

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

VALOR PRONÓSTICO DEL CA 19.9 Y EL
EGFR TISULARES EN LA SUPERVIVENCIA
DEL CARCINOMA COLORRECTAL

Autor: D. Carlos .L. Morales Gutiérrez

Directores: J.L. Balibrea Cantero
J.I. Landa García

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

Como Director de la Tesis Doctoral "Valor pronóstico del CA. 19.9 y del EGFR tisulares en la supervivencia del Ca. Colo-Rectal", informo que reúne todas las condiciones de forma y contenido necesarias para ser presentada ante el Tribunal Calificador.

Fdo.: Dr. I.Landa García

Vº Bº
EL TUTOR (2)



El Director de la Tesis

Fdo.: _____
(fecha y firma)

D.N.I.:

Prof. J.L. Balibrea
Fdo.: _____
(fecha y firma)

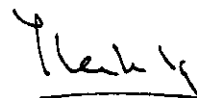
D.N.I.: 2.011.048

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

La Tesis Doctoral "Valor pronóstico del CA. 19.9 y del EGFR tisulares en la supervivencia del Ca. Colo-Rectal", ha sido considerada por el Consejo del Departamento apta para ser presentada ante el Tribunal Calificador.

Fecha reunión
Consejo Departamento
20 de Diciembre 1995

El Director del Departamento



Fdo.: Prof. J.L. Balibrea
(fecha y firma)

A mi esposa, hijas y padres.

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. D. J.L. Balibrea Cantero, Jefe del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad COMPLUTENSE de Madrid, por haber aceptado dirigir esta Tesis y ayudarme con sus sabios consejos y aportaciones a llevar a buen fin el término de la misma. Por ello, deseo expresarle mi más profundo agradecimiento y admiración a su quehacer al frente del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de Madrid.

Al Dr. J.I. Landa García, Médico Adjunto de Cirugía del Hospital 12 de Octubre de Madrid, por su confianza en mi, su apoyo y su inestimable ayuda a la hora de valorar los resultados de la Tesis. Por todo ello, deseo reciba mi gratitud y mi cariño.

A la Dra Irene Vegh Polgary, Médico Especialista en Endocrinología, del Servicio de Oncología del Hospital 12 de Octubre de Madrid, inestimable compañera de trabajo, sin cuyos conocimientos sobre oncología y capacidad investigadora, así como la dedicación prestada a la elaboración de esta Tesis, no hubiera podido realizarla. A su cariño, confianza y paciencia demostrada, mi más sincero agradecimiento, admiración y cariño.

A los Doctores Dionisio Ballesteros Saez, Alfredo Abad Barahona, Juan Alcalde Escribano, Alfredo Ibarra Peláez, Antonio Sierra García, Enrique Garrote Nieto, Manuel de Quadros Borrajo, Fernando Sánchez Bustos, Felipe de la Cruz Vigo, José María Menéndez Rubio, Juan Pedro Simón Aznar y Pedro Yuste García, todos ellos componentes del Servicio de Cirugía General A, y compañeros de probada capacidad y profesionalidad, pero ante todo, entrañables amigos, a quienes resulta innecesario subrayar mi afecto y gratitud.

A los Doctores José Manuel Ramia, Daniel Sánchez, Silvia Rodríguez y Ana Bayón, todos ellos médicos residentes de nuestra Sección, por su inestimable paciencia y ayuda en la ingrata labor de la recogida de muestras y transporte de las mismas. A todos ellos, mi más profundo agradecimiento.

A la Srta. Aurora Berlanga, Secretaria del Jefe de Departamento de Cirugía del Hospital "12 de Octubre" de Madrid eficacísima Secretaria de todos los Médicos del Servicio y que me ha sabido animar en los momentos de decaimiento a lo largo de mi carrera profesional. A ella le dedico mi cariño y gratitud.

A las Srtas. Pilar y Paula, Secretarias del Jefe de Departamento de la Facultad de Medicina, por la paciencia que han tenido conmigo y por la ayuda prestada en la ingrata labor que conlleva la burocracia. Vaya para ellas mi sincera gratitud.

A mi mujer y a mis hijas, por la paciencia que han demostrado conmigo en el último año, durante la elaboración de la Tesis, por haber sabido postergar sus deseos a mi trabajo. Vaya para ellas mi amor y gratitud.

A todo el personal sanitario de la Planta Baja de Cirugía, por su apoyo y cuidado que presentan en su labor diaria y su quehacer profesional de probada valía. Vaya para todos ellos mi más sincero afecto y cariño.

Y finalmente, a todos aquellos que de una forma u otra han contribuido a la realización de esta Tesis y se me ha olvidado citar. A todos ellos les ruego no lo tengan en cuenta y reciban mi mas sincera gratitud.

ÍNDICE:

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EPIDEMIOLOGÍA	5
1.2. FACTORES PRONÓSTICOS	13
1.2.1. DATOS CLÍNICOS	13
1.2.2. DATOS ANATOMOPATOLÓGICOS	20
1.3. FACTORES DE RIESGO	34
1.3.1. GRUPOS DE ALTO RIESGO	40
1.4. MARCADORES TUMORALES	51
1.4.1. ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMORES	51
1.4.2. ANTÍGENOS ONCOFETALES	53
1.4.3. MARCADORES HUMORALES	57
1.4.4. MARCADORES HÍSTICOS	62
1.5. SEGUIMIENTO	69
2. OBJETIVOS	78
3. MATERIAL Y MÉTODOS	84
4. RESULTADOS	108
5. DISCUSIÓN	171
6. CONCLUSIONES	199
7. RESUMEN	201
8. BIBLIOGRAFÍA	205

1).- INTRODUCCION

1.- INTRODUCCIÓN:

Las enfermedades oncológicas ocupan la tercera causa de muerte en los países occidentales. En los EEUU se producen anualmente alrededor de 350.000 muertes por cáncer, lo que representa aproximadamente el 20% de todas las muertes ocurridas en dicho país (60).

En el momento actual, se puede afirmar que la mejor arma para luchar contra el cáncer, es el diagnóstico precoz del mismo. Por ello numerosos grupos de investigadores en todo el mundo, han orientado sus trabajos a conseguir métodos de diagnóstico capaces de detectar el cáncer en sus estadios más iniciales. Los grandes avances en la biología y genética moleculares conseguidos en los últimos 10 años, han contribuido en gran medida a conocer mejor los mecanismos íntimos de la transformación neoplásica.

La incidencia de cáncer colorrectal presenta una notable variabilidad geográfica, siendo más elevada en América del Norte, Australia, Nueva Zelanda y Europa.

Según la American Cancer Association, en EEUU fueron diagnosticados 151.000 casos nuevos durante 1989. Su incidencia es únicamente superada por el cáncer de pulmón.

En Navarra, hay una incidencia de 11,2 casos nuevos anuales por 100.000 habitantes, en hombres y en tasas estandarizadas para la edad, y de 8,1 para las mujeres (281)

En España se calcula una incidencia de 13.000 casos nuevos de Cáncer colorrectal (CCR) por año (42) con una mortalidad de 10.1/100.000 habitantes. (122)

Con el correcto tratamiento del tumor, esto es, con la escisión quirúrgica, se consigue el 84 % de supervivencia a los 5 años en los tumores locales y el 53 % cuando la afectación es locorregional (33).

En la década pasada se ha observado que la localización del CCR está cambiando de una situación preferente en el recto hacia otra más localizada en el colon (223). La causa de este cambio es desconocida, pero actualmente, cerca del 70 % de los casos y 80 % de las muertes de cáncer de intestino grueso, son debidos a tumores en el colon. El resto, corresponde al recto (60). Hasta el momento, los patrones epidemiológicos no han cambiado lo suficiente para justificar una descripción de dichas entidades por separado, por lo cual, se considera al cáncer de colon y recto, como cáncer colorrectal. En nuestra casuística, y sobre 342 cánceres de colon intervenidos desde Enero de 1991 hasta

Diciembre de 1995, ha sido de 49.81 % de cánceres de colon frente a un 50.19% de cánceres de recto (CR).

Aunque en los últimos 10 años se ha observado un incremento en la proporción de pacientes con CR sintomáticos en estadios más tempranos, dicho cambio no ha ocurrido en los pacientes con cáncer de colon, lo que puede reflejar un cambio de la sensibilización sobre esta patología y sus síntomas por parte de los pacientes y los médicos generales (225).

En los últimos 25 años, la mortalidad del CCR no ha variado a pesar de la mejoría en las técnicas quirúrgicas y terapéuticas en general, lo que unido a la dificultad de la realización de un diagnóstico precoz de la enfermedad, ha hecho que los esfuerzos vayan dirigidos a realizar un diagnóstico más precoz de las recidivas, a fin de conseguir una mayor supervivencia de estos pacientes.

En vista de lo anteriormente expuesto, está claro que poco vamos a poder hacer en cuanto a un diagnóstico más precoz de la enfermedad, por lo que los esfuerzos de los distintos autores han ido encaminados a descubrir factores pronósticos que hagan posible un seguimiento más estricto de determinados pacientes y poder de esa manera detectar más precozmente las recidivas, tanto con intención de que la recidiva detectada sea subsidiaria de nuevo tratamiento quirúrgico con carácter curativo, así como para abaratar los

costes de los follow-up que resultan extraordinariamente costosos cuando se hacen de forma indiscriminada y por igual a todos los pacientes afectados de CCR.

Así pues, el tratamiento del CCR sigue constituyendo un reto para la medicina, por ser uno de los cánceres más frecuentes y por tener un alto índice de mortalidad global. En la actualidad, la cirugía sigue considerándose como el tratamiento inicial de elección, que posteriormente puede acompañarse de otros tratamientos coadyuvantes (quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia).

Por ello hemos intentado en este trabajo encontrar si la determinación de dos marcadores tumorales de utilización frecuente en la clínica diaria, como son el CA 19.9 y el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico, determinados en el propio tumor y en tejidos adyacentes, nos podría identificar un grupo de enfermos en los que el seguimiento debiéramos realizarlo de una manera más exhaustiva, pues estaría probado que estos enfermos tienen una tasa de recidivas más alta que otros con la misma ubicación de la enfermedad.

1.1).-EPIDEMIOLOGIA

EPIDEMIOLOGÍA:

La frecuencia del cáncer colorrectal está relacionada con el aumento de la renta per cápita y el incremento de la ingesta oral de grasas, carnes, proteínas animales, colesterol y calorías. Los distintos efectos de las grasas y de las proteínas animales no se pueden distinguir con precisión, puesto que el consumo de ambas es igualmente alto en las sociedades ricas, y bajo en los pobres (52).

Una de las características más importantes del cáncer de colon, es su diferente incidencia geográfica, siendo la frecuencia más alta en los países occidentales. Así, en EEUU, su frecuencia se incrementa de año en año. Incluso, se ha demostrado que siendo la incidencia de este cáncer en Japón relativamente baja, sin embargo las familias japonesas emigradas a EEUU, al cabo de una generación, presentan igual riesgo de incidencia que la población americana.

Existe un enorme interés por investigar los factores etiológicos del CCR con la esperanza de que estos conocimientos permitirán evitarlo. La dieta ha surgido como uno de los fenómenos más factibles. Pero las limitaciones para su estudio estriban en que en los modelos animales no hay un modelo de CCR espontáneo. En muchas investigaciones, a los roedores expuestos a potentes carcinógenos químicos, se les ha suministrado una dieta complementada con

grandes dosis de posibles agentes causales o protectores. La extrapolación de los datos resultantes con la situación humana tiene validez cuestionable (192)

Existen datos que apoyan la hipótesis de que los cánceres de la porción proximal del colon y los del recto poseen orígenes etiológicos y epidemiológicos distintos (277). Así, la población urbana japonesa que ha adoptado una dieta occidental con un mayor contenido en grasa, ha presentado una incidencia mayor de carcinoma localizado en la porción distal del colon, pero no ha cambiado la del colon proximal. (30)

Las personas que consumen alimentos típicos de una dieta occidental parecen tener una abundante flora anaerobia en el colon; el desarrollo de estos anaerobios es estimulado por la ingestión de carnes, que provoca la producción de enzimas bacterianas como la β -glucuronidasa y la azorreductasa. Estas enzimas pueden transformar compuestos intraluminales como las sales biliares en factores que actúan como carcinógenos en el laboratorio (117).

Dentro de los factores relacionados con la dieta, los más estudiados son:

1.- Fibra y CCR: La importancia de la fibra en la etiología del CCR se debe a DP BURKIT (29). P GREENWALD y cols. revisaron las

pruebas en pro de una relación inversa entre el consumo de fibras vegetales y el peligro de cáncer de colon (99). Analizaron 40 estudios en cuanto a criterios epidemiológicos de causalidad. La valoración sugiere netamente que existe una relación entre el CCR y el menor consumo de fibra, pero posiblemente intervengan otros factores además de la fibra. Cuando se valora la fibra vegetal total es imposible saber qué componente de la misma puede ejercer efectos y por qué mecanismo de acción. Los beneficios del mayor consumo de fibra pudieran provenir de una disminución concomitante en la ingestión de grasas (144). Un estudio hecho en Francia indica un efecto protector del consumo de verduras, pero no un beneficio del consumo de fibras de cereales (173). HP LEE y cols. hicieron un estudio sobre dieta y cáncer en los chinos de Singapur e identificaron un efecto protector del mayor consumo de hortalizas crucíferas (col, brócoli, coliflor y coles de Bruselas) (149).

Los efectos de la fibra incluyen un mayor peso de las heces, mayor frecuencia de la defecación, disminución del tiempo de tránsito intestinal, dilución del contenido del colon, mayor proliferación microbiana, alteración del metabolismo energético, disminución de la hidroxilación de ácidos biliares y una mayor producción de hidrógeno, metano, CO₂ y ac. grasos de cadena corta (146). La fibra vegetal se une a los ácidos biliares y disminuye la concentración de ellos en el excremento. También la alta concentración de fibra en las heces se acompaña

de un número menor de anaerobios en el colon y una disminución resultante en la producción de ac. biliares secundarios (211).

2.- Grasas y CCR: B ARMSTRONG y R DOLL han encontrado una correlación directa entre la incidencia de CCR y la ingestión de grasa per cápita (9). El incremento del 180% en el consumo de grasas por persona en la población japonesa desde 1959 a 1985, se acompañó del aumento proporcional en la cifra de mortalidad por CCR en un lapso de 15 años (284). En estudios en ratas, las dietas ricas en grasas aumentan la incidencia, la multicentricidad y la capacidad metastásica de tumores del colon provocados por carcinógenos (198). Estudios en roedores han demostrado que las dietas que tienen ácido linoleico, precursor de prostaglandinas, son eficaces para estimular la oncogénesis en colon y que los inhibidores de la síntesis de prostaglandinas antagonizan el efecto de la grasa de los alimentos (38). El mecanismo más verosímil de la actuación de las grasas sobre el CCR es por medio de cambios en la concentración de ácidos biliares en las heces. La concentración fecal de ácidos biliares, con efectos cancerígenos, aumentan en personas que reciben dietas con abundantes grasas. Se ha observado un incremento de la concentración de ácidos biliares en las heces del 82% de los pacientes con CCR frente a un 17% en los controles (270).

El metabolismo de las grasas en el lumen intestinal se asocia con la producción de esteroides neutros y metabolitos ácidos, existiendo alguna posibilidad de que la mayor concentración de ácidos biliares en el intestino, interviniese en dicho mecanismo (270). Existe además la posibilidad de que los tumores por sí solos cambien el metabolismo del contenido intestinal, lo cual complica los estudios (99).

3.- Mutágenos fecales y CCR: Las bacterias del intestino grueso se desarrollan merced a la descomposición de carbohidratos (fermentación). La fuente exógena principal de estos carbohidratos es la fibra de la dieta. La fermentación se acelera con dietas ricas en fibra y ello hace que las heces sean más ácidas. El pH bajo inhibe la 7α -deshidroxilación de los ácidos biliares primarios, causando una concentración disminuida de ácido desoxicólico, un carcinógeno potencial. Este mecanismo explicaría teóricamente por qué grupos cuyas dietas son altas en fibras y grasas tienen índices bajos de CCR (38).

4.- Equilibrio energético: Hay una correlación positiva entre riesgo de la neoplasia y el consumo total de sustancias energéticas (284).

5.- Factores adicionales de la dieta: Entre los agentes protectores propuestos están el CA y vit D (86), selenio (193), vit A y su precursor beta-caroteno (293), vitaminas C (20), E (136) e inhibidores vegetales

naturales como los indoles y proteasas (285). Los factores alimentarios que agravan la carcinogenia del colon incluyen alcohol (133) y productos mutágenos secundarios de alimentos preparados (155).

5.1.- Ca y vit D. El cáncer de colon es raro en latitudes bajas y casi desaparece en la franja de los 10 grados desde el ecuador (86). Una excepción a esto se observa en Japón, país situado en una latitud relativamente alta, pero con una baja incidencia de cáncer de colon. Sin embargo, la dieta japonesa es muy rica en pescado que contienen grandes cantidades de vit D y se ha calculado que la ingestión promedio de dicha vitamina en la población japonesa va de 800 a 1000 UI al día (96).

El mayor consumo de Ca en los alimentos se ha relacionado con una menor incidencia del cáncer de colon (85). Un estudio prospectivo durante 19 años de 1954 varones en Chicago identificó una disminución del 75% en la incidencia del CCR en personas que consumieron más de 1200 mg de Ca al día (92). El Ca aminora la respuesta proliferativa de las células epiteliales del colon al consumo de grasas, de bilis o de ácidos grasos en exceso (275).

5.2.- Selenio. Es un elemento esencial que sirve como cofactor para que la peroxidasa de glutatión proteja a células contra la lesión oxidativa. También puede intervenir en la síntesis de prostaglandinas y anticuer-

pos. El efecto anticarcinógeno del selenio fue propuesto en 1976 (240), después de identificar concentraciones séricas menores de dicho elemento en cancerosos, en comparación con sujetos testigos sin cáncer. Las fuentes principales en la dieta son los granos de cereales y los mariscos. Parece ser que el selenio tiene un efecto antioxidante que es el resultado de la intensificación de la actividad de la peroxidasa de glutatión.

5.3.- Vit. A. Los productos lácteos, huevos, leche y cereales fortificados son las fuentes alimenticias primarias de vit A (retinol) y retinoides afines. Estudios en Francia y Australia (211) han señalado poca relación entre la ingesta de retinol o beta-caroteno y peligro de que surja carcinoma de colon. Los compuestos del grupo de la vit A son antioxidantes y tienen la capacidad de proteger la membrana, DNA y otros constituyentes celulares de la lesión oxidativa (293).

5.4.- Vit C. No hay datos de que la vit C influya en la aparición del CCR (287). La vit E, otro antioxidante, quizá tenga un efecto anticarcinógeno, inhibiendo la conversión espontánea de nitratos y nitritos a nitrosaminas carcinógenas en verduras y alimentos conservados (136).

5.5.- Alcohol. Hay una correlación intensa entre el consumo de cerveza y la aparición de CCR (212). Parece ser que hay un riesgo

relativo de 3.17 de cáncer rectal y de 1.71 en cáncer de colon en individuos que señalaron un consumo diario de 3 o más raciones de bebidas alcohólicas, en comparación con personas abstemias (133). Se desconoce el mecanismo mediante el cual el consumo de bebidas alcohólicas influye en la carcinogénesis. Dicha relación pudiera reflejar las alteraciones en el consumo de grasa, fibra y microelementos que acompaña al abuso del alcohol.

5.6.- Carcinógenos en la dieta. Es posible que los carcinógenos generados durante la preparación de los alimentos sea la causa de que influyan los factores dietéticos en la aparición de carcinomas en el colon (51). La superficie del pescado o la carne asada a la brasa contiene potentes mutágenos y agentes similares se acumulan en alimentos fritos o asados. Los alimentos ahumados también favorecen la actividad carcinógena (243).

6.- Fármacos: Hay un estudio prospectivo recientemente publicado que abarca más de 600.000 adultos en los que se señaló que la aspirina consumida en dosis pequeñas, disminuye el peligro de cáncer de colon mortal (267).

1.2).- FACTORES PRONOSTICOS

FACTORES PRONÓSTICOS:

Hay múltiples factores, unos dependientes de la propia naturaleza del tumor y otros dependientes de situaciones clínicas acompañantes al paciente, que parecen tener una influencia decisiva en la evolución y aparición precoz de recidivas.

1.- Datos clínicos y su influencia en el pronóstico.

1.1.- Diagnóstico en pacientes asintomáticos:

El diagnóstico del CCR antes de que el paciente haya desarrollado los síntomas, aumenta considerablemente la supervivencia. Hertz siguió 58 pacientes en los que mediante examen sigmoidoscópico había detectado carcinoma invasivo en estadio asintomático (115). Solo un 15% de estos pacientes tenían ganglios linfáticos positivos y el índice de supervivencia a 5 años era de 80%. Gilbertsen y Nelms, presentaron 25 adenocarcinomas diagnosticados en pacientes asintomáticos mediante examen sigmoidoscópico inicial. De estos 25 pacientes, 16 (64%) sobrevivieron a los 5 años, como mínimo el doble del índice de supervivencia absoluto de los pacientes afectados de CCR (88). ML CORMAN (50) y PM SANFELIPPO (231) también han comunicado aumento de la

supervivencia cuando el cáncer era detectado mediante examen sigmoidoscópico en estado asintomático.

1.2.- Larga duración de los síntomas:

Numerosos estudios han demostrado que hay relación entre la duración de los síntomas y el pronóstico (49, 278, 167). Ciertamente, los pacientes que sufren un cuadro agudo y son diagnosticados en la urgencia, tienen un peor pronóstico. HB DEVLIN (64) ha planteado que los individuos que presentan síntomas precoces, tienen peor pronóstico ya que suele haber una relación entre la corta duración de los síntomas y el elevado grado histológico del tumor. Podemos resumir diciendo que el retraso del paciente en buscar ayuda médica, no empeora el pronóstico, debido a que los pacientes que buscan ayuda pronto es porque tienen tumores agresivos con obstrucción. Ahora bien, para el paciente con un tumor de grado medio, el diagnóstico y tratamiento precoces pueden mejorar notablemente la supervivencia. (64)

1.3.- Pacientes jóvenes:

Los pacientes menores de 30 años diagnosticados de CCR, vienen a representar el 1% del total (222). La supervivencia de este grupo estaba notablemente reducida, con un 19% de supervivencia global a los 5 años, mientras

que la tasa de supervivencia en una muestra no seleccionada de CCR, es del 34.7%, aunque en estudios más recientes se han presentado tasas de supervivencia de hasta 59% (116). El 53% de los pacientes jóvenes con CCR presentan un alto grado de malignidad en la pieza histológica.

1.4.- Pacientes con 70 años o más:

En pacientes de edad avanzada que superan una intervención quirúrgica convencional para el CCR, el índice de supervivencia a los 5 años es superior al de la población en general (28).

1.5.- Sexo:

Por regla general, se admite un mejor pronóstico para las mujeres con CCR, pero los distintos autores no coinciden al respecto. (55, 81, 206)

1.6.- Niveles plasmáticos preoperatorios del antígeno carcino-embriionario:

Parece existir una relación entre los niveles plasmáticos preoperatorios de CEA y la supervivencia a largo plazo, de modo que a mayores niveles, peor pronóstico. HJ WANEBO (274) ha demostrado una correlación entre CEA preoperatorio elevado y recidivas en los cánceres tipo B y C de Dukes. Pero

un CEA preoperatorio normal en tumores mal diferenciados no sugiere un pronóstico más favorable ya que estos tumores producen menos CEA que los bien diferenciados.

1.7.- Obstrucción intestinal:

El CCR con obstrucción intestinal se asocia a un peor pronóstico que las lesiones no obstructivas (43, 279). Varios factores se combinan para ensombrecer el pronóstico:

a).- Sólo alrededor del 50 % de los pacientes son candidatos a cirugía potencialmente curativa.

b).- La cirugía se acompaña de una elevada tasa de morbi-mortalidad y por desgracia, aunque la cirugía sea curativa y el paciente se recupere de la operación, las expectativas de supervivencia a los 5 años rara vez superan el 30%. Parece ser que puede estar relacionado con un mayor flujo linfático a partir del área de carcinoma causando un aumento de la diseminación de las células tumorales. (4)

1.8.- Perforación:

Está claro que el carcinoma perforante de colon y recto comporta un pronóstico sombrío con un índice inapreciable de supervivencia a los 5 años, que puede estar en relación con una siembra de células cancerosas a partir de la perforación en el interior de la cavidad abdominal.(90, 280)

1.9.- Hemorragia como primer síntoma:

Es un síntoma que presenta una mejoría en el pronóstico. Thomas, en un estudio de 267 pacientes con CCR derecho, encuentra un 54% de supervivencia a 5 años en pacientes con hemorragia, 28% en pacientes con obstrucción y 11% en pacientes con perforación (263).

1.10.- Afectación de órganos y tejidos adyacentes:

Suele darse en un 10-20% y empeora el pronóstico. No obstante, en diversas series en las que se han elegido los enfermos a los que se les ha practicado resección en bloque de la tumoración, sin incluir las resecciones paliativas por extensas que fueran, encuentran una supervivencia a los 5 años de un 20-50% (74, 59, 224), quizás debido a que la afectación muchas veces es inflamatoria y no tumoral.

1.11.- Tamaño del tumor primario:

El tamaño del tumor tiene escasa o nula relación con el pronóstico. Un estudio de RS GRINELL (102) sobre 941 piezas, muestra una correlación estadísticamente significativa entre el tamaño del tumor midiendo su diámetro lineal mayor y la frecuencia de metástasis linfáticas. Se estudió sólo en tumores comprendidos entre 1.5 y 6.9 cm; en tumores más grandes (7 a 15.9 cm) el pronóstico mejora si el tamaño aumenta.

1.12.- Morfología del tumor primario:

La configuración del tumor, parece reflejar la naturaleza biológica del mismo. Así, los tumores polipoideos, con una tasa de supervivencia a los 5 años del 83%, hacen protrusión hacia el interior del intestino y tienen escasa tendencia a invadir en profundidad la pared. Los tumores ulcerados, generalmente penetran en la pared intestinal y tiene peor pronóstico, con una supervivencia del 38% a los 5 años (101).

1.13.- Localización del tumor primario:

La mayoría de los autores coinciden en aceptar que el CR tiene peor pronóstico que el cáncer de colon (CC), y en el recto, peor pronóstico mientras

más baja es la lesión. Los tumores por debajo del repliegue peritoneal, no protegidos por la serosa y con mayor dificultad de exéresis quirúrgica, pueden provocar una mayor cantidad de recidivas. Una explicación plausible sería las diferencias en el drenaje linfático. Las lesiones más altas se supone que solo metastatizarían a través del plexo hemorroidal superior, mientras que las lesiones más bajas pueden metastatizar no sólo por esas vías, sino también a través de los linfáticos medios e inferiores. (59)

1.14.- Proporción de la circunferencia de la luz intestinal afectada:

A mayor proporción de luz intestinal afectada, peor pronóstico. Se ha comprobado una mayor frecuencia de metástasis linfática, invasión venosa y disminución de la tasa de supervivencia cuando los tumores eran completamente anulares, en comparación con los que solo lo son parcialmente (100).

1.15.- Transfusiones perioperatorias:

Desde la comunicación de L BURROWS y T TARTTER (31) se ha debatido mucho sobre si la transfusión sanguínea peroperatoria durante la cirugía oncológica puede tener un efecto adverso sobre la recidiva del tumor. En 5.236 casos revisados, se aprecia que la transfusión perioperatoria de sangre se

asocia a un aumento del riesgo de recidiva del CCR y de muerte por neoplasia maligna.(57)

1.16.- Respuesta inmune:

La respuesta inmune del paciente ha sido estudiada a fin de relacionarla con la supervivencia. Es conocido que el desarrollo de cualquier tumor se ve frenado con un respuesta inmune alta del individuo. En el CCR se ha observado que una cifra de linfocitos $<1.000/\text{mm}^3$ se acompaña de una peor supervivencia (30%), mientras que cuando la cifra global es elevada, la supervivencia se incrementa al 60%. En el CCR, y mediante el estudio de subpoblaciones linfocitarias, se ha observado una disminución de los linfocitos T, mientras que los linfocitos B son normales (47).

2.- Datos anatomopatológicos y su influencia en el pronóstico.

2.1.- Ploidía:

Estudios previos indican de una manera uniforme una tendencia de los tumores con un contenido normal de ADN (euploide) a tener mejor pronóstico que las que muestran una composición de ADN anormal (aneuploide). Otros estudios con un número amplio de pacientes (217, 235, 145, 6) han sugerido que

el contenido de ADN tiene una significación pronóstica independiente; sin embargo, algunos autores indican que la importancia pronóstica de la clasificación de Dukes es muy superior a la ploidía del ADN (217, 282). Finalmente, hay quien opina que ésta no tiene relación significativa con la supervivencia en ningún tipo de pacientes (94, 226). Recientemente, el grupo del Prof. A GÓMEZ ALONSO (186) ha estudiado un grupo de 72 pacientes a los que realizó citometría de flujo de las piezas en fresco, valorando el contenido de ADN en las células tumorales (diploide/aneuploide), el índice de ADN y el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular. Concluye exponiendo que ni la ploidía, ni el porcentaje de células en fase G_0/G_1 y G_2/M parecen influir significativamente sobre las tasas de recidivas. Sin embargo, los tumores que tienen más del 15% de células en fase S presentan una tendencia a recidivar significativamente mayor ($p=0.03$) respecto a aquellos que tienen tumores con menos de un 15% de células en fase S.

2.2.- Regiones organizadoras nucleolares:

El valor pronóstico de las regiones organizadoras nucleolares en las células tumorales, está siendo investigado en la actualidad en toda una serie de tumores humanos. Las llamadas regiones organizadoras nucleolares con asas de ADN ribosómico se encuentran en el núcleo y participan directamente de la síntesis proteica y ribosómica (54). Se ha sugerido que el número de regiones organizadoras nucleolares en el núcleo, puede reflejar el estado de la actividad

celular o el potencial de malignidad de una célula (205). K MORAN y cols (183) han indicado que cuanto más alto es el número de regiones organizadoras nucleolares, peor es el pronóstico y mas indiferenciación presenta el tumor, encontrándose el mayor número de dichas regiones en las metástasis hepáticas.

2.3.- Pronóstico según el grado histológico:

Aunque las clasificaciones que se han propuesto para el CCR han sido variadas, todas coinciden en que a peor grado de diferenciación o mayor invasión, según las clasificaciones, hay un peor pronóstico para el paciente.

2.3.1.- Adenocarcinoma mucoide:

La supervivencia de los pacientes con tumores de recto que producen una alta cantidad de moco es reducida, si se compara con los tumores que tienen una escasa producción de éste (259), recogándose una supervivencia a 5 años del 34% en los carcinomas mucoides frente al 53% en los controles. Estos tumores se acompañan de un pronóstico especialmente malo en el recto, con una supervivencia del 18%.

2.3.2.- Adenocarcinoma en anillo de sello:

Se denomina así al tumor en el que la acumulación de grandes cantidades de material mucoide es intracelular. Su presencia implica una supervivencia mínima ya que su comportamiento biológico es parecido al de los tumores poco diferenciados (47)

2.3.3.- Carcinoma escirro:

El diagnóstico histológico de carcinoma escirro del intestino grueso cursa con un pronóstico bastante malo, con una supervivencia escasa, del 18% (288).

2.4.- Penetración en la pared intestinal:

El riesgo de recidiva local después de resección curativa está relacionado con la extensión de la enfermedad más allá de la pared intestinal y de la afectación ganglionar (104, 224). La recidiva local en pacientes con afectación ganglionar pero con tumor confinado a la pared (C1) es un 25% menos frecuente que en el grupo sin afectación ganglionar pero con extensión del tumor a través de la pared intestinal (B2), donde el riesgo de recidiva es del 35%. El grupo que tiene afectación ganglionar y extensión a través de la pared (C2)

muestra un riesgo adicional de recidiva local que varía entre el 50 y 65 % en las series clínicas y hasta un 70% en las series de reoperaciones.

Así pues, el grado de penetración del tumor en la pared es importante, ya que es rara la propagación linfática sin que se haya atravesado la pared. Diversos autores propugnan que la penetración y la extensión en la pared intestinal, se asocia con peor pronóstico, independientemente de los ganglios afectados (10, 49).

2.5.- Afectación de los ganglios linfáticos:

Es una de las variables pronósticas más importante en el CCR. A medida que aumenta el número de ganglios, disminuye la supervivencia (49).

2.6.- Invasión linfática:

Sprat (251), ha recogido una supervivencia a 5 años del 20% cuando existe invasión linfática y del 47% en su ausencia. Pero no hay pruebas de que la invasión linfática sea por sí misma una variable independiente.

2.7.- Margen distal de resección:

Hasta hace pocos años, la mayoría de los autores ha recomendado la Amputación Abdomino Perineal (AAA) cuando el margen de seguridad era inferior a 5 cm (76, 49). Sin embargo, estudios de SM WILSON (283) no encontraron relación entre el margen de resección pequeño y un peor pronóstico. Un trabajo reciente del St Marks Hospital apoya lo adecuado de una resección del margen distal más pequeño (2 cm) en el cáncer rectal, sobre todo desde que se conoce que la Radioterapia postoperatoria puede alterar también la importancia pronóstica de un margen de resección más pequeño (208).

2.8.- Invasión venosa:

No hay duda de que la invasión venosa en la pieza conlleva una mayor frecuencia de metástasis por vía hematógena y menor supervivencia. Esta invasión aumenta a medida que el tumor es más indiferenciado. Recientemente, N KHANKHANIAN ha sugerido que la invasión venosa no es en sí misma una variable independiente ya que los pacientes con estadio B presentaban prácticamente la misma supervivencia tuvieran o no infiltración venosa (129). Parece ser que la invasión de los vasos murales no tiene aparentemente un significado pronóstico, mientras que la invasión de 2 venas extramurales, si la tiene.

2.9.- Invasión perineural:

PH SEEFELD (239) ha hallado recidivas locales en el 81.2% de los enfermos con invasión perineural en contra de un 34% en los pacientes sin invasión.

2.10.- Respuesta inflamatoria alrededor del tumor primario:

JS SPRATT (251) ha comprobado en 802 cánceres que la total ausencia de inflamación en el margen tumoral se asocia con peor pronóstico, con una supervivencia del 20%. Una respuesta inflamatoria moderada se asocia con una supervivencia del 36% y una respuesta intensa con formación de absceso, del 41% a los 5 años.

2.11.- Histología de los ganglios linfáticos:

Estudios recientes han puesto de manifiesto que la histiocitosis sinusal y la actividad inmunoblástica cortical de los ganglios linfáticos peritumorales, se asocian con una supervivencia significativamente mejor. Sin embargo, la presencia o ausencia de actividad germinal central no parece asociarse con una mejoría en la supervivencia (204). En la tabla 1 se registran los factores pronósticos de forma sucinta.

Tabla 1
Características clínicas del cáncer colorrectal
y su efecto en el pronóstico

Características clínicas	Efectos en el pronóstico
Diagnóstico en pacientes asintomáticos	Mejoría
Duración total de síntomas	Sin efecto, posible mejoría
Edad, <30 años	Disminución
Edad, >70 años	Mejoría
CEA preoperatorio > 5 ng/ml < 5 ng/ml Menor de 5 ng/ml (tumor escasamente diferenciado)	Disminución Mejoría No evaluable
Obstrucción	Disminución
Perforación libre	Marcada disminución
Perforación localizada con la formación de abscesos	Disminución
Hemorragia como síntoma	Mejoría
Padecimientos de órganos adyacentes	Disminución
Formación de fistulas	Disminución
Tamaño del tumor primario	Sin efecto
Configuración del tumor primario Ulcerado Polipoideo	Disminución Mejoría
Localización del tumor primario Recto Recto debajo de la flexión	Disminución Disminución
Padecimiento del lumen intestinal circunferencial	Disminución

3.- Oncogenes:

Gracias al desarrollo en los últimos años de las técnicas de purificación y secuenciación de ácidos nucleicos, se ha descubierto la existencia de genes capaces de inducir la transformación de líneas celulares en cultivo y tumores en animales. Todo ello hace que en un futuro no muy lejano, la aplicación de estas determinaciones cromosómicas en la mucosa del colon, valgan para predeterminar aquellos pacientes que vayan a desarrollar a lo largo de su vida un carcinoma.

De estas investigaciones ha surgido el concepto de **oncogenes** o genes celulares que adquieren el potencial de transformación mediante alteraciones en su estructura, modificaciones en la regulación de su expresión o variaciones en la función de la proteína por la que codifican. Estas proteínas citoplasmáticas y superficiales anormales, pero funcionalmente activas, escapan a los mecanismos reguladores antineoplásicos. Actualmente se estudian con intensidad los mecanismos por los que se produce la activación de genes normales o **protooncogenes**, convirtiéndose en genes transformantes u **oncogenes**. Una luz a la esperanza ha quedado abierta recientemente con el descubrimiento de genes necesarios para la regulación negativa del crecimiento celular y cuya pérdida conlleva también a la transformación tumoral. En determinadas circunstancias son capaces de revertir la transformación mediada por oncogenes.

Con el reconocimiento de que el gen responsable del retinoblastoma (Rb) era un miembro de la familia de los genes supresores, empezó otra carrera para clonar nuevos genes. El gen Rb manifiesta su efecto tumorogénico cuando se pierde su función. Esta es una característica diferencial de estos genes supresores respecto a los oncogenes anteriormente expuestos. El gen Rb fue localizado en el cromosoma 13 (82). En la mayoría de los retinoblastomas el gen estaba ausente completa o parcialmente. En otros casos el gen estaba presente, pero los análisis moleculares revelaron mutaciones puntuales que hacían que se produjera una proteína aberrante. Introduciendo una copia del gen normal mediante un vector en el interior de una célula transformada se pueden revertir las propiedades de crecimiento, volviendo la célula a la normalidad, evidenciando que el gen clonado tiene actividad de gen supresor de tumoración.

Son éstos los denominados genes supresores o también mal denominados **antioncogenes**, término acuñado por AG KNUDSON Jr (138). Son genes que en condiciones normales transmiten continuamente señales de carácter negativo sobre la proliferación celular y cuya inactivación provoca, por defecto, divisiones descontroladas. Los oncogenes se comportarían en la célula a modo de "aceleradores" de la proliferación, mientras que los oncosupresores serían los "frenos". Los fallos de unos y otros pueden ser catastróficos para la buena marcha celular. La identificación de varios oncosupresores se ha llevado a cabo estudiando la pérdida de uno de los alelos, exclusivamente en el tejido tumoral, de individuos

heterocigóticos, para marcadores genéticos diversos. Estas pérdidas alélicas se han interpretado como evidencia de que la región ausente contiene un oncosupresor, cuya eliminación predispone a la neoplasia. En muchos casos, el alelo que no se pierde contiene una mutación, con lo que la falta total de función normal del gen es lo que contribuye al desarrollo tumoral. La deleción completa del material cromosómico que contiene reguladores negativos, al parecer, contribuye a que surja un CCR (128, 255). La pérdida de la función represora activa permite la reexpresión de otros oncogenes.

El gen **p53** es uno de los oncosupresores que con mayor frecuencia se encuentra alterado en una gran variedad de cánceres humanos. Su identificación como oncosupresor se debió a la observación de que numerosos astrocitomas, cánceres de mama, colon y pulmón, presentaban una deleción y por tanto pérdida de heterocigosidad en la banda 13 del brazo pequeño de uno de los cromosomas 17 (17p13), deduciéndose que esta región contenía el gen p53 (123). Aparecen deleciones 17p en 6-25% de los adenomas de colon, y en 75% de los carcinomas (13). La confirmación del carácter antioncogénico se dedujo de los resultados de la transfección de células tumorales con el gen p53 de tipo salvaje. La expresión elevada de la proteína normal origina no solo el retroceso total en cuanto a la proliferación celular sino también la inhibición de la transformación originada por oncogenes como *ras* o formas mutadas de p53.

Este gen codifica una fosfoproteína nuclear de 393 Aa y un peso molecular de 53 kD que controla el paso de la fase G1 a S. Se cree que tras la unión de dicha proteína a un receptor nuclear específico, se activa la expresión de genes que inhiben la replicación de ADN, manteniendo a la célula en fase de reposo (271). La proteína codificada por el gen que ha sufrido una mutación, posee una secuencia de aminoácidos diferente, una conformación alterada, y es inactiva fundamentalmente (214). La proteína mutante no es capaz de bloquear la progresión del ciclo celular, por lo que se ven favorecidos los procesos de progresión e invasión tumoral (128). Hay una sobreexpresión de la proteína p53 en el 40-50% de los carcinomas de colon, relacionado con el grado de displasia y la localización, siendo más elevada la expresión en el colon distal y recto (67). Estos autores afirman que la sobreexpresión de p53 es más frecuente en tumores de recto y en tumores con invasión vascular e identifica a un grupo de pacientes de alto riesgo, con menor supervivencia y mayor probabilidad de recidivar. En estudios experimentales, la transferencia génica o transfección, que restaura la función perdida de p53, suprime la transformación en líneas celulares en cultivo.

