia, su concentración en la luz colónica se encuentra más elevada que en cualquier otra parte del organismo. Experimentalmente, se ha demostrado que la administración de hierro tanto por vía oral como parenteral incrementa el riesgo de CCR (Nelson RL et al, 1989).

### ***Alcohol***

Desde finales de la década de los 60's, se ha asociado el cáncer colorrectal con el consumo de alcohol (Morales et al, 1990). Un consumo de alcohol relativamente bajo, de un litro de cerveza al día, puede incrementar hasta tres veces el riesgo de desarrollar un CCR. Estudios en animales parecen demostrar que aunque el alcohol no es un carcinógeno en sí mismo, favorece el desarrollo de cáncer, es decir co-carcinogénico. El alcohol podría actuar desplazando los inhibidores de la dieta (Simanowski et al, 1991). Los factores generales, asociados a CCR favorecidos por el consumo de alcohol serían: inmunosupresión, alteración de la capacidad enzimática del hígado, cambios en la composición de la bilis, efecto de las nitrosaminas. Los factores locales a nivel del medio colónico serían: estimulación de la proliferación de la mucosa, activación de procarcinógenos intestinales y acción química de los asbestos (Kune G y Vitetta, 1992).

### ***Tabaco***

Aún cuando existe una relación positiva entre el tabaquismo y el desarrollo de adenomas colorrectales, no existen estudios concluyentes de dicha relación entre el tabaquismo y el desarrollo de CCR (Hoff G y Vatu MH, 1987).

### ***Actividad física***

Distintos estudios indican que el riesgo relativo de padecer CCR incrementa en relación con la disminución del grado de actividad física que se desarrolla durante el trabajo (Obrador et al, 1990 y Slattery et al, 1990). La actividad ocupacional vigorosa muestra una reducción del riesgo de cáncer de colon, al menos en hombres (Kritchevsky D, 1993).

## **1. 5. ANTECEDENTES PATOLÓGICOS**

### **Enfermedad inflamatoria intestinal**

En la enfermedad inflamatoria intestinal crónica, existe una clara disminución de la incidencia de desarrollo de CCR debido al mejor control de la enfermedad y al tratamiento con 5-Aminosalicilatos (ASA). **Colitis Ulcerosa**

A pesar de que históricamente se ha atribuido una alta incidencia de CCR asociada a colitis ulcerosa, la incidencia ha disminuido considerablemente, con una probabilidad acumulada del 9% a los 25 años (Lennard-Jones et al, 1990). En el caso de los pacientes con colitis ulcerosa tipo pancolitis, presentan un riesgo incrementado de desarrollar cáncer de colon. Este riesgo empieza a aumentar después de 10 años de enfermedad y se eleva un 2% por año (Beart RW, 1990 y Axon AT, 1994).

### **Enfermedad de Crohn**

El riesgo de CCR en pacientes con enfermedad de Crohn, es de cuatro a veinte veces más elevado que en la población general. También se ha encontrado una alta asociación de carcinomas mucinosos (50%) comparado con el grupo control (9%). También se observó una disminución en la edad de aparición del CCR (Hamilton SR, 1985 y Ekbohm et al, 1985).

### ***Antecedentes de pólipos***

La secuencia adenoma-carcinoma, constituye una de las bases fundamentales de los actuales estudios genéticos moleculares así como de screening y prevención. El riesgo de presentar CCR depende del tipo histológico, tamaño y número de adenomas. Los enfermos con adenomas con componente vellosos, o de tamaño mayor de 1 cm. presentan un riesgo aumentado de 3,6 veces, y los que presentan adenomas múltiples grandes tienen un riesgo de 6,6 veces más. Por el contrario, un adenoma tubular o pequeños adenomas múltiples sin displasia de alto grado no incrementan el riesgo de CCR (Luk GD, 1993).

Estudios multicéntricos han puesto de manifiesto que el 93% de los cánceres colorrectales aparecen sobre pólipos adenomatosos. También describieron que los cánceres sobre pólipos adenomatosos tenían un tiempo de crecimiento de 7 años desde 1 cm. a cáncer invasivo, con un rango de 0-14 años y que cerca del 5% de los adenomas que alcanzan 5 mm. desarrollarán un cáncer invasivo. También que un cáncer infiltrante alcanza el estadio Dukes A en dos años, el B en un año más y el C en otro año (Burmer et al, 1990). La distribución topográfica de los adenomas apoya la teoría de su potencial maligno. Los adenomas del colon izquierdo distal y del sigma tienen una frecuencia más alta de malignización que los que aparecen en otras zonas del colon; esto se correlaciona muy bien con la distribución anatómica del CCR (Obrador et al,1990). Los familiares de primer grado de pacientes con poliposis colónica familiar presentan una incidencia considerablemente incrementada de CCR, iniciándose alrededor de los 20 años (Iwama et al, 1994).

### ***Patología biliar previa***

La actividad carcinógena de algunos componentes de la bilis se ha descrito previamente al estudiar los factores ambientales. Se ha supuesto, por consiguiente, que las personas con antecedentes de colecistectomía podrían tener un riesgo más elevado de desarrollar CCR, debido al flujo continuo de bilis al tubo digestivo. De hecho una revisión detallada del tema no ha demostrado una relación evidente entre colecistectomía y riesgo de padecer CCR considerado globalmente, si bien hay indicios a favor de un incremento de riesgo para el cáncer de colon derecho en las mujeres (Friedman et al, 1987).

## **I.3 HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER COLORECTAL**

Las células de la mucosa colónica tienen un origen policlonal y se originan de las células progenitoras totipotenciales de la mucosa, mientras que las células del CCR se han seleccionado de forma clonal (Hahn WC et al, 1999). La secuencia adenoma-carcinoma se caracteriza por la acumulación secuencial de múltiples alteraciones genéticas en oncogenes y genes supresores tumorales que afectan el equilibrio entre la proliferación y la muerte celular. La génesis tumoral se basa en el concepto de que cada uno de estos acontecimientos mutacionales confiere una capacidad de crecimiento a cada célula tumoral (Hahn WC et al, 1999; Mecklin JP et al, 2000). Cada alteración molecular añadida confiere a la célula capacidad adicional de crecimiento

comparada con el resto de células tumorales, resultando en múltiples etapas de expansión clonal, y eventualmente en progresión tumoral (Hanh WC et al, 1999; Carethers JM et al, 1996).

La mayoría de los carcinomas CCR se desarrollan a partir de pólipos, siendo los adenomas las lesiones precursoras de la mayoría de carcinomas. Sin embargo, la presencia de adenomas es frecuente en la población y únicamente un pequeño porcentaje progresará a cáncer. El tiempo medio necesario para completar esta progresión es largo, probablemente de 10 años o más, hecho que permite prevenir o detectar precozmente el CCR y mejorar su pronóstico (Castells et al. Gastroenterol Hepatol 2004; 27:573-634; Carethers JM et al, 1996).

## **I. 2. Focos de criptas aberrantes**

La mucosa del colon está compuesta por criptas que tienen una profundidad aproximada de 50 células. La función principal es la secreción de moco para facilitar el avance del bolo fecal y la absorción, mayoritariamente de agua (Potter JD, 1999). El epitelio colónico presenta una alta tasa de recambio celular, a través de la proliferación y diferenciación celular en la cripta. El epitelio de superficie se renueva aproximadamente cada seis días. La proliferación de las células colónicas tiene lugar en la porción inferior o proliferativa de la cripta y se caracteriza por la división celular y por la migración de células a las porciones más altas de la cripta a partir de células progenitoras. La diferenciación y la maduración de las nuevas células tiene lugar mientras éstas migran a lo largo de la cripta (Potter JD, 1999). Las células maduras pierden su capacidad para dividirse otra vez, y finalmente mueren por apoptosis, siendo exfoliadas a la luz del colon. El CCR se desarrolla de forma secuencial, con etapas definidas que se inician con alteraciones moleculares en las criptas o focos de criptas aberrantes, pasando por el adenoma hasta la célula cancerígena con capacidad de invasión estromal y diseminación a distancia. En los focos de criptas aberrantes las células no se diferencian, proliferan en el compartimiento y pueden abarcar toda la cripta. Aunque el adenoma es una proliferación neoplásica precursora de CCR, es sabido que la mayoría de adenomas no evolucionan a cáncer.

La traducción histológica que refleja la alteración molecular inicial es sutil y con frecuencia no es evidente en el exámen histológico, pero si detectable mediante cambios en varios marcadores de proliferación, diferenciación y muerte celular programada. Con la progresión de los cambios, las lesiones precursoras de carcinoma se hacen evidentes en forma de criptas aberrantes (microadenomas) o de micropólipos que protruyen hacia la luz sobresaliendo de la superficie de la mucosa

circundante. Finalmente las lesiones premalignas y malignas son detectables por histología, como los pólipos, masas tumorales y lesiones planas.

Este proceso inicial del desarrollo del CCR, o la secuencia displasia epitelial-adenoma-carcinoma (Mutto T et al, 1975; Volgestein ...xxx).

#### **1. 4. E . ALTERACIONES MOLECULARES EN EL CCR**

Las principales vías patogénicas moleculares del CCR son la inestabilidad cromosómica (CIN) y la inestabilidad de microsatélites (MSI). Los modelos moleculares de CCR se dividen en cuatro grandes grupos, establecidos últimamente en un documento de consenso (Consensus Nature 2015). Describiremos las principales vías moleculares y los grupos de consenso descritos.

##### **1.4.E.1. Inestabilidad cromosómica (CIN)**

Los mecanismos que causan CIN fueron los primeros que se descubrieron. Se asocian a defectos en el aparato del huso mitótico. Así, los tumores originados por esta vía suelen caracterizarse molecularmente por varias deleciones cromosómicas, translocaciones y pérdida de heterocigosidad. La vía más frecuentemente alterada es la de la Activación Mitótica de la Proteína Kinasa o MAPK. La vía MAPK es un mecanismo fundamental para la conducción de la señal celular, la mediación de respuestas a señales extracelulares relacionadas con el crecimiento celular, la diferenciación y apoptosis. Las mutaciones de los componentes de esta vía han sido identificados en muchos tipos de cáncer. La activación de BRAF o RAS, componentes de la cascada de señalización MAPK, en respuesta a la señalización de elementos en la vía por encima de estos genes, resulta en una mayor división celular y en la reducción de la apoptosis. Las mutaciones en BRAF o RAS conducen a la activación constitutiva de esta vía. Las mutaciones RAS, que son comunes en la vía de la inestabilidad cromosómica, también han sido identificadas en un subgrupo de cánceres que surgen a través de la vía serrada de la carcinogénesis. Las mutaciones de BRAF se describieron por primera vez en CCR en 2002 por Rajagopalan et al. Es importante destacar que las mutaciones BRAF y RAS son mutuamente excluyentes, y que las mutaciones BRAF se correlacionan fuertemente con ambas IMS y CIMP.

En este grupo se encuentran un 65% de los CCR, considerados como esporádicos según la clasificación. Las alteraciones genéticas implicadas en la génesis del CCR esporádico se basan en la secuencia adenoma- carcinoma. En este modelo secuencial, el desarrollo del CCR refleja la activación de determinados oncogenes (RAS) y la inactivación de diversos genes supresores (APC; SMAD4, DCC, TP53). La

acumulación de estas alteraciones, es la responsable de la transformación y progresión neoplásica (Fearon ER, 1990).

La presencia de mutaciones en el gen APC (adenomatous polyposis coli) constituye un fenómeno precoz y clave para el desarrollo de los adenomas. Este gen participa en la regulación de la migración de células a través de la interacción con los microtúbulos, en adhesión celular mediada por  $\beta$ -catenina i E,cadherina, en la transducción de la señal dependiente de  $\beta$ -catenina, conlleva alteraciones en la migración y adhesión de la célula, así como un incremento de la actividad transcripcional Tcf y cMyc que induce la proliferación celular. (Powell SM y Ford CHJ, 1992).

La progresión desde adenoma hasta carcinoma requiere Además de la activación de la vía APC-  $\beta$ -catenina-Tcf de la acumulación de otras alteraciones genéticas o cromosómicas. Entre las diferentes alteraciones implicadas destaca el protooncogén K-RAS. La proteína codificada por éste gen, p21, puede encontrarse en dos estados funcionales según el grado de fosforilación. La forma activa (p21-GTP) favorece la activación de la cascada MAP quinasa, la cual tiene por finalidad promover la síntesis de DNA. Esta función está regulada por su actividad GTPasa intrínseca que favorece el regreso a la forma inactiva (p21-GDP). La presencia de mutaciones en el gen K-RAS conlleva la activación permanente de p21, lo que incrementa la transducción de la señal que resultará en un aumento de la actividad proliferativa de la célula (McDonald F y Ford CHJ, 1997).

Otra alteración cromosómica frecuente en el CCR es la presencia de pérdidas alélicas en el brazo largo del cromosoma 18 (Fearon ER y Volgestein B, 1990), implicando los genes DCC y SMAD4 en la patogenia del CCR. En relación al gen DCC (deleted in colonic cancer) se ha comprobado que la falta de expresión de la proteína que codifica se correlaciona con una menor probabilidad de supervivencia en enfermos afectados de CCR. Por otro lado, el gen SMAD4 codifica una proteína que participa en la mediación intracelular de la respuesta al TGF-  $\beta$ . La pérdida aislada de SMAD4 no induce la aparición de tumores intestinales, pero que cuando esta se asocia a la pérdida de APC se desarrollan adenomas que se malignizan fácilmente. Estudios realizados en animales han demostrado. TGF- $\beta$  es una familia de pequeños polipéptidos con diversas funciones en el crecimiento y desarrollo celular. La respuesta de la célula al TGF- $\beta$  depende de receptores específicos localizados en la superficie celular (RI y RII). La presencia de mutaciones en el gen TGF- $\beta$ RII (presente en el 20% de los carcinomas colorrectales) o SMAD4, responsable de la poliposis juvenil, conlleva a que la célula se escape del control negativo ejercido por el TGF- $\beta$  sobre la proliferación celular (Takaku K et al, 1998).



El gen supresor TP53 está localizado en el brazo corto del cromosoma 17. La proteína codificada por este gen, p53, inhibe el crecimiento celular actuando como un factor de transcripción, de tal manera que promueve la transcripción de genes que codifican proteínas con actividad supresora. Al producirse una lesión en el DNA, hay un rápido incremento de niveles de p53, que lleva a la detención del ciclo celular en fase G1, dando tiempo a la célula para reparar el daño genético. Cuando la reparación no es posible, p53 induce apoptosis. Las células con mutaciones o pérdidas alélicas de TP53 no pueden llevar a término estas funciones, por lo que son incapaces de detener el proceso neoplásico (Hollstein M, 1991).

#### **1.4.E.2. Inestabilidad de microsatélites**

La vía MSI es responsable de un 15% de todos los CCR y también incluye algunos síndromes familiares. El síndrome de Lynch (CCHNP) es el prototipo de los tumores caracterizados por MSI.

La primera sugerencia de la existencia de una vía molecular del CCR distinta a la de la inestabilidad cromosómica fue a partir del estudio de pacientes con síndrome de poliposis serrada (SPS), descrita en 1980. Los pólipos hiperplásicos eran entonces el único tipo de pólipos serrados reconocidos, y se consideraban lesiones no neoplásicas y los primeros informes de una posible asociación entre el SPS y el CCR recibieron poca atención. En 1996 Torlakovic y Snover demostraron diferencias histológicas entre los pólipos en SPS y pólipos hiperplásicos esporádicos. Se reportaron pólipos hiperplásicos con rasgos atípicos, pólipos mixtos con características de ambos, hiperplásicos y adenoma convencional, y ocasionales CCR originados en pólipos hiperplásicos.

#### **1.4.E.3. Vía de metilación**

La metilación del ADN es un proceso fisiológico con una amplia gama de funciones, incluyendo la impronta genómica, el momento de la replicación del ADN, y la regulación de estructura de la cromatina y transcripción. En los seres humanos, la mayoría de los procesos de metilación se producen a través de la actividad de ADN metiltransferasa, con residuos de citosina seguidos por guanina (CpG) siendo particularmente propensos a la metilación. Citosina metilada está en alto riesgo de desaminación a timina, por lo que los dinucleótidos CpG son poco comunes en gran parte del genoma, y se producen con una frecuencia del 20-25% de la esperada por azar. Sin embargo, intercalados entre el ADN empobrecido en CpG, existen regiones ricas en CpG que se conocen como islas CpG. Estas regiones se encuentran casi exclusivamente en las regiones promotoras de los genes que codifican para las

proteínas housekeeping, implicadas en el metabolismo y la estructura de la célula. La metilación de los dinucleótidos CpG en estas islas resulta en la silenciación de la función del gen. Algunos genes, incluidos genes supresores tumorales albergan islas CpG en sus regiones promotoras (incluyendo p16 y MLH1), La metilación de las islas CpG es un mecanismo potencial de carcinogenesis. En 1999 , Toyota et al. describió dos patrones de metilación al analizar el silenciamiento de genes en 50 CCR tras evaluar los niveles de metilación en 30 islas CpG. El tipo A (relacionado con la edad), en el cual un bajo nivel de metilación aumentaba progresivamente con la edad, y el tipo C (relacionado con el cáncer), con altos niveles de metilación en las islas CpG, que en consecuencia silenciaba genes importantes en regulación celular. El tipo C se lo encontró en el 27% de CRC, y denominó a la vía molecular de estos CCR como fenotipo de islas CpG (tumores de fenotipo metilador o CIMP). El grupo CIMP incluye casi todos los casos de cánceres esporádicos MSI-H. El silenciamiento inducido por metilación de MLH1 proporcionó una explicación para los carcinomas esporádicos con IMS que ocurren fuera del síndrome de Lynch. Se utilizan dos principales 'paneles CIMP' o paneles propios para la clasificación de los CCR, Esto hace que la comparación de CIMP entre los estudios sea difícil, y es en parte responsable de la variabilidad reportada en número de tumores que surgen a través de la vía serrada de la carcinogénesis. Las altas tasas de cánceres sincrónicos o metacrónicos en pacientes con pólipos serrados, síndrome de poliposis serrada que exhibieron CIMP, silenciamiento de MLH1 e IMS apoyaron la existencia de una vía de neoplasia serrada en la que intervienen: (i) activación de la vía MAPK; y, (ii) la activación de las vías CIMP y MAPK ocurre por la mutación de BRAF o KRAS, y puede haber alto o bajo CIMP (CIMP-L) o (CIMP-H). Aunque és importante, la IMS no es un requisito de la vía serrada de carcinogénesis CRC.

Los dos modelos propuestos por Jass en 2007 se resumen en:

1 CIMP-H con mutación de BRAF y con MSI-H o MSS.

2 CIMP-L con mutación de K-RAS y MSS.

#### **1.4.E.4. Subtipos Moleculares de Consenso del CCR**

En un intento de homogenizar las respuestas heterogéneas al tratamiento y las diferencias de supervivencia en pacientes con CCR, un consorcio internacional creó unos subtipos moleculares de consenso basados en datos moleculares a gran escala. Se analizaron seis sistemas de clasificación independientes y se obtuvieron cuatro subtipos moleculares de consenso con rasgos moleculares y clínicos distintivos:

- Subtipo de consenso molecular 1 (CMS1): Tipo immune con inestabilidad de microsatélites, 14%; hipermutado, con inestabilidad de microsatellites y marcada activación inmune.
- Subtipo de consenso molecular 2 (CMS2): Tipo canónico, 37%; epitelial, marcada activación de vías de señalización WNT y MYC.
- Subtipo de consenso molecular 3 (CMS3): Tipo metabólico, 13%; epitelial y alteración de la regulación metabólica.
- Subtipo de consenso molecular 4 (CMS4): Tipo mesenquimal, 23%; marcada activación del factor de crecimiento transformador NFkbeta, invasión estromal y angiogénesis.
- Patrones mixtos (13%) que probablemente representan un fenotipo de transición o heterogeneidad tumoral.

Esta clasificación se considera un sistema robusto con interpretabilidad biológica como base de una estratificación clínica de futuro en la que se basarán las terapias dirigidas.

#### **1.4.F CCR ESPORÁDICO Y SÍNDROMES HEREDITARIOS DE CCR**

La mayoría de los casos de CCR corresponden a formas esporádicas de la enfermedad, sin embargo, un 15 - 25% son de carácter hereditario y es posible obtener antecedentes familiares de CCR y/o de otras neoplasias (Burt RW, 2000 y Winawer SJ, 1997). Las formas familiares o hereditarias pueden tener baja baja penetrancia o ser trastornos poligénicos con participación de polimorfismos que modulen la influencia de factores ambientales. Los dos síndromes hereditarios asociados al cacinoma colorrectal más prevalentes son la poliposis adenomatosa familiar (PAF) y el CCR hereditario no asociado a poliposis (CCHNP), o síndrome de Lynch (Rustgi AK, 1994). Ambas entidades, pese a que representan una proporción reducida del total de neoplasias colorrectales, tienen una gran importancia desde el punto de vista fisiopatológico, clínico y terapéutico. En primer lugar, los conocimientos adquiridos en relación a los factores que participan en el desarrollo de estas enfermedades hereditarias han permitido conocer los mecanismos implicados en CCR esporádico, ya que algunos de los genes que se encuentran mutados a nivel germinal en la PAF y el CCHNP también tiene un papel clave en esta última situación (Fearon ER, 1990). En segundo lugar, la identificación de los genes responsables ha permitido establecer el diagnóstico presintomático de los individuos portadores de mutaciones en estos genes y, por tanto, el riesgo de desarrollar la enfermedad, con la consecuente repercusión en las estrategias de cribaje (Giardello FM, 2001) .

El primer indicio de la existencia de una vía molecular distinta a la de la inestabilidad cromosómica nació a partir del estudio de pacientes con síndrome de poliposis hiperplásica, que ahora se denomina síndrome de poliposis serrada (SPS). El SPS se describió en 1980, momento en el que únicamente se reconocían los pólipos hiperplásicos de entre todos los tipos de pólipos serrados existentes. Además, los pólipos hiperplásicos se consideraban lesiones benignas sin capacidad de transformación neoplásica. En 1996 Torlakovic y Snover demostraron diferencias histológicas entre los pólipos del SPS y los pólipos hiperplásicos esporádicos. Se describieron pólipos mixtos con rasgos de adenoma convencional e hiperplásico y algunos CCR originados en pólipos hiperplásicos.

#### **1. 4. F . 1 . Poliposis adenomatosa familiar**

Es una enfermedad hereditaria autosómica dominante, con una incidencia 1/10.000 habitantes. Desde el punto de vista fenotípico se caracteriza por la presencia de numerosos pólipos adenomatosos (más de 100) distribuidos a lo largo del colon. El diagnóstico suele realizarse entre la segunda y la cuarta décadas de la vida. Esta enfermedad presenta un alto potencial de malignización, de tal manera que si no se efectúa tratamiento quirúrgico, la práctica totalidad de los enfermos desarrollan un CCR antes de los 50 años. Con frecuencia se acompaña de manifestaciones gastrointestinales, entre las que destaca la presencia de adenomas gastroduodenales, hipertrofia pigmentaria de la retina o tumores desmoides, conocido como síndrome de Gardner (Rustgi AK, 1994).

Mediante estudios de ligamiento genético y posterior clonaje posicional, ha sido posible identificar el gen responsable de esta enfermedad, APC (adenomatous polyposis coli), localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (Grodin J, 1991). La presencia de mutaciones germinales en este gen han permitido el diagnóstico molecular de esta enfermedad y, consecuentemente, su aplicación en el cribaje familiar de la misma (Powell SM, 1993). Por otro lado, existe una buena correlación genotipo-fenotipo, de tal manera que la localización de la mutación condiciona el espectro clínico de la enfermedad (Soravia C, 1998 y Foie R, 2001).

Se ha descrito la variante denominada poliposis adenomatosa familiar atenuada, caracterizada por un inicio más tardío, menor número de pólipos localizados preferentemente en colon derecho, y que se asocia a mutaciones en los extremos 5' o 3' del gen APC. Los casos con mayor número de pólipos habitualmente se asocian a

mutaciones entre los codones 1285 y 1465 del gen APC. El desarrollo de hipertrofia pigmentaria de la retina en mutaciones en los codones 542 – 1309, y la aparición de múltiples manifestaciones extracolónicas a mutaciones en los codones 1465, 1546 y 2621. Por último los enfermos en los que no es posible detectar mutaciones en APC (20 – 40%) presentan un fenotipo mucho más leve, tanto en las manifestaciones colónicas como en relación al número de pólipos colónicos (Heinimann K, 1998). Estos últimos datos, así como las importantes diferencias fenotípicas entre las familias afectas sugieren la posible existencia de otros genes implicados que ejercen un papel modificador (Houlston R, 2001).

El gen APC, como se ha señalado previamente, juega un papel clave en la regulación de la migración celular a través de la interacción con los microtúbulos, de la adhesión celular mediada por  $\beta$ -catenina y E-cadherina, y de la transducción de señal dependiente de  $\beta$ -catenina. La pérdida o mutación de APC, responsable de la degradación de  $\beta$ -catenina, conlleva alteraciones en la migración y la adhesión de la célula, así como un incremento de la actividad transcripcional Tcf – cMyc que induce la proliferación celular (Foie R, 1992).

La estrategia recomendada para el cribaje de la poliposis adenomatosa familiar se basa en medidas de consejo genético que incluyen la realización del análisis mutacional del gen APC y la información y el asesoramiento a los familiares sobre el riesgo que conlleva la enfermedad, la importancia que tiene el seguimiento y la trascendencia que puede tener el resultado de la prueba genética. (Powell SM, 1993 y Giardello FM, 1997).

En los individuos portadores de mutaciones o en aquellos en los que no ha sido posible determinar su presencia, el cribaje contempla la práctica de una colonoscopia anual. Si se establece el diagnóstico de poliposis, además de indicar el tratamiento quirúrgico, puede hacerse un estudio de extensión que incluiría fibrogastroscofia, ortopantomografía y estudio del fondo de ojo para descartar la presencia de manifestaciones extracolónicas. El tratamiento de la poliposis adenomatosa familiar es quirúrgico, ya sea mediante proctocolectomía total con reservorio o colectomía subtotal con preservación del recto y anastomosis ileorectal (Rustgi AK, 1994). Mientras que la primera evita el riesgo de un ulterior desarrollo de una neoplasia rectal, esta opción está agravada por un mayor número de complicaciones postoperatorias y peor calidad de vida. La elección de una técnica quirúrgica depende fundamentalmente de las manifestaciones del individuo o de la familia, recomendándose la colectomía total en la mayoría de pacientes y reservando la subtotal para aquellos casos en que existen pocos pólipos en el recto y el fenotipo

familiar es leve, o para las formas atenuadas (Bülow C, 2000). Asimismo, algunos estudios sugieren que la localización de las mutaciones podría contribuir a decidir el tipo de intervención. Así, estaría indicado realizar una colectomía subtotal cuando las mutaciones estuvieran localizadas en los codones 0 –200 o posteriores a los 1500, mientras que otros autores recomendarían posponer la colectomía cuando las mutaciones se encuentren entre los codones 1445 y 1580 debido al elevado riesgo de desarrollar tumores desmoides después de la intervención (Vasen HFA, 1996 y Friedl W, 2001).

En los últimos años, se ha demostrado que los adenomas de pacientes con poliposis adenomatosa familiar presentan sobreexpresión de ciclooxigenasa 2 (COX-2), la isoforma indiluíble de esta enzima que participa en el metabolismo de las prostaglandinas (Gupta RA, 2001). Paralelamente, se ha observado que la utilización de antiinflamatorios no esteroideos reduce el número de pólipos que presentan estos pacientes (Gupta RA, 2001). Estos resultados también se han observado con la utilización de inhibidores específicos de COX-2 (Steinbach G, 2000), mientras que estudios experimentales con ratones deficientes para APC y para COX 2 han confirmado la importancia patogénica de esta isoenzima y el potencial efecto beneficioso de estos fármacos. No obstante, la utilización de inhibidores selectivos de COX-2 está limitada a los pacientes tratados quirúrgicamente con preservación del recto, con tal de evitar la aparición de nuevos pólipos en éste segmento (Gupta RA, 2001).

#### **1. 4. F. 2. Síndrome de Lynch o CCR hereditario no asociado poliposis (CCHNP)**

El Síndrome de Lynch es una enfermedad hereditaria con patrón autosómico dominante, que se caracteriza por un alto riesgo de cáncer en múltiples órganos, particularmente el intestino grueso. Está causado por una mutación germinal en uno de los genes reparadores del ADN (*hMSH2*, *hMLH1*, *hMSH6*, *hMLH3*, *hPMS1*, *hPMS2*) (*missmatch repair gene*, o *MMR*). La inactivación de los alelos normales resulta en la pérdida de la función de reparación de los genes y la acumulación de mutaciones en secuencias de ADN repetitivas, mono, di o trinucleótidos, llamadas microsatélites. (Ionov Y, 1993 y Chung DC, 1995) (Leach FS, 1993 y Cheng DC, 1995). La mayoría de los microsatélites están distribuidos a lo largo del ADN no codificante, pero algunos genes que juegan un papel fundamental en la regulación del crecimiento, proliferación y muerte celular como BAX, o los genes que codifican los receptores TGF- $\beta$  y IGFR2, entre otros, albergan microsatélites y son particularmente propensos a estar mutados en el síndrome de Lynch. Esta propensión se denomina inestabilidad de microsatélites (IMS). En 1993 se identificó la IMS y la primera

mutación germinal en un gen reparador (*hMSH2*), lo que permitió definir la base genética de esta enfermedad. La corrección de los errores de apareamiento y pequeñas inserciones/delecciones de una o dos bases se inician por la unión de heterodímeros MSH2-MSH6 al fragmento dañado. Esta primera fase va seguida por un cambio conformacional de estas moléculas, lo que facilita la unión del complejo MLH1-PMS2. Posteriormente, se produce la escisión de la cadena de ADN afecta y la síntesis de una nueva. Cuando deben repararse inserciones/delecciones más largas, probablemente interviene el complejo MSH2-MSH3 (Chung DC, 1995). En 1997 se llegó al consenso en cuanto a los marcadores más adecuados para definir la IMS. Se definió como IMS alta (MSI-H) al encontrar MMR en dos o más de los cinco mono o dinucleótidos estudiados; IMS baja (MSI-L) al detectar un solo MMR en un mono o dinucleótido de los cinco estudiados y estabilidad de microsatélites (MMS) si no había alteración en ninguno de los MMR estudiados. Aproximadamente el 15% de los CCR son MSI-H, pero únicamente un 2-2% eran debidos a un defecto de la línea germinal en un gen reparador del ADN. La causa de la inestabilidad del 12–13% de CCR es debida a otras alteraciones moleculares.

El síndrome de Lynch se caracteriza por el desarrollo precoz de CCR. Los tumores suelen presentarse predominantemente en colon derecho, hay mayor frecuencia de carcinomas sincrónicos o metacrónicos, así como neoplasias en otros órganos (endometrio, estómago, ovario, tracto urinario, vías biliares, etc). Histológicamente los tumores suelen presentar características especiales, con frecuencia son coloides o productores de moco, o con células en anillo de sello, pobremente diferenciados o de alto grado y con linfocitos intraepiteliales (Rustgi AK, 1994).

El diagnóstico de CCHNP se establece a partir de la historia familiar, junto con criterios histológicos y moleculares. Los CCR con MSI representan un 15% de los CCR, sin embargo no todos pertenecen al síndrome de Lynch.

Las Guías Bethesda para identificar pacientes con síndrome de Lynch mediante IMS se gestaron en un *workshop* en el National Cancer Institute (NCI).. En 2002 se hizo una segunda reunión para revisar y mejorar los criterios. Son los *criterios o Guías Bethesda revisadas* para a identificar pacientes con riesgo de CCHNP que también tiene recomendaciones para realizar el test de MSI.

Dado el elevado riesgo de desarrollar un CCR (superior al 80% a lo largo de la vida de los individuos con mutaciones germinales en los genes *hMSH2* y *hMLH1*), la colectomía total profiláctica en pacientes afectados de síndrome de Lynch es una estrategia controvertida, (Vasen HF, 2001; Giardello FM, 2001), al no haber estudios que demuestren un mejor pronóstico en estos pacientes. Menos controvertida resulta

la decisión terapéutica en relación a la técnica quirúrgica más apropiada para el tratamiento de los pacientes que han desarrollado un CCR. Dado el elevado riesgo de presentar lesiones metacrónicas durante su seguimiento, la práctica de una colectomía total o subtotal podría constituir una estrategia adecuada.

En los últimos años se ha demostrado que la vigilancia periódica mediante colonoscopias mejora el pronóstico de los individuos portadores sanos pertenecientes a familias con síndrome de Lynch. Así, la realización de una colonoscopia anual se asocia a una disminución de la probabilidad de desarrollar CCR y a un aumento de la supervivencia (Järvinen HJ, 2000). Las recomendaciones actuales en los pacientes pertenecientes a familias con síndrome de Lynch contempla la realización del análisis germinal de las mutaciones en los genes *hMSH2*, *hMLH1*, *hMSH6* y *hPMS2*. (Giardello FM, 2001 y AGA, 2001). En los individuos portadores de mutaciones o en aquellos casos en los que no es posible determinar su presencia, la práctica de una colonoscopia cada uno o dos años a partir de los 25 – 30 años (o de 10 años antes de la edad de diagnóstico del familiar afecto más joven) constituye la estrategia más adecuada.

En cuanto al cribaje molecular mediante inmunohistoquímica o inestabilidad de microsatélites por PCR, algunos grupos optan por un primer análisis inmunohistoquímico por su inmediatez, bajo coste y por el hecho que la IHQ permite dirigir el/los genes en los que se deberá realizar el análisis mutacional en línea germinal. (REF) Otros sugieren la detección del fenómeno de inestabilidad de microsatélites como método de cribaje para detectar pacientes con CCHNP (Rodríguez-Bigas MA, 1997 y Boland CR, 1998).

## **I. 6. DIAGNÓSTICO**

### **I. 6. A. Características clínicas**

El CCR, frecuentemente es asintomático durante un largo periodo de tiempo que incluye las primeras etapas de su desarrollo en la pared colónica (Bassa et al, 1992). La presencia de un CCR debe sospecharse en base a la información obtenida de una historia clínica cuidadosa. Los síntomas de alarma son fundamentalmente los cambios del ritmo intestinal, sangre en heces, tenesmo, descarga de moco, anemia microcítica, ferropenia, y afectación del estado general con pérdida de peso. La progresión local de la enfermedad puede producir obstrucción, especialmente en el sigma, hemorragia y perforación, que empeoran notablemente el pronóstico. En el caso de oclusión o



perforación intestinal, la sintomatología es de presentación aguda y el diagnóstico del tumor suele hacerse durante el acto quirúrgico.

La sintomatología varía según la localización del tumor. Los tumores de colon ascendente, que presentan una menor expresión clínica, raramente producen obstrucción ya que existe un calibre mayor de la luz colónica y las heces son más líquidas, habitualmente se manifestarán por anemia microcítica ferropénica, pérdida de peso y tumoración palpable en fosa ilíaca y vacíos derechos, aunque con frecuencia se manifiestan con dolor no siempre localizado en el lado derecho, que puede ser agravado o aliviado con las comidas, y que puede ser confundido con el dolor de la úlcera péptica o de una coleditiasis. Los tumores del sigma debutan clínicamente con un cuadro de obstrucción en casi el 30% de los pacientes. Si existe dolor, es típicamente cólico, suele aliviarse con las deposiciones y se localiza preferentemente en la parte baja del abdomen. El carcinoma rectal produce rectorragias en el 60% de los casos, tenesmo en el 75%, y ocasionan dolor con poca frecuencia, pero cuando el tumor rectal engloba los nervios pélvicos puede manifestarse con dolor sacro o ciatalgia, y acompañarse de incontinencia (Carda P, 1989).

#### **I. 6. B. Diagnóstico en pacientes asintomáticos**

Existen distintos métodos de cribado del CCR en las poblaciones de medio o alto riesgo, que incluyen el tacto rectal, el estudio de la presencia de sangre oculta en heces y métodos endoscópicos o radiológicos.

De estos métodos el más simple es el tacto rectal al cual son accesibles las neoplasias localizadas a menos de 8 cm. del esfínter anal, lo que implica aproximadamente el 10-13% de los cánceres colorrectales (Medrano J, 1990). No existe evidencia de que esta técnica disminuya la mortalidad, pero por su simplicidad es obligatoria en toda exploración médica. Los análisis de sangre oculta en heces se han incorporado como el método de cribado poblacional en muchos países, incluido Cataluña y algunas regiones de España (Castells). Las ventajas que presenta el estudio de sangre oculta se centran en que es un método simple, de bajo coste y que permite diagnosticar tumores en estadios tempranos (Winawer et al, 1991), además se ha demostrado que la aplicación de éste método de detección disminuye la mortalidad por CCR (Mandel et al, 1993, castells, etc). Sus principales desventajas son su relativamente baja sensibilidad y especificidad que a veces obligan a poner en marcha toda una serie de estudios complementarios para descartar la presencia de una neoplasia (Wanebo et al, 1986).

Los estudios endoscópicos tienen una elevada sensibilidad (85-95%), el porcentaje de falsos positivos es despreciable, además aportan la ventaja de que las lesiones

observadas pueden ser biopsiadas confirmando el diagnóstico y en ocasiones pueden ser técnicas terapéuticas (polipectomías) (Bordas JM, 1990). Sus principales inconvenientes son las molestias para el paciente y el alto coste que supone cualquier campaña de diagnóstico precoz que asumiera esta técnica para un amplio grupo de población. Además, existe en el caso de la colonoscopia el riesgo de perforación de un 0,2%, requiriendo cirugía y con una mortalidad de un 7,5% (Bassa et al, 1992). Las técnicas de cribado mediante sigmoidoscopia se ha visto que reducen la mortalidad por cáncer de recto y colon distal (Selby et al, 1992), pero no la del resto del coln.

Dentro de las técnicas de imagen, el enema con doble contraste es el que proporciona una mayor sensibilidad (85%) con sólo un 3-4% de falsos positivos. La principal desventaja son las molestias para el paciente, alto coste y la desventaja frente a las técnicas endoscópicas de que no permite un diagnóstico histológico y sus hallazgos deberán ser casi siempre confirmados con endoscopia-biopsia (Dodd GD, 1991).

La *American Cancer Society* (ACS) recomienda practicar un cribado en los pacientes asintomáticos que presentan riesgo incrementado de padecer CCR consistente en un tacto rectal anual, un test de sangre oculta en heces anual y una sigmoidoscopia cada 5 años (Slavin et al, 1991). Estudios recientes, describen la utilidad de una única sigmoidoscopia flexible realizada entre los 55 y los 60 años de edad en la prevención del CCR, con un seguimiento colonoscópico adecuado en el 3-5% de los casos que presentan adenomas de alto riesgo (> 1 cm. o histología vellosa). La sigmoidoscopia como screening debería identificar a la mayoría de personas con adenomas distales que tienen probabilidades de desarrollar un cáncer (Slavin et al, 1991). El screening de personas asintomáticas sin factores de riesgo conocidos no está justificado en la actualidad (Ransohoff et al, 1991).

En Cataluña se inició el programa de detección precoz de CCR en 2009 utilizando el test de sangre oculta en heces. Se realiza un cribado a la población de riesgo intermedio, con test bienal entre los 50 y 69 años de edad. La tasa de detección de lesiones precursoras y CCR incipientes es elevada (Ref la web de cribado del clinic). El programa se ha ampliado y se extenderá a todo el territorio.

#### I. 6. C. Diagnóstico en pacientes sintomáticos

Cuando el paciente ya presenta algunos de los síntomas anteriormente descritos, se parte de un diagnóstico clínico de sospecha y ponemos en marcha una serie de pruebas complementarias para confirmar el diagnóstico. La mayoría de autores están de acuerdo en que la secuencia más habitual de maniobras diagnósticas en el paciente sintomático es el tacto rectal y la colonoscopia . (Dodd GD, 1991; Iwama et al, 1994 y Pique J, 1990). La ecografía y la tomografía axial computarizada, sola o

asociada a técnicas de angiorradiología como la portografía pueden ser usadas como pruebas complementarias en el diagnóstico de extensión (Soyer et al, 1992). Desde el punto de vista analítico, el antígeno carcinoembrionario (CEA) está generalmente elevado en el CCR. No se ha demostrado su utilidad en el diagnóstico precoz, pero es muy útil para la predicción de recidivas antes de que exista evidencia clínica de éstas, facilitando la eficacia de las intervenciones secundarias (Zeng et al, 1993).

## **I. 7. ANATOMÍA PATOLÓGICA**

### **I. 7. A. Características macroscópicas**

Macroscópicamente, los carcinomas colorrectales se presentan básicamente de dos formas: ulcerada-infiltrante y polipoide. La forma más usual es la de tumor ulcerado-infiltrante, que suele infiltrar por lo menos hasta la submucosa, es de márgenes sobreelevados y puede perforarse. Los tumores polipoides, de crecimiento exofítico, son menos frecuentes y suelen ser de bajo grado y menos infiltrantes. Probablemente por estas últimas razones los tumores polipoideos se asocian a un mejor pronóstico que las formas ulcero-infiltrantes. Estos tumores se encuentran preferentemente en el colon ascendente (Cooper HS, 1989). En raras ocasiones los tumores colorrectales tienen una forma de crecimiento con engrosamiento difuso y rígido de la pared intestinal, con escasa manifestación en la superficie luminal, similar a la linitis plástica del estómago. Los carcinomas colorrectales pueden ser múltiples en el 3-6% de los casos, aunque en algunas series esta cifra se eleva al 18% (Morson et al, 1979 y Ekelund et al, 1974). Además el 20% de los pacientes con CCR presentan adenomas sincrónicos (Muto et al, 1975). Esta cifra aumenta al 66% cuando existe más de una neoplasia maligna (Ekelund et al, 1974).

### **I. 7. B. Características microscópicas**

Microscópicamente se reconocen distintos tipos histológicos.

#### ***Adenocarcinoma***

El tumor maligno más frecuente en el intestino grueso es el adenocarcinoma. Su incidencia global oscila entre el 75 y el 85% (Morson et al, 1979 y Falterman et al, 1974). Microscópicamente, se caracteriza por la formación de un patrón glandular con mayor o menor grado de diferenciación. Los adenocarcinomas se dividen según el

grado de diferenciación en adenocarcinomas de bajo grado (bien y moderadamente diferenciados) y de alto grado (poco diferenciados, indiferenciados, mucinosos). El grado de diferenciación de los adenocarcinomas se establece básicamente en base a la arquitectura, a la configuración tubular o el grado de polaridad nuclear. Los adenocarcinomas bien diferenciados presentan glándulas simples o complejas con aspecto pseudocribiforme, las células mantienen cierta polaridad con los núcleos basales y son de tamaño uniforme (Campo et al, 1990). Los adenocarcinomas moderadamente diferenciados muestran glándulas simples, complejas o ligeramente irregulares, cuya polaridad nuclear se pierde o es difícilmente identificable. Los adenocarcinomas poco diferenciados se caracterizan por la presencia de glándulas irregulares o ausencia de su formación, con pérdida de polaridad nuclear. Basándose en estos criterios, el 15-20% de los adenocarcinomas son bien diferenciados, el 60-70% moderadamente diferenciados y el 15-20% poco diferenciados (Jass et al, 1986).

### ***Carcinoma mucinoso***

La producción de moco por los adenocarcinomas intestinales es un hallazgo frecuente. Deben diferenciarse dos formas de carcinomas mucosecretores: a) el carcinoma coloide o mucinoso, caracterizado por grandes cantidades de moco situado preferentemente fuera de las células, y b) una variante menos frecuente, constituida por células con moco intracitoplasmático y núcleos localizados periféricamente, dispuestos individualmente o en forma de grupos sueltos y difusamente extendidos a lo largo de toda la pared, del tipo células en *anillo de sello* (Kirkham N, 1988). Microscópicamente, la característica de este tumor es la presencia de una gran reacción desmoplásica que engloba a las células tumorales, las cuales muestran la imagen típica en *anillo de sello*. También pueden observarse glándulas abortivas o células pequeñas indiferenciadas. El carcinoma mucinoso abarca alrededor del 15-16% del CCR (Halvorsen et al, 1988).

### ***Carcinoma de células pequeñas***

El carcinoma de células pequeñas colorrectal es un tumor muy infrecuente que histológicamente guarda similitud al carcinoma de células pequeñas pulmonar (Schwartz et al, 1985). Algunos de estos casos pueden presentar focos de diferenciación glandular o mucina. También pueden encontrarse en relación con adenomas (45%). Son tumores neuroendocrinos, con positividad inmunohistoquímica para marcadores neuroendocrinos como la enolasa neuronal específica y la cromogranina, entre otros. En la mayoría de los casos se localizan en el colon derecho (Burke AB et al, 1991). Son carcinomas muy agresivos y de mal pronóstico.

### ***Carcinoma medular***

Este tipo histológico, se asocia invariablemente a inestabilidad de microsatélites y a buen pronóstico. Está caracterizado por células tumorales con núcleos vesiculares que presentan nucleolos prominentes y citoplasma abundante, se disponen en un patrón sincitial y contienen marcada infiltración linfocitaria intraepitelial. (Jessurun et al, 1999)

### ***Otros tipos histológicos***

El carcinoma escamoso puro de colon, es un tipo histológico poco frecuente. La incidencia de esta neoplasia es poco conocida, oscilando entre el 0,25 y el 0,50% (Hickey W F et al, 1981). El carcinoma adenoescamoso es un tipo histológico que está constituido por elementos glandulares y escamosos entremezclados. Su frecuencia es también baja (Campo E et al, 1990). Más raros aún, son los casos de adenocarcinomas colorrectales con diferenciación a coriocarcinoma (Park CH et al, 1980). Estas neoplasias presentan áreas de adenocarcinoma concomitantes con áreas de diferenciación trofoblástica con presencia de células gigantes multinucleadas de tipo sincitiotrofoblástico y en las que puede demostrarse la producción de gonadotropina coriónica. Se han descrito casos aislados de otros tipos histológicos raros, como el carcinoma de células claras o de tipo nefrogénico (Morson B C et al, 1979). Hay tumores intestinales con diferenciación histológica multidireccional, como los carcinomas mixtos adeno-neuroendocrinos (MANEC) con diferenciación de adenocarcinoma y carcinoma o tumor neuroendocrino, y casos de carcinoma adenoscamoso con diferenciación carcinoide (Peomin V et al, 1983).

En el apéndice cecal, el tumor más frecuente es el tumor neuroendocrino (antiguo carcinoide). El adenocarcinoma de apéndice frecuentemente es mucosecretor y puede presentarse clínicamente como mucocele y, puede tener diversos grados de agresividad histológica y clínica, llegando a producir implantes peritoneales en forma de pseudomixoma o carcinomatosis peritoneal (Carda P, 1989).

### ***- Mucosa transicional***

La mucosa transicional o mucosa adyacente al tumor colónico se ha observado que muestra alteraciones ultraestructurales e histoquímicas distintas a la mucosa normal alejada del tumor. Histológicamente, las glándulas de la mucosa transicional están alargadas y ramificadas (Riddel R H et al, 1977). Se observa aumento de las sialomucinas y alteración en las proporciones relativas de los distintos tipos celulares a lo largo de la cripta con persistencia de células inmaduras en niveles altos de las criptas. Las células caliciformes están incrementadas en número y tamaño (Dawson P

A et al, 1976). El significado biológico de la mucosa transicional no está claro (William G T, 1985). Inicialmente se pensó que podría ser una respuesta preneoplásica a un estímulo carcinogénico a partir del cual se desarrollaría la neoplasia, pero algunos estudios inmunohistoquímicos describen un origen no neoplásico de la mucosa transicional (Sawady et al, 1991).

### **I. 7. C. Anatomía patológica de las lesiones precursoras**

De acuerdo a lo comentado, la importancia de los adenomas, es que son verdaderos precursores del CCR. Todos ellos son proliferaciones neoplásicas del epitelio con protrusión hacia la luz.

Por definición, todos los adenomas colorrectales son displásicos. El grado de displasia ha sido graduada como leve, moderada o severa, basadas en las características citológicas y arquitecturales. El grado de displasia ha sido asociado con transformación maligna. Alrededor del 90% de los pacientes con carcinoma tienen displasia de alto grado en los especímenes resecados, y algunos creen que un 40% de los pólipos con alto grado de displasia tienen un foco de carcinoma in situ (Ransohoff DF et al, 1985). Para evitar confusiones, los adenomas con displasia severa o carcinoma in situ, han sido llamados, pólipos (adenomas) con displasia de alto grado. Asimismo, se ha propuesto que el carcinoma in situ y el carcinoma intramucoso sean llamados carcinoma no invasor (Itzkowitz SH et al, 1990 ). Un pólipo con carcinoma invasor también es llamado "pólipo maligno". Aunque la mayoría de pólipos con carcinoma invasor son tratados adecuadamente con polipectomía endoscópica, cerca de un 10% de los pacientes tendrán cáncer residual en la pared colónica o en los ganglios linfáticos al momento de la polipectomía o durante el seguimiento (Coverlizza S et al, 1989; Itzkowitz SH et al, 1990 ; Wilcox GM y Beck JR, 1986).

Un pólipo es llamado pediculado cuando tiene un tallo. Una de las definiciones es que un pólipo es pediculado si la longitud del tallo es mayor que el diámetro (Wilcox GM y Beck JR, 1987). Los llamados adenomas sesiles tienen una amplia base de implantación y suelen tener características histológicas menos favorables que los pediculados (Coverlizza S et al, 1989)

#### ***Adenoma tubular***

Alrededor de un 75% de los pólipos neoplásicos son adenomas tubulares (**FIG**) , se localizan de forma preferente en colon distal y en recto, y más del 50% son únicos. Aparecen de forma esporádica en la población general, con una mayor incidencia en la sexta década de la vida y con predominio masculino de 2:1 (Spjut H y Estrada RG, 1977). Suelen tener una "cabeza" con forma de frambuesa, y la mayoría se

caracterizan por estar unidos a la pared intestinal por un tallo delgado, pero también pueden presentar otros aspectos y pueden medir desde unos pocos milímetros hasta más de un centímetro (Kent TH y Mitros FA, 1983). La superficie de corte muestra un eje central fibrovascular que procede de la submucosa y permanece en continuidad por el centro del tallo. Aunque el eje suele estar recubierto por mucosa normal, la “cabeza” del mismo tiene un epitelio con diversos grados de displasia, formado por túbulos alargados, y glándulas muy próximas entre sí, separadas por una escasa cantidad de estroma conjuntivo fibroso (Day DW y Morson BC, 1978).

### ***Adenoma vellosa***

Son los adenomas cólicos que presentan más de un 50% de estructuras vellosas. La gran mayoría (75%) de estas lesiones se localizan en el tramo recto-colon sigmoide, siendo su distribución paralela a la del adenoCCR. Son los pólipos epiteliales menos frecuentes, y suelen ser los más grandes midiendo entre 1 y 10 cm. Con frecuencia se encuentran en pacientes en la sexta década de la vida, y con similar afectación en ambos sexos. El síntoma más característico de estos pólipos es la hemorragia rectal y, de forma menos frecuente, la secreción de material mucoide rico en proteínas que puede producir hipoproteinemia y, a veces hipopotasemia. Una parte importante de ellos son lesiones sesiles o con una amplia base de implantación y ligeramente lobulados. Histológicamente, no menos de la mitad de la lesión está formada por papilas digitiformes o ramificadas, recubiertas de epitelio polipoide. El resto puede tener estructura tubular. Cada papila está formada por un eje fibrovascular, recubierto por epitelio que varía de una capa única de células columnares altas, bien alineadas, hasta células indudablemente anaplásicas poliestratificadas. Se ha descrito una correlación casi lineal entre la medida del pólipo y la cantidad de componente vellosa del mismo (Day DW y Morson BC, 1978).

### ***Adenoma tubulovellosa***

Este tipo, como su nombre lo indica, comparte características con los de tipo tubular y con los de tipo vellosa. Por definición, el componente vellosa oscila entre el 25 y 50%, y tiene un potencial maligno directamente proporcional a la cantidad de este. El tamaño es intermedio entre los dos tipos que representa, y el tallo prácticamente al del adenoma tubular pero con mayor tendencia a evolucionar hacia el crecimiento sesil. Histológicamente, tienen un aspecto muy variable, pudiendo adoptar desde las formas benignas de un adenoma tubular hasta grados altos de atipia y anaplasia (Dayal y DeLellis, 1990).

## I. 8. LOCALIZACIÓN

Existen sin duda diferencias significativas en cuanto a la localización de los tumores dentro del colon. En los países de mayor incidencia de esta neoplasia hay un predominio importante de la afectación de colon izquierdo (considerado a partir del ángulo esplénico), mientras que en los de menor incidencia es más común la localización en colon derecho (Morson BC y Dawson IMP, 1979).

También se han encontrado diferencias en cuanto a la afectación cólica y rectal. A manera de ejemplo, mientras que el cáncer de recto es igualmente frecuente en países como Los Estados Unidos o Japón, la afectación rectal es mucho menor en este último. A pesar de todo, parece que hoy por hoy existe una ligera tendencia hacia la disminución de las neoplasias que se localizan en recto- colon sigmoide (Levi R et al, 1993 y Huang J et al, 1999). Esto, ligado al hecho de que la supervivencia a los cinco años de los pacientes con tumores de localización izquierda halla mejorado significativamente en los últimos años, probablemente es consecuencia de las cada vez más generalizadas sigmoidoscopias flexibles y de la actitud terapéutica más agresiva en vez de la resección de pólipos adenomatosos (Cady B et al, 1974 y Kawazuma Y et al, 1999).

## I. 9. CLASIFICACIÓN Y PRONÓSTICO

El CCR es el tumor digestivo que tiene la correlación anatomopatológica/pronóstico mejor establecida. En 1927, al observarse una relación entre el pronóstico y la extensión de los tumores rectales, se sugirió una clasificación clínica que posteriormente fue modificada para tener en cuenta los datos patológicos (Deans G T et al, 1992). Más tarde, Dukes modificó los criterios y formuló un sistema para la clasificación anatomopatológica del carcinoma rectal. En el sistema de clasificación inicialmente propuesto por Gordon-Watson y Dukes la profundidad de penetración en la pared colónica era valorada según el grado de invasión de los estratos de la pared. Simpson y Mayo usaron una modificación de la clasificación de Dukes de 1929-1930 para ayudar a analizar los factores que influyen en la supervivencia en el carcinoma del colon, con múltiples modificaciones hasta los años 80's.

La última clasificación TNM, es un sistema clinicopatológico, propuesto conjuntamente por la *Unión Internacional contra el Cáncer* (UICC) y el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), tiene en cuenta la invasión de estructuras vecinas, además del número de ganglios positivos: T1, invasión de la submucosa; T2, invasión de la muscularis propia; T3, invasión de la subserosa o tejido perirrectal no peritonizado; T4,



invasión del peritoneo visceral o invasión directa de otros órganos o estructuras vecinas; N0, sin metástasis en los ganglios linfáticos regionales; N1, metástasis en 1-3 ganglios regionales; N2, metástasis en 4 ó más ganglios regionales; N3, metástasis en cualquier ganglio central; M0, sin metástasis a distancia; y M1, metástasis a distancia. Posteriormente, la clasificación original fue modificada puesto que la extensión del carcinoma de colon no podía valorarse por completo clínicamente en el momento de la intervención quirúrgica y se añadieron una serie de prefijos a la clasificación TNM para relacionarla con la extensión de la enfermedad en localizaciones y momentos dados. Se relacionan a continuación: cTNM, estadio diagnóstico clínico; sTNM, estadio de evaluación quirúrgica; pTNM, estadio patológico postquirúrgico; rTNM, estadio en retratamiento; y aTNM, estadio en autopsia. (Deans G T et al, 1992)<sup>107</sup>,( Estapé J, 1982)<sup>110</sup>. Esta clasificación TNM estadounidense ha sido considerada por muchos demasiado compleja para su uso habitual. A manera de resumen, diremos que el pronóstico de los pacientes con CCR depende de diversos factores clínicos, histopatológicos y biológicos. En relación a los primeros, es bien conocido que la perforación y la oclusión como manifestación inicial del tumor se asocian a un peor pronóstico. Por otro lado, el factor predictivo más determinante en cuanto a la supervivencia y recidiva, es el estadio tumoral, en el cual se tiene en cuenta la penetración en la pared del intestino, la afectación ganglionar y la presencia de metástasis a distancia.

El estadio del tumor se correlaciona con el pronóstico de los pacientes. Durante décadas se ha utilizado la clasificación de Dukes modificada por Astler y Coller (tabla 1) para el estadiaje del CCR. Actualmente se utiliza el sistema TNM de la International Union Against Cancer-UICC (tabla 2),(tabla 3).

<b>Estadio</b>	<b>Extensión</b>
A	Penetración limitada a la mucosa
B1	Penetración hasta la muscular propia
B2	Penetración hasta la capa serosa
C1	Igual que B1 más metástasis ganglionar
C2	Igual que B2 más metástasis ganglionar
D	Metástasis a distancia o invasión parietal de órganos adyacentes

Tabla 1. Clasificación de Dukes (modificada por Astler y Coller)

<b>Estadio 0</b> Tis N0 M0	Carcinoma in situ
<b>Estadio I</b> T1 N0 M0 T2 N0 M0	Tumor que invade la submucosa Tumor que invade la muscular propia
<b>Estadio IIA</b> T3 N0 M0 <b>Estadio IIB</b> T4a N0 M0 <b>Estadio IIC</b> T4b N0 M0	Tumor que atraviesa la muscular propia, e invade la subserosa, tejidos pericólicos, perirrectales no peritonizados Tumor que perfora el peritoneo visceral o que invade directamente otros órganos o estructuras
<b>Estadio IIIA</b> T1-2 N1 M0 T1-2 N2a M0 <b>Estadio IIIB</b> T3-4aN1 M0 T2-T3N2a M0 T1-T2 N2b M0 <b>Estadio IIIC</b> T4a N2a M0 T3-T4a N2b M0 T4b N1-N2 M0	<b>Cualquier grado de infiltración pared con metastasis ganglionar</b> 1-3 ganglios linfáticos regionales afectados 4 o más ganglios linfáticos regionales afectados Metástasis ganglionar linfática a lo largo de un tronco vascular
<b>Estadio IVA</b> T1-4 N0-3 M1a <b>Estadio IVB</b> T1-4 N0-3 M1b	<b>Cualquier grado de afectación parietal, con o sin afectación ganglionar, pero Con metástasis a distancia</b>

Tabla 2. Clasificación TNM del CCR (7ª ed; 2010)

Estadio TNM	Supervivencia a los 5 años
In situ	96 – 100%
I	96,8 – 97,4%
II	71,5 – 87,5%
III	87,6 – 47,6%
IV	< 5%

Tabla 3. Pronóstico de los pacientes con CCR en función del estadio TNM.

## **I. 10. FACTORES PRONÓSTICOS DEL CCR**

El estudio de los factores pronósticos mejora el conocimiento de la naturaleza de la enfermedad, ayuda a comprender su patogenia y a evaluar nuevas formas terapéuticas (Rifá J et al, 1992).

Existen dos grandes grupos de factores pronósticos: uno, formado por los factores pronósticos clínicos, que pueden ser obtenidos a través de la historia clínica o mediante la exploración del paciente, y una segunda categoría de variables pronósticas anatomopatológicas, que se establecen a partir del estudio de la biopsia o de la pieza de resección quirúrgica.

### **Clínicos**

Además de las características previamente comentadas asociadas a la raza, edad y sexo, la sintomatología con que se presenta la enfermedad, a menudo está relacionada con el estadio. La hemorragia o el cambio de ritmo intestinal suelen ser síntomas asociados con estadios más iniciales y por tanto, con mejor pronóstico, mientras que la anemia, la palpación de una masa abdominal o una perforación u oclusión intestinal, son síntomas que ocurren en estadios más avanzados.

Cuando el paciente está totalmente asintomático, como sucede en personas que son diagnosticadas en un programa de screening, el pronóstico es mejor que en los pacientes con síntomas, la supervivencia es de un 75% a 80%, mientras que para los pacientes sintomáticos es del 50% a los cinco años (Selby J et al, 1992).

### ***Hemorragia***

La hemorragia es un factor de buen pronóstico en la mayoría de trabajos que han analizado esta variable, si bien no es un factor pronóstico independiente de estadio (Steinberg et al, 1986).

### ***Obstrucción intestinal***

La obstrucción intestinal como primera manifestación de un cáncer de colon o recto es relativamente frecuente, y supone un factor de mal pronóstico. Las causas que explican este mal pronóstico son, entre otras, el estadio avanzado del tumor, la gran actividad peristáltica del intestino ocluido que facilita la diseminación tumoral, y una

mortalidad operatoria mayor del 15%. La mortalidad operatoria es menor en el colon izquierdo, pero llega a alcanzar cifras del 29% en el colon derecho (Kelley W E et al, 1981 y Dutton R W et al, 1976). Si el tumor obstructivo está situado en el colon derecho, el pronóstico es peor que en el colon izquierdo. Por otra parte los tumores obstructivos de colon derecho tienen una supervivencia tres veces menor que los tumores no obstructivos de la misma localización (Fitchtt C W et al, 1986). La perforación intestinal, que con frecuencia se asocia a la oclusión, también es una circunstancia que comporta un pronóstico muy desfavorable incluso independiente del estadio (Willet C et al, 1985).

### ***Intervalo entre el primer síntoma y el diagnóstico***

El retraso diagnóstico es un factor que puede condicionar el pronóstico. Se ha comprobado que los pacientes con un retraso largo (de aproximadamente 5-6 meses), tienen un mejor pronóstico que los enfermos con menor retraso (Pescaroti M et al, 1982). Este hecho, paradójico a primera vista, se cree que es debido a que los tumores con sintomatología de menos de 6 meses de evolución tienen una mayor mortalidad operatoria, una tasa de cirugía radical más baja, y además se asocian con síntomas de mal pronóstico como la obstrucción y perforación intestinal.

### ***Localización del tumor***

Los tumores localizados en el colon tienen mejor pronóstico que los tumores rectales. Dentro de las localizaciones colónicas, algunos estudios muestran un pronóstico más favorable para el colon derecho en relación al izquierdo (Halvorsen T B et al, 1987), sin embargo, otros autores demuestran lo contrario, con un pronóstico especialmente grave en los tumores de ciego. En los tumores de colon derecho hay una menor proporción de estadios Dukes A y un mayor número de estadios avanzados que en las otras localizaciones del colon (Alley P G et al, 1986), lo que explicaría su menor supervivencia a los 5 años.

Estos resultados discordantes podrían explicarse por la historia natural más larga de los tumores de colon izquierdo y sigma, en los que se han descrito recidivas y muertes más allá de los 5 años del diagnóstico, circunstancia que es más rara en los tumores de colon derecho y transversal.

