

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Ciencias Biomédicas



**VALOR PRONÓSTICO DE LA EXPRESIÓN
DE EGFr, COX-2, TP53, Ki-67,
REGULADORES DEL CICLO CELULAR y
TIMIDILATO SINTASA EN EL CÁNCER DE
COLON ESPORÁDICO.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Cristóbal Gaspar Martínez

Dirigida por:

Dra. Laia Bernet Vegué

Dr. Rafael Cano Muñoz

VALENCIA 2013

“La Medicina es la Ciencia de
la Incertidumbre y el Arte de la Probabilidad”
Sir William Osler 1849-1919.

“No hay que temer a nada en la vida,
tan solo tratar de comprender”
Marie Curie 1867-1934.

A Milagros, mi mujer.

A mis padres, Cristóbal y Carmen, que ya no están.

A Enrique, mi hermano.

A Enrique, Rosa Clara, Pablo y Alberto, nuestro futuro.

A Milagros y Laureano.

A Conchi, M^a José, Carlos, y a mi familia.

Agradecimientos.

Mi más sincero agradecimiento a los Dres. Laia Bernet Vegué y Rafael Cano Muñoz, miembros del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de la Ribera (HUdR) donde se realizó el estudio experimental. Han sido los directores de la tesis, impulsaron el desarrollo del estudio y supervisaron el resultado final. Gracias Laia y Rafa por vuestra amistad, consejos, paciencia y comprensión.

Al Dr. José María Tenías Burillo de la Unidad de Apoyo a la Investigación del Hospital de la Mancha Centro en Alcázar de San Juan, Ciudad Real. Se encargó del análisis estadístico del estudio, nos aportó su profesionalidad y nos orientó en la interpretación de los resultados.

A Juan María De la Cámara De las Heras, Jefe del Servicio de Bibliometría del HUdR en Alzira, por su labor incansable en la búsqueda bibliográfica y por estar siempre disponible.

A la Dra. Juana Rodríguez Delgado, especialista en Análisis Clínicos del Hospital General Universitario de Valencia por su ayuda en la búsqueda de datos referentes a los MT séricos incorporados al estudio; sin su trabajo no hubiese sido posible.

A la Dra. M^a Milagros López Muñoz, especialista en Oncología Radioterápica del HUdR. Realizó una magnífica y abnegada labor en la recogida de datos de las historias clínicas de los pacientes. Compartimos todo.

Al Dr. Miguel Soler Tortosa, Jefe del Servicio de Oncología Radioterápica del HUdR, porque su forma de trabajar siempre enseña, su persona es un ejemplo permanente y su amistad me honra.

A mis compañeros/as del HUdR con quien comparto trabajo diario y que hacen más fácil enfrentarse a un problema tan complejo como la enfermedad cancerosa.

A la Comisión de Docencia y Estudios Clínicos del HUdR por sus facilidades para la realización de este trabajo. Su ayuda logística y económica ha permitido que sea una realidad. Gracias a María Cuenca Torres. Por su ayuda con la edición a Juan Vicente Izquierdo Soriano.

A todos los investigadores que han trabajado con BMT en el Laboratorio y la Clínica. De todos ellos hemos aprendido, a través de la lectura de sus textos, a tratar de introducirnos en esta apasionante área de estudio.

Siempre a los pacientes afectados de enfermedad neoplásica, en especial del área colorrectal, ya que cualquier avance que pudiésemos aportar en su beneficio nunca sería suficiente. Todos tienen nombre e ilusión de vida. A Aurora Maestro Mogrera, quien les tutela y orienta con las complejidades de sus problemas cotidianos.

ÍNDICE.

INTRODUCCIÓN.	11
Pronóstico y Factores Pronósticos.	12
Conceptos.	12
Clasificación.	14
Biomarcadores.....	14
Conceptos.	14
Metodología de estudio.	16
Técnicas de análisis para BMT.....	17
Carcinomas Colorrectales.....	18
Características generales.....	18
Diagnóstico y tratamiento.....	20
Carcinogénesis colorrectal.....	22
Factores pronósticos en Carcinomas de Colon.	24
Estudios sobre BMT en CCR.....	25
Descripción de los BMT tumorales para estudio.....	26
Receptor del Factor Epidérmico de Crecimiento EGFR.....	27
Ciclooxigenasa Cox-2.	30
Proteína Tumoral TP53.....	33
Antígeno de Proliferación pKi-67.....	35
Regulador de Ciclo Celular Ciclina D1.....	37
Regulador de Ciclo Celular p21 ^{waf17cip1}	40
Regulador de Ciclo Celular p27 ^{Kip1}	43