Casi con la misma frecuencia aparecen deleciones del brazo largo (q) del cromosoma 18, región q21 (18q21) en carcinomas de colon, pero no en adenomas. La caracterización de esta región ha permitido identificar una unidad de transcripción cuya pérdida o mutación se asocia con el paso de adenoma a carcinoma. El gen, denominado *dcc* se pierde o se expresa a niveles muy

reducidos, no sólo en los carcinomas de colon, sino también en carcinomas gástricos, pancreáticos, de esófago y próstata. Su producto, (Dcc), tiene la estructura de un receptor de la membrana celular externa con un dominio extracelular muy largo, una región transmural y un dominio intracelular (78). La pérdida del locus *dcc* pudiera explicar todos los cambios de antígeno superficial descritos en las células del cáncer colorrectal. Se ha observado que 88% de los carcinomas de colon muestran una disminución significativa o ausencia completa de expresión Dcc (77).

En la figura 1, realizamos un resumen de las frecuencias de las deleciones cromosómicas halladas hasta ahora en los adenomas, pólipos malignos y carcinomas colorrectales.

DELECCIONES CROMOSOMICAS

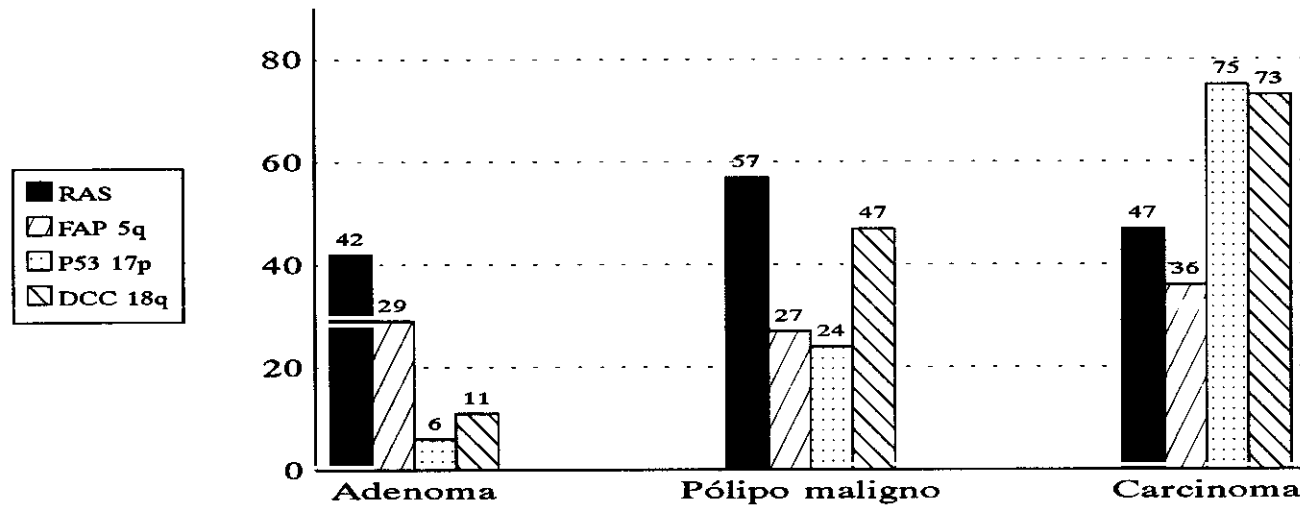


Fig 1: El modelo multifásico en la carcinogénesis colorrectal ha sido reforzado por datos de defectos genéticos que se acumulan, con progresión en la secuencia pólipo/cáncer. La activación del oncogén ras parece ser un fenómeno temprano, al que sigue un incremento progresivo en la aparición de deleciones 18q y 17p, con un fenotipo totalmente maligno. 90% de las células contienen como mínimo 2 cromosomas anormales. Se han identificado otras muchas deleciones. Sin embargo, las que se muestran parecen ser las más importantes.

1.3).-FACTORES DE RIESGO

FACTORES DE RIESGO:

A la vista a los detalles anteriormente expuestos, está claro que no disponemos de ningún tipo de dato que nos permita realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad. No obstante, sí hay un grupo de pacientes con un riesgo elevado sobre la población normal a padecer la enfermedad. Estos pacientes son los que vamos a considerar a continuación.

Una cuestión importante es el origen del tumor primitivo. ¿La mayor parte de las neoplasias se inician en pólipos benignos o bien se inician de novo a partir de la mucosa normal del colon?. ¿Quizás ocurren ambos procesos?. Si todos los cánceres se inician con el transcurso de los años sobre una lesión benigna, entonces es posible que una prueba específica para diagnosticar esta lesión podría eliminar virtualmente la enfermedad. Históricamente muchos clínicos y patólogos han admitido que el CCR se origina a partir de un pólipo benigno. Es difícil realizar la prueba de dejar evolucionar los pólipos para ver la certeza del hecho, ya que puede haber pólipos ya malignizados pero en los que la biopsia no ha llegado a la zona tumoral, por lo que es necesaria la exéresis completa del mismo.

Los argumentos a favor de la transformación de adenoma a carcinoma, son:

* En pequeños cánceres, menores de 5 mm, se observa frecuentemente tejido adenomatoso residual (265).

* Los pacientes que están libres de pólipos están libres de cáncer (88).

* Pequeños focos de cáncer intramucoso se observan a menudo en pólipos, pero son extremadamente raros en mucosa normal (137).

* Es infrecuente hallar cánceres diminutos; en cambio, son frecuentes los pequeños adenomas (150).

* Algunos pólipos adenomatosos aparentemente benignos presentan el desarrollo de un cáncer en su interior (188).

* Existe un aumento de la incidencia de cáncer al aumentar el número de los pólipos (188).

* No existen criterios mediante los cuales los pólipos adenomatosos puedan ser clasificados como una entidad biológica diferente de los adenomas vellosos, lesión con potencial maligno definido (84).

* La transición pólipo adenomatoso-cáncer ha sido observada en la poliposis rectocólica familiar (32).

* La transición pólipo adenomatoso-cáncer a partir de un estado precanceroso a neoplasia invasiva se observa en animales administrando carcinógenos para el intestino grueso (154).

* El pico de edad en el cual los pólipos son diagnosticados, precede en 5 años al del cáncer (188).

* Hay una distribución similar del cáncer y de los pólipos en el intestino grueso (27).

En contra de estas opiniones se hallan las de JS SPRAT (250), que no encuentra ningún tejido semejante a un pólipo en 353 carcinomas de colon estudiados. JS SPRAT y LV ACKERMAN (249) estudiaron 20 cánceres de colon y recto de 2 cm o menos de diámetro mediante cortes seriados, pensando que en estas pequeñas lesiones sería más fácil encontrar restos de tejido adenomatoso. No se halló ningún resto de pólipo adenomatoso.

Más del 30% de adenomas de intestino grueso contienen áreas de neoplasia invasiva "in situ"; además, la incidencia de cambios malignos aumenta con el tamaño del pólipo (103).

CH FUNG y H GOLDMAN, en una revisión de la experiencia de 11 años sobre lesiones polipoideas del St Marks Hospital, muestran que hay una mayor incidencia de cáncer en los pólipos que aumentan de tamaño. Los pólipos adenomatosos por debajo de 1 cm tienen un 1% de incidencia de enfermedad neoplásica; los de 1 a 2 cm, un 10% y por encima de 2 cm, un 37,4% (84).

En resumen, hay sólidas pruebas de la transición de los pólipos adenomatosos a cáncer. Es cierto que no todos los pólipos degeneran en un cáncer, pero parece que cuanto más crecen y más tiempo estén sin extirparse, más probabilidades hay de que cambien a un cáncer.

B VOLGESTEIN y cols, en 1988 , propusieron un modelo de carcinogénesis rectal mediante el cual se deben producir una serie de alteraciones genéticas sucesivas e independientes para desencadenar el cáncer colorrectal (272). La acumulación e interacción de las múltiples alteraciones genéticas determinan el fenotipo y comportamiento clínico de las células tumorales, de forma que con las primeras alteraciones se forma el adenoma y a medida que se van sucediendo otras alteraciones aparece el carcinoma, con diferente grado de agresividad según

sus características genéticas. Este modelo surgió tras la observación de que el 90% de los carcinomas colorrectales contienen dos o más alteraciones genéticas, siendo menor del 10% aquellos tumores que solo tienen una (106).

El modelo propuesto implica tanto alteraciones de oncogenes como de genes supresores de tumoración, pudiendo tratarse de mutaciones, deleciones o metilaciones, mediante las cuales se produce una ausencia de la regulación de la división celular.

El esquema propuesto para la carcinogénesis colorrectal según la progresión de mucosa sana a carcinoma comienza por una mutación de los genes supresores de tumoración APC y/o MCC, dando lugar a la formación de un adenoma. Cuando esta alteración se produce en la línea germinal, la heredan los descendientes que desarrollarán una mucosa hiperproliferativa produciéndose la poliposis familiar. Tras la formación del adenoma se produce otra alteración de un oncogén (k-ras), que contribuye a la progresión del adenoma. Alteraciones en genes localizados en los cromosomas 17 y 18 confieren características más invasivas produciéndose el carcinoma. Otras alteraciones genéticas posteriores aumentan la agresividad tumoral, apareciendo el carcinoma metastásico.

En la figura 2 se resume el conocimiento actual en cuanto a la transformación del adenoma benigno a carcinoma.

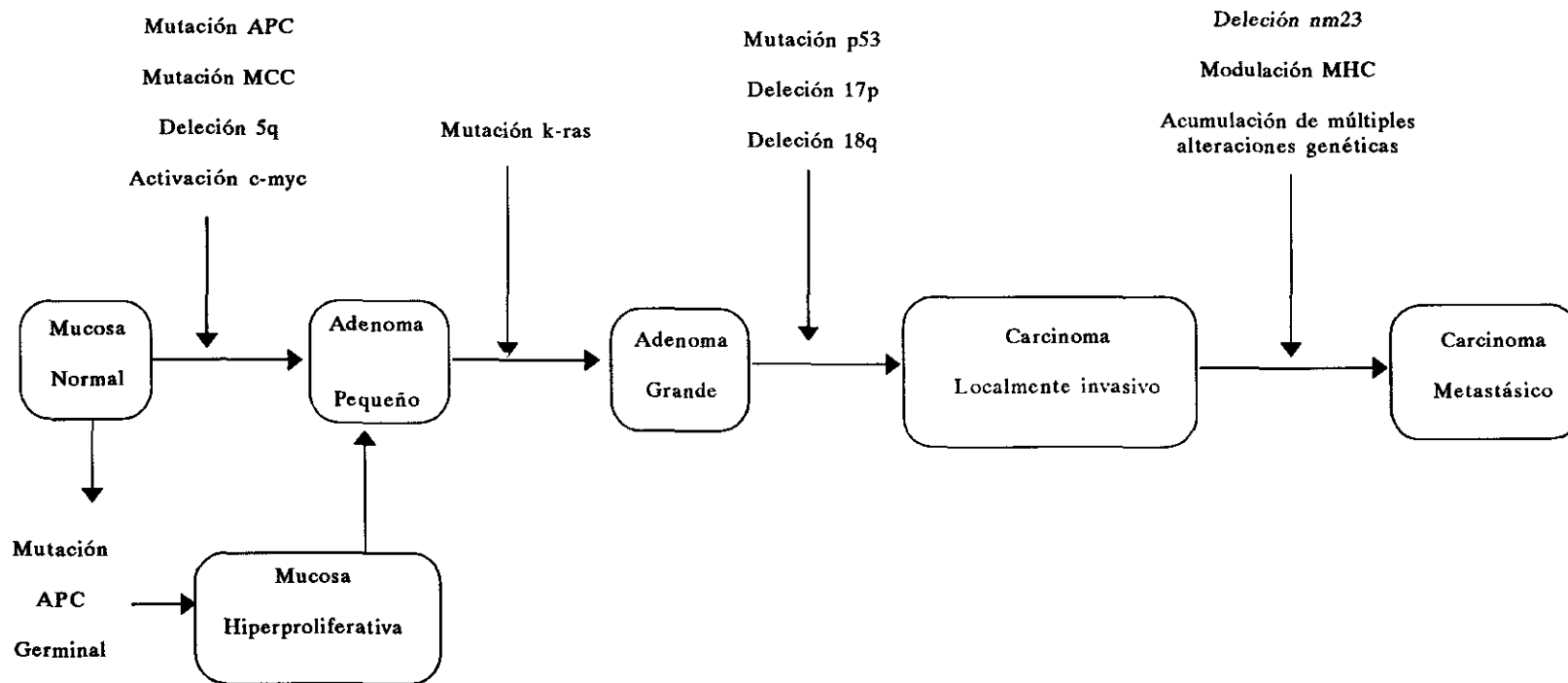


Fig 2: Esquema de la secuencia adenoma-carcinoma.

La gran pregunta que cabe hacerse ahora es: ¿Con qué frecuencia se desarrolla un cáncer sobre un pólipo benigno?.

En los enfermos con adenomas y carcinomas de colon existen alteraciones bien definidas de la mucosa. En los sujetos normales, la zona de síntesis del DNA y proliferación celular se encuentra en la base de las criptas colónicas, mientras que en los enfermos que presentan adenomas y carcinomas, las células de la mucosa siguen proliferando hasta el vértice de las criptas. Esta anomalía de la proliferación y maduración celular se observa también en la mucosa de enfermos pertenecientes a familias con alta incidencia de CCR.

En cuanto a la capacidad de malignización de los distintos tipos de pólipos, T MUTO y HJR BUSSEY hallaron "inequívocas pruebas de invasión" en el 5% de los pólipos adenomatosos, en el 22% de los de tipo intermedio y en el 40% de los vellosos (188). Por tanto, aunque las lesiones vellosas son mucho menos comunes (10% del total de adenomas), es mucho más probable que contengan neoplasia invasiva.

GRUPOS DE ALTO RIESGO DE CÁNCER COLORRECTAL

1.- Edad mayor de 40 años:

El riesgo, igual entre hombres y mujeres, empieza a ser significativo entre los 40 y 45 años. Generalmente hay un aumento del doble en cada década hasta un pico que se alcanza a los 75 años (28).

2.- Colectomía y CCR:

Muchos estudios sugieren la asociación de colectomía y CCR. LNA LINOS y cols (153) siguieron a 1.681 pacientes colectomizados y encontraron un riesgo relativo aumentado del 1.7% siendo en la mujer del 2.1%. Incluso se han descrito riesgos más elevados para el carcinoma de colon derecho en la mujeres de hasta el 3.5% (181) y del 4.5% para las lesiones sigmoideas. Incluso los sujetos que son tratados con medicamentos que promueven la excreción de colesterol por las heces presentan mayor incidencia de CCR (1).

3.- Cáncer colorrectal y enfermedades inflamatorias asociadas:

Los pacientes con enteropatías inflamatorias presentan un mayor riesgo de padecer cáncer colorrectal, sobre todo si presentan colitis ulcerosa. Esta frecuencia se eleva bruscamente a partir de la primera década de la enfermedad

y luego aumenta un 20% por cada década. Suele ser infiltrativo, anaplásico y multifocal, y metastatiza precozmente (151).

3.1.- Colitis ulcerosa: El riesgo de transformación maligna es mayor cuando la enfermedad se inicia en la infancia. Si el paciente ha presentado síntomas durante más de 10 años, afecta a todo el colon y es de tipo grave, el riesgo de cáncer rectal es de 5 a 11 veces mayor (185).

3.2.- Colitis granulomatosa: Los enfermos que presentan enfermedad de Crohn que se produce antes de los 21 años, tienen un riesgo 20 veces mayor para padecer cáncer colorrectal (276).

4.- Historia:

4.1.- Adenomas colorrectales: La frecuencia de carcinomas en pacientes con adenomas en colon es el doble de los esperado en individuos normales (213). Aproximadamente en un 30% de los casos, el propio pólipo fue el lugar de transformación maligna.

4.2.- Cáncer colorrectal: Los pacientes con CCR previo deben considerarse de alto riesgo para un subsiguiente cáncer de intestino grueso, aunque

una parte importante de su órgano se haya extirpado con el primer cáncer. La posibilidad es casi del triple de la población general (238).

4.3.- Cáncer genital femenino o de mama: Estas mujeres tienen un riesgo aumentado de padecer CCR, aunque no se sabe si entran dentro del "síndrome familiar del cáncer" (174).

4.4.- Radioterapia por cáncer de cérvix: En los estudios que encuentran una relación entre la radioterapia previa por cáncer de cérvix y CCR (40), no hay datos que recojan la incidencia total de cáncer rectosigmoide en pacientes con irradiación pélvica, por lo que hay que realizar más estudios sobre este problema.

5.- Síndromes familiares y herencia:

5.1.- Síndromes de poliposis familiar: Esta enfermedad, caracterizada por innumerable pólipos en el colon, se hereda con carácter autosómico dominante con una penetrancia del 90%. A la edad de 37 años, casi el 50% desarrollará carcinoma. Antaño, 2/3 de los pacientes a los que se les diagnosticaba poliposis, también tenían pruebas positivas para el cáncer. En los grupos familiares controlados escrupulosamente, se ha reducido a un 9% (160).

En los pacientes con poliposis familiar se ha encontrado un gen, el *pac*, que se ha localizado en el locus 5q21 (199). La herencia de un alelo no funcional se asocia con la aparición de múltiples pólipos en el colon (adenomas) en la segunda y tercera décadas de la vida, que más tarde pueden convertirse en carcinomas. También se ha encontrado alterado en adenomas y carcinomas esporádicos del colon (123). El análisis molecular parece indicar que es preciso inactivar totalmente el locus para que se desencadene el paso de adenoma (benigno) a carcinoma (maligno).

El gen *pac* contiene una pauta de lectura abierta de 8.5 kb originando una proteína de unos 300 kd y localización citoplasmática. Aunque la función no es conocida, se sabe que en el extremo amino se encuentra el dominio responsable de la oligomerización de los monómeros y que las formas mutadas son capaces de unirse a las de tipo salvaje, por lo que es muy posible que los heterodímeros normal/mutante, sean inactivos (257).

Otras poliposis son el Síndrome de Gardner, el de Peutz Jeghers, el síndrome de Oldfield, el de Turcot, etc. Hay pruebas de que el defecto genético en los síndromes de poliposis, no se limita al desarrollo de adenomas (156). Las células epiteliales a lo largo del colon pierden su capacidad de control de la síntesis de ADN y las células epidérmicas cutáneas, parecen ser también anómalas.

5.2.- Antecedentes familiares de cáncer colorrectal: El cáncer de colon muestra una agregación familiar moderada (176). Esta predisposición familiar no es debida a causas genéticas sino que parece tener mayor relación con fenómenos ambientales. Pacientes con familiares cercanos con CCR tienen 2-4 veces más posibilidad de padecer el mismo tipo de cáncer (147). Los riesgos son (120):

Riesgos de población.....	1-50
1 familiar afectado.....	1-17
1 de primer grado y 1 de 2º.....	1-12
1 familiar < 45 años.....	1-10
2 familiares primer grado.....	1-6
Antecedentes familiares dominantes.....	1-2

Pudo observarse que el hecho de tener un solo familiar con CCR aumenta la posibilidad de presentar una enfermedad maligna hasta un nivel en el que está indicado un screening intensivo.

Parece probable que la mayor tasa de incidencia y de mortalidad por CCR observada en los familiares de pacientes con esta enfermedad, se deban a una mayor prevalencia de adenomas, más que a una secuencia más agresiva de adenoma-carcinoma en estos individuos. La sigmoidoscopia rígida reveló un 45%

de adenomas en los familiares y un 5% en los cónyuges (72). En la tabla 2 se recogen los grupos de alto riesgo en el CCR.

5.3.- Cáncer colorrectal hereditario: El síndrome del CCR hereditario no polipoideo, o Síndrome de Lynch, indica el diagnóstico de casos de CCR en una familia, siguiendo un patrón de herencia de tipo autosómico dominante y la ausencia de poliposis difusa.

Se caracteriza por una media de edad baja (41 años) para la incidencia del CCR, la presencia de CCR sincrónico o metacrónico y una proporción aumentada del tumor en el colon proximal. Estas características son propias del síndrome de Lynch tipo I, y las asociaciones con otras neoplasias, sobre todo del área ginecológica, constituye el llamado Síndrome de Lynch tipo II. Sólo el 35% se dio por debajo del sigma. (163, 164). Con la excepción del síndrome de Muir-Torre, una variante del cáncer colorrectal no polipósico hereditario (HNPCC), en el que los tumores de las glándulas sebáceas actúan como marcadores visibles (45), no hay características fenotípicas específicas para llamar la atención del médico hacia la presentación de un HNPCC. La historia familiar es, por tanto, la piedra angular para llegar al diagnóstico. La frecuencia de aparición de cánceres sincrónicos o metacrónicos es del 18.1% y 24.2% (165) es distinta, con un 72.3% en el colon derecho y un 25% en rectosigma (162) en

Tabla 2

GRUPOS DE ALTO RIESGO DE CÁNCER COLORRECTAL

Edad:

Más de 40 años en hombres y mujeres asintomáticos.

Enfermedad asociada:

Colitis ulcerosa

Colitis granulomatosa

Antecedentes personales:

Adenomas colorrectales

Cáncer colorrectal

Cáncer genital femenino

Cáncer de mama femenino

Antecedentes familiares:

Poliposis familiar

Síndrome de Gardner

Síndrome de Turcot (Tumores del SNC)

Síndrome de Oldfield (Quistes sebáceos abundantes)

Cáncer colorrectal

Pólipos colorrectales

Síndrome de cáncer familiar

Poliposis gastrointestinal juvenil generalizada

contra de un 23% en derecho y un 76% en rectosigma en los esporádicos. NR HALL (109) recomienda el estudio con colonoscopia para todos los familiares próximos a parientes jóvenes con CCR. En la tabla 3 se describen los criterios de aplicación para evaluar la contribución de la susceptibilidad al cáncer, heredada con carácter dominante.

5.4.- Síndrome de cáncer familiar: En estas familias hay un riesgo aumentado de adenocarcinomas de todo tipo con predominio especial de carcinomas de colon y endometrio (69). La herencia es autosómica dominante.

5.5.- Poliposis familiar juvenil: RC HAGGIT describió a 2 pacientes con poliposis juvenil de colon y antecedentes de familiares con cáncer de colon en edad temprana (108). No son típicas poliposis ya que los pólipos no eran suficientemente numerosos y además no eran adenomas sino pólipos juveniles.

6.- CCR asociado a anomalías congénitas de las vías urinarias.

La asociación de anomalías congénitas renales con el CCR se observó por primera vez en los antecedentes familiares de 2 pacientes con una duplicidad del sistema colector pielocalicial y un ureterocele ectópico (11). Esta asociación, motivó 2 revisiones: una, de 14 pacientes con CCR antes de los 45 años, de los que 3 presentaban anomalías de las vías urinarias diagnosticadas con

anterioridad. En la otra, se estudiaron 29 familias que acudían al seguimiento de patologías urológicas congénitas.

Tabla 3

Criterios de aplicación para evaluar la contribución de la susceptibilidad al cáncer, heredada con carácter dominante.

Criterios de Amsterdam.

- * Cáncer colorrectal confirmado histológicamente en tres familiares, uno de ellos, de primer grado con respecto a los restantes.
- * Un CCR diagnosticado antes de los 50 años.
- * Afectación de dos o más generaciones.
- * Descartada la presencia de FAP

Criterios menos estrictos para HNPCC

- * Tres o más tumores asociados en dos o más individuos estrechamente relacionados.
- * CCR en dos familiares de primer grado.
- * Un CCR diagnosticado antes de los 40 años.
- * Confirmación de los diagnósticos.
- * Compatibilidad con herencia dominante, descartada la presencia de FAP

Más un criterio, como mínimo, de los siguientes:

- * Un tercer cáncer colorrectal.
- * Cáncer endometrial, cáncer del intestino delgado o cáncer uretral.
- * Aparición temprana (edad inferior a los 50 años) de carcinoma ovárico, gástrico, vesical o hepatobiliar.
- * Un tercer familiar de edad inferior a 45 años con un adenoma o pólipo significativo (≥ 1 cm, túbulo vellosos o vellosos, o una displasia grave) a cualquier edad.

1.4).- MARCADORES TUMORALES

MARCADORES TUMORALES:

Un tumor maligno puede caracterizarse como una población celular que aumenta de forma continua. Este aumento puede no ser regular, rápido o eficiente, pero se produce hasta el fallecimiento del huésped.

Los estudios sobre el cáncer lo consideran como una enfermedad hística integrada por células que se han hecho hasta cierto punto independientes de los mecanismos del huésped que realizan el control del crecimiento en condiciones normales.

1.- ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMORES.

Los antígenos son estructuras químicas que pueden ser reconocidas por una respuesta inmune humoral o celular. Un factor que distingue la inmunología tumoral de otras muchas áreas de la investigación inmunológica, es que el huésped portador del tumor debe de enfrentarse a una fuente de antígenos en constante expansión. Conforme crece el tumor, crece la cantidad total de antígenos asociados al mismo, y sin embargo, si el tumor responde al tratamiento, disminuye el aflujo de dichos antígenos. Por consiguiente, los antígenos asociados a tumores, proporcionan valiosos datos de la masa tumoral. Un requisito para que un marcador sea de utilidad, es que se vierta a un compartimiento donde pueda

demostrarse fácilmente. Los antígenos asociados a tumores pueden verse en cantidades importantes a la sangre y su concentración en la misma depende de varias circunstancias:

- 1.- Número de células productoras, y por ello, mayor concentración en la enfermedad diseminada.
- 2.- Vascularización tumoral (a mayor vascularización tumoral, mayor facilidad para pasar el marcador al torrente circulatorio)
- 3.- Metabolismo del marcador; es importante conocer los tejidos o estirpes celulares asociadas a su síntesis o degradación, que patologías benignas de estos tejidos pueden cursar con elevación de un marcador, pues descartarlas es aumentar la especificidad y sensibilidad del mismo en todos sus aspectos de uso clínico, y conocer las vías de eliminación, urinaria o biliar, que pueden explicar la elevación de un determinado marcador en casos de insuficiencia renal o ictericias obstructivas.

- 4.- Vida media plasmática que varía claramente de un marcador a otro, de unas horas a varios días, lo que es útil para valorar la respuesta al tratamiento .
- 5.- Biología tumoral, como la velocidad de crecimiento, el grado de diferenciación, el recambio celular, la necrosis tumoral, etc. **(210)**

En teoría, un antígeno citoplasmático o nuclear, puede proporcionar un marcador sérico tan útil como un antígeno de la superficie celular para la detección o monitorización de un cáncer humano, siempre que se liberen los determinantes intracelulares a partir del tumor necrótico. En algunos tumores, la expresión del antígeno varía en relación a las diferentes fases del ciclo celular y, en otras, depende de la proximidad de las células tumorales a los vasos sanguíneos **(110)**. En la tabla 4 se resumen las aplicaciones de los marcadores tumorales.

2.- ANTÍGENOS ONCOFETALES:

Estos antígenos se expresan durante el desarrollo embrionario. Su síntesis queda generalmente reprimida durante la vida adulta pero pueden reexpresarse en tejidos que se están regenerando o en neoplasias. Por lo menos 3 han demostrado ser marcadores útiles en la monitorización del crecimiento

Tabla 4

Aplicaciones de los marcadores tumorales.

Aplicación	Objetivo
<i>Detección</i>	<i>Screening</i> en personas asintomáticas.
<i>Diagnóstico</i>	Diferenciar condiciones benignas o malignas
<i>Monitorización</i>	Objetivar el efecto de la terapéutica y detectar las recidivas tumorales.
<i>Clasificación</i>	Escoger el tratamiento y predecir el comportamiento tumoral (pronóstico)
<i>Clasificación</i>	Definir la extensión de la enfermedad en estadíos
<i>Localización</i>	Detectar gammagráficamente anticuerpos radiactivos inyectados.
<i>Tratamiento</i>	Dirigir los agentes citotóxicos hacia las células que contienen marcador.

de diferentes tumores: Antígeno Carcinoembrionario (CEA) (292), Alfa-fetoproteína (AFP) (175) y Proteína de la enfermedad macrocística (GCDP) (107).

Las moléculas propuestas como marcadores deben ser primero evaluadas en cuanto a frecuencia en pacientes con y sin cáncer, para determinar su sensibilidad y especificidad. La *sensibilidad* se refiere a la proporción de pacientes con un determinado tumor que presenta elevación del marcador. El valor de la sensibilidad en porcentajes se refleja en el cociente entre el número de pacientes con el marcador elevado y con determinada neoplasia (verdaderos positivos) dividido por el número total de pacientes con el marcador elevado (verdaderos positivos) y pacientes con el cáncer y marcador normal (falsos negativos) multiplicado por 100 (184). La *especificidad* define la proporción de pacientes sin cáncer que muestran la prueba negativa o normal (166). El valor de la especificidad en porcentajes se calcula mediante el cociente entre el número de individuos sin el determinado tumor con marcador normal (verdaderos negativos) dividido por la suma entre estos pacientes y los individuos con marcador elevado sin el tumor (falsos positivos) multiplicado por 100. Cuanto mayores sean estos valores, mayor serán la sensibilidad y la especificidad. Por ello, la presencia de un marcador tumoral elevado debe aumentar la sospecha de que estamos ante un cáncer, pero de ningún modo utilizarse como única prueba diagnóstica.

Las aplicaciones de los marcadores tumorales van siendo cada vez más extensas. Un objetivo más realista al utilizar los marcadores tumorales es encontrar marcadores que se asocien a condiciones que predispongan a la aparición de un cáncer, tales como anormalidades genéticas (291) o exposición a agentes mutágenos (194). La posibilidad de identificar a los individuos que presentan alto riesgo de desarrollar un tipo concreto de neoplasia permitiría diseñar estudios prospectivos de terapéutica precoz o preventivos y también proporcionaría una mejor idea de los estadios y desarrollo del cáncer en el ser humano.

Los marcadores también pueden dar una idea sobre el estadio tumoral y la presencia de metástasis microscópicas (61). Pero la aplicación más rentable de los marcadores, es comprobar la efectividad o no de un tratamiento. El poder detectar la recidiva de algunos tumores, permite iniciar la terapéutica, incluso con cirugía exploratoria y resección, semanas e incluso meses antes de que haya pruebas clínicas de aquélla (171, 26).

Los niveles del marcador se deberían determinar a intervalos que coincidan con el tiempo aproximado de duplicación tumoral durante los períodos en que se sospeche que el crecimiento tumoral está en la fase exponencial, tales como el inicio de la recidiva o cuando aparecen metástasis de crecimiento rápido (215). Cuando hay una destrucción celular tumoral o una resección quirúrgica, las concentraciones de marcadores deberían de disminuir a un ritmo que se

aproxime al tiempo de vida media biológica, si se han extraído todas las células y a un ritmo más lento si solo lo han sido una parte de ellas. Tiene más interés valorar los cambios en la concentración del marcador que sus valores absolutos. Así, las variaciones inesperadas en las concentraciones de un marcador, indican la conveniencia de acortar los intervalos en su determinación, pues pueden ser indicio de un cambio en la actividad clínica del tumor.

3.- MARCADORES HUMORALES EN EL CCR

3.1.- CEA:

Es el marcador más utilizado. Se describió por primera vez en 1965 por P GOLD y SO FREEDMAN (95) como un antígeno específico de los adenocarcinomas del aparato digestivo, también presente en los tejidos endodérmicos embrionarios durante los 2 primeros trimestres de gestación (266). Cuando se dispuso del radioinmunoensayo para su determinación, se pudo comprobar que también estaba aumentado en varias enfermedades no malignas e incluso en pacientes sin enfermedad aparente (159). El CEA es una glucoproteína de aproximadamente 180.000 Daltons. Se sintetiza en las células epiteliales columnares, se concentra en el glicocalix del borde luminal y finalmente se libera al tubo digestivo o a otros líquidos corporales (93, 273). Los valores del CEA en la población normal, son menores de 5 ng/ml, rango donde se incluyen el 95-

98% de la población, excepto los fumadores, que pueden llegar hasta 10 ng/ml. La vida media del CEA en el hombre, parece oscilar de 1 a 8 días. El aclaramiento plasmático se realiza en el hígado, de aquí su elevación en las obstrucciones biliares intra y extrahepáticas y su disminución cuando son resueltas. En las enfermedades malignas, el CEA se eleva debido a la combinación de varios factores: aumento del número de células productoras de CEA, incremento de la capacidad de síntesis de CEA por parte de las células malignas y disminución de la capacidad para utilizar las vías normales de eliminación. El aclaramiento del CEA se produce en el hígado (264) y las concentraciones más elevadas de CEA se da en los pacientes con metástasis hepáticas. Las enfermedades no malignas del hígado, especialmente las que cursan con obstrucción del flujo de la bilis, también producen un incremento de los niveles del marcador.

El CEA se produce en una gran cantidad de tumores de origen epitelial. Los cánceres que son susceptibles de ser monitorizados con el CEA son: colorrectal (60-90%), páncreas (hasta el 90%), gástrico (hasta el 50%), de pulmón (hasta el 70%) y de mama (hasta el 50%). Hay que tener en cuenta que también se eleva en enfermedades no malignas e incluso en personas fumadoras (111).

No puede utilizarse para el *screening* de enfermedad neoplásica en una población asintomática. La ausencia de CEA no puede utilizarse como criterio para descartar una neoplasia ni su presencia como para afirmarla. Ahora

bien, durante el tratamiento intensivo de los tumores, la monitorización del CEA si puede ofrecer una valiosa información acerca de la eficacia del tratamiento.

Después de extirpar un cáncer colorrectal, las cifras del CEA deben volver a la normalidad (200) a una velocidad que se aproxime al tiempo de vida media catabólico. En los casos en que la resección es incompleta, los niveles plasmáticos de CEA permanecerán elevados tras un descenso inicial o mostrarán un pequeño incremento después de un período de normalidad. El máximo valor del CEA en la monitorización del tratamiento, está en la detección precoz de las metástasis o recidivas en el cáncer de colon tras un período de remisión clínica. Si la recidiva se detecta en una fase incipiente, quizás un segundo intento quirúrgico podrá extirpar el tumor con éxito (252).

3.2.- CA 19.9

Es un antígeno carbohidratado, descubierto por H KOPROWSKI (142) y aislado en el tracto digestivo de un paciente con carcinoma colorrectal (antígeno del cáncer gastrointestinal) . Es una sialosil-fucosil-lactotetraosil ceramida reconocida por anticuerpos monoclonales obtenidos por inmunización del ratón con línea celular de cáncer colorrectal humano y relacionado con el antígeno del grupo sanguíneo Lewis A (61). El CA 19.9 en la población sana, se halla en valores por debajo de 37 U/ml, por lo que sería el límite mayor de

la normalidad. Se encuentra presente en diversos tejidos fetales y en el adulto en el páncreas, el estómago, el hígado, la vesícula biliar y en las glándulas de la mucosa bronquial. Niveles elevados se encuentran en pacientes con carcinoma de páncreas (80%), cáncer gástrico (67%), cáncer colorrectal avanzado (58%), cáncer de vesícula biliar (67%), cáncer primitivo de hígado (49%) y en el 47% del cáncer de ovario localizado y metastásico. Se metaboliza y elimina por la bilis, de ahí su elevación en pacientes con ictericia. (184)

En cáncer colorrectal, la elevación del CA 19.9 se correlaciona con la extensión de la enfermedad. Es válido en el diagnóstico precoz de la recidiva en un 30% de los casos, pero inferior a los obtenidos con el CEA. Sin embargo, hay estudios que señalan una mayor especificidad que el CEA (97% vs 70%) (62, 148, 134).

El CA 19.9 se ha llegado a determinar en heces, revelando una tasa de positividad en el CCR de hasta el 68% (261).

3.3.- CA 19.5

Es otro marcador tumoral usado en la determinación de la evolución de los CCR. JW SHIUE (242) lo evalúa comparándolo con el CEA y el CA 19.9, encontrando mayor elevación que el CEA en el CCR, así como una correlación

de la elevación con la extensión del tumor. Su sensibilidad está en relación con la extensión del tumor: 9% en estadíos A y B, y 79% en estadíos avanzados C y D.

3.4.- CA 72.4

Es un marcador tumoral circulante y se define por 2 anticuerpos monoclonales (CC49 y B72.3) que detectan a dos epítomos de una glucoproteína tipo mucina (TAG-72), presente en sueros de pacientes con neoplasias especialmente gastrointestinales, mientras que su elevación en patología benigna es escasa (230). Se detecta en el 50% de los tejidos de carcinomas de mama, en el 50% de los carcinomas de colon y en otras neoplasias, como páncreas, ovario y pulmón. El uso de la combinación anti-TAG-72 y anti-CEA en tejidos de carcinoma de colon, presenta positivities del 90% lo que puede tener trascendencia a nivel del inmunodiagnóstico y la inmunoterapia en este tipo de neoplasias.

Diversos estudios han demostrado expresión de TAG-72 en áreas de atipia de adenomas de colon, así como en enfermedades premalignas como la colitis ulcerosa, pensándose que el TAG-72 es un antígeno relacionado con la transformación neoplásica. Las cifras normales es de menos de 6 U/ml, encontrándose elevaciones en un 72% de los cánceres colorrectales (184). La

determinación conjunta de CA 72.4, CA 19.9 y CEA, aumenta la positividad en los cánceres colorrectales (201).

Aunque la mayoría de los autores dan más especificidad al CEA que al CA 19.9 en cuanto al diagnóstico de la extensión de la enfermedad, nuestra experiencia revela que el CA 19.9 es algo más fiable que el CEA, con una sensibilidad 5 puntos mayor para el CA 19.9 sin tener en cuenta el estadio del tumor.

4.- MARCADORES HÍSTICOS EN EL CCR

4.1.- CEA:

Descrito como ya hemos visto por P GOLD y SO FREEDMAN (95), se ha comprobado que frecuentemente no es detectable en la sangre de los estadios precancerosos o en los casos de "early cancer", mientras que sí lo está en los cánceres desarrollados. Así pues, los contenidos del marcador se han estudiado en los tejidos cancerosos y polipoideos del colon para poder determinar si hay una mayor correlación.

Numerosos autores han estudiado la correlación entre el CEA tisular y factores diagnósticos y pronósticos, como el Estadío de Dukes (179), grado de

diferenciación del tumor (3), niveles preoperatorios de CEA en suero (190), relación con pólipos y tejido normal (53), etc., pero sin llegar a obtener resultados consistentes. La presencia de CEA tisular, cuya concentración se va incrementando desde los tumores benignos hasta los malignos en el colon, ha sido ampliamente demostrada (12, 21).

4.2.- CA 19.9:

Al igual que ocurre con el CEA, el CA 19.9 a menudo no es detectable en la sangre de los pacientes precancerosos o en aquellos que presentan un "early cancer". Por eso, se intentó determinar la expresión de este marcador en el tejido de tumores colorrectales así como en pólipos con el fin de poder valorar la tendencia a la malignización de los mismos. Y IMAMURA (121) encuentra una positividad en suero del 4-8% en estadíos A y B y 46-47% en C y D. En nuestra casuística, sobre 342 cánceres operados en los últimos 5 años, encontramos positividad del CA 19.9 en sangre en el 16.6% de los A, 89.6% en los B, 93.7% en los C y 66.6% en los D. Cuando determina el antígeno en la célula tumoral, encuentra valores más altos de CA 199 en las regiones tumorales que en las regiones colónicas a 1 y 5 cm del tumor, al igual que nuestros casos.

4.3.- EGFR:

El Factor de Crecimiento Epidérmico fue originalmente descrito como una sustancia aislada de las glándulas salivares del ratón que, inyectado a ratones recién nacidos, producía una precoz apertura de los ojos y nacimiento de los dientes (46). Estos eventos fisiológicos son el resultado de la proliferación y diferenciación de células que contienen una molécula EGF-receptor específico en la superficie celular (37). Aunque el EGF aislado del ratón y su homónimo humano, la urogastrona, fueron originalmente definidos como una hormona peptídica de 53 Aa (232), análisis realizados sobre el EGF ADNc del ratón, indican que el EGF propiamente dicho, es sintetizado probablemente por una molécula transmembrana pre-pro-EGF de 1.217 Aa (98). El EGF se deriva de una molécula intermedia, pro-EGF por la acción de dos arginina esterasas distintas (80). El papel que juega el EGF está todavía por dilucidar, pero hay evidencias acumuladas de que juega un papel en la regulación de la proliferación y función de una gran variedad de células, tanto in vitro como in vivo (290). El EGF estimula el crecimiento celular en el tracto gastrointestinal de ratones y ratas (5).

El receptor celular para el EGF (EGFR) es una glicoproteína con un peso molecular de 170.000 (157). Se consiguió purificar a partir de los cultivos de la línea celular A-431, derivada del carcinoma de células escamosas humanas, donde este receptor se encuentra en número muy elevado (17). Consta esta proteína de una porción extracelular, de naturaleza glicoproteica de 100 KDa,

dentro de la cual se encuentra una región repetida rica en cisteínas, a la que se unen el EGF y el TGF- α con alta afinidad; una porción "transmembrana", hidrofóbica, formada por una cadena de unos 20-26 Aa; y una porción intracelular con una actividad tirosin-kinasa por una parte y de autofosforilación por otra, esta última cercana a la cola del terminal carboxilo de la proteína, que es larga y flexible. El gen que determina la síntesis del EGFR humano, se encuentra localizado en el cromosoma 7, ocupa 110 kilobases de DNA y posee 26 exones (124).