### ***Variables clínicas preoperatorias***

En un estudio del *Medical Research Council* de Gran Bretaña (Medical Research Council, 1984), la movilidad del tumor al tacto digital o a la exploración endoscópica,

fue la variable preoperatoria más importante en los tumores de recto, seguida del número de cuadrantes afectados y que la distancia entre el tumor se localizara a menos de 8 cm. del esfínter.

### ***Tamaño del tumor***

En la mayoría de tumores malignos el tamaño tumoral está relacionado con el pronóstico y también ocurre así en el CCR, y especialmente en los tumores de colon existiendo una correlación entre el tamaño y el nivel de penetración tumoral en la pared del intestino; que como es sabido, tiene un importancia pronóstica considerable (Minsky B D et al, 1988).

Steinberg et al, en su estudio señalan que existe un incremento del riesgo de mortalidad del 7% por centímetro de longitud tumoral.

## **Anatomopatológicos**

### ***Morfología tumoral***

Los tumores exofíticos tienen un mejor pronóstico que los tumores anulares, ulcerados o desmoplásicos (Okuno M, 1987).

### ***Nivel de penetración del tumor en la pared del intestino***

Los pacientes con tumores en grado A de Dukes sobreviven más del 80% (80-95%) a los 5 años. Los del nivel B, solamente de un 40 a 60%, y el nivel C menos del 40% (Copeland E et al, 1968).

### ***Número de ganglios positivos***

La supervivencia se reduce progresivamente según el mayor número de ganglios afectados y en algunos estudios es un factor significativo para la supervivencia (Adloff M et al, 1990).

### ***Invasión de órganos vecinos***

La clasificación TNM, citada anteriormente, ha mostrado su utilidad pronóstica, en los diferentes subgrupos, con supervivencia a los 5 años del 91% para el estadio T1, 84% para el T2, 63% para los T3-T4, 56% para el N1, 38% para el N2, y 34% para el N3 (Hermaneck P et al, 1989 y Chapuis PH et al, 1986).

Nathanson SD et al, 1986 en un artículo de revisión llegan a la conclusión de que la clasificación de Dukes continúa siendo válida, si bien para mejorar su sensibilidad

pronóstica, deberían incluir el porcentaje de ganglios positivos, la presencia o ausencia de ulceración del tumor primario y la invasión de las estructuras vecinas. (Deans GT et al, 1992). En su estudio de factores pronósticos en el CCR concluyen que la clasificación de Dukes sigue siendo el mejor predictor de la supervivencia después de transcurrido más de 60 años.

### ***Histología***

El adenocarcinoma mucinoso o coloide tiene una tasa de recidivas superiores al adenocarcinoma puro y se diagnostica con mayor frecuencia en estadios Dukes C y con metástasis. La supervivencia de la variante mucinosa es menor que la del adenocarcinoma no mucinoso (Sasaki O et al, 1987 y Symonds D A et al, 1976), aunque existen discrepancias al respecto. Los estudios de (Halvorsen TB et al, 1988), sugieren que la presencia de componentes mucinosos probablemente no implican un peor pronóstico excepto cuando se trata de un carcinoma con células en *anillo de sello*.

### ***Grado de diferenciación***

Diversos estudios han puesto de manifiesto la importancia del grado histológico como variable pronóstica independiente en el CCR (Deans GT et al, 1992).

### ***Invasión vascular***

La invasión vascular reduce de forma significativa la supervivencia de los pacientes con CCR independientemente del estadio y el grado de diferenciación (Chapuis PH et al, 1986). Se ha observado una correlación entre la invasión vascular y la existencia de metástasis hepáticas y también con la invasión perineural. Algunos estudios muestran un peor pronóstico de la invasión intramural de los capilares por el tumor y otros, sin embargo, recogen que la invasión de las venas próximas al tumor tiene un efecto más ominoso (Crissman J D et al, 1989).

### **Biológicos**

Además de los mencionados factores clínicopatológicos, también existen otros que confieren pronóstico al CCR. Son los marcadores moleculares surgidos de la doble necesidad de: 1) identificar al grupo de pacientes de alto riesgo que cursará con recidiva postquirúrgica o progresión de la enfermedad - candidato por tanto a beneficiarse de los tratamientos complementarios a la cirugía -; y 2) seleccionar el tipo de terapia adyuvante que requieren los pacientes con enfermedad avanzada. Entre los

marcadores susceptibles de formar parte de un hipotético panel de pronóstico del CCR, y por tanto capaces de predecir la evolución de la neoplasia y respuesta al tratamiento, destacan: la proliferación, la timidilato sintasa, el antígeno carcinoembrionario, la p53, las alteraciones en el cromosoma 18q y la inestabilidad de microsatélites.

### **Determinantes genéticos**

La pérdida de heterocigosidad de los cromosomas 17p, 18q y 22q es detectada con más frecuencia en carcinomas avanzados que en carcinomas intramucosos, y LOH de 17p está significativamente correlacionado con la invasión vascular y LOH 18q está correlacionado con la invasión linfática y metastásica (Iino H et al, 1994).

Los errores en la replicación del ADN se asocian a crecimiento exofítico, mayor tamaño, pobre diferenciación, producción extracelular de mucina, reacción linfoide tipo Crohn, y mayor expresión del gen p53 por inmunohistoquímica (Kim H et al, 1994).

### **Ploidía**

La aneuploidía o descompensación anómala del contenido cromosómico celular, ha estado recientemente señalada como un fenómeno causante de la inestabilidad genética, y asociada por tanto, a la heterogeneidad cariotípica del fenotipo canceroso (Duesberg P et al, 1998). Es más, las posteriores evidencias han permitido afirmar que la mayor parte de tumores en estadio avanzado son aneuploides (Armitage NC et al, 1985; Quirke P et al, 1987; Crissman JD et al, 1989). En lo referente al CCR, desgraciadamente cerca de un 90% de los tumores son aneuploides, resultando cuestionable el significado pronóstico de este fenómeno (Steinbeck RG et al, 1993).

### **Apoptosis**

Entre todos los potenciales marcadores predictivos que se conocen en la actualidad, el gen *p53* ha sido uno de los más ampliamente estudiados. Aunque los datos varían según los distintos autores, se detectan alteraciones de *p53* hasta en el 60% de los adenocarcinomas de colon y recto (Velculescu V et al, 1996 y Steele JR et al, 1998). En condiciones normales, la proteína codificada por este gen, la proteína p53, es un factor de transcripción que desempeña un papel muy importante en la regulación del ciclo celular y en la muerte celular programada o apoptosis (Mc Dermott U et al, 2002). Cuando existe una mutación del gen se produce una proteína estructuralmente anormal, no funcionante, que se acumula en la célula y es fácilmente detectable por técnica inmunohistoquímica (Díez et al, 2004).

### **Proliferación**

En cuanto a la actividad proliferativa, como en cualquier tumor, el alto índice se asocia a una mayor agresividad biológica. Este estudio puede abordarse con distintas metodologías. Por un lado, mediante técnicas como la citometría de flujo, que permite detectar el índice proliferativo, así como el porcentaje de células tumorales con contenido de DNA que corresponde a la fase S de síntesis del ciclo celular ( Koss LG et al, 1989). Más vigentes se encuentran las aproximaciones inmunohistoquímicas basadas en el marcaje pasivo de anticuerpos específicos contra proteínas que intervienen en el ciclo celular. De todas ellas, la de mayor impacto ha sido la Ki67, un antígeno nuclear humano de naturaleza no histónica, presente en todas las células con actividad proliferativa y ausente en las que no lo están (Gerdes J et al, 1993). Con la aparición del anticuerpo monoclonal MIB-1, capaz de detectar el antígeno en tejido fijado en formol e incluido en parafina, la ki67 se ha convertido en una herramienta de utilidad práctica. Permitiendo efectuar numerosos estudios retrospectivos (McCormick D et al, 1993).

Debemos mencionar que actualmente con el advenimiento de nuevos marcadores, existe cierta tendencia a restar importancia al Ki67 como marcador pronóstico de los tumores colorrectales primarios.

### **Timidilato sintasa**

La timidilato sintasa es una enzima imprescindible para la síntesis de DNA, ya que constituye la única fuente de suministro celular de timidilato. Tiene actividad máxima en los estadios avanzados de la fase G1 y al principio de la fase S del ciclo celular, y superior en las células de proliferación rápida que en las que no se dividen. Se ha descrito que la timidilato sintasa es capaz de mediar el efecto citotóxico de algunos agentes quimioterápicos como las fluoropirimidinas y, en especial, del 5 fluoruracilo. Este – como inhibidor competitivo de la timidilato sintasa que es, y en condiciones normales -, regula negativamente la producción de timidilato, y consecuentemente, reduce la síntesis de DNA (Santi DV et al, 1974). Resulta, que el aumento de expresión de la timidilato sintasa - como en consecuencia de la amplificación del propio gen - se ha relacionado con la resistencia al tratamiento con 5 fluoruracilo (Clark JL et al, 1987; Copur S et al, 1995). Hay estudios que sugieren que los pacientes con tumores que expresan niveles bajos de timidilato sintasa pueden beneficiarse de la terapia convencional con fluoropirimidinas, mientras que para aquellos tumores con alta expresión de la misma, hay opciones terapéuticas más adecuadas, como por ejemplo el irinotecan (Leichman CG, 1998). De tal manera, todo parece indicar que la timidilato sintasa intratumoral constituye un buen marcador de respuesta al 5-fluoruracilo. La cuantificación enzimática puede realizarse mediante RT-



PCR cuantitativa (transcripción inversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa), si se dispone de material congelado (Lenz HJ et al, 1998). O bien por inmunohistoquímica, que se puede realizar en tejido fijado en formol e incluido en parafina (Aschele C et al, 1999).

### **Antígeno carcinoembrionario (CEA)**

Estudios realizados por inmunohistoquímica revelan que, algunas veces, ganglios procedentes de una resección colorrectal, aparentemente negativos, contienen pequeñas cantidades de tumor (Cutait R et al, 1991). Aún así, no queda claro cual es la trascendencia de este hecho actualmente, ya que existen avances técnicos que permiten realizar la detección de micrometástasis a nivel molecular. El CEA puede considerarse en este sentido, un buen marcador ya que está presente en la mayoría de los tumores colorrectales y no en el tejido normal. (Shively JE y Beaty JD , 1985). Se han desarrollado ensayos de RT-PCR para detectar su mRNA, que resultan eficaces para localizar micrometástasis en ganglios de pacientes con CCR (Mori M et al, 1995). Así, debido a que sabemos que los tumores en estadio II con micrometástasis tienen mayor tendencia a recidivar que los que no la tienen, el hallazgo de CEA en estos casos permite definir el subgrupo de pacientes que pueden beneficiarse de la terapia adyuvante (Liefers GJ et al, 1998).

## **I. 11. TRATAMIENTO**

### **Tratamiento primario**

Sin duda, la opción terapéutica más adecuada para el CCR es la cirugía radical con finalidad curativa, que puede practicarse en el 80 – 90% de los pacientes: Antes de la intervención se ha de llevar a cabo un estudio de la extensión completa para revelar las posibles metástasis, si es que las hay. Es aconsejable también realizar una colonoscopia total para identificar otras posibles neoplasias y/o pólipos sincrónicos que pudieran estar presentes. En el caso de encontrar metástasis, el tratamiento quirúrgico sigue siendo válido. Después de la intervención, el paciente debe someterse a exploraciones físicas de control y a análisis bioquímicos periódicos ( Winawer SJ et al, 1996 ).

La cirugía también está indicada en pacientes en quienes después de haber extirpado el tumor primario, presentan recurrencia local o metástasis resecables. Aún en los casos en los que la curación completa no es posible, la opción quirúrgica se practica con la finalidad paliativa de controlar los síntomas (Sigurdson ER, 1995).

## **Terapia adyuvante**

### ***Quimioterapia***

Que una parte importante de los pacientes sometidos a cirugía con intención curativa, murieran a causa de la enfermedad metastásica, fue un hecho de rápida asimilación. En los años cincuentas, con la finalidad de mejorar el periodo libre de enfermedad y la tasa de supervivencia global, se llevaron a cabo los primeros ensayos clínicos utilizando terapia sistémica adyuvante. Entre los agentes quimioterápicos, que en aquel entonces estaban al alcance, hay que destacar el 5-fluoruracilo (Dwight RW et al, 1969; Ben Josef E y Court WS, 1995). De hecho, este continúa siendo hoy por hoy el agente quimioterápico más utilizado, sea solo o combinado con otros fármacos.

En los últimos años se han desarrollado nuevos agentes quimioterápicos destinados a mejorar la eficacia de los primeros. Así, como alternativa al 5-fluoruracilo en pacientes con metástasis refractarias, se administra el irinotecan, conocido también como CPT-11 (Fukuoka M et al, 1990). Parece que este, en comparación al 5-fluoruracilo, mejora significativamente no solo la supervivencia de los pacientes sino también su calidad de vida, dejando a un lado la diarrea que, como efecto secundario inevitable, puede ocasionar. También se ha experimentado con oxaliplatino, un agente de tipo diamino-clorhexano que actúa intercalando las cadenas de DNA ( Wiseman LR et al, 1999). Su eficacia en este caso, se ha demostrado en pacientes con enfermedad avanzada, principalmente asociado a 5-fluoruracilo y leucovorina ( De Gramont A, et al, 1997; Andre T et al, 1998).

Después de más de cuatro décadas de experiencia, todo parece demostrar que el tratamiento quimioterápico mas eficaz para el CCR es el 5-fluoruracilo. A pesar de todo, se siguen desarrollando nuevos fármacos que constituyen futuras opciones terapéuticas. Así, los ensayos clínicos vigentes permitirán, a mediano plazo, cuales de estos agentes o combinaciones de ellos serán considerados los mejores candidatos para el tratamiento del cáncer de colon avanzado. Los coctels parecen mantener la eficacia de los antiguos regímenes al mismo tiempo que disminuyen la toxicidad, mejorando la calidad de vida de los pacientes así tratados.

### ***Radioterapia***

A pesar de que la radioterapia no es eficaz como tratamiento primario del CCR, si está indicada en casos específicos de afectación local. De forma preoperatoria, lo está en neoplasias grandes de recto, potencialmente no resecables, ya que pueden reducirse lo suficiente para permitir su extirpación quirúrgica (Gastrointestinal Tumor Study Group, 1984). A propósito, podemos mencionar, como avance remarcable dentro de

esta modalidad de tratamiento, la radioterapia tridimensional, que disminuye la exposición a la radiación de los tejidos no afectados por la neoplasia (Tait DM et al, 1997). También, en lo referente al tratamiento postoperatorio de recidivas locales, puede emplearse la radioterapia adyuvante locoregional (Willett CG et al, 1993).

Otra modalidad de radioterapia es la pélvica, pre, intra o postquirúrgica, indicada en pacientes con tumores irresecables y/o en estadio avanzado, ya que parece disminuir la probabilidad de recidiva local, pero no mejoran la supervivencia. Su limitación, es elevada dosis de radiación necesaria para garantizar el control local, que excede en muchos casos los niveles máximos de tolerancia de los tejidos adyacentes. En estos casos el tratamiento combinado con quimioterapia sistémica (por ejemplo, 5-fluoruracilo) aumenta la efectividad. Por tanto, esto favorece el efecto biológico de la radiación ( Skibber JM et al, 2001 ).

### ***Terapia génica***

La terapia génica se ha convertido en los últimos años en una verdadera modalidad de tratamiento en algunos cánceres. En lo referente a la neoplasia colorrectal, en los Estados Unidos, desde mediados de 1998, se llevan a cabo algunos ensayos clínicos basados en la terapia génica. A grandes rasgos, las estrategias empleadas pueden dividirse en tres categorías: 1) Los sistemas diseñados para la administración de enzimas y de profármacos; 2) la terapia génica de sustitución del gen supresor tumoral p53; y 3) la terapia inmunogénica, basada en la expresión de antígenos tumorales o citoquinas que inducen inmunidad tumoral ( Zwacka RM y Dunlop MG, 1998).

## **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL CCR**

Todos los estudios de los que se disponen, permiten afirmar que la gran mayoría de cánceres de colon surgen de pólipos neoplásicos preexistentes. El riesgo de desarrollar un adenocarcinoma, no es debido a la existencia de los pólipos en si, sino a la probabilidad de que estos se transformen. También se ha señalado que el proceso de progresión tumoral es multifásico (secuencia adenoma adenocarcinoma), y que puede tardar años o incluso décadas para completarlo (Gryfe R et al, 1997).

En los últimos años se han producido importantes avances en el conocimiento de estos mecanismos moleculares, producto del análisis de los dos tipos fundamentales de CCR heredofamiliares: la poliposis colónica familiar (FAP) y el síndrome de Lynch o CCR no hereditario no asociado a poliposis (HNPCC).

## **CRECIMIENTO, INVASIVIDAD Y DISEMINACIÓN TUMORAL**

El CCR presenta cuatro vías clásicas de crecimiento y diseminación: 1) la extensión local, 2) la diseminación por vía linfática, 3) la diseminación hematológica y 4) la implantación.

En la extensión local, el tumor crece hacia la luz o bien extramuralmente. Otra forma de crecimiento local, es la invasión perineural que explica el dolor que refieren algunos pacientes.

La diseminación a través de la vía linfática se produce de forma escalonada y depende de la localización de la tumoración. Los tumores rectales dan metástasis primariamente a nivel de los ganglios perirectales y posteriormente a los hemorroidales. La vía normal de diseminación de los tumores de colon se realiza de forma escalonada a través de los ganglios pericólicos, intermedios, y finalmente, de los ganglios principales situados en la raíz de los vasos mesentéricos, pasando luego a los ganglios periaórticos.

Las metástasis por vía hematológica afectan prácticamente siempre al hígado, siendo la localización pulmonar la segunda en orden de frecuencia. El recto presenta un drenaje venoso especial: las venas hemorroidales superiores que drenan al sistema porta y por tanto hacia el hígado y las venas hemorroidales inferiores que drenan hacia la cava y por tanto la sangre que proceda de las mismas alcanza los pulmones sin pasar por el filtro hepático. Existe una tercera vía de drenaje a nivel rectal que se realiza a través de un plexo venoso **4EBP1**

La familia de proteínas kinasas median la respuesta de las células eucariotas a los estímulos externos mediante la fosforilación de hidroxiaminoácidos (Hanks et al, 1988). Existen unas 500 kinasas diferentes que se agrupan en unas 20 familias en base a semejanzas estructurales. Regulan funciones celulares, incluyendo el ciclo celular, metabolismo, movilidad, respuesta al microambiente, reparación del daño del DNA, y la decisión entre supervivencia o apoptosis (Dancey J. y Sausville EA, 2003). Las kinasas como MAPK (Mitogen Activated Protein kinase), PI3K (Phosphoinositide-3 Kinase) y Akt (Protein kinase B) se activan con frecuencia en células cancerígenas, promoviendo la proliferación celular y la tumorigénesis.

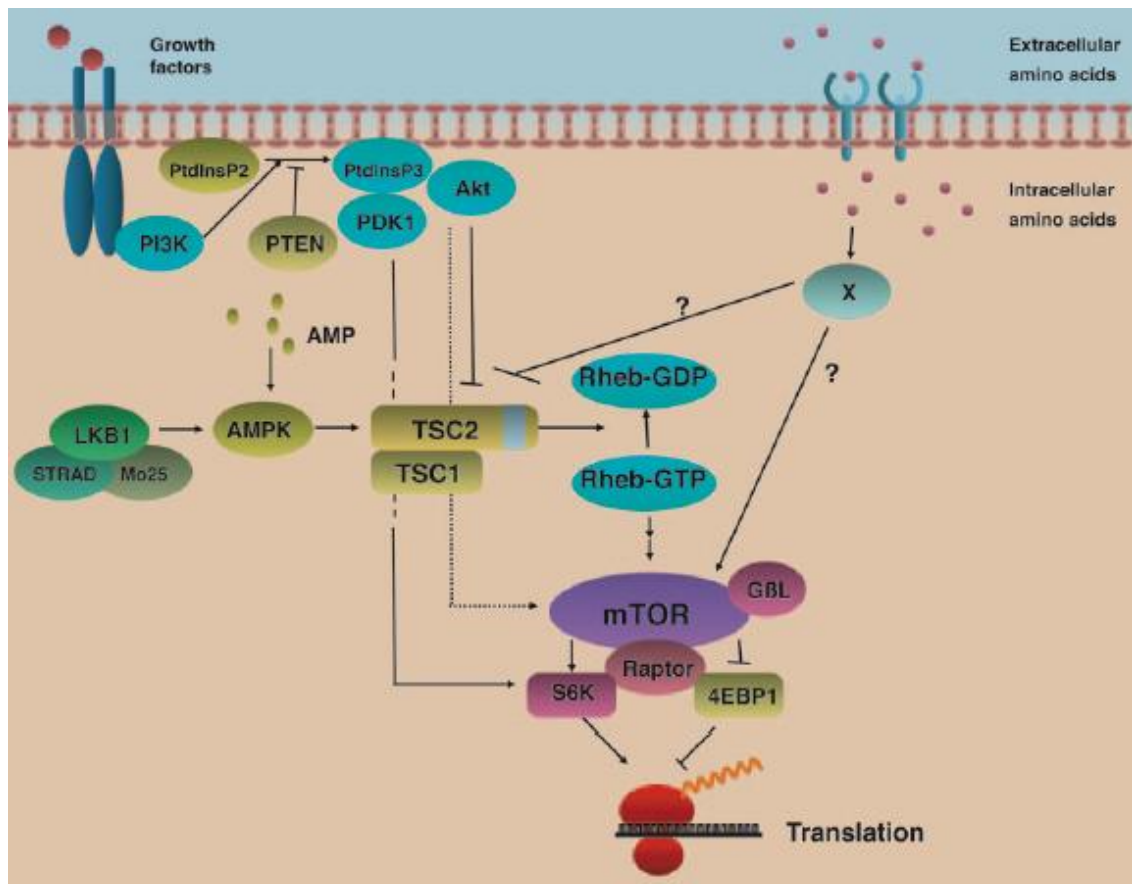
Desde el importante descubrimiento de la quinasa, STI 571 (mesilato de imatinib; Gleevec), un inhibidor del dominio Bcr-Abl tirosin quinasa (Melo J. y Barnes DJ, 2004), se han desarrollado varios inhibidores de kinasas.

Se ha centrado la atención en mTOR (mammalian target of rapamycin) como una vía atractiva para el desarrollo de fármacos, ya que algunos agentes que actúan sobre ésta pueden inhibir la proliferación e invertir la represión de la apoptosis y la resistencia a la terapia citotóxica en las células del cáncer (Janus et al, 2005)

### mTOR QUINASA: ESTRUCTURA, ACTIVACIÓN Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN.

La vía de mTOR empieza en la membrana celular (Fig.1). La activación de los congéneres de los receptores tirosin quinasa es mediada por factores de crecimiento que promueven el reclutamiento de la kinasa lipídica PI3K (phosphatidylinositol 3-kinasa) a la membrana celular (Fig 1). PI3K convierte PIP2 en PIP3 (phosphatidylinositol-3, 4, 5-trifosfato), que es activamente opuesto por su fosfatasa, PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten). PIP3 recluta PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1 ) y AKT a la membrana. PDK1 activa AKT en la posición Thr308 (Vivanco I y Sawyers CL, 2002). Una vez activado, AKT fosforila una miríada de proteínas, dando como resultado un incremento en la supervivencia celular, proliferación, crecimiento y metabolismo. La fosforilación de mTOR por AKT ocurre a través de la inactivación del complejo de la esclerosis tuberosa (TSC).

Fig 1



Aunque mTOR tiene varias funciones, la regulación de la traducción es lo más estudiado en el campo de la oncogenesis.

La síntesis proteica es regulada por la fosforilación de dos sustratos mTor: la quinasa ribosomal S6 (S6K) y el factor eucariótico 1 unido a la proteína 4E (4EBP-1).

S6K fosforila a la proteína ribosomal S6, dando por resultado la traducción de mRNAs que contienen zonas específicas de oligopirimidina, designadas como zonas terminales de oligopirimidina (TOPs), dentro de su región sin traducir 5' (UTR); estos mRNAs, de forma alterna, codifican las proteínas esenciales para la biogénesis ribosomal, incluyendo el eIF-4G (eukaryotic initiation factor-4G), el eEF-1A (eukaryotic initiation factor -1A) y el eEF-2, incrementando la maquinaria de transducción de la célula.

El segundo regulador de traducción diana de mTOR es 4EBP-1, que actúa como un represor de la traducción, uniéndose e inhibiendo al factor eucariótico iniciador de la traducción (eIF-4F). El eIF-4E se une a la estructura contenedora del casquillo de mGTP del mRNA situado en la UTR 5', y, posteriormente, este complejo interactúa con eIF-4G -- el complejo resultante se llama eIF-4F. Las señales mediadas por mTOR hacen que 4EBP-1 se vuelva altamente fosforilado y se disocie de eIF-4E, conduciendo la traducción mRNAs 5' del casquillo, que incluye varias proteínas oncogénicas: FGF (fibroblast growth factor), c-Myc, VEGF (vascular endothelial growth factor) y ciclina D1 (Bjornsti MA y Houghton PJ, 2004). Datos recientes señalan que eIF-4E desempeña un papel en la supresión de la apoptosis (Ruggero D et al, 2004 y Wendel HG et al, 2004).

## **PAPEL DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN mTOR EN LA TUMOROGENESIS**

La vía mTor desempeña un papel esencial en el crecimiento tumoral. Se han detectado en células malignas numerosas alteraciones antes y después de mTOR, incluyendo la amplificación de la subunidad catalítica p110 de PI3K, la pérdida de PTEN, la amplificación de AKT2, mutaciones de TSC1 o de TSC2 y sobreexpresión o amplificación del eIF4E o de S6K1.

PI3K y Akt se consideran protooncogenes cuya función es regulada "más abajo" en la vía mTOR por un gen supresor tumoral, PTEN, cuyas mutaciones están entre las mutaciones somáticas más frecuentes y conocidas de los cánceres humanos. En la mayoría de los glioblastomas (el 70%) se ha encontrado mutaciones de PTEN. Las mutaciones somáticas de PTEN también ocurren en piel, cánceres de la próstata y de tiroides, melanomas, y cáncer de pulmón de célula pequeña. Estudios recientes

demuestran que PTEN puede inhibir la migración de células a través de su dominio C2, un efecto independiente de su actividad de fosfatasa lipídica y dependiente de la actividad fosfatasa proteica. La fosfatasa proteica es responsable de la desfosforilación de treonina 383, un residuo de PTEN necesario para retardar la migración de la célula (Raftopoulou M et al, 2004).

La sobreexpresión de Akt ocurre con frecuencia durante la carcinogénesis colónica. Un 57% de cánceres colorrectales muestran expresión significativa de Akt. Akt también se detectó en más de la mitad de los adenomas estudiados, implicando sobreexpresión de este protooncogen como acontecimiento temprano durante la carcinogénesis del colon (Royl HK et al, 2002). En estudios de respuesta a diversos agentes quimioterápicos usados en primera línea en células derivadas de cánceres de pulmón de célula no pequeña, Akt ha demostrado que confiere quimiorresistencia por vía de la inhibición de la apoptosis (David O et al, 2004). En cáncer de mama, la sobreexpresión de ErbB2 se asocia a la activación de Akt. Datos experimentales demuestran que la desactivación de Akt sensibiliza las células cancerígenas a las drogas citotóxicas y a la radioterapia (Zhou X et al, 2004).

Falta por determinar si las propiedades antitumorales atribuidas a la inhibición de mTOR dependen de un efecto citostático directo sobre las células endoteliales, de citotoxicidad directa contra la proliferación celular tumoral, o de la inhibición de los factores angiogénicos (Bjornsti MA y Houghton PJ, 2004).

Los componentes de la vía de eIF4E situados “más abajo” en la vía de mTOR están alterados en muchos cánceres. Varios estudios implican al eIF4E en la formación y desarrollo de los tumores. La sobreexpresión de eIF4E conduce al crecimiento desregularizado y a la transformación maligna de una variedad de cultivos celulares. Se han detectado niveles elevados de eIF4E en tumores sólidos, especialmente en mama, colon, y en cabeza y cuello (De Benedetti A y Harris AL, 1999). También se ha encontrado que la expresión de 4EBP1 se asocia a peor pronóstico en algunos tumores humanos, como los de mama, colon, ovario y próstata. También se ha encontrado expresión de 4EBP1 asociado con la quimiorresistencia en cáncer de ovario. (Armengol G. et al, 2007).

Estudios clínicos indican que la amplificación del gen de eIF4E y la sobreexpresión de la proteína están asociadas al desarrollo maligno de estos tumores (De Benedetti A y Graff JR, 2004). Además, niveles altos de eIF4E se asocian a un índice más alto de recidiva y muerte por cáncer. Para otros autores (Jiang H et al, 2003), al contrario que eIF4E, la sobreexpresión de 4EBP inhibe la proliferación celular y los niveles de

expresión de 4EBP-1 se correlacionan de manera inversa con la progresión de algunos tumores (Jiang H et al, 2003).

En resumen, el acoplamiento de la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento es esencial para todos los organismos. mTOR, es un regulador central del crecimiento y el metabolismo celular en los eucariotas. mTOR activa el crecimiento celular en respuesta a nutrientes (aminoácidos), factores de crecimiento (insulina e insulina-como factor de crecimiento) y el estado de energía celular (ATP). La quinasa central mTOR está presente en dos complejos multiproteicos funcionalmente y estructuralmente distintos, denominados complejo TOR 1 (TORC1) y complejo TOR 2 (TORC2).

En los mamíferos, en contraste con mTORC1, mTORC2 no es directamente inhibido por la rapamicina. En la última década mTORC1 ha sido reconocido en el control de muchos procesos celulares que determinan en última instancia el crecimiento de células, incluyendo: la síntesis de proteínas, la biogénesis de los ribosomas, el transporte de nutrientes y la autofagia. Los dos sustratos mejor caracterizados de mTORC1 son S6 quinasa (S6K) y 4E-BP1, a través de cuyas vías mTORC1 controla la síntesis de proteínas. La fosforilación de 4E-BP1 por mTORC1 resulta en su disociación de eIF4E, promoviendo el ensamblaje del complejo eIF4F para permitir la iniciación adecuada. La fosforilación de S6K1 promueve la síntesis de proteínas y el crecimiento celular presuntamente mediante la fosforilación de múltiples sustratos (por ejemplo, proteína ribosomal S6). En este sentido, S6K mejora la capacidad global de la traducción de las células (Crystal S. et al, 2011).

vertebral y las metástasis por esta vía se localizan en sacro-coxis, pelvis y columna vertebral.

La implantación es un sistema de metástasis en el cual existe una liberación de células tumorales viables que se depositan en otra superficie. Puede ser intraluminal al desprenderse células de la superficie externa del tumor al interior de la luz y anidar en otro punto de la superficie intestinal. Si el desprendimiento de células se produce desde la superficie serosa del tumor la implantación se hará a nivel de la cavidad peritoneal (carcinomatosis peritoneal).

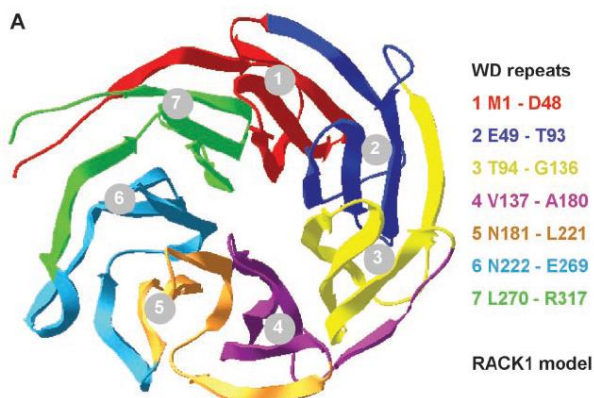
Finalmente pueden desprenderse células tumorales durante la manipulación quirúrgica del tumor y pueden producirse implantes a nivel de la herida quirúrgica, en los márgenes mucocutáneos de una colostomía y en cualquier punto de campo operatorio (Bassa A et al, 1992).



## RACK 1

El receptor de la quinasa C activada 1 (RACK1) es un miembro de la familia de proteínas de repetición triptófano-aspartato (WD-repetición) y comparte homología significativa con la subunidad B de las proteínas G (Gb). RACK1 adopta una estructura helicoidal de siete aspas que facilita la unión a proteínas. RACK1 juega un papel importante en el transporte de proteínas alrededor de la célula, en el anclaje de proteínas en localizaciones específicas y en la estabilización de la actividad proteica. Interactúa con la maquinaria ribosómica, con varios receptores de la superficie celular y con las proteínas nucleares. Es por ello que RACK1 es un mediador clave de las diversas vías y contribuye a numerosos aspectos de la función celular. (Adams et al, 2011)

RACK-1 tiene siete repeticiones WD (Fig. 1), e interactúa con la isoforma  $\beta 1$  de la proteína quinasa C (PKC) en presencia de fosfatidilserina, diacilglicerol y calcio. Originalmente se describió como una proteína de anclaje para PKC (Ron D et al, 1994). RACK1 se asocia a PKC $\beta 1$  activada y contribuye a su localización en la membrana celular (Mochly-Rosen et al, 1995). La unión de RACK1 a PKC $\beta 1$  es dosis dependiente y se produce fuera de la región catalítica, indicando que RACK1 no es un sustrato de PKC. La función de RACK1, va más allá de su asociación a PKC, y juega un papel de proteína adaptadora en otros procesos de señalización, interactuando con el protooncogen c-Src (Chang et al, 2001 y Chang et al, 1998).



**Fig.1**

Debido a su habilidad para coordinar la interacción de moléculas clave en la señalización, RACK1 juega un papel central en las respuestas biológicas críticas, como el crecimiento celular (McCahill A et al 2002), y se expresa simultáneamente en tejidos de mamíferos superiores y humanos (Guillemot F et al 1989), como el cerebro,

hígado, y bazo, sugiriendo que tiene un papel funcional importante en casi todas las células (Chou YC et al, 1999).

Se ha descrito que RACK1 interactúa con muchas moléculas de señalización (McCahill et al, 2002). Un estudio masivo con espectroscopia ha demostrado que RACK1 es parte de una pequeña subunidad ribosomal ( Link AJ et al, 1999) y un estudio con microscopía crioelectrónica lo sitúa al frente de una pequeña subunidad ribosomal, en las inmediaciones del sitio de salida del mRNA (Sengupta J et al, 2004). RACK1 integra señales procedentes de distintas vías de señalización, actuando como proteína de andamio en diversos procesos de señalización.

Las moléculas de señalización que se unen a RACK1 se clasifican en dos grupos principales: proteínas solubles de señalización y dominios citosólicos de receptores transmembrana. (McCahill A et al 2002) RACK1 sirve como un receptor ( $PKC\beta$ ) de proteína quinasa activada  $C\beta$  y de otras isoformas de PKC, incluyendo  $PKC\delta$  (Rosdahl JA et al, 2002) y  $PKC\mu$  (Hermanto U, et al 2002). La unión de RACK1 a PKC conduce al incremento en la actividad quinasa (Ron D et al, 1994), y RACK1 se cree que traslada PKC activada a su localización celular correcta. RACK1 también interactúa con la quinasa Src, la cual está involucrada en el crecimiento y adhesión celular. Contrariamente a su efecto sobre PKC, RACK1 mayoritariamente inhibe la actividad quinasa de Src, aunque algunos sustratos de Src aún no caracterizados parecen ser fosforilados a una mayor actividad en presencia de RACK1 (Chang BY et al, 1998) .

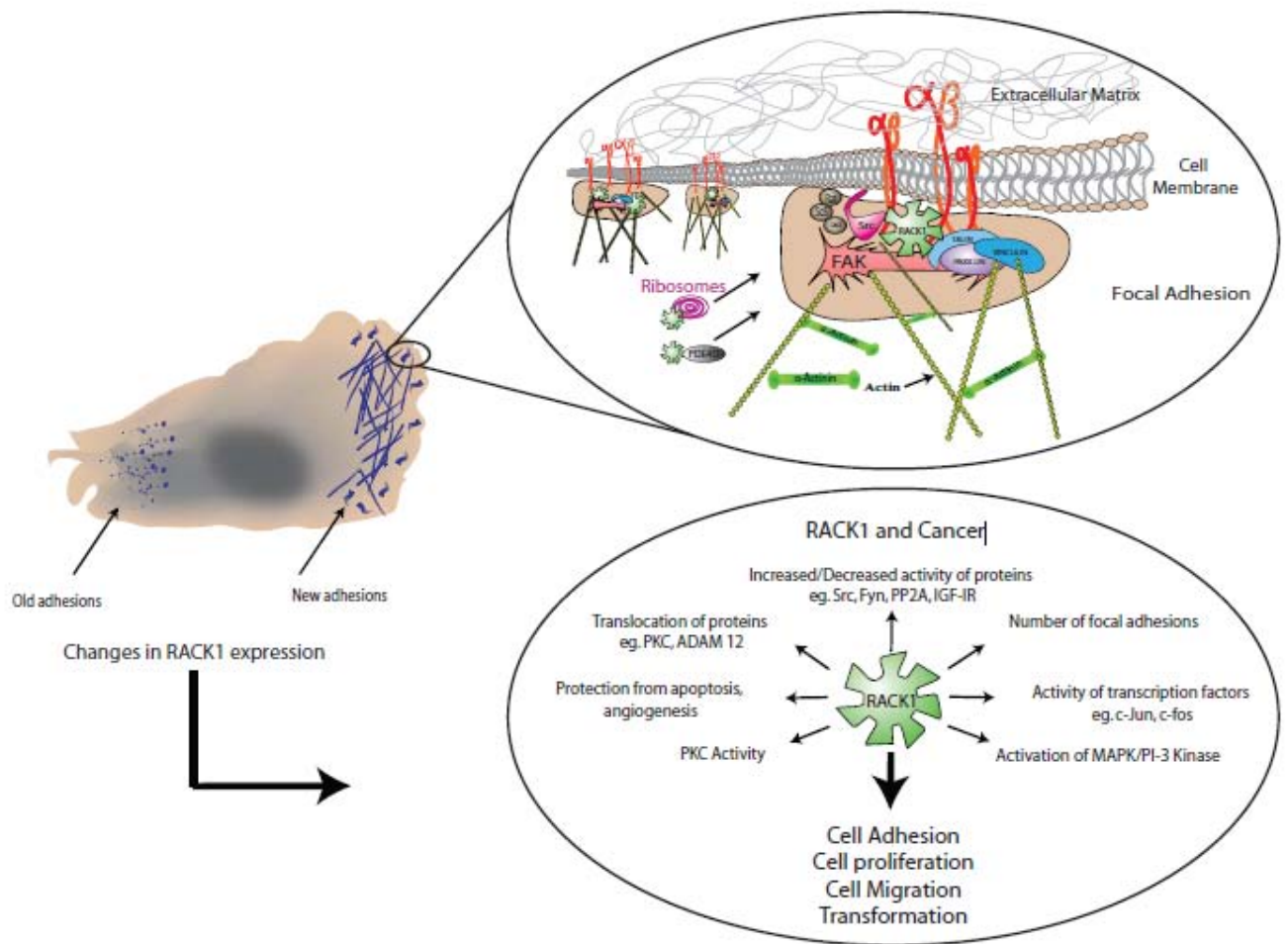
Un ejemplo de un receptor transmembrana que se une a RACK1 es el dominio citoplasmático de la subunidad  $\beta$  del receptor de la integrina (subtipos  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  y  $\beta 5$ ) (Liliental J y Chang DD, 1998; Buensuceso CS et al, 2001). El receptor de la integrina entra en contacto con la matriz extracelular y juega un papel importante en el establecimiento de adherencias focales. Interactuando con RACK1 solamente después de la activación de PKC. (Liliental J y Chang DD, 1998).

En mamíferos, RACK1 regula varios procesos que implican el contacto con la matriz extracelular: la diseminación celular, el establecimiento de adhesiones focales y los contactos intercelulares.

La depleción de RACK1 por RNA contrasentido en fibroblastos de ratón, previene la diseminación celular y reduce el número de adhesiones focales, lo que indica que RACK1 es un regulador positivo de estos procesos (Hermanto U et al, 2002). RACK1 tiene un papel importante en la coordinación de los acontecimientos que controlan el contacto con la matriz extracelular a través del reclutamiento de PKC y de Src al receptor de la integrina.

Algunos estudios han demostrado que la asociación entre RACK1 y dos componentes importantes en la adhesión focal, talina y vinculina, es regulada por el estado de adhesión de la célula. En células en suspensión, RACK1 interactúa con más fuerza con talina, mientras que en las células acopladas, RACK1 se une con más fuerza a vinculina (de Hoog CL et al, 2004). Estudios con inmunofluorescencia en etapas tempranas de la diseminación muestran coexistencia de RACK1 y de vinculina en estructuras que se conocen como centros iniciadores de la diseminación, aunque RACK1 no fue detectado en adhesiones focales maduras. Los centros iniciadores de la diseminación contienen varias proteínas de unión de RNA y RNA ribosomal, siendo compatible con estudios que demuestran la presencia de RNA en los sitios de acoplamiento (Chicurel ME et al, 1998), indicando que la traducción puede ser requerida en etapas tempranas en el establecimiento de adhesiones focales, aunque el mecanismo por el cual se localizan los componentes de la traducción sigue sin ser elucidado.

El papel de RACK1 como una “proteína de andamio” es claramente evidente durante la migración celular. La migración celular es fundamental, es el proceso necesario para el desarrollo embrionario, la cicatrización de las heridas, las respuestas inmunitarias y para los componentes de la migración celular. El fracaso de las células para migrar, o su migración hacia el lugar equivocado tiene serias consecuencias para la vida, como el desarrollo defectuoso del cerebro o un mal funcionamiento del sistema inmunológico que conlleva a la materialización del cáncer. La comprensión de la migración de las células es un desafío considerable, ya que resulta de la actividad coordinada de varios componentes intra y extracelulares. Estos procesos incluyen varias vías de señalización y requieren una bien orquestada comunicación entre los receptores de la superficie celular y los elementos del citoesqueleto de la célula. RACK1 es esencial para la migración celular, y la unión de proteínas a muchos de los componentes de la maquinaria de migración celular, que incluye las quinasas, fosfatasas y los dominios citoplasmáticos de los receptores de la superficie celular. La interacción de RACK1 con integrinas B1 y B2, y Src regula la adhesión y la diseminación celular. Se ha descrito que RACK1 se une a componentes del citoesqueleto. Las adhesiones focales se realizan mediante un componente mecánico y otro componente de señalización celular. Estas adhesiones son el vínculo entre la célula y la matriz extracelular, que se forman después de que las integrinas se agrupan en la superficie celular. (Subauste C et al, 2011).



Muchas publicaciones indican que RACK1 desempeña una importante función en la progresión tumoral y que su expresión está alterada durante la angiogénesis y en muchos cánceres humanos. En concreto, se está evaluando la expresión RACK1 como un indicador de pronóstico en el cáncer de mama, donde el aumento de la expresión de RACK1 está fuertemente relacionada con el estadio clínico avanzado. En adenocarcinomas pulmonares, el aumento de la expresión de RACK1 se asocia con el estadio patológico y con el tamaño del tumor por lo que también es un potencial marcador de pronóstico. Por el contrario, algunos informes sugieren que la expresión de RACK1 está disminuida en el cáncer de mama. Además, RACK1 puede proteger células de la apoptosis en cáncer de mama. También está implicado como un component clave en el cáncer de ovario , cáncer de próstata y en los cánceres causados por patógenos como el virus del papiloma humano 16 y Helicobacter pylori. (Adams et all, 2011).

## p53

El gen TP53, localizado en el cromosoma 17p, es un importante gen supresor tumoral que codifica una fosfoproteína nuclear p53 de 53 kDa. Esta proteína forma homodímeros que al unirse dan lugar a tetrámeros, ligando secuencias específicas de DNA de doble hebra. Su función está relacionada con la inhibición de la progresión del ciclo celular en fase G1 y con la apoptosis (Lane, 1992). Mutaciones puntuales en uno de los alelos del gen TP53 originan proteínas alteradas que, unidas a la proteína normal codificada por el alelo no mutante, la inactivan (Hollstein et al, 1991; Volgestein i Kinzler, 1992). Este efecto, llamado *efecto dominante negativo*, confiere a la clona celular derivada una ventaja proliferativa. La p53 también puede actuar como un verdadero supresor y la mutación se acompaña de la pérdida concomitante del alelo y el tumor progresa por falta de supresión del crecimiento celular.

### **Actividad biológica de la proteína p53**

La función que desarrolla p53 en condiciones normales –entendiendo por normalidad la ausencia de daño genómico–, es la de regular la proliferación celular. En su conformación tetramérica es capaz de unirse a secuencias específicas de DNA, estimulando la expresión de genes distales del ciclo celular que inhiben el crecimiento (Stenger et al, 1992; Volgestein; Kinzler, 1992). Sin embargo, en presencia de daño celular, p53 controla el ciclo. Las células aumentan su expresión y la acumulación de la proteína provoca la detención del mismo en un intento por ganar el tiempo necesario para reparar las lesiones. Como recurso ante el fracaso de la reparación, p53 puede conducir la célula dañada hacia la muerte celular programada o apoptosis (Lane, 1992; Volgestein; Kinzler, 1992) con la finalidad de mantener la integridad del genoma (Zambetti *et al*, 1992).

La proteína p53, en condiciones normales juega un papel minoritario en el control del ciclo celular, mientras que en situaciones de estrés resulta ser un factor clave de la regulación del crecimiento celular (Kastan et al, 1992; Lane, 1992). En ausencia de daño celular, su actividad principal es la transactivación de la transcripción de diversos genes. Muchos genes pueden ser inducidos por p53, estimándose que son varios centenares los que contienen las mencionadas secuencias de DNA específicas de unión.

Existe un equilibrio en las células normales entre crecimiento, diferenciación y control celular. La apoptosis es además un mecanismo normal para el control de la

proliferación de la población celular, sin embargo, la falta de apoptosis no parece el único mecanismo para el crecimiento y progresión tumoral, ya que el cúmulo de células tumorales ocurrirá también si existe mayor proliferación celular que pérdida celular por apoptosis. Esto explicaría porqué en la mayoría de los tumores se observan altos índices de mitosis junto con altos índices de apoptosis (Sarkiss et al, 1996).

La apoptosis es un proceso clave en la homeostasis tisular que interviene en diferentes procesos fisiológicos y patológicos, entre los que destaca el cáncer.

La importancia de la apoptosis en las neoplasias se basa en: a) la destrucción de células preneoplásicas; b) es un fenómeno presente en tumores ya establecidos como resultado de procesos intrínsecos de las células tumorales, o secundario a factores externos que tienen lugar en el tejido tumoral; c) es necesario en la respuesta terapéutica de las diferentes armas antitumorales.

Es evidente que un mejor conocimiento de la apoptosis en las neoplasias ampliaría nuestros conceptos sobre cinética celular tumoral, basada durante años en los índices de proliferación celular y a su vez, nos proporcionaría métodos de conocimiento pronósticos con amplia repercusión terapéutica (de la Torre, 2002).

El TP53 es el gen mutado más frecuente en neoplasias humanas. Está involucrado en el desarrollo de más del 50% de los tumores. Mutaciones en genes asociados con el ciclo celular conducen a la pérdida de guardianes del genoma y a la progresión de células con daños en el DNA. La pérdida de p53 provoca una inestabilidad en el cariotipo, resultando en una aneuploidia, con múltiples amplificaciones y deleciones genéticas, como la pérdida de heterocigocidad. Las mutaciones en tumores humanos se encuentran en conjunción con la pérdida del alelo *wild type*. La pérdida de la actividad normal de p53 se ve tanto en neoplasias hereditarias como en las esporádicas, y en ambas se ha identificado una pérdida del cromosoma 17p (Wallace-Brodeur RR, et al 1999). Los pacientes que padecen el síndrome de Li-Fraumeni, heredan mutaciones de p53 en la línea germinal con pérdida del alelo *wild type*, que favorece el desarrollo de numerosos tumores (córtes adrenal, cerebro, mama, sarcomas y leucemias). Estos pacientes tienen una probabilidad del 90% de desarrollar un tumor a los 70 años. Son necesarios al menos dos fenómenos genéticos o *hits* en p53 para que se desarrolle un tumor, tanto en los hereditarios como en los somáticos (primer *hit*: pérdida de un alelo; segundo *hit*: inactivación del alelo restante). línea germinal como somática. Este fenómeno ocurre en muchos tumores como en vejiga, cerebro, colón, hígado o pulmón (Hainaut P et al, 1998), sin embargo, en algunos estudios, pacientes con CCR e historia familiar de CCR tienen con más frecuencia tumores p53 negativos. Esto puede significar que la carga genética puede aumentar el riesgo mediante un mecanismo independiente de p53. No obstante, debe

tenerse en cuenta que la ausencia de sobreexpresión de p53 no implica necesariamente la inexistencia de mutaciones, especialmente en el caso de mutaciones nulas o mutaciones por desplazamiento de la fase de lectura (*frameshift mutations*), aunque ambas son muy raras en el CCR (Freedman et al, 1996).

La p53 mutada produce una ventaja de crecimiento selectivo, incluso ante la presencia de un alelo normal, ya que le permitirá inactivarlo uniéndose a él, y evitando sus interacciones celulares normales (Hainaut P et al, 1998).

Por otro lado, la mutación de p53 ocurre precozmente en la secuencia neoplásica, encontrándose en aquellos tumores expuestos crónicamente a carcinógenos externos o inflamación, tales como los carcinomas escamoso de la piel, cáncer oral, y tumores sobre esófago de Barret. Sin embargo, la pérdida total de p53 ocurre en la progresión tardía del proceso; se encuentra en la interfase entre adenoma-carcinoma en tumores de colon esporádicos, después de la activación del oncogen K-ras y la pérdida del gen supresor tumoral del cáncer colorrectal (Kushner J et al, 1997).

La pérdida de p53 permitirá una acumulación más rápida de mutaciones en el tumor y disminuirá la probabilidad de que tenga lugar la apoptosis. El hecho de que la mutación de p53 sea muy frecuente en los carcinomas colónicos primarios pero rara en los pólipos sugiere que la ventaja selectiva de la mutación p53 es más fuerte durante la progresión a transformación maligna completa que en el desarrollo de los pólipos.

Los tumores con p53 mutado pueden tener un peor pronóstico, lo cual es consistente con el aumento de la generación de diversidad genética y el descenso de la respuesta apoptótica en las células con ese defecto. Por otro lado, es interesante resaltar que la pérdida de la función p53 en el epitelio colónico normal o en los pólipos pequeños no se asocia con una mayor progresión a CCR.

Las técnicas de inmunohistoquímica son un buen método de detección de la proteína. Hasta el momento, se ha utilizado como un método indirecto para establecer la presencia de mutaciones en p53, ya que se había establecido que las mutaciones puntuales en p53 conducían a una estabilización y acumulación de proteína en las células tumorales. La proteína p53 mutada tiene una vida media relativamente más larga, alrededor de 12 horas, pero existen algunas mutaciones que no inducen sobreexpresión de p53 (20 % de los casos en tumores humanos). Por otro lado, la proteína p53 "wild type" es virtualmente indetectable en las células normales, ya que su vida media es muy corta, alrededor de 20 minutos. Sin embargo, ante un daño de DNA los niveles de p53 wild type aumenta por estabilización postranscripcional, y son estos niveles los que paran el ciclo celular o, en su caso, provocan apoptosis, siendo esta proteína reconocida por inmunohistoquímica. Por ello, los anticuerpos

monoclonales utilizados en inmunohistoquímica, reconocen tanto la proteína “wild type” acumulada ante situaciones de estrés : hipoxia, inflamación, o exposiciones a agentes citotóxicos, como la proteína mutada que se sobreexpresa. De cualquier modo la detección inmunohistoquímica en células tumorales se basa en el aumento de concentración de los niveles de proteína, secundarios a un aumento de síntesis o a una disminución de la degradación con mayor vida media.

### **Ki-67**

Ki 67 es un antígeno nuclear ligado a la proliferación celular, situado en el cromosoma 10q25 (Fonatsch et al, 1991). En 1983 se describió el anticuerpo monoclonal de ratón Ki-67 que reconocía un antígeno nuclear presente en todas las fases del ciclo celular (G1, S, G2, M), sin embargo, no reaccionaba con células quiescentes ni con células en fase G1 precoz. La inmunotinción con Ki-67 demostraba reactividad nuclear en varias líneas celulares humanas en división celular activa (corteza tímica, células germinales de centros foliculares corticales, cuello de criptas glandulares de la mucosa gástrica, espermatogonias indiferenciadas) y por el contrario, carecía de efecto en células diferenciadas (linfocitos, monocitos, hepatocitos, células renales, células parietales de la mucosa gástrica y células cerebrales). La expresión del antígeno volvía a manifestarse en linfocitos tras ser estimulados con un mitógeno (fitohemaglutinina). Estos hallazgos sugirieron la posibilidad de utilizar el antígeno Ki-67 para valorar la fracción de crecimiento o proporción de células en división de un tumor (Gerdes *et al.*, 1983).

Una de las primeras aplicaciones clínicas del anticuerpo contra el antígeno Ki-67 fue en linfomas no Hodgkin. Se utilizó la mediana de expresión como parámetro de discriminación y se correlacionaron linfomas de alto y bajo grado de la clasificación de Kiel con elevadas y bajas tasas de división celular respectivamente (Gerdes *et al.*, 1984).

Estudios realizados en diferentes tejidos humanos han demostrado que Ki-67 se une a un antígeno de 35 – 40 kDa en células que están en división (Danova *et al.*, 1988; Landberg *et al.*, 1990; Landberg y Roos 1993). Con citometría de flujo se ha comprobado que los niveles de expresión del antígeno aumentan durante la última mitad de la fase S y alcanzan un pico máximo durante la fase G2/M. El tratamiento de las células HeLa S3 con inhibidores de la síntesis de DNA aumentaba la expresión del antígeno, mientras desaparecía al tratarlas con DNAasa. En base a estos resultados se concluyó que Ki-67 se encuentra unido al DNA, que su expresión es independiente de la síntesis de DNA y que puede ser necesario para mantener el estado de proliferación celular (Sasaki *et al.*, 1987). Con microscopía electrónica y de barrido



confocal con láser en las células humanas MR65, se localizó el antígeno en la corteza del nucleolo y en los componentes fibrilares densos (Verheijen *et al.*, 1989). Asimismo, mediante citometría de imagen se objetivó, que el antígeno se encontraba principalmente en el nucleolo en la fase G1 y en el nucleoplasma en las subsiguientes fases del ciclo celular y además, que la síntesis de RNAr nucleolar es esencial para la expresión del antígeno (Guillaud *et al.*, 1989).

Estudios con doble inmunofluorescencia han demostrado que durante la mayor parte de la interfase, el antígeno Ki-67 se localiza en el nucleolo. En la fase G1 precoz se localiza en un gran número de focos que se distribuyen en el nucleoplasma, extendiéndose hasta la envoltura nuclear. Durante la mitad de la fase G1 precoz el antígeno se encuentra en asociación con el nucleolo en unas regiones distintas a los dominios que contienen los mayores antígenos nucleolares (fibrilarina y RNA polimerasa I). Otros estudios han comprobado que la localización de Ki-67 varía constantemente de manera dependiente del ciclo celular. Durante la fase de mitosis este antígeno cubre a los cromosomas, en G1 se acumula en focos nucleares y se mantiene dentro del nucleolo en la fase tardía de G1, S y G2. En la fase G1 precoz se ha observado su localización en las siguientes regiones satélites del DNA: alfa satélite (centrómero), minisatélite (telómero) y satélite III (bloques heterocromáticos). En la fase G1 tardía existen mínimas regiones satélites con Ki-67, desplazándose éste hacia el nucleolo. Sin embargo, las regiones centroméricas y brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos próximas a los genes de RNA ribosomal (RNAr) contienen Ki-67. En la fase de reformación postmitótica y nucleogénesis disminuyen progresivamente las regiones satélites del DNA que permanecen asociadas a Ki-67 (Bridger *et al.*, (1998). En base a estos hallazgos se ha llegado a la conclusión que Ki-67 se localiza en el nucleolo durante la interfase, mientras que se distribuye en la periferia de los cromosomas durante la mitosis.

Inicialmente Ki-67 sólo se reconocía en tejido congelado o fresco y cuando se quería utilizar la técnica utilizando los protocolos estandarizados de solubilización, desaparecía. En 1991 se estudiaron varias líneas celulares para averiguar la naturaleza de Ki-67 con concentraciones y disolventes distintos, demostrándose que Ki-67 era una proteína no histónica muy sensible a las proteasas (Gerdes *et al.*, 1991). Posteriormente, se adaptó la técnica para estudiar tejidos sólidos. En un estudio con carcinomas de célula no pequeña de pulmón realizado en 1992 y utilizando diferentes anticuerpos (p53, c-myc y Ki-67), observaron que todos los tumores mostraban una positividad de entre 44 y 76% para Ki-67 (Morkve *et al.*, 1992).

Uno de los problemas del anticuerpo Ki-67 era que sólo funcionaba en material congelado, perdiéndose la posibilidad de hacer estudios retrospectivos. En 1992 se experimentó con la familia de anticuerpos MIB1 y MIB3, siendo éstos los más adecuados para marcar las células activadas y pudiéndose utilizar tanto en congelación como en parafina siguiendo la técnica del microondas (Cattoretti et al 1992) .

## JUSTIFICACIÓN

El estudio cotidiano de las biopsias humanas nos da una panorámica global de la situación de un conjunto de células en un momento determinado: el de la extirpación del tumor. Se trata de hacer una descripción detallada de los tumores a nivel anatomopatológico para obtener un diagnóstico, lo más preciso posible y así clasificarlos con un objetivo principal: que tenga un valor clínico, es decir, que nos sirva como indicador pronóstico, y por tanto que nos sea útil para decidir el tratamiento más efectivo.

El estudio histopatológico de los tumores tiene dos funciones: el diagnóstico y la búsqueda de parámetros morfológicos y biológicos que permitan presagiar la evolución clínica y/o la respuesta al tratamiento, en un enfermo particular, es decir, los llamados factores pronósticos y predictivos. Algunos de estos factores, como el tamaño del tumor y el estadio, son generales y pueden aplicarse a casi todos los tumores, pero otros son particulares de cada tipo y es tarea del patólogo contribuir a su identificación.

Las características clínico patológicas *clásicas* siguen siendo los mejores factores pronósticos en el comportamiento de la neoplasia colorrectal, sin embargo, para que se mantengan vigentes deben ser constantemente revisadas, evitando que puedan volverse irrelevantes con la aparición de nuevos marcadores, los cuales podrían ser incorporados dentro de su análisis rutinario en un momento determinado una vez comprobada su utilidad clínico patológica.

## HIPÓTESIS

- El grado de malignidad tumoral a nivel molecular puede identificarse con un panel simplificado de alteraciones oncogénicas diana, que juegan un papel en la transformación y desarrollo de la malignidad celular. El estudio de estas dianas mediante inmunohistoquímica en microarrays tisulares en un elevado número de tumores clínicamente protocolizados, nos permitirá asociar la expresión y la impronta real de algunas alteraciones bioquímicas y su asociación con la evolución clínica y el pronóstico.
- El análisis anatomopatológico de rutina, apoyado en el estudio inmunohistoquímico complementario de algunos marcadores de señalización y proliferación celular, apoptosis e invasividad tumoral, nos permitirían identificar el papel que juegan algunas moléculas en el desarrollo y agresividad del CCR. Así, la expresión inmunohistoquímica de estas moléculas nos brindaría información clínica importante asociada al curso clínico y al pronóstico del CCR.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Analizar y reflejar la complejidad que desde el punto de vista anatomopatológico y clínico presentan las distintas vías y factores de señalización implicados en la génesis y evolución del CCR, e identificar su relación con otros factores pronósticos en el CCR.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar el perfil inmunohistoquímico de aquellos carcinomas colorrectales que se asocian a una mayor agresividad clínico-patológica, y por tanto a un peor pronóstico.
- Correlacionar la expresión inmunohistoquímica de RACK1, 4EBP1 p53 y Ki-67 en los carcinomas colorrectales, con los datos patológicos y el curso clínico de esta entidad.
- Establecer y validar aquellas alteraciones moleculares con valor predictivo en la progresión tumoral.

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### VI.1. MATERIAL: Pacientes y piezas quirúrgicas

**Tipo de estudio:** Los casos se han obtenido de una selección retrospectiva de los archivos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron (HUVH). Todo el material ha sido revisado por dos patólogos previamente a su inclusión en el estudio, para asegurar la correcta clasificación histológica y TNM en el caso de los carcinomas y el tipo histológico y grado de displasia en los adenomas.

**Criterios de inclusión:** Pacientes con CCR, diagnosticados, tratados e intervenidos quirúrgicamente en el HUVH, entre el 1 de enero de 2000 y el 15 de enero de 2003. Los pacientes están clínicamente protocolizados y con seguimiento clínico conocido. Los adenomas provienen de una serie distinta, también diagnosticados y resecados en esta institución entre el 22 de junio y 13 de septiembre de 2004.

**Criterios de exclusión:** Se han excluido las variantes histológicas inusuales de CCR (medulares, células pequeñas, linfomas, etc.), así como los pólipos no adenomatosos.

**Pacientes:** Se han analizado de forma rutinaria 133 casos de CCR. Todas las muestras se recibieron en fresco y se tomó material para congelación, con posterior procesamiento del tejido. Los adenomas estudiados fueron 62, todos ellos fijados en formol y procesados de forma rutinaria.

La **muestra** de pacientes con CCR está constituida por 86 hombres (64,7%) y 47 mujeres (35,3%), con un rango de **edad** que oscila entre los 33 y 92 años. La distribución por **estadios** es de 9 casos (6,8%) en estadio A, 49 (36,8%) en estadio B, 40 (30,1%) en estadio C y 35 (26,3%) en estadio D.

**Distribución anatómica:** 52 casos (39,1%) en colon derecho, 42 (33,8%) en colon izquierdo y 36 (27,1%) en el recto.

**Subtipo histológico:** 112 casos (84,2%) convencionales y 21 (15,8%) mucinosos.

**Grado histológico:** 107 tumores (80,5%) de bajo grado, de los cuales 7 (5,3%) eran grado 1 y 100 (75,2%) grado 2; 26 tumores de alto grado (19,5%), de los cuales 24 (18,0%) grado 3 y 2 (1,5%) grado 4.

Se diagnosticaron **metástasis** ganglionares linfáticas en 67 pacientes (50,4%), y hepáticas en 33 pacientes (25%).