Regulador de Síntesis y Reparación de DNA Timidilato Sintasa.	46
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	50
OBJETIVOS.	52
PACIENTES, MATERIAL Y.....	54
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.	54
Selección de Pacientes y Material.	55
Metodología Experimental.	57
Análisis Estadístico.....	60
RESULTADOS.....	62
Pacientes y tratamiento.	63
Resultados del estudio de marcadores tumorales.	64
Expresión de EGFR.	64
Expresión de Cox-2.....	65
Expresión de TP53.....	65
Expresión de Marcador de Proliferación pKi-67.	65
Expresión de Reguladores del Ciclo celular.....	65
Expresión de Timidilato sintasa.....	66
Correlaciones clínico-patológicas y marcadores tumorales.....	66
Correlaciones entre diferentes biomarcadores.	69
Seguimiento y status de los pacientes.....	72
Correlaciones evolutivas.....	72
Análisis de Supervivencia Libre de Enfermedad.....	72
SLE para Factores Pronósticos Convencionales.	73
SLE para Biomarcadores.	73
Análisis de Supervivencia global.	73
Supervivencia global para Factores Pronósticos Convencionales.	74
Supervivencia Global para Biomarcadores.	74
Análisis Multivariante	75
Modelo multivariante para SLE.	75
Modelo multivariante para Supervivencia global.	75
DISCUSIÓN.	76
Consideraciones sobre el Cáncer de Colon y Factores pronósticos.....	77
Heterogeneidad y necesidad de BMT de optimización.	77
Comentarios sobre resultados del estudio.....	82
Contextualización bibliográfica.	82
EGFR y su vía de señalización.	82
Metodología y Rendimiento.....	82

Correlaciones de EGFR con otros BMT.	83
Relación de EGFR con FCP convencionales.	84
Expresión de EGFR y Relación Pronóstica.	86
Proteína Cox-2.	87
Metodología y Rendimiento.	88
Correlaciones de Cox-2 con otros BMT.	89
Relación de Cox-2 y FCP Convencionales.	90
Expresión de Cox-2 y Relación Pronóstica.	91
TP53.	92
Metodología y Rendimiento.	93
Correlaciones de TP53 con otros BMT.	93
Relación de TP53 con FPC convencionales.	94
Expresión de TP53 y Relación Pronóstica.	95
Marcador de Proliferación pKi-67.	97
Metodología y Rendimiento.	98
Correlaciones de pKi-67 con otros BMT.	99
Relación de pKi-67 con FCP convencionales.	100
Expresión de pKi-67 y Relación Pronóstica.	101
Estudio de los Reguladores del Ciclo Celular.	103
Expresión de proteína Ciclina D1.	103
Metodología y Rendimiento.	103
Correlaciones de Ciclina D1 con otros BMT.	105
Relación de Ciclina D1 con FCP convencionales.	105
Expresión de ciclina D1 y Relación Pronóstica.	106
Regulador del Ciclo Celular p21 ^{waf1/cip1}	109
Metodología y Rendimiento.	110
Correlaciones de p21 ^{waf1/cip1} con otros BMT.	110
Relación de p21 ^{waf1/cip1} con FPC convencionales.	111
Expresión de p21 ^{waf1/cip1} y Relación Pronóstica.	113
Regulador de Ciclo celular p27 ^{Kip1}	114
Metodología y Rendimiento.	115
Correlaciones de p27 ^{Kip1} con otros BMT.	116
Relación de p27 ^{Kip1} con FCP convencionales.	116
Expresión de p27 ^{Kip1} y Relación Pronóstica.	117

Timidilato Sintasa.....	120
Metodología y Rendimiento.....	120
Correlaciones de pTS con otros BMT.....	121
Relación de pTS con FCP convencionales.	122
Expresión de pTS y Relación Pronóstica.	123
Comentarios sobre nuestro estudio y sus limitaciones.	126
BMT en las Guías de Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de Colon.	128
Perspectivas de Investigación de BMT en Cáncer de Colon.	129
CONCLUSIONES.....	135
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	138
RESUMEN.	179
ANEXO: FIGURAS.....	183
ANEXO: TABLAS.....	211
ANEXO: FIGURAS/DIAGRAMAS SOBRE BMT, METODOLOGÍA EXPERIMENTAL e INMUNOTINCIONES.....	270
ANEXO: CRITERIOS REMARK.	288
ANEXO: ABREVIATURAS.	291

INTRODUCCIÓN.

El carcinoma colorrectal (CCR) es una de las enfermedades neoplásicas más frecuentes y constituye un importante problema de salud pública por la cantidad de recursos necesarios para su diagnóstico y tratamiento.

Los principales factores pronósticos de uso cotidiano en CCR son la edad, status funcional, localización tumoral, grado histológico y estadio TNM. Permiten agrupar a los pacientes en diferentes categorías de riesgo y ofrecer tratamientos específicos, pero su papel definitorio individual es muy limitado. El conocimiento de la fisiopatología molecular y el desarrollo de técnicas de análisis específicas pueden servir de base para la incorporación de nuevos biomarcadores al objeto de optimizar los factores pronósticos y predictivos clínico-patológicos convencionales (FCP).

Pronóstico y Factores Pronósticos.

Conceptos.

La práctica clínica diaria está fundamentada en tres actividades esenciales basadas en estudios probabilísticos y relacionadas entre sí: Diagnóstico, Pronóstico y Tratamiento. Se puede definir el Pronóstico como el intento de formular previsiones respecto a la evolución de un proceso patológico que afecta a un individuo enfermo (1). La perspectiva de evolución de un paciente depende de un diagnóstico adecuado, del conocimiento de la historia natural de la enfermedad, de la respuesta a tratamientos determinados y de su progresión en un paciente individual (2).