Se han detectado receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en una gran diversidad de tejidos, tales como las células corneales, fibroblastos, células del endotelio vascular, hepatocitos, células epidermoides, células de la membrana coriónica, células amnióticas, células de la granulosa ovárica y en la decidua y placenta de mujeres embarazadas. En lo que respecta al tejido colónico, el EGFR se halla localizado en un 75,7% en la mucosa del colon. La más alta concentración del mismo, se ha hallado en la Muscularis Mucosæ, con un 100%. En menor cuantía se ha logrado determinar en la capa de músculo circular (11,5%) y en la capa muscular externa, con un 16,4% (294)

En cuanto a su mecanismo de acción, el receptor, una vez unido al EGF o al TGF- α , sufre un cambio alostérico, alterando su distribución en la membrana, lo que condiciona un cambio en su afinidad (97). La célula puede

albergar 10.000 o más de ellos en su superficie. Al principio, los complejos factor de crecimiento-receptor suelen distribuirse al azar, pero migran con rapidez a las regiones especializadas denominadas *coated pits*, donde se concentran. A continuación se forma una vesícula de paredes lisas mediante invaginación, los *receptosomas* (202), que transporta los receptores ocupados al interior de la célula. Poco se sabe acerca de las diferencias que en este mecanismo existen entre células tumorales y no tumorales. En el momento actual no se puede determinar la importancia que para el crecimiento tumoral tiene el número de receptores (228). Las células con más receptores parecen tener períodos G_1 (34) más breves. Además se ha propuesto el oncogén *erb-B* como codificador del EFGR (68).

Cuando el EGF se une a la superficie de la membrana es interiorizado con bastante rapidez y digerido (119). Así su acción en la estimulación del crecimiento celular podría ser debido a estos fragmentos internos del EGF o del receptor.

El balance de los datos de que disponemos actualmente, sugiere que los factores de crecimiento de carácter proteico ejercen su acción actuando sobre la membrana para producir una liberación de un "segundo mensajero" hacia el citoplasma. La naturaleza de estos segundos mensajeros, factores que actúan de forma activa en las células de crecimiento, queda demostrada tras la fusión de células en distintas etapas en el ciclo de crecimiento. Hace unos pocos años,

numerosos trabajos intentaron relacionar los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc con la regulación del crecimiento celular (159). En la actualidad no existe un acuerdo con respecto a un único papel de estos dos nucleótidos cíclicos en el control del crecimiento, lo que proporciona datos conflictivos (221). Otros candidatos para segundos mensajeros son los iones metálicos como el Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ y K^+ . Las concentraciones intracelulares de estos iones dependen de sistemas de transporte y sus requerimientos vienen modificados por sus concentraciones en el suero y por factores de crecimiento (237).

Como consecuencia de la interiorización de los receptores y hasta que sean reemplazados por los de nueva síntesis, se produce una disminución en el número de los mismos. Este mecanismo se denomina "regulación negativa".

La activación de la proteína kinasa por un factor de crecimiento es considerada como la señal mitogénica inicial. (7)

Los factores peptídicos de crecimiento son importantes para el control del crecimiento y la diferenciación celular debido a su alto grado de especificidad y a su gran potencia. La actuación de los factores de crecimiento se realiza sobre unos receptores específicos situados en la membrana celular. Se sabe desde hace más de 10 años, que las células malignas, a diferencia de sus homólogas normales, no son igualmente susceptibles a la regulación debida a

factores de crecimiento exógenos (262). Igualmente se ha sugerido que las células malignas escapan a los controles normales del crecimiento por requerir menos hormonas o factores de crecimiento. Recientemente se ha descubierto una explicación verosímil para este hecho. En varios sistemas se ha podido demostrar que las células tumorales son capaces de sintetizar de forma endógena sus propios factores peptídicos de crecimiento; estas mismas células tumorales, también poseen receptores funcionales para estos factores de crecimiento sintetizados de forma endógena. Así pues estas células son capaces de autoestimularse mediante un proceso denominado **secreción autocrina** (248).

Hay otro mecanismo diferente, aunque relacionado, que puede explicar también los menores requerimientos de factores de crecimiento exógenos de las células cancerosas; esencialmente consiste en que éstas pueden ser más sensibles o receptoras a los factores peptídicos de crecimiento que sus copias normales. La receptividad aumentada a la estimulación inducida por un factor peptídico de crecimiento puede ser tanto el resultado de un número aumentado de receptores en la superficie de la membrana celular, como un incremento de la afinidad de los receptores a los péptidos.

1.5).- SEGUIMIENTO

SEGUIMIENTO

En los últimos 25 años, la mortalidad por cáncer de colon no ha variado a pesar de la mejoría en cuanto a las técnicas quirúrgicas en general. Ésto, unido a la dificultad de realizar un diagnóstico precoz del mismo, ha hecho que todos los esfuerzos se hayan dirigido a realizar un diagnóstico más precoz de la recidiva a fin de conseguir una mayor supervivencia (14).

La **RECIDIVA LOCAL** es un problema persistente después del tratamiento curativo del CCR. Tal recidiva se define como un nuevo crecimiento del tumor en el lecho tumoral y a su alrededor, incluyendo grasa pericólica, mesenterio y ganglios adyacentes (recidiva extramural) o bien en la línea de sutura manual o mecánica de la anastomosis intestinal (recidiva intramural). La recidiva local causa una importante mortalidad que deteriora gravemente la calidad de vida del paciente y generalmente causa la muerte. Los síntomas son: dolor refractario al tratamiento, oclusión intestinal, perforación, hemorragias, secreción y complicación infecciosa.

Al menos el 50% de las recurrencias después de la cirugía colorrectal con criterios de curación ocurre en los primeros 5 años, y el 80% de las recurrencias locales, regionales o a distancia, ocurre en los primeros 2 años después de la resección (207), por lo que numerosos autores preconizan un follow-

up intensivo, buscando una precoz detección y resección de las recurrencias, a fin de aumentar la supervivencia de pacientes con CCR intervenidos con criterios curativos (75, 63, 2). Sin embargo, otros autores critican el uso de pruebas diagnósticas exhaustivas en el postoperatorio pues son muy costosas y no mejoran el pronóstico del paciente (83, 44, 73).

U METZGER resume las recomendaciones del 1990 NIH Consensus Conference diciendo: "La búsqueda de factores de riesgo relevantes para el pronóstico, debe de encaminarse a determinar qué tipo de pacientes pueden beneficiarse de una terapia adicional" (178).

K SLENTZ estudia el CEA en el pre y postoperatorio encontrando una peor tasa de supervivencia a los 5 años en aquellos pacientes con CEA elevado en el pre y postoperatorio (36%), frente a aquellos con CEA alto en el preoperatorio que se normaliza en el postoperatorio (58%) (246).

Se ha demostrado que programas bien diseñados de pruebas especiales de seguimiento son capaces de identificar recurrencias susceptibles de tratamiento en las etapas más tempranas de detección. La aplicación de controles de costo, crecientemente estrictos en nuestro sistema de Atención de la Salud, exige que las pruebas y exámenes de seguimiento deben ser de probado valor en cuanto a la curación o paliación del paciente con enfermedad recurrente.

El plan de follow-up ideal se debe basar en la biología del tumor. Hay que tener en cuenta la tasa de recidivas para el tipo de tumor, el tiempo de aparición de la misma, la relativa facilidad o no del diagnóstico de recidiva, con qué pruebas contamos y el beneficio o no que aporta una nueva cirugía curativa cuando se diagnostica en fase asintomática (254).

Hay que buscar pruebas que permitan un diagnóstico más precoz de la recidiva. Entre ellas están los marcadores tumorales, que pueden definir la aparición de metástasis hepáticas o pulmonares aisladas y resecables .

La mayor justificación para realizar un follow-up estrecho y efectivo después de la resección curativa, es la de realizar un screening para descubrir cánceres metacrónicos o precánceres en colon mediante colonoscopias seriadas y paliar los síntomas de recurrencia en cuanto aparezcan. No obstante, SE PATCHET (203) afirma que la colonoscopia rara vez permitirá una detección precoz de una recidiva intestinal asintomática, aunque afirma que es útil para la detección de lesiones sincrónicas. De la misma opinión participa AP BARLOW (16) que afirma que es poco probable que la colonoscopia beneficie a la mayoría, pero es importante en los pacientes jóvenes y sanos con formación continua de pólipos y que presentan un riesgo elevado de padecer un cáncer metacrónico.

Aproximadamente un 50% de los pacientes que han sido sometidos a un tratamiento correcto de su cáncer primitivo, tienen una recidiva local, regional o a distancia. Estas cifras, que han permanecido invariables durante muchos años, es posible que cambien en fechas próximas debido a la terapéutica coadyuvante en pacientes con alto riesgo de cáncer colorrectal (191).

La intensidad del follow-up debe ir en relación con el pronóstico del tumor primitivo. Debe ser más intensivo en los tumores B2/C2, sobre todo si infiltran la grasa perivisceral. Así mismo, G STEELE Jr (254) preconiza un seguimiento más intensivo para los tumores del recto, esto es, para aquellos tumores situados por debajo de la reflexión peritoneal. La colonoscopia se justifica tanto como para detectar la recidiva como para extirpar los pólipos que vayan apareciendo, antes de que presumiblemente se transformen en carcinomas (89).

En estudios críticos llevados a cabo en Suiza, los investigadores intentan definir que tipo de seguimiento, intensivo o no, beneficia a los pacientes (268, 35). No han encontrado diferencias realizando la revisión 2 veces o 4 al año, ni dependiendo tampoco de las pruebas pedidas, con marcadores o no, en cuanto al número de pacientes en los que pudieron detectar y resear recidivas en uno u otro grupo.

Los estudios de VA GILBERTSEN (87) y los de LL GUNDERSON (104) no han encontrado diferencias en la supervivencia de aquellos pacientes en los que la recidiva fue descubierta en fase asintomática y por un second-look, versus aquéllos en los que la reexploración se realizó en fase sintomática y las recidivas habían sido previamente documentadas.

DJ BRUINVELS (25) defiende el follow-up intensivo basándose en los siguientes criterios:

1.- La recidiva es más frecuentemente detectada en forma sintomática.

2.- Los pacientes con recurrencias son más frecuentemente intervenidos, no solo mediante resecciones con intención curativa, sino con laparotomías exploradoras.

3.- Se detectan un mayor número de tumores metacrónicos.

4.- Un incremento significativo de la supervivencia se encuentra cuando el CEA se incluye entre las determinaciones a realizar en las revisiones.

Para la detección de la recidiva parece ser de gran utilidad la realización de la ECO transrectal. Así, JM RAMÍREZ (219) en 13 recidivas diagnosticadas por ECO transrectal, observó 3 en que no la pudo detectar la endoscopia rígida.

Dado que la mayor parte de las recurrencias del cáncer de colon ocurre en los primeros 5 años, y de éstas, el 80% ocurren en los 2 primeros años de la resección (254), pensamos que los estudios de follow-up deben de ser especialmente exhaustivos en estos 2 primeros años.

SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES:

El protocolo de seguimiento que hemos empleado para comprobar las recidivas tumorales en pacientes intervenidos de CCR, no ha sido unívoco, sino que al contrario, ha sido parcialmente individualizado, según las características del paciente y del tumor.

El modelo básico de seguimiento para todos los enfermos, con las modificaciones individuales que luego especificaremos, es:

PRIMER AÑO: Revisión cada 3 meses. En estas revisiones trimestrales, realizamos únicamente analítica de sangre y determinación de los

3 marcadores: CEA, CA 19.9 y CA 195. La 4^a revisión, al año, conlleva estudio completo de extensión consistente en realizar analítica sistemática, marcadores tumorales, Rx de Tórax, colonoscopia y TAC.

SEGUNDO AÑO: Revisión cada 6 meses. En estas revisiones únicamente realizamos analítica de sangre y los 3 marcadores anteriormente expuestos.

REVISIÓN ANUAL. A partir del tercer año, realizamos las revisiones anualmente, practicando colonoscopia y TAC al tercero y quinto año. Pasados los 5 años, realizamos una revisión anual con solo determinación de los 3 marcadores. Por supuesto, el paciente es advertido que, de presentar algún síntoma tal como rectorragia, alteraciones del ritmo intestinal, dolor abdominal, dolor torácico o disnea, etc, acuda antes a la Consulta para serle controlado.

Dentro de esta revisión standard, si en cualquiera de los análisis encontramos un aumento de la GPT, GammaGT o FA, realizamos ECO abdominal para despistaje de la metástasis hepática.

En caso de que los marcadores realizados en una revisión rutinaria se eleven, realizamos 3 determinaciones seguidas cada 15 días para comprobar la veracidad de la elevación. Si comprobamos la misma, realizamos entonces

colonoscopia y TAC con el objeto de encontrar la posible recidiva. Este estudio lo realizamos ante la elevación mantenida de cualquiera de los 3 marcadores. Nunca hemos realizado un second-look solamente por la elevación de los marcadores.

Sobre este tipo base de revisiones, llevamos a cabo una variante de la misma en algunos casos determinados:

1.- Tumores circunferenciales. En aquellos pacientes en los que en el preoperatorio no se ha podido efectuar una endoscopia completa por tener un carcinoma estenosante y por tanto, no poder pasar el colonoscopio por encima del tumor, realizamos una colonoscopia a los 3 meses de la intervención a fin de comprobar la existencia o no de lesiones sincrónicas con el tumor.

2.- Lesiones sincrónicas: Aquellos pacientes que en la colonoscopia preoperatoria presentan pólipos adenomatosos además del carcinoma, llevamos a cabo colonoscopias de control anuales, hasta disponer de 2 colonoscopias seguidas sin presencia de pólipos. Las continuamos practicando mientras que en el colon haya presencia de lesiones polipoideas.

3.- Estadíos B2 y C2 con infiltración grasa: En estos estadíos, las revisiones las realizamos cada 3 meses los 2 primeros años, pasando a ser cada

6 meses los años 3 y 4, y si no encontramos recidiva, continuamos con revisiones anuales de los mismos.

4.- Resecciones anteriores bajas: Los pacientes a los que se les ha practicado resecciones anteriores bajas y ante la posibilidad de mayor incidencia de recidivas loco-regionales, realizamos CT abdomino-pélvico anual hasta los 5 años, pasados los cuales, los pasamos al protocolo standard.

En cuanto al tratamiento coadyuvante, a los pacientes con estadíos A y B1, no se les realiza ningún tipo de tratamiento. Los pacientes con carcinoma de colon estadíos B2 y cualquier C o D, pasan a protocolo de Quimioterapia con 5-FU y Levamisol. Los pacientes con cáncer rectal, en estadíos a partir del B2, pasan a protocolo de QT y RT locorregional.

2).- OBJETIVOS

OBJETIVOS:

La clasificación de Dukes fue introducida en 1932 para ayudar a predecir la evolución del CCR (71). Aunque las modificaciones introducidas a dicha clasificación (132, 10, 70) y el grado de diferenciación histológica, tal como fue descrito por A BRODERS (24) siguen siendo los estándares de oro para el pronóstico del CCR, se observan algunos defectos. La inexactitud de estos factores pronósticos queda demostrada por el hecho de que, por un lado, la tercera parte de los enfermos con metástasis ganglionares linfáticas, lleguen a sobrevivir a largo plazo, a la vez que aproximadamente un tercio de los pacientes con tumores de Dukes B fallecen a causa de su cáncer, independientemente del grado de diferenciación histológico (126, 15). En consecuencia, son necesarios índices pronósticos más exactos.

Se han barajado otros factores, como hemos visto anteriormente, entre los que se hallan la edad, sexo, la localización, la fijación y los niveles de CEA. Se considera que como mucho, se puede predecir la recurrencia con exactitud en el 50-75% de los casos de CCR invasivo no metastásico.

La mayoría de los índices pronósticos que se utilizan habitualmente se obtienen en el momento de la resección tumoral y después del estudio de las piezas de resección por lo que no están disponibles antes de la intervención

quirúrgica. N WILLIAMS y cols han mostrado que la valoración preoperatoria del estudio de las neoplasias rectales podría tener influencia sobre la actitud terapéutica que se adopta posteriormente (286). Utilizando los avances tecnológicos actuales, concretamente técnicas bioquímicas e histopatológicas, estos autores consiguen valorar los estadios de una forma más precisa que hasta ahora se hacía. En sus conclusiones señalan que esta mejoría en la precisión del estadio, modificaría las decisiones preoperatorias, evitando que algunos pacientes reciban tratamientos coadyuvantes, así como seleccionando pacientes de forma más exacta para un tratamiento correcto. En consecuencia, el pronóstico podría ser mejorado.

El hecho de haber sufrido un incremento en el número de pacientes con CCR que son vistos en nuestra Consulta Externa del Hospital "12 de Octubre", nos indujo a introducirnos más de lleno en la problemática del carcinoma colorrectal y estudiar los factores pronósticos barajados hasta el momento, a fin de dar la mayor garantía de un tratamiento correcto a nuestros enfermos. Fruto de estos estudios fue la comprobación de que las líneas modernas de investigación se basaban fundamentalmente en el estudio de los marcadores tisulares a fin de valorar su utilidad como factor pronóstico, debido fundamentalmente a que es en la propia célula tumoral donde se encuentran las características que van a determinar el comportamiento biológico tumoral, y de ahí, el gran interés que se ha mostrado en estudiar el DNA y el ciclo celular, los oncogenes, los marcadores tisulares, etc.

Como anteriormente hemos expuesto, en teoría, un antígeno citoplasmático o nuclear, puede proporcionar un marcador sérico tan útil como un antígeno de la superficie celular para la detección o monitorización de un cáncer humano, siempre que se liberen los determinantes intracelulares a partir del tumor necrótico. En algunos tumores, la expresión del antígeno varía en relación a las diferentes fases del ciclo celular y, en otras, depende de la proximidad de las células tumorales a los vasos sanguíneos (110). Este concepto tan claro, nos indujo a pensar que podríamos obviar la posible liberación o no del antígeno del citosol, y obviar el condicionante de necrosis tumoral o proximidad de vasos, si podíamos determinar el antígeno en el propio citosol de la célula tumoral.

Dado que la inmensa mayoría de los diferentes estudios realizados sobre marcadores tumorales en tejido se realizaron mediante técnicas inmunohistoquímicas, subjetivas y de baja reproductibilidad, cosa que no ocurre cuando los marcadores tumorales en tejido se determinaban mediante métodos cuantitativos (RIA, EIA, MEIA, etc.), que son objetivos y más fácilmente reproducibles por otros investigadores, fue lo que nos decidió a iniciar este trabajo, estudiando el comportamiento de dos marcadores tumorales en el seno de la célula tumoral: el CA 19.9, marcador de relevancia en el CCR, que en nuestra experiencia presenta una significación idónea cuando se realiza su determinación en sangre periférica, y el EGFR, marcador de importancia en otros tipos de

tumores, y poco estudiado en cuanto a su relación con el Carcinoma colorrectal. Decidimos pues, estudiar su significación dentro de las células colónicas en pacientes portadores de CCR, e intentar, mediante seguimiento de estos pacientes, comprobar su valor como factor pronóstico en los mismos. Para ello, iniciamos el estudio en el año 1990, a fin de tener un seguimiento adecuado de los mismos. En este intervalo, se ha leído una Tesis Doctoral en la que se estudiaba el CEA y el CA 19.9, junto con otros marcadores, a nivel tisular, con medios de inmunohistoquímica. En nuestro trabajo, la determinación de los dos marcadores la hacemos cuantitativamente e intentamos correlacionar los valores hallados con un índice pronóstico eficaz.

Autores como RJC STEELE (253) encuentran en sus estudios que la concentración del EGFR tiende a ser mayor en aquellos tumores colorrectales que son invasivos y poco diferenciados, lo cual concuerda con los hallazgos en otros tumores humanos. El papel del EGFR en la conducta del cáncer aún es oscuro. Los estudios de unión a ligandos en tumores humanos indican que el receptor es capaz de unirse al EGF y el aumento de su expresión podría ser parcialmente responsable del crecimiento rápido y del consiguiente peor pronóstico que se asocia a tumores invasivos poco diferenciados. Por lo tanto, el EGFR puede tener un significado pronóstico que podría utilizarse para complementar otros factores con el objeto de obtener una predicción más precisa de la evolución (197).

Con este fin, nos propusimos los siguientes objetivos:

1) Determinar los valores de los dos marcadores en 4 muestras de la pieza de resección: en el propio tumor, en tejido distante del tumor unos 15 cm, en el borde de resección oral y en el borde de resección anal.

2) Averiguar sus posibles relaciones con el grado de invasión del tumor, relacionarlos con los distintos factores pronósticos utilizados habitualmente para el CCR.

3) Averiguar si la mayor cuantificación del marcador en el tumor se asociaba a una mayor índice de recidivas o a una recidiva más precoz.

4).- Averiguar el comportamiento de los marcadores en el borde anal de los tumores rectales y su relación o no con recidivas en la línea de sutura.

5).- Intentar hallar una relación entre los valores del CA 19.9 en el citosol del tumor y los valores determinados en la sangre periférica.

6) Finalmente, intentar correlacionar las determinaciones de estos marcadores con un pronóstico determinado, a fin de seleccionar pacientes que se

beneficiarían de un tratamiento complementario aunque no entrara en el protocolo de tratamiento coadyuvante según los protocolos establecidos.

3).- MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y MÉTODOS.

Realizamos un estudio prospectivo sobre 87 pacientes no seleccionados, pero diagnosticados de carcinoma colorrectal por endoscopia y biopsia, que fueron vistos en nuestra Consulta Externa del Hospital "12 de Octubre" de Madrid, en el Servicio de Cirugía General y Ap. Digestivo A, Sección A que dirige el Dr. Ballesteros, desde Julio de 1990 hasta Julio de 1994. En este estudio solamente se incluyen aquellos enfermos portadores de carcinoma colorrectal (87/274) que fueron intervenidos por el doctorando en el período anteriormente expuesto, a fin de eliminar una posible variable en las recidivas que, como es sabido, depende de la técnica de cada cirujano. De los 87 casos estudiados, fueron desestimados 24 pacientes en base a dos criterios de exclusión: No haber podido determinar los 2 marcadores en las 4 muestras (22 casos), y no ser Adenocarcinomas, a fin de excluir la diferencia de pronóstico correspondiente a los diferentes tipos histológicos del tumor (2 casos: 1 Carcinoma epidermoide y 1 Carcinoma mucoso).

1.- METODOLOGÍA DIAGNÓSTICA.

El diagnóstico de sospecha fue siempre realizado por la H^a Clínica y confirmado por el Servicio de Medicina Interna (Aparato Digestivo), mediante la realización del estudio endoscópico. Ante la sospecha macroscópica del tumor,

el paciente nos es remitido a nuestra Sección, donde es ingresado y realizado el estudio preoperatorio en espera de la confirmación diagnóstica por medio de la biopsia. El estudio de extensión se realizó mediante TAC abdominal. A todos los enfermos se les solicitó Hemograma completo, Autoanализador, Rx de tórax, ECG, PFR, TAC abdominal, CEA, CA 19.9 y CA 19.5, pues pensamos que las variaciones posibles de los 3 marcadores en conjunto, dan más información del grado de extensión del tumor en el preoperatorio y sobre todo para el seguimiento, que un marcador aislado (Tabla 5).

Para el diagnóstico instrumental, se ha empleado fundamentalmente la rectocolonoscopia. En 6 casos se practicó primero un enema opaco antes de la endoscopia.

2.- CLASIFICACIÓN:

Para la clasificación de los pacientes, hemos empleado la clasificación de Dukes y la modificada por VB ASTLER y FA COLLER en 1954 (10). Según esta clasificación, entendemos por tumores en Estadios A, aquéllos cuya infiltración está limitada a la mucosa o a la submucosa. Serían tumores en Estadios B1, aquéllos cuya infiltración atañe a la muscular de la pared del colon. Tumores en estadios B2 seían aquellos cuya infiltración alcanza la serosa o incluso

Tabla 5

METODOLOGÍA DIAGNÓSTICA

- Historia Clínica
- Estudios de laboratorio
- Radiografía de Tórax
- Electrocardiograma
- Rectocolonoscopia
- Biopsia de la lesión

ESTUDIO DE EXTENSIÓN

- TAC abdominal
- Marcadores tumorales:
 - CEA
 - CA 19.9
 - CA 19.5

la sobrepasa llegando a infiltrar la grasa perivisceral. Por tumores en Estadios C1 entendemos aquéllos cuya infiltración abarca hasta la serosa, pero tiene ganglios regionales positivos. Tumores C2 serían aquéllos que se extienden más allá de la serosa y que tienen ganglios regionales positivos, y finalmente, serían tumores en Estadios D aquéllos que tienen metástasis a distancia o metástasis hepáticas.

En cuanto a la clasificación según el grado de diferenciación, hemos seguido la propugnada por A BRODERS en 1925 (24) clasificándolos en **bien diferenciados**, en los que las células neoplásicas se disponen en cúmulos aciniformes que simulan las criptas glandulares de la mucosa del colon normal; **pobrementemente diferenciados**, en los que las células neoplásicas se presentan en masas y cordones irregulares, a menudo de desarrollo imperfecto (anaplasia), lo cual dificulta la identificación de su origen; y **medianamente diferenciados** en los que las células carcinomatosas se caracterizan por su citoplasma más oscuro que el normal y por su núcleo vesicular hipercromático, que a menudo presenta fases de mitosis.

3.- LOCALIZACIÓN:

Para la localización de los distintos tumores de la serie, hemos dividido al colon en tres porciones: derecho, izquierdo y recto. Entendemos por

tumores localizados en el colon **derecho**, aquéllos que asientan entre el ciego y la mitad izquierda del transverso, esto es, hasta la izquierda de la aorta. Por colon **izquierdo** hemos tomado aquella porción de colon que va desde la izquierda de la aorta hasta la unión rectosigmoidea. Entendemos por tumores **rectales** los que están localizados entre la unión rectosigmoidea y el canal anal. Incluimos dentro de estos tumores aquéllos que en su límite inferior llegan a la reflexión peritoneal del recto, pues en todos ellos hay que hacer disección del espacio pelvirrectal.

4.- ANATOMÍA PATOLÓGICA:

Las piezas de resección de los 65 pacientes, fueron remitidas al Servicio de Anatomía Patológica después de haber sido abiertas longitudinalmente y haber extirpado las cuatro muestras de tejido necesarias para nuestro estudio. El diagnóstico de carcinoma fue realizado por el patólogo. De los 65 pacientes, 63 fueron Adenocarcinomas, que fueron los que incluimos en el estudio, desestimando del mismo un carcinoma epidermoide y una carcinoma mucinoso. En el informe definitivo de la pieza, se describe el tipo de tumor, el grado de infiltración del mismo, el grado de diferenciación, el número total de ganglios extirpados con la pieza y el número de ellos que se hallan invadidos por el tumor. En cuanto a la infiltración vascular y linfática, no lo suelen dar en el resumen diagnóstico de la pieza y hay que entresacarla de la descripción microscópica de

la misma. No en todos los casos de descripción microscópica se pudo sacar la infiltración, por lo que no fue una variable a tener en cuenta en el estudio.

Para la clasificación de los casos según el número de ganglios los hemos dividido en 3 grupos: aquellos casos en que los ganglios no estaban infiltrados por el tumor; aquellos en los que los ganglios afectados eran menos de 3 y aquellos cuyo número de ganglios afectados era mayor de tres, pues según EM COPELAND, el pronóstico se ensombrece a medida que el número de ganglios afectos aumenta (49). La división de los casos según esta distribución ganglionar, la realizamos basados en el trabajo de P HERMANEK (114), que coincide con la clasificación TNM (23).

5.- INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA:

Todos los pacientes fueron intervenidos bajo anestesia general e intubación endotraqueal mediante una laparotomía media suprainfraumbilical. Los carcinomas del colon derecho, fueron intervenidos mediante una hemicolectomía derecha reglada, pasando siempre el límite distal de la resección a la izquierda de la aorta cuando asientan en colon ascendente y ángulo hepático, llegando al descendente cuando asientan en el transversal. Los carcinomas del colon izquierdo se intervinieron mediante una hemicolectomía izquierda reglada previa ligadura de la v. mesentérica y a. mesentérica inferior en su origen y linfadenectomía

reglada de aorta y vasos ilíacos. En los cánceres de recto, tanto alto como bajo, en aquellas situaciones en que pudimos, realizamos resección anterior baja. En los otros casos, se realizaron amputaciones abdominoperineales (Tabla 6). Las anastomosis en éstos fueron siempre mecánicas con el Stappler Proximate CDH-33 de los laboratorios Ethicon. La distancia del borde de resección ha sido de unos 5 cm. en los casos localizados en el recto alto (entendiendo por recto alto aquellos tumores rectales por encima de 12 cm) y de unos 3 cm en los tumores situados en el recto bajo (aquéllos situados por debajo de los 12 cm.)

6.- RECIDIVAS:

Siguiendo el criterio de PJ MARSH, entendemos a la recidiva local después de la operación de carcinoma de colon como toda enfermedad local detectable durante el seguimiento, que aparezca tanto de manera aislada como en el conjunto de una recidiva generalizada en pacientes sometidos a resección (169). Por ello, vamos a distinguir en nuestros casos a aquellos pacientes que sufrieron recidiva local, ciñéndonos a los criterios anteriormente expuestos, de aquellos pacientes que han sufrido a lo largo del seguimiento la aparición de metástasis a distancia o tumores metacrónicos.

Tabla 6

TIPOS DE SUTURAS

Colon derecho.....8

Mecánicas.....4

Manuales.....4

Colon izquierdo.....25

Mecánicas.....11

Manuales.....25

Recto.....33

Mecánicas.....21

AAA.....12 pacientes

7- DETERMINACIÓN DEL CA 19.9 PLASMÁTICO

El CA 19.9 plasmático fue determinado por el Servicio de Inmunología del Hospital "12 de Octubre" que dirige el Prof. Arnaiz, mediante RIA. Los valores normales se consideraron por debajo de 37 U/ml.

8.- OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS TUMORALES.

Una vez resecada la pieza, un colaborador obtiene de la misma las muestras para el trabajo. Para ello, lava la pieza en suero salino, abriéndola longitudinalmente. Toma una muestra del tumor que es introducida en un tubo de cristal, taponado y congelado inmediatamente en Nitrógeno líquido. Este tubo es identificado con el número de protocolo del paciente y con la letra **T** en el mismo. Lo mismo se hace con una muestra localizada a una distancia aproximada de 15 cm desde el borde superior de la tumoración, introducida en frasco de cristal rotulado como **N**, y es la muestra que tratamos como tejido normal. A continuación hacemos lo mismo con el borde más proximal, esto es, el borde más cercano al íleon terminal, que introducimos en un frasco rotulado como **BO**. Finalmente, tomamos otra muestra del borde más distal de resección, que introducimos en otro frasco de cristal rotulado como **BA**. Así pues, tomamos 4 muestras de cada pieza de resección que corresponden a **tumor, tejido normal, borde oral, y borde anal**. Estas 4 muestras son introducidas en un termo con

Nitrógeno líquido para ultracongelarlas al instante, y son enviadas al Laboratorio por un colaborador del Servicio donde se introducen en nevera a -80° para su estudio posterior. En estas 4 muestras, se realizaron las determinaciones de CA 19.9 y Receptor para el Factor de Crecimiento Epidérmico.

8.1- DETERMINACIÓN DEL CA 19.9 TISULAR

Para realizar la determinación del Ca 19.9 en las 4 muestras obtenidas de cada paciente, se sacan la víspera y se descongelan a temperatura ambiente. Al día siguiente, una vez descongelada la muestra, se colocan en sendas bandejas de cristal y se desmenuzan entre 200-500 mg. de tejido en pequeños trozos de forma que quede totalmente triturado, momento en el que es transferido a un homogeneizador vidrio-vidrio y tratado con Buffer A , consistente en 10% de glicerol 1.5 mM, 10 mM de monothioglicerol y 10 mM de TRIS-HCL, pH 7.6, usando varias ráfagas intermitentes de Polytron, en relación 1 a 3 muestra/buffer, y a una temperatura de 4° C. Una vez totalmente homogeneizada la muestra con el buffer, ultracentrifugamos a 105.000 xg. (ultracentrífuga Beckman modelo L-8-M) durante cuarenta y cinco minutos. Con ello obtenemos las dos muestras con las que vamos a actuar: un sobrenadante o citosol, esto es, la fracción citosoluble de la célula, que además está diluido por el contenido del buffer y en la zona más inferior, vamos a obtener un "pellet". En el sobrenadante

del citosol es donde vamos a realizar la determinación del CA 19.9 mediante el método de MEIA. En el pellet restante, realizaremos la determinación del EGFR.

8.1.1.- MÉTODO DE ENSAYO:

Para ello, hemos utilizado el marcador tumoral sérico Abbott CA 19.9, que se basa en un anticuerpo monoclonal 1116-NS-19.9, disponible únicamente a través de Centocor, Inc y distribuidores autorizados.

El ensayo IMx CA 19.9 es un enzimoimmunoensayo de micropartículas (MEIA) para la determinación cuantitativa de los determinantes reactivos 1116-NS-19.9 en el sobrenadante de citosol. Este ensayo determina un antígeno asociado a tumores que está presente en los tejidos como un monosialogangliósido. Se basa en un anticuerpo monoclonal 1116-NS-19.9 el cual reacciona con un determinante antigénico de carbohidrato expresado en el antígeno tumoral.

8.1.2.- PRINCIPIOS BIOLÓGICOS DEL PROCEDIMIENTO:

TO:

El ensayo IMx CA 19.9 se basa en la tecnología de enzimoimmunoensayo de micropartículas (MEIA). Los reactivos IMx CA 19.9 y las muestras se añaden a la celdilla de reacción en la secuencia siguiente:

* El conjunto sonda/electrodo dispensa la muestra, el diluyente de muestra IMx CA 19.9 y las micropartículas recubiertas de 1116-NS-19.9, en el pocillo de incubación de la celdilla de reacción.

* Los determinantes reactivos 1116-NS-19.9 presentes en la muestra se unen a las micropartículas recubiertas de 1116-NS-19.9 formándose un complejo anticuerpo-antígeno.

* Una alícuota de la mezcla de reacción, que contiene el complejo anticuerpo-antígeno unido a las micropartículas, se transfiere a la matriz de fibra de vidrio. Las micropartículas se unen irreversiblemente a la matriz.

* La matriz se lava para eliminar los materiales no unidos.

* El conjugado 1116-NS-19.9: fosfatasa alcalina se dispensa sobre la matriz y se une al complejo anticuerpo-antígeno.

* La matriz se lava para eliminar los materiales no unidos.

* El sustrato, 4-metilumbeliferil fosfato se añade a la matriz, y la velocidad con que se forma el producto fluorescente es medido por el sistema óptico MEIA.

8.1.3.- REACTIVOS:

IMx CA 19.9 se suministra en dos tipos de envases de reactivos distintos: N° 2203-20, el envase de reactivos IMx CA 19.9 estándar, que puede ser utilizado con todas las versiones de software del sistema y el N° 2203-70, el envase de reactivos IMx SELECT CA 19.9, que solo puede utilizarse con la versión 5.0 de software del sistema (y versiones superiores). Nosotros hemos utilizado los reactivos del envase 2203-20, que para 100 tests contiene:

1.- 1 frasco (4 ml) de micropartículas recubiertas de 1116-NS-19.9 (de ratón, monoclonal), en tampón con estabilizantes de proteínas.
Conservante: Azida sódica al 0.1%

2.- 1 frasco (8 ml) de conjugado 1116-NS-19.9 (de ratón, monoclonal):fosfatasa alcalina, en tampón con estabilizantes de proteínas.
Concentración mínima: 0.1 µg/ml. Conservantes: Azida sódica al 0.1% y agentes antimicrobianos.

3.- 1 frasco (10 ml) de 4-metilumbeliferil fosfato, 1.2 mM en tampón. Conservante: Azida sódica al 0.1%.

4.- 1 frasco (12.5 ml) de diluyente de muestra. Tampón con estabilizantes de proteínas. Conservantes: Azida sódica al 0.1% y agentes antimicrobianos.

1 frasco (4 ml) de calibrador IMx CA 19.9 MODE 1 (C). Valor de ensayo: 90 U/mg de proteína de determinantes reactivos 1116-NS-19.9 (humanos) en tampón con estabilizantes de proteínas. Conservante: Azida sódica al 0.1% y agentes antimicrobianos.

8.1.4.- CALIBRADORES;

Los seis frascos (4 ml cada uno) de calibradores IMx CA 19.9 contienen determinantes reactivos 1116-NS-19.9 (humanos) en tampón con estabilizantes de proteínas, en las siguientes concentraciones:

<u>Frasco</u>	<u>Valor de ensayo CA 19.9 (U/mg prot)</u>
A	0
B	30
C	90
D	180
E	320
F	500

Conservante: Azida sódica al 0.1% y agentes antimicrobianos.

8.1.5.- CONTROLES:

Los tres frascos (8 ml cada uno) de controles IMx CA 19.9 contienen determinantes reactivos 1116-NS-19.9 (humanos) en tampón con estabilizantes de proteínas en los rangos de concentración siguientes:

<u>Frasco</u>	<u>Valor de ensayo CA 19.9 (U/mg prot.)</u>	<u>Rango U/mg prot.)</u>
L	50	37.5- 62.5
M	125	94.0-156.0
H	250	188.0-313.0

Conservantes: Azida sódica al 0.1% y agentes antimicrobianos.

8.1.6.- DILUYENTE DE MUESTRA:

Un frasco (100 ml) de diluyente de muestra IMx CA 19.9. Tampón con estabilizantes de proteínas. Conservantes: Azida sódica al 0.1% y agentes antimicrobianos.

8.1.7.- ALMACENAMIENTO:

El envase de reactivos, el diluyente de muestra, los calibradores y los controles IMx CA 19.9, deben almacenarse entre 2 y 8° centígrados y pueden ser usados inmediatamente después de sacarlos del refrigerador.

8.1.8.- RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS:

Las muestras hísticas recogidas, se congelan hasta su procesamiento. Una vez se vayan a procesar, la víspera se descongelan a temperatura ambiente y se procede a la preparación de las mismas como anteriormente hemos expuesto. El volumen mínimo de muestra para efectuar la determinación es de 150 µl. Para cumplir los requerimientos de volumen establecidos para los calibradores y

controles IMx CA 19.9, hay que mantener los frascos verticalmente y dispensar 4 gotas en el pocillo de muestra.

Las muestras con un valor de CA 19.9 superior a 500 U/mg de proteína del citosol, aparecen señalizadas con el código "> 500". Para cuantificar exactamente la concentración de estas muestras, hay que llevar a cabo el procedimiento de dilución manual.

La dilución manual se efectúa diluyendo la muestra con el diluyente de muestra IMx CA 19.9 (N° 2203-50) antes de pipetearla en el pocillo de muestra. Así, una dilución al 1:10 se prepara añadiendo 100 μ l de muestra a 900 μ l de diluyente de muestra IMx CA 19.9. Hay que mezclar bien antes de la determinación. Para determinar la concentración de CA 19.9 en la muestra, hay que multiplicar la concentración de la muestra diluida por el factor de dilución.

Se recomienda hacer la dilución de tal manera que la muestra diluida produzca una lectura superior a la del calibrador B CA 19.9 de 30 U/mg de proteína en la curva de calibración.

8.2.- DETERMINACIÓN DEL EGFR TISULAR

8.2.1.- MÉTODO DE ENSAYO

La técnica analítica empleada para la determinación del receptor del factor de crecimiento epidérmico, es por ensayo por unión competitiva. Normalmente el EGFR es medido, por competición entre EGF marcado (EGF I.125) y el no marcado, de acuerdo con el análisis de Scatchard multipuntual (7 puntos) (234). Este método limita las posibilidades de detección de EGFR debido a la cantidad sustancial de tejido que se necesita (que oscila entre 5.000 a 10.000 mg). Por este motivo, porque el método es muy costoso, consume mucho tiempo y muy frecuentemente, el tumor remitido es pequeño, es por lo que nosotros hemos utilizado la técnica de un solo punto saturante.

El Scatchard plot análisis fue realizado mediante la utilización de un pool tumoral, del que se obtuvieron las membranas que fueron incubadas en concentraciones crecientes de I-125 EGF en presencia o ausencia de EGF no marcado durante 2 horas a temperatura ambiente, utilizando el método de filtración de la solución de hidroxipatita, hallando el punto de "sitio" de alta afinidad, a una concentración para la media de la constante de disociación de $K_d = 1.2 \text{ nM}$.

8.2.2.- SECUENCIA DEL ENSAYO

I. Preparación del tejido tumoral.

La determinación del EGFR la hemos realizado en el "pellet" sobrante de la preparación de las muestras para la determinación del CA 19.9. Los pasos que se han seguido han sido ya pormenorizados al hablar de la determinación del CA 19.9.

II. Determinación específica de EGFR:

- 1) Resuspender el Pellet en Buffer (PBS)

- 2) Centrifugar a 800 rpm durante 10 minutos dando lugar a suspensión de membrana (sobrenadante)

- 3) El sobrenadante de membrana se emplea para la determinación del EGFR. (En el Pellet resultante se hallan los núcleos para realizar estudio citogenético)

- 4) Incubación en tubos de ensayo (12 x 75 mm) con I-125 EGF (1 nM) (unión específica), por triplicado.

- 5) Final de incubación. Adición de 2 ml de Buffer C más albúmina bovina.

6) Se agrega una solución de 100 μ l de hidroxapatita, centrifugando a continuación la solución a 3.000 rpm durante 10 minutos.

7) El sobrenadante se descarta.

8) Lectura en contador gamma

9) Expresión en fentomoles/mg de proteína.

8.2.3.- MATERIAL UTILIZADO PARA EL ENSAYO:

- Reactivos:

1. El I-125 EGF con SA 150-250 Uc/mg (5.5-7.4 MBq/ng) de MW 6.000, liofilizado en Buffer fosfato (pH 7.4) proveniente de NEN (New England Nuclear Products, Dupont).