La muestra de los pacientes con **adenomas** está constituida por 41 (66,1%) hombres y 21 (33,9%) mujeres, con un rango edad entre los 13 y 90 años. La distribución

anat6mica corresponde a 17 casos en colon derecho (27,4%), 29 en colon izquierdo (46,8%), 12 en recto (19,4%) y 4 casos (6,5%) a lo largo de todo el colon. En cuanto al tipo tuvimos, 29 tubulares (46,8%), 6 vellosos (9,7%) y 27 tubulovellosos (43,5%). El grado de displasia fue de bajo grado en 41 casos (66,2%), de los cuales 5 fueron leve (8,1%), y 36 moderada (58,1%) y de alto grado (severa) en 21 casos (33,9%).

Los CCR recidivaron en 15 pacientes (11,3%), 28 (21,1%) murieron por la enfermedad y 5 (3,7%) murieron por otras causas.

El tiempo de seguimiento ha sido entre 0,5 y 51,1 meses. La supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad han sido calculadas desde la fecha de la intervenci6n quir6rgica y/o diagn6stico hasta la muerte o 6ltima visita del paciente.

La informaci6n cl6nica se obtuvo de las historias cl6nicas del archivo del HUVH. Los datos de la evoluci6n se obtuvieron en las sucesivas consultas de control , realiz6ndose la 6ltima revisi6n de historias el 22 de noviembre de 2005. Para evitar la p6rdida de casos se contact6 con los especialistas cl6nicos (cirug6a y oncolog6a), que tienen contacto directo con el paciente o con los familiares de los mismos, completando el seguimiento adecuado, estableciendo las supervivencias, recidivas 6 met6stasis en todos los casos de CCR. Se realiz6 una base de datos y se recogieron las siguientes variables para cada paciente: nombre, sexo, edad, n6mero de historia, n6mero de biopsia y localizaci6n anat6mica. En el caso de los adenomas se estudi6 el tipo y grado de displasia y en e CCR, tipo histol6gico, grado, estadio de Dukes, ganglios identificados, ganglios positivos y seguimiento cl6nico (estado del paciente).

Tambi6n se seleccionaron al azar 20 casos de mucosas no tumorales, provenientes de las porciones sanas de piezas de colectom6a de pacientes con divert6culos.

## **TISSUE MICROARRAYS**

Los tissue microarrays (TMAs), permiten el estudio de la expresi6n de una prote6na en un gran n6mero de tumores de forma simult6nea, a partir de muestras tisulares incluidas en parafina de forma convencional (Farr6 X, 2002).

### **Construcci6n del tissue microarray**

Recogimos de la historia cl6nica, la informaci6n necesaria referente a los casos en estudio para la confecci6n del "array". Obtuvimos bloques "donantes" de parafina, con un m6nimo de 2 mm de profundidad tisular y con adecuada preservaci6n antig6nica

durante el proceso de fijación y realizamos una preparación teñida con hematoxilina-eosina como guía para seleccionar las regiones que deseamos muestrear. En el microscopio óptico, marcamos con un rotulador el punto exacto correspondiente a la zona representativa elegida y enfrentamos la preparación histológica con el bloque de parafina correspondiente marcando las zonas elegidas en el bloque con rotulador. Preparamos un bloque de parafina en blanco, para utilizar como “receptor” de las muestras titulares. Finalmente confeccionamos una plantilla, identificando los cilindros y su disposición en el array.

### **INMUNOHISTOQUÍMICA**

La técnica de inmunohistoquímica realizada sobre cortes de tejido parafinado ha requerido de un pretratamiento con calor, para desenmascarar los antígenos que se han querido identificar. A continuación se ha añadido el anticuerpo primario y, tras un tiempo de incubación, se ha añadido un polímero específico marcado con peroxidasa y un sustrato cromógeno (diaminobencidina) que nos permite visualizar la reacción. El sistema de visualización utilizado ha sido el EnVision de Dako Cytomation. Finalmente, se ha realizado una contratinción con hematoxilina de Mayer. Todas las técnicas del estudio se realizaron con Dako Autostainer. Las condiciones específicas para cada una de las reacciones se han optimizado para cada uno de los anticuerpos. Los anticuerpos utilizados son: 4EBP1: Cell Signalling Tech. (9452L); RACK-1: BD Pharmingen (610177); Ki67 y p53.

### **VALORACIÓN DE LOS TISSUE MICROARRAYS**

La evaluación de la tinción de inmunohistoquímica se ha realizado con un método semicuantitativo (Hscore) por dos patólogos de modo independiente, desconociendo la información clínica de los pacientes. El método ha incluido dos parámetros: Intensidad de tinción (0:negativo; 1:intensidad leve; 2:intensidad moderada; 3:intensidad elevada) y porcentaje de células positivas. El Hscore de cada cilindro se ha obtenido del producto resultante al multiplicar cada intensidad por su correspondiente porcentaje de positividad (rango 0-300), siendo expresión o score bajo de 0–100, intermedio de 101–200 y alto de 201–300. Cada uno de los cilindros se ha analizado por separado, considerando como resultado final del caso el promedio entre los tres. Para Ki67 y p53 la reacción fue considerada positiva cuando el 10% o más de los núcleos de las células tumorales mostraron tinción con el anticuerpo. El punto de corte se escogió para indicar los casos con clara positividad a la tinción. Los puntos de corte



seleccionados coincidían con los más frecuentemente utilizados en la literatura para cada molécula.

Los resultados obtenidos se han recogido en una base de datos utilizando el programa Access. Los parámetros clínicos, histológicos y biológicos se han comparado por análisis estadístico.

### **Análisis estadístico**

Las variables anatomopatológicas clásicas y las variables clínicas se han descrito con número de casos y porcentaje en el caso de variables cualitativas, y media y desviación standard (ds) en las variables continuas.

La cuantificación de cada uno de los marcadores (Hscore ó porcentaje) se ha descrito inicialmente con media y ds, para posteriormente la clasificación de positividad (específica de cada marcador) con número de casos y porcentaje.

Para la valoración de la relación de las variables anatomopatológicas clásicas y clínicas con los Hscore se ha utilizado el análisis de la varianza, y el test Exacto de Fisher con la clasificación de positividad.

La comparación de Adenocarcinomas (de cada una de las localizaciones: tumor primario, margen tumoral infiltrante, metástasis ganglionares y metástasis hepáticas) con los Adenomas se ha realizado a través del test T-Student para muestras independientes.

## **4-EBP1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO**

### **Expresión nuclear de 4-EBP1 en la mucosa colónica normal cercana al tumor**

En la tabla 1 analizamos la expresión basal de 4-EBP1 en 41 casos de los 133 incluidos en la serie. Obtuvimos un score negativo en 11 casos (27%), con baja expresión en 18 casos (44%), 10 casos (24%) con score intermedio y 2 casos (5%) con score alto.

### **Expresión citoplasmática de 4-EBP1 en la mucosa colónica normal cercana al tumor**

En la tabla 2 analizamos 41 casos de los 133 incluidos en la serie. Obtuvimos un score negativo en 27 casos (66%), y con baja expresión en 14 casos (34%). No obtuvimos scores con alta expresión (mayor de 100).

### **Expresión nuclear de 4-EBP1 en la mucosa colónica normal distante al tumor**

En la tabla 3 analizamos 48 casos de los 133 incluidos en la serie. Obtuvimos un score negativo en 13 casos (27%), con baja expresión en 28 casos (58%), 4 casos (8%) con score intermedio y 3 casos (7%) de score alto.

### **Expresión citoplasmática de 4-EBP1 en la mucosa colónica normal distante al tumor**

En la tabla 4 analizamos 48 casos de los 133 incluidos en la serie. Obtuvimos un score negativo en 18 casos (38%), con baja expresión en 29 casos (60%) y 1 caso (2%) con score intermedio. No hubo casos con score alto.

### **Expresión nuclear de 4EBP1 en el tumor primario**

La tabla 5 indica que analizamos 116 casos de los 133 incluidos en la serie. Se obtuvo un score negativo en 2 casos (2%), con baja expresión en 38 casos (33%) y alta expresión en 76 casos (65%), de los cuales 26 casos (22%) presentaron score intermedio y 50 casos (43%) presentaron score alto.

### **Expresión citoplasmática de 4EBP1 en el tumor primario**

La tabla 6 indica que analizamos 115 casos de los 133 incluidos en la serie. Se obtuvo un score negativo en 24 casos (21%), con baja expresión en 73 casos (63%) y alta

expresión en 18 casos (16%), de los cuales 12 casos (10%) presentaron score intermedio y 6 casos (5%) presentaron score alto.

#### **Expresión nuclear de 4-EBP1 según el grado histológico del tumor**

En la tabla 7 observamos que de nuestra serie se analizaron 116 casos, 93 corresponden a tumores de bajo grado y 23 a tumores de alto grado. En los de bajo grado hubo 2 casos negativos (2%), 31 casos con baja expresión (33%), 60 casos con alta expresión (65%), entre estos últimos 19 de score intermedio (20%) y 41 de score alto (45%). En los de alto grado, tuvimos 7 casos con baja expresión (30%), 16 con alta expresión (70%), entre estos últimos 7 de score intermedio (30%) y 9 de score alto (40%). Por tanto, no observamos diferencias significativas de expresión nuclear según el grado histológico del tumor ( $p = 0,689$ ). Ver gráficos 1 y 2.

#### **Expresión citoplasmática de 4-EBP1 según el grado histológico del tumor**

En la tabla 8 observamos que de nuestra serie se analizaron 115 casos, 92 corresponden a tumores de bajo grado y 23 a tumores de alto grado. En los tumores de bajo grado hubo 20 casos negativos (22%), 59 casos con baja expresión (64%), 13 casos con alta expresión (14%), entre estos últimos 8 de score intermedio (9%) y 5 de score alto (5%). En los tumores de alto grado, hubo 4 casos negativos (17%), 14 casos con baja expresión (61%), 5 con alta expresión (22%), entre estos últimos 4 de score intermedio (18%) y 1 de score alto (4%). No se observaron diferencias estadísticamente significativas de la expresión citoplasmática de 4-EBP1 en relación al grado histológico del tumor ( $p = 0,666$ ). Ver gráficos 3 y 4.

#### **Expresión nuclear de 4-EBP1 según el estadio N**

En la tabla 9 observamos que de nuestra serie se analizaron 115 casos, 56 corresponden a estadio N0, 30 a estadio N1 y 29 a estadio N2. En el estadio N0, obtuvimos 2 casos negativos (4%), 17 casos con baja expresión (30%) y 37 casos con alta expresión (66%), entre estos últimos 14 de score intermedio (25%) y 23 de score alto (41%). En el estadio N1, obtuvimos 13 casos con baja expresión (43%) y 17 casos con alta expresión (57%), entre estos últimos 6 de score intermedio (20%) y 11 de score alto (37%). En el estadio N2, obtuvimos 7 casos con baja expresión (24%) y 22 casos con alta expresión (76%), entre estos últimos 6 de score intermedio (21%) y 16 de score alto (55%). La expresión nuclear de 4-EBP1 no es significativamente distinta ( $p=0,482$ ) según el estadio N. Ver gráficos 5 y 6.

### **Expresión citoplasmática de 4-EBP1 según el estadio N**

En la tabla 10 observamos que de nuestra serie se analizaron 114 casos, 55 corresponden a estadio N0, 30 a estadio N1 y 29 a estadio N2. En el estadio N0, obtuvimos 13 casos negativos (24%), 33 casos con baja expresión (60%) y 9 casos con alta expresión (16%), entre estos últimos 5 de score intermedio (9%) y 4 de score alto (7%). En el estadio N1, obtuvimos 8 casos negativos (27%), 18 casos con baja expresión (60%) y 4 casos con alta expresión (13%), estos últimos de score intermedio. En el estadio N2, obtuvimos 3 casos negativos (10%), 21 casos con baja expresión (73%) y 5 casos con alta expresión (17%), entre estos últimos 3 de score intermedio (10%) y 2 de score alto (7%). Las diferencias de expresión citoplasmáticas observadas en los distintos estadios de N, no fueron significativas ( $p = 0,517$ ). Ver gráficos 7 y 8.

### **Expresión nuclear de 4-EBP1 en pacientes con metástasis hepáticas**

En la tabla 11 observamos que de un total de 115 analizamos la expresión nuclear de 28 pacientes con metástasis hepáticas, obteniendo baja expresión en 8 casos (29%) y alta expresión en 20 casos (71%), de los cuales 7 presentaron score intermedio (25%) y 13 score alto (46%). La expresión en los pacientes sin afectación hepática metastásica no fue significativamente diferente ( $p = 0,811$ ), ya que observamos que de 87 casos, 2 no expresaron nada (2,3%), 29 presentaron expresión baja (33%), 19 presentaron score intermedio (22%) y 37 score alto (43%). Ver gráficos 9 y 10.

### **Expresión citoplasmática de 4-EBP1 en pacientes con metástasis hepáticas**

En la tabla 12 analizamos la expresión citoplasmática de los 28 pacientes con metástasis hepáticas. Obtuvimos negatividad en 7 casos (25%), baja expresión en 17 casos (61%) y alta expresión en 4 casos (14%), estos últimos con score intermedio. La expresión en los pacientes sin afectación hepática metastásica no fue significativamente diferente ( $p = 0,430$ ), ya que observamos que de 86 casos, 17 no expresaron nada (20%), 55 presentaron expresión baja (64%), 8 presentaron score intermedio (9%) y 6 score alto (7%). Ver gráficos 11 y 12.

### **Expresión nuclear de 4-EBP1 en pacientes que fueron exitus por CCR**

En la tabla 13 analizamos la expresión nuclear de los 26 pacientes que fueron exitus por ccr. Se observó baja expresión en 11 pacientes (42%) y alta expresión en 15 pacientes (58%), de lo cuales 6 (23%) presentaron score intermedio y 9 (35%) score alto. Mientras que en los 90 pacientes restantes 2 (2%) no presentaron expresión alguna, 27 (30%) presentaron expresión baja, 20 presentaron score moderado (22%)

y 41 (46%) presentaron score alto. Por tanto pudimos observar que las diferencias de expresión no son significativas ( $p = 0,557$ ). Ver gráficos 13 y 14.

#### **Expresión citoplasmática de 4-EBP1 en pacientes que fueron exitus por CCR**

En la tabla 14 analizamos la expresión citoplasmática de los 26 pacientes que fueron exitus por ccr. Se observó negatividad en 7 pacientes (27%), baja expresión en 15 pacientes (58%) y alta expresión en 4 pacientes (15%), todos estos últimos presentaron score intermedio. Mientras que en los 89 pacientes restantes 17 (19%) no presentaron expresión alguna, 58 (65%) presentaron expresión baja, 8 presentaron score moderado (9%) y 6 (7%) presentaron score alto. Por tanto pudimos observar que las diferencias de expresión no son significativas ( $p = 0,346$ ). Ver gráficos 15 y 16.

#### **Expresión nuclear de 4-EBP1 en pacientes que presentaron recidivas**

En la tabla 15 analizamos la expresión nuclear de los 14 pacientes que presentaron recidiva de ccr. Se observó baja expresión en 6 pacientes (43%) y alta expresión en 8 pacientes (57%), de lo cuales 2 (14%) presentaron score intermedio y 6 (43%) score alto. Mientras que en los 102 pacientes restantes 2 (2%) no presentaron expresión alguna, 32 (31%) presentaron expresión baja, 24 presentaron score moderado (24%) y 44 (43%) presentaron score alto. Por tanto pudimos observar que las diferencias de expresión no son significativas ( $p = 0,744$ ). Ver gráficos 17 y 18.

#### **Expresión citoplasmática de 4-EBP1 en pacientes que presentaron recidiva por CCR**

En la tabla 16 analizamos la expresión citoplasmática de los 14 pacientes que presentaron recidiva de ccr. Se observó negatividad en 1 caso (7%), baja expresión en 9 pacientes (64%) y alta expresión en 4 pacientes (29%), de lo cuales 3 (22%) presentaron score intermedio y 1 (7%) score alto. Mientras que en los 101 pacientes restantes 23 (23%) no presentaron expresión alguna, 64 (63%) presentaron expresión baja, 9 presentaron score moderado (9%) y 5 (5%) presentaron score alto. Por tanto pudimos observar que las diferencias de expresión no son significativas ( $p = 0,334$ ). Ver gráficos 19 y 20.

#### **4-EBP1 EN ADENOMAS. ANÁLISIS DESCRIPTIVO**

En la tabla 17 observamos que al valorar la tinción nuclear de los 62 casos, 59 (95%) presentaron un score bajo (de 1 a 100) y solo 3 casos (5%) un score intermedio. No hubo casos con score alto (mayor de 200).

En cuanto a la expresión citoplasmática, observamos que en la tabla 16 todos los adenomas (100%) presentaron una tinción citoplasmática con un score menor de 100 (la mayoría menor de 50).

#### **ANÁLISIS BIVARIADO DE LA EXPRESIÓN NUCLEAR DE 4-EBP1**

##### **Adenocarcinoma vs Adenomas**

De acuerdo al gráfico 21, la expresión nuclear en los tumores primarios fue analizada en 116 casos, con una expresión media de 157; mientras que la media de expresión en los 62 adenomas fue de 62. Estos valores tienen una diferencia de medias de 94, lo que representa un valor estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ).

##### **Margen tumoral infiltrante vs Adenomas**

La expresión nuclear media en el margen infiltrante analizada en 64 casos fue de 32, y de 62 en la serie de los 62 adenomas, según observamos en el gráfico 22.

Esto representa una diferencia de medias de -29,8, con un valor estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ).

##### **Metástasis ganglionares vs Adenoma**

El gráfico 23 nos muestra que la expresión nuclear en 29 metástasis ganglionares analizadas fue de 33 de media, mientras que en los 62 adenomas fue de 62.

La diferencia de medias de éstos datos es de -29, el cual es un valor estadísticamente significativo ( $< 0,001$ ).

#### **ANÁLISIS BIVARIADO DE LA EXPRESIÓN CITOPLASMÁTICA DE 4-EBP1**

##### **Adenocarcinoma vs Adenoma**

La expresión citoplasmática analizada en 116 tumores primarios presentó una media de expresión de 62, mientras que en la serie de 62 adenomas la expresión media fue de 6.

El gráfico 24 nos pone en evidencia una significativa sobreexpresión ( $p < 0,001$ ) en los adenocarcinomas, cuando comparamos el tumor primario con los adenomas, la diferencia de medias fue de 57.

#### **Margen infiltrante vs Adenoma**

Cuando valoramos el margen infiltrante del adenocarcinoma obtuvimos una expresión citoplasmática media de 19, mientras que en el grupo de adenomas fue de 6. De tal manera que en el gráfico 25 podemos observar que la diferencia entre ambas medias fue de 13, pudiendo constatar una sobreexpresión significativa ( $p=0,003$ ) en el margen tumoral infiltrante.

#### **Metástasis ganglionares vs Adenoma**

En las metástasis ganglionares existe una sobreexpresión citoplasmática significativa ( $p=0,007$ ) en comparación a la observada en los adenomas, ya que la diferencia de media de expresión fue de 23. Estos valores pueden apreciarse en la gráfica 26, en donde vemos que esta expresión analizada en 29 metástasis ganglionares tuvo un valor de 29 de media, mientras que en los 62 adenomas su expresión media tuvo un valor de 6.

#### **Metástasis hepáticas vs Adenoma**

Las metástasis hepáticas, al igual que las ganglionares presentaron sobreexpresión citoplasmática significativa ( $p < 0,000$ ) al ser comparadas con los adenomas, con una diferencia de medias de 102. En el gráfico 27 apreciamos que la expresión media de las 20 metástasis hepáticas fue de 107; mientras que en la serie de adenomas fue de 5.

**Tabla 1. Expresión nuclear de 4-EBP1 en la mucosa colónica normal cercana al tumor**

**R2\_p4EBP1\_Nucleo\_MucosaNormal\_SCORE**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	NO	11	8,3	26,8	26,8
	1-100	18	13,5	43,9	70,7
	101-200	10	7,5	24,4	95,1
	201-300	2	1,5	4,9	100,0
	Total	41	30,8	100,0	
Perdidos	Sin Información	92	69,2		
Total		133	100,0		

**Tabla 2. Expresión citoplasmática de 4-EBP1 en la mucosa colónica normal****R2\_p4EBP1\_Citoplasma\_MucosaNormal\_SCORE**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	NO	27	20,3	65,9	65,9
	1-100	14	10,5	34,1	100,0
	Total	41	30,8	100,0	
Perdidos	Sin Información	92	69,2		
Total		133	100,0		

**Tabla 3. Expresión nuclear de 4-EBP1 en la mucosa colónica normal****R2\_p4EBP1\_Nucleo\_MucosaLejana\_SCORE**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	NO	13	9,8	27,1	27,1
	1-100	28	21,1	58,3	85,4
	101-200	4	3,0	8,3	93,8
	201-300	3	2,3	6,3	100,0
	Total	48	36,1	100,0	
Perdidos	Sin Información	85	63,9		
Total		133	100,0		



**Tabla 4. Expresión citoplasmática de 4-EBP1 en la mucosa colónica**

**R2\_p4EBP1\_Citoplasma\_MucosaLejana\_SCORE**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	NO	18	13,5	37,5	37,5
	1-100	29	21,8	60,4	97,9
	101-200	1	,8	2,1	100,0
	Total	48	36,1	100,0	
Perdidos	Sin Información	85	63,9		
Total		133	100,0		

**R2\_p4EBP1\_Nucleo\_Epitelio\_SCORE**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	NO	2	1,5	1,7	1,7
	1-100	38	28,6	32,8	34,5
	101-200	26	19,5	22,4	56,9
	201-300	50	37,6	43,1	100,0
	Total	116	87,2	100,0	
Perdidos	Sin Información	17	12,8		
Total		133	100,0		

**R2\_p4EBP1\_Citoplasma\_Epitelio\_SCORE**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	NO	24	18,0	20,9	20,9
	1-100	73	54,9	63,5	84,3
	101-200	12	9,0	10,4	94,8
	201-300	6	4,5	5,2	100,0
	Total	115	86,5	100,0	
Perdidos	Sin Información	17	12,8		
	Sistema	1	,8		
	Total	18	13,5		
Total		133	100,0		

Tabla 7. Expresión nuclear de 4-EBP1 según el grado histológico del tumor

SCORE	Neg	1-100	101-200	201-300	Total
<b>Bajo Grado</b>	<b>2</b> 2,2%	<b>31</b> 33,3%	<b>19</b> 44,1%	<b>41</b> 44,1%	<b>93</b> 100%
<b>Alto Grado</b>	<b>0</b> 0%	<b>7</b> 30,4%	<b>7</b> 30,4%	<b>9</b> 39,1%	<b>23</b> 100%
<b>Total</b>	<b>2</b> 1,7%	<b>38</b> 32,8%	<b>26</b> 22,4%	<b>50</b> 43,1%	<b>116</b> 100%

Gráfico 1. Expresión nuclear de 4-EBP1 según el grado histológico del tumor

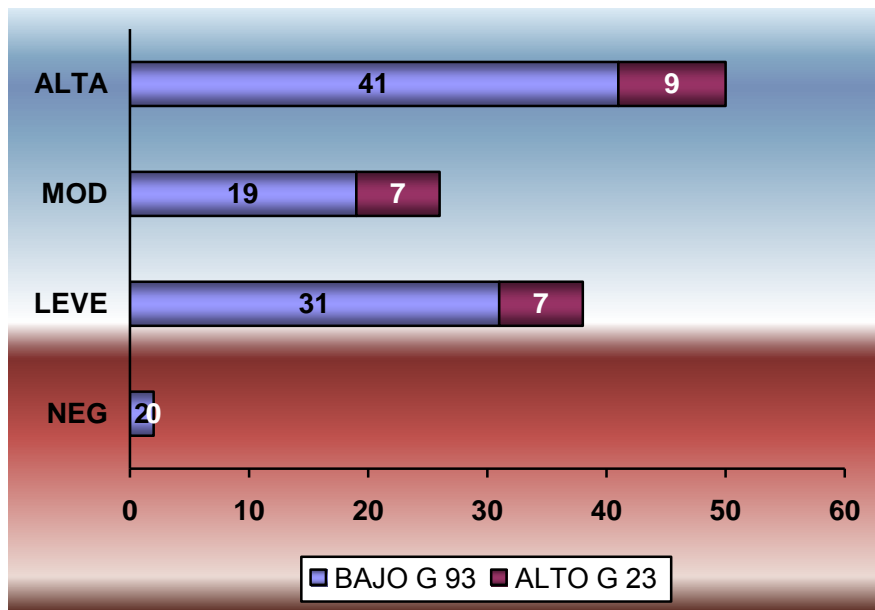


Gráfico 2. Expresión nuclear de 4-EBP1 según el grado histológico del tumor

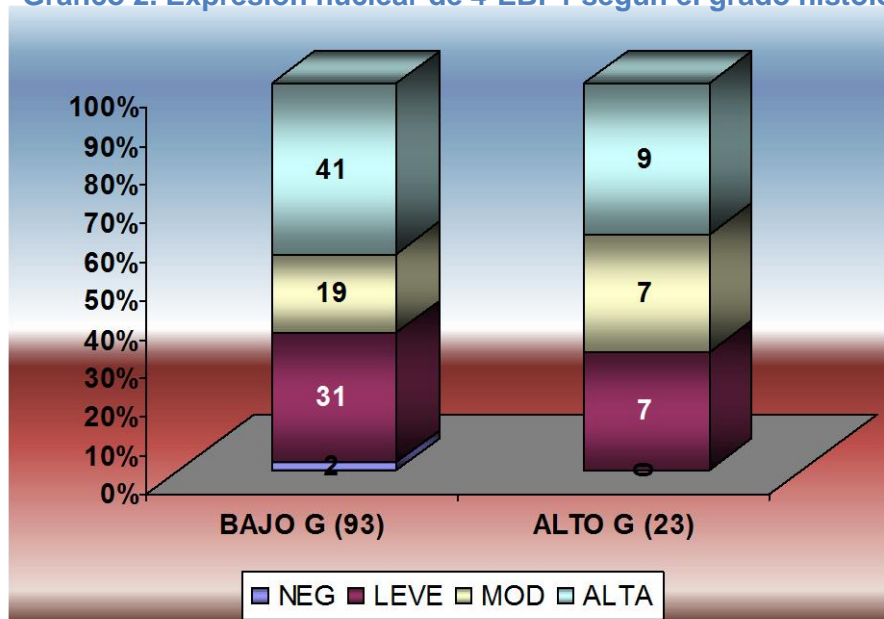


Tabla 8. Expresión citoplasmática de 4-EBP1 según el grado histológico del tumor

SCORE	Neg	1-100	101-200	201-300	Total
<b>Bajo Grado</b>	<b>20</b> 21,7%	<b>59</b> 64,1%	<b>8</b> 8,7%	<b>5</b> 5,4%	<b>92</b> 100%
<b>Alto Grado</b>	<b>4</b> 17,4%	<b>14</b> 60,9%	<b>4</b> 17,4%	<b>1</b> 4,3%	<b>23</b> 100%
<b>Total</b>	<b>24</b> 20,9%	<b>73</b> 63,5%	<b>12</b> 10,4%	<b>6</b> 5,2%	<b>115</b> 100%

Gráfico 3. Expresión citoplasmática de 4-EBP1 según el grado histológico del tumor

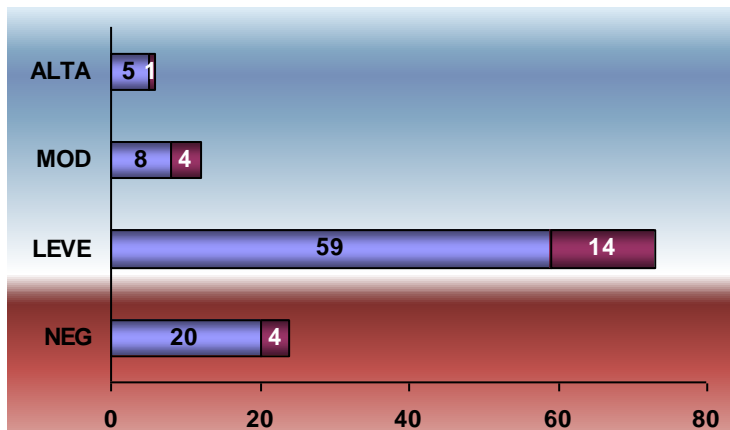


Gráfico 4. Expresión citoplasmática de 4-EBP1 según el grado histológico del tumor

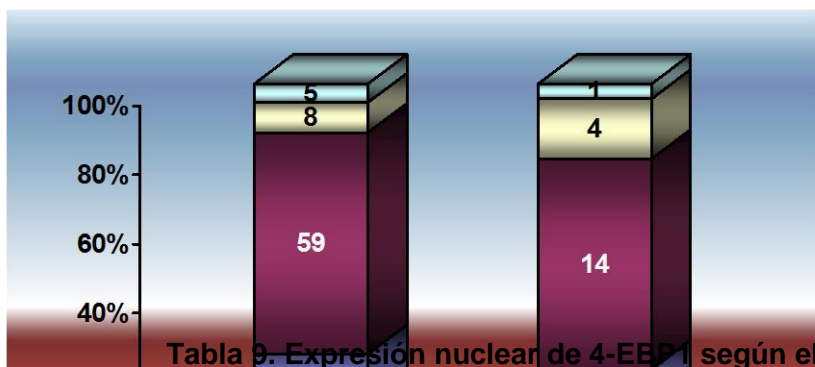


Tabla 9. Expresión nuclear de 4-EBP1 según el estadio N

SCORE	Neg	1-100	101-200	201-300	Total
<b>Estadio 0</b>	<b>2</b> 3,6%	<b>17</b> 30,4%	<b>14</b> 25,0%	<b>23</b> 41,1%	<b>56</b> 100%
<b>Estadio 1</b>	<b>0</b> 0%	<b>13</b> 43,3%	<b>6</b> 20,0%	<b>11</b> 36,7%	<b>30</b> 100%
<b>Estadio 2</b>	<b>0</b> 0%	<b>7</b> 24,1%	<b>6</b> 20,7%	<b>16</b> 55,2%	<b>29</b> 100%

<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>37</b>	<b>26</b>	<b>50</b>	<b>115</b>
	1,7%	32,2%	22,6%	43,5%	100%

Gráfico 5. Expresión nuclear de 4-EBP1 según el estadio N

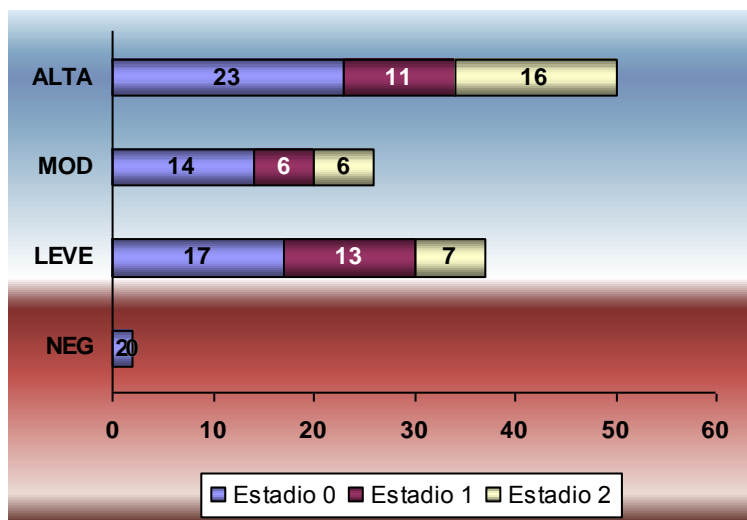


Gráfico 6. Expresión nuclear de 4-EBP1 según el estadio N

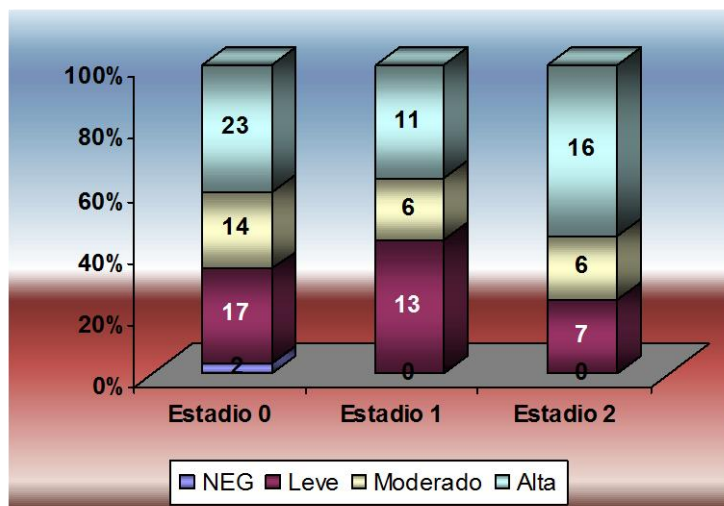


Tabla 10. Expresión citoplasmática de 4-EBP1 según el estadio N

SCORE	Neg	1-100	101-200	201-300	Total
<b>Estadio 0</b>	<b>13</b>	<b>33</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>56</b>
	23,6%	60,0%	9,1%	7,3%	100%
<b>Estadio 1</b>	<b>8</b>	<b>18</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>30</b>
	26,7%	60,0%	13,3%	0%	100%
<b>Estadio 2</b>	<b>3</b>	<b>21</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>29</b>
	10,3%	72,4%	10,3%	6,9%	100%

<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>72</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>114</b>
	21,1%	63,2%	10,5%	5,3%	100%

Gráfico 7. Expresión citoplasmática de 4-EBP1 según el estadio N

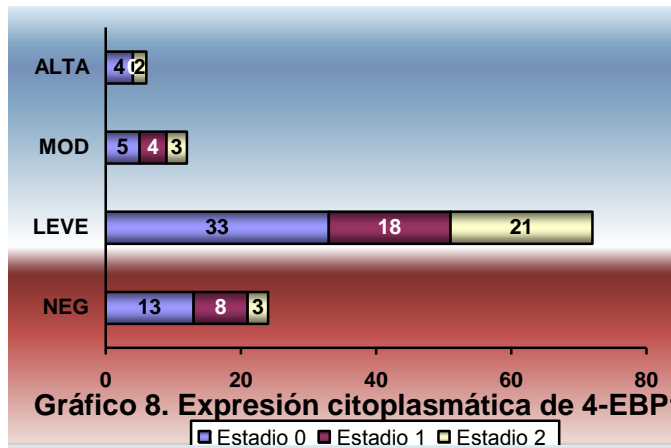


Gráfico 8. Expresión citoplasmática de 4-EBP1 según el estadio N

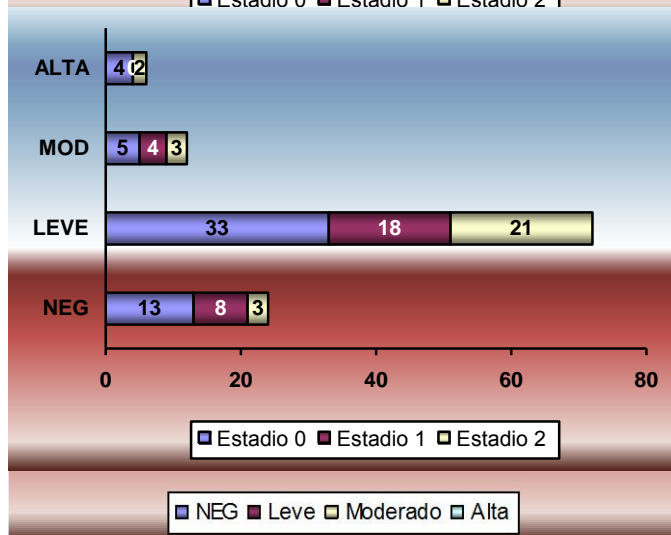


Tabla 11. Expresión nuclear de 4-EBP1 en pacientes con metástasis hepáticas

SCORE	Neg	1-100	101-200	201-300	Total
<b>M 0</b>	<b>2</b>	<b>29</b>	<b>19</b>	<b>37</b>	<b>87</b>
	2,3%	33,3%	21,8%	42,5%	100%
<b>M 1</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>28</b>
	0%	28,6%	25,0%	46,4%	100%
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>37</b>	<b>26</b>	<b>50</b>	<b>115</b>
	1,7%	32,2%	22,6%	43,5%	100%

Gráfico 9. Expresión nuclear de 4-EBP1 en pacientes con metástasis hepáticas

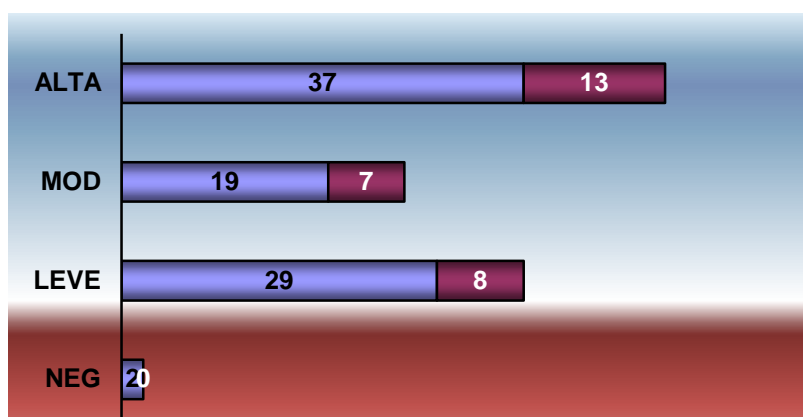


Gráfico 10. Expresión nuclear de 4-EBP1 en pacientes con metástasis hepáticas

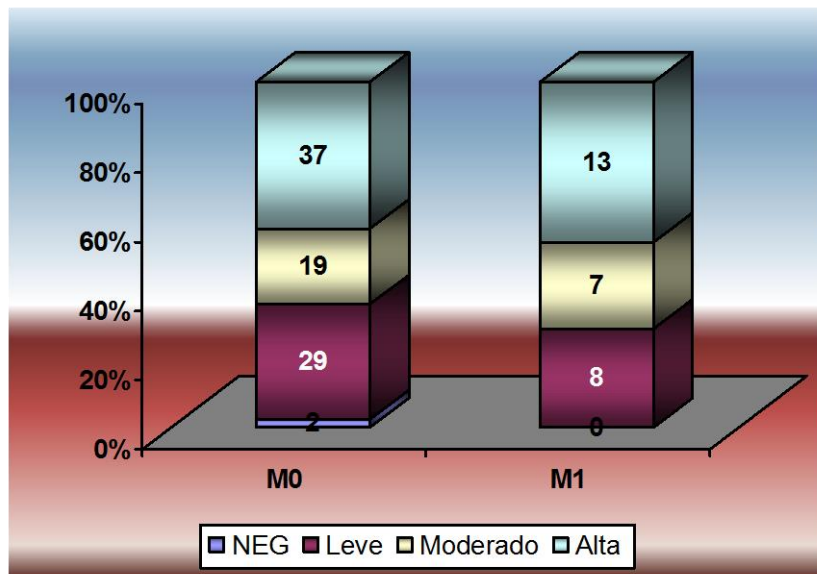
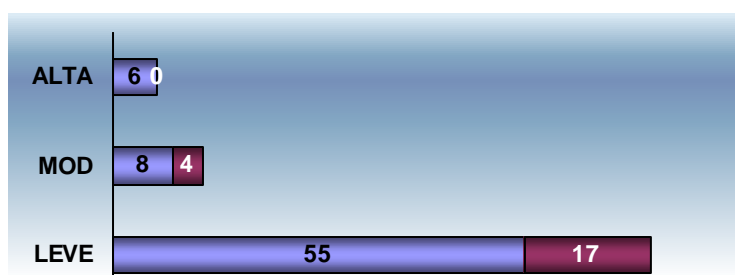


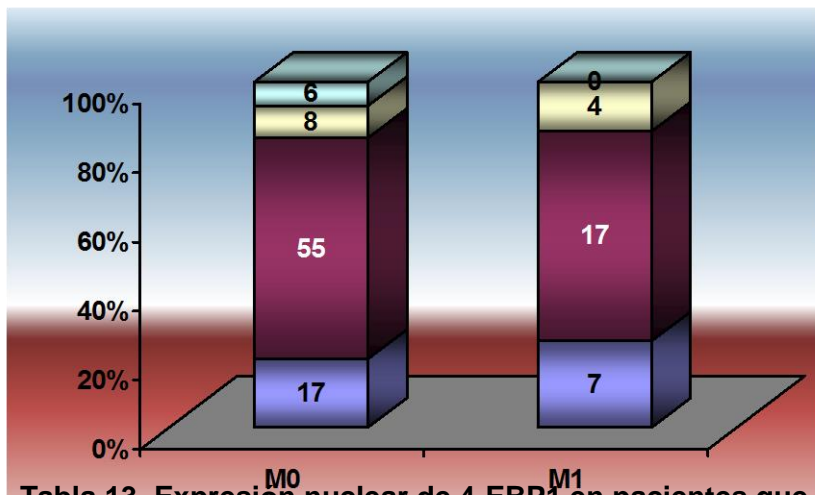
Tabla 12. Expresión citoplasmática de 4-EBP1 en pacientes con metástasis hepáticas

SCORE	Neg	1-100	101-200	201-300	Total
<b>M 0</b>	<b>17</b>	<b>55</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>86</b>
	19,8%	64,0%	9,3%	7,0%	100%
<b>M 1</b>	<b>7</b>	<b>17</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>28</b>
	25,0%	60,7%	14,3%	0%	100%
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>72</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>114</b>
	21,1%	63,2%	10,5%	5,3%	100%

Gráfico 11. Expresión citoplasmática de 4-EBP1 en pacientes con metástasis hepáticas



**Gráfico 12. Expresión citoplasmática de 4-EBP1 en pacientes con metástasis hepáticas**



**Tabla 13. Expresión nuclear de 4-EBP1 en pacientes que fueron éxitus por CCR**

SCORE	Neg	1-100	101-200	201-300	Total
<b>Exitus 0</b>	<b>2</b>	<b>27</b>	<b>20</b>	<b>41</b>	<b>90</b>
	2,2%	30,0%	22,2%	45,6%	100%
<b>Exitus 1</b>	<b>0</b>	<b>11</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>26</b>
	0%	60,7%	23,1%	34,6%	100%
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>38</b>	<b>26</b>	<b>50</b>	<b>116</b>
	1,7%	32,8%	22,4%	43,1%	100%

**Gráfico 13. Expresión nuclear de 4-EBP1 en pacientes que fueron éxitus por CCR**

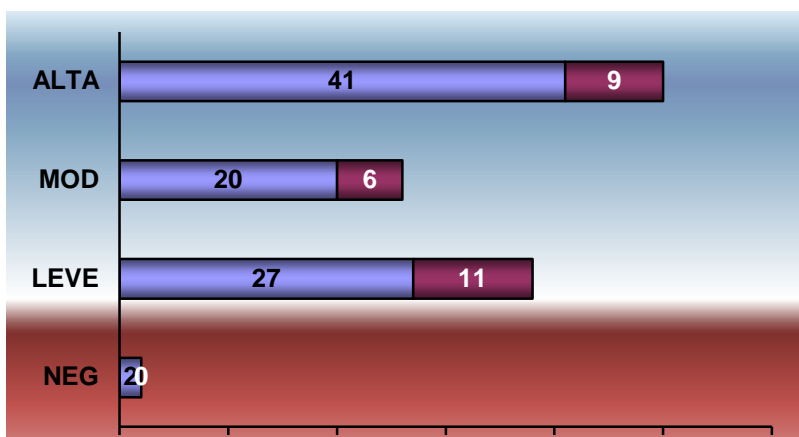


Gráfico 14. Expresión nuclear de 4-EBP1 en pacientes que fueron éxitus por CCR

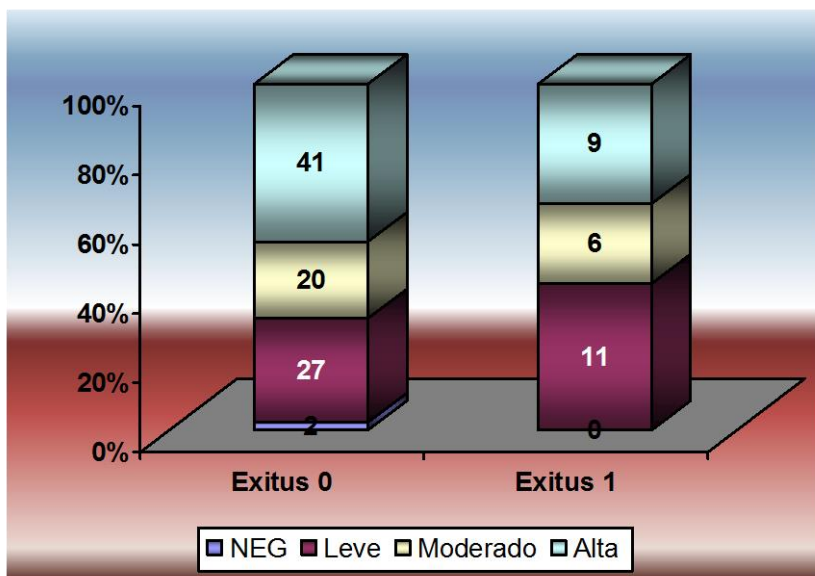


Tabla 14. Expresión citoplasmática de 4-EBP1 en pacientes que fueron éxitus por CCR

SCORE	Neg	1-100	101-200	201-300	Total
<b>Exitus 0</b>	<b>17</b> 19,1%	<b>58</b> 65,2%	<b>8</b> 9,0%	<b>6</b> 6,7%	<b>89</b> 100%
<b>Exitus 1</b>	<b>7</b> 26,9%	<b>15</b> 57,7%	<b>4</b> 15,4%	<b>0</b> 0%	<b>26</b> 100%
<b>Total</b>	<b>24</b> 20,9%	<b>73</b> 63,5%	<b>12</b> 10,4%	<b>6</b> 5,2%	<b>115</b> 100%

Gráfico 15. Expresión citoplasmática de 4-EBP1 en pacientes que fueron éxitus por CCR

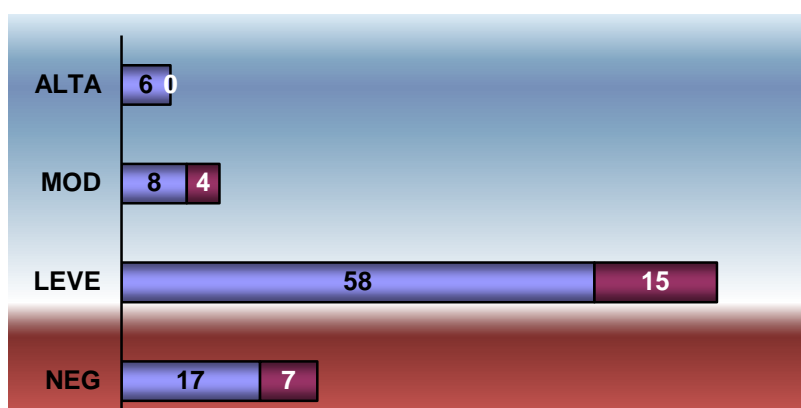




Gráfico 16. Expresión citoplasmática de 4-EBP1 en pacientes que fueron exitus por CCR

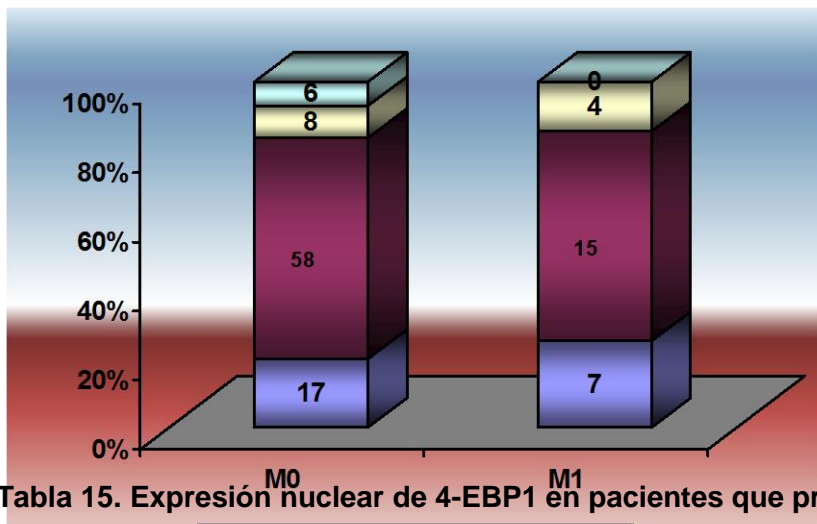


Tabla 15. Expresión nuclear de 4-EBP1 en pacientes que presentaron recidivas

SCORE	Neg	1-100	101-200	201-300	Total
<b>Recidiva 0</b>	<b>2</b>	<b>32</b>	<b>24</b>	<b>44</b>	<b>102</b>
	2,0%	31,4%	23,5%	43,1%	100%
<b>Recidiva 1</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>14</b>
	0%	42,9%	14,3%	42,9%	100%
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>38</b>	<b>26</b>	<b>50</b>	<b>116</b>
	1,7%	32,8%	22,4%	43,1%	100%

Tabla 17. Expresión nuclear de 4-EBP1 en pacientes que presentaron recidivas

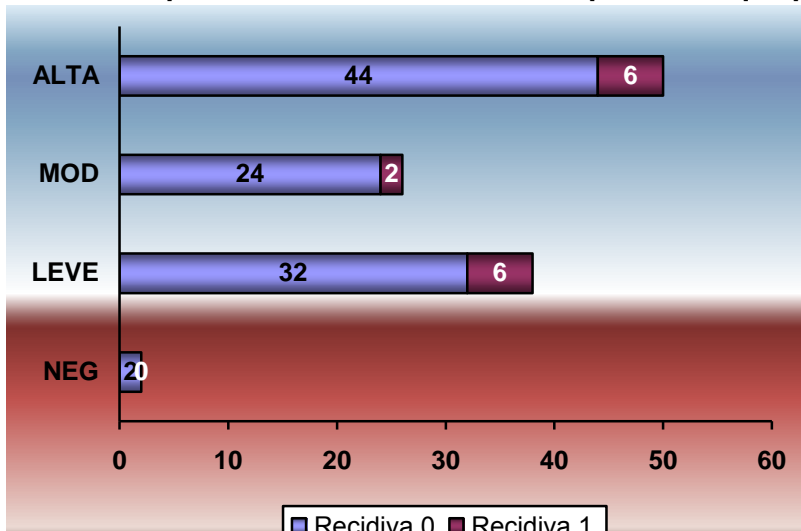


Gráfico 18. Expresión nuclear de 4-EBP1 en pacientes que presentaron recidivas

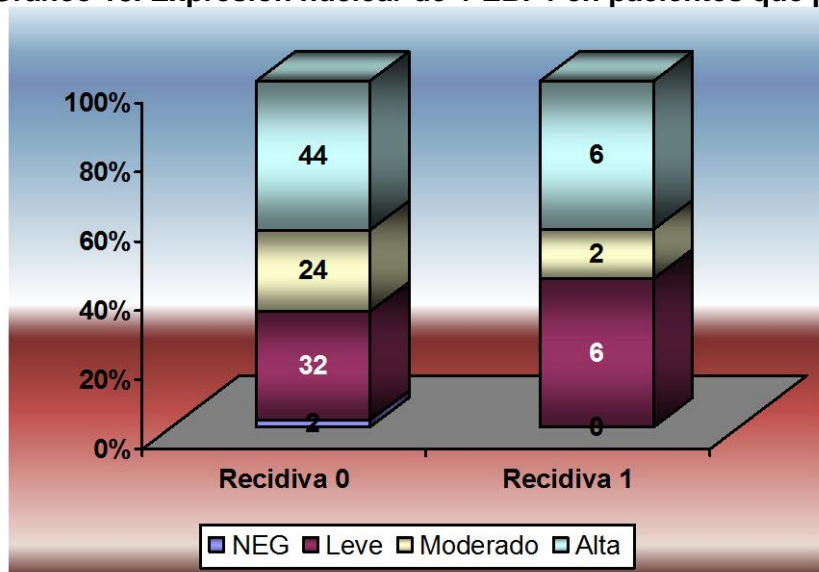
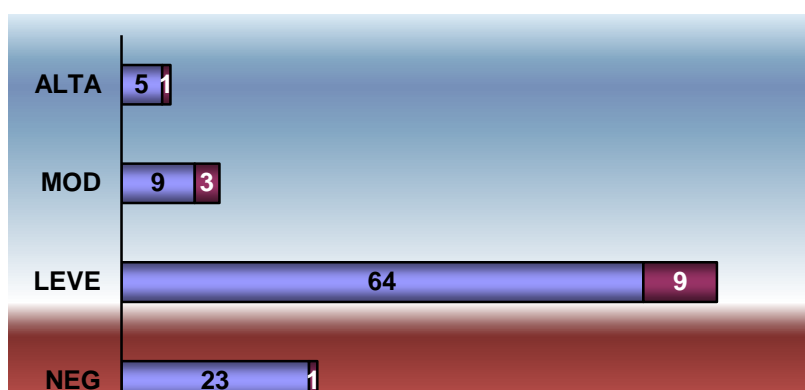


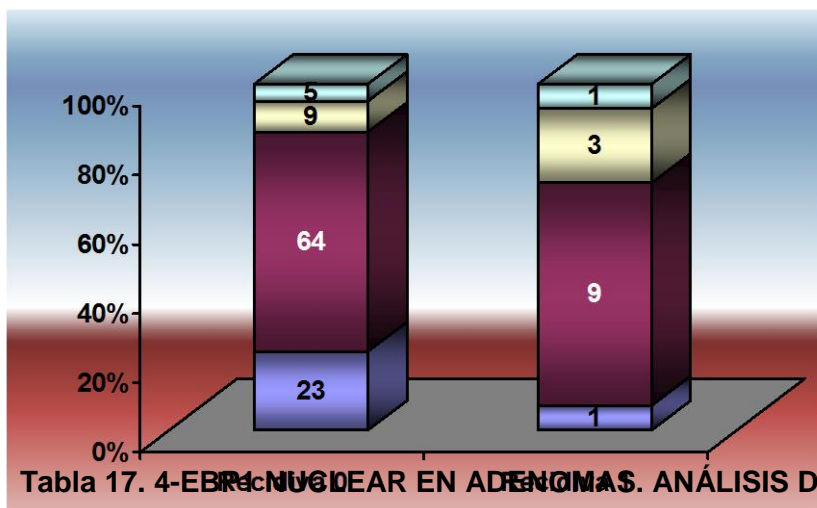
Tabla 16. Expresión citoplasmática de 4-EBP1 en pacientes que presentaron recidivas

SCORE	Neg	1-100	101-200	201-300	Total
<b>Recidiva 0</b>	<b>23</b>	<b>64</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>101</b>
	22,8%	63,4%	8,9%	5,0%	100%
<b>Recidiva 1</b>	<b>1</b>	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>14</b>
	7,1%	64,3%	21,4%	7,1%	100%
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>73</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>115</b>
	20,9%	63,5%	10,4%	5,2%	100%

Gráfico 19. Expresión citoplasmática de 4-EBP1 en pacientes que presentaron recidivas



**Gráfico 20. Expresión citoplasmática de 4-EBP1 en pacientes que presentaron recidivas**



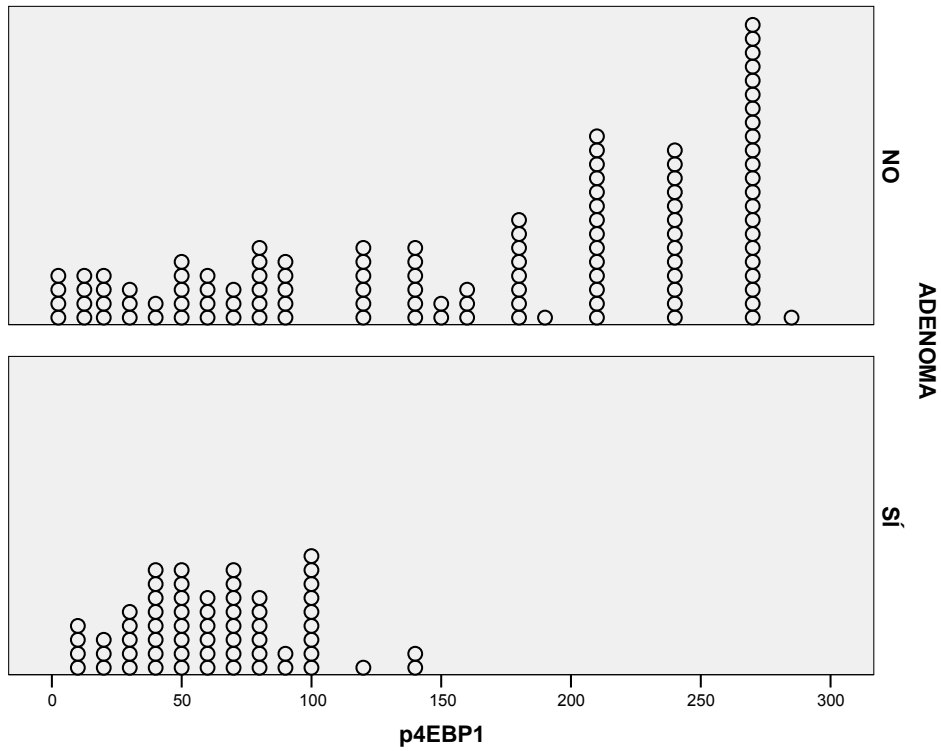
**Tabla 17. 4-EBP1 NUCLEAR EN ADENOMAS. ANÁLISIS DESCRIPTIVO**

R2_p4EBP1_Nucleo_Adenoma_SCORE						
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado	
Válidos	1 1-100	59	95,2	95,2	95,2	
	2 101-200	3	4,8	4,8	100,0	
	Total	62	100,0	100,0		

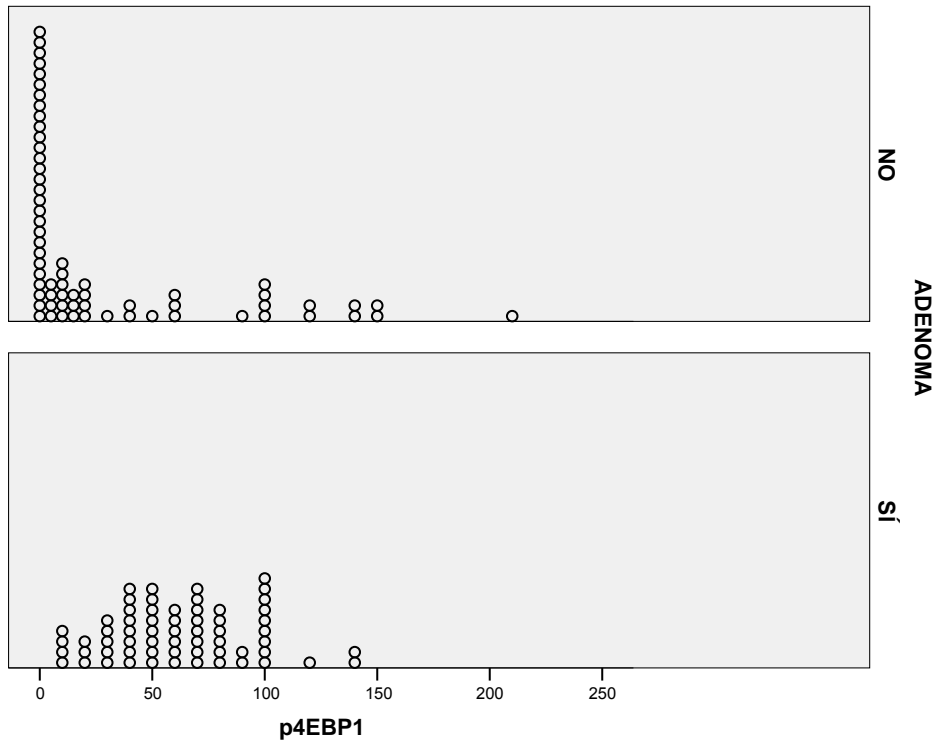
**Tabla 18. 4-EBP1 CITOPLASMÁTICO EN ADENOMAS. ANÁLISIS DESCRIPTIVO**

R3_p4EBP1_Citoplasma_Adenoma_SCORE						
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado	
Válidos	0 NO	21	33,9	33,9	33,9	
	1 1-50	41	66,1	66,1	100,0	
	Total	62	100,0	100,0		

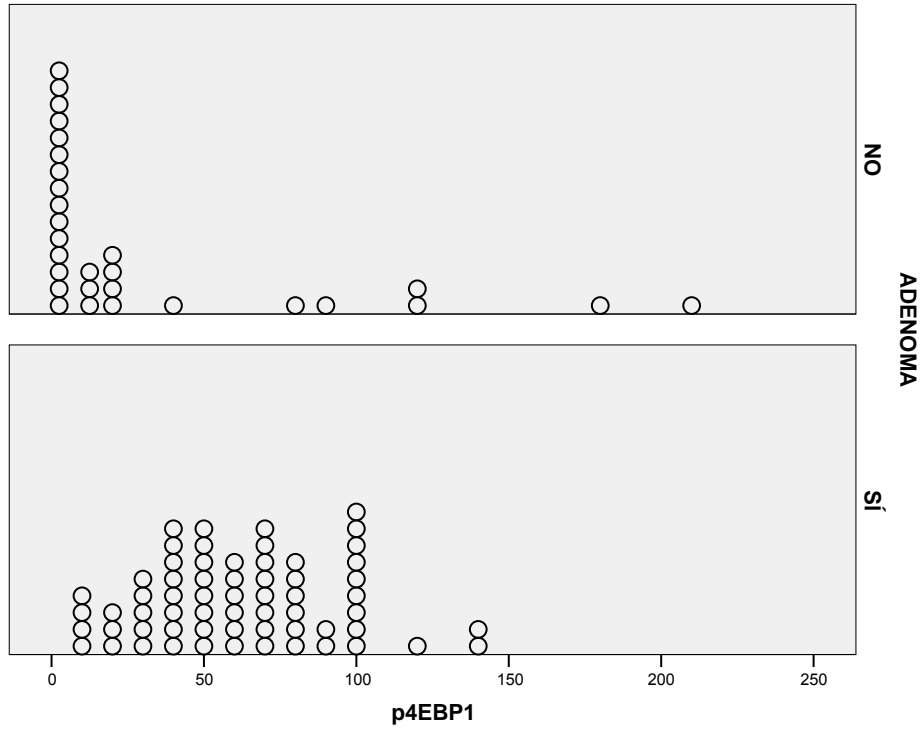
**Gráfico 21. ADENOCARCINOMA VRS ADENOMAS.  
EXPRESIÓN NUCLEAR DE 4EBP1.**



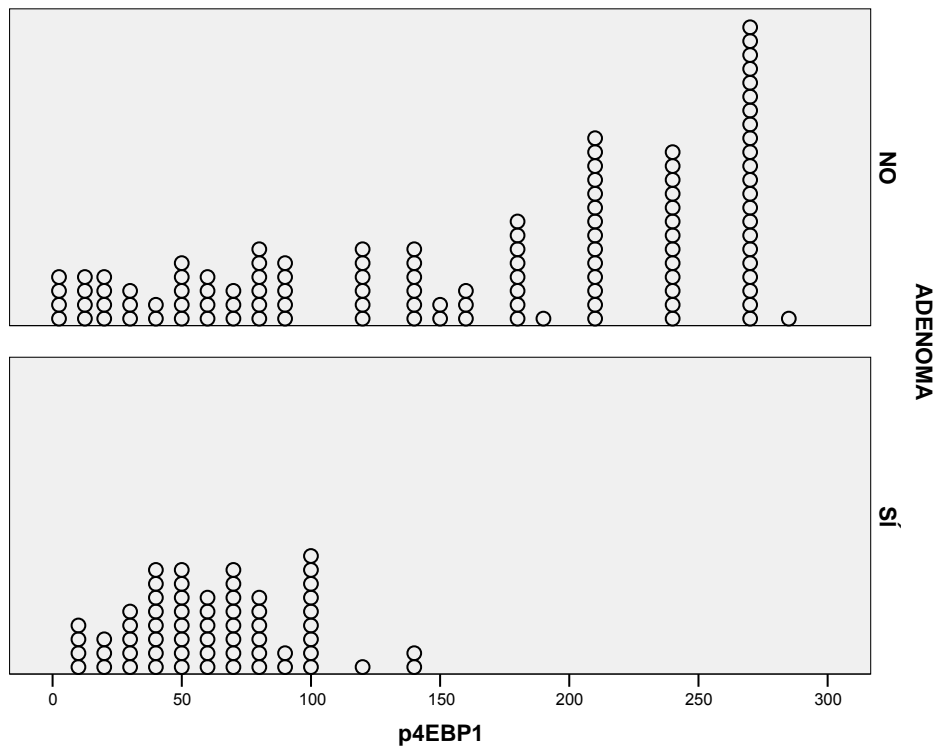
**Gráfico 22. MARGEN TUMORAL INFILTRANTE VS ADENOMAS.  
EXPRESIÓN NUCLEAR DE 4EBP1**



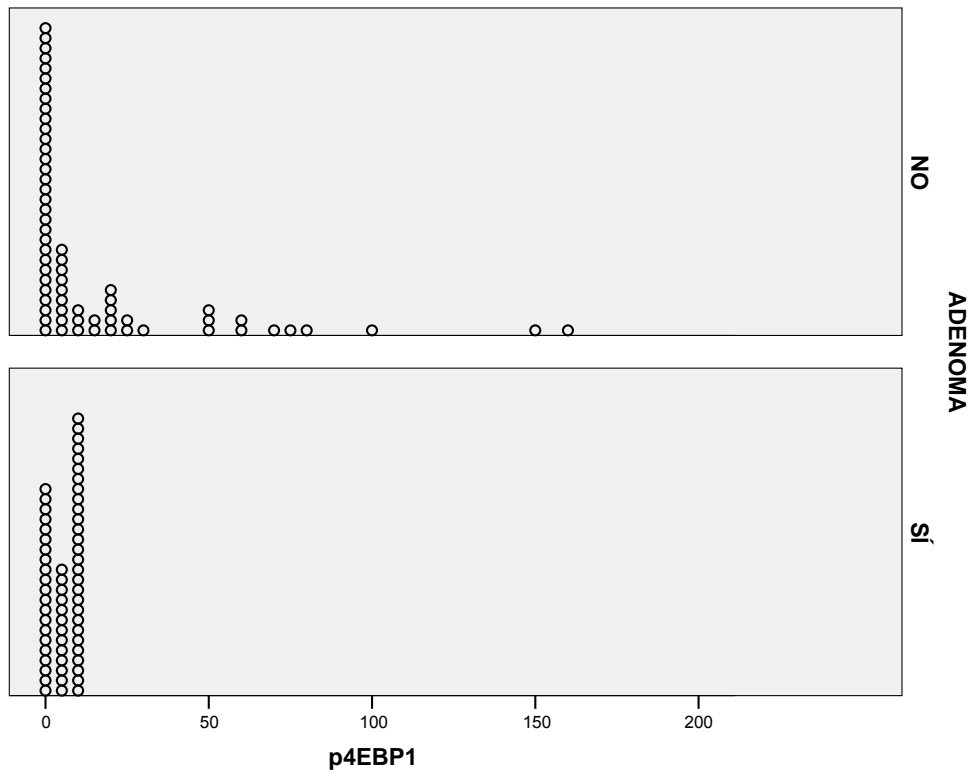
**Gráfico 23. METÁSTASIS GANGLIONARES VS ADENOMA  
EXPRESIÓN NUCLEAR DE 4EBP1**



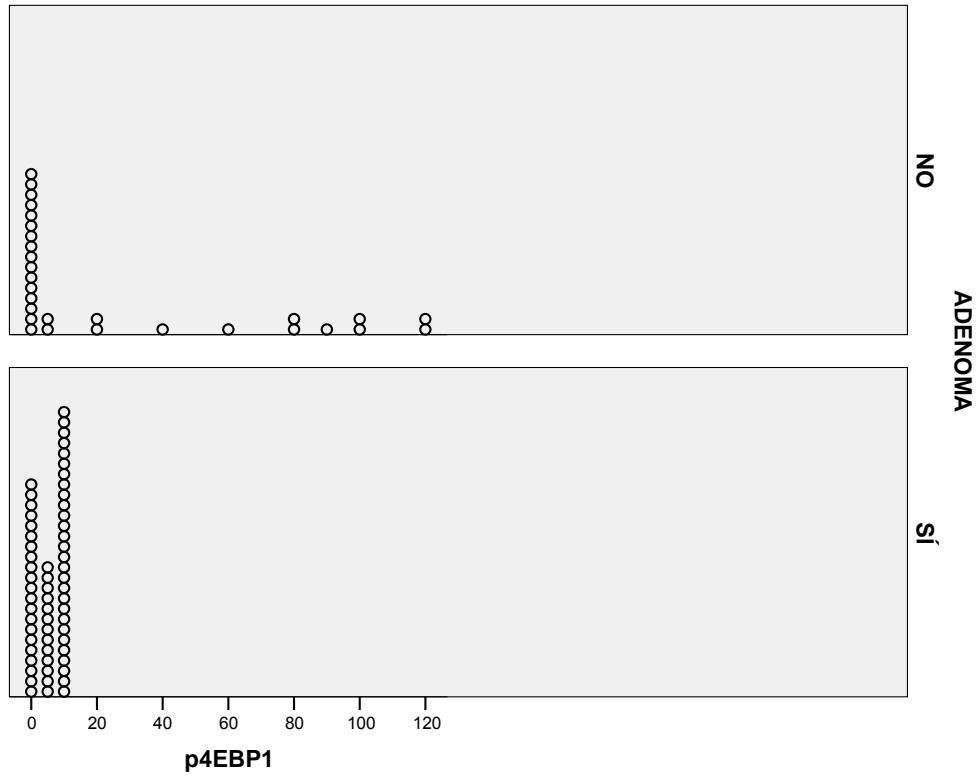
**Gráfico 24. ADENOCARCINOMA VRS ADENOMAS.  
EXPRESIÓN CITOPASMÁTICA DE 4EBP1**



**Gráfico 25. MARGEN INFILTRANTE VS ADENOMA  
EXPRESIÓN CITOPASMÁTICA DE 4EBP1**

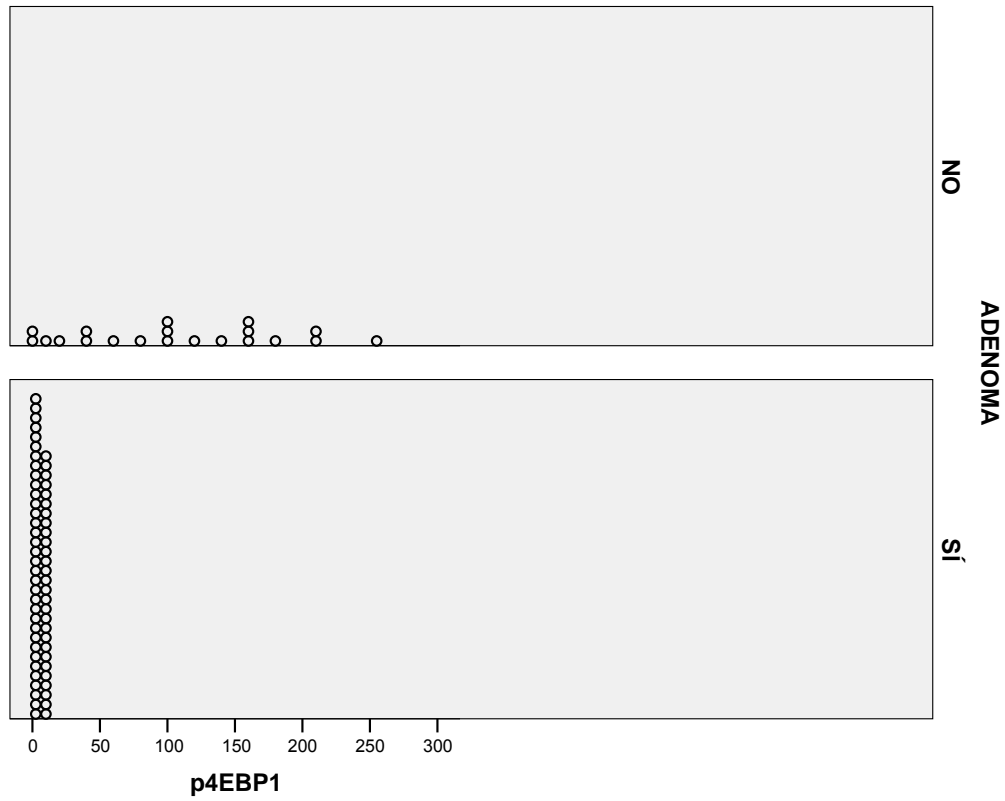


**GRÁFICO 26. METÁSTASIS GANGLIONARES VS ADENOMA  
EXPRESIÓN CITOPASMÁTICA DE 4EBP1**



Gráfico

**GRÁFICO 27. METÁSTASIS HEPÁTICAS VS ADENOMA  
EXPRESIÓN CITOPASMÁTICA DE 4EBP1**



## **RACK1**

### **Expresión inmunohistoquímica de RACK1 en la mucosa colónica normal**

En la tabla 19 vemos que se analizaron 64 casos de la serie. Se obtuvo negatividad en 3 casos (5%), un score con baja expresión en 49 casos (76%) y alta expresión en 12 casos (19%), correspondiendo 8 casos (13%) a un score intermedio y 4 casos (6%) a un score alto.

### **Expresión inmunohistoquímica de RACK1 en el tumor primario**

La tabla 20 indica que se analizaron 126 casos de los 133 incluidos en la serie. Se obtuvo baja expresión (menor de 100) en 28 casos (22%) y un score con alta expresión (de 101 a 300) en 98 casos (78%), de los cuales 52 casos (41%) presentaron score intermedio (de 101 a 200) y 46 casos (37%) presentaron score alto (de 201 a 300).

### **Expresión inmunohistoquímica de RACK1 en metástasis ganglionares**

En la tabla 21 observamos que las metástasis ganglionares fueron analizadas en 30 casos de la serie. Obtuvimos un score con baja expresión en 6 casos (20%) y alta expresión en 24 casos (80%), de los cuales 14 casos (47%) presentaron score intermedio y 10 casos (33%) presentaron score alto.

### **Expresión inmunohistoquímica de RACK1 en el margen tumoral infiltrante**

En la tabla 22 podemos observar que el margen tumoral infiltrante fue analizado en 67 casos de la serie. Obtuvimos un score con baja expresión en 13 casos (19%) y alta expresión en 54 casos (81%), de los cuales 30 casos (45%) presentaron score intermedio y 24 casos (36%) presentaron score alto.

### **Expresión inmunohistoquímica de RACK1 según el subtipo histológico**

En la tabla 23 vemos que de nuestra serie se analizaron 126 casos, 105 corresponden a subtipo histológico normal y 21 a subtipo mucinoso.

En el subtipo normal, hubo 20 casos con baja expresión (19%), 85 casos con alta expresión (81%), entre estos últimos 46 de score intermedio (44%) y 39 de score alto (37%).



En el subtipo mucinoso, hubo 8 casos con baja expresión (38%), 13 con alta expresión (62%), entre estos últimos 6 de score intermedio (29%) y 7 de score alto (33%).

En los pacientes con ccr de tipo mucinoso no se observó mayor grado de expresión inmunohistoquímica de RACK1, en comparación a los pacientes con ccr de tipo convencional, por tanto, la mayor agresividad de los tumores mucinosos no es significativa evaluado con RACK1 ( $p = 0,141$ ). Ver gráficos 28 y 29.

### **Expresión inmunohistoquímica de RACK1 según el grado histológico del tumor**

En la tabla 24 vemos que de nuestra serie se analizaron 126 casos, 102 corresponden a tumores de bajo grado y 24 a tumores de alto grado.

En los tumores de bajo grado, hubo 25 casos con baja expresión (25%), 77 casos con alta expresión (75%), entre estos últimos 45 de score intermedio (44%) y 32 de score alto (31%).

En los tumores de alto grado, hubo 3 casos con baja expresión (13%), 21 con alta expresión (87%), entre estos últimos 7 de score intermedio (29%) y 14 de score alto (58%). La expresión inmunohistoquímica de RACK 1 fue más alta en pacientes con tumores de alto grado histológico, en comparación con los del grupo de bajo grado. Por tanto, es considerable una mayor expresión de RACK1 en tumores anatomopatológicamente más agresivos. ( $p = 0,045$ ). Ver gráficos 30 y 31.

### **Expresión inmunohistoquímica de RACK1 en pacientes con metástasis de ganglios linfáticos, según el estadio**

En la tabla 25 vemos que de nuestra serie se analizaron 125 casos, 61 corresponden a estadio N0, 34 a estadio N1 y 30 a estadio N2.

En el estadio N0, obtuvimos 15 casos con baja expresión (25%) y 46 casos con alta expresión (75%), entre estos últimos 24 de score intermedio (39%) y 22 de score alto (36%).

En el estadio N1, obtuvimos 11 casos con baja expresión (32%) y 23 casos con alta expresión (68%), entre estos últimos 16 de score intermedio (47%) y 7 de score alto (21%).

En el estadio N2, obtuvimos 2 casos con baja expresión (7%) y 28 casos con alta expresión (93%), entre estos 11 de score intermedio (36%) y 17 de score alto (57%).

La expresión inmunohistoquímica de RACK1 no es significativamente más alta en pacientes que presentaron tumores con mayor afectación de ganglios linfáticos, ( $p = 0.026$ ). Ver gráficos 32 y 33.

### **Expresión inmunohistoquímica de RACK1 en pacientes con metástasis hepáticas**

En la tabla 26 analizamos la expresión citoplasmática de los 30 pacientes con metástasis hepáticas. Obtuvimos baja expresión en 7 casos (23%) y alta expresión en 23 casos (77%), entre estos últimos 12 casos de score intermedio (40%) y 11 casos de score alto (37%)

La expresión inmunohistoquímica de RACK1 en tumores con metástasis hepáticas fue similar a la de los tumores que no metastatizaron al hígado. Por tanto, su expresión no está asociada a las afectación metástasis hepáticas ( $p = 0,989$ ). Ver gráficos 34 y 35.

### **Expresión inmunohistoquímica de RACK1 en pacientes que fueron exitus por ccr.**

En la tabla 27 analizamos la expresión citoplasmática de los 28 pacientes que presentaron exitus por ccr. Se obtuvo baja expresión en 6 pacientes (21%) y alta expresión en 22 pacientes (79%), de estos últimos, 12 casos (43%) fueron de score intermedio y 10 casos (36%) de score alto.

Los pacientes que fueron éxitus por CCR no presentaron mayor expresión inmunohistoquímica de RACK1 que en el resto de pacientes estudiados ( $p = 0,981$ ). Ver gráficos 36 y 37.

### **Expresión inmunohistoquímica de RACK1 en pacientes que presentaron recidiva por ccr.**

En la tabla 28 analizamos la expresión citoplasmática de los 15 pacientes que presentaron recidiva de ccr. Se observó baja expresión en 4 pacientes (27%) y alta expresión en 11 pacientes (73%), de lo cuales 6 (40%) presentaron score intermedio y 5 (33%) score alto.

En pacientes que presentaron recidiva no se observó mayor expresión inmunohistoquímica de RACK1 que en el resto de la población estudiada ( $p = 0,903$ ). Ver gráficos 38 y 39.

### **RACK1 EN ADENOMAS. ANÁLISIS DESCRIPTIVO**

En las tablas 29 y 30, observamos que la evaluación citoplasmática de RACK1 se realizó en 62 casos, de los cuales 29 casos (47%) fueron negativos (score menor de 25) y 33 casos (53%) expresaron positividad. Sin embargo, 55 casos (89%)

presentaron un score bajo (de 1 a 100) y solo 7 casos (11%) un score intermedio (de 101 a 200). No hubo casos con expresión alta.

## **ANÁLISIS BIVARIADO DE LA EXPRESIÓN DE RACK1**

### **Adenocarcinoma vs. Adenoma**

Para valorar las diferencias de expresión citoplasmática de RACK1 entre adenocarcinomas y adenomas presentamos la gráfica 40, donde observamos que la expresión citoplasmática de RACK1 en el tumor primario analizada en 126 tumores presenta una expresión media de 165, mientras que analizada en 62 adenomas presentan una expresión media de 50.

Estos datos representan que la diferencia entre las medias de expresión fue de 114, con un valor estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ).

### **Margen tumoral infiltrante vs adenoma**

Al comparar la expresión RACK1 en estas muestras observamos que el margen infiltrante analizada en 67 casos presentó una expresión media de 178, mientras que analizada en 62 adenomas presentó una expresión media de 50. Esto queda reflejado en el gráfico 41.

Estos datos representan una diferencia de 128 entre las medias de expresión, significativamente mayor en el margen tumoral infiltrante ( $P < 0,001$ ).

### **Metástasis ganglionares vs adenoma.**

El gráfico 42 pone de manifiesto que la expresión citoplasmática de RACK1 en las metástasis ganglionares analizada en 30 casos presenta una expresión media de 162, mientras que analizada en 62 adenomas presentan una expresión media de 50.

Resultados significativamente mayores en las metástasis ganglionares ( $p < 0,001$ ), con una diferencia de 112 entre ambas medias de expresión.

### **Metástasis hepáticas vs adenoma.**

La expresión citoplasmática de RACK1 en las metástasis hepáticas no fue significativamente mayor que en los adenomas ( $p < 0,024$ ). En el gráfico 43 podemos observar que analizados 13 casos de metástasis hepáticas presentaron una expresión media de 85, mientras que al analizar los 62 adenomas presentaron una

expresión media de 50. Esto representa una diferencia de 35 entre ambas expresiones medias.

### **Mucosa normal vs adenoma**

Al comparar la expresión en la mucosa normal con la de los adenomas no se observaron diferencias significativas ( $p=0,055$ ). Observamos en el gráfico 44 que en la mucosa normal se analizaron 64 casos, presentando una expresión media de 68; mientras que analizada en 62 adenomas la expresión media fue de 50, con una diferencia entre ambas medias de 18.

### **Mucosa lejana vs adenoma**

La expresión inmunohistoquímica citoplasmática de RACK1 en la mucosa lejana al tumor analizada en 14 casos presenta una expresión media de 2,50, mientras que analizada en 62 adenomas presentan una expresión media de 50. Gráfico 45.

Estos datos representan una diferencia de medias de -48 con un valor estadísticamente significativo mayor en adenomas ( $p < 0,001$ ).

### **Adenomas coexistentes con adenocarcinoma vs adenomas control**

En el gráfico 46 podemos observar que la expresión citoplasmática de RACK1 en los 12 adenomas coexistentes en las piezas quirúrgicas de los pacientes con adenocarcinomas, presentó una expresión media de 62; mientras que analizada en el grupo control de los 62 adenomas presentó una expresión media de 50, dando como resultado una diferencia de medias de 12, lo cual no es un dato estadísticamente significativo ( $p=0,402$ ).

**Tabla 19. Expresión inmunohistoquímica de RACK1 en la mucosa colónica**

r

**R2\_Rack1\_Citoplasma\_MucosaNormal\_SCORE**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	NO	3	2,3	4,7	4,7
	1-100	49	36,8	76,6	81,3
	101-200	8	6,0	12,5	93,8
	201-300	4	3,0	6,3	100,0
	Total	64	48,1	100,0	
Perdidos	Sin Información	69	51,9		
Total		133	100,0		

**R2\_Rack1\_Citoplasma\_Epitelio\_SCORE**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	1-100	28	21,1	22,2	22,2
	101-200	52	39,1	41,3	63,5
	201-300	46	34,6	36,5	100,0
	Total	126	94,7	100,0	
Perdidos	Sin Información	7	5,3		
Total		133	100,0		

**R2\_Rack1\_Citoplasma\_MetastasisGanglios\_SCORE**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	1-100	6	4,5	20,0	20,0
	101-200	14	10,5	46,7	66,7
	201-300	10	7,5	33,3	100,0
	Total	30	22,6	100,0	
Perdidos	Sin Información	103	77,4		
Total		133	100,0		

**Tabla 22. Expresión inmunohistoquímica de RACK1 en el margen tumoral**

**R2\_Rack1\_Citoplasma\_MargenInfiltrante\_SCORE**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	1-100	13	9,8	19,4	19,4
	101-200	30	22,6	44,8	64,2
	201-300	24	18,0	35,8	100,0
	Total	67	50,4	100,0	
Perdidos	Sin Información	66	49,6		
Total		133	100,0		

Tabla 23. Expresión inmunohistoquímica de RACK1 según el subtipo histológico.

SCORE	1-100	101-200	201-300	Total
<b>Normal</b>	<b>20</b> 19,0%	<b>46</b> 43,8%	<b>39</b> 37,1%	<b>105</b> 100%
<b>Mucinoso</b>	<b>8</b> 38,1%	<b>6</b> 28,6%	<b>7</b> 33,3%	<b>21</b> 100%
<b>Total</b>	<b>28</b> 22,2%	<b>52</b> 41,3%	<b>46</b> 36,5%	<b>126</b> 100%

Gráfico 28. Expresión inmunohistoquímica de RACK1 según el subtipo histológico.

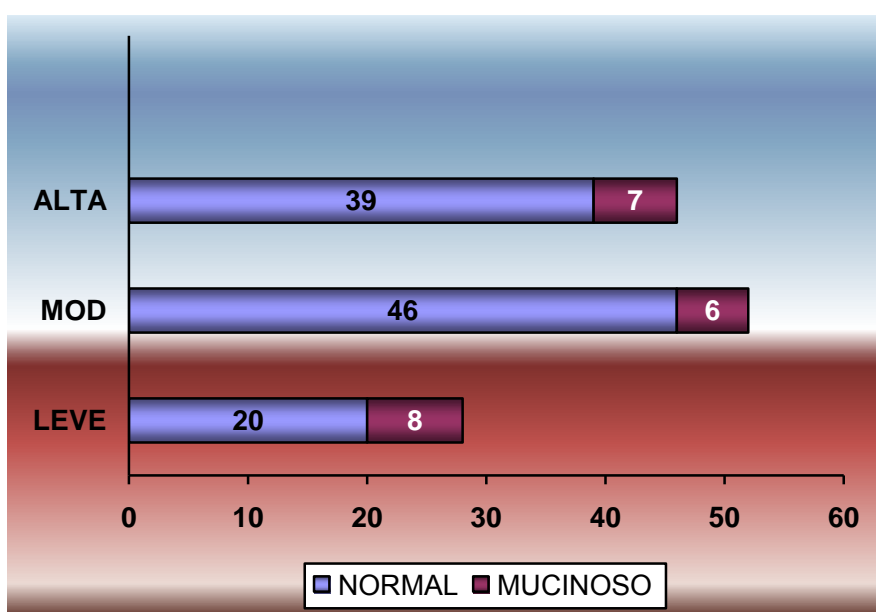


Gráfico 29. Expresión inmunohistoquímica de RACK1 según el subtipo histológico

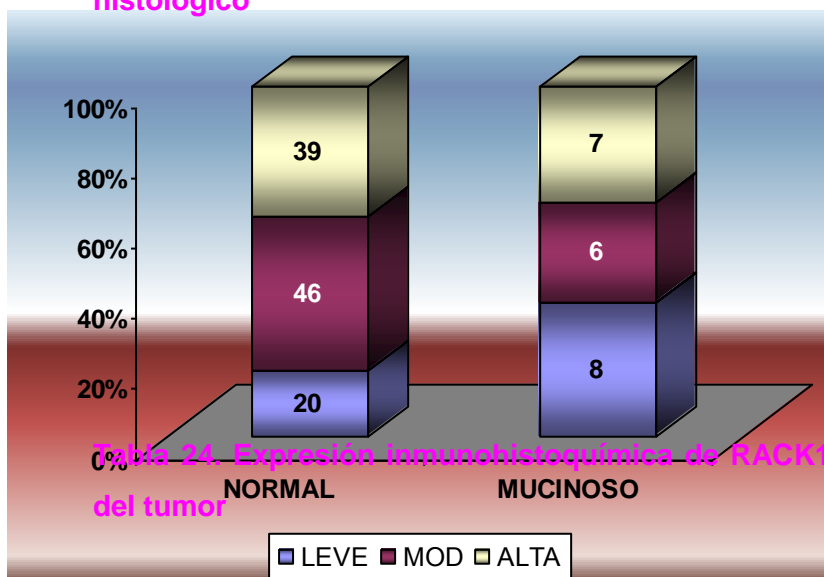


Tabla 24. Expresión inmunohistoquímica de RACK1 según el grado histológico del tumor

SCORE	1-100	101-200	201-300	Total
<b>Bajo Grado</b>	<b>25</b> 24,5%	<b>45</b> 44,1%	<b>32</b> 31,4%	<b>102</b> 100%
<b>Alto Grado</b>	<b>3</b> 12,5%	<b>7</b> 29,2%	<b>14</b> 58,3%	<b>24</b> 100%
<b>Total</b>	<b>28</b> 22,2%	<b>52</b> 41,3%	<b>46</b> 36,5%	<b>126</b> 100%

Gráfico 30. Expresión inmunohistoquímica de RACK1 según el grado histológico del tumor

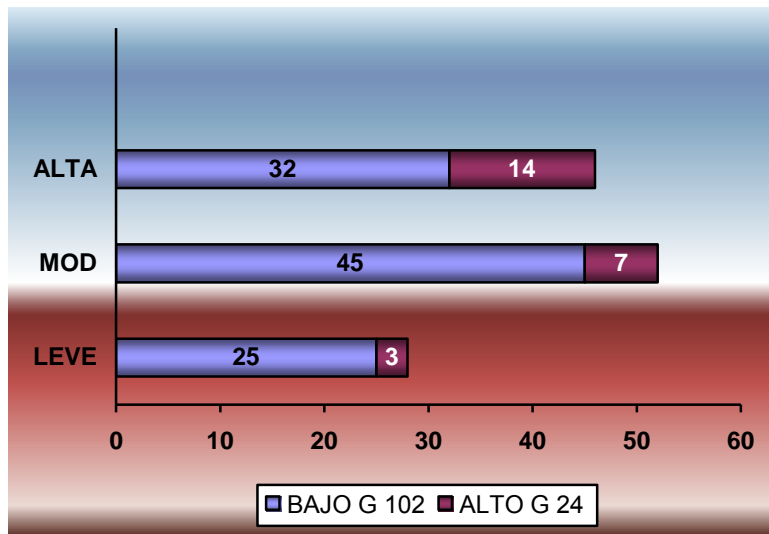


Gráfico 31. Expresión inmunohistoquímica de RACK1 según el grado histológico del tumor

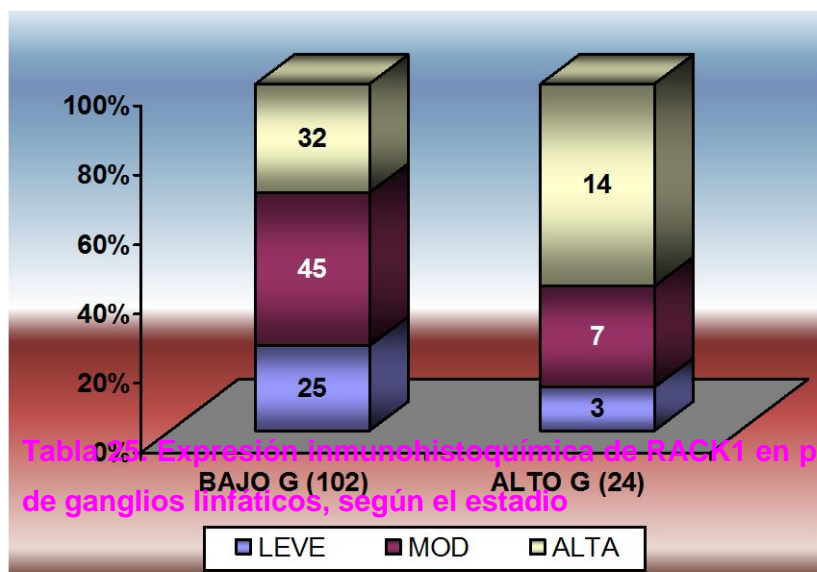


Tabla 3. Expresión inmunohistoquímica de RACK1 en pacientes con metástasis de ganglios linfáticos, según el estado



SCORE	1-100	101-200	201-300	Total
<b>Estadio 0</b>	<b>15</b> 24,6%	<b>24</b> 39,3%	<b>22</b> 36,1%	<b>61</b> 100%
<b>Estadio 1</b>	<b>11</b> 32,4%	<b>16</b> 47,1%	<b>7</b> 20,6%	<b>34</b> 100%
<b>Estadio 2</b>	<b>2</b> 6,7%	<b>11</b> 36,7%	<b>17</b> 56,7%	<b>30</b> 100%
<b>Total</b>	<b>28</b> 22,4%	<b>51</b> 40,8%	<b>46</b> 36,8%	<b>125</b> 100%

Gráfico 32. Expresión inmunohistoquímica de RACK1 en pacientes con metástasis de ganglios linfáticos, según el estadio

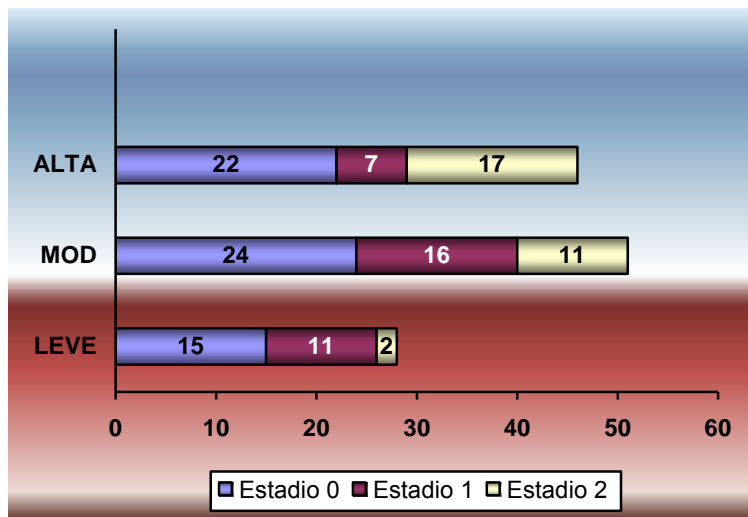


Gráfico 33. Expresión inmunohistoquímica de RACK1 en pacientes con metástasis de ganglios linfáticos, según el estadio

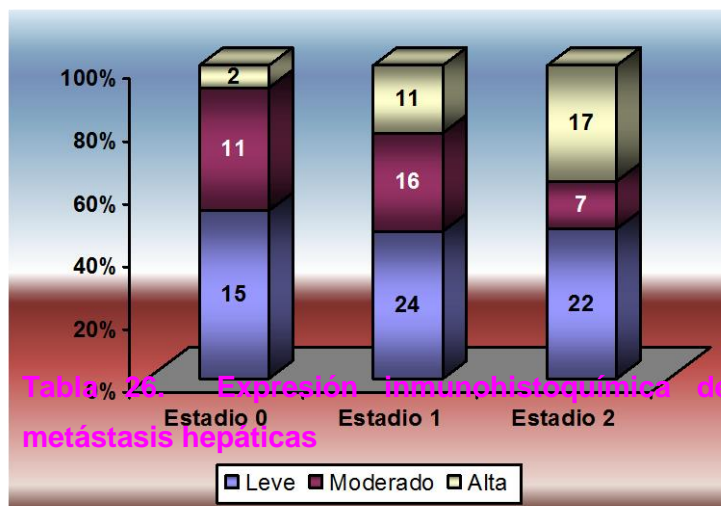
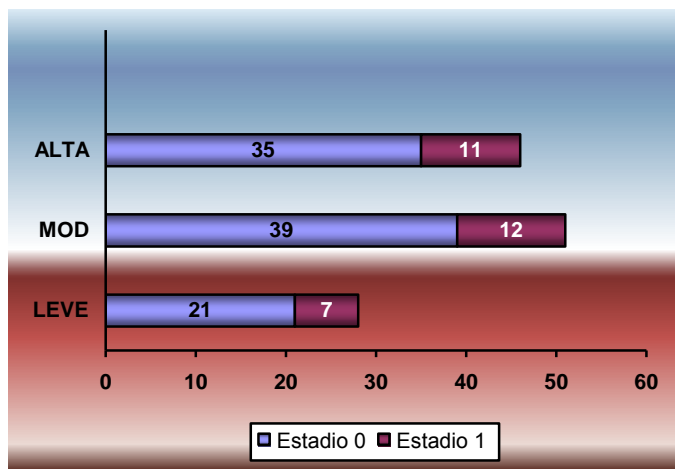


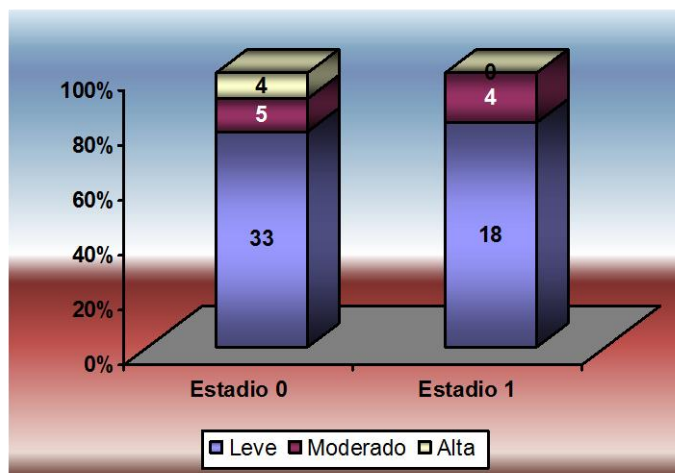
Tabla 26. Expresión inmunohistoquímica de RACK1 en pacientes con metástasis hepáticas

SCORE	1-100	101-200	201-300	Total
<b>Estadio 0</b>	<b>21</b>	<b>39</b>	<b>35</b>	<b>95</b>
	22,1%	41,1%	36,8%	100%
<b>Estadio 1</b>	<b>7</b>	<b>12</b>	<b>11</b>	<b>30</b>
	23,3%	40,0%	36,7%	100%
<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>51</b>	<b>46</b>	<b>125</b>
	22,4%	40,8%	36,8%	100%

**Gráfico 34. Expresión inmunohistoquímica de RACK1 en pacientes con metástasis hepáticas**



**Gráfico 35. Expresión inmunohistoquímica de RACK1 en pacientes con metástasis hepáticas**



**Tabla 27. Expresión inmunohistoquímica de RACK1 en pacientes que fueron exitos por ccr.**

SCORE	1-100	101-200	201-300	Total
<b>Exitus 0</b>	<b>22</b> 22,4%	<b>40</b> 40,8%	<b>36</b> 36,7%	<b>98</b> 100%
<b>Exitus 1</b>	<b>6</b> 21,4%	<b>12</b> 42,9%	<b>10</b> 35,7%	<b>28</b> 100%
<b>Total</b>	<b>28</b> 22,2%	<b>52</b> 41,3%	<b>46</b> 36,5%	<b>126</b> 100%

Gráfico 36. Expresión inmunohistoquímica de RACK1 en pacientes que fueron exitus por ccr.

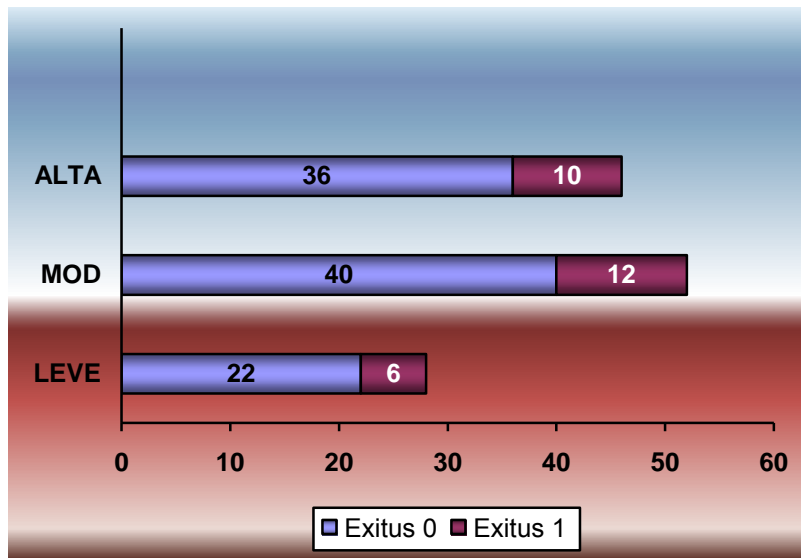


Gráfico 37. Expresión inmunohistoquímica de RACK1 en pacientes que fueron exitus por ccr.

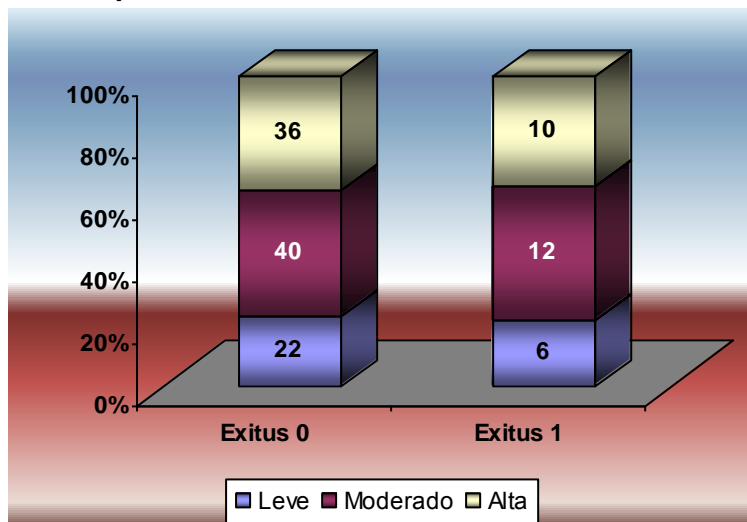


Tabla 28. Expresión inmunohistoquímica de RACK1 en pacientes que presentaron recidiva por ccr

SCORE	1-100	101-200	201-300	Total
<b>Recidiva 0</b>	<b>24</b>	<b>46</b>	<b>41</b>	<b>111</b>
	21,6%	41,4%	36,9%	100%
<b>Recidiva 1</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>15</b>
	26,7%	40,0%	33,3%	100%
<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>52</b>	<b>46</b>	<b>126</b>
	22,2%	41,3%	36,5%	100%

Gráfico 38. Expresión inmunohistoquímica de RACK1 en pacientes que presentaron recidiva por ccr

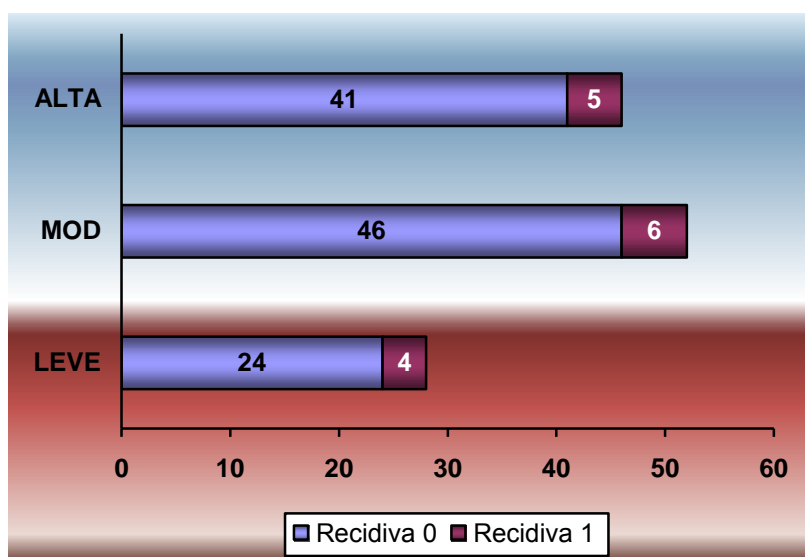
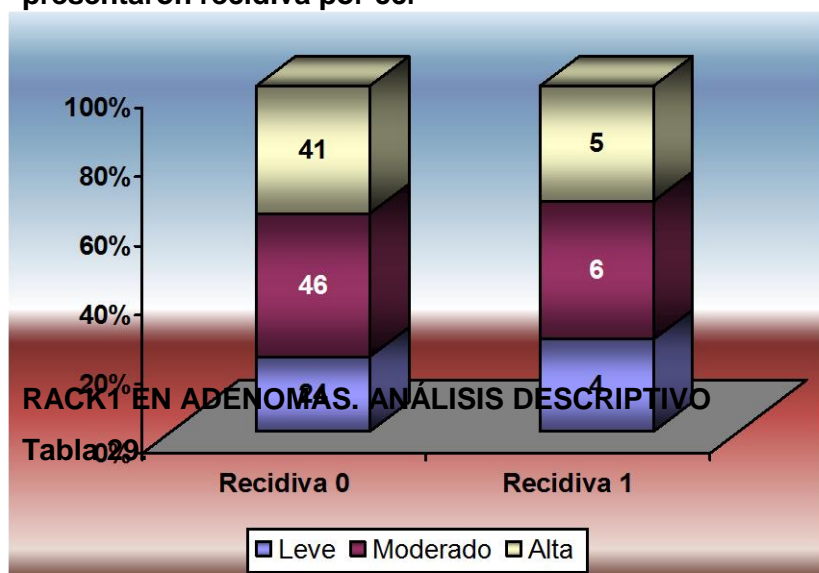


Gráfico 39. Expresión inmunohistoquímica de RACK1 en pacientes que presentaron recidiva por ccr



**Positivo25\_Rack1\_Citoplasma\_Adenoma\_SCORE**

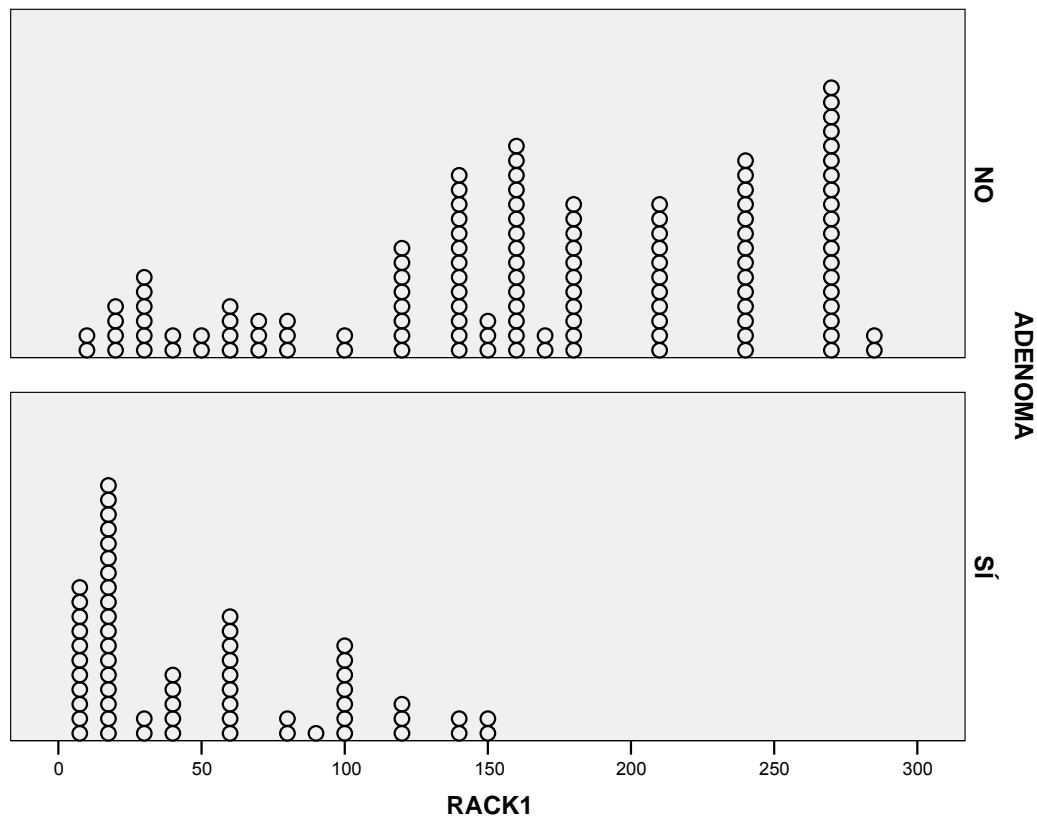
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	0 Negativo (< 25)	29	46,8	46,8	46,8
	1 Positivo (>= 25)	33	53,2	53,2	100,0
	Total	62	100,0	100,0	

**Tabla 30**

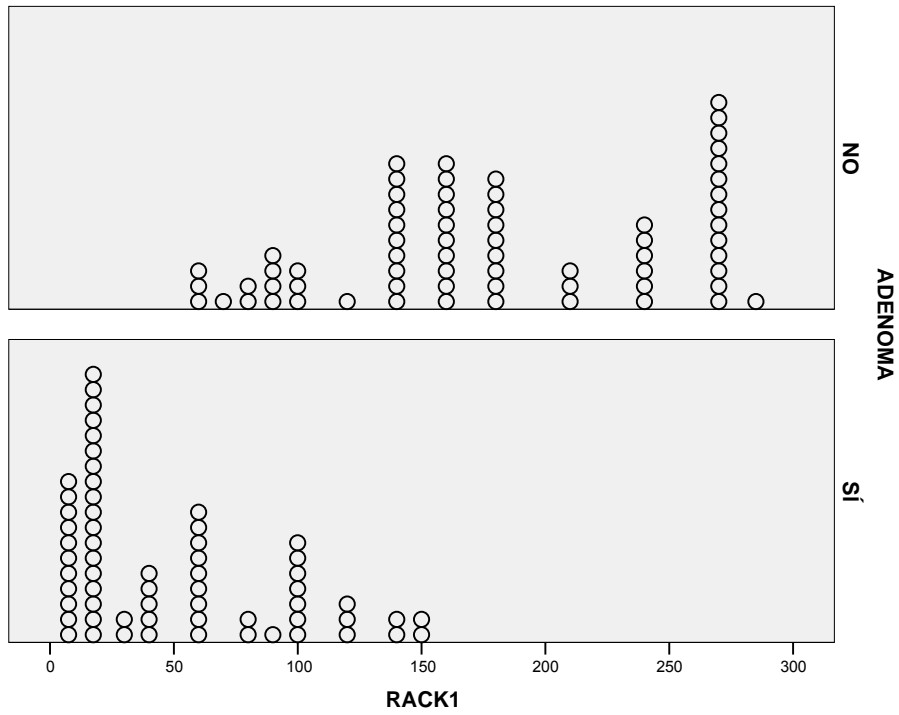
**R2\_Rack1\_Citoplasma\_Adenoma\_SCORE**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	1 1-100	55	88,7	88,7	88,7
	2 101-200	7	11,3	11,3	100,0
	Total	62	100,0	100,0	

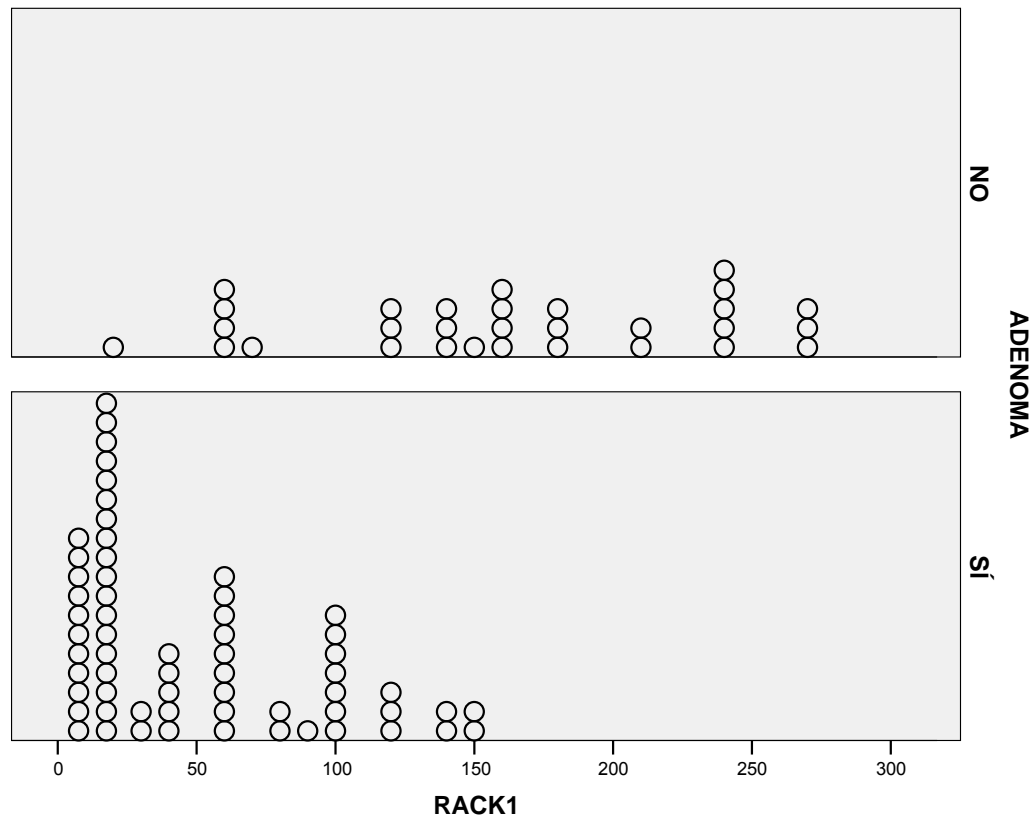
**Gráfico 40. Expresión citoplasmática de RACK1 entre adenocarcinomas y adenomas**



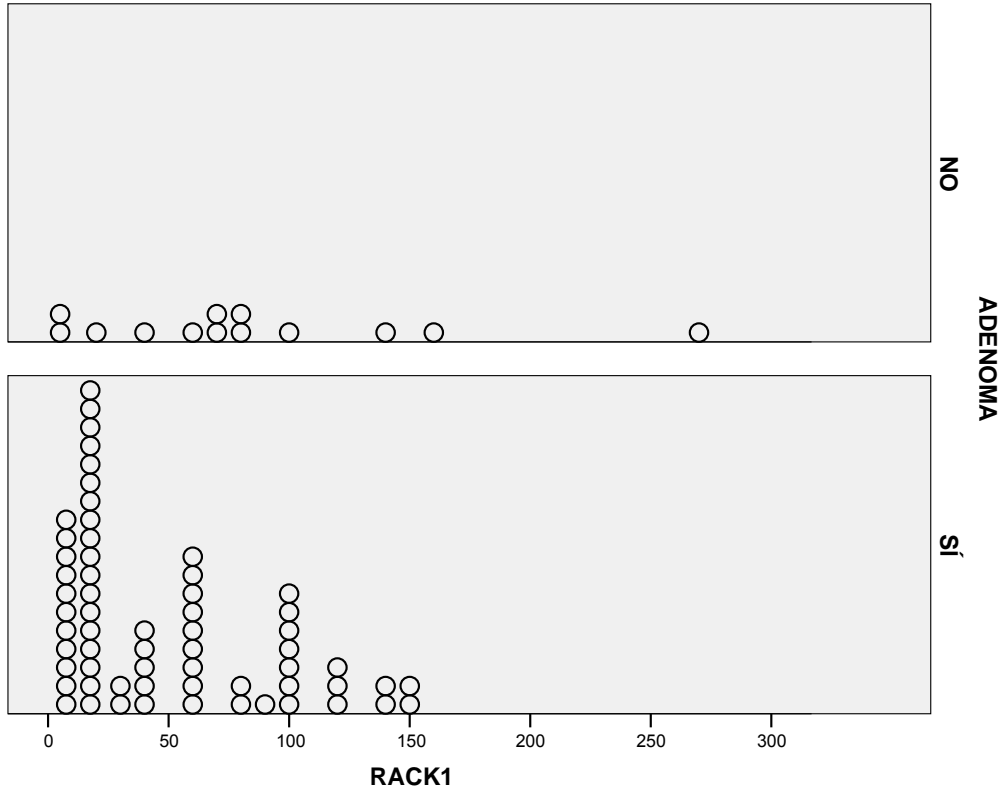
**Gráfico 41. Expresión citoplasmática de RACK1 entre tumoral infiltrante y adenomas**



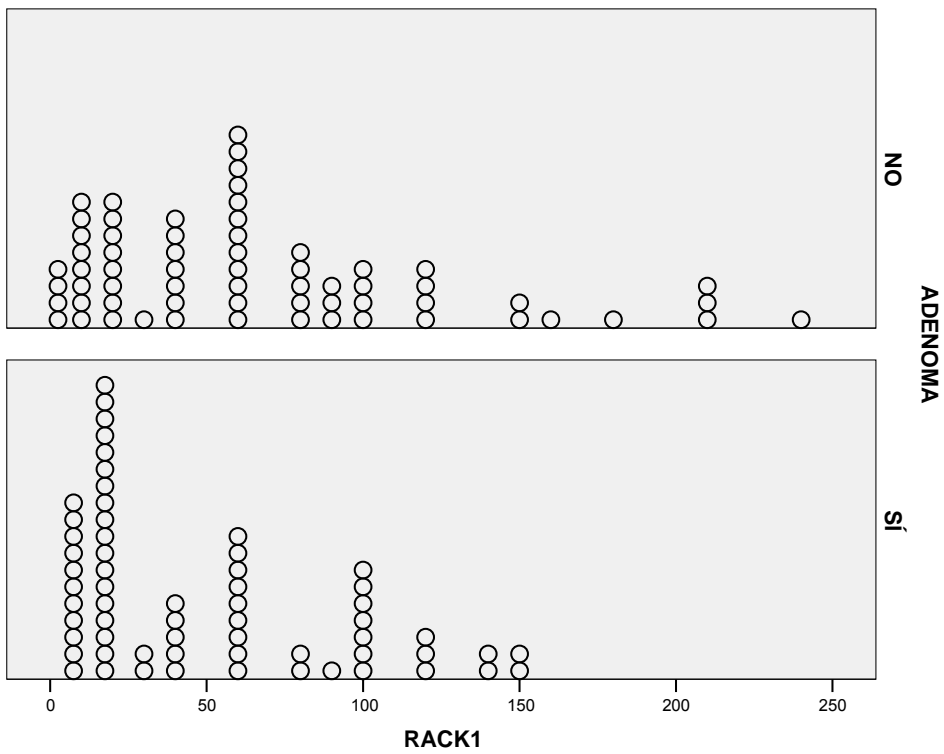
**Gráfico 42. Expresión citoplasmática de RACK1 entre metástasis ganglionares y adenomas**



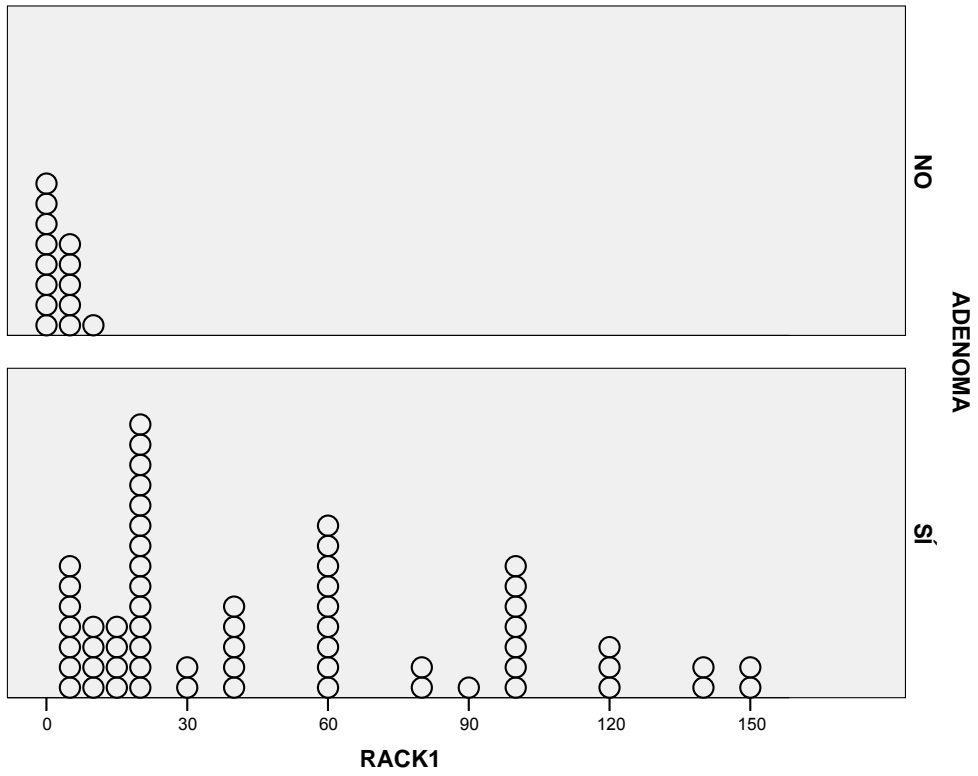
**Gráfico 43. Expresión citoplasmática de RACK1 entre metástasis hepáticas y adenomas**



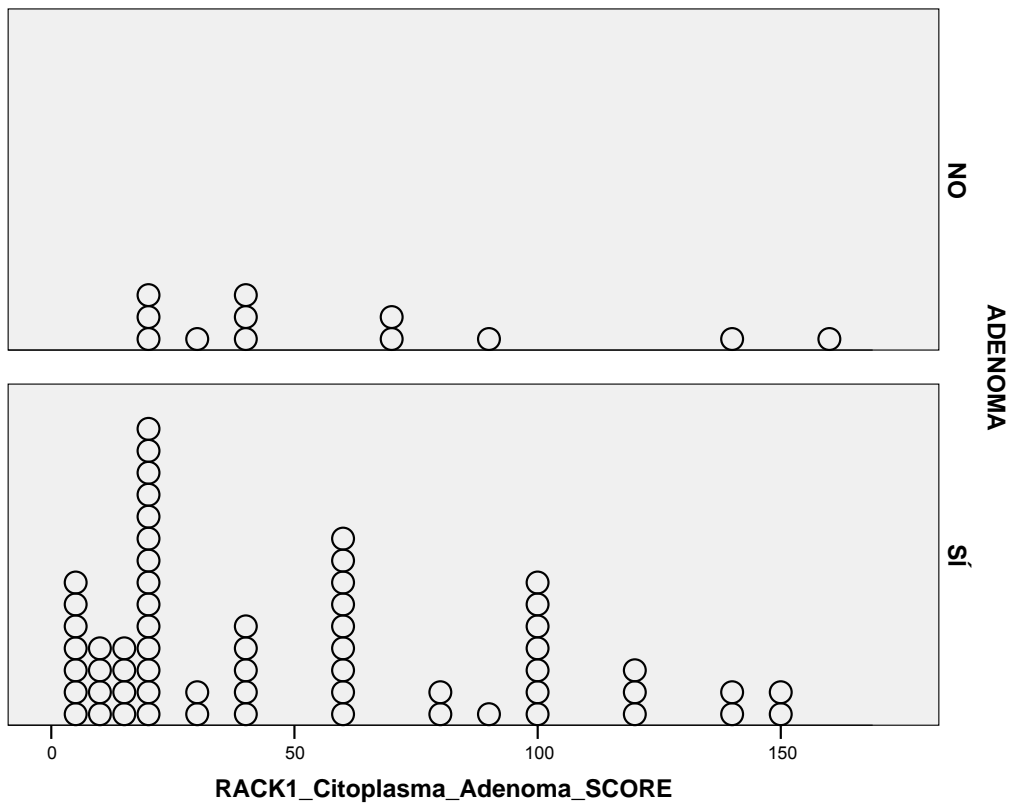
**Gráfico 44. Expresión citoplasmática de RACK1 entre mucosa normal y adenomas**



**Gráfico 45. Expresión citoplasmática de RACK1 entre mucosa lejana al tumor y adenomas**



**Gráfico 46. Expresión citoplasmática de RACK1 entre adenomas coexistentes con adenocarcinoma vs adenomas control**





## **ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE p53 EN TUMORES COLORRECTALES**

### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en la mucosa normal lejana al tumor**

Para tener una representación de la expresión inmunohistoquímica basal de p53, se evaluaron como control mucosas no tumorales de 26 casos de la serie. En la tabla 31 observamos que, todos ellos (100%) presentaron un porcentaje de expresión menor de 10 (por tanto, menor de 20).

### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en la mucosa normal cercana al tumor**

Para evaluar las diferencias de expresión en relación a la distancia al tumor primario, este parámetro se analizó en 35 casos de la serie, todos ellos (100%) con un porcentaje de expresión menor de 10, como se observa en la tabla 32.

### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario**

De las 66 piezas quirúrgicas estudiadas, el 46% (30 casos) presentaron una expresión menor de 20 y el 54% (36 casos) un porcentaje de expresión mayor de 20, como se observa en la tabla 33.

### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis ganglionares**

Observamos que al analizar este parámetro en 19 casos, el 21% (4 casos) presentaron un porcentaje de expresión menor de 20 y el 79% (15 casos) un porcentaje de expresión mayor de 20, como se observa en la tabla 34.

### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación a su localización**

Esta expresión fue estudiada en 66 piezas, 26 tumores de colon derecho, 23 de colon izquierdo y 17 de recto. Del grupo de colon derecho, el 42% (11 casos) fueron positivos y el 58% (15 casos) fueron negativos. Mientras que en el colon izquierdo, el 56% (13 casos) expresaron positividad y el 44% (10 casos) fueron negativos. En los tumores rectales primarios se observó un aumento gradual de expresión con respecto a los tumores del resto del colon, con el 71% (12 casos) de positivos y el 29% (5 casos) de negativos, sin alcanzar diferencias significativas ( $p=0,185$ ). Tabla 35, gráfico 47 y gráfico 48.

### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al subtipo histológico**

En la tabla 36, observamos que estos parámetros se analizaron en 66 casos de la serie, 53 casos de subtipo convencional y, 13 de subtipo mucinoso. Del subtipo convencional, 23 fueron negativos (43%) y 30 positivos (57%). Del subtipo mucinoso, 7 fueron negativos (54%) y 6 positivos (46%). Por tanto, el subtipo histológico en el tumor primario no influye en el grado de expresión ( $p=0,547$ ). Ver gráficos 49 y 50.

### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al grado histológico**

En la tabla 37, observamos que estos parámetros se analizaron en 66 casos de la serie, 53 casos de bajo grado histológico y, 13 de alto grado. Del grupo de bajo grado, 26 fueron negativos (49%) y 27 positivos (51%); y en el grupo de alto grado, 4 fueron negativos (31%) y 9 positivos (69%). Aunque el porcentaje de expresión de positividad aumentó en los tumores de alto grado histológico, este incremento no fue estadísticamente significativo cuando se comparó con la expresión en los de bajo grado. ( $p=0,353$ ). Ver gráficos 51 y 52.

### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis hepáticas en relación al grado histológico**

Como podemos observar en la tabla 38, estas variables se analizaron en 13 casos, 3 casos de bajo grado y 4 de alto grado histológico. Pudimos constatar que la expresión en las metástasis hepáticas no se modifica significativamente ( $p=1,000$ ) en función del grado histológico, teniendo en cuenta que en el grupo de bajo grado histológico, 3 fueron negativos (43%) y 4 positivos (57%); y en el grupo de alto grado, 2 fueron negativos (33%) y 4 positivos (67%). Ver gráficos 53 y 54.

### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis ganglionares en relación al grado histológico**

En la tabla 39, analizamos estas variables en 19 casos de la serie, 12 de bajo grado y 7 de alto grado histológico. Del grupo de bajo grado, 2 fueron negativos (17%) y 10 positivos (83%); y del grupo de alto grado, 2 fueron negativos (29%) y 5 positivos (71%). De esta manera podemos constatar que la diferencia de expresión en las

metástasis ganglionares en relación al grado histológico no es significativa ( $p=0,603$ ). Ver gráficos 55 y 56.

#### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al estadio TNM. Análisis en relación al estadio T**

En la tabla 40, observamos que el estadio T se analizó en 66 casos de la serie, 7 casos en estadios T1 y T2; 52 casos en estadio T3; y 7 casos en estadio T4. De los casos en estadios T1 y T2, 5 fueron negativos (71%) y 2 positivos (29%). De los casos en estadio T3, 22 (42%) casos fueron negativos y 30 positivos (58%). De los casos en estadio T4, 3 casos fueron negativos (43%) y 4 positivos (57%). La expresión en el tumor primario en relación al estadio T, no presentó diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,344$ ). Ver gráficos 57 y 58.

#### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al estadio TNM. Análisis en relación al estadio N**

Según lo observado en la tabla 41, el estadio N se analizó en 66 casos de la serie, 35 casos en estadios N0; 17 casos en estadio N1; y 14 casos en estadio N2. De los casos en estadios N0, 19 casos fueron negativos (54%) y 16 positivos (46%). De los casos en estadio N1, 5 casos fueron negativos (29%) y 12 positivos (71%). De los casos en estadio N2, 6 casos fueron negativos (43%) y 8 positivos (57%). Teniendo como resultado estos valores, podemos decir que la expresión en el tumor primario en relación al estadio N, no presentó modificaciones estadísticamente significativas ( $p=0,234$ ). Ver gráficos 59 y 60.

#### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al estadio TNM. Análisis en relación al estadio M.**

En la tabla 42 observamos que se analizaron 66 casos de tumores primarios, 53 casos en estadios M0; 13 casos en estadio M1. De los casos en estadio M0, 24 casos fueron negativos (45%) y 29 positivos (55%). De los casos en estadio M1, 6 casos fueron negativos (46%) y 7 positivos (54%). Como podemos comprobar en la tabla , la expresión del tumor primario no presentó diferencias significativas cuando se valoró en función de la presencia o no de metástasis hepáticas ( $p=1,000$ ). Ver gráficos 61 y 62.

### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al número de ganglios afectados**

En la tabla 43, observamos que estas variables se relacionaron en 66 casos de la serie, 36 tumores no presentaron afectación ganglionar, 18 tumores presentaron de 1 a 3 ganglios afectados y 12 tumores presentaron afectación de más de 3 ganglios. De los tumores que no presentaron afectación ganglionar, 19 fueron negativos (53%) y 17 positivos (47%). De los tumores que presentaron de 1 a 3 ganglios afectados, 5 casos fueron negativos (28%) y 13 positivos (72%). De los tumores que presentaron más de 3 ganglios afectados, 6 casos fueron negativos (50%) y 6 positivos (50%). Con los valores anteriores podemos constatar que la expresión en el tumor primario no presentó diferencias significativas en relación al número de ganglios afectados, ( $p=0,207$ ). Ver gráficos 63 y 64.

### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación a los pacientes que fueron éxitus**

En la tabla 44, observamos que estas variables se estudiaron en 66 casos, de los cuales 49 permanecieron vivos y 17 fueron éxitus. De los pacientes que permanecieron vivos, 22 casos fueron negativos (45%) y 27 positivos (55%). De los pacientes que fueron éxitus, 8 casos fueron negativos (47%) y 9 positivos (53%). Tal como observamos en la tabla, la expresión en el tumor primario fue muy similar en los pacientes que fueron éxitus y en aquellos que permanecieron vivos, por tanto la diferencia de expresión no fue significativa ( $p=1,000$ ). Ver gráficos 65 y 66.

### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis hepáticas en relación a los pacientes que fueron éxitus**

En la tabla 45, observamos que estas variables se relacionaron en 13 casos de la serie, de los cuales 4 permanecieron vivos y 9 fueron éxitus. De los pacientes que permanecieron vivos, 2 casos fueron negativos (50%) y 2 positivos (50%). De los pacientes que fueron éxitus, 3 casos fueron negativos (33%) y 6 positivos (67%). La expresión en las metástasis hepáticas fue más frecuente en los pacientes fallecidos que en el resto, pero sin alcanzar diferencia estadísticamente significativa ( $p=1,000$ ). Ver gráficos 67 y 68.

### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis ganglionares en relación a los pacientes que fueron éxitus**

En la tabla 46, observamos que estas variables se relacionaron en 19 casos, de los cuales 12 permanecieron vivos y 7 fueron éxitus. De los pacientes que permanecieron vivos, 4 casos fueron negativos (33%) y 8 positivos (67%). De los pacientes que fueron éxitus, los 7 fueron positivos (100%). Como podemos observar en la tabla, a diferencia de los pacientes que no fallecieron, todos los fallecidos expresaron positividad en las metástasis ganglionares, sin embargo este resultado no fue significativo ( $p=0,245$ ). Ver gráficos 69 y 70

### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación a los pacientes que fueron éxitus por CCR**

En la tabla 47, observamos que estas variables se relacionaron en 66 casos, de los cuales 13 fueron éxitus por el ccr, siendo 6 casos negativos (46%) y 7 positivos (54%). La expresión en el tumor primario en relación a los pacientes que fueron éxitus por ccr, no presentó diferencias estadísticamente significativas ( $p=1,000$ ), cuando lo comparamos con el resto de pacientes. Ver gráficos 71 y 72

### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación a los pacientes vivos con enfermedad.**

Observamos no hubo diferencias de expresión significativas ( $p=1,000$ ) en el tumor primario en relación a los pacientes que siguieron vivos con enfermedad comparados con el resto. En la tabla 48 podemos observar que estas variables se relacionaron en 66 casos, de los cuales 20 pacientes permanecieron vivos con enfermedad, siendo 9 negativos (45%) y 11 positivos (55%). Los 46 pacientes restantes, presentaron un perfil de expresión muy similar, con 21 casos (46%) negativos y 25 casos (54%) positivos. Ver gráficos 73 y 74.

### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis hepáticas en relación a los pacientes vivos con enfermedad.**

En la tabla 49, se observa que estas variables se estudiaron en 13 casos, de los cuales 11 pacientes permanecieron vivos con enfermedad, siendo 5 negativos (45%) y 6 positivos (55%). Los otros 2 pacientes expresaron positividad en el 100% (2 casos)

de las metástasis hepáticas. De tal manera que la expresión en las metástasis hepáticas en relación a los pacientes que permanecieron vivos con enfermedad, no presentó diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,487$ ). Ver gráficos 75 y 76.

#### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis ganglionares en relación a los pacientes vivos con enfermedad.**

En la tabla 50, observamos que estas variables se relacionaron en 19 casos de la serie, de los cuales 9 pacientes permanecieron vivos con enfermedad, siendo 2 negativos (22%) y 7 positivos (78%). En los 10 casos restantes, 2 casos (20%) fueron negativos y 8 (80%) positivos. La expresión en las metástasis ganglionares en relación a los pacientes que permanecieron vivos con enfermedad, no presentó diferencias estadísticamente significativas ( $p=1,000$ ). Ver gráficos 77 y 78.

#### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación a los pacientes que presentaron recidivas.**

En la tabla 51, observamos que estas variables se relacionaron en 66 casos de la serie, de los cuales 9 pacientes permanecieron vivos con enfermedad, siendo 4 negativos (44%) y 5 positivos (56%). En los otros 57 pacientes, 26 casos (46%) fueron negativos y 31 casos (54%) fueron positivos. La expresión en el tumor primario en relación a los pacientes que presentaron recidivas, fue muy similar que en el resto de los pacientes, sin diferencias significativas ( $p=1,000$ ). Ver gráficos 79 y 80.

#### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis hepáticas en relación a los pacientes que presentaron recidivas**

En la tabla 52, observamos que estas variables se relacionaron en 13 casos, de los cuales 1 correspondía a un paciente vivo con enfermedad, siendo positivo. En los otros 12 casos, se observó el 42% (5 casos) de negatividad y el 58% (7 casos) con expresión positiva. Por tanto, la expresión en las metástasis hepáticas en relación a los pacientes que permanecieron vivos con enfermedad, no presentó diferencias estadísticamente significativas ( $p=1,000$ ). Ver gráficos 81 y 82.

### **Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis ganglionares en relación a los pacientes que presentaron recidivas**

En la tabla 53, observamos que estas variables se relacionaron en 19 casos de la serie, de los cuales 5 correspondían a pacientes vivos con enfermedad, siendo 2 casos negativos (40%) y 3 positivos (60%). En los otros 14 casos, se observaron 2 casos (14%) negativos y 12 casos (86%) con expresión positiva. La expresión en las metástasis ganglionares en relación a los pacientes que permanecieron vivos con enfermedad, no presentó diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,272$ ). Ver gráficos 83 y 84.

### **p53 EN ADENOMAS. DESCRIPTIVA**

En la tabla 54, observamos que la evaluación nuclear de p53 se realizó en 62 casos, de los cuales 42 casos (67,7%) presentaron negatividad (porcentaje  $\leq 10$ ) y 20 casos (32,3%) expresaron positividad.

## **ANÁLISIS BIVARIADO SEGÚN VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS**

### **Adenocarcinoma vs adenoma.**

En el gráfico 85, se observa que al analizar la expresión de p53 en el tumor primario en 69 casos presentó una media de 48, mientras que analizada en el grupo de los 62 adenomas presentó una media de 13.

Estos resultados representan una diferencia de medias de 35, lo cual indica una clara sobreexpresión significativa ( $p < 0,001$ ) en los tumores primarios cuando se compara con el grupo de adenomas.

### **Margen tumoral infiltrante vs adenoma.**

Al igual que en el tumor primario propiamente dicho, la expresión de p53 en el margen infiltrante presentó una sobreexpresión significativa ( $p < 0,001$ ) comparada con el grupo de adenomas, con una diferencia de medias de 30. Este hecho queda reflejado en el gráfico 86, en donde podemos observar que analizados 27 casos del margen

tumoral infiltrante obtuvimos una expresión media de 42; mientras que analizada en los 62 adenomas la expresión media fue de 13.

### **Metástasis ganglionares vs adenoma.**

La expresión de p53 en las metástasis ganglionares analizada en 19 casos presentó una expresión media de 49; mientras que analizada en los 62 adenomas presentó una expresión media de 13. En el gráfico 87 se pone de manifiesto que la sobreexpresión en las metástasis ganglionares es significativa ( $p < 0,001$ ), con una diferencia de medias de 36.

### **Metástasis hepáticas vs adenoma.**

En la gráfica 88, podemos observar que la expresión de p53 en las metástasis hepáticas analizada en 13 casos presentó una media de 47, mientras que analizada en 62 adenomas presentó una expresión media de 13, por consiguiente la diferencia de medias es de 34, lo cual tiene un valor significativo ( $p = 0,004$ ).

### **Mucosa normal vs adenoma.**

Cuando valoramos la expresión de p53 en la mucosa normal de 35 casos presentó una expresión media de 0, mientras que analizada en los 62 adenomas presentó una expresión media de 13, por consiguiente podemos observar que la diferencia de medias de expresión es de 13, la cual es significativa ( $p < 0,001$ ). La sobreexpresión en los adenomas puede apreciarse en el gráfico 89.

**Tabla 31 Expresión inmunohistoquímica de p53 en la mucosa normal lejana al tumor**

<b>Positvo10_p53_Nucleo_MucosaNormalLejana_Porcentaje</b>					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Negativo ( $\leq 10$ )	26	19,5	100,0	100,0
Perdidos	Sin Información	107	80,5		
Total		133	100,0		



**Tabla 32 Expresión inmunohistoquímica de p53 en la mucosa normal cercana al tumor**

<b>Positvo10_p53_Nucleo_MucosaNormalCercana_Porcentaje</b>					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Negativo (<=10)	35	26,3	100,0	100,0
Perdidos	Sin Información	98	73,7		
<b>Total</b>		<b>133</b>	<b>100,0</b>		

**Tabla 33 Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario**

<b>Positvo20_p53_Nucleo_Epitelio_Porcentaje</b>					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Negativo (<=20)	30	22,6	45,5	45,5
	Positivo (>20)	36	27,1	54,5	100,0
	<b>Total</b>	<b>66</b>	<b>49,6</b>	<b>100,0</b>	
Perdidos	Sin Información	67	50,4		
<b>Total</b>		<b>133</b>	<b>100,0</b>		

**Tabla 34 Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis ganglionares**

Positivo20_p53_Nucleo_MetastasisGanglios_Porcentaje					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Negativo (<=2)	4	3,0	21,1	21,1
	Positivo (>20)	15	11,3	78,9	100,0
	Total	19	14,3	100,0	
Perdidos	Sin Información	114	85,7		
Total		133	100,0		

Tabla 35 Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación a su localización

SCORE	Negativo (≤20)	Positivo (>20)	Total
<b>Derecho</b>	<b>15</b> 57,7%	<b>11</b> 42,3%	<b>26</b> 100%
<b>Izquierdo</b>	<b>10</b> 43,5%	<b>13</b> 56,5%	<b>23</b> 100%
<b>Recto</b>	<b>5</b> 29,4%	<b>12</b> 70,6%	<b>17</b> 100%
<b>Total</b>	<b>30</b> 45,5%	<b>36</b> 54,5%	<b>66</b> 100%

Gráfico 47. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación a su localización

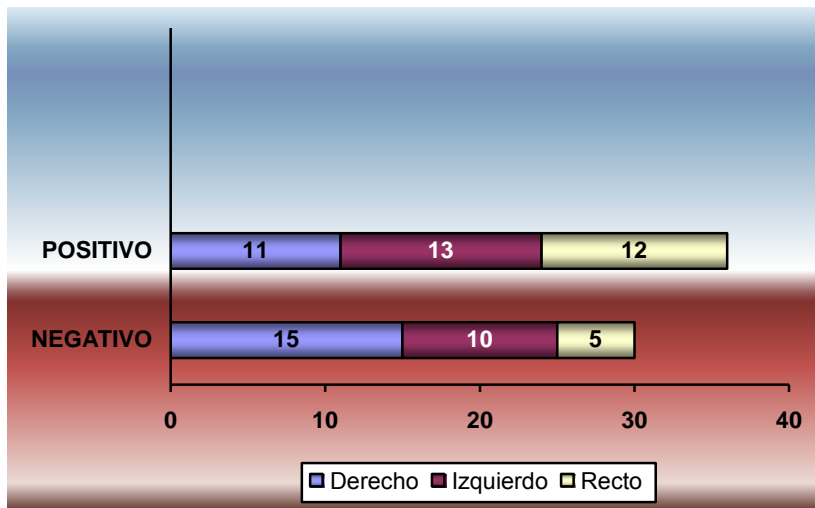
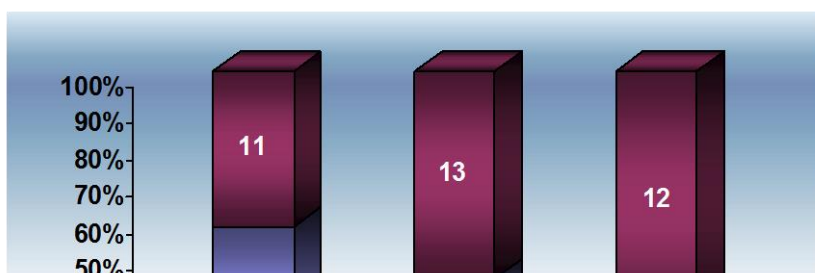


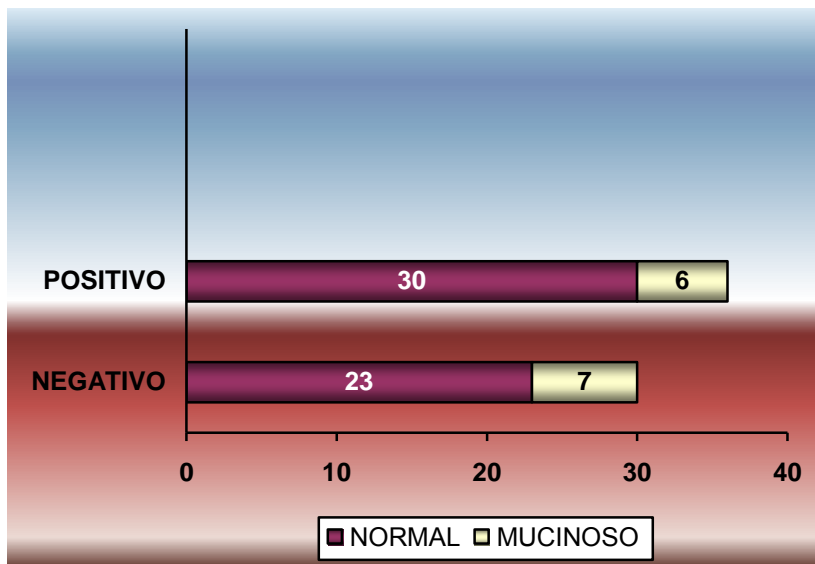
Gráfico 48. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación a su localización



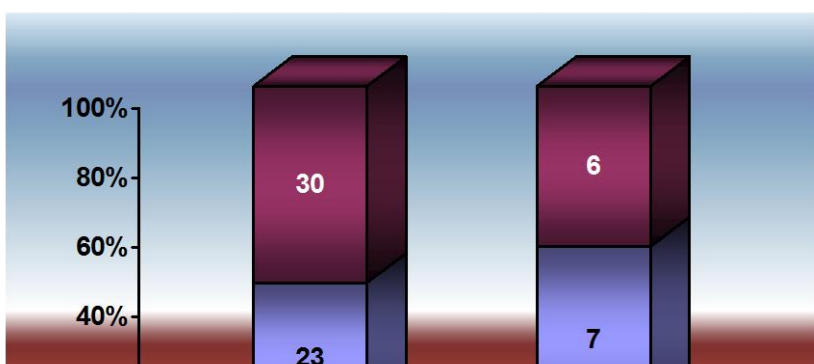
**Tabla 36. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al subtipo histológico**

<b>SCORE</b>	<b>Negativo (≤20)</b>	<b>Positivo (&gt;20)</b>	<b>Total</b>
<b>Normal</b>	<b>23</b> 43,4%	<b>30</b> 56,6%	<b>53</b> 100%
<b>Mucinoso</b>	<b>7</b> 53,8%	<b>6</b> 46,2%	<b>13</b> 100%
<b>Total</b>	<b>30</b> 45,5%	<b>36</b> 54,5%	<b>66</b> 100%

**Gráfico 49. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al subtipo histológico**



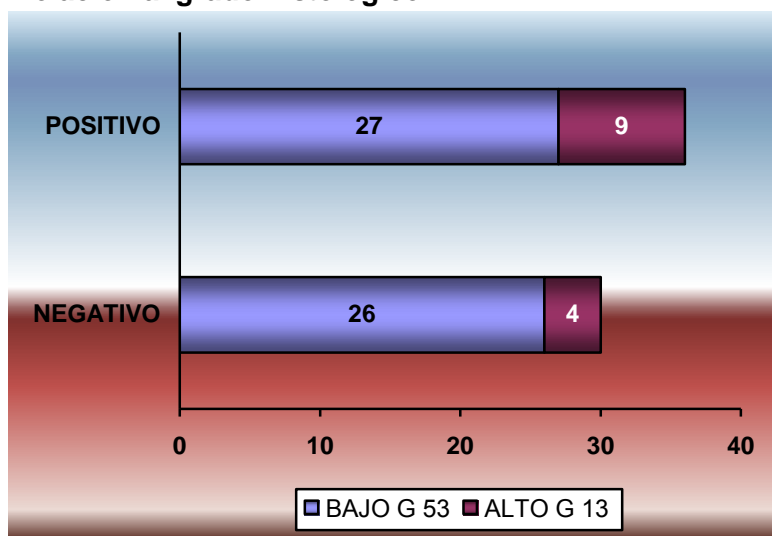
**Gráfico 50. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al subtipo histológico**



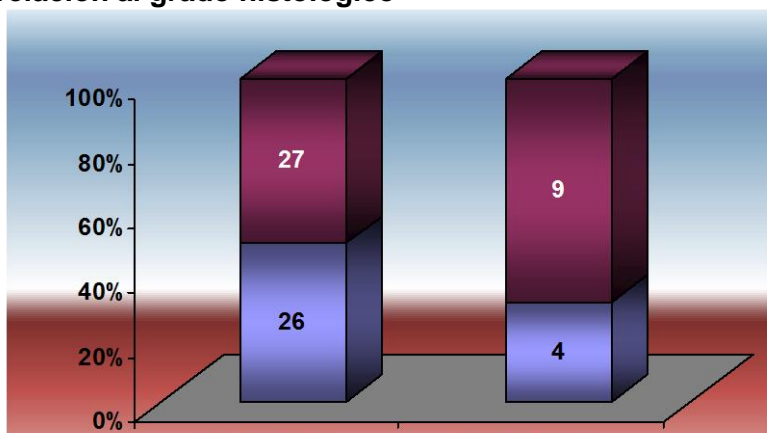
**Tabla 37 Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al grado histológico**

<b>SCORE</b>	Negativo ( $\leq 20$ )	Positivo ( $> 20$ )	Total
<b>Bajo Grado</b>	<b>26</b> 49,1%	<b>27</b> 50,9%	<b>53</b> 100%
<b>Alto Grado</b>	<b>4</b> 30,8%	<b>9</b> 69,2%	<b>13</b> 100%
<b>Total</b>	<b>30</b> 45,5%	<b>36</b> 54,5%	<b>66</b> 100%

**Gráfico 51. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al grado histológico**



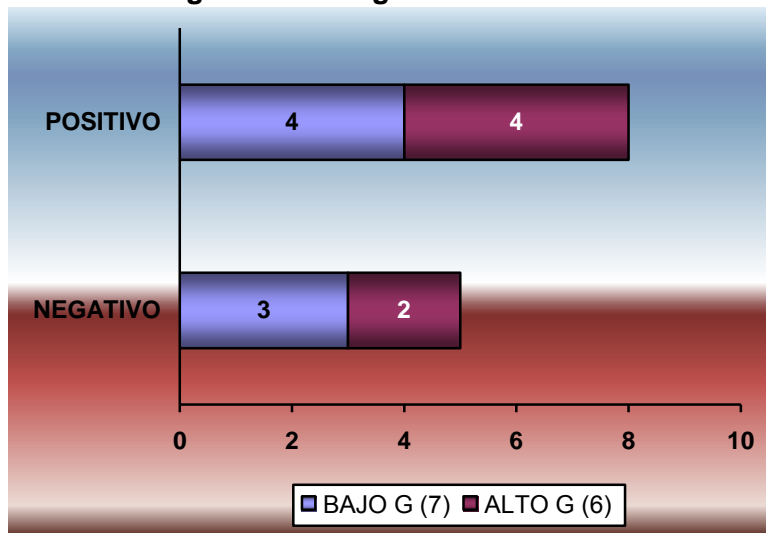
**Gráfico 52. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al grado histológico**



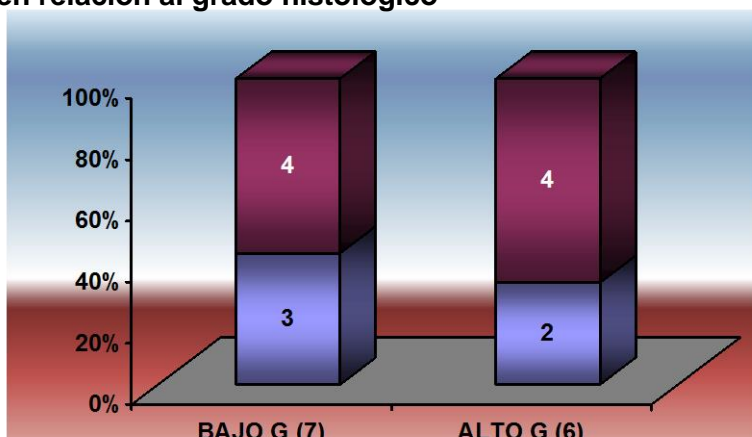
**Tabla 38. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis hepáticas en relación al grado histológico**

<b>SCORE</b>	Negativo ( $\leq 20$ )	Positivo ( $>20$ )	Total
<b>Bajo Grado</b>	<b>3</b> 42,9%	<b>4</b> 57,1%	<b>7</b> 100%
<b>Alto Grado</b>	<b>2</b> 33,3%	<b>4</b> 66,7%	<b>6</b> 100%
<b>Total</b>	<b>5</b> 38,5%	<b>8</b> 61,5%	<b>13</b> 100%

**Gráfico 53. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis hepáticas en relación al grado histológico**



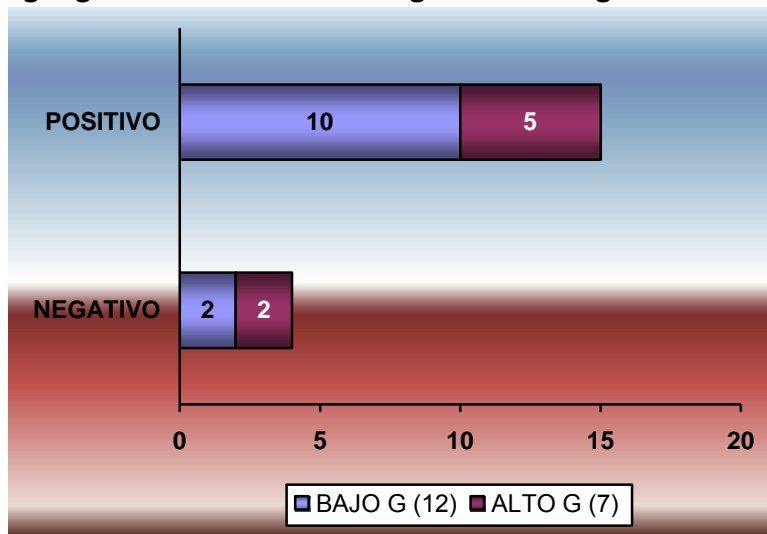
**Gráfico 54. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis hepáticas en relación al grado histológico**



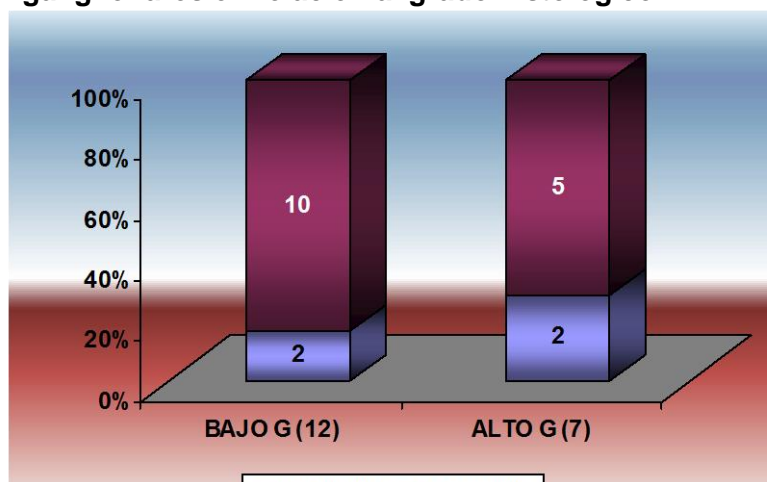
**Tabla 39 Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis ganglionares en relación al grado histológico**

<b>SCORE</b>	Negativo ( $\leq 20$ )	Positivo ( $>20$ )	Total
<b>Bajo Grado</b>	2 16,7%	10 83,3%	12 100%
<b>Alto Grado</b>	2 28,6%	5 71,4%	7 100%
<b>Total</b>	4 21,1%	15 78,9%	19 100%

**Gráfico 55. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis ganglionares en relación al grado histológico**



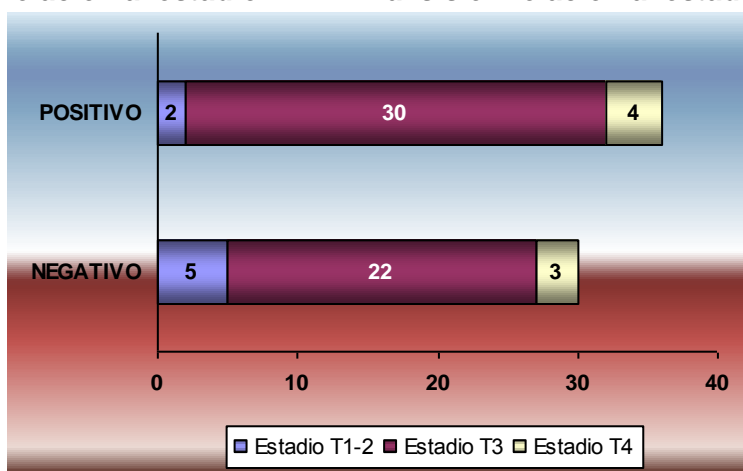
**Gráfico 56. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis ganglionares en relación al grado histológico**



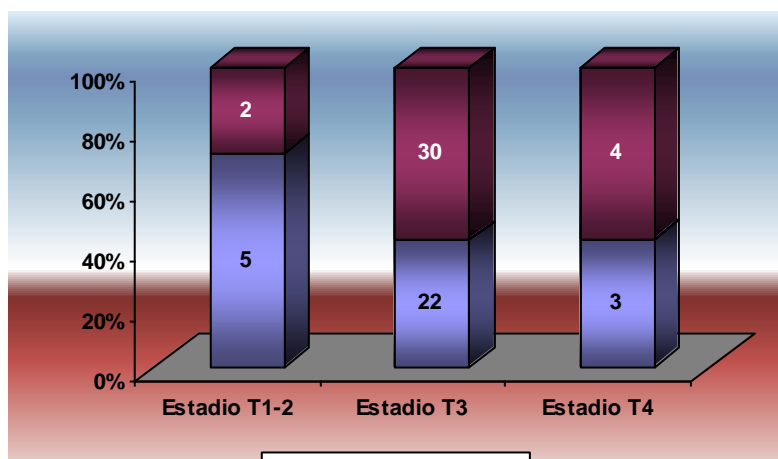
**Tabla 40 Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al estadio TNM. Análisis en relación al estadio T**

<b>SCORE</b>	Negativo ( $\leq 20$ )	Positivo ( $>20$ )	Total
<b>Estadio T1-2</b>	<b>5</b> 71,4%	<b>2</b> 28,6%	<b>7</b> 100%
<b>Estadio T3</b>	<b>22</b> 42,3%	<b>30</b> 57,7%	<b>52</b> 100%
<b>Estadio T4</b>	<b>3</b> 42,9%	<b>4</b> 57,1%	<b>7</b> 100%
<b>Total</b>	<b>30</b> 45,5%	<b>36</b> 54,5%	<b>66</b> 100%

**Gráfico 57. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al estadio TNM. Análisis en relación al estadio T**



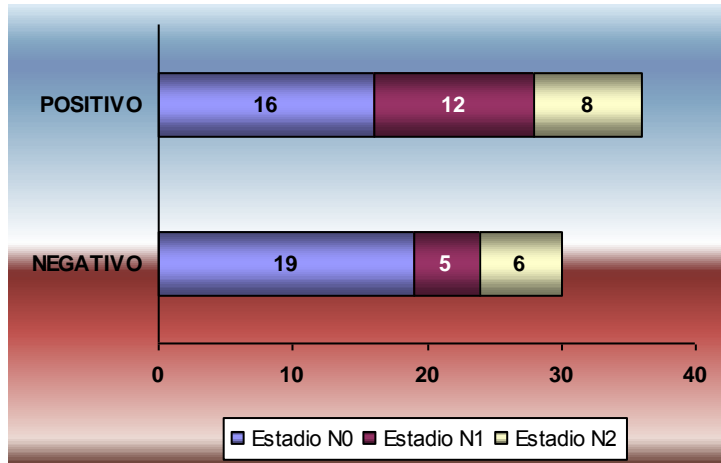
**Gráfico 58. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al estadio TNM. Análisis en relación al estadio T**



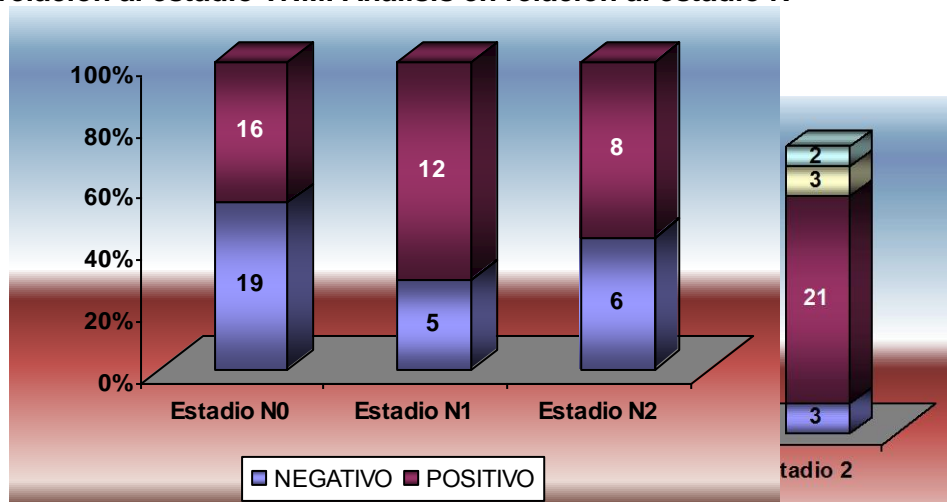
**Tabla 41** Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al estadio TNM. Análisis en relación al estadio N

SCORE	Negativo ( $\leq 20$ )	Positivo ( $>20$ )	Total
<b>Estadio N0</b>	<b>19</b>	<b>16</b>	<b>35</b>
	54,3%	45,7%	100%
<b>Estadio N1</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>17</b>
	29,4%	70,6%	100%
<b>Estadio N2</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>14</b>
	42,9%	57,1%	100%
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>36</b>	<b>66</b>
	45,5%	54,5%	100%

**Gráfico 59.** Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al estadio TNM. Análisis en relación al estadio N



**Gráfico 60.** Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al estadio TNM. Análisis en relación al estadio N

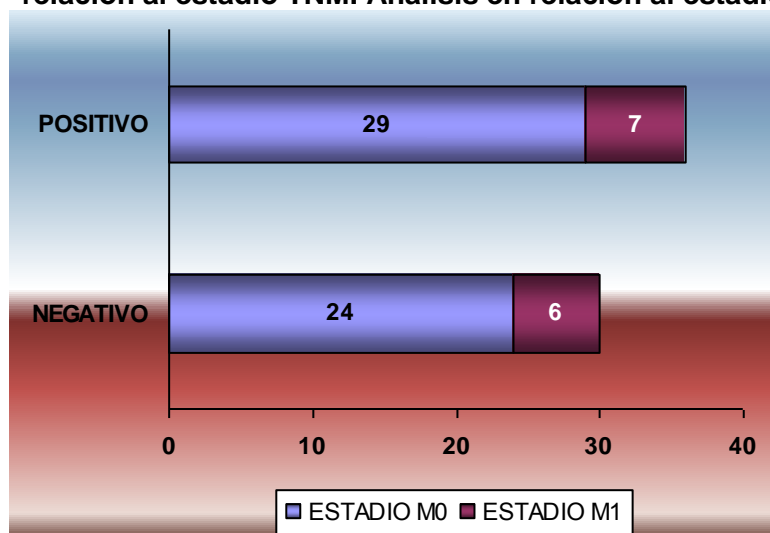




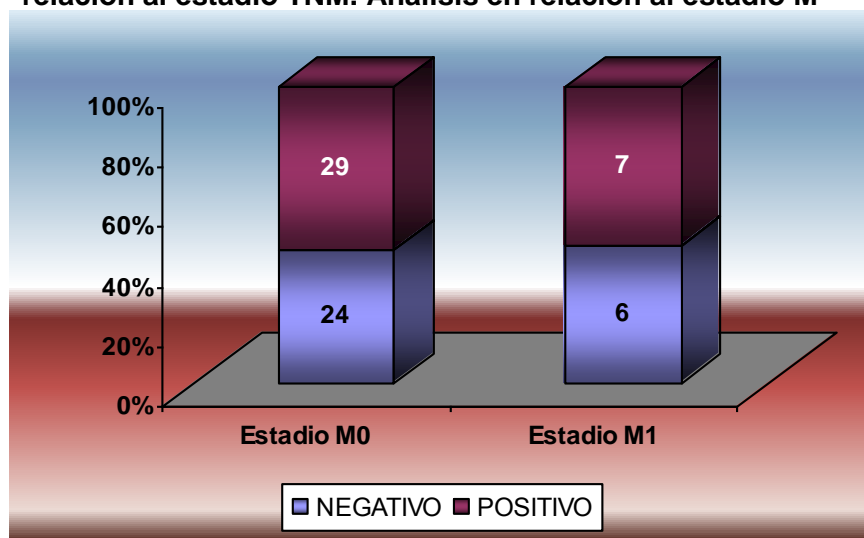
**Tabla 42. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al estadio TNM. Análisis en relación al estadio M**

<b>SCORE</b>	Negativo ( $\leq 20$ )	Positivo ( $>20$ )	Total
<b>Estadio M0</b>	<b>24</b> 45,3%	<b>29</b> 54,7%	<b>53</b> 100%
<b>Estadio M1</b>	<b>6</b> 46,2%	<b>7</b> 53,8%	<b>13</b> 100%
<b>Total</b>	<b>30</b> 45,5%	<b>36</b> 54,5%	<b>66</b> 100%

**Gráfico 61. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al estadio TNM. Análisis en relación al estadio M**



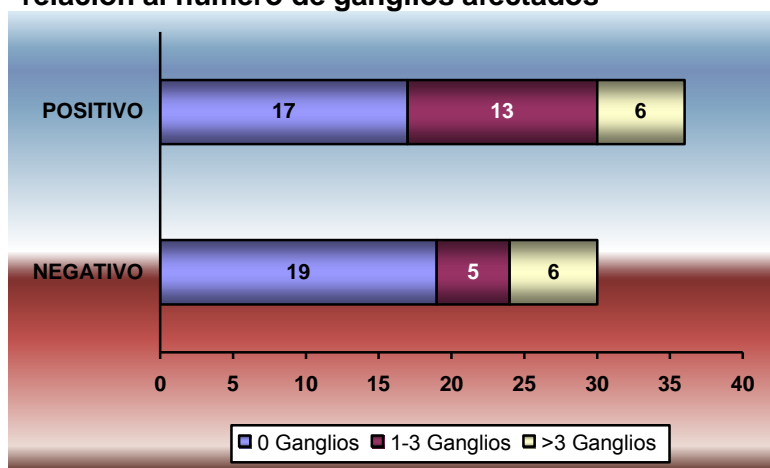
**Gráfico 62. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al estadio TNM. Análisis en relación al estadio M**



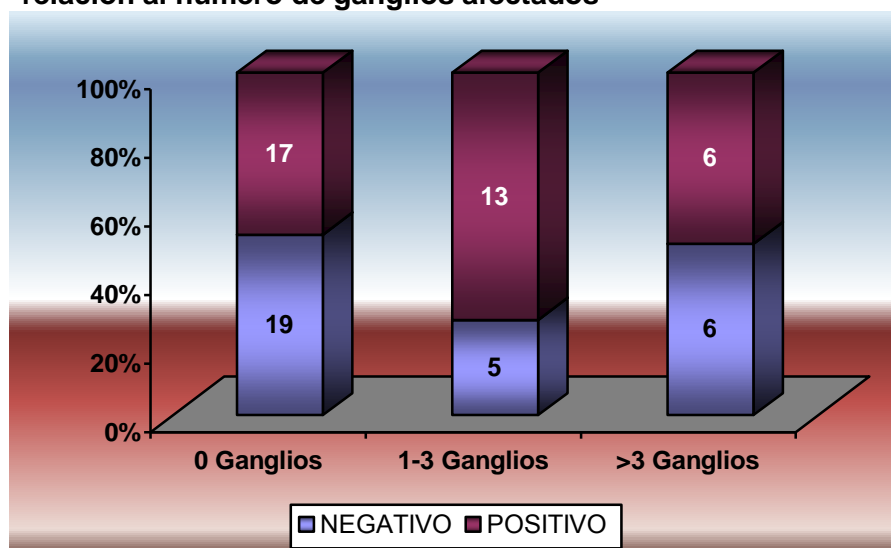
**Tabla 43 Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al número de ganglios afectados**

<b>SCORE</b>	<b>Negativo (≤20)</b>	<b>Positivo (&gt;20)</b>	<b>Total</b>
<b>0 Ganglios</b>	<b>19</b> 52,9%	<b>17</b> 47,2%	<b>36</b> 100%
<b>1-3 Ganglios</b>	<b>5</b> 27,8%	<b>13</b> 72,2%	<b>18</b> 100%
<b>&gt;3 Ganglios</b>	<b>6</b> 50,0%	<b>6</b> 50,0%	<b>12</b> 100%
<b>Total</b>	<b>30</b> 45,5%	<b>36</b> 54,5%	<b>66</b> 100%

**Gráfico 63. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al número de ganglios afectados**



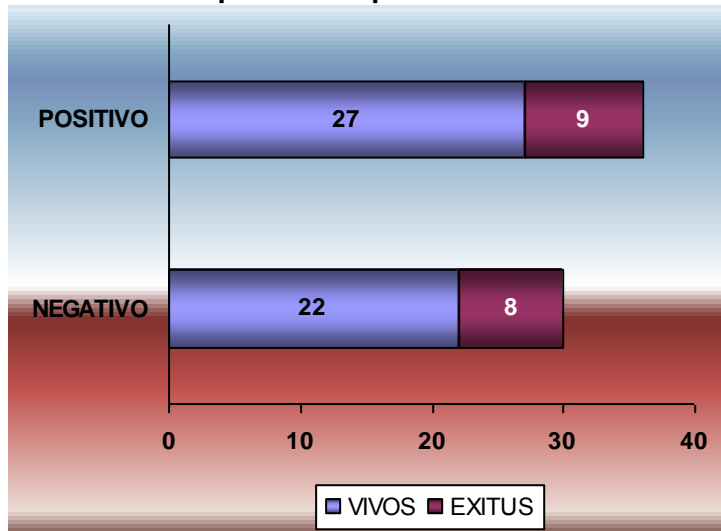
**Gráfico 64. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación al número de ganglios afectados**



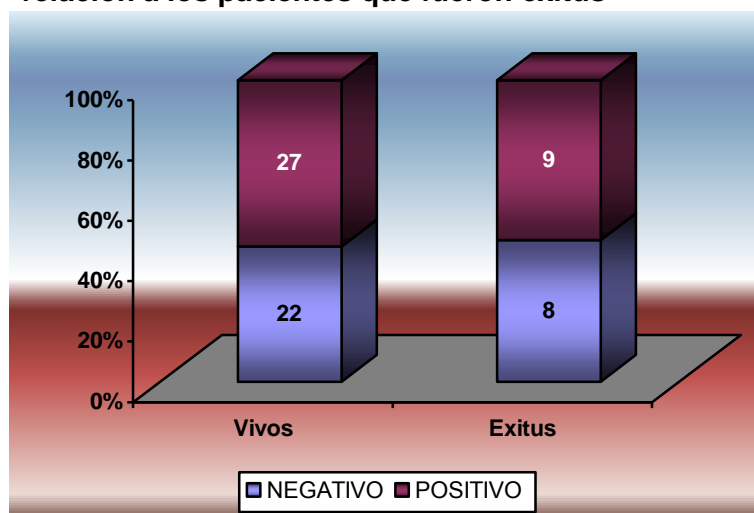
**Tabla 44. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación a los pacientes que fueron éxitus**

<b>SCORE</b>	<b>Negativo (≤20)</b>	<b>Positivo (&gt;20)</b>	<b>Total</b>
<b>Vivos</b>	<b>22</b> 44,9%	<b>27</b> 55,1%	<b>49</b> 100%
<b>Exitus</b>	<b>8</b> 47,1%	<b>9</b> 52,9%	<b>17</b> 100%
<b>Total</b>	<b>30</b> 45,5%	<b>36</b> 54,5%	<b>66</b> 100%

**Gráfico 65. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación a los pacientes que fueron éxitus**



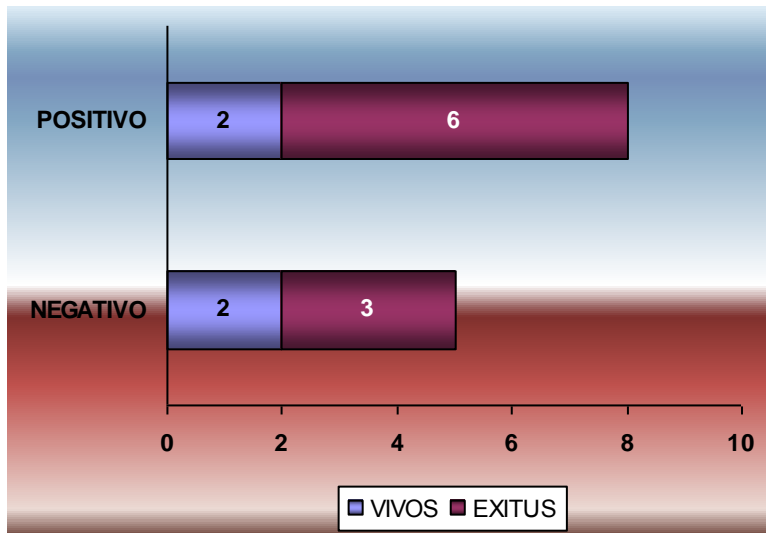
**Gráfica 66. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación a los pacientes que fueron éxitus**



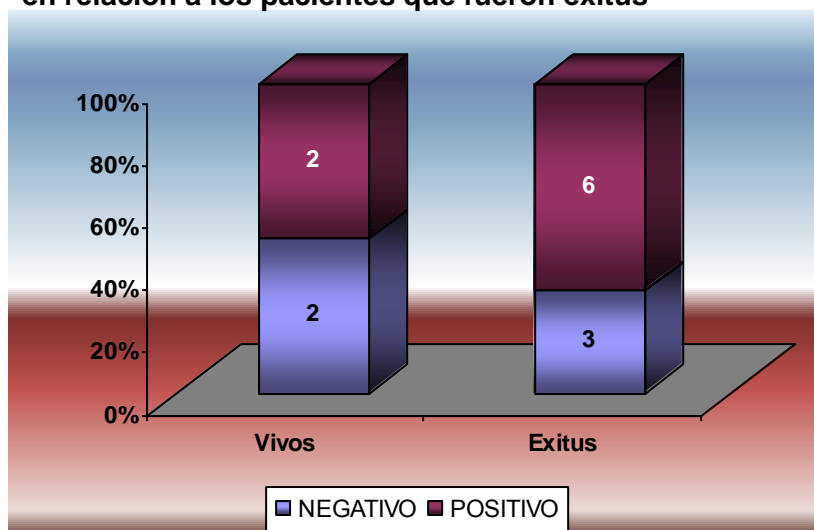
**Tabla 45. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis hepáticas en relación a los pacientes que fueron éxitus**

<b>SCORE</b>	Negativo ( $\leq 20$ )	Positivo ( $>20$ )	Total
<b>Vivos</b>	2 50,0%	2 50,0%	4 100%
<b>Exitus</b>	3 33,3%	6 66,7%	9 100%
<b>Total</b>	5 38,5%	8 61,5%	13 100%

**Gráfico 67. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis hepáticas en relación a los pacientes que fueron éxitus**



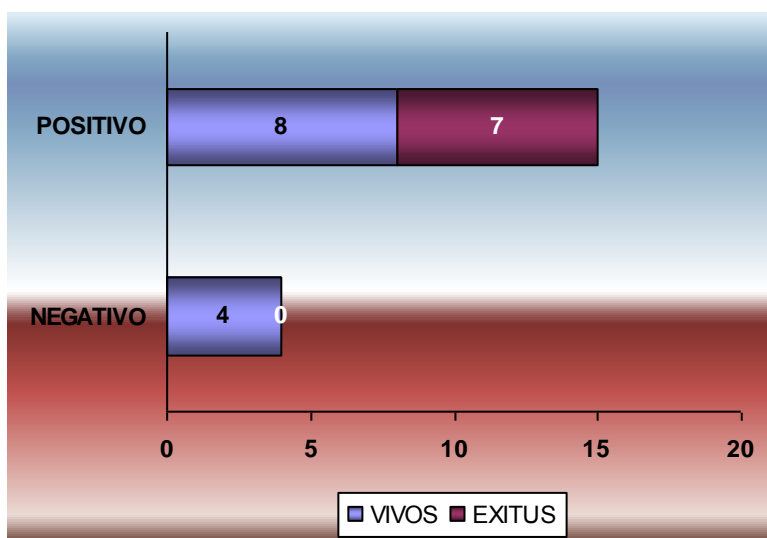
**Gráfico 68. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis hepáticas en relación a los pacientes que fueron éxitus**



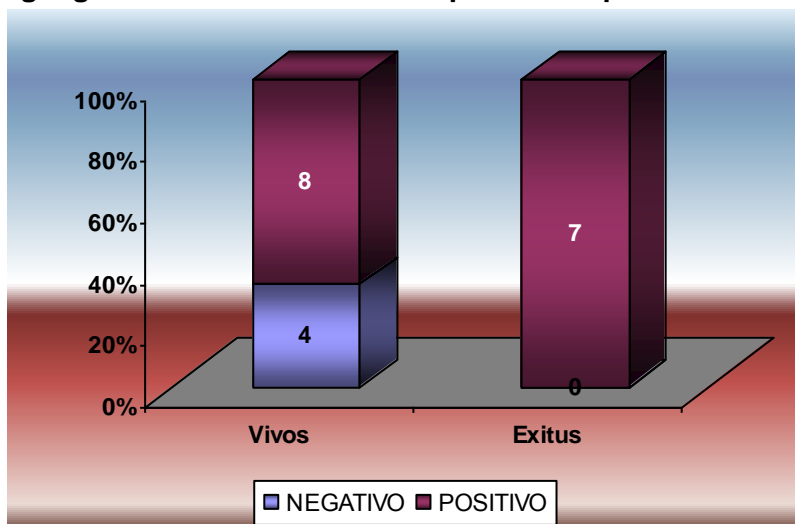
**Tabla 46. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis ganglionares en relación a los pacientes que fueron éxitus**

<b>SCORE</b>	Negativo (≤20)	Positivo (>20)	Total
<b>Vivos</b>	4 33,3%	8 66,7%	12 100%
<b>Exitus</b>	0 0,0%	7 100,0%	7 100%
<b>Total</b>	4 21,1%	15 78,9%	19 100%

**Gráfico 69. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis ganglionares en relación a los pacientes que fueron éxitus**



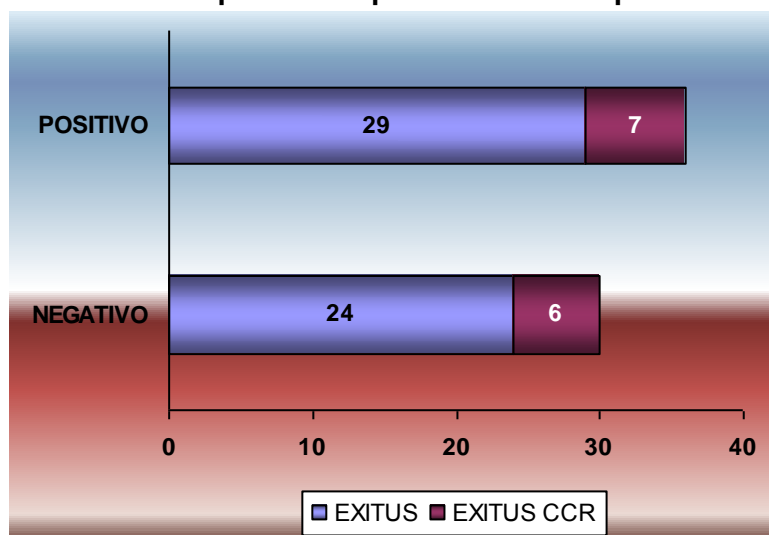
**Gráfico 70. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis ganglionares en relación a los pacientes que fueron éxitus**



**Tabla 47. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación a los pacientes que fueron éxitus por CCR**

<b>SCORE</b>	Negativo ( $\leq 20$ )	Positivo ( $>20$ )	Total
<b>Exitus</b>	<b>24</b> 45,3%	<b>29</b> 54,7%	<b>53</b> 100%
<b>Exitus CCR</b>	<b>6</b> 46,2%	<b>7</b> 53,8%	<b>13</b> 100%
<b>Total</b>	<b>30</b> 45,5%	<b>36</b> 54,5%	<b>13</b> 100%

**Gráfico 71. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación a los pacientes que fueron éxitus por CCR**



**Tabla 72. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación a los pacientes que fueron éxitus por CCR**

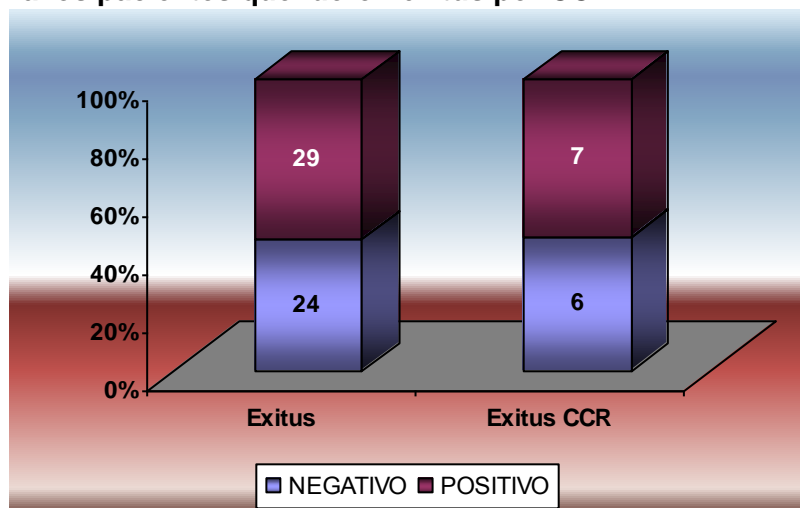


Tabla 48. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación a los pacientes vivos con enfermedad.

SCORE	Negativo ( $\leq 20$ )	Positivo ( $>20$ )	Total
Enfermedad 0	21 45,7%	25 54,3%	46 100%
Enfermedad 1	9 45,0%	11 55,0%	20 100%
<b>Total</b>	<b>30</b> 45,5%	<b>36</b> 54,5%	<b>66</b> 100%

Gráfico 73. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación a los pacientes vivos con enfermedad.

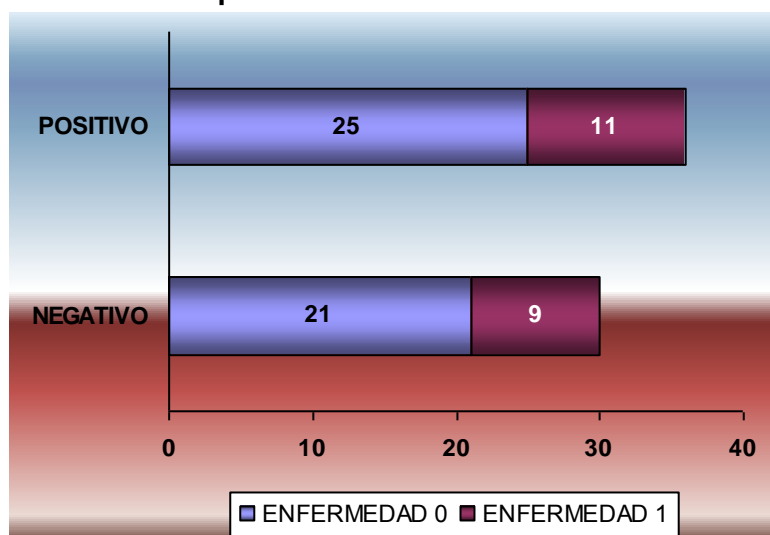
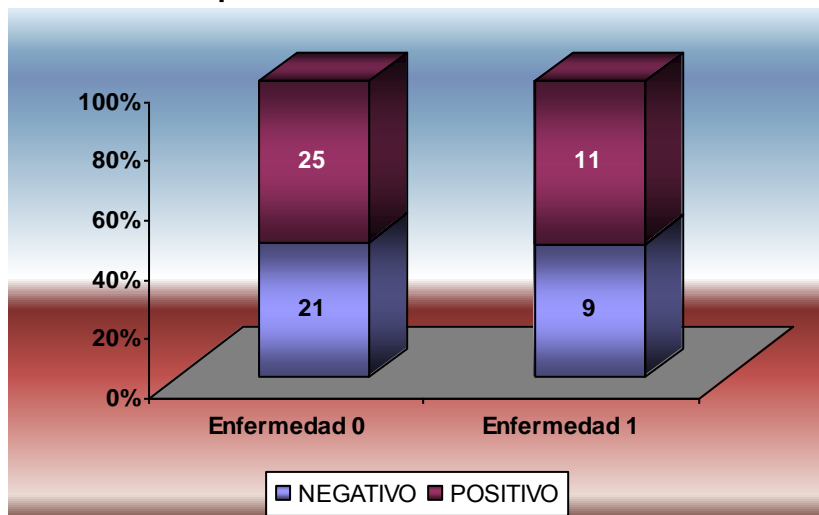


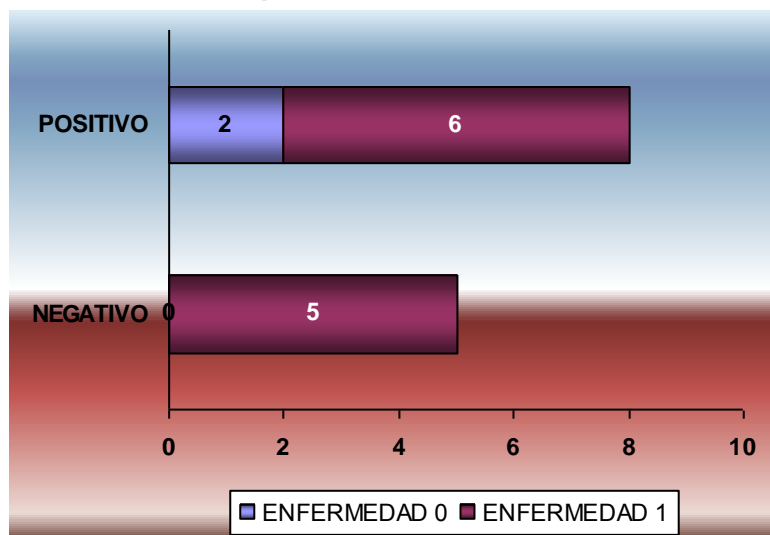
Gráfico 74. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación a los pacientes vivos con enfermedad.