2. El EGF no marcado, Factor de Crecimiento Epidérmico (urogastrona) de Amersham International (England), con Actividad Específica de aproximadamente 1 ng/ml (ARN 5.100)

3. Buffer A: 10% de glicerol; 1.5 mM de EDTA; 10 mM de monothioglicerol y 10 mM de THIS-HCL, pH 7.6

4. Buffer B: 150 mM de ClNa; 2 mM de ClMg y 2 mM de fosfato de sodio, pH 7.0

5. Buffer C: Buffer de fosfato (BSA) con albúmina sérica bovina a -4° C.

8.2.4.- DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA:

Después de obtenido este pellet, es resuspendido en Buffer B, consistente en: 150 mM de ClNa, 2 mM de ClMg y 25 mM de fosfato de sodio, pH 7.0, y rehomogeneizado y centrifugado a 800 rpm durante 10 minutos. En este pellet así obtenido (el segundo pellet), van a quedar núcleos y mitocondrias, que es la porción que se descarta y se almacena para posteriores estudios de citogenética y ADN que están en perspectiva, y solo la suspensión del sobrenadante, conteniendo las membranas, es utilizado para la determinación del EGFR.

A continuación se realiza la determinación, en la suspensión de membranas, de proteínas (método Lowry) (161), conteniendo las mismas un promedio de 2 a 5 mg de proteína/ml.

El sobrenadante obtenido se reparte en porciones alícuotas de 100 μ l., que contienen aproximadamente entre 200 a 500 μ g. de proteínas de membrana, incubándolo en tres tubos de cristal (12 x 75 mm) con I-125 EGF (1 nM.) en presencia (unión no específica) o ausencia (unión total) de EGF no marcado durante dos horas a veinticinco grados o temperatura ambiente.

Por otra parte, en otros tres tubos similares, se incubaba la suspensión de membrana (100 μ l) con 10 μ l de I-125 EGF más 10 μ l de EGF frío, no marcado.

La incubación se mantiene durante dos horas a temperatura ambiente ($\pm 26^{\circ}$ C) a un volumen final de 110 μ l. El intercambio es detenido agregando a la incubación 2 ml del Buffer C, consistente en Buffer de fosfato (BSA) con albúmina sérica bovina (5 ng/ml) a 4 $^{\circ}$ C. Ello se realiza con objeto de separar las fases, debido a que la albúmina, por su gran capacidad y poca afinidad, va a unir todo el EGF marcado y no marcado que no se ha unido al receptor, esto es, el libre. Después de veinte minutos de incubación, se agrega una solución de

100 μ l de hidroxapatita, centrifugando a continuación la solución a 3.000 rpm durante 10 minutos.

Finalmente, se pasan al contador gamma (Bøhring Gamma Counter 1612).

La unión específica fue calculada sustrayendo de la media total, la media no específica:

UNIÓN ESPECÍFICA = MEDIA DEL TOTAL - MEDIA DEL NO ESPECÍFICO.

Los resultados fueron expresados en fentomoles por mg de proteína de membrana. Se considera positivo para nuestro estudio a partir de 1 fmol/mg de proteína de membrana.

9.- MÉTODOS ESTADÍSTICOS:

Para la realización de los cálculos hemos utilizado un PC NORTH con placa 486 SX a 33 Mhz, y el programa de Bioestadística RSIGMA. Para estudiar los grados de significación, hemos realizado comparación de medias pareadas y el análisis de la varianza (Anova). Cuando hemos tenido que comparar

variables cualitativas, hemos usado le Chi². Hemos considerado valores con significación estadística aquéllos cuya p era menor de 0.05.

10.- TRATAMIENTO COADYUVANTE.

Como ya hemos dicho anteriormente al hablar del seguimiento, todos los pacientes que presentaban carcinoma de colon con estadio B2 en adelante, pasan a protocolo de tratamiento coadyuvante de QT con 5-FU y Levamisol. Los carcinomas de recto en estadios B2, C y D, pasan a protocolo de tratamiento coadyuvante con QT y RT.

No todos los pacientes que cumplieron los requisitos, recibieron tratamiento coadyuvante. Algunos, por edad u otros condicionantes, no fueron candidatos, según el Servicio de Oncología del Hospital para recibir dicho tratamiento, y en otros casos, fue la propia familia del paciente la que lo rechazó.

4).- RESULTADOS

RESULTADOS

El grupo de estudio comprende 252 muestras de tejido colorrectal (63 x 4) en las que se han realizado 504 determinaciones, pertenecientes a 63 pacientes portadores de carcinoma colorrectal intervenidos por el doctorando, en el período comprendido entre Julio de 1.990 hasta Julio de 1.994, que incluyen todos los estadios de Dukes y diversas localizaciones. Se realizó durante este período de tiempo, para tener un número suficiente de enfermos con un seguimiento óptimo, de al menos 2 años. El estudio global comprendió, en un principio, 87 enfermos, desestimando 22 en los que por deterioro de las muestras o pérdidas de las mismas durante la manipulación, no pudimos realizar las 8 determinaciones por paciente, motivo del trabajo, y otros 2 por no ser Adenocarcinomas, y por tanto, tener pronóstico distinto.

EDAD

La edad media de los 63 pacientes fue de 67,33 años, con un mínimo de 45 y un máximo de 85. La distribución por décadas puede verse en la figura 3, en la que se aprecia un máximo entre los 61 y 70 años.

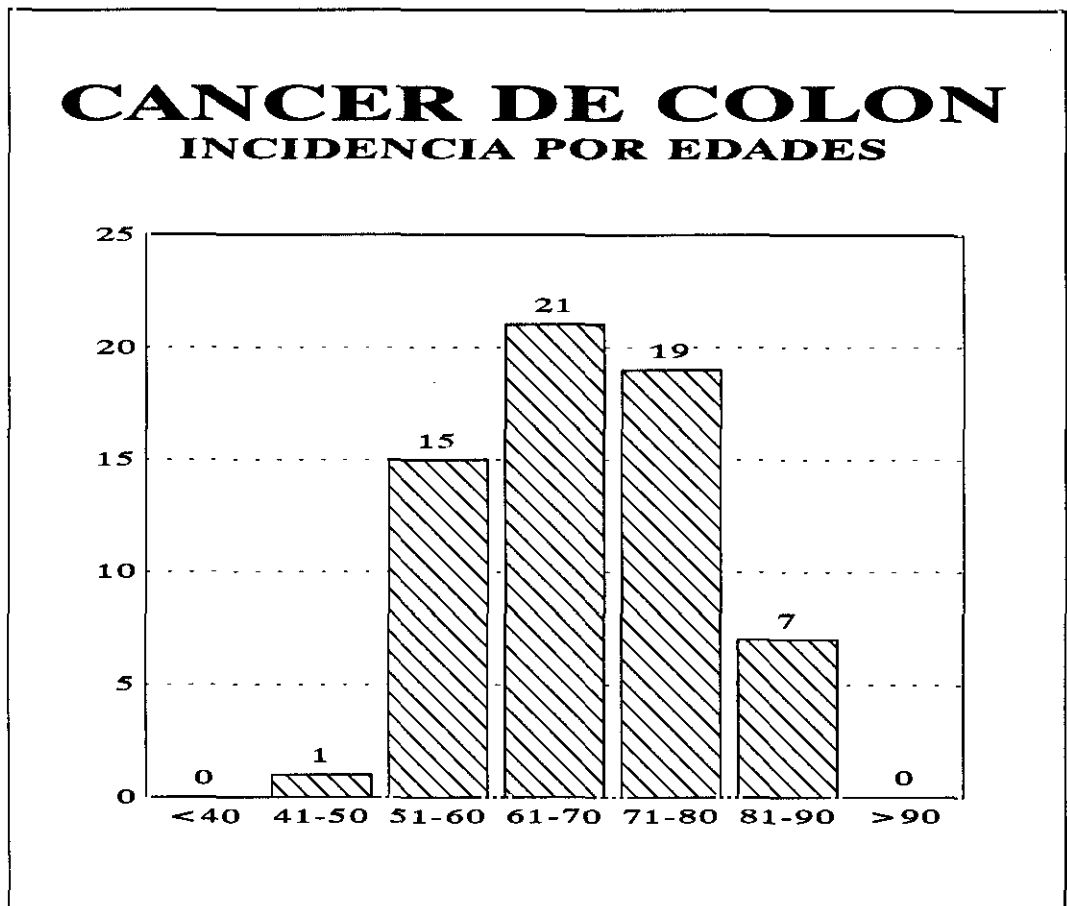


Fig. 3. Distribución por edades

SEXO

Los 63 pacientes se han distribuido en 35 hombres (55,6%) y 28 mujeres (44,4%) (figura 4). No han existido diferencias en cuanto a la edad respecto del sexo, con una edad media en los hombres de 68,5 años y de 66,5 en las mujeres (figura 5).

LOCALIZACIÓN

Respecto a las distintas localizaciones, encontramos 31 pacientes con cáncer de colon (49,2%) y 32 pacientes con cáncer de recto (50,8%), distribuidos de la siguiente manera: ningún cáncer de ciego (0%), 2 tumores en colon ascendente (3,2%), en ángulo hepático, 4 casos (6,3%), 1 caso en colon transversal (1,6%), 5 en ángulo esplénico (7,9%), 1 en colon izquierdo o descendente (1,6%), 18 tumores en sigma (28,6%), 10 localizados en el recto alto (15,9%) y finalmente, 22 en recto bajo (34,9%). (figuras 6 y 7)

No se han encontrado grandes diferencias entre las distintas localizaciones y las edades de los pacientes. Únicamente ha sido significativo la edad más temprana de presentación en los carcinomas del colon derecho, con una media de 52 años, respecto a la media de edad de los localizados en sigma, con un valor significativo de $p < 0.05$ (figura 8)

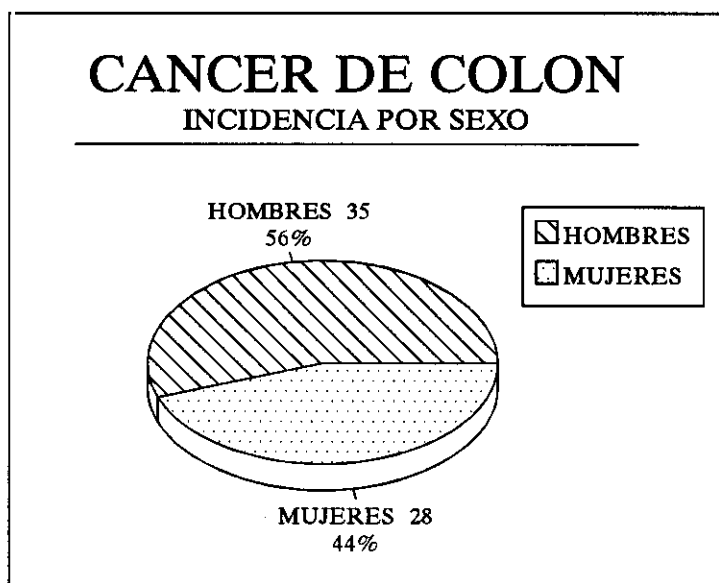


Figura 4: Distribución por sexos

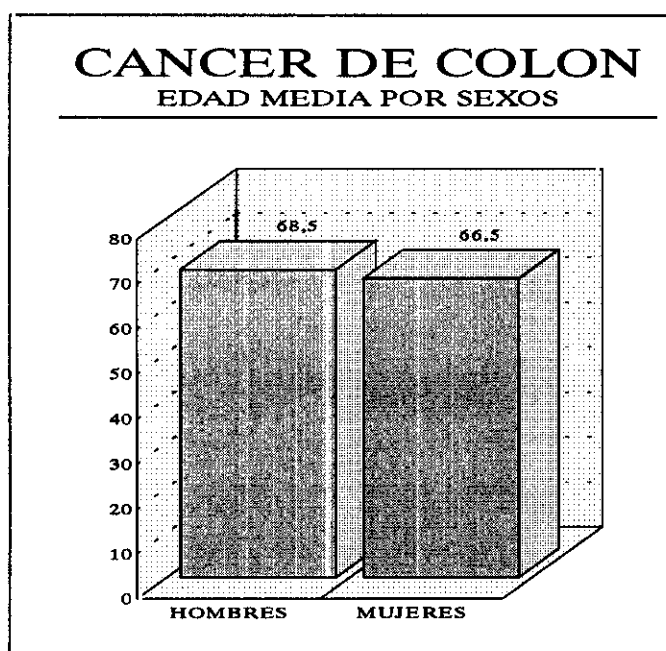


Figura 5: Edad media por sexos.

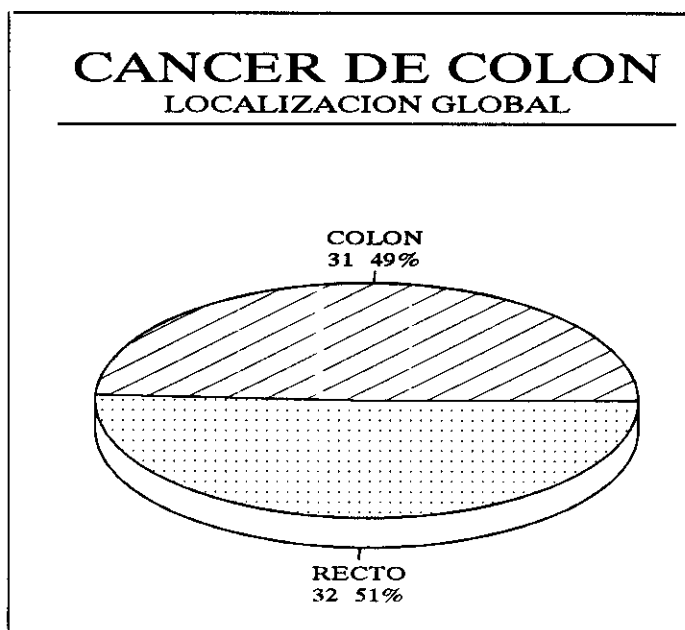


Figura 6: Distribución de los tumores de colon, según su localización global.

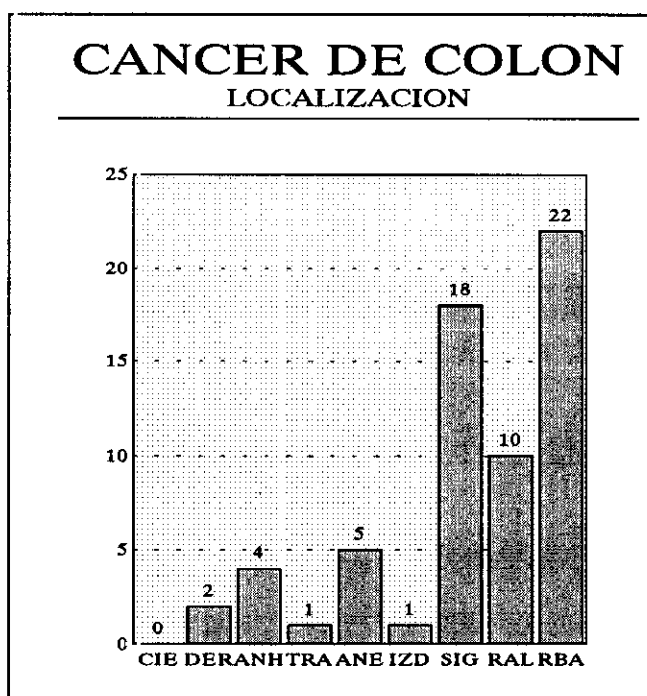


Figura 7: Distribución de los casos según localizaciones.

En la figura 9 vemos las frecuencias de las distintas localizaciones según el sexo, siendo como se ve, más frecuentes los cánceres de la mitad derecha del colon en los hombres que en las mujeres.

CLASIFICACIÓN DE DUKES

Según la clasificación de Dukes, hemos encontrado 3 pacientes en Estadío A (4,7%), 31 pacientes en Estadío B (49,2%), 22 pacientes en Estadío C (35,0%) y 7 pacientes en Estadío D (11,1%), como muestra la figura 10.

CLASIFICACIÓN DE ASTLER Y COLLER

Según la clasificación de Astler y Coller, hemos encontrado 3 pacientes en Estadío A (4,8%), 1 solo caso en Estadío B1 (1,6%), 30 casos en Estadío B2 (47,6%), ningún caso en Estadío C1 (0%), 22 casos en Estadío C2 (34,9%) y 7 casos en Estadío D (11,1%) (figura 11).

GRADOS DE DIFERENCIACIÓN (BRODERS)

Atendiendo al grado de diferenciación del tumor descrito por A BRODERS (23), los 63 pacientes se han distribuido de la siguiente manera: 3 han

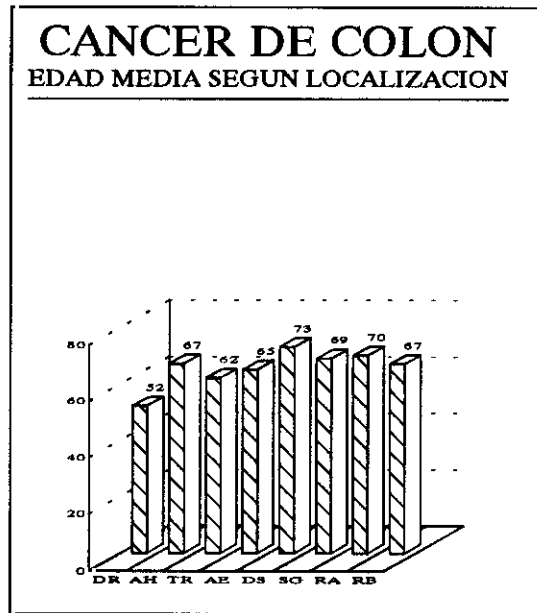


Figura 8: Edad media por localización

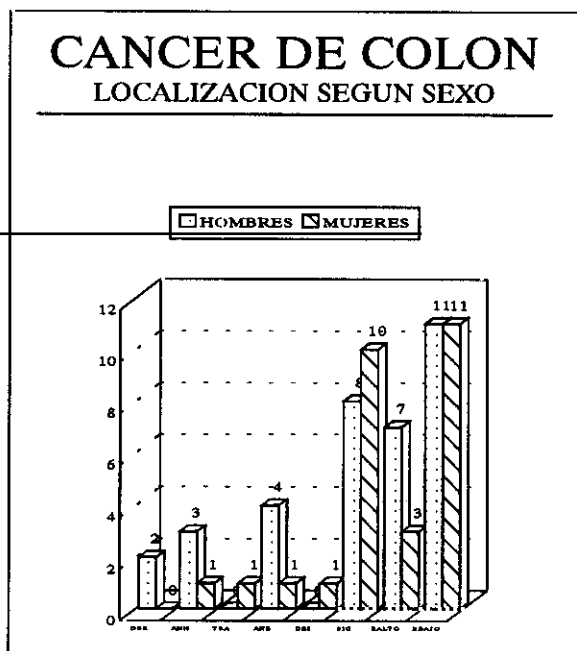


Figura 9: Localización según sexo

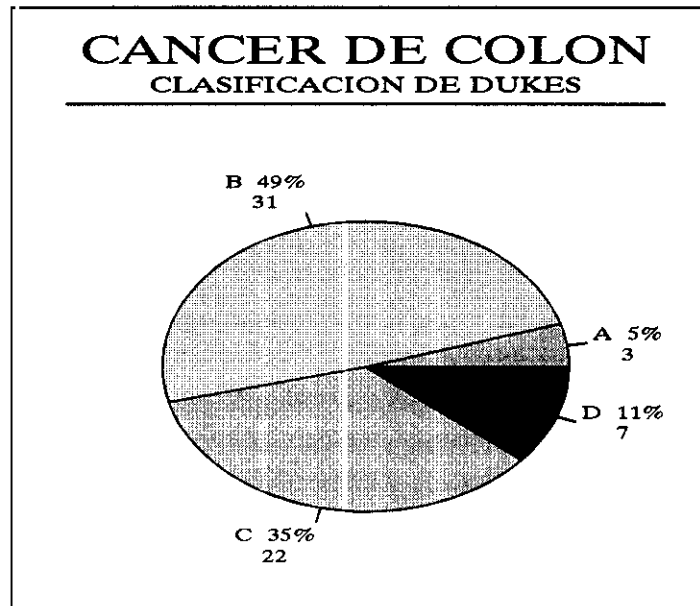


Figura 10: Distribución según clasificación de Dukes.

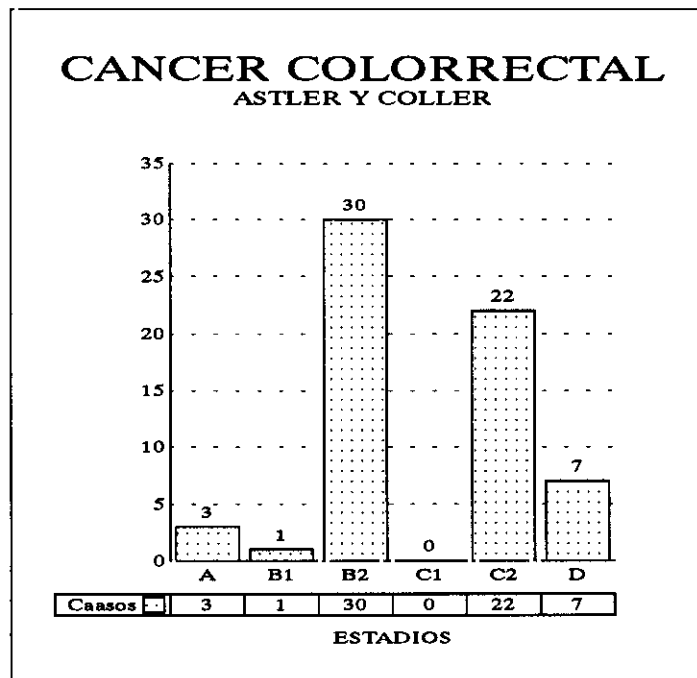


Figura 11: Distribución según clasificación de Astler y Coller.

sido pobremente diferenciados (4,8%); 23 lo han sido medianamente diferenciados (36,5%) y 37 lo han sido bien diferenciados (58,7%) (figura 12).

Nº DE GANGLIOS AFECTADOS COMO FACTOR PRONÓSTICO

La media de ganglios aislados en los 63 pacientes ha sido de 13,22, con un máximo de 33 y un mínimo de 4. No ha habido diferencia de la media de ganglios aislados respecto a las recidivas, con una media de ganglios aislados en los pacientes que han sufrido recidivas de 13,41. Así mismo, tampoco hay relación con los enfermos fallecidos, con una media de ganglios aislados en estos enfermos de 13,79.

Dentro de los 29 pacientes en Estadios C y D, solamente 27 presentaron ganglios positivos, ya que 2 pacientes con estadios D no los presentaron. De los 27 con ganglios positivos, 16 (59,3%) de ellos presentaron menos de 3 ganglios positivos, mientras que 11 (40,7%), presentaron más de 3 ganglios positivos (figura 13).

De los 22 casos con estadios C, 14 de ellos (63,6%) presentaron menos de 3 ganglios positivos, mientras que los 8 restantes, presentaron más de 3 (figura 14).

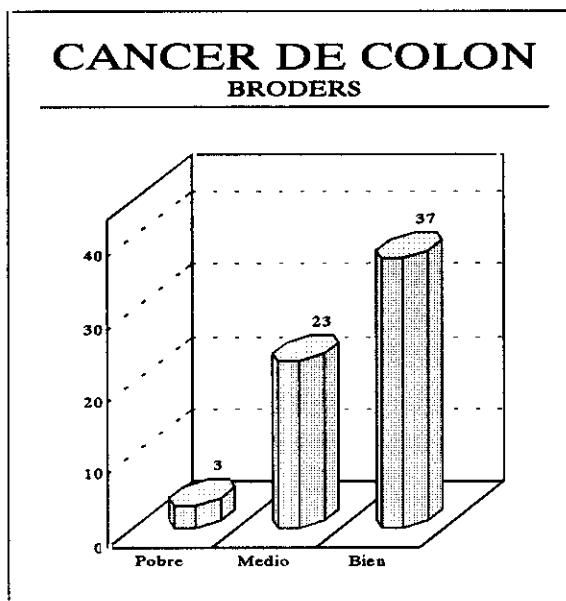


Figura 12: Distribución según grados de diferenciación de Broders.

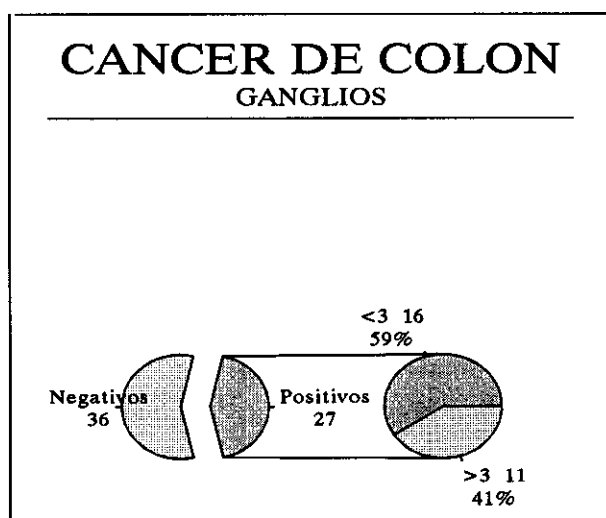


Figura 13: Distribución del número de ganglios positivos o negativos.

ANASTOMOSIS

De los 63 pacientes, en 12 (19,0%) de ellos se realizó amputación abdominoperineal, y por lo tanto, ano ilíaco definitivo. En el resto de los pacientes, se realizaron 33 (52,4%) anastomosis mecánicas, frente a 18 (28,6%) anastomosis manuales (figura 15).

TRATAMIENTO COADYUVANTE

De los 63 pacientes, 31 (49,2%) recibieron tratamiento coadyuvante consistente en QT si el tumor era de colon y QT + RT si era de recto. El resto, 32 pacientes (50,8%) no lo recibieron, bien por no estar indicado, o por desestimarse por edad o situación general del paciente (figura 16).

EXITUS

Los pacientes fallecidos en el seguimiento han sido 18 (28,6%), que se han repartido de la siguiente manera: 2 (3,2%), en el postoperatorio inmediato; 14 (22,2%) por causa de la enfermedad y 2 (3,2%) por otra causa ajena a la enfermedad (figura 17).

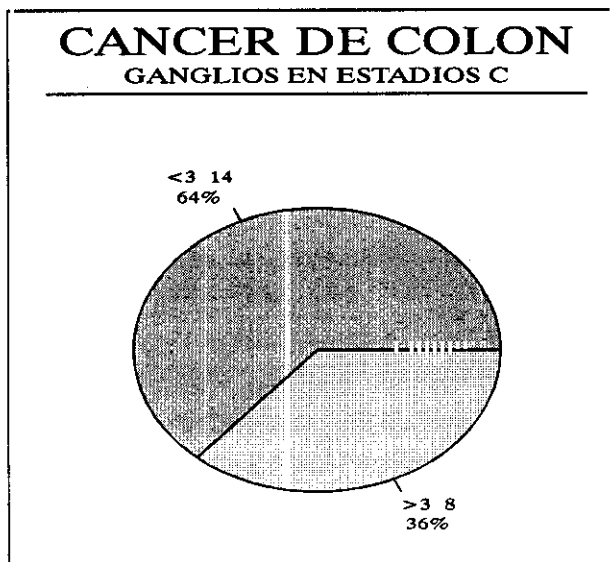


Figura 14: Relación de nº de ganglios en el estadio C

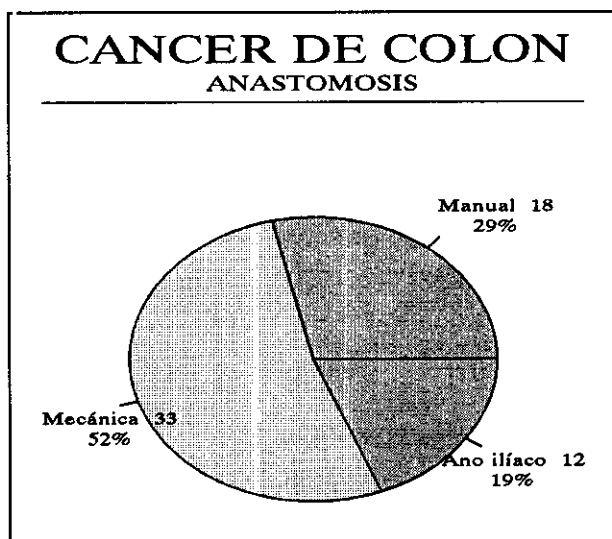


Figura 15: Tipos de anastomosis realizadas.

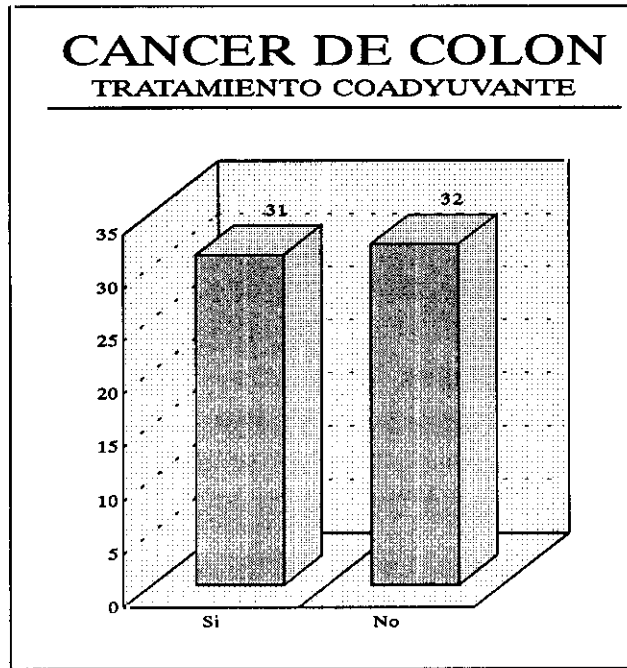


Figura 16: Pacientes que recibieron tratamiento coadyuvante.

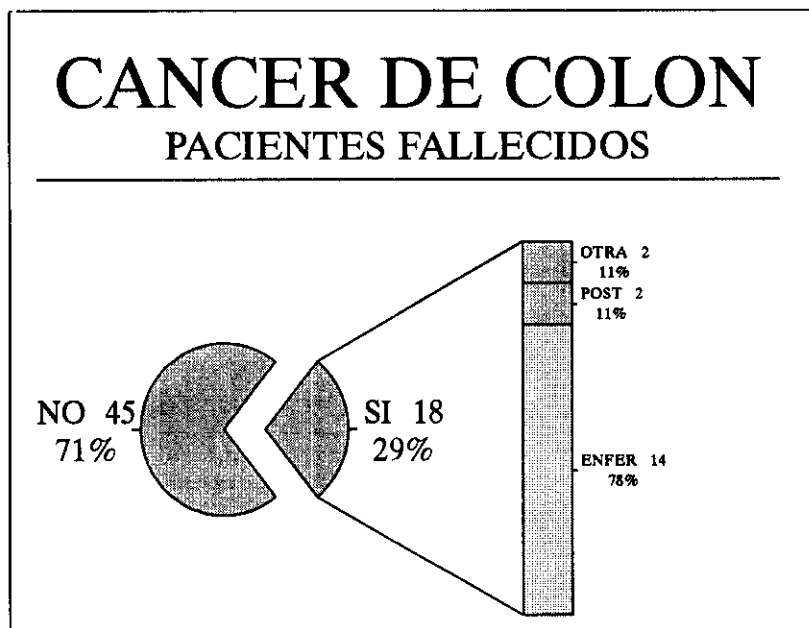


Figura 17: Pacientes fallecidos y sus causas

La expectativa de vida de estos pacientes, después de la intervención y excluyendo a los 2 pacientes que fallecieron en el postoperatorio inmediato, ha sido de $28,8 \pm 3,5$ meses, con un mínimo de 2,6 y un máximo de 63,7 meses.

En cuanto a la relación con los estadios de Astler y Coller, no ha fallecido ningún paciente con estadios A o B1, mientras que han fallecido 8 de 30 con estadios B2, con una vida media de 25,6 meses; 7 de 15 con estadios C2, con una vida media de 25,5 meses y 3 de 7 con estadios D con una vida media de 20,1 meses (figura 18). No hemos encontrado diferencias significativas entre las expectativas de vida de los enfermos que fallecieron y los estadios de Dukes ni Astler y Coller.

RECIDIVAS

De los 63 pacientes intervenidos hemos encontrado 17 pacientes (26,9%) que han recidivado, mientras que el resto, 46 (73,1%), continúan libres de recidivas al momento de cerrar el estudio (31 de Octubre de 1995).

De los 17 pacientes recidivados, 7 (11,1%) lo hicieron locorregionalmente, considerando también aquellas recidivas presacras en enfermos que han sufrido una amputación abdominoperineal. 8 pacientes (12,6%) han sufrido a lo largo del seguimiento aparición de metástasis a distancia y 2 pacientes (3,2%) han

presentado tumores metacrónicos, que han sido reintervenidos con carácter curativo y están vivos en la actualidad y libres de enfermedad (figura 19).

De las 17 recidivas encontradas, 12 de ellas (70,6%) han aparecido durante los 2 primeros años de seguimiento, mientras que las otras 5 (29,4%) lo han hecho después de los 2 años.

Respecto a la localización de los tumores primitivos en los 7 pacientes con recidivas locorregionales, 2 (3,2%) lo presentaban en recto alto y 5 (7,9%) en recto bajo. En el resto de las localizaciones no hemos hallado ninguna recidiva locorregional (figura 20).

No ha ocurrido así con los 8 pacientes que desarrollaron metástasis a distancia, en que 2 enfermos portadores de cáncer de colon (3,2%) las han desarrollado así como 2 que lo tenían localizado en el recto alto (3,2%) y 4 en el recto bajo (6,3%). Los 2 enfermos que desarrollaron un cáncer metacrónico, tenían localizado el tumor primitivo en el recto alto (figura 21).

No pudimos hallar diferencias en cuanto a la posible relación existente entre el tipo de anastomosis y la presencia de recidivas locorregionales, ya que todos los pacientes con recidiva locorregional, tenían el tumor primitivo

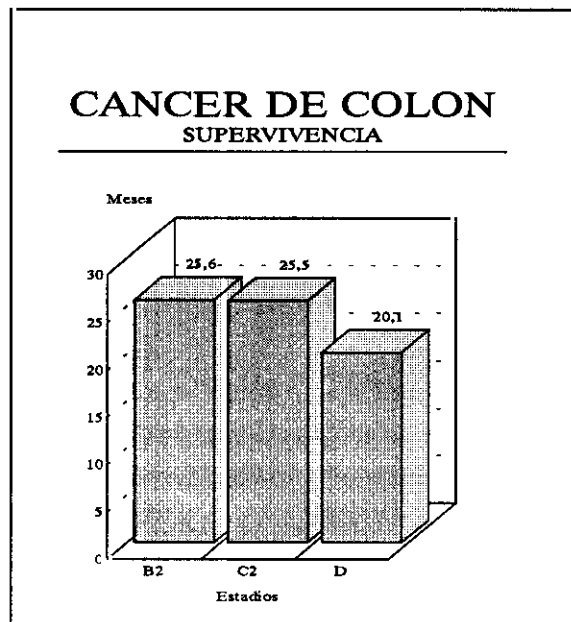


Figura 18: Expectativa de vida en los pacientes fallecidos.

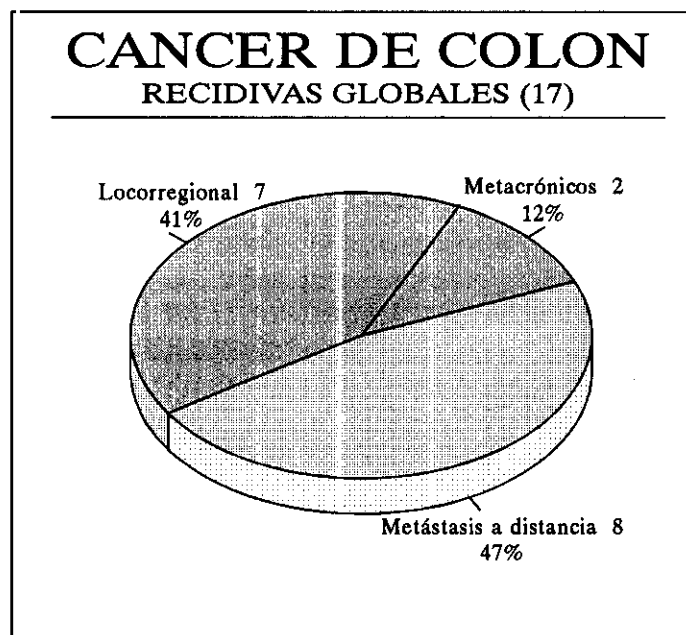


Figura 19: Índice global de recidivas.

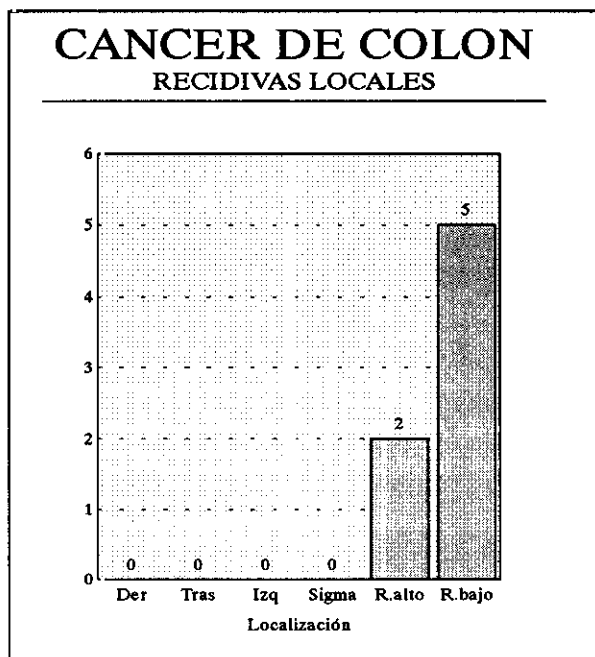


Figura 20: Localización de las recidivas locales.

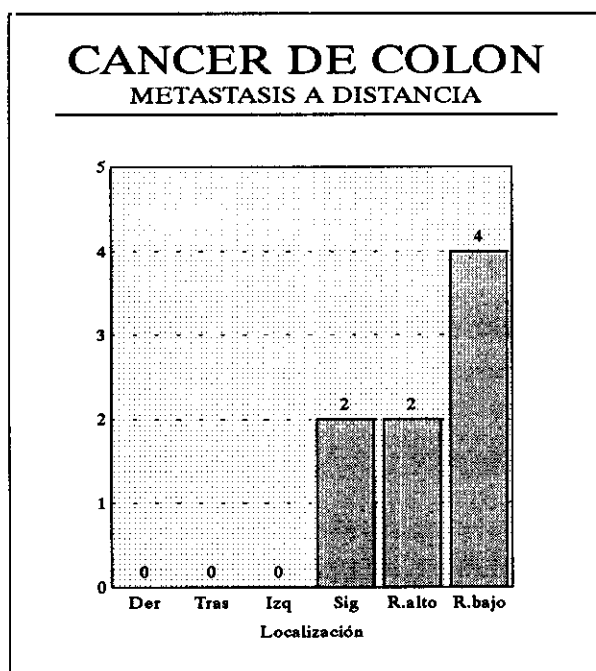


Figura 21: Localización primitiva en la Mx a distancia.

localizado en el recto y a todos se les practicó la anastomosis con sutura mecánica Proximate CDH 33 o se les realizó una amputación abdominoperineal.

Sí encontramos mayor índice de recidivas locorregionales en aquellos cánceres rectales a los que les practicamos resección anterior (5/20 (25%)) que en aquellos a los que practicamos amputación abdominoperineal (2/12 (16,6%)) aunque sin significación estadística (figura 22).

No hemos encontrado diferencias significativas entre el número de ganglios positivos y el índice de recidivas locorregionales, con 3 pacientes (4,8%) con ganglios positivos, 2 pacientes (3,2%) con menos de 3 ganglios y 2 pacientes (3,2%) con más de 3 ganglios (figura 23). Tampoco las hemos hallado cuando comparamos el número de ganglios con las recidivas globales, con 10 pacientes (58,8%) con ganglios negativos, 4 con menos de 3 ganglios positivos (23,5%) y 3 con más de 3 ganglios positivos (17,6%).

Respecto a los estadios de Astler y Coller, hemos hallado que 3 de los 7 pacientes con recidiva locorregional (42,8%) presentaban un estadio B2 mientras que los otros 4 (57,2%) presentaban un estadio C2. Sin embargo, hay que reseñar que de los 3 pacientes que tenían un estadio B2, 2 (66,6%) tenían infiltración de la grasa perivisceral en el estudio histopatológico, y 3 de los 4 C2 (75%), tenían también infiltración de la grasa perivisceral. (figuras 24 y 25).