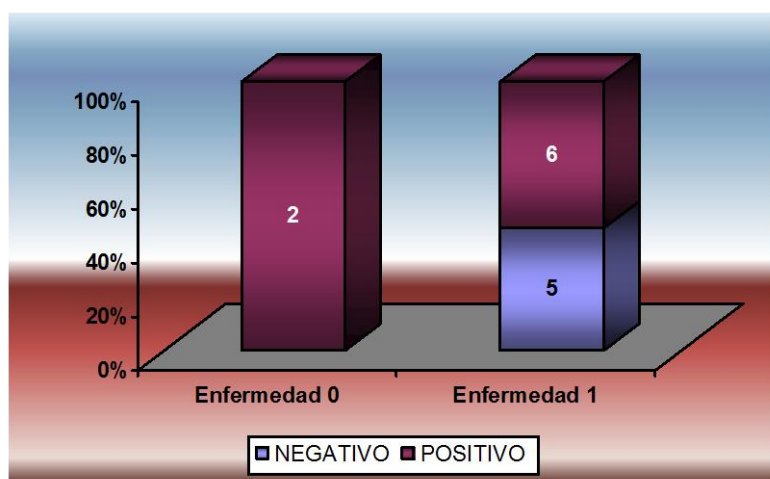
**Tabla 49. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis hepáticas en relación a los pacientes vivos con enfermedad.**

<b>SCORE</b>	Negativo ( $\leq 20$ )	Positivo ( $>20$ )	Total
<b>Enfermedad 0</b>	<b>0</b> 0,0%	<b>2</b> 100,0%	<b>2</b> 100%
<b>Enfermedad 1</b>	<b>5</b> 45,5%	<b>6</b> 54,5%	<b>11</b> 100%
<b>Total</b>	<b>5</b> 38,5%	<b>8</b> 61,5%	<b>13</b> 100%

**Gráfico 75. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis hepáticas en relación a los pacientes vivos con enfermedad.**



**Gráfico 76. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis hepáticas en relación a los pacientes vivos con enfermedad.**

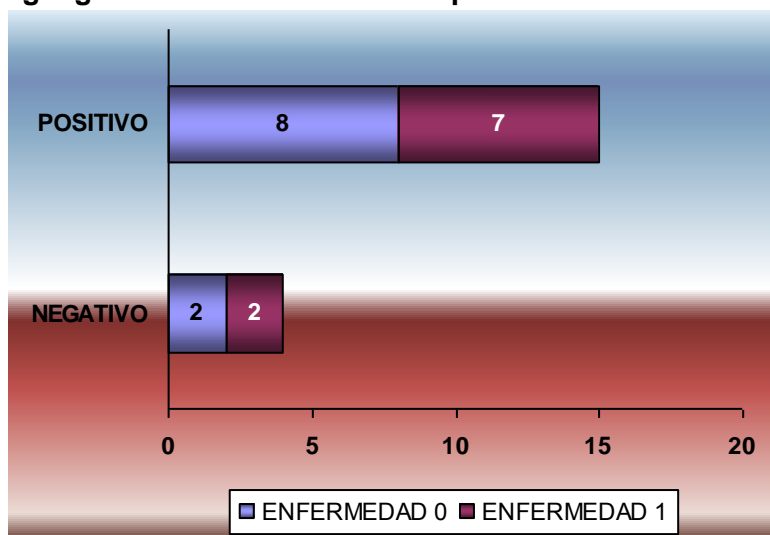




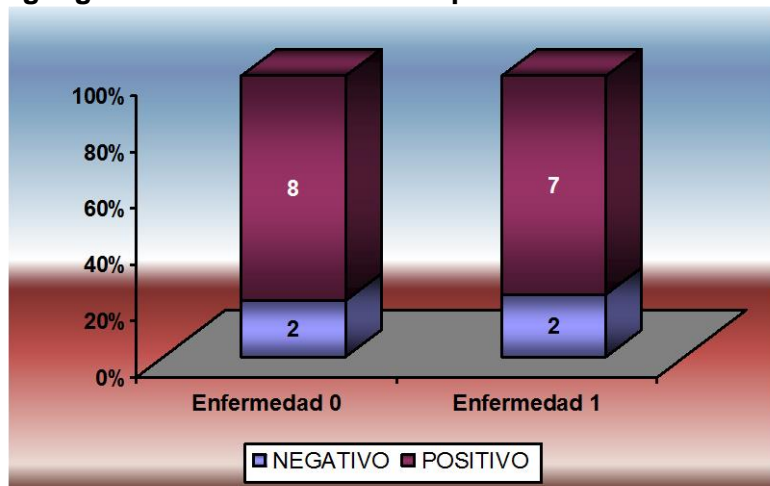
**Tabla 50. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis ganglionares en relación a los pacientes vivos con enfermedad.**

<b>SCORE</b>	Negativo ( $\leq 20$ )	Positivo ( $>20$ )	Total
<b>Enfermedad 0</b>	<b>2</b> 20,0%	<b>8</b> 80,0%	<b>10</b> 100%
<b>Enfermedad 1</b>	<b>2</b> 22,2%	<b>7</b> 77,8%	<b>9</b> 100%
<b>Total</b>	<b>4</b> 21,1%	<b>15</b> 78,9%	<b>19</b> 100%

**Gráfico 77. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis ganglionares en relación a los pacientes vivos con enfermedad.**



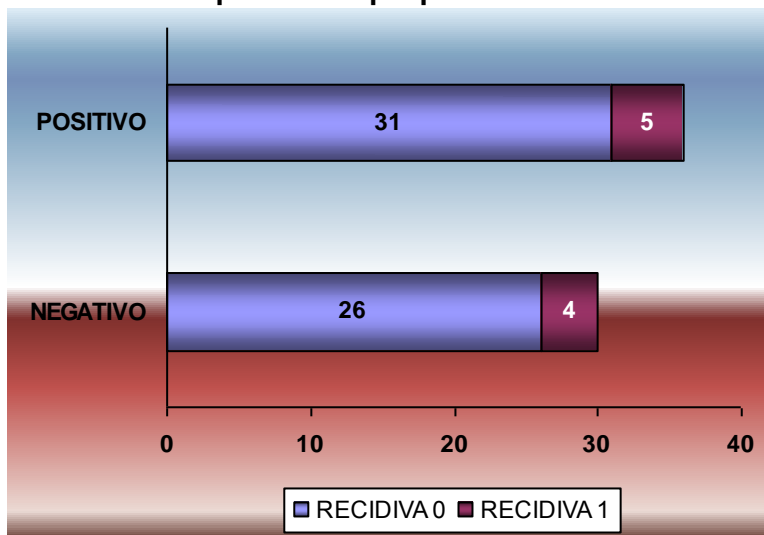
**Gráfico 78. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis ganglionares en relación a los pacientes vivos con enfermedad.**



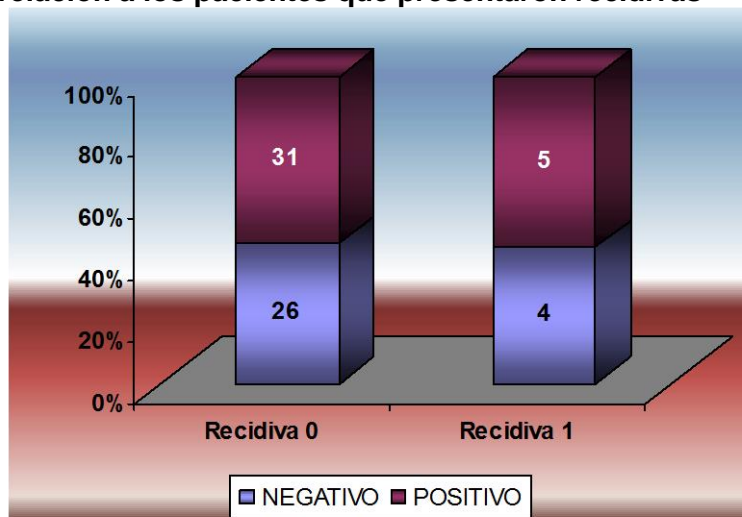
**Tabla 51 Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación a los pacientes que presentaron recidivas.**

<b>SCORE</b>	Negativo ( $\leq 20$ )	Positivo ( $>20$ )	Total
<b>Recidiva 0</b>	<b>26</b> 45,6%	<b>31</b> 54,4%	<b>57</b> 100%
<b>Recidiva 1</b>	<b>4</b> 44,4%	<b>5</b> 55,6%	<b>9</b> 100%
<b>Total</b>	<b>30</b> 45,5%	<b>36</b> 54,5%	<b>66</b> 100%

**Gráfico 79. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación a los pacientes que presentaron recidivas**



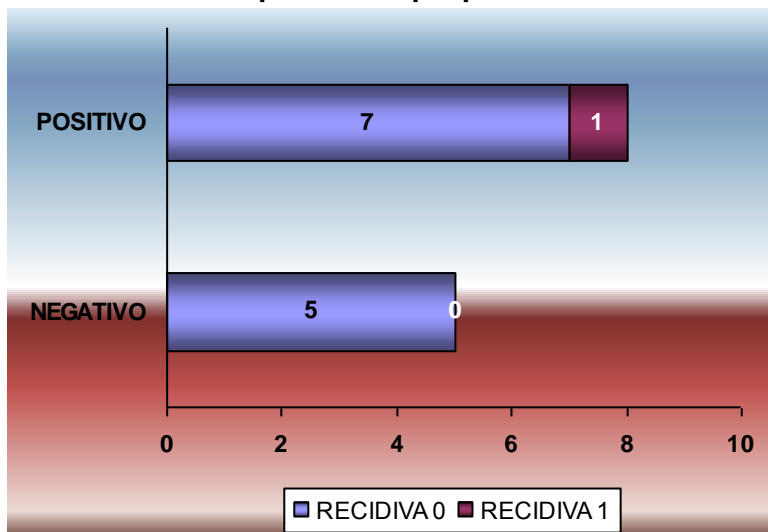
**Gráfico 80. Expresión inmunohistoquímica de p53 en el tumor primario en relación a los pacientes que presentaron recidivas**



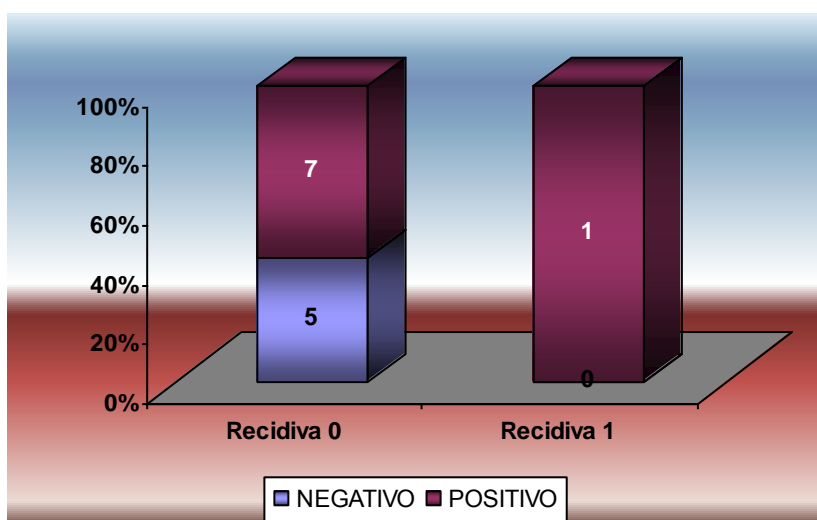
**Tabla 52. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis hepáticas en relación a los pacientes que presentaron recidivas**

<b>SCORE</b>	Negativo ( $\leq 20$ )	Positivo ( $>20$ )	Total
<b>Recidiva 0</b>	<b>5</b> 41,7%	<b>7</b> 58,3%	<b>12</b> 100%
<b>Recidiva 1</b>	<b>0</b> 0,0%	<b>1</b> 100,0%	<b>1</b> 100%
<b>Total</b>	<b>5</b> 38,5%	<b>8</b> 61,5%	<b>13</b> 100%

**Gráfico 81. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis hepáticas en relación a los pacientes que presentaron recidivas**



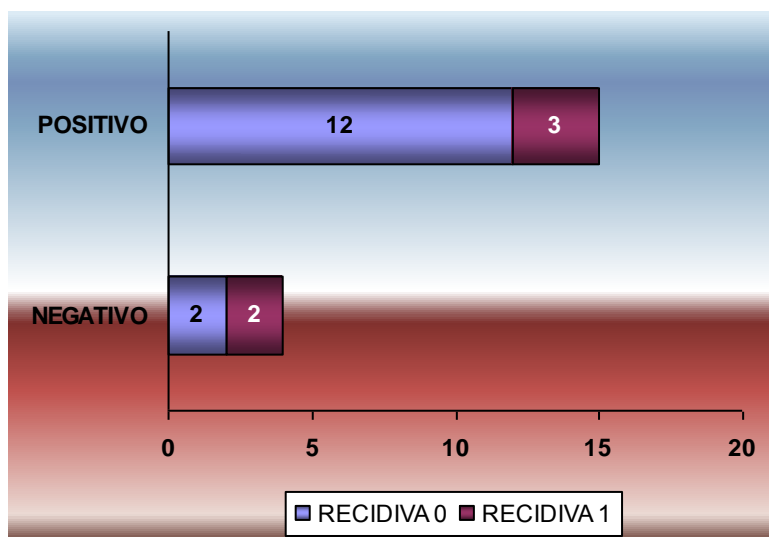
**Gráfico 82. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis hepáticas en relación a los pacientes que presentaron recidivas**



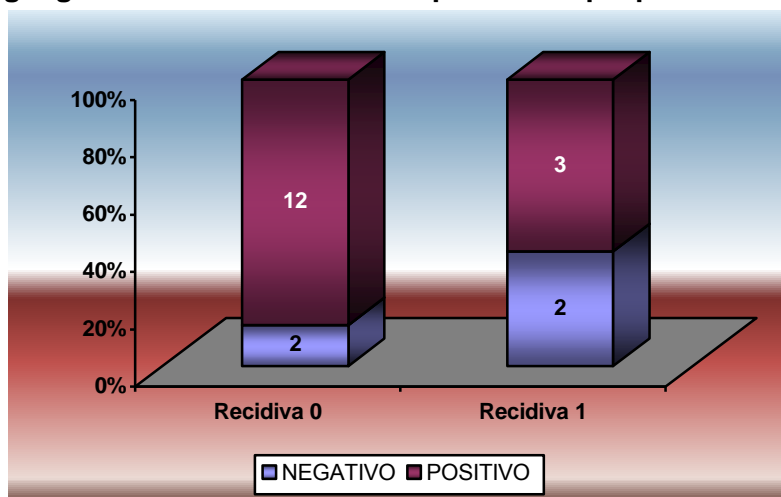
**Tabla 53. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis ganglionares en relación a los pacientes que presentaron recidivas**

<b>SCORE</b>	Negativo ( $\leq 20$ )	Positivo ( $>20$ )	Total
<b>Recidiva 0</b>	<b>2</b> 14,3%	<b>12</b> 85,7%	<b>14</b> 100%
<b>Recidiva 1</b>	<b>2</b> 40,0%	<b>3</b> 60,0%	<b>5</b> 100%
<b>Total</b>	<b>4</b> 21,1%	<b>15</b> 78,9%	<b>19</b> 100%

**Gráfico 83. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis ganglionares en relación a los pacientes que presentaron recidivas**



**Gráfico 84. Expresión inmunohistoquímica de p53 en las metástasis ganglionares en relación a los pacientes que presentaron recidivas**



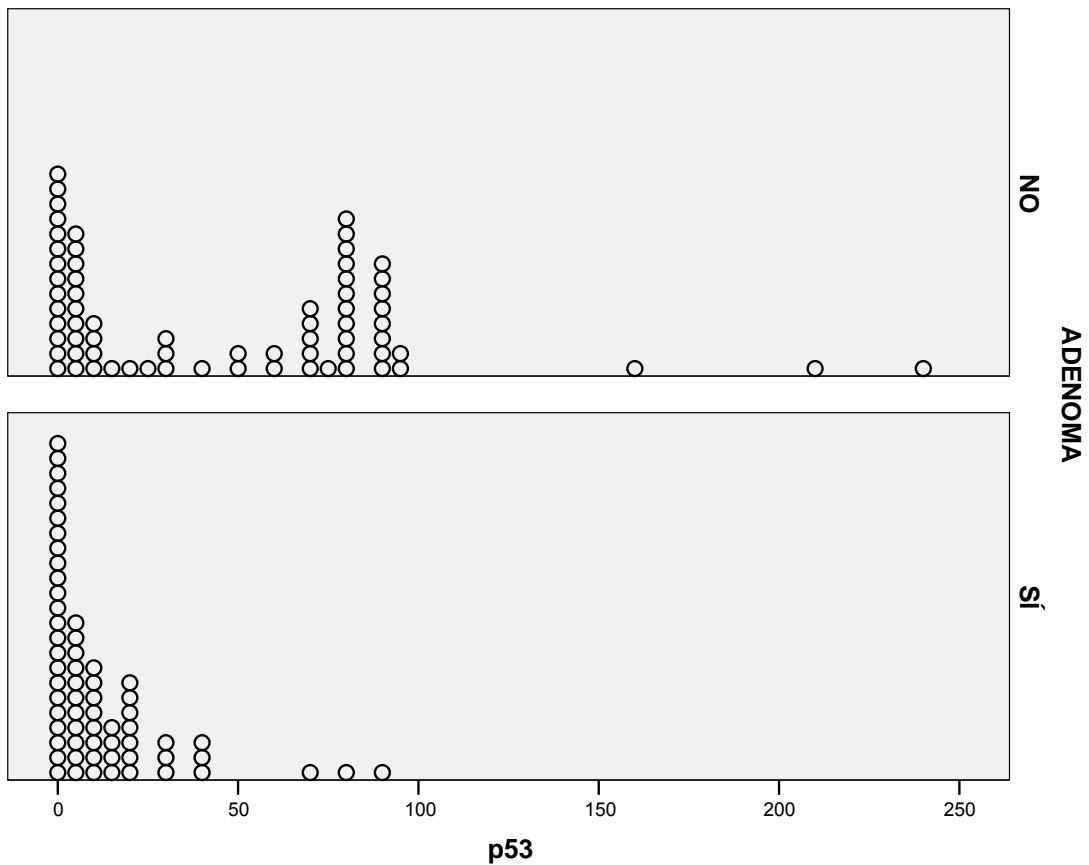
**Tabla 54. p53 EN ADENOMAS. DESCRIPTIVA**

Positivo10_p53_Nucleo_Adenoma_Porcentaje						
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado	
Válidos	0 Negativo (<=10)	42	67,7	67,7	67,7	
	1 Positivo (>10)	20	32,3	32,3	100,0	
	Total	62	100,0	100,0		

**ANÁLISIS BIVARIADO SEGÚN VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS**

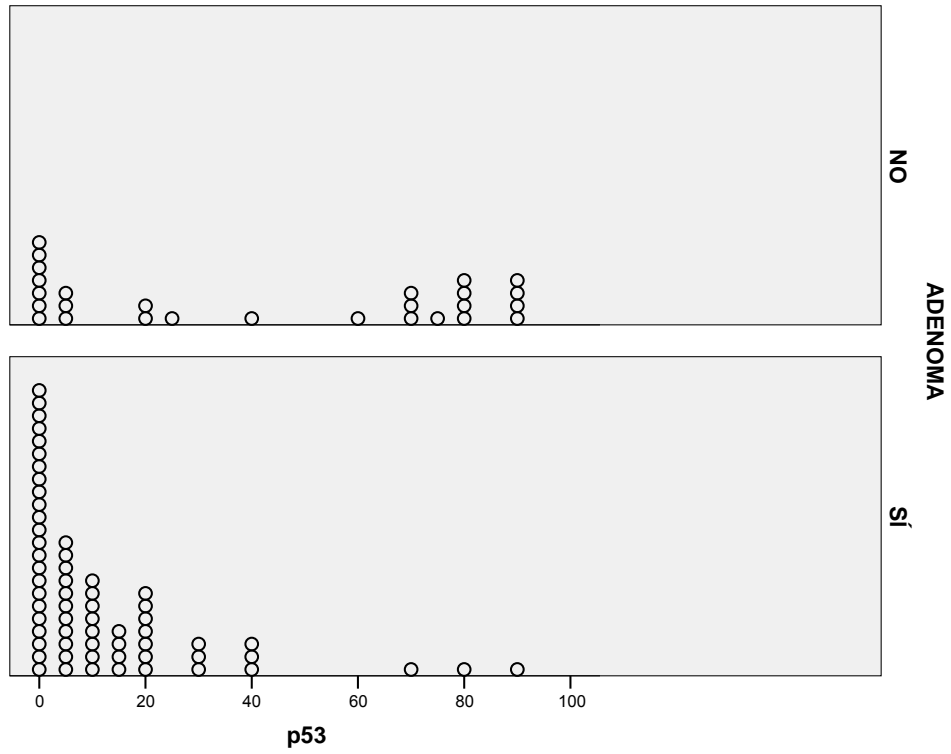
**Expresión de p53 en adenocarcinoma vs adenoma**

**Gráfico 85**



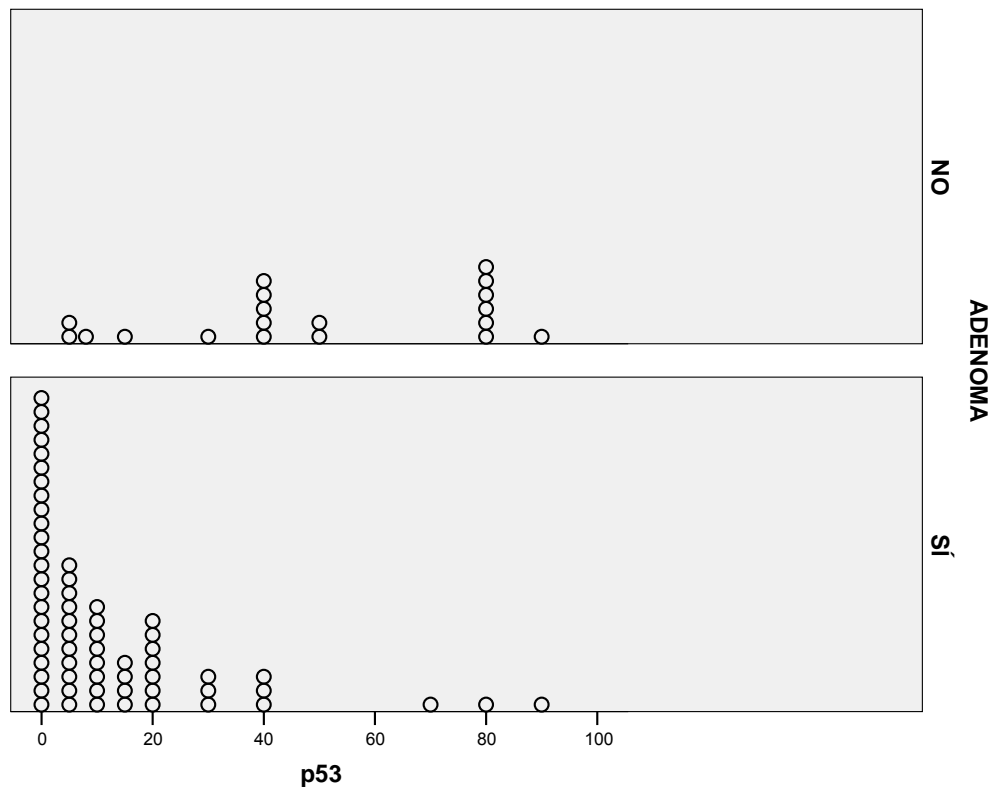
**Expresión de p53 en el margen tumoral infiltrante vs adenoma.**

**Gráfico 86**



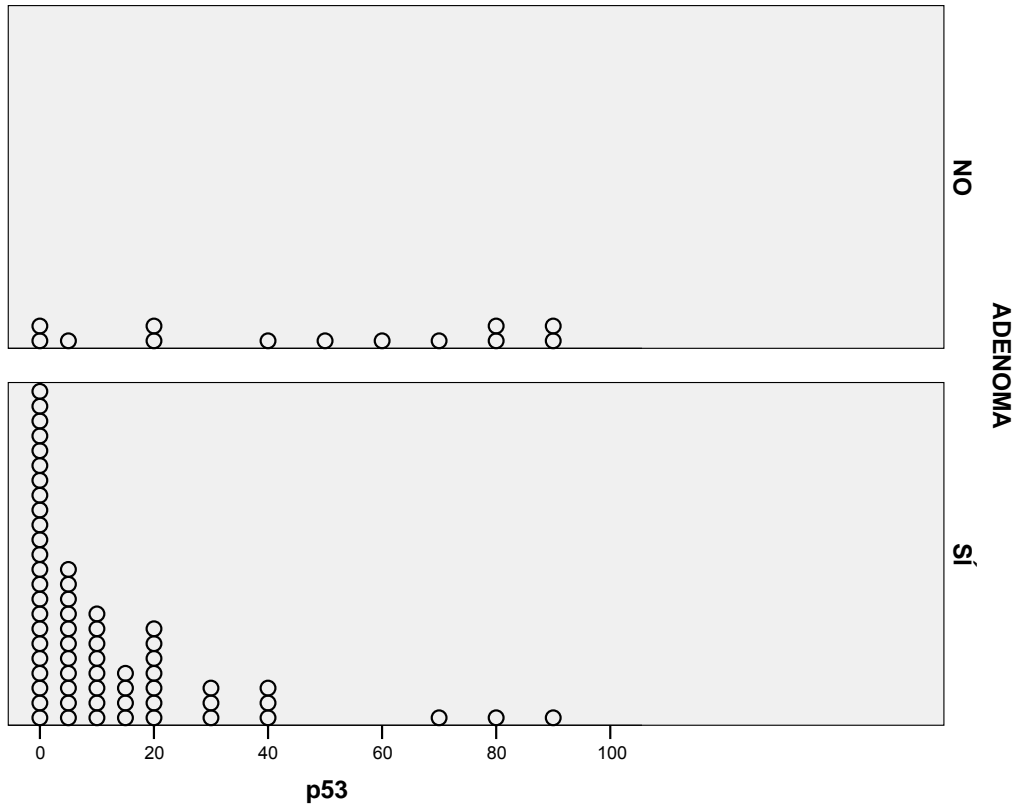
**Expresión de p53 en las metástasis ganglionares vs adenoma**

**Gráfico 87**



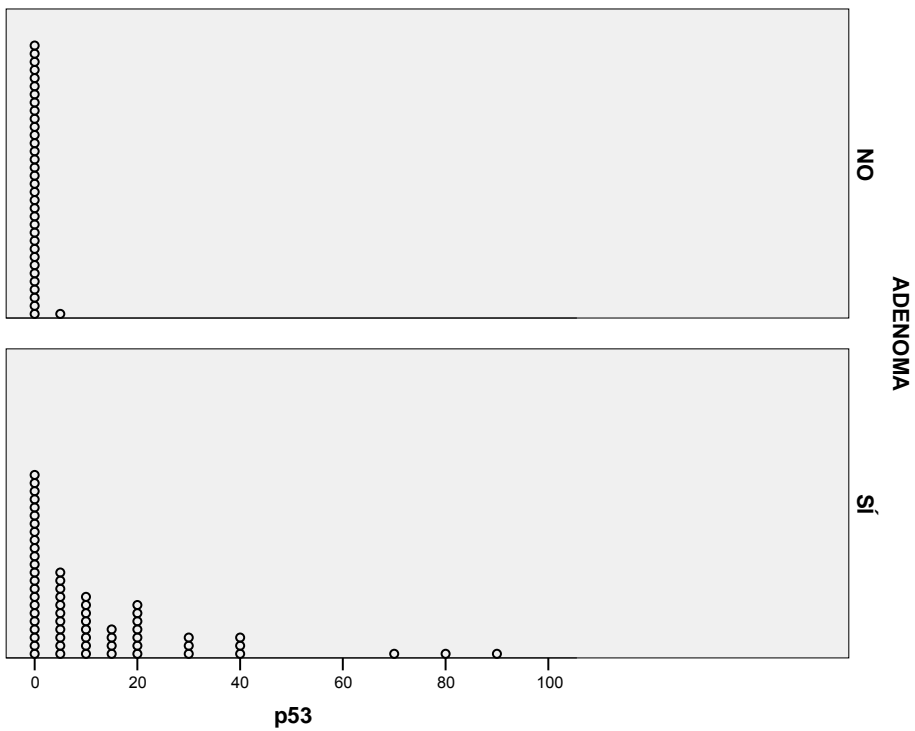
### Expresión de p53 en las Metástasis hepáticas vs adenoma

Gráfico 88



### Expresión de p53 en la mucosa normal vs adenoma.

Gráfico 89



## **Ki-67**

### **Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en la mucosa sana lejana al tumor**

Se seleccionaron mucosas normales de 28 casos de la serie que se utilizaron como control de la expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en mucosa sana. Se observó tinción nuclear en células de las criptas glandulares, siendo negativas el resto de las células epiteliales. La expresión resultó negativa (inferior al 10%) en todos los casos. Ver tabla 55.

### **Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario**

En la tabla 56 observamos que se analizó el 80% (106 casos) de la serie, de los cuales el 91% (97 casos) fueron positivos y el 9% (9 casos) fueron negativos.

### **Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en relación a la localización del tumor**

Se analizaron en 106 casos de la serie con la siguiente distribución: 42 de colon derecho, 36 de colon izquierdo y 28 de recto. El tumor primario, en toda la longitud del colon presentó positividad en alrededor del 90% de los casos, sin diferencias significativas de expresión entre los distintos segmentos colónicos ( $p = 0,426$ ). Un 93% de los tumores (39 casos) de colon derecho, fueron positivos y un 7% (3 casos) fueron negativos. En el colon izquierdo, el 94% (34 casos) expresaron positividad y el 6% (2 casos) fueron negativos. En el recto, el 92% (97 casos) fueron positivos y el 8% (9 casos) fueron negativos. (Tabla 57). Ver gráficos 90 y 91.

### **Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en relación al subtipo histológico**

Al comparar la inmunoexpresión de Ki-67 en 106 carcinomas (87 de tipo convencional y 19 mucinosos), observamos que el 90% de los CCR eran positivos, sin diferencias entre los carcinomas de tipo convencional y los mucinosos ( $p=0,662$ ). En los carcinomas de tipo convencional, un 92% (80 casos) fueron positivos y un 8% (7 casos) fueron negativos. En los carcinomas mucinosos, el 90% (17 casos) fueron positivos y el 10% (2 casos) fueron negativos. (Tabla 58). Ver gráficos 92 y 93.

Aunque en el gráfico 94, podemos observar que al comparar las medianas de expresión se observa una tendencia de sobreexpresión en el grupo de tumores de alto



grado (mediana=60) en comparación al grupo de bajo grado (mediana = 40), aunque sin alcanzar diferencias significativas ( $p = 0,51$ )

### **Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en relación al grado histológico**

Se analizaron 106 CCR, 87 de bajo grado y 19 de alto grado histológico. El 91% (79 casos) de los carcinomas de bajo grado fueron positivos y el 9% (8 casos) fueron negativos. El 95% (18 casos) de los carcinomas de alto grado fueron positivos y el 5% (1 caso) fue negativo.

Podemos observar que independientemente del grado histológico la positividad fue muy alta y similar en la gran mayoría de los tumores (entre 91 y 95%), proporcionándonos diferencias no significativas ( $p = 1,000$ ). (Tabla 59). Ver gráficos 95 y 96.

Sin embargo, en el gráfico 97, podemos ver que al comparar las medianas de expresión, se observa que en el grupo de tumores de alto grado existe una tendencia de mayor expresión (mediana = 70) en comparación al grupo de tumores de bajo grado histológico (mediana = 50), aunque sin alcanzar diferencias significativas ( $p=0,303$ ).

### **Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en relación al estadio pN (metástasis ganglionar)**

Se analizaron en 106 CCR: 54 tumores sin metástasis ganglionares (pN0), 27 con metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos (pN1) y 25 carcinomas con metástasis a más de 3 ganglios linfáticos (pN2). Un 89% de CCR tenían niveles altos de expresión de ki67, sin observarse diferencias estadísticamente significativas según el estadio pN ( $p=0,849$ ). Un 93% (50) de los CCR sin afectación ganglionar fueron positivos, 4 fueron negativos (7%). Los carcinomas pN1 fueron positivos en un 89% (24 casos) y 3 fueron negativos (11%). El 92% (23 casos) de los carcinomas en estadio pN2 fueron positivos y 2 (8%) fueron negativos. La positividad fue alta en todos los casos (>89%), (Tabla 60 ). Ver gráficos 98 y 99.

En el gráfico 100, podemos observar que al agrupar los tumores primarios de los casos que no presentaron metástasis ganglionares la mediana de expresión fue de 50, mientras que en el grupo de los que si presentaron metástasis ganglionares fue de 55,

estos valores cercanos, hacen que las diferencias entre ambos grupos tampoco sea significativa (  $p = 0,954$ ).

### **Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en CCR de pacientes muertos por enfermedad**

En la tabla 61 vemos que de los 106 CCR analizados, 27 pacientes murieron por tumor. Un 89% (24 casos) fueron positivos y un 11% negativos (3 casos). Sin embargo, los 79 pacientes que no fueron éxitos presentaron un perfil similar de expresión con el 92% (73 casos) de positividad y 8% (6 casos) de negatividad. Por consiguiente, las diferencias entre esta asociación estadísticamente no fueron significativas ( $p = 0,690$ ). Ver gráficos 101 y 102.

En el gráfico 103 observamos, que al valorar las medianas de expresión fue de 60 en el grupo de pacientes que permanecieron vivos en general, y de 50 en el grupo de los pacientes que fallecieron, por lo que las diferencias estadísticamente no son significativas ( $p = 446$ )

### **Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en las metástasis ganglionares de los pacientes muertos por tumor**

Se analizó la expresión de Ki-67 en 30 metástasis ganglionares, de los cuales 9 pacientes murieron por tumor. Un 89% (8 casos) fueron positivos y un 11% (1 caso) negativos. Entre los 21 pacientes que no murieron por tumor hubo un 95% (20 casos) inmunopositivos y un 5% (1 caso) negativos. El número de casos positivos es similar en ambos grupos, por lo que podemos decir que esta asociación no proporciona diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,517$ ). (Tabla 62 ). Ver gráficos 104 y 105.

### **Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en los pacientes vivos con enfermedad**

Estas variables se analizaron en 106 casos de la serie, de los cuales 32 casos correspondieron a pacientes vivos con enfermedad, el 88% (28 casos) positivos y el 12% (4 casos) negativos. El perfil expresión fue similar en el resto de pacientes (74 casos), con el 93% (69 casos) positivos y el 7% (5 casos) negativos. De esta manera, obtuvimos diferencias de expresión no significativas ( $p=0,448$ ) entre estos grupos (Tabla 63 ). Ver gráficos 106 y 107.

### **Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en las metástasis ganglionares en relación a los pacientes vivos con enfermedad.**

Estas variables se analizaron en 30 casos de la serie, de los cuales 12 casos correspondieron a pacientes vivos con enfermedad, siendo 2 negativos (17%) y 10 positivos (83%). Y en el resto de pacientes la positividad estuvo presente en el 100% (18 casos). Obteniendo como resultado de este estudio, diferencias de expresión no significativas entre los distintos grupos ( $p=0,152$ ) (Tabla 64). Ver gráficos 108 y 109.

### **Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en relación a los pacientes con recidiva**

Estas variables se analizaron en 106 casos de la serie, de los cuales 13 casos correspondieron a pacientes con recidiva, siendo 3 negativos (23%) y 10 positivos (77%). Mientras que en los pacientes que presentaron tumores no recidivantes la positividad fue del 93% (87 casos) y la negatividad del 7% (6 casos). Dando diferencias estadísticamente no significativas ( $p=0,079$ ), en el estudio entre estos grupos. (Tabla 65 ). Ver gráficos 110 y 111.

### **Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en los ganglios linfáticos en relación a los pacientes con recidiva**

Estas variables se analizaron en 30 casos de la serie, de los cuales 4 casos correspondieron a pacientes con recidiva, siendo 2 negativos (50%) y 2 positivos (50%). Mientras que en los pacientes que presentaron tumores no recidivantes la positividad fue del 100% (26 casos) y la negatividad fue de 0. Dando diferencias estadísticamente no significativas. (Tabla 66). Ver gráficos 112 y 113.

## **DESCRIPTIVA**

En la tabla 67, observamos que la valoración de Ki67 se realizó en los 62 casos de adenomas, de los cuales 48 casos (77%) presentaron negatividad (porcentaje  $\leq 10$ ) y 14 casos (22%) expresaron positividad.

## **ANÁLISIS BIVARIADO PARA LA VALORACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Ki-67.**

### **Adenocarcinoma vs adenoma.**

La expresión de ki67 en el tumor primario analizada en 106 tumores presenta una expresión media de 52; mientras que analizada en los 62 adenomas presentó una expresión media de 10.

La gráfica 114 representa estos datos, en donde apreciamos una diferencia de medias de 42, lo cual es significativo ( $p < 0,001$ ) e indicativo de una mayor expresión en los adenocarcinomas.

### **Margen infiltrante vs adenoma**

En el gráfico 115 observamos que la expresión de ki67 en el margen infiltrante analizada en 98 casos presentó una expresión media de 54; mientras que analizada en 62 adenomas presentó una expresión media de 10.

Estos datos representan una diferencia de medias de 44, lo cual representa un valor de expresión significativamente mayor ( $p < 0,001$ ) en el margen infiltrante.

### **Metástasis ganglionares vs adenoma.**

Al analizar la expresión de ki67 en las metástasis ganglionares en 30 casos, observamos que presentó una expresión media de 50; mientras que analizada en 62 adenomas presentó una expresión media de 10. Esta diferencia de medias de 40 pone en evidencia una significativa ( $p < 0,001$ ) mayor expresión en las metástasis ganglionares cuando la comparamos con la expresión en los adenomas, según lo observado en la gráfica 116.

### **Mucosa lejana al tumor vs adenoma.**

Podemos observar en la gráfica 117, que la expresión de ki67 en la mucosa lejana al tumor analizada en 28 casos presentó una media de 4; mientras que analizada en los 62 adenomas presentó una expresión media de 10 (Tabla 4 y Gráfico 4). Esta diferencia de medias de -6 representa una mayor expresión en los adenomas que en la mucosa colónica lejana al tumor, con un valor significativo ( $p < 0,001$ ).

**Tabla 55. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en la mucosa sana lejana al tumor**

<b>Positivo10_Ki67_Nucleo_MucosaLejana_Porcentaje</b>					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Negativo (<=10)	28	21,1	100,0	100,0
Perdidos	Sin Información	105	78,9		
<b>Total</b>		<b>133</b>	<b>100,0</b>		

**Tabla 56. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario**

<b>Positivo10_Ki67_Nucleo_Epitelio_Porcentaje</b>					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Negativo (<=10)	9	6,8	8,5	8,5
	Positivo (>10)	97	72,9	91,5	100,0
	<b>Total</b>	<b>106</b>	<b>79,7</b>	<b>100,0</b>	
Perdidos	Sin Información	27	20,3		
<b>Total</b>		<b>133</b>	<b>100,0</b>		

Tabla 57. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en relación a la localización del tumor

SCORE	Negativo (≤10)	Positivo (>10)	Total
<b>Derecho</b>	<b>3</b> 7,1%	<b>39</b> 92,9%	<b>42</b> 100%
<b>Izquierdo</b>	<b>2</b> 5,6%	<b>34</b> 94,4%	<b>36</b> 100%
<b>Recto</b>	<b>4</b> 14,3%	<b>24</b> 85,7%	<b>28</b> 100%
<b>Total</b>	<b>9</b> 8,5%	<b>97</b> 91,5%	<b>106</b> 100%

Gráfico 90. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en relación a la localización del tumor

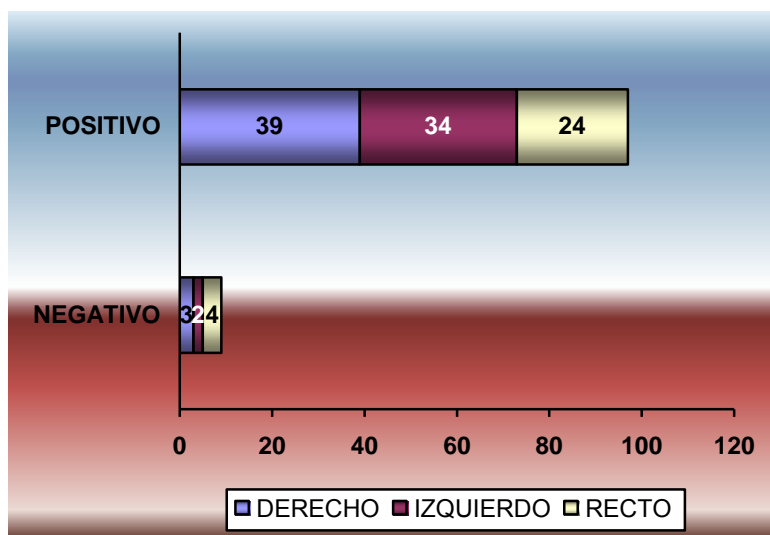


Gráfico 91. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en relación a la localización del tumor

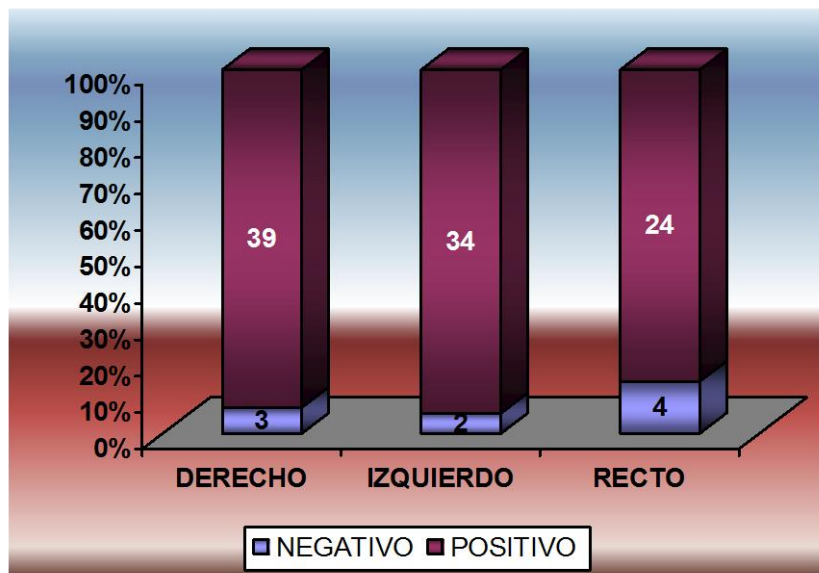


Tabla 58. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en relación al subtipo histológico

<b>SCORE</b>	Negativo ( $\leq 10$ )	Positivo ( $> 10$ )	Total
<b>Normal</b>	<b>7</b> 8,0%	<b>80</b> 92,0%	<b>87</b> 100%
<b>Mucinoso</b>	<b>2</b> 10,5%	<b>17</b> 89,5%	<b>19</b> 100%
<b>Total</b>	<b>9</b> 8,5%	<b>97</b> 91,5%	<b>106</b> 100%

Gráfico 92. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en relación al subtipo histológico

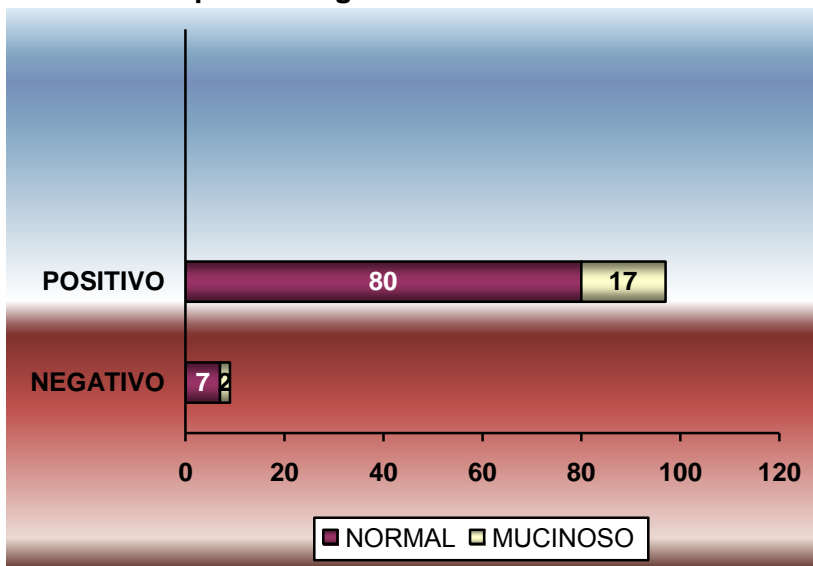


Gráfico 93. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en relación al subtipo histológico

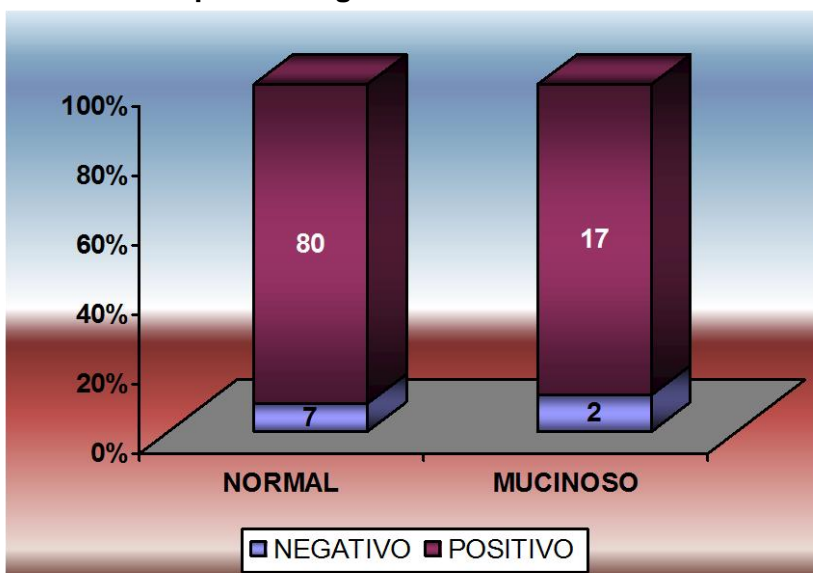


Gráfico 94

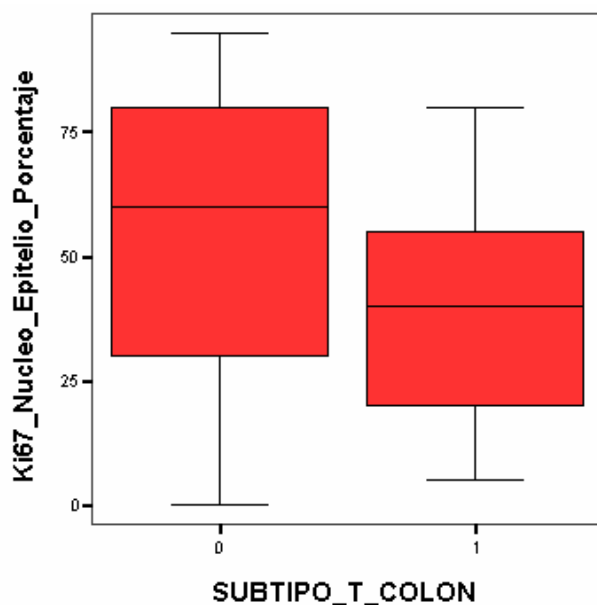
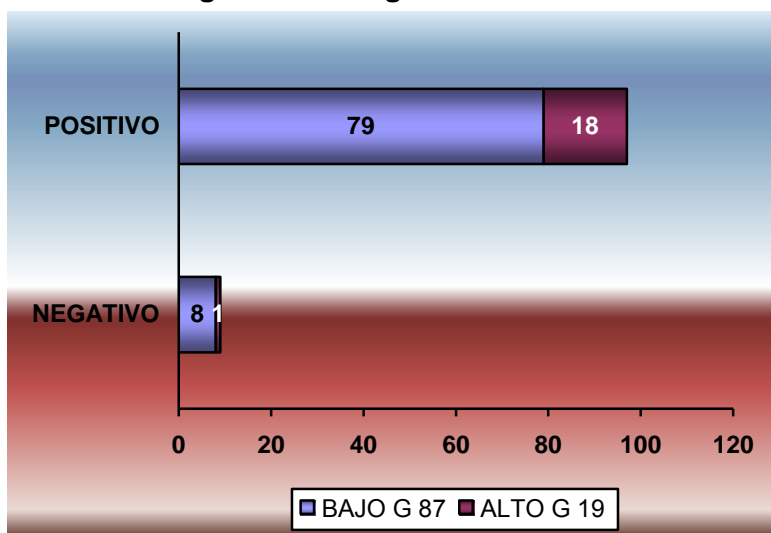


Tabla 59. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en relación al grado histológico

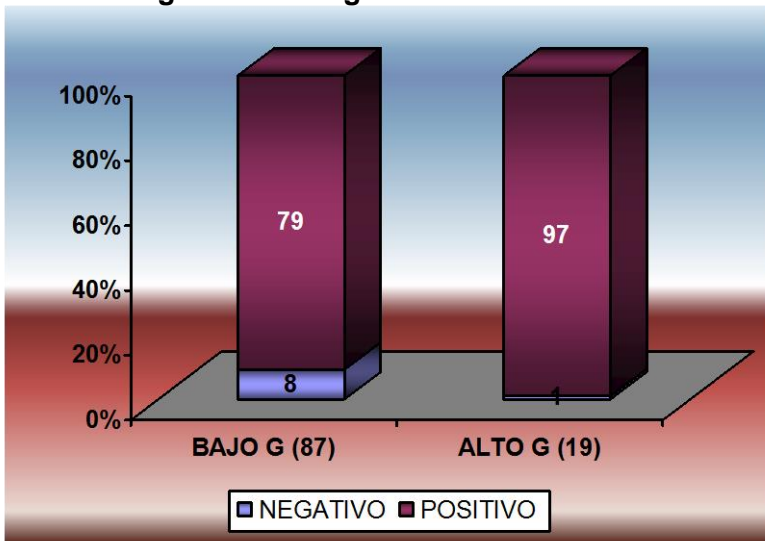
SCORE	Negativo (≤10)	Positivo (>10)	Total
<b>Bajo Grado</b>	<b>8</b>	<b>79</b>	<b>87</b>
	9,2%	90,8%	100%
<b>Alto Grado</b>	<b>1</b>	<b>18</b>	<b>19</b>
	5,3%	94,7%	100%
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>97</b>	<b>106</b>
	8,5%	91,5%	100%

Gráfico 95. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en relación al grado histológico





**Gráfico 96. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en relación al grado histológico**



**Gráfico 97**

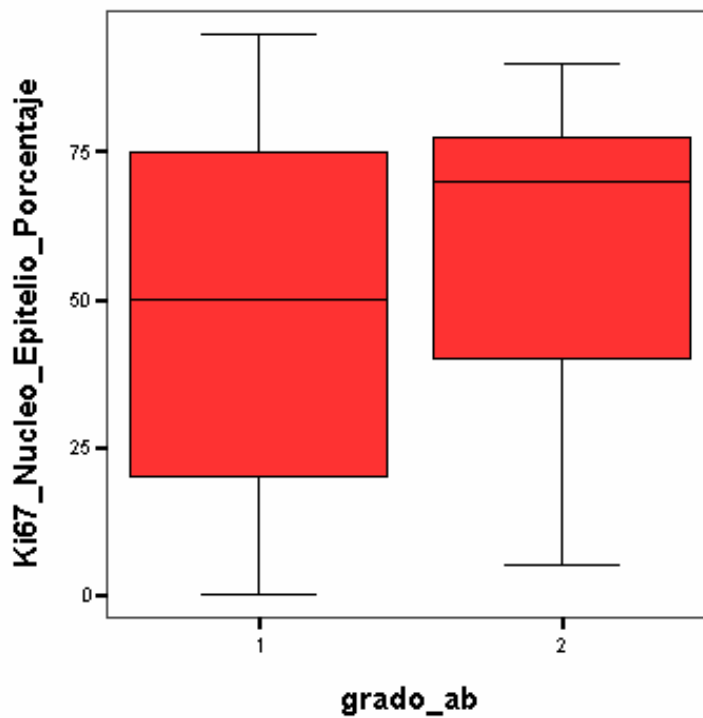


Tabla 60. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en relación al estadio pN (metástasis ganglionar)

<b>SCORE</b>	Negativo (≤10)	Positivo (>10)	Total
<b>0 Ganglios</b>	<b>4</b> 7,4%	<b>50</b> 92,6%	<b>54</b> 100%
<b>1-3 Ganglios</b>	<b>3</b> 11,1%	<b>24</b> 88,9%	<b>27</b> 100%
<b>&gt;3 Ganglios</b>	<b>2</b> 8,0%	<b>23</b> 92,0%	<b>25</b> 100%
<b>Total</b>	<b>9</b> 8,5%	<b>97</b> 91,5%	<b>106</b> 100%

Gráfico 98. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en relación al estadio pN (metástasis ganglionar)

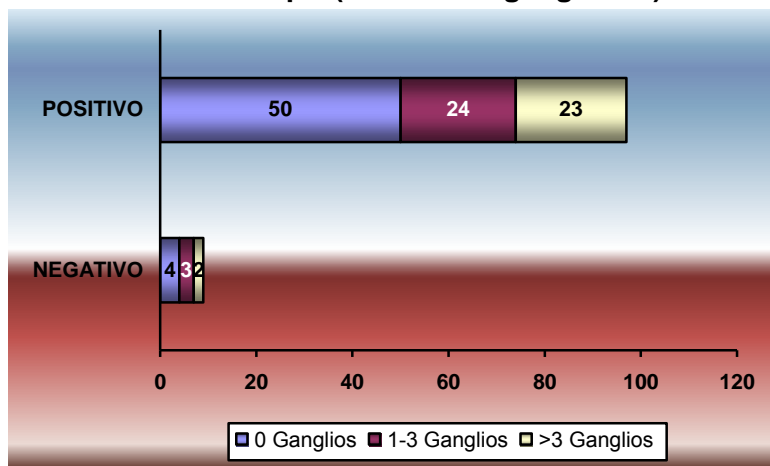


Gráfico 99. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en relación al estadio pN (metástasis ganglionar)

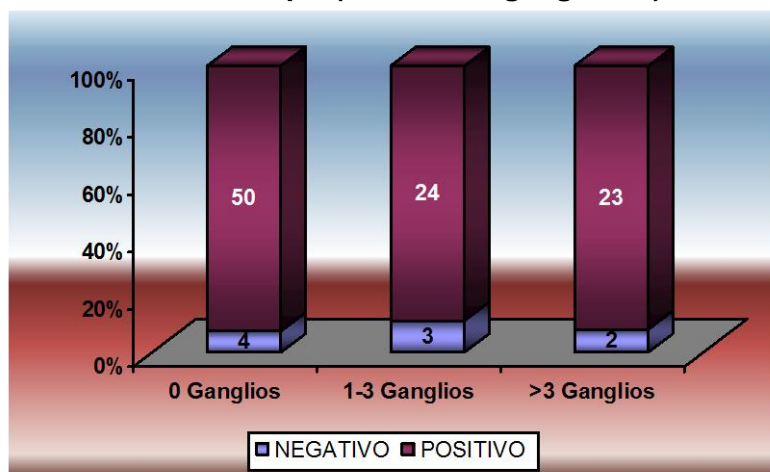


Gráfico 100.

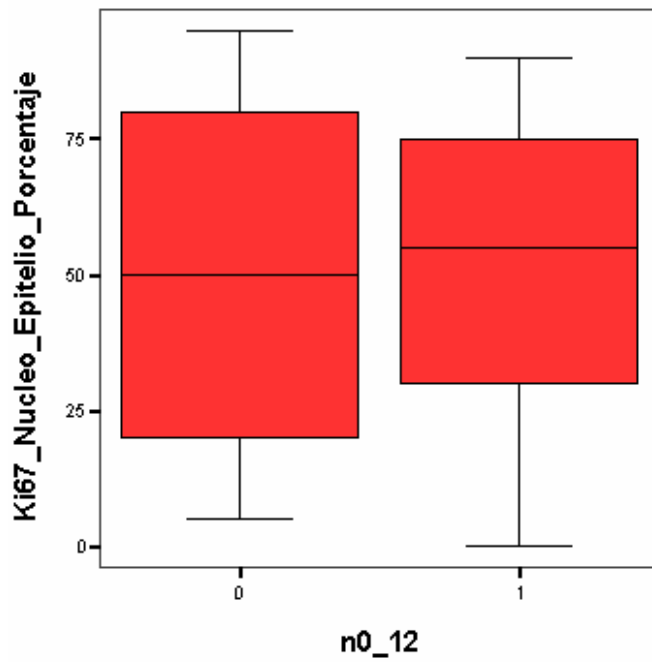
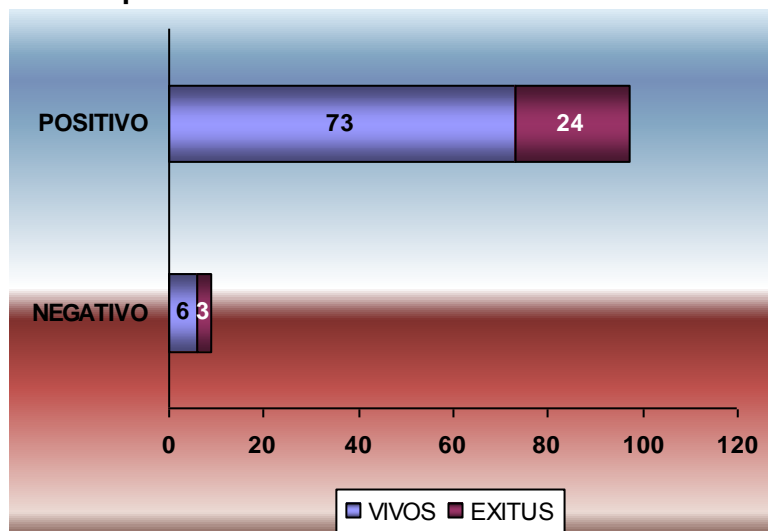


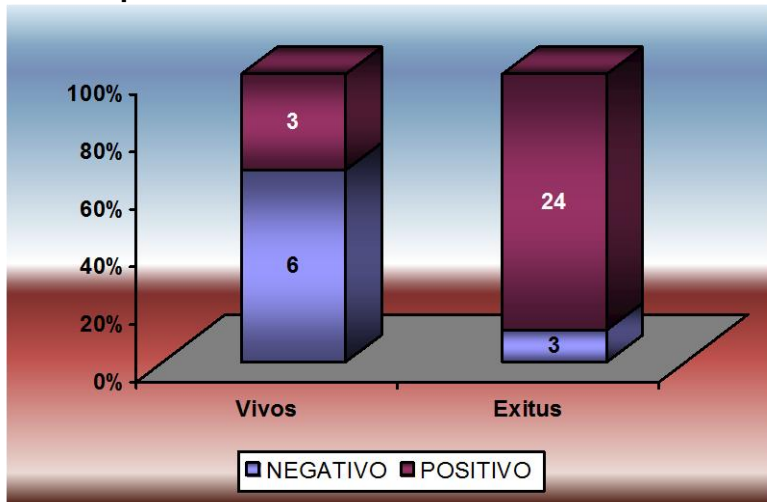
Tabla 61. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en CCR de pacientes muertos por enfermedad

SCORE	Negativo (≤10)	Positivo (>10)	Total
<b>Vivos</b>	<b>6</b> 7,6%	<b>73</b> 92,4%	<b>79</b> 100%
<b>Exitus</b>	<b>3</b> 11,1%	<b>24</b> 88,9%	<b>27</b> 100%
<b>Total</b>	<b>9</b> 8,5%	<b>97</b> 91,5%	<b>13</b> 100%

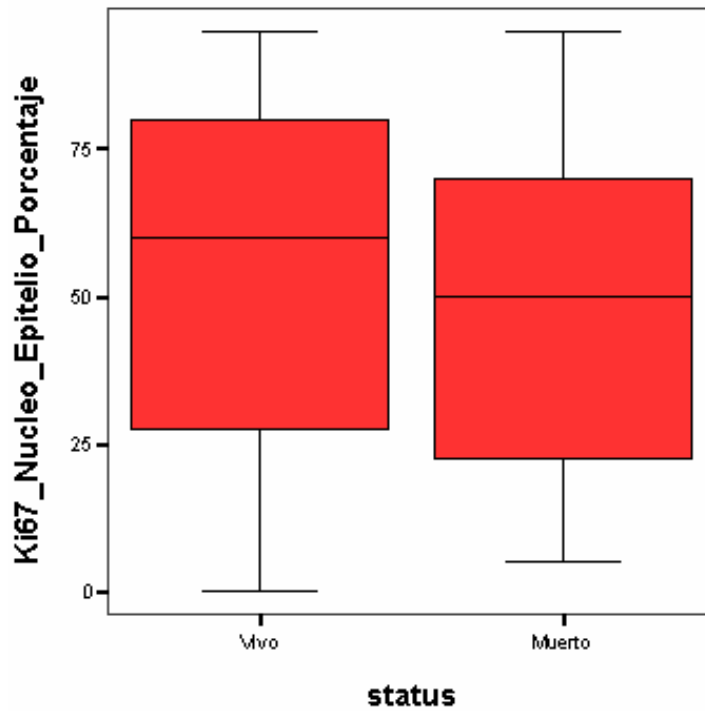
Gráfico 101. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en CCR de pacientes muertos por enfermedad



**Gráfico 102. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en CCR de pacientes muertos por enfermedad**



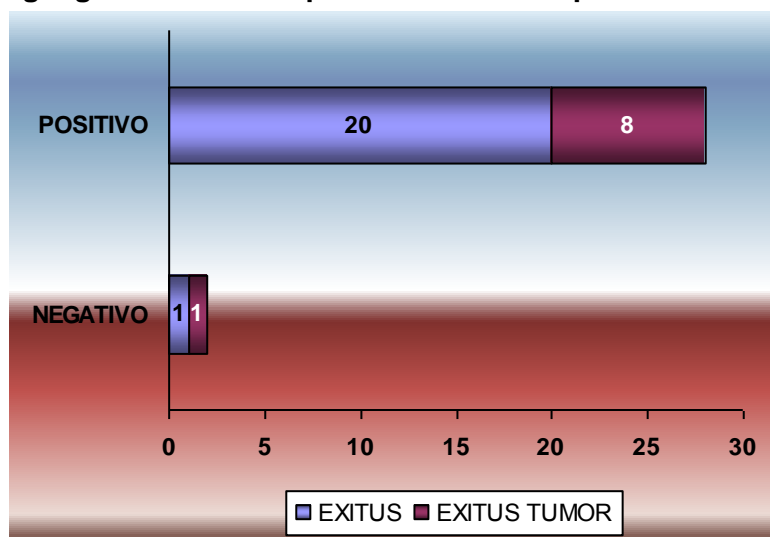
**Gráfico 103**



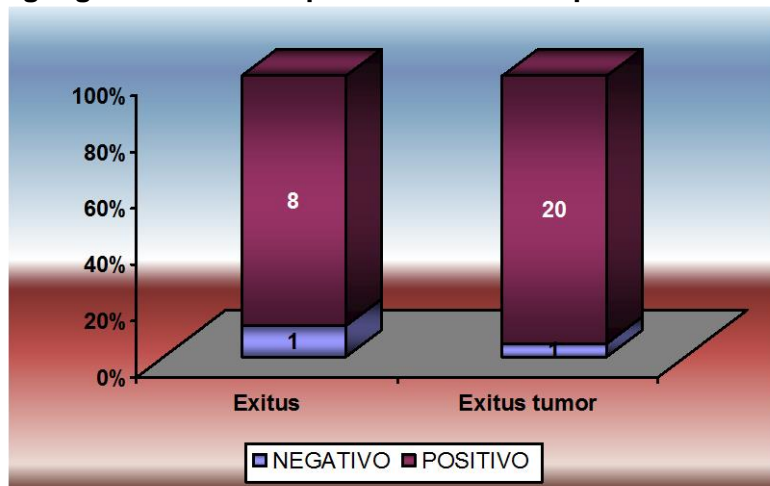
**Tabla 62. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en las metástasis ganglionares de los pacientes muertos por tumor**

<b>SCORE</b>	Negativo (≤10)	Positivo (>10)	Total
<b>Exitus</b>	1 4,8%	20 95,2%	21 100%
<b>Exitus tumor</b>	1 11,1%	8 88,9%	9 100%
<b>Total</b>	2 6,7%	28 93,3%	30 100%

**Gráfico 104. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en las metástasis ganglionares de los pacientes muertos por tumor**



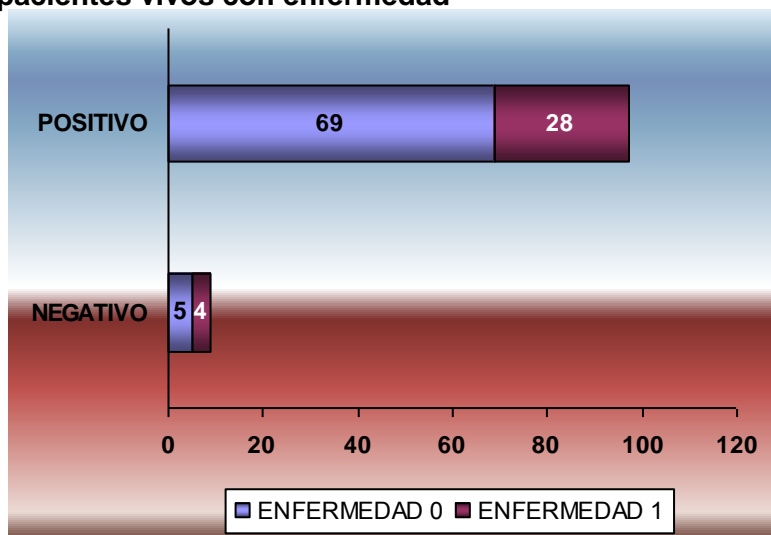
**Tabla 105. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en las metástasis ganglionares de los pacientes muertos por tumor**



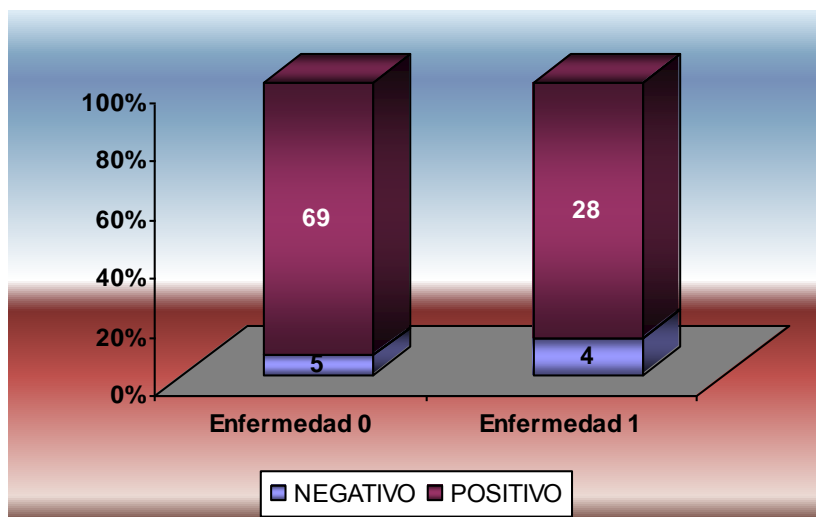
**Tabla 63. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en los pacientes vivos con enfermedad**

<b>SCORE</b>	Negativo ( $\leq 10$ )	Positivo ( $> 10$ )	Total
<b>Enfermedad 0</b>	<b>5</b> 6,8%	<b>69</b> 93,2%	<b>74</b> 100%
<b>Enfermedad 1</b>	<b>4</b> 12,5%	<b>28</b> 87,5%	<b>32</b> 100%
<b>Total</b>	<b>9</b> 8,5%	<b>97</b> 91,5%	<b>106</b> 100%

**Gráfico 106. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en los pacientes vivos con enfermedad**



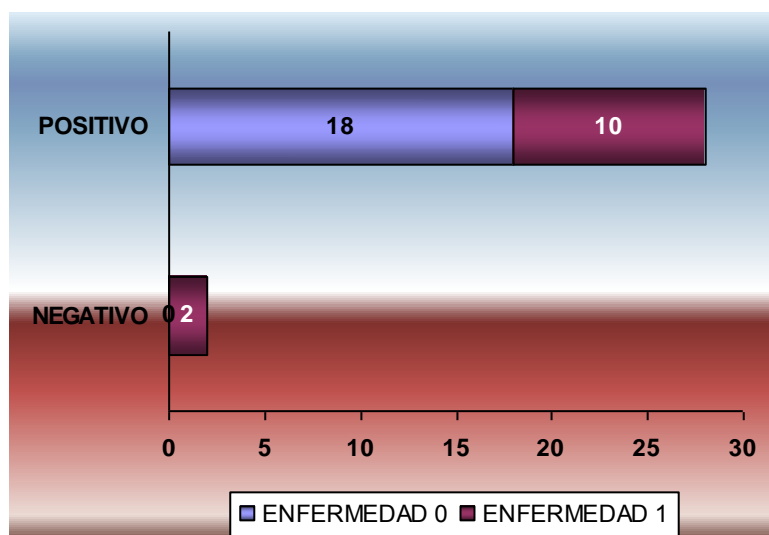
**Gráfico 107. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en los pacientes vivos con enfermedad**



**Tabla 64. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en las metástasis ganglionares en relación a los pacientes vivos con enfermedad**

<b>SCORE</b>	Negativo ( $\leq 10$ )	Positivo ( $> 10$ )	Total
<b>Enfermedad 0</b>	<b>0</b> 0,0%	<b>18</b> 100,0%	<b>18</b> 100%
<b>Enfermedad 1</b>	<b>2</b> 16,7%	<b>10</b> 83,3%	<b>12</b> 100%
<b>Total</b>	<b>2</b> 6,7%	<b>28</b> 93,3%	<b>30</b> 100%

**Gráfico 108. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en las metástasis ganglionares en relación a los pacientes vivos con enfermedad**



**Gráfico 109. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en las metástasis ganglionares en relación a los pacientes vivos con enfermedad**

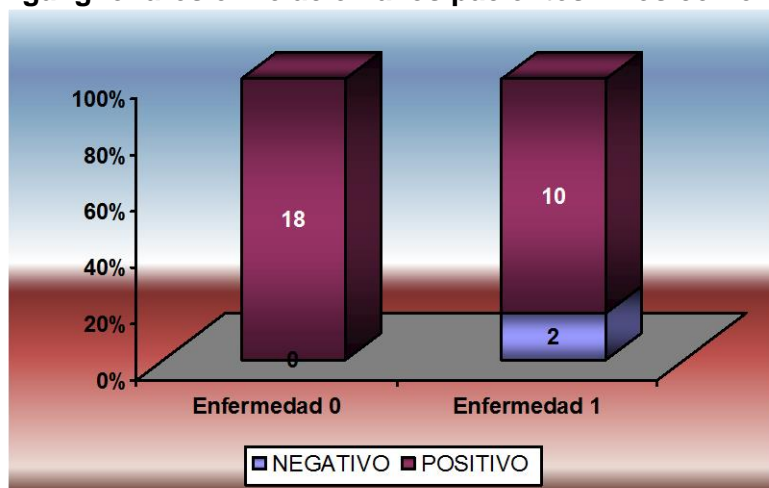


Tabla 65. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en relación a los pacientes con recidiva

SCORE	Negativo ( $\leq 10$ )	Positivo ( $> 10$ )	Total
<b>Recidiva 0</b>	<b>6</b> 6,5%	<b>87</b> 93,5%	<b>93</b> 100%
<b>Recidiva 1</b>	<b>3</b> 23,1%	<b>10</b> 76,9%	<b>13</b> 100%
<b>Total</b>	<b>9</b> 8,5%	<b>97</b> 91,5%	<b>106</b> 100%

Gráfico 110. Expresión

inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en relación a los pacientes con recidiva

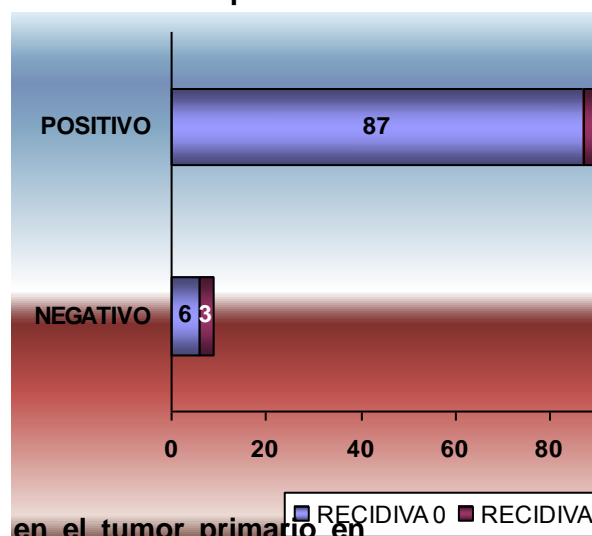


Gráfico 111. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en el tumor primario en relación a los pacientes con recidiva

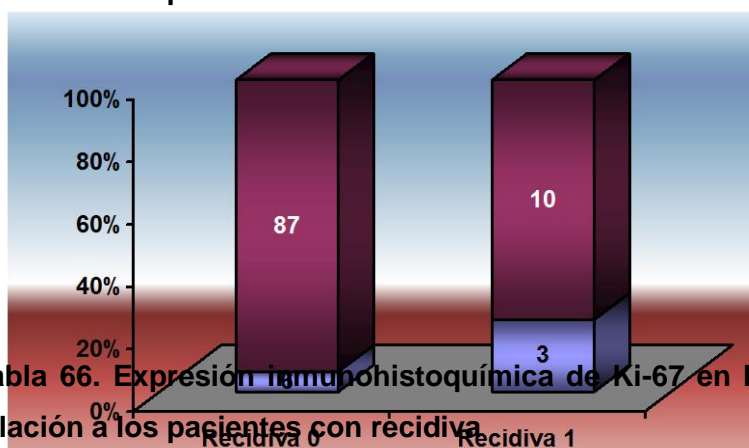
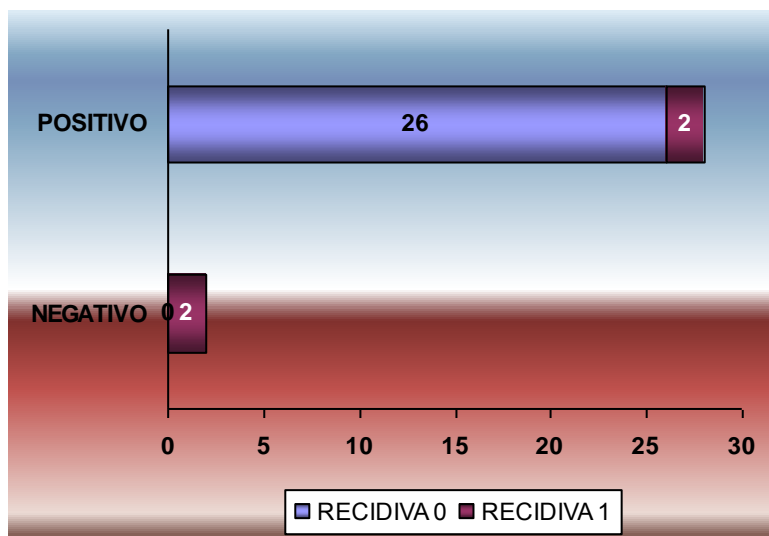


Tabla 66. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en los ganglios linfáticos en relación a los pacientes con recidiva

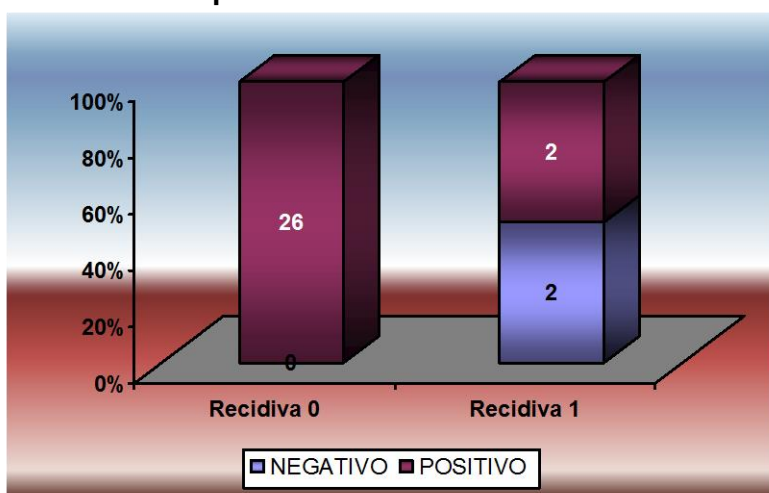
SCORE	Negativo ( $\leq 10$ )	Positivo ( $> 10$ )	Total
<b>Recidiva 0</b>	<b>0</b> 0,0%	<b>26</b> 100,0%	<b>26</b> 100%
<b>Recidiva 1</b>	<b>2</b> 50,0%	<b>2</b> 50,0%	<b>4</b> 100%
<b>Total</b>	<b>2</b> 6,7%	<b>28</b> 93,3%	<b>30</b> 100%



**Gráfico 112. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en los ganglios linfáticos en relación a los pacientes con recidiva**



**Gráfico 113. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en los ganglios linfáticos en relación a los pacientes con recidiva**

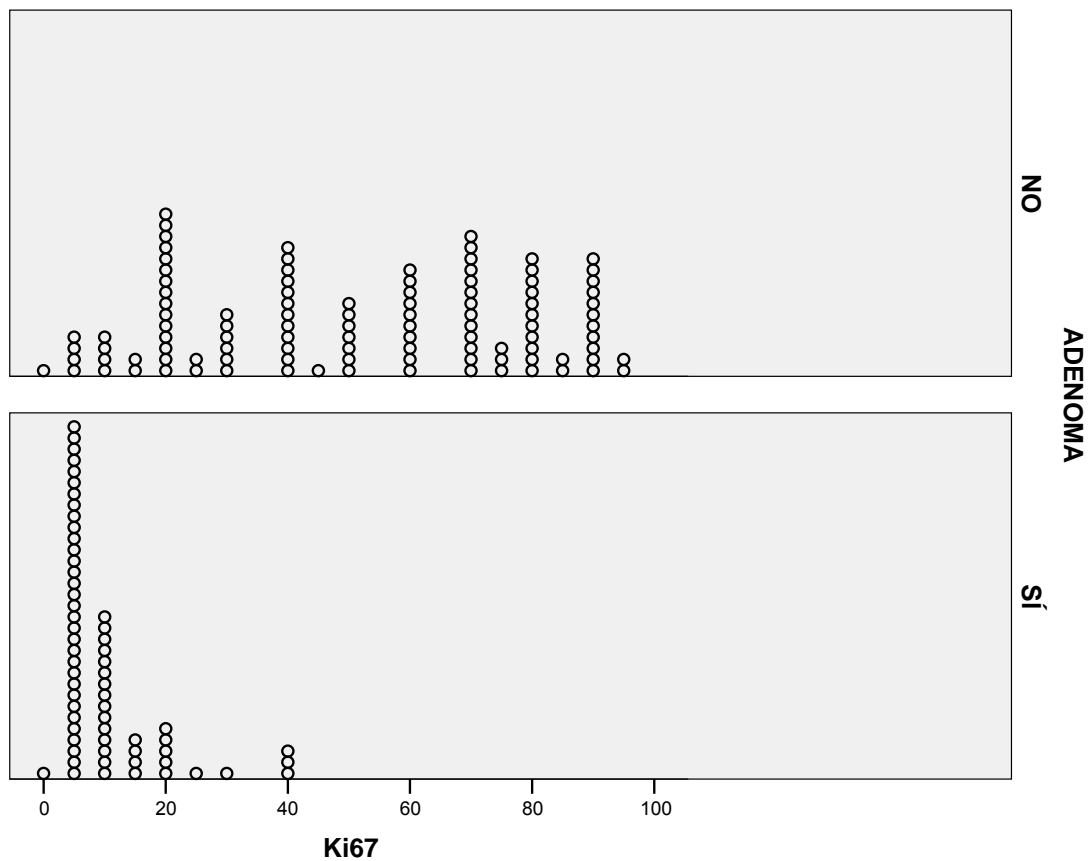


## DESCRIPTIVA

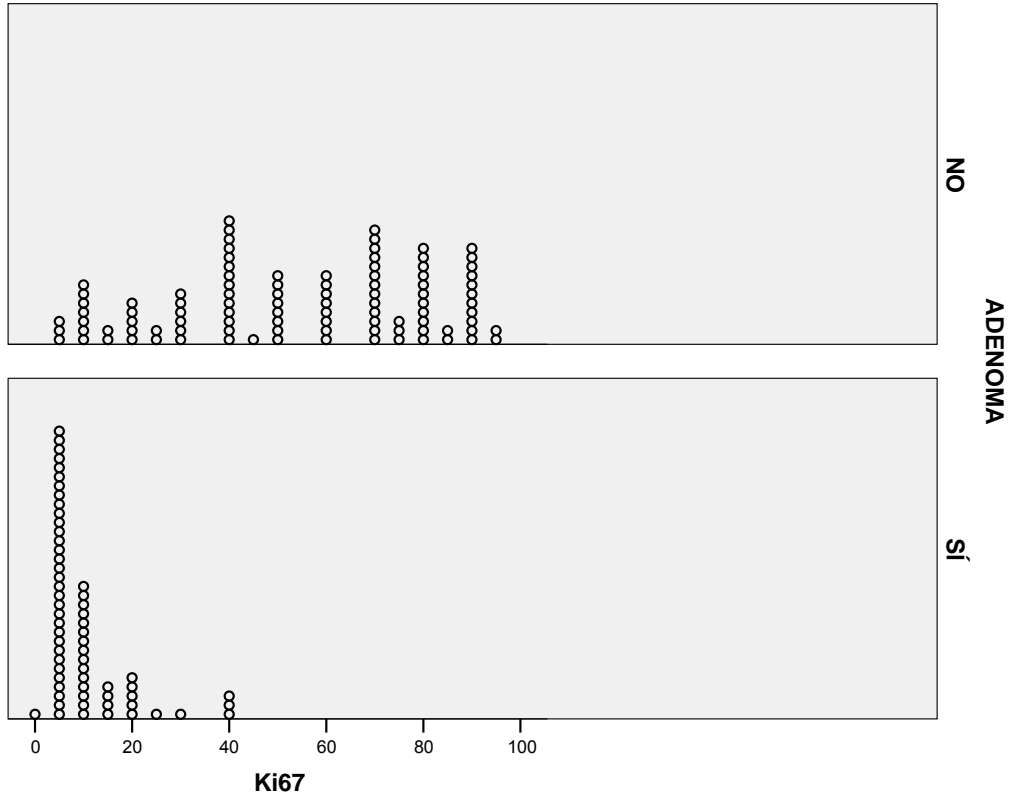
**Tabla 67.**

Positivo10_Ki67_Nucleo_Adenoma_Porcentaje					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	0 Negativo (>=10)	48	77,4	77,4	77,4
	1 Positivo (>10)	14	22,6	22,6	100,0
	Total	62	100,0	100,0	

**Gráfico 114. Expresión de Ki-67 en adenocarcinoma vs adenoma.**



**Gráfico 115. Expresión de ki-67 en el margen infiltrante vs adenoma**



Gráfica 116. Expresión de Ki-67 en metástasis ganglionares vs adenoma.

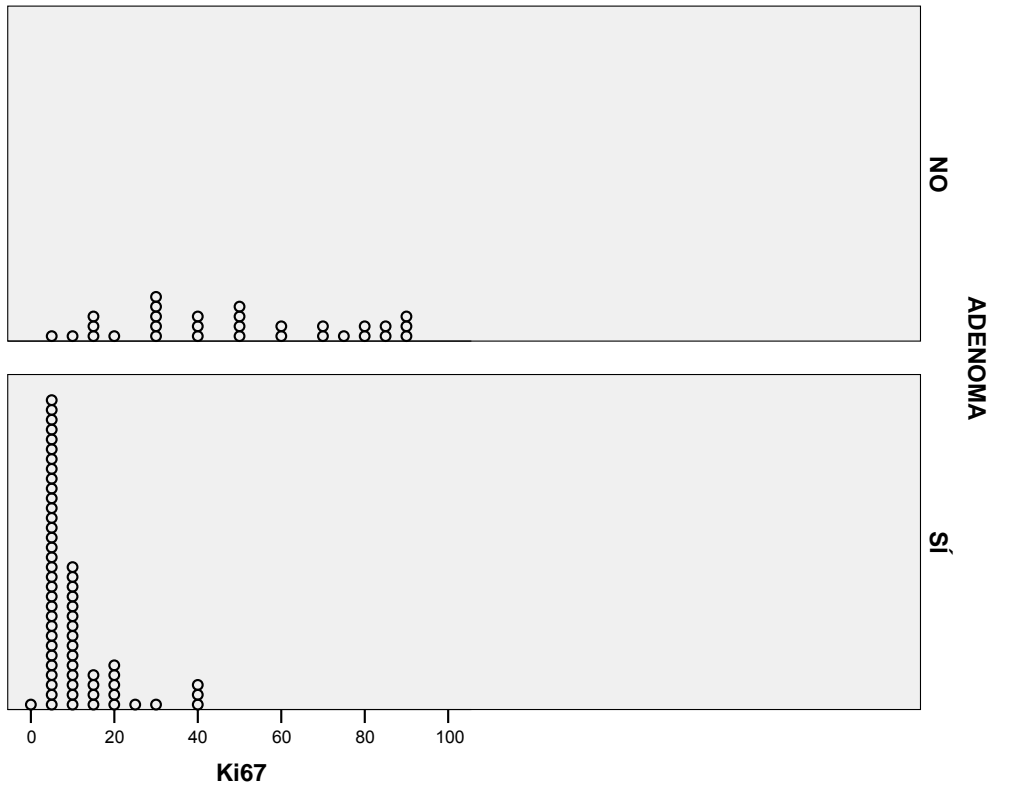
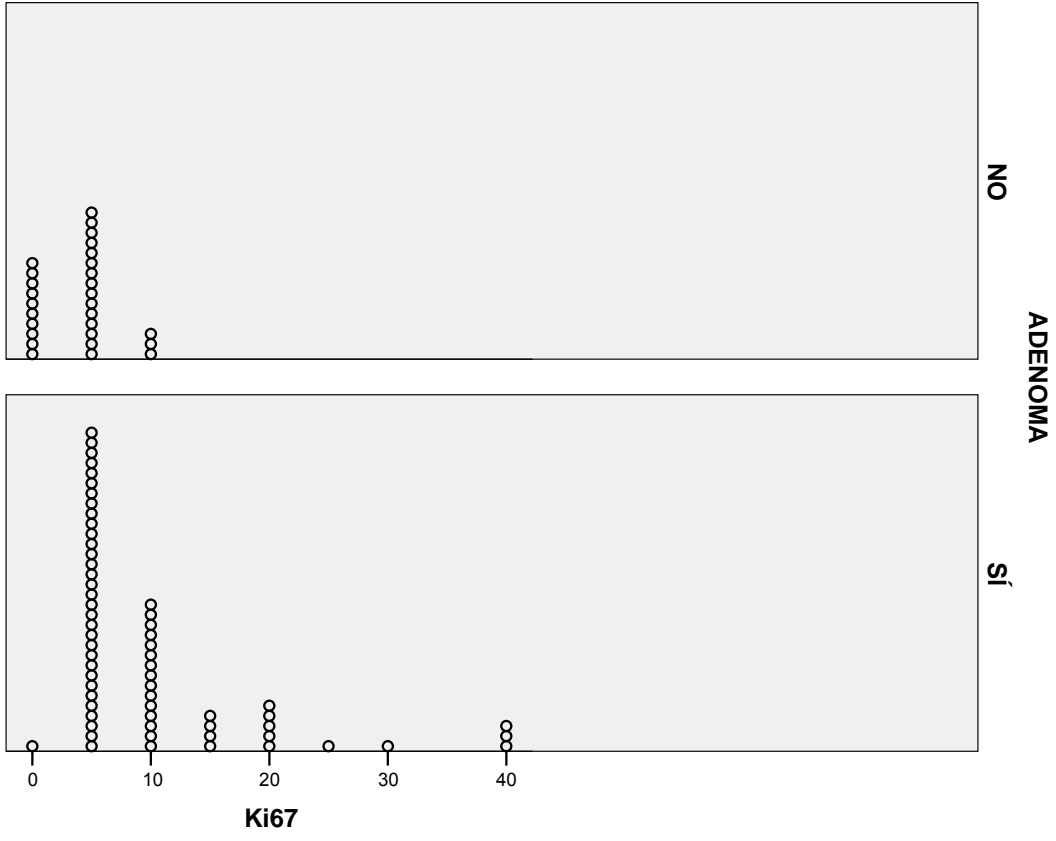


Gráfico 117. Expresión de Ki-67 en la mucosa lejana al tumor vs adenoma



## 4EBP1

Las vías de señalización que promueven el crecimiento celular con frecuencia están mal reguladas en el cáncer. Una de estas vías reguladoras converge en efectores como 4EBP1, promoviendo el crecimiento celular y la síntesis proteica. Esta vía está regulada tanto por señales extracelulares, como por factores de crecimiento y señales intracelulares, como los nutrientes. Es por ello que una mutación que amplifique cualquiera de estos dos tipos de señales es un factor de riesgo que potencialmente conduce a la formación de tumores. Se ha descubierto que un complejo supresor tumoral (cuya función se pierde en los pacientes con esclerosis tuberosa) regula la señal, de los nutrientes celulares, regulada y transmitida por mTOR (mammalian target of rapamycin), una proteína crítica en el proceso de señalización hacia los efectores 4EBP1. El interés que tiene esta vía es debido a que la molécula rapamicina inhibe a mTOR, y por consiguiente a sus efectores, lo cual podría constituir una estrategia terapéutica para el desarrollo y uso de nuevas drogas en aquellos tumores cuyo crecimiento depende de ésta vía (Shamji a et al, 2003 y [Cabrera López C. et al, 2011](#))

Para facilitar el crecimiento celular es necesario un incremento en la síntesis proteica. 4EBP1 juega un papel importante en la síntesis proteica ribosomal, y por tanto, en la supervivencia y proliferación celular (Heesom KJ et al 2001 y Topisirovic et al, 2004) a través de la fosforilación del factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E). La fosforilación de 4EBP1 (p-4EBP1) trae como consecuencia la liberación de eIF4E y la activación de la síntesis proteica celular (Avdulov S et al, 2004). Se cree que el incremento en la síntesis proteica esta directamente relacionado al aumento en la expresión y función de la proteína de unión activada eIF-4E1 (4EBP1). Numerosas observaciones sugieren que ésta proteína podría jugar un papel clave en el crecimiento celular de tumores sólidos como los de mama, vejiga y cervix, sin embargo su papel es poco conocido en el cáncer colorrectal. Uno de los pocos estudios existente de esta vía en cáncer colorrectal, no ha encontrado relación significativa entre la expresión de eIF-4E, con la edad ni con el sexo, (Hans J et al, 2001). En nuestro trabajo analizamos la expresión de 4EBP1 en relación al sexo; estudiamos la expresión citoplasmática de 116 casos, 72 hombres y 44 mujeres. Entre los hombres, 2 fueron negativos (3%), 26 (36%) con baja expresión (score  $\leq 100$ ) y 44 (61%) con expresión alta (score 101-300), éstos últimos divididos en 11 casos (15%) con expresión intermedia (score 101-200) y 33 casos (46%) con expresión alta (score 201-300). Entre las mujeres, obtuvimos 12 (27%) con baja expresión y 32 (73%) con expresión alta (15; 34% intermedia y 17; 39% alta). Éstas diferencias de expresión no fueron significativas ( $p=0,089$ ). Asimismo se analizó la expresión nuclear en 115 casos, 71 hombres y 44 mujeres. En los

hombres, 17 (24%) fueron negativos, 41 (58%) con expresión baja y 13 (18%) alta (7; 10% intermedia y 6; 8% alta). En las mujeres, 7 (16%) fueron negativos, 32 (73%) con baja expresión y 5 (11%) con expresión de moderada intensidad. No hubo casos de intensidad alta. Estos resultados tampoco presentaron diferencias significativas ( $p=0,134$ ).

Según este mismo estudio (Hans J et al, 2001), la mayoría de casos (71%) en los que eIF-4E no pudo ser detectado correspondieron a mucosa normal, mientras que el 69% de los adenocarcinomas tuvieron niveles altos de expresión. Cuando analizamos la expresión citoplasmática de p4EBP1 en la mucosa normal, obtuvimos resultados similares a los que hemos citado previamente. Estudiamos 41 casos, obteniendo un score negativo en 27 (66%) y baja expresión en 14 (34%). No obtuvimos scores altos de expresión (mayor de 100). Sin embargo, la expresión analizada en 115 adenocarcinomas, fue negativa en 24 casos (21%), con baja expresión en 73 (63%) y alta expresión en 18 (16%), de los cuales 12 (11%) presentaron score intermedio y 6 (5%) presentaron score alto. Por lo que nuestros resultados son solo parcialmente similares a los del estudio citado anteriormente.

Al analizar la expresión nuclear en 29 metástasis ganglionares obtuvimos un score negativo en 12 (41%), baja expresión en 13 (45%) y alta expresión en 4 (14%), de los cuales 3 casos (10%) eran de score intermedio y 1 caso (3%) de score alto. Asimismo, la expresión citoplasmática analizada en 29 metástasis ganglionares fue negativa en 16 casos (55%), expresión baja en 11 (38%) e intermedia en 2 (7%). No hubo casos de score alto. Lo que pone de manifiesto que también existe una discreta mayor expresión en las metástasis ganglionares que en la mucosa normal, sin llegar a ser significativa.

Los mismos investigadores (Hans J et al, 2001) han encontrado una relación estadística alta ( $p=0,00001$ ) entre el grado de malignidad de la mucosa y el nivel de expresión de eIF-4E. Las lesiones carcinomatosas presentaron niveles de hasta 43 veces más altos de expresión que los de la mucosa normal ( $P=0,0001$ ), y en los adenomas la superioridad en el nivel de expresión fue hasta de 13 veces comparada con la mucosa normal ( $p=0,0003$ ).

En nuestro estudio la expresión nuclear de p4EBP1 se analizó en 116 adenocarcinomas, con una expresión media de 157 (score intermedio), mientras que el score medio de expresión en los 62 adenomas fue de 62 (bajo). Estos valores tienen una diferencia de medias de 94, lo cual representa expresión significativamente mayor en los carcinomas ( $p<0,001$ ). El estudio de la expresión citoplasmática en los mismos casos también objetivó una mayor expresión en los adenocarcinomas que en los adenomas, con una diferencia de medias de 57 que fue significativa ( $p<0,001$ ).

Estas diferencias también fueron significativas en el margen tumoral infiltrante ( $p=0,003$ ), en las metástasis ganglionares ( $p=0,007$ ) y en las metástasis hepáticas ( $p<0,000$ ) en relación a los adenomas. Asimismo, la expresión citoplasmática en la mucosa normal lejana al tumor fue significativamente menor ( $p< 0,000$ ) que en los adenomas, con una diferencia de medias de expresión de 20.

Para determinar si el aumento en la expresión de eIF-4E es un acontecimiento temprano o tardío en la carcinogénesis colónica, Rosenwald I et al, (1999) analizó la expresión en adenomas vellosos, tubulares y tubulovellosos. Las lesiones adenomatosas mostraron expresión alta de eIF-4E mientras que en la mucosa normal peri-adenomatosa la expresión fue baja, limitándose a la porción inferior (áreas proliferativas) de las criptas. En resumen, todos los casos estudiados revelaron incremento en la expresión de eIF-4E en los adenomas colónicos, suponiendo que existe un incremento de eIF-4E durante las fases tempranas de la tumorigénesis colónica. Ninguno de estos estudios hace referencia a la expresión según los componentes tubular y veloso, lo cual probablemente no tiene mayor importancia ya que carece de diferencias significativas según se pone de manifiesto en nuestro estudio, en el cual hemos podido observar que la media de la expresión nuclear en los adenomas tubulares fue de 68; en los vellosos fue de 63 y en los tubulovellosos de 55 ( $p=0,292$ ).

En otro estudio se seleccionaron casos representativos de CCR que contenían mucosa normal y tumoral en estrecha proximidad, con el objetivo de que ambos componentes pudieran ser evaluados en una misma preparación (Rosenwald I et al, 1999). El frente tumoral invasor mostró un nivel más alto de eIF-4E que las glándulas mucosas adyacentes, las cuales presentaron una expresión de eIF-4E mínimamente detectable. Sin embargo, con frecuencia pudo detectarse expresión leve en las áreas proliferativas de las glándulas normales (criptas). Al comparar las áreas más intensas de expresión de eIF-4E en las glándulas colónicas normales con áreas tumorales, la diferencia seguía siendo contundente. A pesar de todo, eIF-4E se encontró aumentado en todos los casos analizados. Merece la pena resaltar que las células tumorales en los márgenes del tumor mostraron niveles más altos de expresión que en las porciones centrales. Este hallazgo podría justificarse si tenemos en cuenta que las regiones periféricas podrían ser las áreas que más proliferan en el tumor, en comparación a la porción central en donde podría existir un flujo sanguíneo más pobre, disminución en el aporte de nutrientes, con la consiguiente disminución de la actividad de crecimiento, de proliferación y muerte celular. Sin embargo, estudios en cáncer de mama y de cabeza y cuello han puesto de manifiesto un patrón de expresión que aumenta de forma gradual desde la mucosa normal a la zona de transición tumoral,

alcanzando la máxima expresión en la porción central del tumor (Sorrells D et al, 1999). Ninguno de estos patrones de expresión se han observado en nuestro estudio, según lo que hemos comentado previamente.

La expresión en el componente estromal del tumor, y en el tejido conectivo subepitelial tuvo niveles de expresión bajos o no detectables. Esto indica que los niveles de expresión muestran variaciones tisulares específicas, por lo que cualquier estudio dirigido a valorar la expresión de esta proteína en tumores debe basarse en la comparación de sus niveles de expresión en el tejido normal de origen y no en los tejidos normales de la proximidad.

Algunos estudios han implicado a eIF-4E en la formación neoplásica y en la progresión metastásica, señalando su sobreexpresión en una variedad de tumores humanos y vinculándolo a parámetros clínico-patológicos. Además en estudios experimentales, eIF-4E por si solo ha demostrado ser suficiente tanto para inducir la transformación neoplásica como para permitir los procesos de angiogénesis y metástasis, mediante la traducción de mRNA que codifica proteínas intimamente involucradas en estos procesos (De Benedetti A y Graff J, 2004).

Recientemente en un estudio inmunohistoquímico con 129 tumores de ovario, se demostró que la expresión de p-4EBP1 se asociaba de forma significativa a las neoplasias de alto grado y a su vez a un mal pronóstico, independientemente de otras alteraciones oncogénicas (Castellvi et al, 2006).

Existe poca literatura científica que estudie la vía mTOR en relación al pronóstico de los tumores y no tenemos conocimiento de alguno que lo haga en cáncer colorrectal. Aunque en el caso de cáncer de mama y de otros tumores sólidos se ha encontrado aumento de la expresión de eIF-4E en relación a la agresividad tumoral, a un pronóstico pobre y a un aumento en la probabilidad de recurrencia (Li B et al, 1997; Sorrells D et al, 1998 y 1999). También se ha descrito sobreexpresión en cáncer gástrico significativamente asociada a invasión vascular y a supervivencia corta en el postoperatorio (Chen C et al, 2004), aunque llama la atención que en este mismo trabajo no se encontró ninguna relación significativa con otros parámetros clínico-patológicos como el tipo macroscópico del tumor, tipo histológico, la profundidad de la invasión, ni con las metástasis a ganglios linfáticos.

En otro estudio reciente con 103 tumores de mama, p4EBP1 fue el principal factor de la vía mTOR que se encontró asociado a un pobre pronóstico y a mayor agresividad en las neoplasias mamarias, ya que se observó mayormente expresado en aquellos tumores pobremente diferenciados y se correlacionó significativamente con el tamaño tumoral, con la presencia de metástasis a ganglios linfáticos y con las recurrencias regionales (Rojó F et al, 2007).



Un estudio más reciente que demuestra mayor expresión inmunohistoquímica de 4EBP1 en cáncer colorrectal, en comparación con los cortes de los epitelios no tumorales y de las displasias de bajo y de alto grado, tiene una metodología distinta, en cuanto que evalúa la expresión de 4EBP1 en todas estas muestras asociadas a un mismo paciente (Yan-Jie Zhang et al, 2009).

A pesar de que no todos nuestros hallazgos concuerdan con lo descrito en la literatura, seguimos creyendo que la proteína de unión activada eIF-4E1 y 4EBP1 son efectores que juegan un papel importante en el proceso de carcinogénesis colorrectal. Un aumento inicial de estos factores conduciría al incremento de tamaño de una neoplasia, probablemente benigna, debido a un aumento en la síntesis proteica, sobre todo de aquellas proteínas de síntesis en el ciclo celular con la consiguiente disminución del proceso de muerte celular. Posteriormente, se sumarían algunas mutaciones, incluyendo aquellas que causan un incremento en las proteínas de regulación transcripcional y de la amplificación de la traducción, lo cual conduciría al desarrollo de las características malignas con consiguientes características invasoras y metastásicas (Rosenwald I et al, 1999). Sin embargo, las diferencias observadas pueden deberse a la asignación de un punto de corte o valor de expresión, que puede ser distinto entre los estudios publicados y el nuestro. Este hecho se fundamenta en gran parte por la subjetividad que supone la valoración de una sección histológica completa, en donde el investigador espera observar mayor expresión en las zonas tumorales que en la mucosa normal circundante. Aunque, en detrimento nuestro también tenemos que comentar que la valoración de marcadores con expresión inmunohistoquímica heterogénea (como p4EBP1) están “relativamente” contraindicados en la utilización de microarrays tisulares. Es bien sabido que la unificación de criterios para la valoración inmunohistoquímica de las preparaciones histológicas ha sido siempre un tema de controversias.

## **RACK 1**

Las isoenzimas proteínicas quinasas C (PKC) comprenden una familia de genes que modulan la transducción de las vías de señalización a través de la membrana (Mellor H y Parker P, 1998) regulando la interacción celular (Freed E et al, 1989) , la secreción (Lord J y Ashcroft S, 1984) y la función del citoesqueleto (Owen P et al, 1996). Algunas isoformas de PKC residen en el núcleo y están involucradas en la transcripción genética (Berry N y Nishizuka Y, 1990), en la regulación de la proliferación (Lord J y Pongracz J, 1995), la diferenciación celular (Silei V et al, 1995), la apoptosis (Cross T et al, 2000) y la transformación maligna (Martelli A et al, 1999). El tráfico intracelular de isoenzimas PKC activadas es llevado a cabo por proteínas de unión específicas, que incluye la familia de receptores de C quinasa activada (RACKs), dentro de las que encontramos a RACK1 (Csukai M, y Mochly-Rosen D, 1999; Jaken S, 1996).

Se ha descrito que RACK1 promueve la diseminación celular y el contacto con la matriz extracelular (Hermanto U et al, 2002). Sin embargo, publicaciones de años recientes ponen de manifiesto que RACK1 desempeña un comportamiento multifacético en los procesos fisiológicos celulares, los cuales podrían ser diseñados de acuerdo a las necesidades individuales de los distintos tipos celulares (McCahill A et al, 2002) .

Aunque desde inicio de la década de los 80's se sabe que los cambios en PKC suceden en el cáncer (Castagna et al, 1982), aún no está claro si contribuye a su fenotipo la señalización por PKC y por RACK, o si éstos cambios constituyen respuestas compensatorias que contrarrestan dicho fenotipo (Schechtman D y Mochly-Ros D, 2001).

En los últimos años se ha visto que los niveles de RACK1 están elevados hasta cuatro veces en el carcinoma pulmonar de célula no pequeña en comparación al tejido pulmonar normal, y valores de hasta 20 veces más altos se han encontrado en el cáncer de colon cuando se ha comparado con el tejido colónico normal (Berns et al., 2000). Sin embargo, estos mismos investigadores no han encontrado aumentos significativos en estudios de mRNA de RACK1 en cáncer de mama. En nuestro estudio observamos que la expresión de RACK1 en la mucosa colónica normal analizada en 64 pacientes fue negativa en 3 casos (5%), baja (score  $\leq 100$ ) en 49 casos (76%) y alta (score 101-300) en 12 (19%), éstos últimos divididos 8 casos (13%) con expresión intermedia (score de 101 a 200) y 4 casos (6%) con expresión alta (de 201 a 300). Mientras que la expresión de RACK1 analizada en 126 adenocarcinomas fué baja en 28 casos (22%) y alta 98 casos (78%), de los cuales 52 (41%) presentaron score intermedio y 46 (37%) un score alto. Con estos resultados hemos podido

constatar que en la mucosa normal, más del 80% de los casos valorados presentaron expresión baja o nula, y que en el tumor primario cerca de un 80% presentaron expresión alta.

Es bien sabido que la formación de nuevos lechos vasculares en la matriz extracelular es una de las principales características que confiere a las neoplasias malignas la capacidad de invasión local y también a distancia (Vernon R et al, 1995). Específicamente, PKC $\beta$ , el ligando de RACK1, se sabe que tiene un papel importante en la angiogénesis (Zhou L et al, 1996 y Yoshiji H et al, 1999). Basado en estos conocimientos, se han realizado estudios in vivo e in vitro en células endoteliales del cuerpo lúteo bovino para investigar la expresión de RACK1 durante la proliferación endotelial (Berns et al., 2000), uno de los aspectos más prominentes de la angiogénesis (Folkman, J y Shing Y, 1992; Risau W, 1997). Se observaron diferencias en la expresión de RACK1 en el cuerpo lúteo durante las fases temprana, media y tardía del ciclo ovárico que se asociaron con las etapas progresiva, activa y regresiva del proceso angiogénico in vivo, observándose una expresión moderada y fuerte durante las fases temprana y media, respectivamente, sin evidencia de expresión en la fase tardía (Berns et al., 2000). Sin embargo, la traducción de estos resultados en material quirúrgico para estudio rutinario no ha podido ser confirmada de manera significativa. Inicialmente nuestro trabajo no contempló el estudio de la expresión de RACK1 en vasos (especialmente neovascularización intratumoral) , sin embargo creemos que la expresión en el margen tumoral infiltrante y en las metástasis ganglionares refleja parte de la actividad angiogénica tumoral. Al analizar la expresión de RACK1 en el margen tumoral infiltrante de 67 tumores, ésta resultó baja en 13 (19%) y alta en 54 casos (81%), de los cuales 30 (45%) presentaron un score intermedio y 24 (36%) alto.

Al estudiar la expresión de RACK1 en 30 metástasis ganglionares, obtuvimos niveles bajos de expresión en 6 casos (20%) y altos en 24 (80%), de los cuales 14 (47%) presentaron score intermedio y 10 (33%) score alto. Estos hallazgos ponen de manifiesto una alta expresión en alrededor un 80% de los casos. Estos resultados son similares a los observados en el tumor primario y superiores a los de la mucosa colónica normal.

Los mismos investigadores (Berns et al, 2000), evaluaron la expresión de RACK1 en la angiogénesis in vivo en cáncer, mediante hibridación in situ de RACK1 en carcinoma pulmonar de célula no pequeña y en carcinoma de colon. Los niveles de expresión de RACK1 fueron mucho más altos en las células neoplásicas de estos tumores que en las células de su contrapartida normal. Sin embargo, la expresión de RACK1 no se limitaba al endotelio angiogénicamente activo, sino que también pudo observarse en

las células neoplásicas del colon y en la mucosa colónica normal. Los vasos normales y las células endoteliales en monocapa de los vasos pequeños también lo expresaron, aunque con niveles más bajos que los observados en los vasos intratumorales de mayor calibre. Por todo ello estos autores apoyan el papel de RACK1 en el mantenimiento de la angiogénesis, el crecimiento y la diseminación tumoral, aunque el estudio no se extiende a investigar el rol de RACK1 en las lesiones tumorales metastásicas.

La variedad de procesos celulares en los cuales RACK1 ha sido implicado, probablemente refleja la habilidad de esta proteína para servir de "andamio", interactuando así con un gran número de proteínas de señalización, con lo cual desde un punto de vista anatomopatológico práctico, partiendo de nuestros objetivos de trabajo y de nuestros resultados, creemos que la expresión de esta proteína reflejaría solo parte del grado real de agresividad tumoral, y que su asociación a un curso clínico desfavorable sería aún más controvertido.

Independientemente de la alteración biológica que represente, la expresión inmunohistoquímica de RACK1 en nuestra serie de CCR tiene una sobreexpresión significativa en relación al grado histológico y a las metástasis ganglionares, ya que en de los 126 casos analizados, 102 correspondían a tumores de bajo grado y 24 a tumores de alto grado. En los tumores de bajo grado hubo 25 (25%) casos con baja expresión y 77 (75%) con alta expresión. Entre estos últimos 45 (44%) de score intermedio y 32 (31%) de score alto. En los tumores de alto grado, hubo 3 casos con baja expresión (13%), 21 con alta expresión (87%), entre estos últimos 7 de score intermedio (29%) y 14 de score alto (58%). Resultados que indican una sobreexpresión significativa en tumores de alto grado ( $p=0,045$ ).

En cuanto a la expresión de RACK1 según el número de ganglios linfáticos metastatizados, hemos analizado 126 casos, de los cuales 63 presentaban ganglios negativos (pN0), 35 tenían de 1 a 3 ganglios positivos (pN1) y 28 tenían metástasis en más de 3 ganglios (pN2). En el grupo tumores pN1, 11 casos (31%) presentaron baja expresión de RACK1 y 24 (69%) alta expresión, entre estos últimos, 16 casos (46%) fueron de score intermedio y 8 casos (23%) de score alto. Entre los tumores pN2, 2 casos (7%) presentaron baja expresión y 26 casos (93%) alta expresión, entre estos últimos, 10 casos (36%) fueron de score intermedio y 16 casos (57%) de score alto. Estos resultados ponen de manifiesto una sobreexpresión significativa de RACK1 en pacientes con mayor afectación ganglionar linfática ( $p = 0,045$ ).

Si bien es cierto, que tanto los aspectos macroscópicos, como el tamaño y la configuración tumoral -independientemente del nivel de infiltración en la pared

colónica-, y la valoración de las preparaciones histológicas sin ningún conocimiento de la clínica del enfermo permite un análisis más objetivo de las preparaciones histológicas, también es importante tener un conocimiento clínico detallado que pueda contribuir al esclarecimiento de algunos de nuestros resultados al hacer la correlación clínico-patológica. De hecho, antes del inicio de la era de los marcadores biológicos, los tumores de gran tamaño y obstructivos se relacionaban con un mal pronóstico probablemente por una asociación entre obstrucción, perforación y el aumento del peristaltismo como factor facilitador de la diseminación tumoral (Kelley W E et al, 1981 y Dutton R W et al, 1976). Sin embargo, aunque esto último puede parecer anecdótico en la actualidad, si es cierto que una gran masa tumoral puede influir en la expresión de determinados marcadores, atendiendo a factores que por su naturaleza son inherentes a ella; como la mayor cantidad de células tumorales, una rica vascularización y/o mayor necesidad de nutrientes. Este hecho se podría tener en cuenta no solo en la expresión de RACK1, sino también de 4EBP1 y de ki-67.

Creemos que en la actualidad debe haber un interés creciente por vincular la expresión de los nuevos marcadores, como RACK1, con todo el espectro clínico-patológico de las diversas neoplasias. En los laboratorios de anatomía patológica, las técnicas inmunohistoquímicas valoradas en microarrays tisulares, deben constituir una herramienta que permita una valoración masiva de la información, pero debido a sus limitaciones, dificultades técnicas y de interpretación aún necesita de estudios repetitivos que refuercen los resultados hasta ahora obtenidos.

## p53

Los resultados que hemos obtenido en el presente estudio ponen de manifiesto que la reactividad inmunohistoquímica de la proteína p53 en los tumores colorrectales, no guarda una relación significativa con el comportamiento de los parámetros clínico-patológicos conocidos ni con la evolución postoperatoria de los pacientes. Sin embargo, en algunos casos existen diferencias de expresión con tendencia hacia una mayor agresividad tumoral a medida que aumenta la expresión.

En un estudio reciente se ha descrito que los tumores con sobreexpresión de p53 desarrollan con mayor frecuencia recidivas y tienen menor supervivencia (Díez M et al, 2005). En nuestra serie, aunque la expresión de p53 en el margen infiltrante del tumor fué superior en los pacientes que presentaron recidivas, que en el resto de pacientes, éstas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p=0,487$ ).

En cuanto a mortalidad, en nuestro estudio se observó que la expresión de p53 en el margen tumoral infiltrante evaluado en el grupo de los pacientes que fallecieron, presentó una mayor positividad (83%) que el resto de pacientes (47%), pero sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,182$ ). Mientras que en el seno del tumor primario, la positividad de p53 fue muy similar entre los pacientes que fueron éxitos (54%) y los que no murieron por CCR (55%), sin que éstas diferencias fueran significativas ( $P=1,000$ ). También fue mayor la expresión en las metástasis hepáticas de los pacientes fallecidos (67%) que en el resto de pacientes (33%), pero ésta tampoco alcanzó diferencias significativas ( $p=1,000$ ).

Asimismo, la expresión en el margen tumoral infiltrante se observó en un mayor número de casos que fueron éxitos por CCR (80%) que en el resto (50%), sin embargo éste valor tampoco alcanzó valores estadísticamente significativos ( $p=0,342$ ).

Se ha descrito que los tumores que poseen mayor expresión de p53 tienen mayor capacidad de desarrollar metástasis hepáticas (Mc Leod H y Murray G, 1999; Cubo T et al, 2000), lo cual a su vez podría asociarse a una mayor mortalidad. Sin embargo, aunque el diseño de nuestro estudio no permite estudiar la expresión individual en cada tumor primario con su respectiva metástasis y la evolución posterior del paciente, si nos permite observar que las metástasis hepáticas de nuestra serie presentaron únicamente niveles de expresión discretamente mayores en los pacientes fallecidos

(67%) con respecto a los pacientes vivos (50%), sin que ésta diferencia fuera significativa ( $p=1,000$ ).

Al comparar la expresión de p53 en las metástasis ganglionares de 19 pacientes y relacionarla con la mortalidad por CCR, no se observaron diferencias significativas ( $p=0,255$ ). A pesar de que en el grupo de fallecidos los 6 casos (100%) expresaron positividad, también se observó positividad en 9 de los 13 casos (69%) de los pacientes que no murieron por CCR y negatividad solo en 4 casos (31%).

De manera similar, los mismos investigadores (Díez et al, 2005) han observado que la expresión de p53 no varía en función del estadio tumoral. Este hallazgo también es aplicable a nuestro estudio, ya que la expresión de p53 no varió según el comportamiento tumoral, ni se observaron variaciones según la mortalidad ni la presencia de recidivas de manera significativa.

La localización anatómica del tumor primario ha sido un factor pronóstico ampliamente reconocido. La mayoría de estudios coinciden en que la frecuencia de recidiva es mayor en los tumores rectales que en los tumores del resto del colon. En el presente trabajo se observó un aumento gradual de expresión según la localización, con un 71% de tumores positivos en recto, frente a un 57% de positividad en colon izquierdo y un 42% en colon derecho, sin que las diferencias según la localización fueran significativas ( $p=0,185$ ).

El crecimiento neoplásico en el margen tumoral infiltrante tiene un significado oncológico reconocido como una zona del tumor con mayor potencial maligno, (Morodomi T et al, 1989), asociado a metástasis ganglionares y relacionado con la supervivencia (Hase K et al, 1993). Éste concepto se basa principalmente en la rica vascularización de ésta zona (Hase K et al, 1995), lo cual debería reflejar una conducta biológica más agresiva dentro del propio tumor (Teixera CR et al, 1994).

En relación a ésta característica del crecimiento neoplásico, en nuestra serie hemos podido observar que el margen tumoral infiltrante no se comportó de manera distinta al tumor primario, independientemente del grado histológico, es decir, que se observaron discretos aumentos de la expresión en tumores de alto grado, en comparación a los de bajo grado histológico sin alcanzar valores significativos ( $p= 0,342$ ). De igual forma, se observó un aumento gradual de la expresión en el margen tumoral infiltrante a medida que aumentaba el estadio T, sin embargo este aumento tampoco fue significativo ( $p=0,057$ ).

También hemos podido constatar que aunque el margen tumoral infiltrante de los casos que presentaron metástasis hepáticas tenía niveles de expresión mayores, esta diferencia no alcanzó valores significativos respecto al resto los casos ( $p=0,342$ ).

Y en cuanto a la evolución clínica, hemos observado que ésta mayor positividad en el margen tumoral infiltrante de los pacientes vivos con enfermedad no es significativamente diferente ( $p=0,091$ ) que la del resto.

En concordancia con lo que algunos autores han descrito en los últimos años (Masaka T et al 2001 y Masaka T et al, 2003), creemos que los mecanismos moleculares que intervienen en la formación de las células a partir de las cuales se inicia el crecimiento en el margen tumoral infiltrante, son aquellos implicados en la pérdida de la adhesión celular y en la diferenciación epitelial anormal. Por lo que una mejor comprensión del comportamiento tumoral en este microambiente, implicaría el estudio complementario con otros marcadores que actúen a nivel de la matriz extracelular (lamininas, cateninas, etc), que están fuera de los objetivos del presente trabajo.

El hecho de que la mutación de p53 sea muy frecuente en los carcinomas colónicos primarios pero rara en los adenomas sugiere que la ventaja selectiva de la mutación p53 es más marcada durante el proceso de transformación maligno completo que en el desarrollo de los adenomas (Mulder J et al, 1995 y Scout N et al, 1993). Las mutaciones en p53 ocurren en aproximadamente un 20-40% de los adenomas colónicos. Como los adenomas rara vez muestran delección 17p, esta alteración es probable que tenga lugar en una fase más tardía de la evolución adenoma-carcinoma (Volgstein B et al, 1988). Sin embargo, el hecho de que la expresión de p53 esté presente tanto en tumores incipientes como en los avanzados, es consistente con lo descrito sobre la acumulación de la proteína p53 en la secuencia adenoma-carcinoma de la carcinogenesis colorrectal (Shao L et al, 2001). La pérdida de p53 permitirá una acumulación más rápida de mutaciones en el tumor y así disminuirá la probabilidad de que tenga lugar la apoptosis.

En nuestra serie, se observa que al analizar la expresión de p53 en 69 carcinomas, la media de expresión fue del 48%, mientras que en el grupo de 62 adenomas la media de expresión fue del 13%. Estos resultados representan una diferencia de medias de 35, lo cual indica una clara sobreexpresión significativa ( $p<0,001$ ) en el grupo de carcinomas comparado con el grupo de adenomas. De manera similar también se observó mayor expresión de p53 en el margen tumoral infiltrante ( $p<0,001$ ), en las metástasis ganglionares ( $p<0,001$ ) y en las metástasis hepáticas ( $p<0,004$ ) en comparación la observada en los adenomas. Los datos apoyan lo descrito por algunos autores (Saleh HA et al, 1998) que han demostrado valores mayores de expresión de



p53 en CCR que en adenomas, de forma estadísticamente significativa. También, la expresión de p53 es más frecuente e intensa en adenomas con displasia de alto grado (10/20, 50%) que en los de bajo grado (8/29, 28%), lo cual sugiere una fuerte correlación entre el grado y displasia en la naturaleza de la neoplasia colorrectal y el patrón de expresión de p53. En contradicción a esto último, en los adenomas de nuestra serie aunque observamos que existe un discreto aumento en la expresión a medida que aumenta el grado de displasia, esta diferencia no tuvo significado estadístico ( $p=0,796$ ).

Existen algunos trabajos que vinculan la presencia de mutaciones en el gen p53 a un estado evolutivo post-quirúrgico desfavorable (Bazán V et al, 2002 y Pricolo V et al, 1997). Algunos enfatizan la frecuencia de sobreexpresión de p53 en el CCR primario y en sus metástasis (Nasif W et al 2004 y Wang J et al, 2004. Asimismo, otros han estudiado la relación entre sobreexpresión de p53 y supervivencia/recidiva. Son menos los trabajos en los que se ha estudiado el valor predictivo de la sobreexpresión de p53 como indicador de riesgo de recidiva/fallecimiento (Paluszkiewicz P et al, 2004 y Tang R et al, 2004). Sin embargo, la mayoría de estos trabajos se refieren a series heterogéneas de pacientes, con tumores en los distintos estadios (Bendardaf R et al, 2004).

Debido a que existen muchas dificultades en relación al estudio genético de TP53, sobretodo aquellas relacionadas con aspectos económicos y técnicos (extracción y secuenciación de DNA, PCR, etc), la mayoría de investigadores en el ámbito de la anatomía patológica prefieren su determinación por medio de técnicas inmunohistoquímicas asumiendo que la acumulación de la proteína p53 (sobreexpresión) refleja la mutación del gen. Pero debemos de tener en cuenta que no existe consenso acerca del valor de detección inmunohistoquímica de la proteína p53 (McDermott U et al 2002; Velculescu V y El-Deiry W, 1996). Se ha descrito que la mutación y la sobreexpresión inmunohistoquímica concuerdan en alrededor del 60% de los casos. También debemos de tener en cuenta que puede haber sobreexpresión causada por otros factores, como agentes virales, alteración en las proteínas relacionadas con la regulación de p53 (proteína mdm-2) o exposición a tóxicos genéticos (Steele R et al, 1998 y Velculescu V). De tal manera que la mutación del gen TP53 y la acumulación de la proteína pueden representar acontecimientos intracelulares diferentes. Definir el papel que juegan todos estos factores sobrepasa las expectativas de los objetivos que nos hemos planteado inicialmente en el presente estudio.

En pocos trabajos se ha estudiado con detalle en una misma serie el valor pronóstico que posee la determinación de p53 en cada estadio tumoral. Cuando intentamos interpretar nuestros resultados basándonos en los resultados publicados en la literatura en los últimos años, ya sean concordantes o discordantes, siempre debemos de plantearnos la influencia del anticuerpo utilizado, ya que se utilizan anticuerpos distintos, así como el resto de condiciones técnicas que influyen en inmunohistoquímica (tipo, calidad y tiempo de fijación, temperatura, pH de los tampones utilizados, etc.) (Fernández Aceñero M et al, 2001). Por consiguiente, esto podría justificar gran parte de la divergencia de resultados publicados. Un grupo nórdico (Kressner U et al, 1996) ha comparado la tinción inmunohistoquímica de p53 utilizando diferentes anticuerpos, con el objetivo de evaluar las posibles implicaciones clínicas de la sobreexpresión de p53, sin poder encontrar ningún indicio de que la mutación del gen TP53, reflejada como sobreexpresión de p53, constituya un prerrequisito para la progresión tumoral en el CCR.

A medida que se avanza en los conocimientos básicos sobre la evolución clínico-patológica de las neoplasias, es evidente que la mutación de p53 es sólo un peldaño más en la escalera de acontecimientos que una célula debe atravesar para transformarse en neoplásica (Prioleau J y Scnitt SJ, 1995). Por tanto, los hallazgos sugieren que las mutaciones de TP53 podrían no ser determinantes sino ser una alteración más, independientemente del resto de acontecimientos que determinan el perfil biológico de una neoplasia.

Con los resultados obtenidos, hemos podido comprobar que aunque la asociación entre la expresión de p53 y el seguimiento de los pacientes no alcanza la significación estadística, muchas veces si existe una discreta relación entre mayor expresión y mayor agresividad tumoral, particularmente al valorar la mortalidad, el margen tumoral infiltrante, las metástasis hepáticas. De igual manera hemos podido observar que el nivel de expresión de p53 no es constante, sino que varía en función del nivel de infiltración del tumor primario (pT).

El presente trabajo no ha permitido concluir que la expresión positiva de p53 en material parafinado de uso rutinario esté asociada de manera significativa a un mal pronóstico en el carcinoma colorrectal.

Hasta donde sabemos, aún en los trabajos en que se vincula la sobreexpresión de p53 con mayor agresividad tumoral, en ninguno de ellos se asocia de manera significativa con en el grado histológico. Recientemente se ha observado una tendencia a la correlación entre el alto grado tumoral y la sobreexpresión de p53 (Vilardell F, 2005).

Estos resultados son similares a los nuestros, donde hemos observado que aunque el porcentaje de positividad fue mayor en los tumores de alto grado histológico (70%), este incremento no fue estadísticamente significativo ( $p=0,353$ ) cuando se comparó con la expresión en los de bajo grado (51%).

En el presente estudio hemos podido observar que existen niveles de expresión discretamente mayores en las metástasis hepáticas de los tumores en estadio T4 (67%) que en aquellos en estadio T3 (60%), sin significancia estadística ( $p=1,000$ ). De acuerdo a estos valores la expresión en ambos estadios es muy similar, por lo que probablemente no se haya prestado demasiado interés al estudio de estos parámetros, ya que desconocemos que este documentada la relación entre estos parámetros en trabajos previos. Al analizar la expresión de p53 en las metástasis ganglionares, observamos que los pacientes en estadio N2 presentaron positivities discretamente mayores (80%) que los pacientes en estadio N1 (75%), sin que estas diferencias fueran significativas ( $P=1,000$ ).

También observamos que las metástasis ganglionares de los pacientes con metástasis hepáticas fueron todas (100%) positivas, pero sin diferencias ( $p=0,530$ ), con los que tenían metástasis ganglionares pero no presentaron metástasis hepáticas (71%).

La expresión en las metástasis ganglionares en relación a los estadios OMS, no presentó diferencias significativas ( $p=0,255$ ). Sin embargo, llama la atención que los todos los casos (100%) en estadio IV expresaron positividad.

Por tanto podemos decir que estos resultados de alguna manera se orientan a que p53 esta implicada en niveles muy similares durante todo el proceso metastásico, independientemente de la participación de otros factores.

## **ki-67**

El recuento de figuras mitóticas es considerado un marcador relevante, pero en los últimos años la evaluación inmunohistoquímica de ki-67 se ha vuelto más popular en la valoración de la proliferación celular, demostrándose con éste anticuerpo que no son equivalentes el recuento de mitosis y la proliferación celular.

Se considera que en la mayoría de las neoplasias, incluido el CCR, un elevado índice de proliferación celular (evaluado por inmunohistoquímica con ki-67) se asocia a una mayor agresividad tumoral, influyendo así en la evolución clínico-patológica (Sanz-Esponera J, 2002). En el caso particular del CCR, distintos trabajos han obtenido resultados contradictorios entre la expresión de ki-67, el pronóstico y la supervivencia.

Algunos autores observaron que los tumores colorrectales con un bajo índice de proliferación se asociaban a peor supervivencia, al compararlos con los que expresaban índices de proliferación más altos (Palmqvist R et al, 1999). Sin embargo, en nuestra serie los niveles de proliferación en 106 tumores primarios en relación a los 23 pacientes que fueron exitus por CCR, siendo 20 casos (87%) positivos y 3 casos negativos (13%), no tuvo diferencias significativas ( $p=0,404$ ), frente al resto de pacientes (83 casos) con 77 positivos (93%) y un 6 casos negativos (7%). La expresión de ki-67 valorada en el margen tumoral infiltrante y en las metástasis ganglionares tampoco produjo diferencias de expresión significativas cuando se utilizaron para valorar la supervivencia ( $p=0,117$  y  $p=0,517$ , respectivamente). Otros midieron la actividad proliferativa tras la radioterapia preoperatoria en tumores rectales, observando que los pacientes cuyos tumores presentaron una alta actividad proliferativa post-radiación tenían índices de supervivencia mayores que aquellos pacientes con tumores con baja actividad proliferativa (Willett C et al, 1995). En contraste a estos hallazgos, otros investigadores (Kimura T et al, 2000) hallaron que los tumores rectales con un elevado índice de proliferación presentaron peor pronóstico. Aunque estudios recientes han demostrado que en el cáncer de localización rectal y recto-sigmoidal, una mayor expresión del antígeno ki-67 se asocia a una mejor supervivencia (Salminen E et al, 2005).