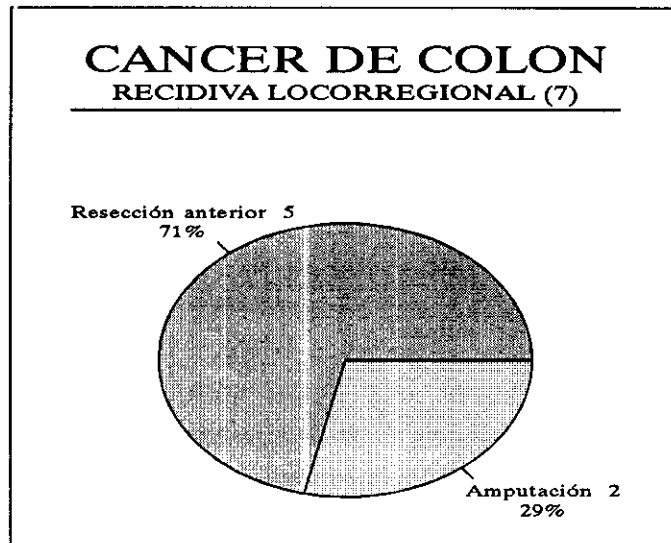


Figura 22: Tipo de intervención y recidiva locorregional.

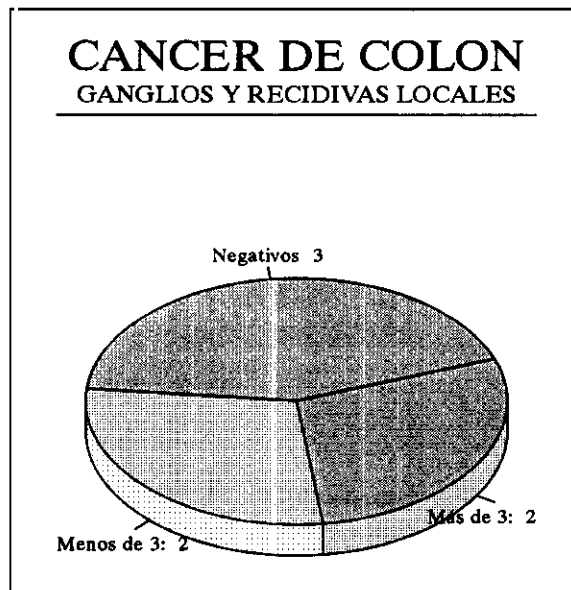


Figura 23: Distribución de recidivas locorregionales y nº de ganglios positivos

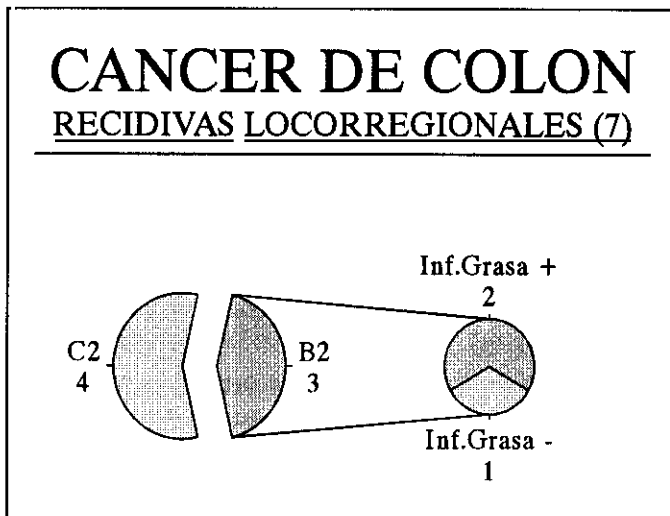


Figura 24: Recidiva local y Estadio (1)

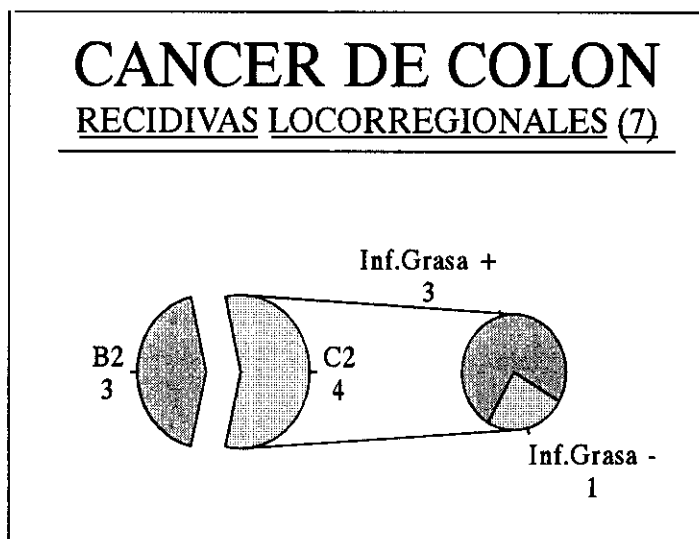


Figura 25 Recidiva local y Estadio (2)

Los grados de diferenciación de **Broders** no se han mostrado de acuerdo con las recidivas locorregionales, pues ningún mal diferenciado nos ha recidivado, mientras 5 (71,4%) recidivas eran moderadamente diferenciados y 2 (28,6%) bien diferenciados (figura 26).

En cuanto a las recidivas globales, tampoco hemos encontrado diferencias significativas, pues ha recidivado 1 tumor pobremente diferenciado de 3 casos (33,3%), 6 de 23 casos medianamente diferenciados (26.1%) y finalmente, 10 de 37 bien diferenciados (27.03%).

De las 7 recidivas locorregionales halladas, solo reintervenimos 2 (28,5%), y ambas con criterios paliativos, no curativos. Las otras 5 (71,5%) correspondían a grandes masas de recidiva tumoral presacras que consideramos inoperables (figura 27).

El tiempo medio que se tardó en diagnosticar la recidiva, tanto locorregional como la aparición de metástasis a distancia o la aparición de un tumor metacrónico, fue de 17,9 meses, con un mínimo de 4,9 meses y un máximo de 35,9 meses. En lo referente al tiempo medio de aparición o de diagnóstico de la recidiva locorregional fue de 14,2 meses, con un mínimo de 4,9 meses y un máximo de 33,8 meses. El tiempo que transcurrió entre la intervención quirúrgica y el diagnóstico de una recidiva locorregional en los 7 pacientes afectados de la

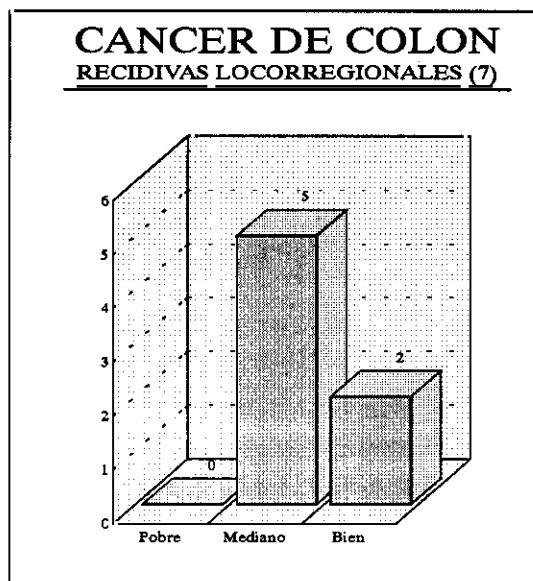


Figura 26: Recidivas localregionales según diferenciación de Broders

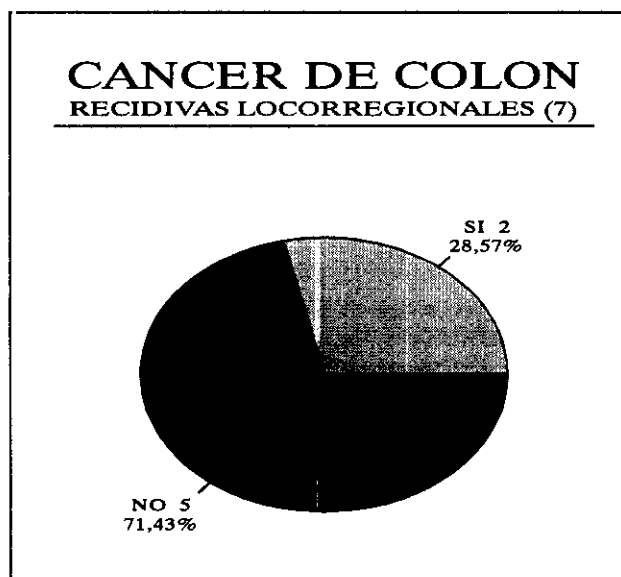


Figura 27: Reintervenciones en las recidivas localregionales

misma, se detalla en la figura 28, donde además se acompaña del tiempo de supervivencia de estos pacientes.

DETERMINACIÓN DEL CA 19.9

A todas las muestras de tejido obtenidas según el método explicado anteriormente, se les hizo determinación en tejido de CA 19.9. Como ya hemos comentado, del número de casos iniciales, se desestimaron aquellos en los que no obtuvimos cuantificación de CA 19.9 en las 4 muestras, y los que no fueron Adenocarcinomas.

Valores medios de las distintas muestras.

La media del marcador hallada en el **tejido tumoral**, fue de 2.775,7 U/mg de proteína, con un intervalo de confianza ($p < 0.05$) para la media de $\pm 1.285,1$. La media hallada para las muestras del que denominamos **tejido normal**, fue de 376,9 U/mg de proteína, con un intervalo de confianza ($p < 0.05$) para la media de $\pm 162,3$. La media hallada en las muestras determinadas en el **borde oral** de la pieza de resección fue de 284,6 U/mg de proteína con un intervalo de confianza ($p < 0.05$) para la media de $\pm 144,5$. Finalmente, la media hallada en las muestras que marcamos como **borde anal**, fue de 163,1 U/mg de

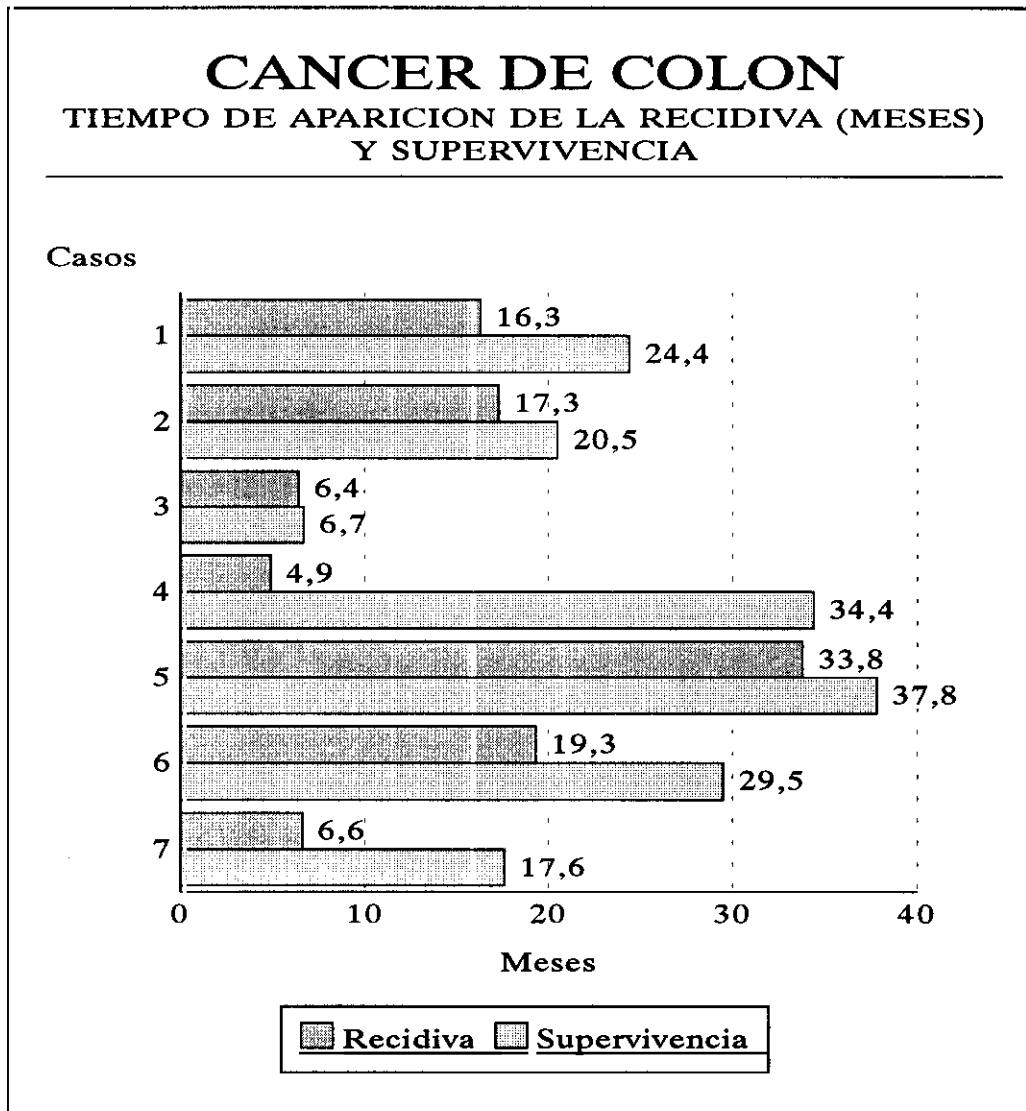


Figura 28: Tiempo de aparición de las recidivas locorregionales y expectativas de vida de los mismos pacientes.

proteína con un intervalo de confianza ($p < 0.05$) para la media de $\pm 57,1$ (Tabla 6), (figura 29). En la tabla 7 mostramos los distintos percentiles para los distintos valores de las muestras analizadas.

Comparados entre sí los valores hallados, encontramos significación estadística $p < 0.001$ cuando lo hacemos entre los valores hallados en las piezas obtenidas del tumor, comparadas con las otras 3 muestras. Comparados el valor del CA 19.9 en el borde anal con las otras 3 muestras, los valores de significación han sido $p < 0.01$.

Con respecto a las distintas localizaciones de los tumores en nuestra casuística, no hemos encontrado diferencias marcadas del CA 19.9 medido en el citosol de la **célula tumoral** en los carcinomas de colon derecho, con respecto a los de colon izquierdo y recto, con unos valores parciales para las distintas localizaciones que se reflejan en la tabla 8 (fig 30). Estos valores han sido, para los derechos, de 3740,3 U/mg de proteína $\pm 1576,5$; las muestras determinadas en los izquierdos han revelado unos valores medios de 1560,4 U/mg de proteína $\pm 477,6$; finalmente, las muestras de los carcinomas rectales han presentado unos valores medios de 3476,2 U/mg de proteína $\pm 1175,2$, sin significación estadística.

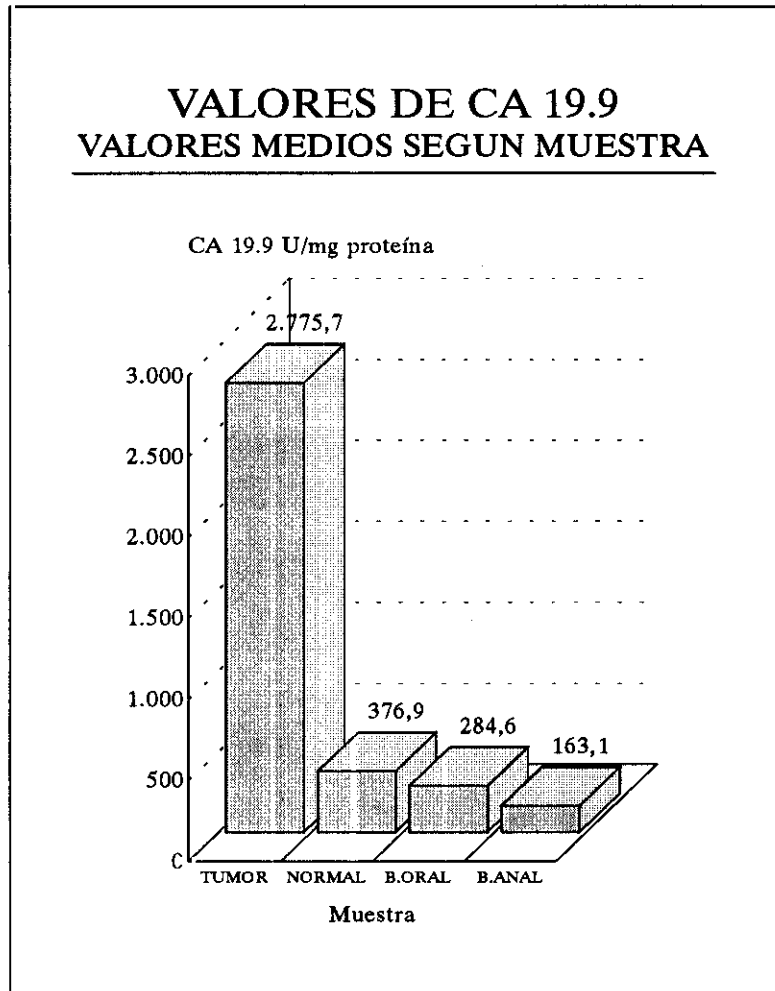


Figura 29: Valores medios del CA 19.9 según las distintas muestras obtenidas.

TABLA 6

VALORES DE CA 19.9

MUESTRA	VALOR MEDIO
TEJ. TUMORAL	2.775,7 ± 1.285,1
TEJ. NORMAL (15mm)	376,9 ± 162,3
TEJ. BORDE ORAL	284,6 ± 144,5
TEJ. BORDE ANAL	163,1 ± 57,1

TABLA 7

PERCENTILES CA 19.9

	CA 19.9 T	CA 19.9 N (15 cm)	CA 19.9 BO	CA 19.9 BA
Perc. 5	9,4	9,35	4,8	2,4
Perc. 10	13,1	10,4	11,2	4,2
Perc. 25	233,8	32	20,9	17,1
Perc. 50	679,9	122,3	78	49,4
Perc. 75	2368,9	411,9	164,3	227
Perc. 90	7856,4	883,6	897,8	338,2
Perc. 95	17825,31	1794,6	1431,7	728,4

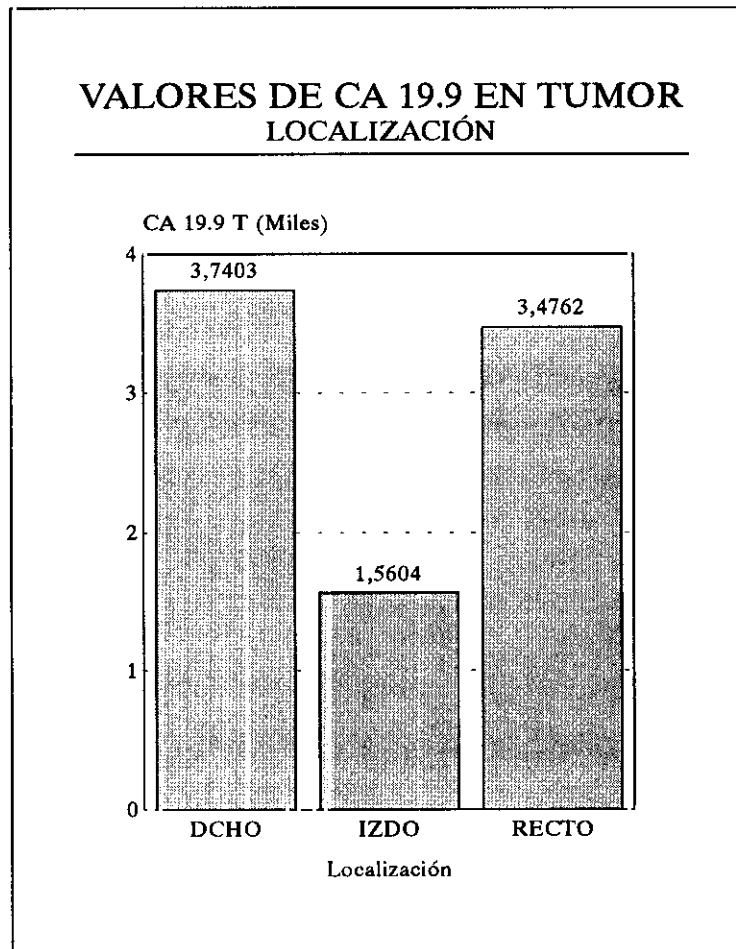


Figura 30: Valores del CA 19.9 en citosol de tumor, según las distintas localizaciones globales

Tabla 8

VALORES DE CA 19.9 TUMOR POR LOCALIZACIONES

LOCALIZACION	VALOR MEDIO
DERECHO	3740,3 ± 1576,5
IZQUIERDO	1560,4 ± 477,6
RECTO	3476,2 ± 1175,2

Tabla 9

VALORES DE CA 19.9 EN TEJIDO NORMAL POR LOCALIZACIONES

LOCALIZACION	VALOR MEDIO
DERECHO	660,7 ± 436,1
IZQUIERDO	265,5 ± 81,4
RECTO	398,6 ± 110,1

Similar distribución hemos encontrado en los valores medios del CA 19.9 medido en las muestras recogidas a unos 15 cm del borde proximal del tumor, esto es, en mucosa colónica que consideramos como **normal**, cuyos valores medios quedan reflejados en la tabla 9. Al igual que en la célula tumoral, los valores medios más altos se han hallado en los carcinomas del colon derecho (660,7 U/mg de proteína \pm 436,1), frente a los de colon izquierdo (265,5 U/mg de proteína \pm 81,4) y recto (398,6 U/mg de proteína \pm 110,10), aunque sin significación estadística.

Tampoco la ha habido cuando la determinación la hacemos sobre las células de colon del **borde oral**, donde no hemos encontrado diferencias en sus valores medios, con un CA 19.9 en los carcinomas del colon derecho de 239,9 U/mg de proteína \pm 152,4, de 300,9 U/mg de proteína \pm 136,7 en los del colon izquierdo y de 282,2 U/mg de proteína \pm 99,6 en los del recto (tabla 10).

Así mismo, la misma nula relación hemos encontrado cuando la determinación la realizamos en el **borde anal**, con valores medios de 203,1 U/mg de proteína \pm 116,5 para los carcinomas de colon derecho, valores medios de 124,2 U/mg de proteína \pm 47,2 para los de colon izquierdo y de 183,4 \pm 63,4 para los de recto (tabla 11).

Tabla 10

VALORES DE CA 19.9 EN BORDE ORAL, POR LOCALIZACIONES

LOCALIZACIÓN	VALOR MEDIO
DERECHO	239,9 ± 152,4
IZQUIERDO	300,9 ± 136,7
RECTO	282,2 ± 99,6

Tabla 11

VALORES DE CA 19.9 EN BORDE ANAL, POR LOCALIZACIONES

LOCALIZACIÓN	VALOR MEDIO
DERECHO	203,1 ± 116,5
IZQUIERDO	124,2 ± 47,2
RECTO	183,4 ± 63,4

Relación del CA 19.9 con el número de ganglios positivos.

Cuando determinamos la cantidad de CA 19.9 contenida en el citosol de la **célula tumoral**, encontramos diferencias marcadas entre los valores hallados en aquellos pacientes con estadios C que presentaban más de 3 **ganglios** positivos (6.199,1 U/mg de proteína \pm 2.247,2) respecto a aquellos que presentaban menos de 3 ganglios positivos (1.251,1 U/mg de proteína \pm 411,9). Prácticamente similar ha sido la diferencia, aunque no tan marcada, cuando comparamos los valores medios de los tumores con más de tres ganglios positivos, con los casos en los que no tenían ganglios positivos, en los que la media del CA 19.9 en el citosol del tumor ha sido de 2.407,1 U/mg de proteína \pm 746,4 (figura 31). Ambas muestras comparadas mediante el Anova, reflejan una significación estadística $p < 0.05$.

Ninguna relación hemos encontrado al analizar el comportamiento de las otras 3 determinaciones con respecto al número de ganglios.

Relación entre el CA 19.9 y los Estadios de Dukes.

Intentamos ver la relación existente entre las distintas determinaciones del CA 19.9 en las 4 muestras de cada pieza y la clasificación por estadios de Dukes. Como vemos en la figura 32, a medida que el estadio de Dukes va

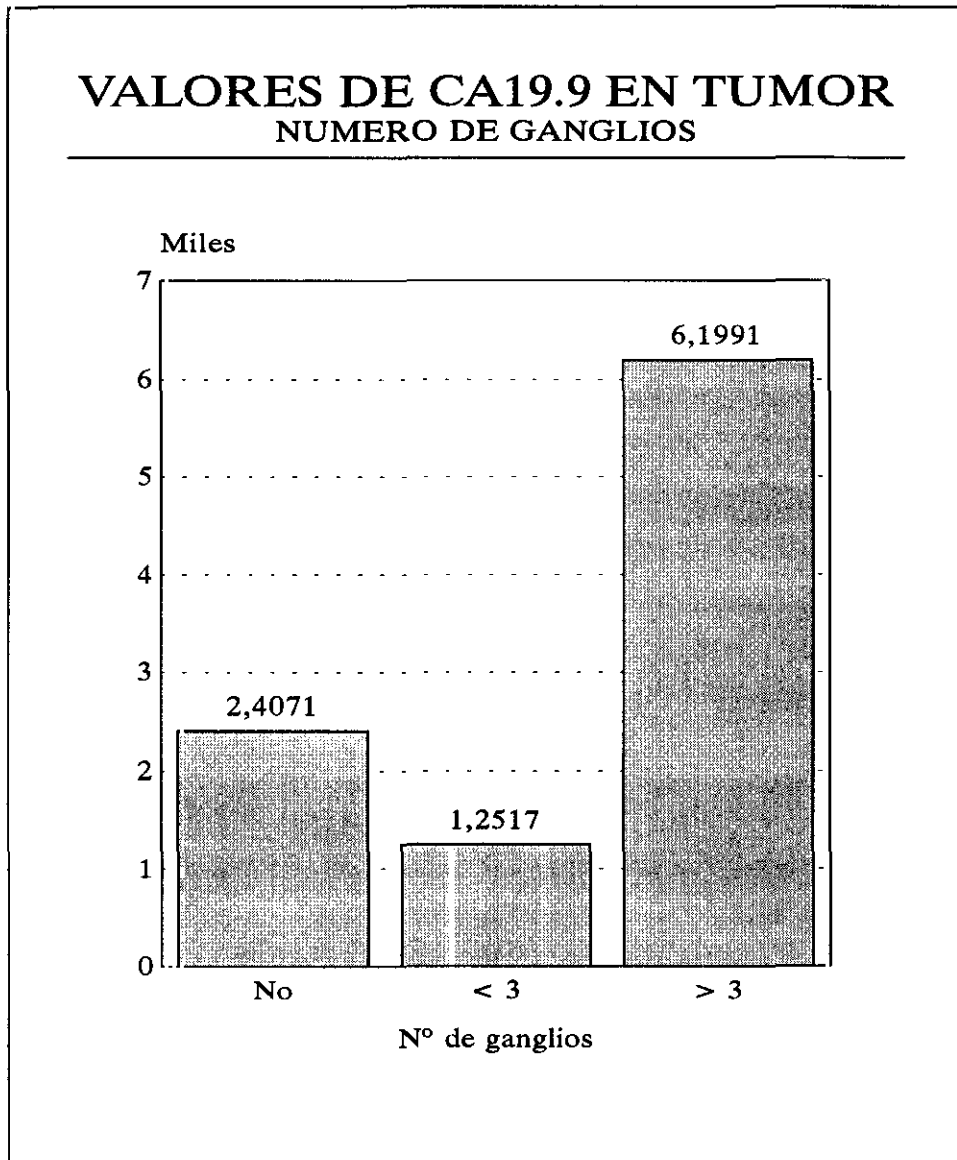


Figura 31: Valores medios del CA 19.9 en el tejido tumoral, y su relación con el número de ganglios positivos de la pieza

empobreciendo el pronóstico, vemos como el marcador detectado en la **célula tumoral**, va aumentando su valor hasta hacerse de 4.252,5 U/mg de proteína \pm 2.576,3 en los estadios D, frente a 548,4 U/mg de proteína \pm 82,8 en los estadios A, pasando por 1.929,6 U/mg de proteína \pm 672,6 en los B y 3.832,5 U/mg de proteína \pm 1.361,4 en los estadios C (tabla 12), con una significación estadística comparando los estadios A con el resto, de $p < 0.05$. Cuando comparamos los estadios B con los estadios C, ya que los estadios A sabemos que prácticamente no van a recaer y los estadios D van a tener un peor pronóstico, no encontramos significación estadística entre las diferencias de valores del CA 19.9 en la célula tumoral.

Tampoco hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas cuando determinamos el marcador en el **tejido normal** para los Estadios B y C, encontrando unos valores medios de 347,3 U/mg de proteína \pm 115,4 en los estadios B y de 407,7 U/mg de proteína \pm 154,4 en los estadios C.

Cuando la determinación del marcador la realizamos en el **borde oral**, la expresión del mismo es muy similar en su distribución a las otras determinaciones en las otras muestras, con unos valores medios para el estadio B de 343,2 U/mg de proteína \pm 65,2 y para los estadios C de 213,3 U/mg de proteína \pm 72,4 sin significación estadística. Al igual que en las anteriores, los valores de las distintas determinaciones de las muestras en el **borde anal** llevan

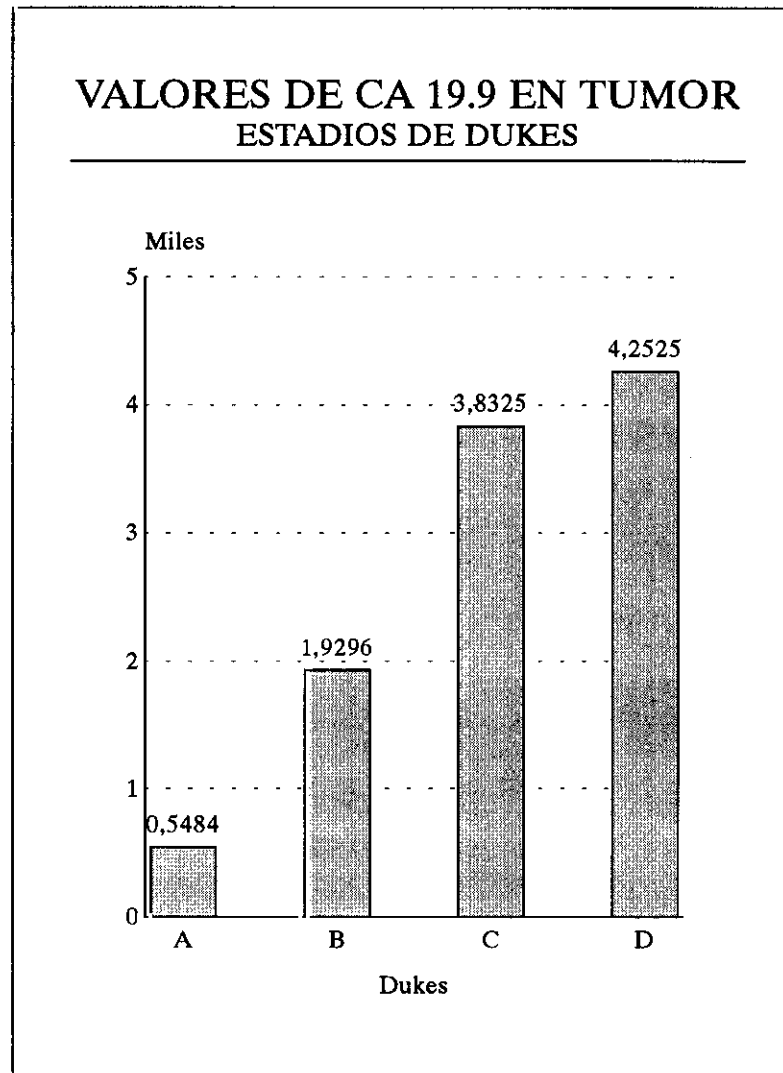


Figura 32: Valores de CA 19.9 en Tejido tumoral y su relación con los Estadios de Dukes ($p < 0.05$)

Tabla 12

VALORES DE CA 19.9 SEGÚN ESTADIOS DUKES

	TUMOR	NORMAL	B. ORAL	B. ANAL
A	548,4 ± 82,8	171,9 ± 105,5	36 ± 19,2	81,6 ± 57,5
B	1929,6 ± 672,6	347,3 ± 115,4	343,2 ± 65,2	128,7 ± 41,6
C	3832,5 ± 1361,4	407,7 ± 154,4	213,3 ± 72,4	166,8 ± 40
D	4252,5 ± 2576,3	456,8 ± 145,6	328,3 ± 68,7	113,8 ± 41

una distribución similar, con unos valores medios de CA 19.9 en los estadios B de 128,7 U/mg de proteína \pm 41,6 y de 166,8 U/mg de proteína \pm 40,7 en los estadios C (tabla 12), también sin significación estadística.

Valores de CA 19.9 y estadios de Astler y Coller.

Una distribución similar a la encontrada cuando relacionamos los valores del CA 19.9 en las distintas muestras y los estadios de Dukes, hemos encontrado cuando los relacionamos con los estadios de Astler y Coller. Dado que en nuestra casuística solo hemos tenido 1 caso clasificable entre los B1 de Astler y Coller y ningún caso C1, los resultados son prácticamente superponibles a cuando los relacionamos con los estadios de Dukes.

Relación del CA 19.9 y el índice de recidivas.

Para intentar comprobar la existencia de una relación entre los valores del marcador y la aparición de recidivas, hemos comparado dos medias: valores de CA 19.9 en tejido tumoral para aquellos pacientes que han recidivado y para aquellos que no lo hicieron, encontrando unos valores medios de 5.828,3 U/mg de proteína \pm 2.059,8 para los primeros, frente a unos valores medios de 856,2 U/mg de proteína \pm 138,4, con una significación estadística de $p < 0.05$ (figura 33). Cuando hemos comparado de la misma forma los valores del marcador

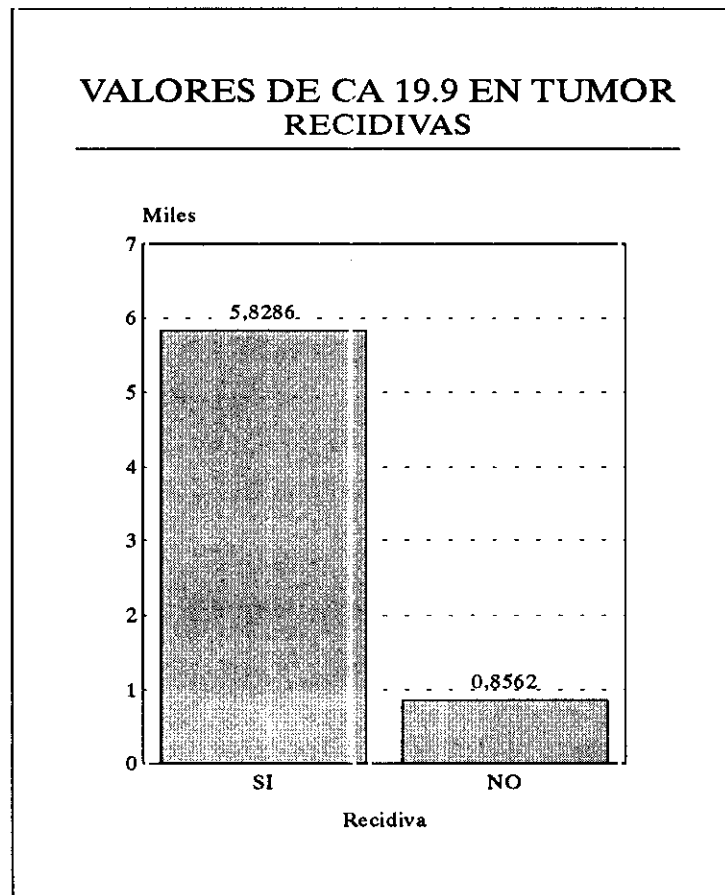


Figura 33: Valores medios de CA 19.9 en tejido tumoral y presencia o no de recidivas ($p < 0.05$)

en las otras muestras, esto es, en el tejido normal, en el borde oral y en el borde anal, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas (tabla 13). Los valores hallados han sido de 417,6 U/mg de proteína \pm 167,4 para el marcador en el tejido normal y si recidivados, frente a 357,4 U/mg de proteína en los no recidivados; de 278,6 U/mg de proteína \pm 107,9 para las muestras de marcador en el borde oral y que sí han sufrido recidivas, frente a 284,8 U/mg de proteína \pm 87,6 para las muestras de aquellos pacientes que no sufrieron recidivas y de 98,3 U/mg de proteína \pm 26,1 para las muestras del borde anal de los pacientes que sí sufrieron recidivas, frente a 190,6 U/mg de proteína \pm 49,8 para aquéllos que no recidivaron, sin encontrar diferencias significativas, como hemos dicho anteriormente.

Para evitar una posible influencia del tratamiento coadyuvante sobre el índice de recidivas y los valores de CA 19.9 en tumor, realizamos el análisis de la varianza eliminando la influencia de 1 factor, para estudiar la varianza del CA 19.9 independientemente de si el paciente ha recibido o no tratamiento coadyuvante, encontrando también valores estadísticamente significativos ($p < 0.01$) (tabla 14).

Una vez comprobado que sí existía una significación estadística en los valores del marcador determinados en el tejido tumoral para las recidivas, en el sentido de que los pacientes recidivados presentan un valor de marcador en el

Tabla 13
VALORES DE CA 19.9 Y RECIDIVAS

	SI	NO
CA 19.9 TUMOR	5.828,3 ± 2.059,8	856,2 ± 138,4
CA 19.9 NORMAL	417,6 ± 167,4	357,4 ± 90,1
CA 19.9 B. ORAL	278,6 ± 107,9	284,8 ± 87,6
CA 19.9 B. ANAL	98,3 ± 26,1	190,6 ± 49,8

Tabla 14

ANOVA 2 FACTORES PARA CA 19.9 TUMOR Y TRATAMIENTO COADYUVANTE

TAMAÑOS	SI	NO
SI	10	7
NO	22	26

ANOVA 2 FACTORES: RECIDIVA/TRATAMIENTO COADYUVANTE

FACTOR	VARIANZA	G.L.	F	PR
RECIDIVA	0,075138	1	0,69229	1
TRAT COAD	0,019468	1	0,17937	1
INTERACC.	0,094929	1	0,87464	1
RESIDUAL	0,10854	61		

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS CELDAS

RECID	T COAD	DIFEREN	Q EXPER	R	Niv. Sig.	Q TEOR
2 - 1	1 - 1	0,58222	6,5532	4	P < 0.01	4,5983
2 - 1	2 - 2	0,44764	6,6333	3	P < 0.01	4,5787
2 - 1	1 - 2	0,41364	4,0918	2	P < 0.01	3,759

tejido más alto que en los que no recidivaban, intentamos averiguar si la cantidad de este marcador tenía influencia sobre la presentación de una recidiva más temprana. Para ello, y dado que las dos variables que íbamos a comparar eran cuantitativas, tuvimos que dar al CA 19.9 en el tejido tumoral un valor a partir del cual pudiéramos compararlo. Para hallar el Cutpoint del marcador, tomamos como valor normal el mínimo hallado, que era el del borde anal, más dos veces su desviación típica, o lo que es lo mismo, el percentil 95, resultando un valor de 728 U/mg de proteína, que sorprendentemente corresponde aproximadamente a 20 veces el valor normal del marcador en la sangre. A partir de ahí, hallamos el tanto por uno de las determinaciones del marcador, comparándolas con el valor de Cutpoint de 728 U/mg de proteína (CA 19.9 determinado en el tejido tumoral, dividido por 728). Hecho esto, comparamos los meses que tardaron en aparecer las recidivas, con este valor porcentual, hallando una media de aparición de las recidivas de 11,06 meses para aquellos pacientes en los que la relación CA 19.9 en el tumor, dividido por 728 era mayor de 1, por una media de 24,02 meses ($p < 0.01$) para aquellos pacientes en que la relación era menor de 1. Así pues, parece existir una relación entre los valores de la determinación del CA 19.,9 en el tejido tumoral y la aparición temprana de las recidivas (figura 34). A continuación, comparamos aquellos pacientes en los que la relación de CA 19.9 en el tejido tumoral respecto al Cutpoint era 10 veces lo normal, con respecto a aquellos cuya relación era menor de 1, encontrando entonces una media en la aparición de las recidivas en este último grupo de 24,02 meses, frente a una media

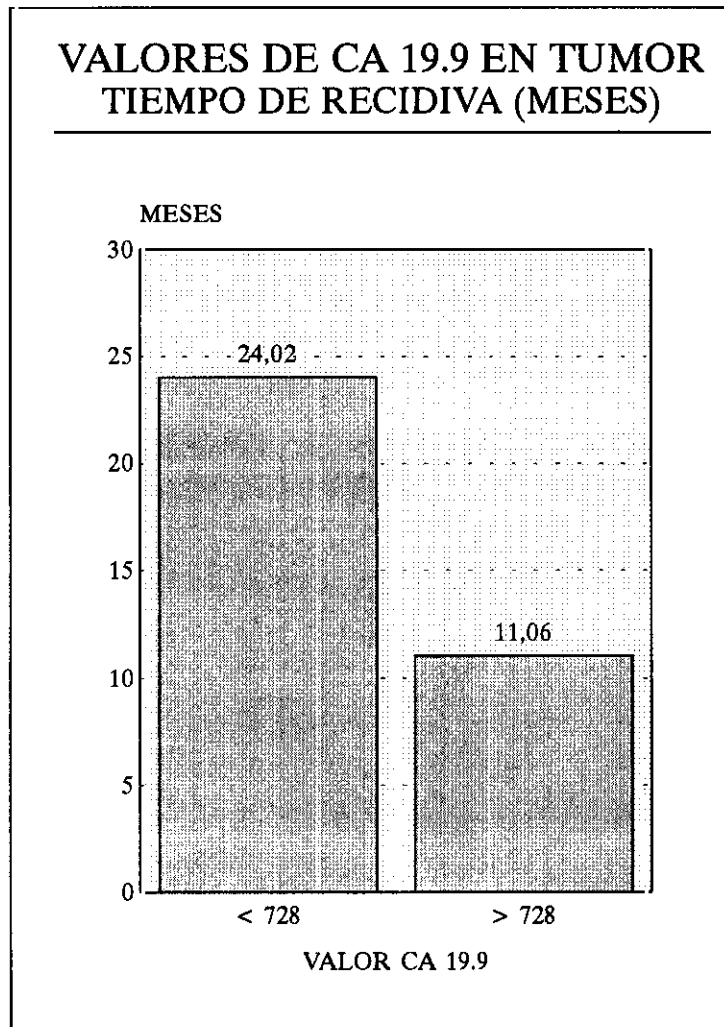


Figura 34: Tiempo medio de aparición de recidivas, según valores de CA 19.9 en tejido tumoral ($p < 0.01$)

de aparición de las recidivas de 8,6 meses para el grupo de relación mayor de 10 ($p < 0.01$). Así pues, no solamente parece haber una relación significativamente estadística entre la cuantificación del CA 19.9 en el tejido tumoral, sino que además, a mayor cantidad del antígeno más tempranamente van a aparecer las recidivas (figura 35).