En este sentido nuestros resultados no mostraron diferencias de expresión significativas en las neoplasias rectales valoradas en el tumor primario ( $p = 0,426$ ), en el margen tumoral infiltrante ( $p = 0,213$ ). y en las metástasis ganglionares ( $p = 0,392$ ), en comparación con los mismos parámetros en tumores de colon derecho y en los de colon izquierdo. Estudios recientes en microarrays tampoco han encontrado asociación entre la expresión de ki-67 y las metástasis a distancia en el cáncer rectal (Fernebro E et al, 2004). La discusión acerca de estas discrepancias es un tema que permanece abierto.

En los últimos años se ha podido constatar que la actividad proliferativa es significativamente más baja en los tumores de alto grado (pobremente diferenciados y en los mucinosos), que en los tumores de bajo grado (bien o moderadamente diferenciados) (Ishida H et al, 2003). Estos hallazgos son similares a los obtenidos en el estudio de otras neoplasias en años anteriores, como el adenocarcinoma gástrico (Zhang G y Nakanishi I, 1991). Por otro lado, hay publicaciones que demuestran que los adenocarcinomas pobremente diferenciados poseen un índice de expresión de ki-67 más alto que el de los adenocarcinomas bien diferenciados (Saleh H et al, 2000 y Lanza G et al, 1990). Sin embargo, nuestros resultados están en concordancia con los de un grupo irlandés (Johnston P et al, 1989), quienes han encontrado que no hay diferencias significativas en el índice de expresión de ki-67 entre los distintos grados de adenocarcinomas (alto y bajo grado). En los tumores de nuestra serie, los CCR de bajo y alto grado presentaron altos niveles de positividad (alrededor del 90%), sin diferencias significativas de expresión ( $p=1,000$  en todos los casos), tanto a nivel del tumor primario, como del margen tumoral infiltrante y de las metástasis ganglionares. También hemos observado, que tanto en tumores primarios convencionales como en los mucinosos hubo una positividad en alrededor del 90% de los casos, por tanto la diferencia estadística de expresión no fue significativa ( $p = 0,662$ ). Estos resultados fueron similares al valorar el margen tumoral infiltrante, en donde los tumores convencionales presentaron una positividad del 81% y los mucinosos del 91% ( $p = 0,207$ ). En las metástasis ganglionares el patrón de expresión fue similar, con un 96% de positividad en las metástasis de tumores de tipo convencional y un 75% en las metástasis de tumores mucinosos ( $p = 0,253$ ).

Las razones para justificar las discrepancias en los resultados obtenidos en la expresión entre los diferentes grados de diferenciación histológica, continúan siendo desconocidas.

También existen estudios que han demostrado que existe correlación clínica entre la inmunoreactividad de Ki-67 con la invasividad local y la enfermedad metastásica en el CCR (Lanza G et al, 1990), sin embargo este mismo estudio no ha mostrado correlación con el pronóstico. En contradicción a estos hallazgos, los trabajos de Kyzer S et al (1997) y de Hoang C et al (1989) no muestran ninguna asociación con los mismos parámetros, lo cual está en concordancia con nuestros resultados, ya que hemos observado que en todos los estadíos TNM, los niveles de expresión fueron muy altos (entre 76 y 100%) a nivel del tumor primario, del margen tumoral infiltrante y de las metástasis ganglionares, lo cual representa diferencias no significativas ( $p$  entre 0,062 0,959).

Esta controversia se extiende en los trabajos de Shepherd N et al, 1988 y Porschen R et al, 1989 y 1991, que indican que no existe relación entre la inmunoreactividad para ki-67 con los parámetros clínico patológicos, ni con los factores pronósticos (Linden M et al, 1993). Otros han descrito que no existe relación significativa con el pronóstico aún cuando existen índices de proliferación significativamente más altos en el estadio D de Dukes (Kyzer et al, 1997).

Asimismo, científicos japoneses han descrito que en el CCR la actividad infiltrativa y la actividad proliferativa no están relacionadas en el CCR, basado en hecho que surge de la observación que en aquellos tumores de infiltración subserosa o más profunda pueden presentar valores positivos más bajos que aquellos que afectan la submucosa o la muscularis propia (Ishida H et al, 2003).

El compartimiento proliferativo de la mucosa colorrectal normal de los individuos con bajo riesgo de padecer CCR está localizado en los dos tercios inferiores de las criptas colónicas, mientras que en los pacientes con riesgo elevado el compartimiento proliferativo se extiende hasta la porción superior de las criptas. En cualquier caso, en vista de que los valores de actividad proliferativa en las criptas colónicas son muy variables en el mismo individuo y pueden estar influenciados por la dieta, entre otros factores, el valor de ki-67 como biomarcador en el riesgo de padecer CCR sigue siendo cuestionable (Scalmati y Lipkin, 1993). Al continuar con el estudio del patrón de proliferación celular en individuos con adenomas de colon o CCR, se ha observado que el compartimiento proliferativo se expande en toda la longitud del colon, sin importar la localización de la lesión.

Los adenomas son lesiones polipoides benignas que pueden evolucionar a CCR, y por tanto pueden ser considerados lesiones potencialmente malignas. Sin embargo la mayoría de los adenomas no progresan a cáncer, siendo necesaria la interacción de alteraciones adicionales en los adenomas para promover la proliferación y la predisposición a cáncer (Ishida H et al, 2003).

Distintos estudios muestran que el índice de proliferación de ki-67 de los adenomas colorrectales es significativamente inferior al observado en el CCR (Johnston P et al, 1989 y Saleh H et al, 2000 ). En nuestra serie hemos podido constatar que la media de expresión de ki67 en los adenomas fue significativamente menor ( $p < 0,001$ ) que en los CCR, valorada tanto en el tumor primario, como en el margen tumoral infiltrante y en las metástasis ganglionares. También se ha descrito que el índice de proliferación de ki-67 en los adenomas colorrectales con displasia de alto grado es significativamente superior que en aquellos adenomas con displasia de bajo grado (Husain A et al, 1999 y Saleh H et al, 2000 ). Los trabajos de Johnston P et al (1989); Hoang C et al, (1989); Carr N et al (1995) y Yang H et al, (1996), entre otros, también

refuerzan estos resultados. Sin embargo, aunque en nuestra serie también se observó mayor expresión en los adenomas con displasia de grado moderado y alto cuando se comparó con los adenomas con displasia de bajo grado, los niveles de expresión no alcanzaron diferencias significativas ( $p=0,520$ ).

Según Husain A et al, (1999), en los adenomas con bajo grado de atipia y en la mucosa normal, las células del tercio inferior de las criptas son las que con más frecuencia expresan positividad, lo cual no pudimos comprobar en los distintos grados de displasia de nuestros adenomas, pero si en la mucosa normal en donde observamos que la expresión de ki67 en la mucosa lejana al tumor analizada en 28 casos presentó una media del 4%; mientras que analizada en los 62 adenomas presentó una expresión media del 10%. Esta diferencia de medias de -6 representa una mayor expresión en los adenomas que en la mucosa colónica lejana al tumor, con un valor significativo ( $p < 0,001$ ).

En cuanto al tipo histológico de los adenomas, el valor de ki-67 se ha correlacionado de forma significativa con el aumento en la cantidad del componente veloso, es decir, los que más expresaron fueron los velosos, en segundo lugar los tubulovellosos y en último lugar los tubulares (Saleh et al, 1999). En nuestra serie la expresión media de ki67 en los adenomas tubulares fue del 10%; en los velosos del 15% y en los túbulo-vellosos del 10%. Sin embargo la mayor expresión observada en los adenomas velosos no es estadísticamente significativa ( $p=0,417$ ), ni está en relación al aumento del componente veloso.

La disminución o inexistencia de expresión en procesos neoplásicos, también ha sido objeto de controversia. Se ha sugerido que la expresión masiva de ki-67 en las células tumorales posiblemente induce la detención del ciclo celular y del crecimiento, contribuyendo así a la propia estabilización (Duchrow M et al, 2003 y Palmqvist R et al, 1999). Recientemente, también se ha propuesto que algunas de las células en proliferación detectadas por el anticuerpo ki-67 podrían ser eliminadas por apoptosis antes de alcanzar la mitosis dentro del ciclo celular (Jalava P et al, 2005). Muchos autores han demostrado que el patrón de tinción inmunohistoquímico de ki-67 se correlaciona bien con la fracción de crecimiento tumoral y con la fracción de la fase S en la neoplasia colorrectal (Linden M et al, 1993 y Hitchcock C et al, 1991), determinando así el grado de proliferación y agresividad tumoral, sin embargo en nuestro estudio la correlación con los parámetros clínico patológicos no fue concordante. En este sentido creemos necesario considerar, que se ha discutido que el verdadero valor de proliferación en cáncer no puede ser medido por técnicas inmunohistoquímicas, porque es el resultado de dos variables: la fracción de crecimiento y el tiempo requerido para completar el ciclo celular (Jansson A y Sun X,

1997; Duchrow M et al, 2003), que son acontecimientos dinámicos cuya determinación es dudosa en material parafinado.

Se requieren estudios detallados en series más grandes que ayuden a definir el verdadero papel del antígeno ki-67 en el comportamiento biológico y clínico del CCR.

Se han sugerido algunas posibles explicaciones para los resultados discrepantes obtenidos en los estudios de la actividad de ki-67 como marcador clínico patológico y pronóstico en el CCR, estas incluyen, procedimientos preoperatorios y el tipo de patrón de crecimiento tumoral. En particular, en el caso de los tumores de colon izquierdo y en los rectales, los procedimientos prequirúrgicos de limpieza del colon con laxantes y los enemas, se ha comprobado que inducen actividad proliferativa en la mucosa (Lehy T et al, 1984). Sería interesante indagar en el manejo preoperatorio de los pacientes de nuestra serie, para conocer a que procedimientos prequirúrgicos fueron sometidos y tratar de determinar de que manera influyeron en nuestros resultados.

Otras explicaciones sugieren que los procesos ulcerativos pueden incrementar la proliferación sobre todo en el borde luminal (Palmqvist R et al, 1999), lo que podría dar como resultado una alta expresión de ki-67. Creemos que sería importante abordar las características macroscópicas y configuración del tumor, ya que de alguna manera esto podría explicar al menos en parte el porque algunos investigadores han encontrado alta actividad proliferativa en sus series.



## CONCLUSIONES

A) De los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación podemos concluir lo siguiente en relación a la expresión de p4-EBP1:

1. Los adenocarcinomas colorrectales tienen niveles significativamente superiores de expresión de p4-EBP1 que los adenomas y que la mucosa normal ( $p < 0,001$ ).
2. Los niveles de inmunoexpresión de p4-EBP1 en el margen tumoral infiltrante, en las metástasis a ganglios linfáticos y hepáticas son similares a los del tumor primario.
3. No existen diferencias significativas de expresión nuclear y citoplasmática de p4-EBP1 según la localización anatómica del tumor, el subtipo histológico -convencional o mucinoso-, el grado histológico, ni según el número de ganglios linfáticos afectados.
4. En los adenomas, la expresión inmunohistoquímica de p4-EBP1 no varía de forma significativa según la localización, el componente tubular y/o vellosos y el grado de displasia de los mismos.
5. En nuestra serie, los niveles de expresión de p4-EBP1 no fueron significativamente distintos según las variables clínicas de sexo, edad, y supervivencia global o libre de enfermedad, por lo que no son valores predictivos de la evolución de la enfermedad.

B) En relación a la expresión de RACK1 en tumores de colon podemos concluir:

1. El adenocarcinoma colorrectal presenta mayor expresión de RACK1 a nivel del tumor primario, en los márgenes tumorales infiltrantes y en las metástasis a ganglios linfáticos que en los adenomas colonicos y que en la mucosa benigna lejana al tumor ( $p < 0,001$ ).
2. No existen diferencias significativas de expresión de RACK1 según la localización anatómica del tumor, el subtipo histológico -convencional o mucinoso-, el grado histológico, o según la presencia de metástasis ganglionares linfáticas ni hepáticas.

3. La expresión inmunohistoquímica de RACK1 en adenomas de colon no se modifica significativamente en función del grado de displasia, ni del componente tubular y/o vellosos.
4. La expresión de RACK1 en los adenomas coexistentes en las piezas quirúrgicas de los pacientes con adenocarcinomas, no presentaron diferencias significativas de expresión en comparación con los adenomas de una serie "control".
5. La tinción de RACK1 no presenta diferencias significativas de expresión en las siguientes variables clínicas: distribución por sexo y edad, en pacientes que fueron éxitos, ni en pacientes que presentaron recidivas de cáncer colorrectal; por tanto no predice la evolución de la enfermedad.

C) En relación a la expresión de p53 en tumores de colon podemos concluir:

1. El adenocarcinoma colorrectal presenta mayor expresión de p53 a nivel del tumor primario, en los márgenes tumorales infiltrantes, en las metástasis a ganglios linfáticos y en las metástasis hepáticas que en los adenomas de colon y que en la mucosa no neoplásica ( $p < 0,001$ ).
2. En nuestra serie no existen diferencias significativas de expresión de p53 según la localización anatómica del tumor, el subtipo histológico -convencional o mucinoso-, el grado histológico, o según la presencia de metástasis ganglionares linfáticas o hepáticas.
3. La inmunoexpresión de p53 no presenta diferencias significativas en las siguientes variables clínicas: distribución por sexo y edad, en pacientes que murieron por CCR o por otras causas, ni en pacientes que presentaron recidiva por CCR; por tanto no predice la evolución de la enfermedad.

D) En relación a la expresión de ki-67 en tumores de colon podemos concluir:

1. El estudio inmunohistoquímico con ki-67 demuestra que el adenocarcinoma colorrectal presenta mayor índice de proliferación celular a nivel del tumor primario, en los márgenes tumorales infiltrantes y en las metástasis a ganglios linfáticos que en los adenomas colorrectales y que en la mucosa no neoplásica ( $p < 0,001$ ).

2. No existen diferencias significativas en proliferación celular valorada con ki-67 según la localización anatómica del tumor, el subtipo histológico -convencional o mucinoso-, el grado histológico, o según la presencia de metástasis ganglionares linfáticas.
3. La localización, el grado de displasia, y los componentes tubulares y/o vellosos de los adenomas colónicos, no modifican de manera significativa el índice de proliferación celular con inmunohistoquímica para ki-67.
4. La proliferación celular valorada mediante ki-67 no presenta diferencias significativas en las siguientes variables clínicas: distribución por sexo y edad, en pacientes que murieron, ni en pacientes que presentaron recidiva de cáncer colorrectal; por consiguiente no pronostica el curso de la enfermedad.

Por tanto, en relación con las hipótesis de trabajo podemos concluir que:

- En la progresión tumoral de los tumores de colon, se observa un aumento significativo de la expresión del factor central de la señalización p4-EBP1 y del receptor de PKC, RACK1 en los adenocarcinomas.
- En nuestra serie los niveles de p4-EBP1 y RACK1 no diferencian grupos de diferente pronóstico clínico, sugiriendo por tanto que la activación de 4EBP1 puede ser relevante en la transformación y progresión tumoral pero no en la evolución clínica.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomaki P, Chadwick RB, Kaariainen H, Eskelinen M, Jarvinen H, Mecklin JP, de la Chapelle A. Incidence of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998;338:1481-1487.
- Adloff M, Arnaud J P, Ollier J C, Schloegel M. Les cancers du colon. Etude retrospective portant sur 11222 malades operés. *J Chir Paris* 1990; 127: 565-571.
- Agnieszka J, Tadeusz R and Piotr S. The mammalian target of the rapamycin (mTOR) kinase pathway: its role in tumorigenesis and targeted antitumour therapy. *Cell Mol Biol Lett.* 2005;10(3):479-98.
- Alley P G, McNee R K. Age and sex differences in right colon cancer. *Dis Colon Rectum* 1986; 29: 227-229.
- Andre T, Louvet C, Raymond E, Tournigand C, de Gramont A. Bi-monthly 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.
- Amitage 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 Oct;72(10):828-30.
- 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 Jun;17(6):1760-70.
- Axon A T. Cancer surveillance in ulcerative colitis - a time for reappraisal. *Gut* 1994; 35: 587-589.
- Barsoum G H, Hendrickse C, Winslet M C, Youngs D, Donovan I A, Neoptolemos J P, Keighley M R B. Reducción de la proliferación de las células de las criptas mucosas en los pacientes con pólipos adenomatosos colorrectales mediante suplementos de calcio en la dieta. *Br J Surg (ed. Esp)*1992; 8: 187-190.
- Bartram H P, Gostner A, Scheppach W, Reddy BS, Rao C V, Dusel G, Richter F, Richter A, Kasper H. Effects of fish oil on rectal cell proliferation, mucosal fatty acids, and prostaglandin E2 release in healthy subjects. *Gastroenterology* 1993; 105: 1317-1322.
- Bassa A, Garau I, Cabeza E. Aspectos generales del cáncer colorrectal. *Gastroenterol Hepatol* 1992; 15: 2-6.
- Ben-Josef E, Court WS. Whole abdominal radiotherapy and concomitant 5-fluoracil as adjuvant therapy in advanced colon cancer. *Dis Colon Rectum* 1995; 38: 1088-1092.
- Beart R W. Colon, rectum, and anus. *Cancer* 1990; 33: 684-688.
- Birt D F. Effects of the intake of selected vitamins and minerals on cancer prevention. *Magnesium* 1989; 8: 17-30.
- Bjornsti MA, Houghton PJ: The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:335-348.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5248-5257.
- Bordas J M. Diagnóstico endoscópico. En: Grau J J, Piqué J M. (eds.). *Monografías clínicas en Oncología. Cáncer colorrectal.* Barcelona: Edic. Doyma; 1990: 31-44.
- Bruce WR. Recent hypotheses for the origin of colon cancer. *Cancer Res* 1987; 47: 4237-4242.
- Bruce W R, Varghese A J, Furrer. Amutagen in human faeces en: Hiatt, Watson J, Winten Y (eds): *Origin of human cancer: New York Spring Harbor Laboratory* 1977, 1641-1646.
- Brugarolas JB, Vazquez F, Reddy A, Sellers WR and Kaelin WG. TSC2 regulates VEGF through mTOR-dependent and independent pathways. *Cancer Cell* 2003; 4: 147-584.
- Buensuceso CS, Woodside D, Huff JL, Plopper GE, O'Toole TE. The WD protein Rack1 mediates protein kinase C and integrin-dependent cell migration. *J Cell Sci* 2001; 114: 1691-1698.
- Bülow C, Vasen HFA, Järvinen H, Bjork J, Bisgaard ML, Bulow S. Ileorectal anastomosis is appropriate for a subset of patients with familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 2000; 119:1454-1460.
- Burke A B, Shekitka K M, Sobin L H. Small-cell Carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1991; 95: 315-321.
- Burkitt D P, Trowel H C (eds). *Refined carbohydrate foods and disease.* London, Academic Press 1975;333-345.

- Burmer G C, Levine D S, Kulander B G, Haggitt R C, Rubin C E, Rabinovitch P S. C-Kiras mutations in chronic ulcerative colitis and sporadic colon carcinoma. *Gastroente-rology* 1990; 99: 416-420.
- Burt RW. Colon cancer screening. *Gastroenterology* 2000; 119: 837-853.
- Cady B, Persson AV, Monson DO, Maunz DL. Proceedings: Changing patterns of colorectal carcinoma. *Cancer*. 1974 Feb;33(2):422-6. No abstract available.
- Cady B, Stone MD, McDermott WV, Jenkins R L, Bothe A, Lavin P T, Lovett E J, Steele G D. Technical and biological factors in disease-free survival after hepatic resection for colorectal cancer metastases. *Arch Surg* 1992; 127: 561-568.
- Campo E, Miquel R. Anatomía patológica. En: Grau J J, Piqué J M. (eds.). *Monografías clínicas en Oncología. Cáncer colorrectal*. Barcelona: Edic. Doyma; 1990: 63-76.
- Carda P. Cáncer del aparato digestivo. En: *Manual de Oncología Básica*. DieGoyanes A, Llombart M, Matilla A (eds). Asociación Española contra el Cáncer. Madrid: ISBN; 1989: 121-132.
- Carethers JM. The cellular and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 1996 Dec;25(4):737-54.
- Castellvi J, García A, Rojo F, Ruiz-Marcellán C, Gil A, Baselga J y Ramón y Cajal S. Phosphorylated 4E Binding Protein 1: A Hallmark of Cell Signaling That Correlates With Survival in Ovarian Cancer. *Cancer Oct* 2006; 107:8:1801-1811.
- Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüeter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against the recombinant parts of the ki-67 antigen (MIB1 and MIB3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992; 168: 357-363.
- Ceci M, Gaviraghi C, Gorrini C, Sala LA, Offenhauser N, Marchisio PC, Biffo S. Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* 2003; 426: 579–584.
- Chang BY, Chiang M, Cartwright CA. The interaction of Src and RACK1 is enhanced by PKC activation and tyrosine phosphorylation of RACK1. *Biol Chem* 2001; 276: 20346-20356.
- Chang BY, Conroy B, Machleder EM, and Cartwright CA. RACK1, a receptor for activated C kinase and a homolog of the subunit of G proteins, inhibits activity of Src tyrosine kinases and growth of NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 3245–3256.
- Chapuis P H, Dent O F, Ficher R. A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer. *Vr J Surg* 1985; 72: 698-702.
- Chapuis P H, Fisher R, Dent O F, Newland R C, Bokey E L, Pheils M T. An evaluation of the American Joint Committee (pTNM) staging method for cancer of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum* 1986; 29: 6-10.
- Chen L H, Boissonneault G A, Glauert H P. Vitamin C, vitamin E and cancer. *Anticancer Res* 1988; 8:739-748.
- Chicurel ME, Singer RH, Meyer CJ, Ingber DE. Integrin binding and mechanical tension induce movement of mRNA and ribosomes to focal adhesions. *Nature* 1998; 392: 730–733.
- Chou YC, Chou CC, Chen YK, Tsai S, Hsieh FM, Liu HJ, and Hseu TH. Structure and genomic organization of porcine RACK1 gene. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489:315–322.
- Chung DC, Rustgi AK. DNA mismatch repair and cancer. *Gastroenterology* 1995; 109:1685-1699.
- Chute C G, Willett W C, Colditz G A, Stampfer M J, Rosner B, Speizer F E. A prospective study of reproductive history and exogenous estrogens on the risk of colorectal cancer in women. *Epidemiology* 1991; 201-207.
- Clark JL, Berger SH, Mittelman A, Berger FG. Thymidylate synthase gene amplification in a colon tumor resistant to fluoropyrimidine chemotherapy. *Cancer Treat Rep*. 1987 Mar;71(3):261-5.
- Colomer A. Càncer colorrectal i gen suppressor tp53. Estudi comparatiu entre methodologies. Universitat Autònoma de Barcelona 2002.
- Commoner B V, Vithayathil A, Dolara P, Nair S, Madyastha P, Cuca G C. Formation of mutagens in beef extract during cooking. *Science* 1978;201:913-916.
- Cooper H S. Intestinal neoplasms. En: Sterberg S S, ed. *Diagnostic surgical pathology*. Nueva York: Raven Press, 1989: 1015-1055.

- Copeland E M, Miller L D, Jones R S. Prognostic factors in the carcinoma of the colon 196 and rectum. *Am J Surg* 1968; 116: 875-881.
- 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 May 17;49(10):1419-26.
- Corradetti MN, Inoki K, Bardeesy N, DePinho RA, Guan KL: Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes Dev* 2004, 18:1533-1538.
- Coverlizza S, Risio M, Ferrari A, Fenoglio-Preiser CM, Rossini FP. Colorectal adenomas containing invasive carcinoma. Pathologic assessment of lymph node metastatic potential. *Cancer.* 1989 Nov 1;64(9):1937-47.
- Crissman J D, Zarbo R J, Ma C K, Visscher D W. Histopathologic parameters and DNA analysis in colorectal adenocarcinomas. *Pathol Annu* 1989; 24: 103-147.
- Cummings J H, Bingham S A, Heaton K W, Eastwood M A. Fecal weigh, colon cancer risk and dietary intake of nonstarch polysachariddes (dietary fat). *Gastroenterology* 1992;103:1783-1789.
- 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 Oct;34(10):917-20.
- Dancey J. and Sausville E.A. Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003; 2: 296-313.
- Danova M, Riccardi A, Giordano M, Girino M, Mazzini G, Dezza L, Ascari E. Cell cycle-related proteins: a flow cytofluorometric study in human tumors. *Biol Cell* 1988; 64: 23-28.
- David O, Jett J, LeBeau H, Dy G, Hughes J, Friedman M, Brody AR. Phospho-Akt overexpression in non-small cell lung cancer confers significant stage-independent survival disadvantage. *Clin Cancer Res.* 2004 Oct 15;10(20):6865-6871.
- Dawson P A, Filipe M I. An ultrastructural and histochemical study of the mucous 194 membrane adjacent to and remote from carcinoma of the colon. *Cancer* 1976; 37: 2388-2398.
- Day DW, Morson BC. The adenoma-carcinoma sequence. *Major Probl Pathol.* 1978;10:58-71. Review.
- Dayal H, Polissar L, Yang C Y, Dahlberg S, Race, socioeconomic status, and prognosis factors for survival from colo-rectal cancer. *J Chron Dis* 1987; 40: 857-864.
- Dayal Y, De Lellis RA. *El tubo digestivo. A: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, eds. Patología estructural y funcional (Vol) 2.* Madrid: Mc Graw Hill-Interamericana de España SA 1990: 873-957.
- Deans G T, Parks T G, Rowlands B J, Spence R A J. Factores pronósticos en el cancer colorrectal. *Br J Surg (Ed. Esp.)* 1992; 8: 271-277.
- De Benedetti A, Graff JR. eIF4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* 2004; 23: 3189-3199.
- De Benedetti A, Harris AL. eIF4E expression in tumors: its possible role in progression of malignancies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1999; 31: 59-72.
- De Gramont A, Vignoud J, Tournigand C, Louvet C, Andre T, Varette C, Raymond E, Moureau S, Le Bail N, Krulik . Oxiplatin with high-dose leucovorin and 5-fluorouracil 48-hour continuous infusion in pretreated metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33: 214-219.
- De Hoog CL, Foster LJ, Mann M. RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers. *Cell* 2004; 117: 649–662.
- De la Torre J. Estudio de la apoptosis y de la expresión de proteínas involucradas en su control y en los mecanismos de vigilancia genómica, en los tumores de ovario de estirpe epitelial. *Universitat Autònoma de Barcelona* 2002.
- Dodd G D. Imaging techniques in the diagnosis of carcinoma of the colon. *Cancer* 1991; 67: 1150-1154.
- Duesberg P, Rausch C, Rasnick D, Hehlmann R. Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Nov 10;95(23):13692-7.
- Dutton R W, Hreno A, Hampson L G. Mortality and prognosis of obstructing carcinoma of the large bowel. *Am J Surg* 1976; 131: 36-41.

- 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.
- Eide T J. The Age-, sex-, and site-specific occurrence of adenomas and carcinomas of the large intestine within a defined population. *Scand J Gastroenterol* 1986; 21: 1083-1088.
- Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami H O. Increased risk of large bowel cancer disease with colonic involvement. *Lancet* 1990;336:357-359.
- Ekelund G R, Pihl B. Multiple carcinomas of the colon and rectum. *Cancer* 1974; 33: 1630-1634.
- Enblad P, Enblad P, Adami H O, Glimelius B, Krusemo U, Palhman L. Relationship between age and survival in cancer of the colon and rectum with special reference to patients less than 40 years of age. *Br J Surg* 1990; 77: 611-616.
- Estapé J. Cáncer de intestino grueso, intestino delgado y ano. En: *Cáncer. Diagnóstico de extensión. Estrategia terapéutica*. 1ª ed. Barcelona: Salvat Edit; 1982: 329-349.
- Esteve J, Kricke A, Parkin DM, Eds. *Facts and figures of cancer in the European community*. IARC, Lyon, 1993.
- Falterman K W, Hill C B, Markey J C, Fox J W, Cohn I. Cancer of the colon, rectum, and anus: a review of 2313 cases. *Cancer* 1974; 34: 951-959.
- Fearon ER, Volgenstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990: 61:759-767.
- Fitchett C W, Hoffman G C. Obstructing malignant lesions of the colon. *Surg Clin North Am* 1986; 66: 807-820.
- Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H. Assignment of the human ki-67 gene (MKI-67) to 10q25-qter. *Genomics*. 1991; 11: 476-477.
- Freedman AN, Michalek AM, Marshall JR, Mettlin CJ, Petrelli NJ, Black JD, Zhang ZF, Satchidanand S y Asirwatham JE: Familial and nutritional risk factors for p53 overexpression in colorectal cancer. *Epidemiol Biomarkers Prev.*, 1996, 5:285- 291
- Friedl W, Caspari R, Sengteller M, Uhlhaas S, Lamberti C, Jungck M, Kadmon M, Wolf M, Fahnenstich J, Gebert J, Moslein G, Mangold E, Propping P. Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families. *Gut* 2001;48:515-521.
- Friedman G D, Golhaber M K, Quesenberry C P. Colectomía y cáncer de intestino grueso. *Lancet (ed esp)* 1987; 11: 129-132.
- 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.
- Garland C F, Garland F C, Gorham E D. Can colon cancer incidence and death rates be reduced with calcium and vitamin D? *Am J Clin Nutr* 1991; 54 (Suppl. 1): S193-S201.
- Gardner B, Feldman J, Spivak Y. Investigations of factors influencing prognosis of colon cancer *Am J Surg* 1987; 153: 541-544.
- Gastrointestinal Tumor Study Group. Adjuvant therapy of colon cancer: results of a prospectively randomized trial. *N Eng J Med* 1984; 310: 737-743.
- 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.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983; 31: 13-20.
- Giardello FM, Brensinger JD, Petersen GM, Luce MC, Hyland LM, Bacon JA, Booker SV, Parker RD, Hamilton SR. The use and interpretation of commercial APC gene testing for familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1997; 336:823- 827.
- Giovannucci E, Rimm E B, Stampfer M J, Colditz J A, Ascheiro A, Willet W C. Intake of fat, meat and fibre in relationship to risk of colon cancer in men. *Cancer Res* 1994;54:2390-2397.
- Goldin B R, Gorbach S L. Effects of antibiotic on incidence of rat intestinal tumours induced by 1,2 dymethylhydrazine dichloride. *J Natl Cancer Inst* 1981; 67:877-880.
- Griffin M R, Berstrahl E J, Coffey R J, Beart R W, Melton L J. Predictors of survival after resection of carcinoma of the colon and rectum. *Cancer* 1987; 60: 2318-2324.

- Griffin P M, Liff J M, Greenberg R S, Clark W S. Adenocarcinomas of the colon and rectum in persons under 40 years old. A population-based study. *Gastroenterology* 1991; 100:1033-1040.
- Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albersten H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991; 66:589-600.
- Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer*. 1997 Sep-Oct;21(5):233-300.
- Guillemot F, Billault A, and Auffray C. Physical linkage of a guanine nucleotide- binding protein-related gene to the chicken major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86:4594–4598.
- Gupta RA, DuBois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nature Rev* 2001;1:11-21.
- Hahn M, Saeger HD, Schackert HK. Hereditary colorectal cancer: clinical consequences of predictive molecular testing. *Int J Colorectal Dis*. 1999 Nov;14(4-5):184-93
- Hainaut P, Hernández T, Robinson A. IARC database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisations tools. *Nucleic Acids Res* 1998;26:205-213
- Halvorsen T B, Seim E. Tumor site: a prognostic factor in colorectal cancer?. A multivariate analysis. *Scand J Gastroenterol* 1987; 22: 124-128.
- Halvorsen T B, Seim E. Influence of mucinous components on survival in colorectal adenocarcinomas: a multivariate analysis. *J Clin Pathol* 1988; 41: 1068-1072.
- Hamilton S R. Colorectal carcinoma in patients with Crohn disease. *Gastroenterology* 1985; 89: 398-407.
- Hanks S.K., Quinn A.M. and Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 1988; 241: 42-52.
- Heilbrun L K, Nomura A, Hankin J H, Stemmermann G N. Diet and colorectal cancer with special reference to fiber intake. *Int J Cancer* 1989; 44: 1-6.
- Heinimann K, Müllhaupt B, Weber W, Attenhofer M, Scott RJ, Fried M, Martinoli S, Muller H, Dobbie Z. Phenotypic differences in familial adenomatous polyposis based on APC gene mutation status. *Gut* 1998; 43:675-679.
- Hermanek P, Guggenmoos-Holzmann I, Gall F P. Prognostic factors in rectal carcinoma. A contribution to the further development of tumor classification. *Dis Colon Rec-tum* 1989; 32: 593-599.
- Hermanto U, Zong CS, Li W, Wang LH. RACK1, an insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor-interacting protein, modulates IGF-I-dependent integrin signaling and promotes cell spreading and contact with extracellular matrix. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 2345–2365.
- Hieger I. Cholesterol carcinogenesis. *Br Med Bull* 1958 14; 159-160.
- Hill M J. The role of colon anaerobes in the metabolism of bile acids and steroids and its relation to colon cancer. *Cancer* 1975; 36: 2387-2400.
- Hill M J, Aries U C. Faecal steroid composition and its relationship to cancer of the large bowel. *J Pathol* 1971; 104: 129-139.
- Hill M J, Drasar B S, Aries V, Crowther J S, Hawksworth G, Williams R E. Bacteria and etiology of cancer of large bowel. *Lancet* 1971; 16: 95-100.
- Hill M J, Drasar B S, Williams R E D. Faecal bile-acid and clostridia in patients with cancer of the large bowel. *Lancet* 1975; 1:535-539.
- Hickey W F, Corson J M. Squamous cell carcinoma arising in a duplication of the colon. Case report and literature review of squamous cell carcinoma of the colon and of malignancy complicating colonic duplication. *Cancer* 1981; 47: 602-609.
- Hoff G, Vatu M H, Larsen S. Relation between tobacco smoking and colorectal polyps. *Scand J Gastroenterology* 1987;22:13-16.
- Holland EC, Sonenberg N, Pandolfi PP, Thomas G: Signaling control of mRNA translation in cancer pathogenesis. *Oncogene* 2004; 23:3138-3144.
- Hollstein M, Sidransky D, Volgestein B, Harris CC. P53 mutations in human cancers. *Science*, 1991; 253: 49-53



- Houlston R, Crabtree M, Phillips R, Tomlinson I. Explaining differences in the severity of familial adenomatous polyposis and the search for modifier genes. *Gut* 2001;48:1-5.
- 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 Jun 15;85(12):2519-25.
- Iino H, Fukayama M, Maeda Y, Koike M, Mori T, Takahashi T, Kikuchi-Yanoshita R, Miyaki M, Mizuno S, Watanabe S. Molecular genetics for clinical management of colo-rectal carcinoma. 17p, 18q, and 22q loss of heterozygosity and decreased DCC expression are correlated with the metastatic potential. *Cancer* 1994; 73: 1324-1331.
- Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL: TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 2002, 4:648-657.
- Inoki K, Zhu T, Guan KL: TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 2003, 115:577-590.
- 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.
- Itzkowitz SH, Dahiya R, Byrd JC, Kim YS. Blood group antigen synthesis and degradation in normal and cancerous colonic tissues. *Gastroenterology*. 1990 Aug;99 (2):431-42.
- Iwama T, Mishima Y. Mortality in young first-degree relatives of patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer* 1994; 73: 2065-2068.
- Jacobs M M. Inhibitory effects of selenium on 1,2-dimethylhydrazine and methylazoxymethanol colon carcinogenesis. *Cancer* 1977; 40: 2557-2564.
- Järvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, et al. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 2000;118:829-834.
- Jass J R, Atkin W S, Cizick J. The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. *Histopathology* 1986; 10: 437-459.
- Jensen H E, Nielsen J, Balslev I. Carcinoma of the colon in old age. *Ann Surg* 1971; 171: 107-115.
- Jensen O M, Esteve J, Moller H, Renard H. Cancer in the European Community and its member states. *Eur J Cancer* 1990; 26: 1167-1256.
- Jessurun J, Romero-Guadarrama M, Manivel JC. Medullary adenocarcinoma of the colon: clinicopathologic study of 11 cases. *Hum Pathol* 1999; 30: 843-848.
- Jiang H, Coleman J, Miskimins R and Miskimins WK. Expression of constitutively active 4EBP-1 enhances p27Kip1 expression and inhibits proliferation of MCF7 breast cancer cells. *Cancer Cell Int.* 2003; 3: 2.
- Karol KK, Khor H T. Dietary fat in relation to tumorigenesis. *Prog Biochem Pharm* 1975; 10: 308-353.
- 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 Jul;90(7):705-10.
- Kee F. B. Changing site distribution of colorectal cancer. *BMJ* 1992; 18: 158.
- Kelley W E, Brown P W, Lawrence W. Penetrating obstructing and perforating carcinomas of the colon and rectum. *Arch Surg* 1981; 116: 381-384.
- Kent TH, Mitros FA. Polyps of the colon and the small bowel, polyp syndromes and polyps carcinoma sequence. A: Norris HT, ed. *Pathology of the colon, small intestine and anus*. New York: Churchill Livingstone 1983; 167-199.
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM: mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002, 110:163-175.
- Kim H, Hen J, Vogelstein B, Hamilton S R. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1994; 145: 148-156.
- Kirkham N. Colorectal signet ring cell carcinoma in young people. *J Pathol* 1988; 155: 93-94.

- Kirklin J W, Docherty M B, Waugh J M. The role of the peritoneal reflection in the prognosis of carcinoma of the rectum and sigmoid colon. *Surg Gynecol Obstet* 1949; 88: 326-331.
- 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 Jun;20(6):528-48. Review.
- Kleinbeuker J, Van der Meer R, De Vries E. Calcium and vitamin D: possible protective agents against colorectal cancer? *Eur J Cancer* 1995;31:1081-1084.
- Kritchevsky D. Colorectal cancer: the role of dietary fat and caloric restriction. *Mutat Res* 1993; 290: 63-70.
- Kune G, Vitetta L. Alcohol consumption and the etiology of colorectal cancer: a review of the scientific evidence from 1957 to 1991. *Nutr Cancer* 1992;18:97-111.
- Kushner J, Bradley G, Jordan RCK. Altered p53 expression is probably an early event in oral carcinogenesis. *J Pathol* 1997; 183:418-423
- Lampe J W, Slavin J L, Melcher E A, Potter J D. Effects of cereal and vegetable fiber feeding on potential risk factor for colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1992; 1: 207-211.
- Landberg G, Roos G. Proliferating cell nuclear antigen and ki-67 antigen expression in human haematopoietic cells during growth stimulation and differentiation. *Cell Prolif* 1993; 26: 427-437.
- Landberg G, Tan EM, Roos G. Flow cytometric multiparameter analysis of proliferating cell nuclear antigen/cyclin and Ki-67 antigen: a new view of the cell cycle. *Exp Cell Res* 1990; 187: 111-118.
- Lane DP. P53, Guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-16.
- Leach FS, Nicolaidis NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomaki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993;75:1215-1225.
- Leichman CG. Thymidylate synthase as a predictor of response. *Oncology (Williston Park).* 1998 Aug;12(8 Suppl 6):43-7.
- Lennard-Jones J E, Melville D M, Morson B C, Ritchie J K, Williams C B. Precancer and cancer in extensive ulcerative colitis: findings among 401 patients over 22 years. *Gut* 1990;31:800-806.
- 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 May;4(5):1243-50.
- Levi F, Randimbison L, La Vecchia C. Trends in subsite distribution of colorectal cancers and polyps from the Vaud Cancer Registry. *Cancer.* 1993 Jul 1;72(1):46-50.
- 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 Jul 23;339(4):223-8.
- Lilliental J, Chang DD. Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin- $\beta$  subunit. *J Biol Chem* 1998; 273: 2379-2383.
- Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, Garvik BM, Yates JR. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 676-682
- Lointier P, Meggouh F, Dechelotte P, Pezet D, Ferrier Ch, Chipponi J, Saez S. Receptores de la 1, 25-dihidroxitamina D3 y adenocarcinoma de colon humano. *Br J Surg (edic. esp)* 1991; 78: 435-439.
- Luk G D. Epidemiology, etiology, and diagnosis of colorectal neoplasia. *Cur Opin Gastroenterol.* 1993; 9: 19-27.
- Mak BC and Yeung RS. The tuberous sclerosis complex genes in tumor development. *Cancer Invest.* 2004; 22: 588-603.
- Mandel J S, Bond J H, Church T R, Snover D C, Bradley G M, Schuman L M, Edever F. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. *N Eng J* 1993; 328: 1365-1371.
- McCahill A, Warwicker J, Bolger GB, Houslay MD, and Yarwood SJ. The RACK1 Scaffold Protein: A Dynamic Cog in Cell Response Mechanisms. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 1261-1273.

- McCormick E. Ras GTPase activating protein: signal transmitter and signal terminator. *Cell*. 1989 Jan 13;56(1):5-8. Review
- McDonald F, Ford CHJ. *Molecular biology of cancer*. Oxford, Bios Scientific Publishers Ltd, 1997.
- Mecklin JP, Peltomaki P. Genetic changes associated with colon tumor development. *Ann Chir Gynaecol*. 2000;89(3):211-5.
- Medical Research Council. Clinico pathological features of prognostic significance in operable rectal cancer in 17 centers in U.K. (Third report of the M. C. R. Trial, on behalf of the Working Party). *Br J Cancer* 1984; 50: 435-442.
- Medrano J. Detección precoz. En: Grau J J, Piqué J M. (eds.). *Monografías clínicas en Oncología. Cáncer colorrectal*. Barcelona: Edic. Doyma; 1990: 13-18.
- Melo J. and Barnes D.J. Switching off oncogenic signals in chronic myeloid leukaemia. *Hamatol. J*. 2004; 5: 183-187.
- Minsky B D, Mies C, Rich T A. Potentially curative surgery if colon cancer: patterns of failure and survival. *J Clin Oncol* 1988; 6: 106-118.
- Mochly-Rosen, D. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* 1995; 268: 247-251.
- Moertel C G, O'Fallon J R, Go V L, O'Connell M J, Thynne G S. The preoperative carcinoembryonic antigen test in the diagnosis staging, and prognosis of colorectal cancer. *Cancer* 1986; 58: 603-610.
- Monnet E, Boutron M C, Faivre J, Milan C. Influence of socioeconomic status on prognosis of colorectal cancer. *Cancer* 1993; 72: 1165-1170.
- Morales M, Lopis A, Castillo A, Vitoria I. Cancer of the rectum in relation to components of the Spanish diet. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1990; 10: 214-219.
- Moreaux J, Catala M. Les cancers coliques. Résultats du traitement chirurgical et prognostic. Cinq cent soixante-dix-neuf observations. *Pres Med* 1985; 14:463-466
- 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 Aug 1;55(15):3417-20
- Morkve O, Halvorsen O J, Stangeland L, Gulsvik A, Laerum O D. Quantitation of biological tumour markers (p53, c-myc, ki-67 and DNA ploidy) by multiparameter flow cytometry in non small cell lung cancer. *Int J Cancer* 1992; 52: 851-855.
- Morson B C, Dawson I M P. *Gastrointestinal pathology*. 2<sup>a</sup> ed. Oxford: Blackwell Scientific Publi, 1979. 193
- Mutto T, Mussey HJR, Morson B. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1975; 36:2251-2270-
- Nathanson S D, Schultz L, Tilley B, Kambouris A. Carcinomas of the colon and rectum. A comparison of staging classification. *Am Surg* 1986; 52: 428-433.
- National Cancer Institut. *Cancer statistics review 1973-1989*. DHHS Publ No (NIH) 92-2789 1992 Bethesda Maryland.
- Nelson R L. Dietary iron and colorectal cancer risk. *Free radical Biol Med* 1992;12:161-168.
- Nelson R L, Yoo S J, Tanure J C, Adrianopopulos G, Misumini A. The effects of iron on experimental colorectal carcinogenesis. *Anticancer Res* 1989;9: 1477-1482.
- Obrador A, Benito E. Epidemiología. En: Grau J J, Piqué J M. (eds.). *Monografías clínicas en Oncología. Cáncer colorrectal*. Barcelona: Edic. Doyma; 1990: 1-11.
- Okuno M, Ikehara T, Nagayama M, Sakamoto K, Kato Y, Umeyana K. Colorectal carcinoma in young adults. *Am J Surg* 1987; 154: 264-268.
- Paganelli G M, Biasco G, Brandi G, Santucci R, Gizzi G, Villani V, Cianci M, Miglioli M, Barbara L. Effect of vitamin A, C, and E supplementation on rectal cell proliferation in patients with colorectal adenomas. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 47-51.
- Park C H, Reid J D. Adenocarcinoma of the colon with choriocarcinoma in the sigmoid colon. *Cancer* 1980; 46: 570-575.

- Pende M, Um SH, Mieulet V, Sticker M, Goss VL, Mestan J, Mueller M, Fumagalli S, Kozma SC, Thomas G: S6K1(-/-)/S6K2(-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(8):3112-24.
- Peomin V, Thakerngpol K, Pacharee P, Stitnimankarn T. Adenosquamous carcinoma and carcinoid differentiation of the colon. Report of a case. *Cancer* 1983; 52: 1122-1125.
- Percesepe A, Borghi F, Menigatti M, Losi L, Foroni M, Di Gregorio C, Rossi G, Pedroni M, Sala E, Vaccina F, Roncucci L, Benatti P, Viel A, Genuardi M, Marra G, Kristo P, Peltomaki P, Ponz de Leon M. Molecular screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer: a prospective, population-based study. *J Clin Oncol* 2001; 19:3944-3950.
- Pescaroti M, Maria G, Beltrani B. Site, emergency, and duration of symptoms in the prognosis of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1982; 25: 33-40.
- Phil E, Hughes E S, McDermott F T, Milne B J, Korner J M, Prece A B. Carcinoma of the colon. Cancer specific long-term survival. A series of 615 patients treated by one surgeon. *Ann Surg* 1980; 192: 114-117.
- Phillips R L. Role of life-style and dietary habits in risk of cancer among Seventh-Day adventists. *Cancer Res* 1975; 35: 3513-3522.
- Piqué J. Diagnóstico clínico. En: Grau J J, Piqué J M. (eds.). *Monografías clínicas en Oncología. Cáncer colorrectal.* Barcelona: Edic. Doyma; 1990: 19-29.
- Potter J D, McMichael A J. Diet and cancer of the colon and rectum: a case control study. *J Natl Cancer Inst* 1986; 76: 557-569.
- Potter J D. Reconciliación de la epidemiología, la fisiología y la biología molecular del cáncer de colon. *JAMA (ed. esp.)* 1993; 2: 303-307.
- Potter JD .Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Jun 2;91(11):916-32.
- Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis.
- Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, Gen J, Giardello FM, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993; 329:1982-1987.
- Pratt C B, Rivera G, Shanks E, Johnson W W, Howarth C, Terrell W, Kumar P M. Colorectal carcinoma in adolescents implications regarding etiology. *Cancer* 1977; 40: 2464- 2472.
- Quirke P, Dixon MF, Clayden AD, Durdev P, Dyson JE, Williams NS, Bird CC. Prognostic significance of DNA aneuploidy and cell proliferation in rectal adenocarcinomas. *J Pathol.* 1987 Apr;151(4):285-91.
- Raftopoulos M, Etienne-Manneville S, Self A, Nicholls S. and Hall A. Regulation of cell migration by the tumor suppressor PTEN. *Science* 2004; 303: 1179-1181.
- Ransohoff DF, Lang C A. Screening for colorectal cancer. *New Engl J Med* 1991; 325: 37-41.
- Ransohoff DF, Riddell RH, Levin B. Ulcerative colitis and colonic cancer. Problems in assessing the diagnostic usefulness of mucosal dysplasia. *Dis Colon Rectum.* 1985 Jun;28(6):383-8
- Rainey J B, Davis P W, Bristol J B, Williamson R C. Adaptation and carcinogenesis in disfunctioned rat colon: divergent effects of faeces and bile acids. *Br J Cancer* 1983;48 477-484.
- Riddell R H, Levin B. Ultrastructure of the "transitional" mucosa adjacent to large bowel carcinoma. *Cancer* 1977; 40: 2509-2522.
- Rieger A, Wahren B. CEA levels at recurrence and metastases; importance for detecting secondary disease. *Scand J Gastroenterol* 1975; 10: 869-874.
- Ries L G, Pollack E S, Young J L. Cancer patient survival: surveillance, epidemiology, and end results program, 1973-1979. *J Natl Cancer Inst* 1983; 70: 693-707.
- Rifà J, Avellà A. Factores pronósticos de cáncer colorrectal. *Gastroenterol Hepatol* 1992; 15: 32-78.
- Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L, Srivasta S. A National Cancer Institute workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1758-1762.
- Rojo F, Nájera L, Lirola J, Jiménez J, Guzmán M, Sabadell M, Baselga J y Ramón y Cajal S. 4E-Binding Protein 1, A Cell Signaling Hallmark in Breast Cancer that Correlates with Pathologic Grade and Prognosis. *Clin Cancer Res* 2007; 13:1:81-89.

- Ron D, Che-Hong C, Caldwell J, Jaimeson L, Orr E, and Mochly-Rosen D. Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the subunit of G-proteins. *Proc Natl Acad Sci* 1994a; 91:839–843.
- Rosdahl JA, Mourton TL, Brady-Kalnay SM. Protein kinase C $\delta$  (PKC $\delta$ ) is required for protein tyrosine phosphatase- $\mu$  (PTP $\mu$ )-dependent neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* 2002; 19: 292–306.
- Rosen N: Chapter 32.1. Cancers of the Gastrointestinal Tract. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, Fifth Edition, edited by Vincent DeVita Jr, Samuel Hellman, Steven A. Rosenberg. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1997.
- Royl HK, Olusolal BF, Clemens DL, Karolski WJ, Ratashak A, Lynch HT and Smyrk TC AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2002; 23: 201-205.
- Ruggero D, Montanaro L, Ma L, Xu W, Londei P, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP: The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis. *Nat Med* 2004; 10:484-486.
- Rustgi AK. Hereditary gastrointestinal polyposis and nonpolyposis syndromes. *N Eng J Med* 1994; 331: 1694-1702.
- Santi DV, McHenry CS, Sommer H. Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry*. 1974 Jan 29;13(3):471-81.
- Sarkiss M, Hsu B, El-Naggar AK, McDonell TJ. The clinical relevance and assesment of apoptotic cell death. *Adv Anat Pathol* 1996; 4:205-211.
- Sasaki O, Atkin W S, Jass J R. Mucinous carcinoma of the rectum. *Histopathology* 1987; 11:259-272.
- Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M. The cell cycle associated change of the ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol* 1987; 133: 579-584.
- Sawady J, Friedman M I, Katzin W E, Mendelsohn G. Role of the transitional mucosa of the colon in differentiating primary adenocarcinoma from carcinomas metastatic to the colon. An immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* 1991; 15: 136-144.
- Shamberger R J. Relationship of selenium to cancer. I. Inhibitory effect of selenium on carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1970; 44: 931-936.
- Schmelzle T, Hall MN: TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000, 103:253-262.
- Schwartz A M, Orestein P M. Small-cell undifferentiated carcinoma of the colon. A clinicopathological study of the resctosigmoid colon. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109: 629- 632
- Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD, Lopez L, Kosmatka M, DePinho RA, Cantley LC: The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* 2004, 6:91-99.
- Shively JE, Beatty JD. CEA-related antigens: molecular biology and clinical significance. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1985;2(4):355-99.
- Silvestrini R, Costa A, Veneroni S, Del Bino G, Persici P. Comparative analysis of different approaches to investigate cell kinetics. *Cell Tissue Kinet* 1988; 21: 123-131.
- Slavin J L, Melcher E A, Sundeen M, Schwartz S. Effects of high-fiber diet on fecal blood content (HemQuant assay) in healthy subjects. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 929-932.
- Selby J V, Friedman G D, Quesenberry C P, Weiss N S. A case-control study of screening sigmoidoscopy and mortality from colorectal cancer. *N Engl J Med* 1992; 326: 653-657.
- Sengupta J, Nilsson J, Gursky R, Spahn CM, Nissen P, Frank J. Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 957–962.
- Shamberger R J, Rukovena E, Longfield A K, Tytko S A, Deodhar S, Willis C E. Antioxidants and cancer. I. Selenium in the blood of normals and cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1973; 863-870.
- Shibata A, Paganini Hill A, Ross R K, Henderson B E. Intake of vegetables, fruits, betacarotene, vitamin C and vitamin supplements and cancer incidence among the elderly: a prospective study. *Br J Cancer* 1992; 66: 673-679.
- Siegers C P, Von Hertzberg, Lottin E, Otte M, Schnider B. Anthranoid laxative abuse- a risk for colorectal cancer? *Gut* 1993; 34 1099-1101.
- Sigurdson ER. Surgical palliation of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer* 1995; 19: 348-359.

- Simanowski U A, Seitz H K, Kommerell B. Alcohol y co-carcinogénesis. *Colo proctology* 1991; 7: 4-6.
- Skibber JM, Hoff PM, Minsky BD. Cancer of the rectum (capitol 33.8). A: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles and practice of oncology* (6ª edición). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001; 1271-1319.
- Simanowski U A, Seitz H K, Kommerell B. Alcohol y co-carcinogénesis. *Colo-proctology* 1991; 7: 4-6. 189
- Slattery M L, Abd-Elghani N, Kerber R, Schumacher M C. Physical activity and colon cancer: a comparison of various indicators of physical activity to evaluate the association. *Epidemiology* 1990; 1: 481-485.
- Slattery M L, West D W, Robison L M, French T K, Ford M H, Schuman K L, Sorenson A W. Tobacco, alcohol, coffee, and caffeine as risk factors for colon cancer in a low-risk population. *Epidemiology* 1990; 1: 141-145.
- Soravia C, Berk T, Madlensky L, Mitri A, Cheng H, Gallinger S, Cohen Z, Bapat B. Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. *Am J Hum Genet* 1998;62:1290-1301.
- Soyer P, Levesque M, Elias D, Aeitoun G, Roche A. Preoperative assessment of respectability of hepatic metastases from colonic carcinoma: CT portography vs sonography and dynamic CT. *Am J Roent* 1992; 159: 741-744.
- Spjut H, Estrada RG. The significance of epithelial polyps of the large bowel. *Pathol Annu.* 1977;12 Pt 1:147-70.
- Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 2000; 342:1946-1952.
- Steinbeck RG, Heselmeyer KM, Neugebauer WF, Falkmer UG, Auer GU. DNA ploidy in human colorectal adenocarcinomas. *Anal Quant Cytol Histol.* 1993 Jun;15(3):187-94.
- Steinberg M S, Barkin J S, Kaplan R S, Stablein D M. Prognostic indicators of colon tumors. The gastrointestinal tumor study group experience. *Cancer* 1986; 57: 1866-1870.
- Steinmetz K A, Potter J D. Vegetables, fruit, and cancer. I. *Epidemiology. Cancer Causes Control* 1991; 2: 325-357
- Stemmermann G N, Nomura A M, Chyou P H, Yoshizawa C. Prospective study of alcohol intake and large bowel cancer. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 1414-1420.
- Stenger JE, Mayr GA, Mann K, Tegtmeyer P. Formation of stable p53 homotetramers and multiples of tetramers. *Med Carcinog* 1992; 5: 249-253.
- Sugarbaker P H, MacDonald J S, Gunderson L L. Cáncer de colon y recto. En: DeVita V C, Hellamn S, Rosenberg S A. (eds). *Cáncer. Principios y práctica de oncología.* Barcelona: Salvat edit.; 1984: 598-660.
- Sugimura T. Carcinogenicity of mutagenic hetrocyclic amines formed during the cooking process. *Mutat Res* 1985;150:33-42.
- Symonds D A, Vickery A L. Mucinous carcinoma of the colon and rectum. *Cancer* 1976; 37: 1891-1900.
- 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.
- Takaku K, Oshima M, Miyoshi H, Matsui M, Selding MF, Taketo MM. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both DPC 4 (SMAD4) and APC genes. *Cell* 1998, 92: 645-656.
- Tang H, Hornstein E, Stolovich M, Levy G, Livingstone M, Templeton D, Avruch J, Meyuhas O: Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 2001, 21:8671-8683.
- Trock B, Lanza E, Greenwald P. Dietary fiber vegetables and colon cancer: Critical review and metaanalysis of the epidemiologic evidence. *J Ntl Cancer Inst* 1990;82: 650-661.
- Troll W. Prevention of cancer by agents that suppress oxygen radical formation. *Free 190 Radic Res Commun* 1991; 12: 751-757.
- Usacheva A, Smith R, Minshall R, Baida G, Seng S, Croze E, Colamonici O. The WD motif-containing protein receptor for activated protein kinase C (RACK1) is required for recruitment and activation of signal transducer and activator of transcription 1 through the type I interferon receptor. *J Biol Chem.* 2001 Jun 22;276(25):22948-53.

- Van der Meer R, Termont D S, De Vries H T. Differential effects of calcium ions and calcium phosphate on cytotoxicity of bile acids. *Am J Physiol* 1991; 260: 142-147.
- Vasen HFA, Van del Luijt RB, Slors JFM, Buskens E, de Ruiter P, Baeten CG, Schouten WR, oostvogel HJ, Kuijpers JH, Tops CM, Meera Khan P. Molecular genetic tests as a guide to surgical management of familial adenomatous polyposis. *Lancet* 1996; 348:433-435.
- Verheijen R, Kuijpers HJ, Schlingemann RO, Boehmer AL, van Driel R, Brakenhoff GJ, Ramaekers FC. Ki- 67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase. *J Cell Sci* 1989; 92:123-130.
- Vivanco I, Sawyers CL: The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002, 2:489-501.
- Vogel V G, McPherson R S. Dietary epidemiology of colon cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 1989; 3: 35-63.
- Volgestein B, Kinzler K. P53 function and dysfunction. *Cell* 1992; 70: 523-526.
- Wallace-Brodeur RR, Lowe S. Clinical implications of p53 mutations. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55:64-75.
- Wanebo H J, Fang W L, Mill A S, Zfass A M. Colorectal cancer. A blueprint for disease control through screening by primary care physicians. *Arch Surg* 1986; 121: 1347-1352.
- Wargovich M J, Engs W S, Newmark H L, Bruce W R. Calcium ameliorates the toxic effect of deoxycholic acid on colonic epithelium. *Carcinogenesis* 1983;4: 1205-1207.
- Wendel HG, De Stanchina E, Fridman JS, Malina A, Ray S, Kogan S, Cordon-Cardo C, Pelletier J, Lowe SW: Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature* 2004; 428:332-337.
- West D W, Slattey M L, Robinson L M, Schuman K L, Ford M H, Mahoney A W, Lyon J L, Sorensen A W. Dietary intake and colon cancer: sex and anatomic site-specific associations. *Am J Epidemiol* 1989; 130: 883-894.
- Wijnen JT, Vasen HFA, Khan PM, Zwinderman AH, van der Klift H, Mulder A, Tops C, Moller P, Fodde R. Clinical findings with implications for genetic testing in families with clustering of colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998; 339: 511-518.
- Wilcox GM, Anderson PB, Colacchio TA. Early invasive carcinoma in colonic polyps. A review of the literature with emphasis on the assessment of the risk of metastasis. Cancer. 1986 Jan 1;57(1):160-71.
- Wilcox GM, Beck JR. Early invasive cancer in adenomatous colonic polyps ("malignant polyps"). Evaluation of the therapeutic options by decision analysis. *Gastroenterology*. 1987 May;92(5 Pt 1):1159-68.
- Willett C, Tepper J E, Cohen A, Orlow E, Welch C. Obstructive and perforative colonic carcinoma: patterns of failure. *J Clin Oncol* 1985; 3: 379-384.
- 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.
- Willett W C. Selenium, vitamin E, fiber, and the incidence of human cancer: an epidemiologic perspective. *Adv Exp Med Biol* 1986; 206: 27-34.
- Williams G T. Transitional mucosa of the large intestine. *Histopathology* 1985; 9: 1237- 1243.
- Williams S T, Beart R W. Staging of colorectal cancer. *Semin Surg Oncol* 1992; 8: 89- 93.
- Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, Goodle F, Stolar MH, Mulrow CD, Woolf SH, Glick SN, Ganiats TG, Bond JH, Rosen L, Zapka JG, Olsen SJ, Giardello, FM, Sisk JE, van Antwerp R, Brown-Davis C, Marciniack DA, Mayer RJ. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rational. *Gastroenterology* 1997; 112: 594-642.
- Winawer S J, Zauber A G, Stewart E, O'Brien M J. The natural history of colorectal cancer. Opportunities for intervention. *Cancer* 1991; 67: 1143-1149.
- Winawer SJ, Zauber AG, Verdes H, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Bond JH, Waye JD, Schapiro M, Panish JF. Risk of colorectal cancer in the families of patients with denomatous 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.

- Wolfe D, Schumutte C, Westerndorf J, Marquardt H. Hydroxyantraquinones as tumor promoters: enhancement of malignant transformation of C3H mouse fibroblast and growth stimulation of primary hepatocytes. *Cancer Res* 1990;50: 6540-6544.
- Wynder E L, Reddy B S. Colon cancer prevention. Today's challenge to biomedical scientist and clinical investigators. *Cancer* 1977; 40: 2565-2571.
- Wynder E L, Shigematsu T. Environmental factors of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1967 ; 20:1520-1560.
- Zambetti GP, Bargonett J, Walker K, Prives C, Levine AJ. Wild-type p53 Mediate positive regulation of gene expression through specific DNA sequence element. *Genes Dev* 1992; 6: 1143-1152.
- Zeng Z, Cohen A M, Urmacher C. Usefulness of carcinoembryonic antigen monitoring despite normal preoperative values in node-positive colon cancer patients. *Dis Colon Rectum* 1993; 36: 1063-1068.
- Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, Ru B, Edgar BA, Pan D: Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nat Cell Biol* 2003, 5:578-581.
- Zhou X, Tan M, Stone Hawthorne V, Klos KS, Lan KH, Yang Y, Yang W, Smith TL, Shi D and Yu D. Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 6779- 6788.
- Zwacka RM, Dunlop MG. Gene therapy for colon cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998: 12: 595-615.