Cuando hemos intentado realizar la comparación con los otros valores de CA 19.9, esto es, los que determinamos en el tejido normal, en el borde oral y en el borde anal, no hemos encontrado diferencias significativas entre estos valores y el tiempo de aparición de las recidivas.

Así mismo, uno de los objetivos que nos propusimos al iniciar este trabajo, era valorar si la determinación del marcador en el borde anal de las resecciones colónicas podría ser un valor determinante en la aparición de recidivas locales a nivel de la línea de sutura. El número de recidivas locorregionales es escaso para poder aseverar esta circunstancia, por lo que no podemos ni aseverarla ni negarla, aunque las medias halladas independientemente, no parecen demostrar ninguna tendencia ni en favor ni en contra de esta presunción.

CA 19.9 en sangre periférica y su relación con el CA 19.9 en el citosol del tumor.

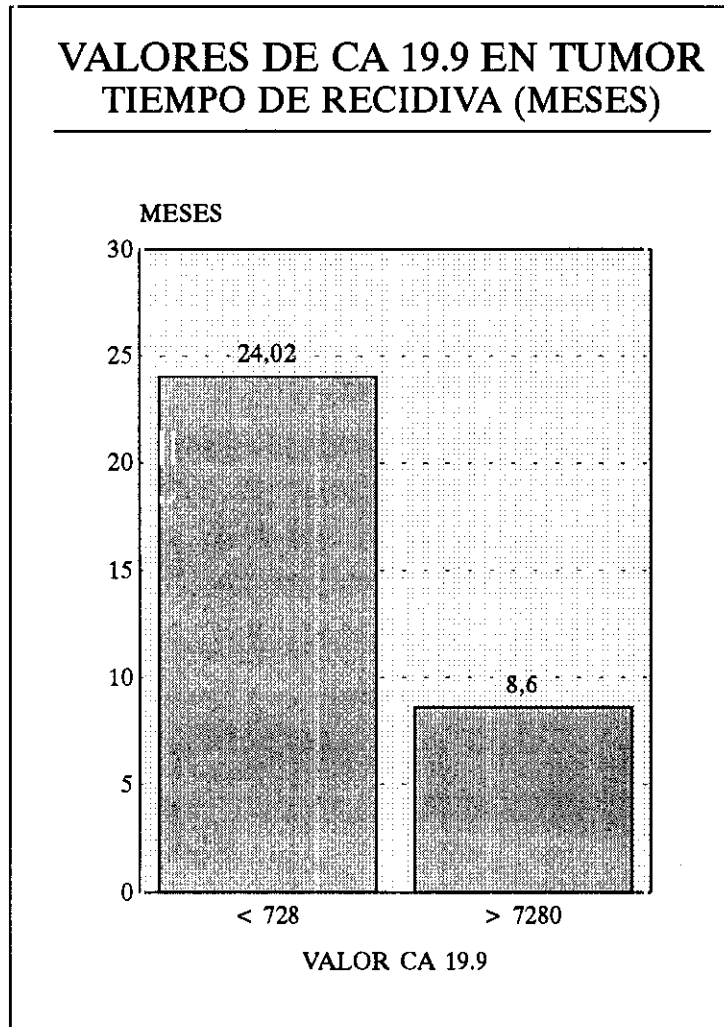


Figura 35: Tiempo medio de aparición de recidivas, según valores de CA 19.9 en tejido tumoral ($p < 0.01$)

En nuestra casuística, el CA 19.9 determinado en sangre periférica, se comporta como un marcador eficiente en la valoración de los casos más agresivos, aunque no tiene valor para poder clasificar preoperatoriamente a los casos de pronóstico más benigno. Así, en los estadios A hemos encontrado una media de 21,7 U/ml, en los estadios B, 28,1 U/ml, en los C 49,2 U/ml y en los D, 487,1 U/ml, con una significación estadística $p < 0.01$ cuando comparamos los valores de los estadios D con los otros 3 (figura 36).

No hemos hallado significación estadística cuando estudiamos el comportamiento del CA 19.9 en sangre periférica con los estadios de Broders, con unas medias de 116,5 para los bien diferenciados, de 51,3 para los moderadamente diferenciados y de 12 para los pobremente diferenciados (figura 37).

Sin embargo, hemos encontrado una buena correlación entre los valores del CA 19.9 en sangre periférica y los valores determinados en el citosol del tumor para los casos que han recidivado, con un coeficiente de correlación de Pearson $r = 0,57$ ($p < 0.05$) .

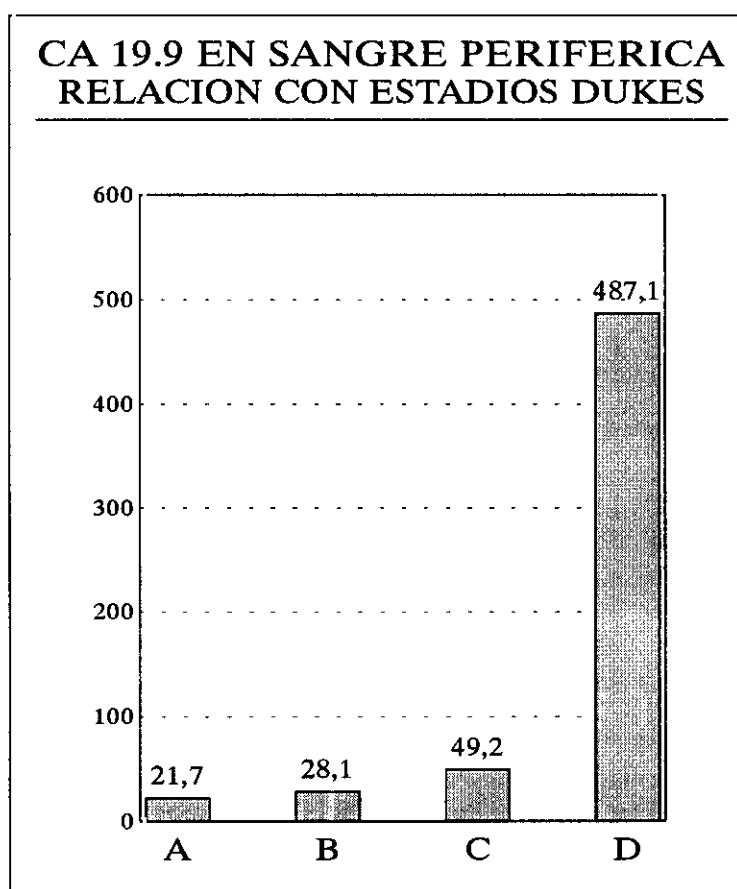


Figura 36: Valores de CA 19.9 en sangre periférica y estadios de Duker ($p < 0.01$)

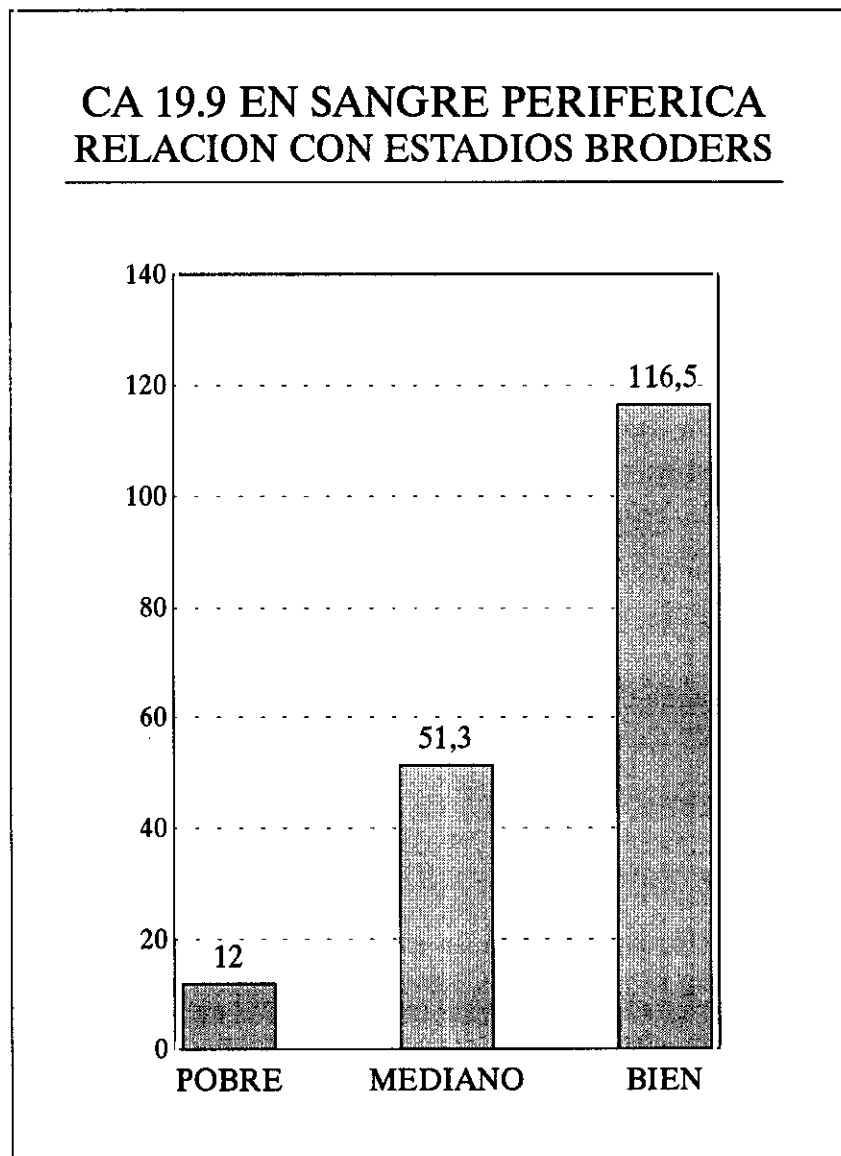


Figura 37: Valores de CA 19.9 en sangre periférica y estadios de Broders (N.S.)

DETERMINACIÓN DEL EGFR

La determinación del EGFR en las muestras tumorales, ha seguido un criterio más diversificado. En los 63 pacientes, se ha determinado cuantitativamente la expresión del EGFR en las 4 muestras. De las 252 muestras de tejido analizadas, en 67 (26,6%) no hubo expresión del receptor. Solamente en 9 de los 63 pacientes (14.3%), la expresión del EGFR fue negativa en las 4 muestras examinadas. De ellos, 3 pacientes fueron estadios B, 4 fueron estadios C y 2 fueron estadios D

Valores medios de las distintas muestras:

Los valores medios hallados en estas muestras, y una vez extraídos de los mismos aquellos resultados negativos, esto es, aquellas muestras que no han presentado expresión positiva del mismo, se han distribuido de la siguiente manera: en las muestras tomadas del **tumor**, la media fue de 50,75 fmol/mg de proteína, con un intervalo de confianza ($p < 0.05$) para la media de $\pm 17,38$; las determinaciones de las muestras del tejido **normal**, mostraron una media de 43,65 fmol/mg de proteína, con un intervalo de confianza ($p < 0.05$) para la media de $\pm 17,57$; en el **borde oral**, la media fue de 74,78 fmol/mg de proteína, con un intervalo de confianza ($p < 0.05$) para la media de $\pm 29,98$; finalmente, en el **borde anal**, la determinación del EGFR dio una media de 68,54 fmol/mg

de proteína, con un intervalo de confianza ($p < 0.05$) para la media de $\pm 29,11$ (tabla 15, figura 38). Cuando hemos comparado cada media con las demás mediante el test de la t de Student, no hemos hallado diferencias estadísticamente significativas entre los distintos valores.

Al igual que hemos hecho con el CA 19.9, hemos comparado los distintos valores cuantitativos del EGFR según las distintas localizaciones. Los valores hallados en el tumor, tejido normal, borde oral y borde anal, cuando los comparamos como medias independientes, respecto a las 3 localizaciones derecho, izquierdo y recto (figuras 39, 40, 41 y 42), no presentan diferencias estadísticamente significativas. Los distintos valores hallados en las distintas localizaciones se representan en las tablas 16, 17, 18 y 19.

Relación del EGFR con el nº de ganglios positivos.

Cuando hemos determinado el EGFR en la membrana de la **célula tumoral**, hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los valores hallados cuando los relacionamos con el número de ganglios positivos, factor pronóstico barajado como hemos visto con anterioridad. La comparación efectuada entre los Estadios B y los C con menos de tres ganglios, comparados con los estadios C con más de 3 ganglios afectados, ha sido estadísticamente significativa, con una $p < 0.05$. Los valores hallados han sido, una vez eliminados

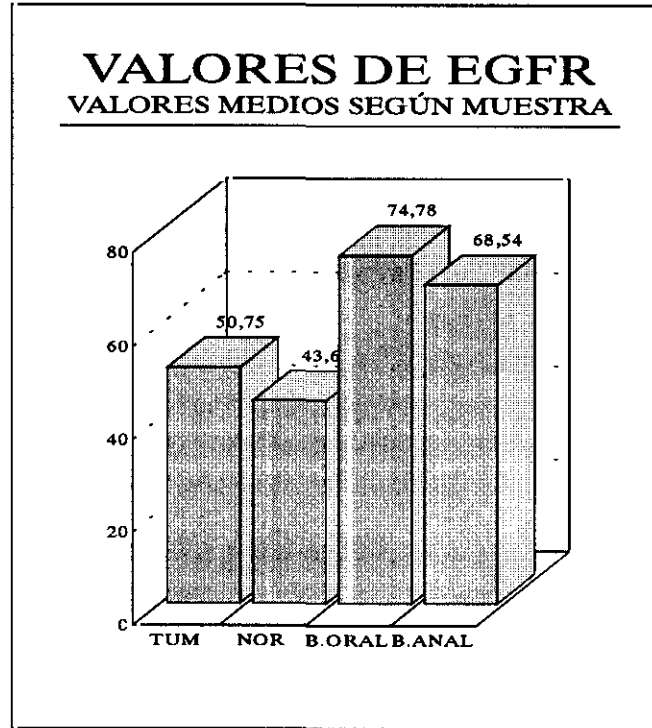


Figura 38: Valores medios del EGFR según las distintas muestras examinadas.

Tabla 15

VALORES MEDIOS DE EGFR SEGÚN LAS MUESTRAS

MUESTRA	VALOR MEDIO
TEJ. TUMORAL	50,75 ± 17,38
TEJ. NORMAL	43,65 ± 17,57
TEJ. BORDE ORAL	74,78 ± 29,98
TEJ. BORDE ANAL	68,54 ± 29,11

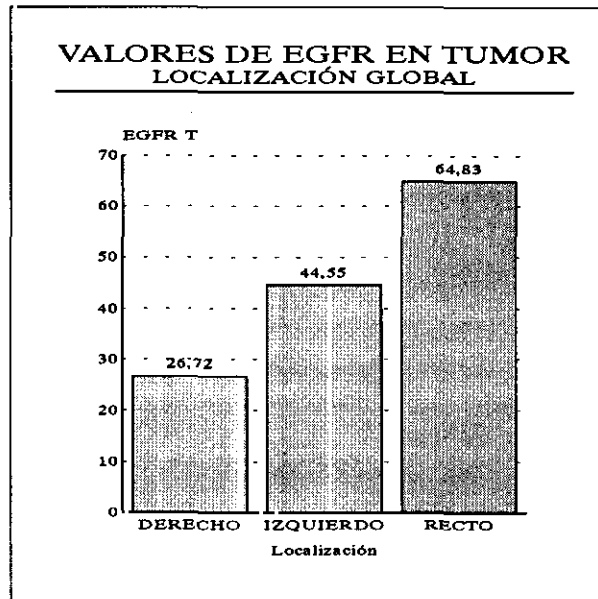


Figura 39: Valores del EGFR en el tumor, comparados con la localización. (No significativo)

Tabla 16

VALORES DE EGFR TUMOR POR LOCALIZACIONES

LOCALIZACIÓN	VALOR MEDIO
DERECHO	26,72 ± 10,84
IZQUIERDO	44,55 ± 15,41
RECTO	64,83 ± 18,39

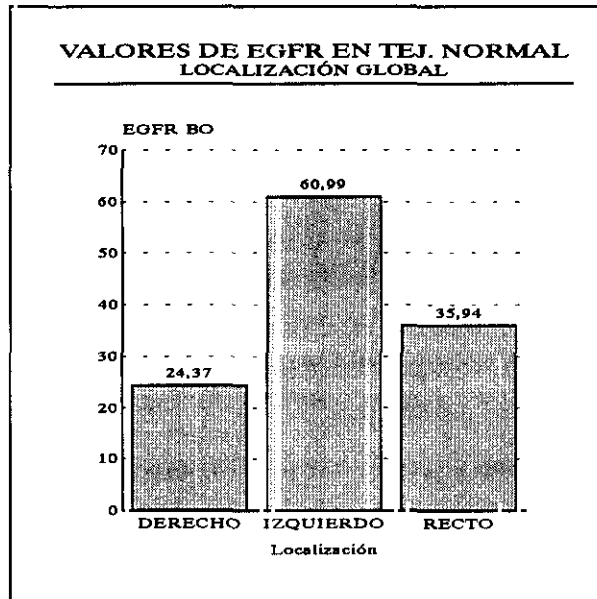


Figura 40: Valores del EGFR en el tej. normal, comparados con la localización. (No significativo)

Tabla 17

VALORES DE EGFR EN TEJ. NORMAL POR LOCALIZACIONES

LOCALIZACIÓN	VALOR MEDIO
DERECHO	24,37 ± 14,44
IZQUIERDO	60,99 ± 18,55
RECTO	35,94 ± 10,07

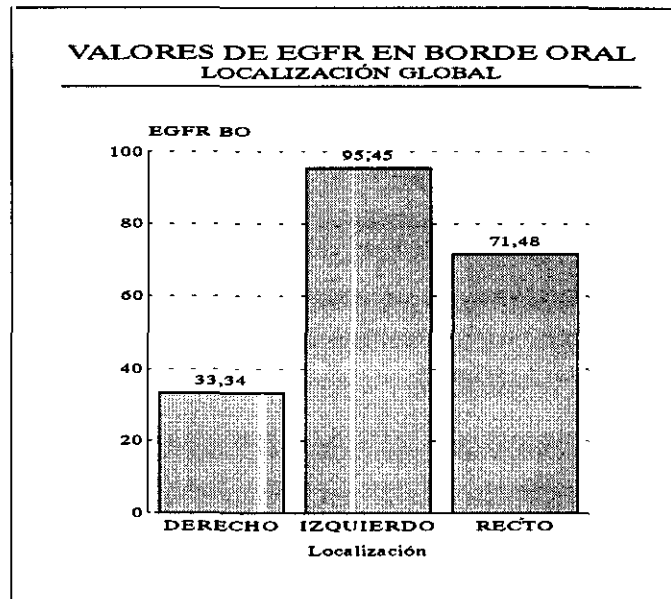


Figura 41: Valores del EGFR en el borde oral, comparados con la localización. (Significativo ($p < 0.05$))

Tabla 18

VALORES DE EGFR EN BORDE ORAL POR LOCALIZACIONES

LOCALIZACIÓN	VALOR MEDIO
DERECHO	33,34 ± 9,81
IZQUIERDO	95,45 ± 32,85
RECTO	71,48 ± 13,94

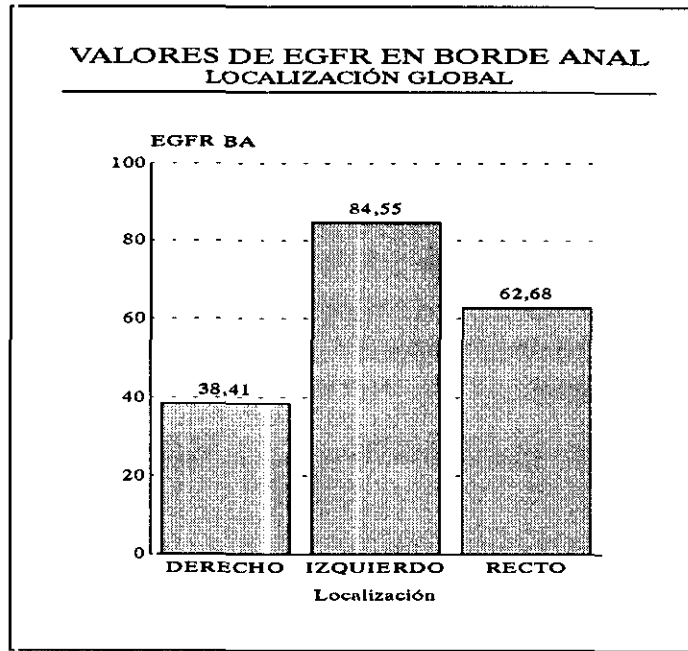


Figura 42: Valores del EGFR en el borde anal, comparados con la localización. (No significativo)

Tabla 19

VALORES DE EGFR EN BORDE ANAL POR LOCALIZACIONES

LOCALIZACIÓN	VALOR MEDIO
DERECHO	38,41 ± 14,49
IZQUIERDO	84,55 ± 33,19
RECTO	62,68 ± 10,89

los casos con expresión negativa, en los Estadios B, esto es, sin ganglios positivos, 46,62 fmol/mg de proteína \pm 8,4; en aquellos casos en Estadios C, pero con menos de tres ganglios positivos, los valores medios han sido de 26,72 fmol/mg de proteína \pm 6,5; finalmente, en los Estadios C con más de tres ganglios positivos, los valores medios hallados han sido de 94,58 fmol/mg de proteína \pm 35,2 (figura 43).

Cuando la determinación la hemos realizado en las otras 3 muestras, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores medios entre los casos en estadios B y los estadios con menos de tres ganglios, y con más de 3 ganglios. Los valores de todas las determinaciones, se hallan resumidas en la tabla 20.

Relación entre el EGFR y los Estadios de Dukes.

Cuando intentamos hallar una correlación entre los valores de EGFR medidos en las distintas muestras de las piezas de resección y los Estadios de Dukes, por ver si había alguna desviación estadísticamente significativa que los correlacionara, no hemos hallado diferencias marcadas. La tabla 21 refleja los valores medios de las distintas muestras, relacionados con los Estadios de Dukes, una vez depurados los valores sin expresión de las mismas.

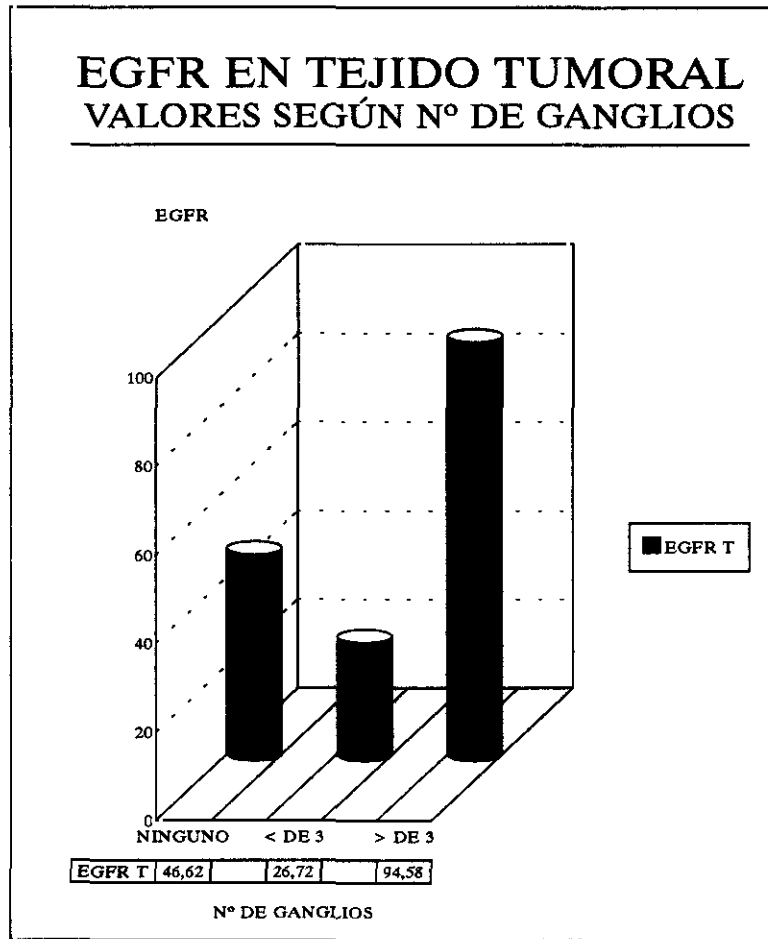


Figura 43: Valores medios de EGFR en tejido tumoral, relacionados con el número de ganglios.

Tabla 20

VALORES DE EGFR SEGÚN N° DE GANGLIOS

	NO GANGLIOS	GANGLIOS < 3	GANGLIOS > 3
EGFR TUMOR	46,62 ± 8,4	26,72 ± 6,5	94,58 ± 35,2
EGFR NORMAL	58,99 ± 14,1	21,87 ± 6,6	24,08 ± 5,8
EGFR B. ORAL	94,00 ± 23,4	33,01 ± 8,4	78,26 ± 32,7
EGFR B. ANAL	80,47 ± 23,8	37,56 ± 7,8	69,41 ± 6,1

Tabla 21

**Valores medios de EGFR en las distintas muestras
y Estadios de Dukes**

	ESTADIO A	ESTADIO B	ESTADIO C	ESTADIO D
EGFR T	28,1 ± 18,5	44,6 ± 8,0	46,7 ± 18,5	103,3 ± 38,2
EGFR N	13,2 ± 5,2	53,27 ± 11,6	23,1 ± 5,1	88,1 ± 52,5
EGFR BD	67,3 ± 27,8	89,4 ± 21,7	45,5 ± 14,1	88,7 ± 30,4
EGFR BA	112,6	80,1 ± 23,6	48,4 ± 14,1	63,2 ± 20,1

Relación entre el EGFR y los Estadios de Astler y Coller.

Por la misma razón que aducíamos cuando hablábamos de las posibles interrelaciones entre el CA 19.9 y los Estadios de Astler y Coller, en el caso del EGFR, los valores son prácticamente superponibles a los hallados cuando los relacionamos con los Estadios de Dukes. Así pues, no hay diferencias estadísticamente significativas entre las distintas determinaciones del EGFR en las distintas muestras, y su relación con los estadios de Astler y Coller.

Valores de EGFR y grados de diferenciación de Broders.

Hemos intentado correlacionar los distintos valores medios de las muestras analizadas con los grados de diferenciación de Broders, después de haber desestimado las muestras que no han expresado valores cuantitativos de EGFR, sin hallar diferencias estadísticamente significativas. En la tabla 22 mostramos los distintos valores medios hallados con su intervalo de confianza ($p < 0.05$) para la media.

Relación del EGFR y el índice de recidivas.

Al igual que hemos realizado con el CA 19.9, hemos intentado hallar una correlación entre las determinaciones cuantitativas de las distintas

Tabla 22

**Valores medios de EGFR en las distintas muestras
y Grados de diferenciación de Broders**

	49,9 ± 15,7	20,9 ±	61,4 ± 4,6	31,5 ± 20,7
	33,2 ± 5,9	34,5 ± 11,5	42,2 ± 9,9	43,9 ± 6,4
	44,6 ± 7,4	40,7 ± 8,6	70,9 ± 11,4	64,6 ± 9,4

muestras analizadas respecto al EGFR y el índice de recidivas y/o una aparición más precoz de las mismas ante la presencia de determinados valores. Para ello, hemos determinado los valores en las 4 muestras de cada paciente, para aquellos pacientes que recidivaron, comparándolas con los que no lo hicieron. Cuando las muestras a analizar fueron las obtenidas de las membranas de las células del **tejido tumoral**, los valores hallados fueron de 56,68 fmol/mg de proteína de membrana con intervalo de confianza ($p < 0.05$) para la media de $\pm 22,19$ para las pacientes que recidivaron, frente a 48,22 fmol/mg de proteína de membrana con intervalo de confianza para la media de 8,37.

Las muestras tomadas en el **tejido normal**, revelaron una expresión de 46,28 fmol/mg de proteína de membrana con intervalo de confianza ($p < 0.05$) para la media de $\pm 31,35$ para los que recidivaron, frente a 44,02 fmol/mg de proteína de membrana con intervalo de confianza para la media de $\pm 8,4$.

Cuando analizamos las muestras del **borde oral**, los valores hallados para aquellos pacientes que recidivaron fueron de 62,65 fmol/mg de proteína de membrana con intervalo de confianza para la media de $\pm 21,3$ para aquellos pacientes que recidivaron frente a 82,19 fmol/mg de proteína de membrana $\pm 19,1$.

En las muestras determinadas en la membrana de la célula del **borde anal**, los valores hallados fueron de 57,43 fmol/mg de proteína de membrana con intervalo de confianza para la media de $\pm 9,3$ para los pacientes que recidivaron, frente a 75,3 fmol/mg de proteína de membrana $\pm 19,8$ para aquellos casos que

no recidivaron. No se han hallado diferencias estadísticamente significativas cuando hemos comparado una a una las diferentes muestras respecto a si han aparecido recidivas o no.

En la tabla 23 reseñamos los distintos valores hallados en las distintas muestras (figura 44).

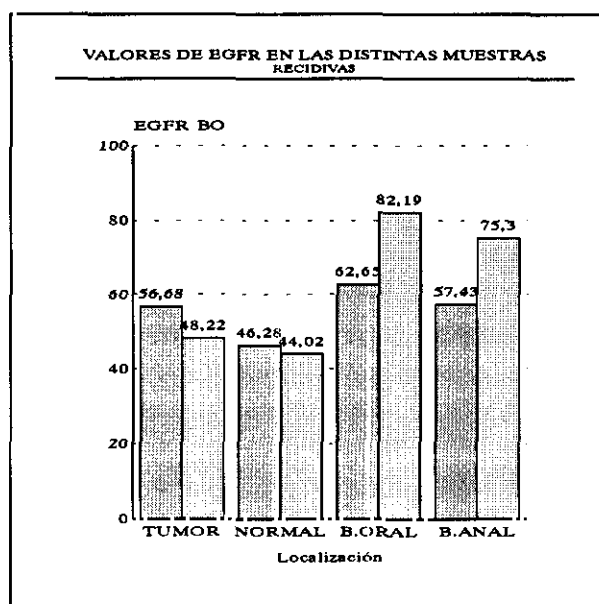


Figura 44: Valores del EGFR en las distintas localizaciones y recidivas. (No significativo)

Tabla 23

Valores medios de EGFR en las distintas muestras relacionados con las recidivas.

	RECIDIVA = SI	RECIDIVA = NO
EGFR TUMOR	56,68 ± 22,2	48,22 ± 8,4
EGFR NORMAL	46,28 ± 21,4	44,02 ± 8,4
EGFR B. ORAL	62,65 ± 14,7	82,19 ± 19,1
EGFR B. ANAL	57,43 ± 9,3	75,30 ± 19,8

5).- DISCUSSION

DISCUSIÓN

El cáncer colorrectal continúa siendo el tercero en frecuencia, llegando a producir en 1991, 170.000 fallecimientos en Canadá y Estados Unidos, con una mortalidad aproximada de un 40% (113). Los aspectos técnicos de las resecciones del carcinoma de colon se han ido progresivamente estandarizando a lo largo de los años, y una mayor agresividad en las intervenciones con unas resecciones más amplias y aumento de las zonas de linfadenectomía, no se han seguido de un aumento marcado en la supervivencia de estos pacientes. En la actualidad, parece ser que el tratamiento coadyuvante en los pacientes con estadios C, conlleva una mayor supervivencia (180). Pero, ¿qué pacientes se van a beneficiar de un tratamiento coadyuvante de QT o RT, dada la alta morbilidad de los mismos?. Los trabajos de los distintos autores hoy día, van encaminados a estudiar aquellas características del tumor que posean una clara influencia sobre el pronóstico, y que por tanto, sean capaces de elaborar subgrupos de pacientes que se puedan beneficiar de estos tratamientos complementarios después de la cirugía radical.

Esta idea fue la que nos indujo a realizar esta Tesis Doctoral, con el fin de poder comprobar si las determinaciones de dos marcadores tumorales, ampliamente debatidos, en la célula del tejido canceroso, podría tener significación y permitirnos distinguir un determinado grupo de pacientes que se

beneficiarían del tratamiento coadyuvante y de un seguimiento más exhaustivo, ante la alta posibilidad de una recidiva más precoz o un comportamiento más agresivo de la enfermedad, hipótesis que pasamos a discutir.

Respecto a la **EDAD**, se observa en nuestra casuística que es una enfermedad propia de la sexta a la octava década, sin encontrar ningún paciente menor de 40 años. En los 63 casos recogidos para este trabajo, no hemos encontrado ningún paciente menor de 40 años, cifras que no coinciden con los datos estadísticos reflejados por distintos autores (229, 245). Por el contrario, en lo referente al **SEXO** y **LOCALIZACIÓN**, nuestros datos se hallan de acuerdo con los reflejados en la literatura (229).

En la tabla 24 comparamos 2 series con la nuestra, sobre los distintos casos según la clasificación de Dukes y la modificada de Astler y Coller, que son representativas de otros muchos trabajos que se han publicado.

La media de recidivas del cáncer colorrectal operado varía alrededor del 35% (229, 65), con un índice de recidivas locales del 39% y de metástasis a distancia, casi siempre hepáticas, del 35%. Casi el 80% de las recidivas se dan en los dos primeros años después de la intervención quirúrgica con carácter curativo, por lo que nuestros datos están dentro, dado el seguimiento

Tabla 24

FRECUENCIA SEGÚN DUKES

ESTADIO	SERIE 1 (66)	SERIE 2 (236)	MORALES
A	12%	5,3%	4,6%
B	44%	54,5%	49,2%
C	27,3%	28,4%	35,4%
D	16,7%	11,7%	10,8%

FRECUENCIA SEGÚN ASTLER y COLLER

ESTADIO	SERIE 1 (152)	SERIE 2 (236)	MORALES
A	0,3%	5,3%	4,6%
B1	13,6%	17,4%	1,5%
B2	46,6%	37,1%	47,7%
C1	4%	19,3%	
C2	35,5%	9,1%	35,4%
D		11,7%	10,8%

medio realizado, de los plazos de aparición de recidivas. Hemos encontrado un 26,9% de recidivas globales, con un 11,1% de recidivas locorreregionales. En cuanto a la aparición de cánceres metacrónicos, hemos tenido 2 casos (3,2%), porcentaje similar al señalado por HE LOCKHART-MUMMERY (158) y N KAIBARA (127).

Con respecto a los **grados de diferenciación** del tumor, nuestros datos no concuerdan con los de otros autores (256, 79) en que a peor grado de diferenciación peor pronóstico, ya que en nuestros 63 casos, y contando las recidivas globales, solo 1 caso de 3 (33.3%) pobremente diferenciado, recidivó; 6 de 23 medianamente diferenciados (26,1%) recidivaron y 10 de 37 (27,03%) de los bien diferenciados, también lo hicieron.

Los estudios realizados sobre marcadores tumorales se han centrado predominantemente en la medición de las concentraciones de los mismos en el suero. De cualquier manera, un primer paso lógico en el estudio de los marcadores tumorales biológicos, sería el realizar su estudio sobre el tejido tumoral para comprobar la presencia del marcador que sea de interés. Para lograr este propósito, se han realizado diferentes estudios con técnicas inmunohistoquímicas (179). Pero estas técnicas solo tienen interés para poder demostrar si determinado tejido tumoral tiene determinado marcador o no. Las mediciones de los marcadores tumorales en los extractos de citosol de los

tumores, dan resultados más precisos, pudiendo determinar las concentraciones del marcador en el tejido (170, 130), y por lo tanto, poder hacer predicciones sobre los distintos valores hallados (39)

Por este motivo nos propusimos el estudio del comportamiento del CA 19.9 y del EGFR en la propia célula tumoral, como método fácilmente reproducible, y ver si podía agrupar determinados grupos de pacientes en los que la recidiva fuera predecible.

CA 19.9

Hay pocas referencias en la literatura sobre la determinación del CA 19.9 en el citosol de las células del cáncer colorrectal, marcador que ha sido menos estudiado que el CEA, haciendo todos ellos referencia a la comparación entre los valores del marcador y los otros factores pronósticos ampliamente manejados para poder evaluar el pronóstico de este tumor. No hemos hallado ninguno que estudiara a largo plazo el comportamiento del tumor teniendo en cuenta las determinaciones del CA 19.9 en el tejido tumoral, estudiando el índice de recidivas y fallecimientos, motivo fundamental de nuestro trabajo.

Las primeras referencias hacia si había una relación entre los valores de CA 19.9 determinados en el tejido del propio tumor y el riesgo de aparición de enfermedad recurrente parecen deberse a R CAVALIERE (41) en el 32 Congreso de la Sociedad Internacional de Cirugía en 1987, donde afirma que la dosificación de este marcador en el tejido del tumor, es independiente de los demás factores pronósticos que se emplean habitualmente, acabando por aseverar que el CA 19.9 en el tejido tumoral se revela como un potencial índice pronóstico.

La determinación del marcador en el **tejido tumoral**, la planteamos desde el punto de vista de que si partimos de la base de que este antígeno está producido por la célula tumoral, sería lógico suponer que si se determina en una emulsión del citosol del tumor, los valores con respecto a la mucosa sana deberían de ser mayores, debiéndonos preguntar además si la mayor cantidad de este antígeno en la célula tumoral, conllevaría a una mayor agresividad del mismo.

Por la razón anteriormente expuesta, hicimos la medición del CA 19.9 en la célula de **tejido normal** a unos 15 cm de distancia, en sentido oral desde el borde superior de la tumoración. Así mismo, hicimos las determinaciones en los **bordes oral y anal** por si pudiéramos hallar una relación

entre los valores absolutos de los mismos o los valores relativos comparándolos con los valores de las células tumorales, y el índice de aparición de las recidivas.

Los valores medios hallados por nosotros en el citosol de la muestra tumoral, ha sido de $2.775,7 \pm 1.285,1$ U/mg de proteína, mientras que las cifras en el tejido normal fueron de $376,9 \pm 162,3$. Los rangos han sido en las muestras halladas en el tumor de $3,2 - 25.780,2$ U/mg de proteína, y de $0,9 - 3.524$ U/mg de proteína en el tejido normal, valores que se hallan relativamente de acuerdo con los hallados por A QUENTMEIER (216), que encuentra valores en el tejido tumoral de $120 - 72.660$ U/mg de proteína y de $37 - 5.800$ U/mg de proteína en las muestras de tejido normal. Resultados similares, aunque en menos cuantía, ha encontrado Y IMAMURA (121), con unos valores más elevados en las muestras del tejido tumoral (17.102 U/mg de proteína) que en las piezas tomadas a 1 cm (1.946 U/mg de proteína) y a 5 cm (1.130 U/mg de proteína). Las diferencias en cuanto a la cuantificación de la expresión del CA 19.9, probablemente sean debidas a las distintas técnicas empleadas, pero todos coinciden en hallar unos valores significativamente más altos en las muestras analizadas del tejido tumoral. En nuestra casuística, encontramos un nivel de significación elevado ($p < 0.001$) cuando comparamos los valores hallados en el citosol del tumor con los valores hallados en las otras 3 muestras. Los valores determinados en el borde anal, esto es, el borde distal de la resección en sentido caudal, han sido los más pequeños, con una significación estadística $p < 0.01$

cuando los comparamos con las otras dos determinaciones del tejido normal. Esto podría ser consecuencia de la propagación del carcinoma de colon, que como es sabido, es en sentido proximal o craneal.

A QUENTMEIER (216), ha determinado el Cut-off, maximizando el índice de Yoiden, en 840 U/mg de proteína. Nosotros, para hallar el Cut-off, hemos tomado como valor de referencia el percentil 95 de los valores encontrados en el borde anal, que son los menores hallados, y que por lo tanto, los hemos tomado como valores normales, encontrando un valor de corte de 740 U/mg de proteína. Cuando comparamos los valores de CA 19.9 en el tumor con el valor de corte, encontramos un 50,27% de las muestras por encima de este valor, y solamente un 4,12% de los casos determinados en el borde anal están por encima de estos valores. A QUENTMEIER (216) obtiene valores similares a los nuestros, con un 57,4% de muestras de tejido canceroso por encima del valor de corte, y solamente un 18,8% de las muestras de tejido normal. Resultados similares ha encontrado también JW ARENDS (8) que encontró, empleando métodos inmunohistoquímicos, un 64% de tinciones positivas en los tejidos cancerosos y en el 39,5% de los casos estudiados en la mucosa normal. Y TABUCHI (260) ha encontrado también, mediante técnicas de inmunohistoquímica, un 62,5% de casos con tinciones positivas en el tejido canceroso. H KOPROWSKY y cols (141) afirman que el CA 19.9 es un antígeno específico para el cáncer colorrectal.

A pesar de que autores como A QUENTMEIER (216) afirman que parece haber una correlación entre los valores determinados en el tejido tumoral y los valores del CA 19.9 hallados en la sangre periférica, aunque para cada caso determinado no pueden asegurar que la correlación exista, en nuestra casuística no hemos hallado esa correlación, encontrando un índice de correlación de Pearson para el CA 19.9 en el tejido canceroso comparado con el CA 19.9 en sangre periférica de 0,10959. Valores similares hemos hallado en las otras tres determinaciones. Ésto podría explicarse ya que aparte del índice de producción del antígeno por el tejido tumoral, intervienen otros factores en los niveles del marcador tumoral circulante, tales como la liberación del mismo por las propias células tumorales, la dilución en la circulación total, estadio del tumor y volumen del mismo, grado de necrosis tumoral, proximidad de las células tumorales a los vasos, etc. El efecto de estas variables sobre los niveles del marcador circulante y la incidencia de niveles positivos en el tejido canceroso y en el suero con respecto al CA 19.9, no ha sido estudiado aún definitivamente. Aunque Y TABUCHI (260) sostiene que el CA 19.9 se elimina por el conducto torácico del sistema linfático vía nódulo metastásico o ganglio invadido, no parece del todo cierto, ya que en los casos con ictericia obstructiva por patología benigna o maligna, el marcador se halla elevado en sobremanera, con una correlación $r = 0,54$ ($p < 0,001$) (195, 218), lo cual indica que la eliminación por vía biliar o hepática del marcador parece ser un hecho.

Solamente hemos hallado una correlación positiva entre el valor del CA 19.9 determinado en el tejido tumoral y el determinado en sangre periférica, en los casos de recidiva, con un coeficiente de correlación de 0,56573, por lo que pensamos que, aunque el CA 19.9 no parece un marcador adecuado para el control del carcinoma colorrectal en los casos de early cáncer o tumores pequeños, unos valores altos del mismo sí que nos deben alertar sobre la posibilidad de la existencia de un tumor con cierto potencial de agresividad.

Cuando intentamos correlacionar los valores del CA 19.9 con las distintas localizaciones del tumor, agrupándolas en 3 localizaciones (derecho, izquierdo y recto), encontramos valores más altos en los colones derechos y recto que en los izquierdos, aunque sin significación estadística. Cabría explicar estos hallazgos dada la tardanza con que se diagnostican los carcinomas de colon derecho y la mayor agresividad de los tumores localizados en el recto.

No hemos encontrado en la literatura revisada ningún estudio intentando relacionar los valores del CA 19.9 en el citosol de la célula tumoral y el número de ganglios, factor pronóstico importante a la hora del pronóstico de estos pacientes. Nosotros lo hemos estudiado, encontrando unos valores medios de 6.199,1 U/mg de proteína para aquellos casos con más de 3 ganglios positivos; valores medios del CA 19.9 de 1.251,1 U/mg de proteína para aquellos casos con menos de 3 ganglios, y de 2.407, 1 U/mg de proteína para los

que no tenían ningún ganglio positivo con una significación $p < 0.05$, lo cual parece indicar que unos valores aumentados del CA 19.9 en el citosol del tejido tumoral, se acompaña de un peor pronóstico en la evolución ulterior del carcinoma. Aunque no hemos hallado diferencias estadísticamente significativas cuando la determinación del CA 19.9 la hacíamos en las otras 3 muestras, cuando los referenciamos con el número de ganglios, los valores hallados en el tumor siempre han sido más altos que los valores del tejido aledaño y los bordes.

Cuando hemos comparado los valores del CA 19.9 en las distintas muestras, según los estadios de Dukes, nuestros resultados se alejan de los hallados por M COSIMELLI y cols (53), los cuales han encontrado sus valores más altos en los casos con estadios B, con una media de 162,4 U/mg de proteína ± 52.7 para el tejido tumoral y de 69,9 U/mg de proteína $\pm 39,2$ para el tejido normal. En nuestra serie, los valores han ido creciendo desde los estadios A a los D, con valores para los A de 584,4 mg de proteína $\pm 82,8$ y de 4.252,5 U/mg de proteína $\pm 2.576,3$ para los estadios D. Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se han comparado los valores del CA 19.9 en el tejido tumoral en los estadios B y C, que son los que preocupan al cirujano, ya que sabemos que los A van a evolucionar satisfactoriamente y los D van a tener peor pronóstico, si se aprecia una clara tendencia a un mayor valor en la cuantificación del marcador en los Estadios C que en los B, con valores medios de 1.929,6 U/mg de proteína $\pm 672,6$ para los

B y de 3.832,5 U/mg de proteína \pm 1.361,4 para los estadios C. Como hemos comentado anteriormente al hablar de los resultados, cuando la cuantificación del marcador la hemos hecho en los tejidos aledaños y distantes del tumor, las variaciones entre los distintos estadios ha sido menor, al igual que refiere Cosimelli.

Más significativa ha sido la relación entre los valores del CA 19.9 realizado en el tejido tumoral del cáncer colorrectal y el índice de recidivas que hemos encontrado en nuestros pacientes. Los valores medios del marcador que hemos hallado en aquellos pacientes que recidivaron fue de 5.828,3 U/mg de proteína \pm 2.059,8, frente a los 858,2 U/mg de proteína \pm 138,4 que hallamos en los que no recidivaron, con una significación estadística de $p < 0.05$. M COSIMELLI (53) estudia el comportamiento del CA 19.9 en el tejido tumoral, comparando los valores en aquellos pacientes que recidivan con los de aquellos que están libres de enfermedad, con un seguimiento medio de 20 meses (13-29). Los 34 pacientes de 47 que están libres de enfermedad tuvieron un CA 19.9 en tumor de 157,1 U/mg de proteína \pm 52,9, mientras que los 13 que recidivaron, presentaron un CA 19.9 de 173,1 U/mg de proteína \pm 66,5, sin encontrar significación estadística. K KIRIYAMA (131) encuentra que los valores más altos de CA 19.9 se observan también con una mayor progresión del cáncer. La expresión positiva de CA 19.9 en el tejido canceroso indica un peor pronóstico del paciente y un alto riesgo de producción de metástasis.

Sin embargo, parece estar dentro de la lógica y de lo esperable, si tenemos en cuenta que el CA 19.9 es un antígeno producido por la célula tumoral a nivel de su membrana, y que por lo tanto, a mayor agresividad del tumor sería lógico esperar que la expresión del mismo sea mayor. Apoyando esta teoría nuestra, viene el que la correlación que encontramos entre el CA 19.9 medido en sangre periférica y en tumor para aquellos casos que recidivaron presenta un valor de 0.57, a pesar de que es sabido que la liberación del marcador a la sangre depende del tamaño del tumor y el grado de necrosis del mismo, así como de la cercanía o no de los vasos a las células tumorales.

Cuando realizamos el análisis de la varianza eliminando la influencia de un factor, que en nuestro caso fue la administración o no de tratamiento complementario, por si este factor podía influenciar en la aparición o no de recidivas, los valores hallados para las recidivas, comparados con los pacientes que no recidivaron, reflejaron una significación estadística de $p < 0.01$, por lo que parece ser que la administración o no de tratamiento complementario en aquellos pacientes con valores extremadamente altos del marcador en el tumor, no va a influenciar el futuro de los mismos.

No contentos con comprobar la existencia de una relación estadísticamente significativa entre los valores del marcador y el índice de recidivas, intentamos comprobar si había una relación entre los valores del

marcador y el tiempo de aparición de las mismas, estudiando solo aquellos casos que recidivaron, encontrando que unos valores del marcador en el tumor por encima de 10 veces el valor del Cut-off, recidivaron más tempranamente que aquellos que estaban por debajo de dicho valor, lo cual viene a corroborar la expectativa de la utilidad de la determinación del CA 19.9 en el tejido tumoral para prever el comportamiento del mismo. Las determinaciones realizadas en las otras muestras tumorales no reflejaron ninguna relación con el índice de aparición de las recidivas ni del tiempo de aparición de las mismas.

Las implicaciones biológicas y posiblemente pronósticas de estos hallazgos, no están totalmente dilucidados, por lo que nuevos estudios deben de ser realizados para comprobarlos. Es propósito del doctorando el realizar nuevos trabajos de determinación del marcador en la muestras de las biopsias tomadas por los endoscopistas en el diagnóstico de la enfermedad y compararlos con los hallazgos intraoperatorios, evolución, recidivas, etc.

EGFR:

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un polipéptido que afecta, tanto in vitro como en vivo, al crecimiento y diferenciación de numerosos tipos celulares (36). Estudios in vitro de diferentes neoplasias humanas y de tipos celulares mesenquimales, incluidos los tumores gastrointestinales, han visto que el crecimiento de estas células están bajo el control del factor de crecimiento epidérmico (177). La actividad de este factor de crecimiento, está mediada por un receptor específico de membrana, el EGFR. Este receptor es una glicoproteína de un peso molecular de 170.000 Daltons (244), que se halla codificada en el brazo corto del cromosoma 7 (241) y revela alguna similitud con la secuencia de proteínas del oncogén v-erb-B. El receptor consiste en un dominio externo glicosilado que reconoce el factor de crecimiento, y de un dominio interno con actividad tirosin kinasa, ligada por 23 Aa transmembrana.

Receptores del factor de crecimiento se hallan presentes en la mucosa colónica normal, en líneas celulares de carcinoma de colon y en carcinomas de colon humanos (168, 166). Las células tumorales pueden mejorar su capacidad para responder a los factores de crecimiento por dos mecanismos: incrementando la densidad del EGFR en la superficie celular o mediante secreción de TGF- α activando el EGFR mediante una acción autocrina

(209). En contraposición con los carcinomas esofágicos (187) los carcinomas de colon humanos no suelen presentar expresión de EGFR.

Así como en el carcinoma de mama (247, 197) y el carcinoma gástrico (258), en el cáncer de células escamosas de la mucosa oral (56) y en el cáncer primitivo de laringe (233) parece haber una correlación entre el EGFR y el estadio y el grado de invasión linfática del tumor, amén de un peor pronóstico cuando la expresión del receptor está elevada, por el contrario no parece que exista una correlación entre el EGFR y el tipo histológico en el carcinoma de colon (W YASUI (289)). Recientemente, el contenido del EGFR en el carcinoma de colon, adenomas y mucosa normal, ha sido investigado por estudios de unión con el radioligando ¹²⁵I-EGFR (E ROTHBAUER (227)). En los carcinomas encontró que existía un contenido similar e incluso a veces menor del EGFR en la mayoría de los casos. Los adenomas tienen un contenido de EGFR similar cuando se compara con la mucosa normal, y por contraste una sobreexpresión del EGFR, parece ser raro en el carcinoma de colon.

M MOORGHEN (182), tampoco encuentra diferencias entre los valores del EGFR en el tejido canceroso y en la mucosa normal. Por el contrario, PG KOENDERS (139), analizando el EGFR en 24 parejas de especímenes, tumor y mucosa normal, encuentra que los niveles de EGFR eran estadísticamente más altos en el colon normal (77,5 fmol/mg de proteína de

membrana con un rango de 35-239) que en la mucosa del tumor (46 fmol/mg de proteína de membrana, rango 22-81). Estos datos están de acuerdo con nuestros resultados, en los que hemos encontrado una expresión mayor de EGFR en la mucosa normal del colon y en los bordes de resección que en el propio tejido tumoral, con valores medios del EGFR para este último tejido de 50,75 fmol/mg de proteína de membrana con un intervalo de confianza para la media de $\pm 17,38$, mientras que en el borde oral de resección, los valores hallados han sido de 74,78 fmol/mg de proteína de membrana con un intervalo de confianza para la media de $\pm 29,11$. P BORLINGHAUS (22), en contra de nuestros hallazgos, encuentra concentraciones significativamente más altas en el tejido tumoral (155 fmol/g de proteína) que en el tejido normal (80 fmol/g de proteína ($p < 0.01$)). La presencia de niveles elevados de EGFR en la mucosa colorrectal normal parece sugerir que este receptor debe estar implicado en los procesos de crecimiento y diferenciación de la mucosa colorrectal normal (139). El hecho de que se encuentren unos valores más bajos en los carcinomas colorrectales que en la mucosa normal respectiva, indican que el contenido original de EGFR disminuye según va aumentando la transformación maligna. Finalmente K KORETZ (143), realizando comparaciones intraindividuales de la expresión del EGFR entre el epitelio neoplásico y el no neoplásico, demostró una sobreexpresión del EGFR en los carcinomas aproximadamente en un tercio de los casos. Otro tercio no mostró diferencias importantes, y el tercio restante, mostró expresiones inferiores del EGFR en el interior del tumor. E ROTHBAUER (227)

estudia los posibles cambios del EGFR, o en la producción de la actividad de EGF en carcinomas de colon o en adenomas. Como quiera que un incremento en la proliferación del pool de células epiteliales es conocido que ocurre en los adenomas premalignos y en los carcinomas invasivos (19), se esperaría un incremento del EGFR en estas condiciones, frente a la mucosa normal. Comprados los valores del EGFR en la mucosa normal frente a la mucosa del tejido tumoral, encuentra cantidades similares en ambas muestras. Solo en 3 casos encontró un aumento de la expresión en carcinomas. Estos datos le sugieren que los carcinomas de colon frecuentemente producen ligeros aumentos de la actividad del EGF y al unirse al EGFR, conlleva a unos niveles normales o disminuidos de los niveles de EGFR cuando los comparamos con los niveles de la mucosa normal. La disminución de los niveles de EGFR puede ser resultado de la baja expresión debido al incremento de la actividad EGFR-like.

C LIU (157) ha comunicado que el TGF- α se encuentra expresado a niveles superiores en el carcinoma colorrectal que en el tejido normal, por lo que también puede ser que el contenido inferior del EGFR en el tejido tumoral esté causado por una regulación decreciente del receptor por un ligante localmente producido. Así pues, la capacidad de los tumores para producir factores de crecimiento, más bien que la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico, podría ser el factor determinante de la capacidad de crecimiento expresada por el tumor.

Y HAYASHI (112), utilizando métodos inmunohisto-químicos, solo encuentra una positividad en la expresión del EGFR en el 8,7% de los casos, al igual que Y KOIKE (140), que solo encuentra positividad en el 16,8% de los casos, aunque encuentra valores más elevados en aquellos casos con mayor invasión macroscópica. Estas cifras están en desacuerdo con las nuestras, en los que la positividad de la expresión del EGFR en el tejido tumoral ha sido de 75,38% de los casos, y en tejido normal, de un 76,9% de los casos, aunque nosotros lo hicimos mediante técnicas de radioinmunoensayo. C MESSA (177) encuentra una positividad del EGFR similar a la nuestra, con un 93% de positivos en el tejido tumoral y un 86% en el tejido normal, al igual que R PORSCHE (209), que encuentra una positividad del EGFR en el 69,9% de los 101 casos estudiados. W YASUI (289) encuentra positividad en el 77,1% de los casos. Estudios inmunohistoquímicos, mediante la tinción del EGFR, revelan porcentajes de EGFR + que varían entre un 25 y un 100% en muestras de carcinoma colorrectal (TS RAVIKAMUR (220), RJC STEELE (253)), y de 0 a 50% en las muestras del tejido normal (TS RAVIKAMUR (220)). La explicación de que haya muestras en las que no se pueda detectar el EGFR, la explica I DAMJANOV (58) sospechando que en el epitelio normal del colon, los depósitos de antígenos pueden estar localizados intracitoplasmáticamente, por lo que la expresión en la superficie celular puede no ser observada. K KORETZ (143), así mismo, mediante técnicas de inmunohistoquímica ha visto acúmulos de estos depósitos de antígeno intracelularmente. Este modelo de antígeno no está

limitado solamente a la mucosa no afectada, sino que también ha sido encontrado en algunos adenomas y carcinomas. Así pues, y en definitiva, la expresión del EGFR en el colon normal y en el colon neoplásico, es altamente variable.

La expresión del EGFR no se correlaciona estadísticamente, ni con el grado de diferenciación ni con el tipo, localización o estadio de Dukes. Sin embargo, parece que hay más expresión del EGFR en el colon proximal (colon y sigma), que cuando se compara con el recto (PG KOENDERS (139)). Nuestros resultados no están de acuerdo con los de este autor, ya que hemos encontrado en las 4 muestras analizadas valores más pequeños de EGFR en el colon derecho que en izquierdo y recto, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Así, mientras Koenders encuentra en mucosa normal valores de 124 fmol/mg de proteína de membrana en el colon derecho y de 55 fmol/mg de proteína de membrana en el recto, nosotros hemos encontrado unos valores medios para el colon derecho en el borde oral de 33,34 fmol/mg de proteína de membrana versus valores de 71,48 fmol/mg de proteína de membrana en el recto. Si está de acuerdo con nuestros resultados el hecho de que las determinaciones realizadas en las muestras de tejido tumoral, no presentan variaciones significativas según la localización. B GUSTERSON (105) examina el EGFR en la mucosa del colon y no encuentra expresión del mismo mediante inmunohistoquímica. Por el contrario, I DAMJANOV (58) detecta una total inducción de EGFR en todas las partes de las criptas pero no examinan un número de casos lo

suficientemente grande. Pensamos que la expresión del EGFR puede ser lo suficientemente pequeña para que el método inmunohistoquímico no fuera capaz de revelarlo.

K KORETZ (143) encuentra expresión del EGFR en una minoría del los casos. La explicación de que haya muestras en las que no se pueda detectar el EGFR la explica Damjanov sospechando que en el epitelio normal del colon los depósitos de antígenos pueden estar localizados intracitoplasmáticamente, por lo que la expresión en la superficie celular puede no ser observada.

K KORETZ (143) , así mismo, mediante técnicas de inmunohistoquímica, ve acúmulos de estos depósitos de antígeno intracelularmente. Este modelo de antígeno no está limitado solamente a la mucosa no afectada sino que también fue detectado en algunos adenomas y carcinomas. La localización intracelular del EGFR como resultado de un proceso de internación del complejo EGF-EGFR ha sido discutido por diversos autores (S COHEN y RA FAVA (48), JR GLENNEY (91), RJ van't HOF (269)). Se ha demostrado que el complejo receptor-ligando está ubicado en un principio en la superficie celular pero rápidamente se interna en compartimentos endosómicos y son rápidamente degradados en los lisosomas. Este proceso ha sido revisado por RJ van't HOF (269), quien observa que estos agregados se hallan localizados en la zona nuclear

mediante el microscopio de Navoid y con el microscopio electrónico. B GUSTERSON (105) observó una débil coloración intranuclear en las células de los conductos de las glándulas salivares mediante un método inmunohistoquímico. Esta internación del receptor está inducida por el ligante fisiológico EGF, un péptido más bien estable, que todavía no se ha encontrado en el epitelio cólico, pero se ha hallado en las glándulas salivares, células gástricas y pilóricas del estómago, células de Paneth y células de los islotes pancreáticos (T JOH (125)). El EGF es secretado en el intestino, y debido a su resistencia a las enzimas proteolíticas y al ácido, el factor de crecimiento ha sido encontrado incluso en la luz cólica. El EGF estimula la proliferación de las células de las criptas intestinales por una parte (Al Al-NAFUSSI (5)), y reduce el EGFR en la superficie celular de una línea celular intestinal por otra (J BLAY (18)). Esto indica una función reguladora del EGF en el crecimiento celular intestinal. Respecto a la localización epitelial, I DAMJANOV (58) arguye que las células en proliferación presentan una intensa reactividad con el anticuerpo EGFR en la superficie de la membrana celular y las células postmitóticas muestran una localización intracelular; esto último explicaría la expresión del EGFR en el interior del citoplasma en las zonas apicales de las criptas en algunos tejidos mucosales normales, en algunos de los carcinomas bien diferenciados y en algunos de los adenomas estudiados por Koretz. Parece, por otra parte, que las diferencias interindividuales en el contenido del EGFR epitelial, constituye la característica principal de la mucosa del colon normal. Por tanto, el modo de

expresión del EGFR en los carcinomas puede también reflejar una característica inherente al individuo. La secuencia adenoma-carcinoma no parece estar influenciada por este sistema del factor de crecimiento, puesto que los contenidos de antígeno en los adenomas y en la mucosa normal que les acompaña, suele ser el mismo.

La importancia funcional de la coexpresión de EGF y EGFR en el carcinoma colorrectal, es desconocida. En los carcinomas gástricos, los pacientes con una expresión sincrónica de EGF y su receptor tienen peor pronóstico que aquellos casos en los que no existe EGF y EGFR (289).

En numerosos estudios realizados sobre la expresión del EGFR en el carcinoma colorrectal en los que se emplearon técnicas de unión a ligandos, otros investigadores no encontraron diferencias estadística-mente significativas entre tejidos colorrectales carcinomatosos y normales. Aunque en los trabajos de E ROTHBAUER y cols (227) se observó una tendencia hacia niveles más elevados en la mucosa colorrectal normal comparado con los niveles de EGFR en el carcinoma, PG KOENDERS (139) demuestra que la variación interindividual de los niveles de EGFR en la mucosa normal colorrectal es explicable, al menos en parte, por las variaciones topográficas en los niveles de EGFR. El uso de muestras de biopsias no emparejadas topográficamente de mucosa colorrectal y carcinoma en el trabajo de W YASUI y cols (289), puede

haber oscurecido la diferencia entre los niveles de EGFR en los tejidos normales y carcinomatosos.

En cuanto a los métodos existentes para la cuantificación del antígeno, los inmunohistoquímicos se realizan normalmente utilizando sistemas subjetivos de graduación histológica y por consiguiente, están sujetos a las variaciones de cada observador (253). Sin embargo, cuando se emplea la técnica de la inmunoperoxidasa, la intensidad de la tinción puede medirse por técnicas fotométricas ya que la absorción de la luz es directamente proporcional a la cantidad del producto de la reacción de la peroxidasa. Si se utilizan anticuerpos monoclonales y las condiciones del examen se mantienen constantes, está justificado extrapolar la medición de la densidad óptica a la concentración del antígeno reconocido por el anticuerpo (196).

S NAKAE (189) y Y KOIKE (140), no encuentran ninguna relación entre los valores del EGFR en las muestras analizadas y la invasión ganglionar, datos que no concuerdan con los nuestros, en los que hemos encontrado una diferencia estadísticamente significativa cuando comparamos los valores del EGFR en la célula tumoral y la invasión ganglionar, con valores de EGFR de 46,62 fmol/mg de proteína de membrana \pm 8,4 para casos sin invasión ganglionar, y valores de EGFR de 94,58 fmol/mg de proteína de membrana \pm 35,2, con $p < 0.05$. No hemos encontrado ninguna relación de las otras

determinaciones del EGFR comparado con la invasión ganglionar. AW HEMMING (113) obtiene unos resultados similares a los nuestros, encontrando por medio de inmunohistoquímica, que los tumores EGFR positivos se relacionan con una mayor invasión de los ganglios linfáticos, lo que se correlaciona con un peor pronóstico (118).

PG KOENDERS (139) encuentra que los valores de EGFR eran más altos en la mucosa normal, dependiendo de la localización, siendo más altos los proximales (124 fmol/mg de proteína de membrana, rango 70-239), que en los distales (124 fmol/mg de proteína de membrana, rango 35-156), $p = 0.02$. En las muestras del tumor, no hay diferencias significativas. W YASUI (289) y K KORETZ (143), no encuentran diferencias significativas según las distintas localizaciones. Por contra, nosotros hemos encontrado valores del EGFR en las cuatro muestras de cada pacientes, más bajos para los carcinomas ubicados en la mitad derecha del colon (26,72 fmol/mg de proteína de membrana $\pm 10,84$) que en los ubicados en la mitad izquierda (44,55 fmol/mg de proteína de membrana $\pm 15,41$) y recto (64,83 fmol/mg de proteína de membrana $\pm 18,39$).

Cuando se correlacionan los valores de EGFR con los estadios de Dukes, factor pronóstico ampliamente utilizado por los Cirujanos, C MESSA (177), R PORSCHE (209), M MOORGHEN (182) y K KORETZ (143) no encuentran diferencias estadísticas ni en el tejido canceroso ni en la mucosa

normal. Por el contrario, S NAKAE (189), AM KLUFTINGER (135), AW HEMMING (113) y RJC STEELE (253), encuentran una relación cuando comparan la expresión del EGFR en el tumor y los estadios de Dukes, con valores más altos del mismo en los estadios C y D, llegando incluso Nakae a aseverar que la alta expresión del EGFR en el tejido tumoral va asociada a la presencia de metástasis a distancia. Nuestra casuística está mas de acuerdo con estos últimos autores, encontrando diferencias marcadas entre los valores de EGFR en el tejido tumoral según los estadios de Dukes, con valores de 28,1 fmol/mg de proteína de membrana \pm 18,5 para los estadios A; de 44,6 fmol/mg de proteína de membrana \pm 8,0 para los estadios B, 46,7 fmol/mg de proteína de membrana \pm 18,5 para los C y de 103,3 \pm 38,2 para los D, pero sin que estas diferencias sean estadísticamente significativas, a pesar de los altos valores hallados para los estadios D. El resto de las muestras obtenidas en las otras tres localizaciones dan resultados similares.

Otra variable pronóstica en los carcinomas colorrectales es el grado de diferenciación del tumor. C MESSA (177), S NAKAE (189), W YASUI (289) R PORSCHE (209) y K KORETZ (143), no encuentran relación alguna entre el valor del EGFR en el tumor y los grados de diferenciación de Broders. En contra de estas observaciones, están los trabajos de AM KLUFTINGER (135) y RJC STEELE (253), en los que los tumores de bajo grado histológico, esto es, los bien diferenciados o medianamente diferenciados

según la clasificación de Broders, tuvieron un promedio de significación del EGFR determinado en el tejido tumoral, significativamente más bajo que los tumores de alto grado, esto es, los pobremente diferenciados. Nuestra casuística está de acorde con los hallazgos de Mess y Nakae, no encontrando diferencias entre los valores del EGFR determinados en las 4 muestras de cada paciente, y el grado de diferenciación histológica del tumor.

Finalmente, nuestros resultados en lo referente a la posible relación existente entre los distintos valores del EGFR en las muestras analizadas y el índice de recidivas o pronóstico de los pacientes, no están de acuerdo con las opiniones expresadas por A MAYER (172), el cual, determinando el EGFR mediante tinciones de secciones de 82 cánceres de colon imbuídas en parafina, encuentra que la magnitud medida del EGFR, determinó diferencias significativas en la supervivencia, encontrando que aquellos pacientes que presentaban en las muestras del tumor más del 50% de las células teñidas, tenían un peor pronóstico que aquéllos que presentaban menos del 50% de las células teñidas. Nosotros no hemos encontrado diferencias significativas en cuanto a la mortalidad ni en lo referente a la aparición de recidivas según los distintos valores de EGFR hallados en las distintas muestras analizadas.

En resumen, la expresión del EGFR en carcinomas colorrectales, no está relacionada con el tipo de tumor, grado de diferenciación

y extensión, sino que es un fenómeno inconstante de la mucosa colorrectal sana y de la afecta de tumor.

6).- CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1^a).- Los valores determinados del CA 19.9 en el citosol de las muestras de tumor, son significativamente más elevados que los valores determinados en las muestras de tejido normal, borde oral y borde anal. Así mismo, existe una correlación entre el nivel del CA 199 en el tumor y los grados de Dukes y Astler y Coller.

2^a).- Existe una correlación marcada entre los valores de CA 19.9 en el citosol de la célula tumoral y las recidivas globales, así como en el tiempo de aparición de las mismas, lo que parece confirmar, en nuestra serie, que la determinación del CA 19.9 en el tumor, es un índice pronóstico fiable.

3^a).- No hemos encontrado ninguna relación entre los valores del CA 19.9 en los bordes de resección y la aparición de recidivas locorreionales.

4^a).- Los valores de EGFR hallados en aquellas muestras que han dado una expresión positiva del mismo, han sido más elevados en las de los bordes que en la del tumor, siendo aún más elevados en las del borde oral.

5^a).- Los valores de EGFR determinados en las 4 muestras, no alcanzan significación diagnóstica ni pronóstica en cuanto al estadiaje habitual (Dukes, Astler y Coller, Broders).

6^a).- No hemos encontrado ninguna relación entre los valores de EGFR en la membrana de la célula tumoral y el índice global de recidivas, así como tampoco entre los valores de los bordes y las recidivas locorreregionales, por lo que no parece que la determinación del EGFR en la membrana de la célula tumoral sea de utilidad para los pacientes afectos de CCR.

7).- RESUMEN

RESUMEN

El carcinoma colorrectal continúa siendo uno de los cánceres más frecuentes, no habiéndose conseguido un aumento significativo en la supervivencia de los mismos a pesar de las mejoras técnicas en cuanto a la cirugía se refiere. El tratamiento coadyuvante, parece ser que en la actualidad está consiguiendo un aumento de la supervivencia. Dado que hay un grupo de pacientes que van a recaer, lo importante sería diagnosticar lo más tempranamente posible la recidiva para que el paciente se beneficie de una cirugía de la misma de una manera lo más precoz posible.

Estudiamos dos marcadores tumorales, el CA 19.9 y el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) en el citosol y membrana de la célula tumoral respectivamente, así como en el tejido normal y los bordes de resección, con el fin de poder identificar un grupo de pacientes en los que la recidiva sería más predecible y por lo tanto, realizar un follow-up más exhaustivo en los mismos. La determinación del CA 19.9 la hemos realizado mediante el método MEIA.

Cuando hemos realizado la determinación del CA 19.9 en el citosol de la célula tumoral, hemos comprobado que los niveles del marcador eran significativamente más elevados en dichas muestras, que en las tomadas

en el tejido normal y bordes, con unos valores de 2.757,7 U/mg de proteína \pm 1.285,1 par el tejido tumoral, y de 376,9 U/mg de proteína \pm 162,3 para las muestras obtenidas en el tejido normal. Así mismo,. hemos encontrado una significación entre los valores del CA 19.9 y los otros factores pronósticos manejados (Estadios de Dukes, Astler y Coller, grados de diferenciación de Broders, número de ganglios afectados, etc), de forma que a peor pronóstico, valores más altos de CA 19.9 en el tumor hemos encontrado.

No hemos hallado correlación entre los valores del CA 19.9 determinados en el tumor y el determinado en sangre periférica, salvo en los casos recidivados, en que si la ha habido con $r = 0,54$, de lo que parece deducirse que aunque el CA 19.9 determinado en la sangre periférica no es determinante de la enfermedad, si parece que valores altos del mismo, van asociados a la posibilidad de recidivas.

Hemos comprobado que, pacientes con valores altos de CA 19.9 en el tumor, recidivaban más que los que contenían valores bajos, asociándose los valores más altos del mismo, con una aparición más precoz de las mismas.

Concluimos pensando que la determinación del CA 19.9 en el tumor, parece ser un marcador fiable para poder predecir la aparición de recidivas.

El Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) lo hemos determinado también en las 4 localizaciones antes descritas. Hemos comprobado que el comportamiento del receptor es errático, habiendo tumores que no presentan expresión del mismo, al lado de otros con elevados contenidos del receptor. Estos mismos hallazgos los hemos encontrado en las determinaciones del resto de las muestras. El EGFR lo hemos determinado mediante ensayo con unión competitiva.

Hemos encontrado en nuestra serie de pacientes, valores más altos del receptor en el tejido normal y bordes de resección que en el propio tumor. Los valores de EGFR han sido más elevados en los tumores rectales que en el resto, pero sin significación estadística. Hay una correlación entre los valores del EGFR en tumor y los estadios de Dukes, pero también sin significación estadística. Los valores hallados del EGFR en tumor, cuando los relacionamos con el número de ganglios, revelan valores más altos en los casos con más de tres ganglios positivos frente a los casos sin ganglios (94,58 fmol/mg de proteína de membrana versus 46,62 fmol/mg de proteína de membrana).

No hemos encontrado ninguna relación entre las determinaciones del EGFR en las 4 muestras, y el índice de recidivas, por lo que pensamos que la determinación del EGFR en el tumor, no tiene significación en la predicción de la aparición de recidivas, y por lo tanto, no aporta ningún dato nuevo sobre

los factores pronósticos habitualmente utilizados.

8).- BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA:

1.- A co-operative trial in the primary prevention of ischemic heart disease using clofibrate: Report from the Committee of Principal Investigators. Br Heart J 40:1069-1118, 1978

2.- Adloff M, Arnaud JP, Ollier JC, Schloegel M. Peut-on améliorer le pronostic des malades opérés d'un cancer du côlon ou du rectum par une surveillance régulière? Étude prospective portant sur 909 patients. Chirurgie 115:228-236, 1989

3.- Ahen DJ, Makane PK, Brown WR. Ultraestructural localization of carcinoembryonic antigen in normal intestine and colon cancer. Cancer 49:2077-2090, 1982

4.- Akerman NB: The influences of mechanical factors on intestinal lymph flow and their relationship to operations for carcinoma of the intestine. Surg Gynecol Obstet 138:677-682, 1974

5.- Al-Nafussi AI, Wrigth NA. The effect of epidermal growth factor (EGF) on cell proliferation of the gastrointestinal mucosa in rodents. *Virchows Arch (A)* 40:63-69, 1982

6.- Ando Y. Prognostic significance of flow cytometric DNA analysis in colorectal cancer. *J Jpn Surg Soc* 91:1700-1709, 1990

7.- Anzano MA, Rieman D, Prichett W, Bowen-Pope DF, Greig R. Growth Factor Production by human colon carcinoma cells lines. *Cancer Res* 49:2898-2904, 1989

8.- Arends JW, Wiggers T, Schutte B et al. Monoclonal antibody (1116 NS 19-9) defined monosialoganglioside (GICA) in colorectal carcinoma in relation to stage, histopathology and DNA flow cytometry. *Int J Cancer* 32:289-293, 1983

9.- Armstrong B, Doll R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in diferents countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer* 15:617-631, 1975

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

11.- Atwel JD, Taylor I, Cruddas M. Incremento del riesgo de CCR asociado a anomalías congénitas de las vías urinarias. Br J Surg (Ed esp) 10:198-201, 1993

12.- Au FC, Stein BS, Genaro AR, Tysson RR. Tissue CEA in colorectal carcinoma. Dis Colon Rectum 27:16-18, 1984

13.- Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutation in colorectal carcinoma. Science 244:217-221, 1989

14.- Ballantyne GH, Modlin IM. Postoperative follow-up for colorectal cancer: who are we kinking?. J clin Gastroenterol 10:359-364, 1988

15.- Banner B, Tomas de la Vega J, Roseman D, Coon J. Should flow cytometric DNA analysis precede definitive surgery for colon carcinoma. Ann Surg 202:740-744, 1985

16.- Barlow AP, Thompson MH. El seguimiento colonoscópico tras la resección debida a un carcinoma colorrectal: una actitud selectiva. Br J Surg (Ed Esp). 10:193-197, 1993

17.- Barnes DW. Epidermal growth factor inhibits growth pf A-431 human epidermoid carcinoma in serum-free culture. J Cell Biol 93:1-4, 1982

18.- Blay J, Brown KD. Functional receptors for epidermal growth factor in a epithelial-cell line derived from the rat small intestine. *Biochem J* 225:85-94, 1985

19.- Bleiberg H, Buyse M, Galand P. Cell kinetic indicators of premalignant stages of colorectal cancer. *Cancer* 56:124-129, 1985

20.- Block G. Vitamin C and cancer prevention: The epidemiologic evidence. *Am J Clin Nutr* 53:270S-282S, 1991

21.- Bombardieri E, Saccani Jotti G, Cocciolo MG, et al. Tissue polypeptide antigen in colon tumors: serum levels and immunohistochemical localization. *Cancer Detect Prev* 8:219-26, 1985

22.- Borlinghaus P, Wieser S, Lamerz R. Epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, and epidermal growth factor receptor content in normal and carcinomatous gastric and colonic tissue. *Clin Investig*, 71(11):903-907, 1993

23.- Bresalier RS, Young SK. Neoplasias malignas del Intestino grueso. En *Enfermedades gastrointestinales (Sleisenger-Fordtran)* Ed Panamericana, Tomo 2, Cap 73:1488-1532, 1994

- 24.- Broders A. The grading of carcinoma. Minn Med. 8:726, 1925
- 25.- Bruinvels DJ, Stiggelbout AM, Kievit J, van Howelingen HC, Habbema DF, van de Velde, CJH. Follow-up of patients with colorectal cancer. A meta-analysis. Ann Surg 219:174-182, 1994
- 26.- Bucci L, Benassai G, Santoro GA: Second look in colorectal surgery. Dis Colon Rectum 2:123-126, 1984
- 27.- Buntain WL, ReMine WH, Farrow GM: Premalignancy of polyps of the colon. Surg Gynecol Obstet B4:499-508, 1972
- 28.- Burdette WJ (Ed). Carcinoma of the colon and antecedent epithelium. Springfield IL. Charles C Thomas, 1970
- 29.- Burkit DP: Epidemiology of cancer of the colon an rectum. Cancer 28:3-13, 1971
- 30.- Burnstein MJ. Factores dietéticos en relación con las neoplasias colorrectales. Surg Clin North Am (Ed Esp), 13-32, 1993

31.- Burrows L, Tartter P. Effects of blood transfusion on colonic malignancy recurrence rate. *Lancet* 2:662, 1982

32.- Bussey HJR: *Familial Polyposis Coli*. Baltimore, Johns Hopkins University Press, 1975

33.- *Cancer facts and figures*. ACA New York, 1990

34.- Cantrell CA, Smith KA: Transient expression of interleukin 2 receptors: consequences for T cell Growth. *J Exp Med* 158:1895-1911, 1983

35.- Carlsson V, Stewenius J, Ekelund G, Leandoer L, Nosslin B. Is CEA analysis of value on screening for recurrences after surgery for colorectal carcinoma?. *Dis Colon Rectum* 26:369-373, 1983

36.- Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem*, 48:193-216, 1979

37.- Carpenter G, Lembach KJ., Morison MM, Cohen S. Characterization of the binding of ¹²⁵I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts. *J Biol Chem* 250:4297-4299, 1975

38.- Carrol KK, Braden LM, Bell HA et al. Fat and cancer. *Cancer* 58:1818-1825, 1986

39.- Castelli M, Casale V, Sega FM et al. The biological and clinical significance of tumor markers in tissue extracts. *Cancer Detect Prev*, 6:61-66, 1983

40.- Castro EB, Rosen PP, Quan Sh: Carcinoma of large intestino in patients irradiated for carcinoma of cervix and uterus. *Cancer* 31:45-52, 1973

41.- Cavaliere R, De Peppo F, Castaldo P et al. A multivariate discriminant analysis of tissue CEA, TPA, and CA 19.9 quantitative determination in colorectal cancer patients. *Proceedings of 32nd Congress of the Société Internationale de Chirurgie* (A 11-2,28), 1987

42.- Cerdán FJ, Díez M, Balibrea JL. Control postoperatorio de los pacientes con cáncer de colon y recto. *Avances de Cirugía Colorrectal*, Salvá JA. Pulso Ediciones. Barcelona 1991

43.- Clark J, Hall AW, Moossa AR: Treatment of obstructing cancer of the colon and rectum. *Surg Gynecol Obstet* 141:541-544, 1975

44.- Cochrane JP, Williams JT, Faber RG, Slack WW. Value of outpatient follow-up after curative surgery for carcinoma of the large bowel. *BMJ* 128:593-595, 1980

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

46.- Cohen S. Isolation of a mouse submandibular gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem* 237:1555, 1962

47.- Cohen AM, Shank B, Friedman MA. Colorectal cancer. Principles and practice of Oncology. Ed JB Lippincot Company. Ce Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, 895-964, 1989

48.- Cohen S, Fava RA. Internalization of functional epidermal growth factor: receptor/kinase complexes in A431-cells. *J Biol Chem* 260:12351-12358, 1985

49.- Copeland EM, Miller LD, Jones RS: Prognostic factors in carcinoma of the colon and rectum. *Am J Surg* 116:875-880, 1968

50.- Corman ML, Collier JA, Viedenheimer MC: Proctosigmoidoscopy: Age criteria for examination in the asymptomatic patient. *Cancer* 25:286-290, 1975

51.- Corpet DE, Stamp D, Medline A et al. Promotion of colonic microadenoma growth in mice and rats fed cooked sugar or cooked casein and fat. *Cancer Res* 50:6955-6958, 1990

52.- Correa P: Nutrition and Cancer: Epidemiologic correlations. In Newel GR, Ellison NM (eds): *Nutrition and Cancer: Etiology and Treatment*. New York, Raven Press, 1-10, 1981

53.- Cosimelli M, De Peppo F, Castelli M, Giannarelli D, Schinaia G, Castaldo P, Buttini GL, Sciarretta F, Bigotti G, Di Filippo F, Cavaliere MS, Cavaliere R. Multivariate analysis of a tissue CEA, and CA 19.9 quantitative study in colorectal cancer patients. *Dis Colon Rectum* 32:389-397, 1989

54.- Crocker J, Skilbeck N. Nucleolar organiser region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quantitative study. *J Clin Pathol* 40:885-889, 1987

55.- Chapulis PH, Dento OF, Fisher R: A multivariate analysis of clinical and pathological variable in prognosis after resection of large bowel cancer. *Br J Surg* 72:698-702, 1985

56.- Christensen ME, Therkildsen MH, Hansen BL, Albeck H, Hansen GN, Bretlau P. Epidermal growth factor receptor expression on oral mucosa dysplastic epithelia an squamous cell carcinomas. Eur Arch Otorhinolaryngol, 249:243-247, 1992

57.- Chung M, Seinmetz OK, Gordon PH. Transfusión perioperatoria de sangre y resultados tras la resección del carcinoma colorrectal. Br J Surg (Ed. esp.)10:66-72, 1993

58.- Damjanov I, Mildner B, Knowles BB. Immunohistochemical localization of the epidermal growth factor receptor in normal human tissues. Lab Invest 55:588-592, 1986

59.- Davies GC, Ellis H: Radical surgery in locally advanced cancer of the large bowel. Clin Oncol 1:21-26, 1975

60.- De Vita V: Principles and practice of oncology. JB Lippincott Company. Philadelphia 21:643-673, 1981

61.- Dearnaley DP, Ormerod MG, Sloane JPO et al: Detection of isolated mamary carcinoma cells in marrow of patients with primary breast cancer. J R Soc Med 76:359-364, 1983

62.- Del Villano BC, Zurawski VR. The carbohydrate antigenic determinant 19.9 (CA 19.9) a monoclonal antibody defined tumor marker. Immunodiagnosics. New York, Alan R. Liss; 269-282, 1983

63.- Devesa JM, Morales V, Enriquez JM et al. Colorectal cancer. The bases for a comprehensive follow-up. Dis Colon Rectum 31:636-652, 1988

64.- Devlin HB, Plant JA, Morris D: The significance of the symptoms of carcinoma of the rectum. Surg Gynecol Obstet 137:399-402, 1973

65.- Díaz-Rubio. Cáncer de colon y recto. Rev Cancer 3(5):209-210, 1989

66.- Díez M, Cerdán FJ, Pollán M, Maestro ML, Ortega MD, Martínez G, Moreno G, Balibrea JL. Prognostic significance of preoperative serum CA 19.9 assay in patients with colorectal carcinoma. Anticancer Res 14:2819-2826, 1994

67.- Díez M, Camuñas J, Enríquez JM, González A, Tobaruela A, Gutiérrez A y cols. Características histopatológicas y clínicas asociadas a la sobreexpresión de la proteína p53 en adenocarcinomas de colon y recto. Cir Ep, 58(4).307-311, 1995

68.- Downward J, Yarden Y, Mayes E et al: Close similarity of epidermal growth factor receptor and *v-erb-B* oncogene protein sequences. *Nature* 307:521-527, 1984

69.- Dubosson JD, Klein D, Pettavel J et al: Syndrome du cancer familial avers 4 generations. *Schweiz Med Wochenschr* 107:875-881, 1977

70.- Dukes C, Bussey H. The spread of rectal cancer and its effect on prognosis. *Br J Cancer* 12:309-320, 1958

71.- Dukes C. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol* 35:323, 1932

72.- Dunlop HG. Programas de screening de neoplasias de intestino grueso en individuos con antecedentes familiares de cáncer colorrectal. *Br J Surg (Ed. esp.)* 8:199-207, 1992

73.- Ekman CA, Gustavson J, Henning A. Value of a follow-up study of recurrent carcinoma of the colon and rectum. *Surg Gynecol Obstet* 145:895-897, 1977

74.- Ellis H, Morgan MN, Wastell C: "Curative" surgery in carcinoma of the colon involving duodenum: A report of 6 cases. *Br J Surg* 59:932-935, 1972

75.- Enker WE, Kramer RG. The follow-up of patients after definitive resections of large bowel cancer. *World J Surg* 6:578-584, 1982

76.- Enker WE, Laffer UT, Block GE: Enhanced survival of patients with colon and rectal cancer is based upon wide anatomic resection. *Ann Surg* 190:350-360, 1979

77.- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 61:759-765, 1990

78.- Fearon ER, Cho KR, Nigro FJ et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247:49-56, 1990

79.- Freedman LS, Macaskill P, Smith AN. Multivariate analysis of prognostic factors for operable rectal cancer. *Lancet* 1:733-736, 1984

80.- Frey P, Forand R, Maciag T, Shooter EM. The biosynthetic precursor of epidermal growth factor and the mechanism of its processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:6294, 1979

81.- Frieldin LP, Phillips RKS, Fry JS. Prediction of outcome after curative resection for large bowel cancer. *Lancet* 2:904-907, 1986

82.- Friend SH, Beinards R, Rogeli S y cols. A Human DNA Segment with Properties of thr Gene that Predisposes to Retinoblastoma and Osteosarcoma. *Nature*, 323:643-646, 1986

83.- Fucini C, Rosi S, Herd-Smith A et al. Significato e limiti del follow-up intensivo dopo intervento readicale per cancro del colon-retto. *Minerva Chir* 40:783-786, 1985

84.- Fung CH, Goldman H: *The incidence and significance of villous change in adenomatous polyps.* *Am J Clin Pathol* 53:21-25, 1970

85.- Garland C, Sheckelle RB, Barret-Connor E et al. Dietary Vit D and calcium and risk of colorectal cancer: a 19 years prospective study in men. *Lancet* 1:307-309, 1985

86.- Garland CF, Garland FC, Goreham ED. Can colon cancer incidence and death rates be reduced with calcium and vitamin D.? *Am J Clin Nutr* 54:193S-201S, 1991

87.- Gilbertsen VA, Wangenstein OH. A summary of thirteen years' experience with the second look program. *Surg Gynecol Obstet* 114:438, 1962

88.- Gilbertsen VA, Nelms JM: The prevention of invasive cancer of the rectum. *Cancer* 41:1137-1139, 1978

89.- Gilbertsen VA. Proctosigmoidoscopy and polypectomy in reducing the incidence of rectal cancer. *Cancer* 34:936-939, 1974

90.- Glenn F, McSherry CK: Obstruction and perforation in colorectal cancer. *Ann Surg* 173:983-992, 1971

91.- Glenney JR, Chen WS, Lazar CS, Walton GM, Zokas LM, Rosenfeld MG, Gill GN. Ligand-induced endocytosis of the EGF receptor is blocked by mutational inactivation and by microinjection of anti-phosphotyrosine antibodies. *Cell* 52:675-684, 1988

92.- Guber GA, Nomura A, Kamiyama A et al. Bowel transit time and stool weight in populations with different colon cancer risks. *Lancet* 2:110-114, 1977

93.- Go WLW, Ammon HW, Holtermuller KH et al: Quantification of carcinoembryonic antigen-like activities in normal human gastrointestinal secretions. *Cancer* 36: 2346-2350, 1975

94.- Goh HS, Jass JR, Atkin WS, Northover JM. Value of flow cytometric determination of ploidy as a guide to prognosis in operable rectal cancer: a multivariate analysis. *Int J Colorectal Dis* 2:17-21, 1987

95.- Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinoma by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med*, 121:439-462, 1965

96.- Gorham ED, Garland CF, Garland FC. Physical activity and colon cancer risk. *Int J Epidemiol* 18:728-729, 1989

97.- Goustin AS, Leof EB, Shipley GD, Moses RL. Growth factors and cancer. *Cancer Res* 46:1015-1029, 1986

98.- Gray A, Dull TJ, Ullrich A. Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128.000-molecular weight protein precursor. *Nature* 303:722, 1983

99.- Greenwald P, Lanza E, Eddy GA. Dietary fiber in the reduction of cancer colon risk. *J Am Diet Assoc* 87:1178-1188, 1987

100.- Grinnell RS: Lymphatic metastases of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 131:494-506, 1950

101.- Grinnell RS: The gradin and prognosis of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 109:500-533, 1939

102.- Grinnell RS: The chance of cancer and lymphatic metastasis in small colon tumors discovered on x-ray examination. *Ann Surg* 159:132-138, 1964

103.- Grinnell RS, Lane N: Benign and malignant adenomatous polyps and papillary adenomas of the colon and rectum: An analysis of 1856 tumors in 1335 patients. *Int Abstr Surg* 106:519-538, 1958

104.- Gunderson LL, Sosin H: Areas of failure found at reoperation (second or symptomatic look) following "curative surgery" for adenocarcinoma of the rectum. *Cancer* 34:1278-1292, 1974

105.- Gusterson B, Copwley G, Smith JA, Ozanne B. Cellular localization of human epidermal growth factor receptor. *Cell Biol Int Rep* 8:649-658, 1984

106.- Hackford AW. Biochemical markers for colorectal cancer. Diagnostic and therapeutic implications. Surg Clin North Am, 73:85-102, 1993

107.- Haagensen DE Jr, Kister SF, Panic J et al: Comparative evaluation of carcinoembryonic antigen and gross cystic disease fluid protein as plasma markers for human breast carcinoma. Cancer 42:1646-1652, 1978

108.- Haggitt RC, Pitcock JA: Familial juvenile polyposis of the colon. Cáncer 26:1232-1238, 1970

109.- Hall NR, Finan PJ, Ward B, Turner G, Bishop DT. Susceptibilidad genética al cáncer colorrectal en pacientes menores de 45 años. Br J Surg (Ed esp) 13:18-23, 1995

110.- Hand PH, Nuti M, Colcher D et al: Definition of antigenic heterogeneity and modulation among human mammary carcinoma cell populations using monoclonal antibodies to tumor-associated antigens. Cancer Res 43:728-735, 1983

111.- Hansen HJ, Snyder LJ, Miller E et al: Carcinoembryonic antigen (CEA) assay. A laboratory adjunct in the diagnosis and management of cancer. *J Hum Pathol* 5:139-147, 1974

112.- Hayashi Y, Widjono YW, Ohta K, Hanioka K, Obayashi Ch, Itoh K, Imai Y, Itoh H. Expression of EGF, EGF-receptor, p53, v-erb B and ras p21 in colorectal neoplasmas by immunostaining paraffin-embedded tissues. *Pat Int*, 44:124-130, 1994

113.- Hemming AW, Davis NL, Kluftinger A, Robinson B, Quenville NF, Liseman B, LeRiche J. Prognostic markers of colorectal cancer: an evaluation of DNA content, epidermal growth factor receptor, and Ki-67. *J Surg Oncol* 51(3):147-152, 1992

114.- Hermanek P, Guggenmoos-Holzmann I, Gall FP. Prognostic factors in rectal carcinoma. A contribution to the further development of tumor classification. *Dis Col Rect*, 32(7): 593-599, 1989

115.- Hertz REL, Deddish MR, Day E: Value of periodic examination in detecting cancer of the rectum and colon. *Postgrad Med* 27:290-294, 1960

116.- Heys SD, Sherif A, Bagley JS, Brittenden J, Smart C, Eremin O. Factores pronósticos y supervivencia de los pacientes de menos de 45 años con CCR. Br J Surg (Ed esp) 12:84-87, 1994

117.- Hill MJ. Bacterial metabolism and colon cancer. Nutrition and cancer 1:46-50, 1979

118.- Hojo K, Kuyama Y, Moriya Y. Lymphatic spread and its prognostic value in patients with rectal cancer. Am J Surg 144:350-354, 1982

119.- Holley RW, Kiernan JA: "Contact inhibition" of cell division in 3T3 cells. Proc Natl Acad Sci USA 60:300-304, 1968

120.- Houlston RS, Murday V, Harcopos C, Williams CB, Slack J. Screening and genetic counselling for relatives of patients with colorectal cancer in a family cancer clinic. Br Med J 301:366-368, 1990

121.- Imamura Y, Yasutake K, Yoshimura Y, Oya M, Matsushita K, Tokisue M, Sashitaka T. Contents of tissue CEA and CA 19-9 in colonic polyp and colorectal cancer, and their clinical significance. Gastroenterol Jpn 25(2):186-192, 1990

122.- Informe OMS, 1981

123.- Izquierdo Rojo M. Oncosupresores y sus productos. En *Biología molecular del cáncer*. Ed Síntesis S.A., Madrid. 105-124; 1995

124.- Izquierdo Rojo, M. Oncogenes en organismos superiores y sus productos. En: *Biología molecular del cáncer*. Ed Síntesis S.A.; 71-103, 1995

125.- Joh T, Itoh M, Katsumi K, Yokohama T, Miyamoto T, Imai S, Ikeda K, Matsusako K, Takeuchi T, Kato T, Tanaka R. Immunoreactive epidermal growth factor in mouse digestive organs. Use of a sensitive enzyme immunoassay. *Acta Endocrinol (Copenh)* 115:203-210, 1987

126.- Jones D, Moore M, Schofield P. Prognostic significance of DNA ploidy in colorectal cancer: a prospective flow cytometric study. *Br J Surg* 75:28-33, 1988

127.- Kaibara N, Koga S, Jinnai D. Synchronous and metachronous malignancies of the colon and rectum in Japan with special reference to a coexisting early cancer. *Cancer*, 54:1870-1874, 1984

128.- Kern SE, Fearon ER, Tersmette WF, Enterline JP, Leppert M, Nakamura Y et al. Allelic loss in colorectal carcinoma. JAMA; 261:3099-3103, 1989

129.- Khankhanian N, Mavligt GM, Russell WO et al: Prognostic significance of vascular invasion in colorectal cancer of Dukes' B class. Cancer 39:1195-1200, 1977

130.- Khoo SK, Warner NL, Lie JT, Mackay IR. Carcinoembryonic antigenic activity of tissue extracts: A quantitative study of malignant and benign neoplasms, cirrhotic liver, normal adult and fetal organs. Int J Cancer, 11:681-687, 1973

131.- Kiriya K, Watanabe T, Sakamoto J, Ito K, Akiyama S, Yamauchi M, Takagi H. Expression and clinical significance of type-1 blood group antigens (Lea, Leb, CA 19-9) in colorectal cancer: comparison with CEA. Nippon Geka Gakkai Zasshi 92(3):320-330, 1991

132.- Kirklin J, Dpockerty M, Vaugh J. The role of the peritoneal reflection in the progress of carcinoma of the rectum and sigmoid colon. Surg Gynecol Obstet 88:326-331, 1949

133.- Klatsky AL, Armstrong MA, Freidman GD et al. The relations of alcoholic beverage use to colon and rectal cancer. *Am J Epidemiol* 128:1007-1015, 1988

134.- Kleist S. The clinical value for the tumor markers CA 19.9 and carcinoembryonic antigen (CEA) in colorectal carcinomas: A critical comparison. *Int J Biol Markers* 1:3-8, 1986

135.- Klufftinger AM, Robinson BW, Quenville NF, Finley RJ, Davis NL. Correlation of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 oncogene product to known prognostic indicators of colorectal cancer. *Surg Oncol* 1(1):97-105, 1992

136.- Knent P, Aromaa A, Maatela J et al. Vitamin E and cancer prevention. *Am J Clin Nutr* 53:283S-286S, 1991

137.- Knoernschild HE: Growth rate and malignant potential of colonic polyps: Early results. *Surg Forum* 14:137-138, 1963

138.- Knudson AG Jr. Hereditary cancer in man. *Cancer Invest* 1:187-193, 1983

139.- Koenders PG, Peters WH, Wobbes T, Beex LV, Nagengast FM, Benraad TJ. Epidermal growth factor receptor levels are lower in carcinomatous than in normal colorectal tissue. *Br J Cancer*, 65(2):189-192, 1992

140.- Koike Y. Immunohistochemical studies on expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and proliferative activity in human colorectal cancers. *Hokkaido Igaku Zasshi*, 68(2):166-175, 1993

141.- Koprowski H, Herlyn M, Steplewski Z, Sears HF. Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma. *Science* 212:53-55, 1981

142.- Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell J et al. Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somat Cell Genet* 5:957-971, 1979

143.- Koretz K, Schlag P, Möller P. Expression of epidermal growth factor receptor in normal colorectal mucosa, adenoma and carcinoma. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 416:343-349, 1990

144.- Korn JE. Colon cancer epidemiology: Fat, fiber and fertility. In Schrok (ed): Perspectives in Colon and Rectal Surgery, vol 3, n° 2. St Louis, Quality Medical Publishing, 297-306, 1990

145.- Kouri M, Pirhonen S, Mecklin JP et al. Prognostic value of DNA ploidy in colorectal carcinoma: a prospective study. Br J Cancer 62:976-981, 1990

146.- Kritchevsky D. Fibre and cancer. Med Oncol Tumor Pharmacother 7:137, 1990

147.- Kune GA, Kune S, Watson LF. The role of heredity in the etiology of colorectal cancer: data from the Melbourne Colorectal Cancer Study. World Surg, 13:124-131, 1989

148.- Kuusela P, Jalanko H, Roberts P et al. Comparison of CA 19.9 and carcinoembryonic antigen (CEA) levels in the serum of patients with colorectal diseases. Br J Cancer, 49:135-139, 1984

149.- Lee HP, Gorley L, Duffy SW et al. Colorectal cancer and diet in an asian population: A case-control study among Singapore Chinese. Int J Cancer 43:1007-1016, 1989

150.- Lev R, Grover R: Precursors of human colon carcinoma: A serial section study of colectomy specimens. *Cancer*: 47:2007-2015, 1981

151.- Lightdale ChJ, Sherlock P. Tumores del intestino delgado y del intestino grueso. En Stein JH: *Medicina Interna*. Salvat Editores, cap: 26, pp:154-162, 1983

152.- Lineweaver W. Stating colon cancer. *Contemp Surg*, 25:19, 1984

153.- Linos LNA, Beard LC, O'Fallow WM, Dockerty MA, Beart RN, Kurland LT. Cholecistectomy and carcinoma of the colon. *Lancet* ii:379-381, 1981

154.- Lipkin M: Biology of large bowel cancer: Present status and research frontiers. *Cancer* 36:2319-2324; 1975

155.- Lipkin M, Newmark H, Boone CW et al. Calcium, Vitamin D and colon cancer. *Cancer Res* 51:3069-3070, 1991

156.- Lipkin M: The identification of individuals at high risk for large bowel cancer. *Cancer*: 40:2523-2530, 1977

- 157.- Liu C, Woo A, Tsao MS. Expression of transforming growth factor-alpha in primary human colon and lung carcinomas. *Br J Cancer*, 62:425-429, 1990
- 158.- Lockhart-Mummery HE, Heald RJ. Metachronous cancer of the large intestine. *Dis Colon Rectum*, 15: 261, 1972
- 159.- LoGerfo P, Krupey J, Hansen HJ: Demonstration of an antigen common to several varieties of neoplasia. *N Engl J Med* 285:138-141, 1971
- 160.- Lovet E: Familial factors in the etiology of carcinoma of the large bowel. *Proc R Soc Lond* 67:751-752, 1974
- 161.- Lowry OH, Rosenbrough AJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951
- 162.- Lynch HT, Krush AJ. Cancer family "G" revisited: 1895-1970 *Cáncer* 27:1506-1511, 1971
- 163.- Lynch HT, Lynch PM: Heredity and gastrointestinal cancer. In Lipkin M, Good RA (eds): *Gastrointestinal Tract Cancer*. New York, Plenum, 1978

164.- Lynch HT, Watson P, Lanspa SJ. Natural history of colorectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II). *Dis Colon Rectum* 31:439-444, 1988

165.- Lynch HT, Harris RE, Lynch PM et al. Role of the heredity in multiple primary cancer. *Cancer* 40:1849-1854, 1977

166.- Mack TM: The evaluation of immunodiagnostic tests. In Herberman RB, McIntire KR (eds): *Immunodiagnosis of cancer*. New York, Marcel Dekker, 1979

167.- MacLeod JH, Chipman ML, Gordon PC et al: Survivorship following treatment for cancer of the colon and rectum. *Cancer* 26:1225-1231, 1970

168.- Malden LT, Novak U, Burgess AW. Expression of transforming-growth-factor-alpha messenger RNA in the normal and neoplastic gastrointestinal tract. *Int J Cancer*, 43:380-384, 1989

169.- Marsh PJ, James RD, Schofield PF. Definición de la recidiva local después del tratamiento quirúrgico del carcinoma colorrectal. *Br J Surg (Ed esp)* 14:69, 1995

170.- Martin F, Martin MS. Radioimmunoassay of carcinoembryonic antigen in extracts of human colon and stomach. *Int J Cancer*, 9:641-647, 1972

171.- Martin EW, Coioperman M, Carey LC et al: Sixty second-look procedures indicated primarily by rise in serial carcinoembrionyc antigen. *J Surg Res* 28:389-394, 1980

172.- Mayer A, Takimoto M, Fritz E, Schellander G, Kofler K, Ludwig H. The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdr gene expression in colorectal cancer. *Cancer*, 71(8):2454-2460, 1993

173.- Macquart-Moulin G, Riboli E, Cornee J et al. Case-control study in colorectal cancer and diet in Marseilles. *Int J Cancer* 38:183-191, 1986

174.- McGregor RA, Bacon HE: Multiple cancers in colon surgery: Report of 162 cases. *Surgery* 44:828-833, 1958

175.- McIntire Kr, Waldemann TA: Measurement of alpha-fetoprotein. In Rose NR, Friedman H (eds): *Manual of Clinical Immunology*, 2nd ed, p 936. Washington, American Society for Microbiology, 1980

176.- McKusick VA: Genetics and large-bowel cancer. Am J Dig Dis 19:954, 1964

177.- Messa C, Russo F, Notarnicola M, Di Leo A. Demonstration of Epidermal Growth Factor Receptor in colorectal Adenocarcinoma by Enzyme Immunoassay. Digestion 55:103-107, 1994

178.- Metzger U. Adjuvant therapy for colorectal carcinoma. World J Surg 15:576-582, 1991

179.- Midiri G, Amanti C, Benedetti M et al. CEA tissue staining in colorectal cancer patients: A way to improve the usefulness of serial serum CEA elevation. Cancer, 55:2624-2629, 1985

180.- Moertel CG, Fleming TR, MacDonald JS et al. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. N Engl J Med 322:352-358, 1990

181.- Moorehead Rj, Kernohan RM, Patterson CC, McKelvey STD, Parks TG. Does cholecistectomy predispose to colorectal cancer?. Dis Colon Rectum, 29:36-38, 1986

182.- Moorghen M, Ince P, Finney KJ, Watson AJ, Haris AL. Epidermal growth factor receptors in colorectal carcinoma. *Anticancer Res*, 10(3):605-612, 1990

183.- Moran K, Cooket T, Forster G, Guillen P, Sheehan S, Dervan P, Fitzpatrick JM. Valor pronóstico de las regiones organizadoras nucleolares y de los valores de la ploidía en el cáncer colorrectal avanzado. *Br J Surg (Ed esp)* 3:135-139, 1990

184.- Moreno JA, Rey C. Utilidad clínica de los marcadores tumorales séricos. En *Controversias en Oncología*, 2. Ed Doyma, Cap 2, 31-71, 1993

185.- Morson BC: Cancer in ulcerative colitis. *Gut* 7:425-426, 1966

186.- Muñoz de la Espada JB, García J, Orfao A, Ciudad J, López A, Urrutia M, Cuadrado F, Gómez Alonso A. Utilidad de la citometría de flujo en la predicción de la recidiva del cáncer colorrectal (estudio en una serie de tres años) *Cir Esp*, 58:102-106, 1995

187.- Murthy U, Anzano MA, Greig RG. Expression of TGF- α /EGF and TGF- β receptors in human colon-carcinoma cell lines. *Int J Cancer*, 44:110-115, 1989

188.- Muto T, Bussey HJR, Morson BC: The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 36:2251-2270, 1975

189.- Nakae S, Shimada E, Urakawa T. Study of c-erbB-2 protein and epidermal growth factor receptor expression and DNA ploidy pattern in colorectal carcinoma. *J Surg Oncol*, 54(4):246-251, 1993

190.- Nakopoulou L, Zinozi M, Theodoropoulos G, Papacharalampous N. Carcinoembryonic antigen detection by immunocytochemical methods in carcinomas of the colon and stomach. *Dis colon Rectum* 26:269-274, 1983

191.- National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. *J.A.M.A.* 264:1444-1450, 1990

192.- Neil GA, Bruce WR. Experimental approaches to colon cancer prevention in humans. *Gastroenterol Clin North Am* 17:917-930, 1988

193.- Nelson RL. Dietary minerals and colon carcinogenesis [review]. *Anticancer Res* 7:259-269, 1987

194.- Nelson N: Cancer prevention: Environmental, industrial and occupational factors. *Cancer* 47:1065-1070, 1981

195.- Ng WW, Tong KJ, Tam TN, Lee SD. Clinical values of CA19-9, CA125 and CEA in malignant obstructive jaundice. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih Taipei*; 55(6):438-446, 1955

196.- Nibbering PH, Leijh PCJ, van Furth R. A cytophotometric method to quantitate the binding of monoclonal antibodies to individual cells. *J Histochem Cytochem*, 33:453-459, 1985

197.- Nicholson N, Sainsbury JRC, Harris AL, Farndon JR. Epidermal growth factor receptor status: a clinically useful prognostic indicator in axillary node negative breast cancer. *Br J Surg* 76:1333, 1989

198.- Nigro ND, Singh DV, Campbell RL et al. Effect of dietary beef fat on intestinal tumor formation by azoxymethane in rats. *J Natl Cancer Inst* 54:439-442, 1975

199.- Nishisho Y, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsonomiya J, Baba S, Hedge P, Markham A, Krush AJ, Petersen G, Hamilton SR, Nilbert MC, Levy DB, Bryan TM, Preiinger AC, Smith KJ, Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*, 253:665-669, 1991

200.- Oh JH, MacLean LD: Prognostic use of of preoperative and immediate postoperative carcinoembryonic antigen determination in colonic cancer. *Can J Surg* 20:64-67, 1977

201.- Ohuchi N, Takahashi K, Matoba N, Sato T, Taira Y, Sakai N; Masuda M; Mori S. Comparison of serum assays for TAG-72, CA19-9 and CEA in gastrointestinal carcinoma patients. *Jpn J Clin Oncol* 19(3):242-248, 1989

202.- Pastan I, Willingham MC. Journey to the center of the cell. Role of the receptosome. *Science* 214:504-509, 1981

203.- Patchet SE, Mulcahy HE, O'Donohue DP. Vigilancia colonoscópica tras la resección curativa por CCR. *Br J Surg (Ed Esp)* 11:47-49, 1994

204.- Patt DJ, Brynes RK, Vardiman JW et al: Mesocolic Lymph node histology is an important prognostic indicator for patients with carcinoma of the sigmoid colon: An immunomorphologic study. *Cancer* 35:1388-1397, 1975

205.- Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F. Improvement in the staining and in the visualisation of the argyrophilic proteins of the nucleolar organiser region at the optical level. *Histochemi J* 18:5-14, 1986

206.- Polissar L, Sim D, Francis A. Survival of colorectal cancer patients in relation to duration of symptoms and other prognosis factors. *Dis colon and rectum* 24:364-369, 1981

207.- Polk HC Jr, Spratt JS Jr. Recurrent colorectal carcinoma: detection, treatment, and other considerations. *Surgery* 69:9-23, 1971

208.- Pollet VG, Nichols RJ: The relationship between the extent of distal clearance and survival and local recurrence rates after curative anterior resection for carcinoma of the rectum. *Ann Surg* 198:159-163, 1983

209.- Porschen R, Classen S, Kahle Y, Borchard F. In situ evaluation of the relationship between epidermal growth factor receptor status and tumor cell proliferation in colon carcinomas. *Int J Cancer* 54(2):189-193, 1993

210.- Porto RM, Ballesta Gimeno AM: Interés clínico de la determinación de marcadores tumorales. Lab 2000 3:45-52, 1986

211.- Potter JD, McMichael AJ. Diet and cancer of the colon and rectum: A case-control study. J Natl Cancer Inst 76:557-569, 1986

212.- Potter JD. McMichael AJ, Hatshdrne JM. Alcohol and beer consumption in relation to cancers of bowel and lung: A extended correlation analysis. J Chron Dis 5:833, 1982

213.- Prager ED, Swinton NW, Young JL et al: Follow-up study of patients with benign mucosal polyps discovered by proctosigmoidoscopy. Dis colon Rectum 17:322-324, 1974

214.- Quartin RS, Finlay CA, Levine AJ. The p53 gene and gene product. En: Sharp PA, editor. Nuclear processes and oncogenes. San Diego, California: Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publisher, 87-104, 1992

215.- Quayle JB: Ability of CEA blood levels to reflect tumor burden; A study in a human xenograft model. Br J Cancer 46:220-227, 1982

216.- Quentmeier A, Möller P, Schwarz V, Abel U, Schlag P. Carcinoembryonic Antigen, CA 19.9, and CA 125 in normal and carcinomatous human colorectal tissue. *Cancer* 60:2261-2266, 1987

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

218.- Ramia JM, Landa JJ, Abad A, Rodriguez S, Morales C y cols. Valoración de CA 19.9 en la ictericia obstructiva. *Cir Esp*, 56, Supl 1:142

219.- Ramírez JM, Mortensen NJ, Takeuchi N, Smilgin MM. La ecografía endoluminal en el seguimiento de pacientes con CCR. *Br J Surg /Ed Esp* 11:280-294, 1994

220.- Ravikumar TS, Wolf B, Cocchiaro G, D'Emilia J, Steele G. RAS gene activation and epidermal growth factor receptor expression in human colon cancer. *J Surg Res* 47:418-422, 1989

221.- Rebhun LI: Cyclic nucleotides, calcium and cell division. *Int Rev Cytol* 49:1-54, 1977

222.- Recio P, Bussey HJR: The pathology and prognosis of carcinoma of the rectum in the young. Proc R Soc Lond 58:789-790, 1965

223.- Rhodes JB et al: Changing distribution of primary cancer in the large bowel. JAMA 238:1641-1643, 1977

224.- Rich T, Gunderson LL, Galdabini J et al: Clinical and pathologic factors influencing local failure after curative resection of carcinoma of the rectum and rectosigmoid. Cancer 52:1317-1329, 1983

225.- Robinson MHE, Thomas WM, Hardcastle JD et al. Tendencia del CCR hacia su presentación clínica en un estadio más precoz. Br J Surg (ed esp.) 11:199-201, 1994

226.- Rognum TO, Thorud E, Lund E. Survival of large bowel carcinoma patients with different DNA ploidy. Br J Cancer 56:633-636, 1987

227.- Rothbauer E, Mann K, Wiebecke B et als. Epidermal growth factor receptors and epidermal growth factor-like activity in colorectal mucosa, adenomas and carcinomas. Klin Wochenschrift 67:518-523, 1989

228.- Rowley JD: Identification of constant chromosome regions involved in human hematologic malignant disease. *Science*: 216:749-751, 1982

229.- Sabiston DC Jr. Carcinoma de colon, recto y ano. En: *Tratado de Patología Quirúrgica*. Vol I. Ed. Interamericana. Mc Graw-Hill. 1056-1071, 1995

230.- Sagredo E, Soriano A, Vivanco FJ, Ruibal A. Incremento de la eficacia diagnóstica del antígeno carcinoembrionario (CEA) en los cánceres gástricos mediante la dosificación simultánea del CA 72.4. *Rev Clin Esp*, 184:86-87, 1989

231.- Sanfelippo PM, Beahrs OH: Factors in the prognosis of adenocarcinoma of the colon and rectum. *Arch Surg* 104:401-406, 1972

232.- Savage CR Jr, Inagami T, Cohen S. Epidermal growth factor and a new derivative: rapid isolation procedures and biological and chemical characterization. *J Biol Chem* 47:7612, 1972

233.- Scambia G, Panici PB, Battaglia F et al. Receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in primary laryngeal cancer. *Cancer*, 67:1347-1351, 1992

234.- Scatchard G. The attraction of proteins for small molecules and ions. AN NY Acad SCI 51:600-672, 1949

235.- Scott NA, Rainwater LM, Wieand HS et al. The relative prognostic value of flow cytometric DNA analysis and conventional clinicopathologic criteria in patients with operable rectal carcinoma. Dis Colon Rectum 30:513-520, 1987

236.- Scott NA, Beart RW Jr. Corectal cancer. Flow cytometric DNA analysis. Aust N Z J Surg. 58:189-191, 1988

237.- Scher CD, Stone ME, Stiles CD: Platelet-derived growth factor prevents GO arrest. Nature 281:390-392, 1979

238.- Schottenfeld D, Berg JW, Vitsky B: Incidence of multiple primary cancers: 11. Index cancer arising in the stomach and lower digestive system. JNCI 43:77-86, 1969

239.- Seefeld PH, Barga JA: The spread of carcinoma of the rectum: Invasion of lymphatics, veins and nerves. Ann Surg 118:76-90, 1943

240.- Shamberger RJ, Tytko SA, Willis CE: Antioxidants and cancer: VI. Selenium and age-adjusted human cancer mortality. Arch Environ Health 31:231-235, 1976

241.- Shimizu N, Kondo I, Gamou S, Belizadin MA, Shimizu Y. Genetic analysis of hyperproduction of epidermal growth factor receptors in human epidermoid carcinoma A431 cells. Somatic Cell Mol Genet 10:45-49, 1984

242.- Shiue JW, Tam TN, Lai KH et als. The clinical significance of a new monoclonal antibody defined antigen CA 195 as a tumor marker in colorectal cancer. Chung Hua I Hsueh Tsa Chih 44(4):223-228, 1989

243.- Sian MS. Diet and nutritional factors in the etiology of colon cancer [review]. Anticancer Res 7:293-300, 1987

244.- Singletary SE, Bker FL, Spitzer G, Tucker RSL, Tomasovic B, Brock WA, Ajani J, Kelly AM. Biological effects of epidermal growth factor on the in vitro growth of human tumors. Cancer Res, 47:403-406, 1987

245.- Sleisenger MH, Fordtran JS. Neoplasias malignas del intetino grueso. En: Enfermedades gastrointesti-nales. Ed Panamericana, 1488-1532, 1994

246.- Slentz K, Senagore A, Hibbert J, Mazier WP, Talbot TM. Can preoperative and postoperative CEA predict survival after colon cancer resection? Am Surgeon 60:528-532, 1994

247.- Somerville JE, Clarke LA, Biggart JD. c-erb B-2 overexpression and histological type of *in situ* and invasive breast carcinoma. J Clin Pathol, 45:16-20, 1992

248.- Sporn MB, Todaro GJ: Autocrine secretion and malignant transformation of cells. New Engl J Med 308:878-880, 1980

249.- Spratt JS, Ackerman LV: Small primary adenocarcinomas of the colon and rectum. JAMA 179:337-346, 1962

250.- Spratt JS, Ackerman LV, Moyer CA: Relationship of polyps of the colon to colonic cancer. Ann Surg 148:682-698, 1958

251.- Spratt JS, Spjut HJ: Prevalence and prognosis of individual clinical and pathologic variables associated with colorectal carcinoma. Cancer 20:1976-1985, 1967

252.- Staab HJ, Anderer FA, Stumppf E et al: Carcinoembryonic antigen follow-up and section of patients for second-look operation in management of gastrointestinal carcinoma. J Surg Oncol 10:273-282, 1978

253.- Steele RJC, Kelly P, Ellul B, Eremin O. La expresión del factor de crecimiento epidérmico en el cáncer colorrectal. Br J Surg (Ed Esp) 5:201-203, 1991

254.- Steele G Jr. Follow-up plans after treatment of primary colon and rectum cancer. World J Surg. 15:583-588, 1991

255.- Steele GD, Davis S, Hsiukang et al. Alterations of gene expression in human colorectal cancer. Arch Surg 125:493-497, 1990

256.- Steinberg SM, Barwick KW, Stablein DM. Importance of tumor pathology and morphology in patients with surgically resected colon cancer. Cancer 58:1340-1345, 1986

257.- Su L et al. Asociation between wild type and mutant APC gene products. Cancer Research, 53:2728-2731, 1993

258.- Sugiyama K, Yonemura Y, Miyazaki I. Immunohistochemical study of epidermal growth factor receptor in gastric carcinoma. *Cancer*, 63:1557-1561, 1989

259.- Symonds DA, Vickery AL: Mucinous carcinoma of the colon and rectum. *Cancer* 37:1891-1900, 1976

260.- Tabuchi Y, Deguchi H, Saitoh Y. Carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 levels of peripheral and draining venous blood in colorectal cancer patients. Correlation with histopathologic and immunohistochemical variables. *Cancer* 62(8): 1605-1613, 1988

261.- Taoka H, Ando Y, Kurumiya T et al. Significance of CA 199 values in the feces of patients with colorectal carcinoma. *Mip Geka Gakk Zas* 88(5):543-50, 1987

262.- Temin HM: Studies on carcinogenesis by avian sarcoma viruses. VI. Differential multiplication of uninfected and of converted cells in response to insulin. *J Cell Physiol* 69:377-384, 1967

263.- Thomas WH, Larson RA, Wright HK et al: An analysis of patients with carcinoma of the right colon. *Surg Gynecol Obstet* 127:313-318, 1968

264.- Thomas P, Zamcheck N: Role of the liver in clearance and excretion of circulating carcinoembryonic antigen (CEA). *Dig Dis Sci* 28:216-224, 1983

265.- Thompson RH, Enterline HT: The macroscopic appearance of colorectal polyps. *Cáncer* 48:151-160, 1981

266.- Thompson DMP, Krupey J, Freedman SO et al: The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Proc Natl Acad Sci Usa* 64:161-167, 1969

267.- Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med* 325:1593-1596, 1991

268.- Tornquist A, Ekelund G, Leandoer L. The value of intensive follow-up after curative resection for colorectal carcinoma. *Br J Surg* 69:725, 1982

269.- van't Hof RJ, Defice LHK, Nujdens R, de Brabander M, Verkleij AJ, Boonstra J. Dynamics of epidermal growth factor receptor internalization studies by Navoid light microscopy in combination with immunogold labeling. *Eur J Cell Biol* 48:5-13, 1989

270.- Vogel VG, MacPherson RS. Dietary epidemiology of colon cancer. Hematol Oncol Clin North Am 3:35-63, 1989

271.- Volgestein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. Cell, 70:523-526, 1992

272.- Volgestein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal tumor development. N Eng J Med, 319:525-532, 1988

273.- Wahren B, Edsmyr F, Zimmerman R: Measurements of urinary CEA-like substance: An aid in management of patients with bladder carcinoma. Cancer 36:1490-1495, 1975

274.- Wanebo HJ, Rao B, Pinsky C et al: Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer. N Engl J Med 299:446-451, 1978

275.- Wargovich MJ, Eng VWS, Newmark HL et al. Calcium ameliorates the toxic effect of deoxycholic acid on colonic epithelium. Carcinogenesis 4:1205, 1983

276.- Weedon DD, Shorter RG, Ilstrup DM et al: Crohn's disease and cancer. New Engl J Med 289:1099-1104, 1973

277.- Weisburger JH. Nutritional approach to cancer prevention with emphasis on vitamins, antioxidants and carotenoids. Am J Clin Nutr 53:226S-227S, 1991

278.- Welch CE, Burke JF: Carcinoma of the colon and rectum. N Engl J Med 266:211-216, 1962

279.- Welch JP, Donaldson GA: Management of severe obstruction of the large bowel due to malignant disease. Am J Surg 127:492-499, 1974

280.- Welch JP, Donaldson GA: Perforative carcinoma of the colon and rectum. Ann Surg 180:734-740, 1974

281.- Whelen SL, Parkin DM, Massayer E. Patterns of cancer incidence in five continents. KJARC Sci. Publ. No 102, Lyon International Agency for Research of Cancer, 1990

282.- Wigers T, Arends JW, Schutte B, Volovics L, Bosman FT. A multivariate analysis of pathological prognostic indicators in large bowel cancer. Cancer 61:386-395, 1988

283.- Wilson SM, Beahrs OH: The curative treatment of carcinoma of the sigmoid, rectosigmoid, and rectum. *Ann Surg* 183:556-565, 1976

284.- Willet W. The search of the causes of breast and colon cancer. *Nature* 338:389-394, 1989

285.- Williams GM, Weisburger JH. Food and cancer: Cause and effect? *Surg Clin North Am* 66:873-889, 1986

286.- Williams N, Durdey P, Quirke P et al. Preoperative staging of rectal neoplasm and its impact on clinical management. *Br J Surg* 72:868-874, 1985

287.- Winn RJ, Levin B. Chemoprevention of colon cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 3:65-73, 1989

288.- Woolam GL, Jackman RJ, Ramirez RJ et al: Scirrhus carcinoma of the lower intestine. *Surg Gynecol Obstet* 121:753-755, 1965

289.- Yasui W, Sumiyoshi H, Hata J, Kameda T, Ochiai A, Ito I, Tahara E. Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas. *Cancer Res*, 48:137-141, 1988

290.- Yeh YC, Scheving LA, Tsai TH, Scheving LE. Circadian phase-dependent effects of epidermal growth factor on deoxyribonucleic acid synthesis in ten different organs of the adult male mouse. *Endocrinology*, 109:644-651, 1981

291.- Yunis JJ: The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* 221:227-236, 1983

292.- Zamcheck n, Kupchik hz: Summary of clinical use and limitations of the carcinoembryonic antigen assay and some methodological considerations. In Rose NR, Friedman H (eds): *Manual of Clinical Immunology*, 2nd ed, p 919. Washington, American Society for Microbiology, 1980

293.- Zeigler RG. Vegetables, fruits and carotenoids and the risk of cancer. *Am J Clin Nutr* 53:251S-259S, 1991

294.- Zimmeramn RP, Gates TS, Boehmer ChG, Mantyh PW. Epidermal growth factor receptors in the human colon. *Eur J Pharm*, 150:201-202, 1988