INTRODUCCION

La valoración pronóstica debe ser contemplada como un proceso dinámico multidimensional, condicional y siempre global, relacionado con todas las causas que pueden confluir en el curso evolutivo de un paciente (2).

El establecimiento del pronóstico es esencial en la toma de decisiones médicas sobre el abordaje de la enfermedad, el diseño de la estrategia terapéutica individual y la información al paciente, que le permitirá mantener su capacidad de autodeterminación y orientar su actitud ante diferentes aspectos de su proyecto vital. Facilita la dilucidación de responsabilidades médico-legales y contribuye a la optimización de los recursos médicos comunitarios con el desarrollo de guías terapéuticas coste-efectivas (1, 2, 3).

Desde la perspectiva de investigación clínica y de transferencia, el conocimiento de los factores pronósticos tiene interés para el diseño y análisis de estudios clínicos que permitan evaluar terapias experimentales frente a tratamientos estándar, en las revisiones retrospectivas de la experiencia clínica, para determinar una relación causal con el curso evolutivo de la enfermedad e incluso delimitar un fenómeno biológico para su explicación (1, 2, 3).

La valoración pronóstica en Oncología Clínica es una actividad científica derivada del análisis de una serie de variables ó factores pronósticos, que pueden explicar la heterogeneidad asociada con el curso evolutivo esperado de un proceso tumoral (1, 3).

La catalogación de la enfermedad oncológica se efectúa en la práctica clínica mediante el sistema descriptivo ICDO (por International Classification of Diseases for Oncology) de extensión específica de la International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems for Tumor Diseases adoptado por la SNOMED (Systematized Nomenclature of Medicine), la WHO Classification of Tumors para la clasificación histológica y el sistema TNM de UICC/AJCC para la definición de extensión anatómica tumoral inicial (3).

Clasificación.

Los factores pronósticos pueden ser clasificados según el sujeto de estudio (por *subject-based*) como: vinculados a la enfermedad o tumor; relacionados con las características demográficas, comorbilidades, compliance del paciente, y con su entorno socio-sanitario. Por su relevancia clínica pueden distinguirse tres categorías: esenciales, adicionales y nuevos prometedores (3).

La información derivada del estudio de factores pronósticos *subject-based* vinculados con el tumor está relacionada con datos referentes a su clasificación morfológica, grado de diferenciación y patrón de invasión; la extensión anatómica y carga tumoral valorada por el sistema de estadificación TMN, el tamaño y localización así como con la propia fisiopatología tumoral relacionada con biomarcadores moleculares (3, 4).

Biomarcadores.

Conceptos.

Los avances en el conocimiento de la biología tumoral, genómica, proteómica y patología molecular han generado nuevos Biomarcadores que están siendo evaluados mediante programas de investigación de transferencia para su aplicación en la clínica oncológica (4, 5).

Según el US National Institute of Health Biomarkers Definition Working Group, un Biomarcador (BMT) se puede definir como “una característica que se puede medir y evaluar de forma objetiva como un indicador de procesos biológicos normales, patogénicos o respuestas farmacológicas a intervenciones terapéuticas” (6).

Con este término se describen una variedad de moléculas, procesos basados en test moleculares o estudios de tejido que requieren un ensayo especial que va más allá del examen clínico, radiológico y/o histopatológico convencional y puede facilitar información sobre el comportamiento futuro de la enfermedad cancerosa. Son resultados de cambios producidos en un tejido maligno, que los diferencian de los normales u otro tipo tumoral, y distinguen comportamientos específicos (7).

Los BMT pueden incluir cambios a nivel genético, transcripcional, traslacional o post-traslacional o funcional y ser estudiados a diferentes niveles como DNA, RNA, proteínas, células; en tejidos o fluidos, tumor primario, ganglios, metástasis y médula ósea (7, 8).

Sus aplicaciones clínicas pueden orientarse hacia la determinación de riesgo, screening, diagnóstico diferencial, pronóstico, y monitorización de la eficacia de tratamiento o status de enfermedad (7).

Los BMT que facilitan información sobre el curso de la enfermedad cancerosa pueden ser categorizados como: pronósticos, predictivos, y subsidiarios, no excluyentes entre sí (4, 6, 9, 10):

- Los BMT Pronósticos están relacionados con la historia natural del proceso oncológico y generalmente se aplican a poblaciones de pacientes no tratados o bien con un amplio rango de tratamientos. Permiten clasificar a los pacientes en subgrupos de riesgo con cursos evolutivos distintos y, con las técnicas de análisis actuales, se definen como ausentes o presentes y/o de alta o baja expresión.
- Los BMT Predictivos identifican la probabilidad de beneficio clínico valorado como respuesta a tratamientos específicos y su toxicidad potencial; se aplican a pacientes individuales mediante la valoración de características tumorales particulares y se suelen medir como variables continuas aunque se pueden identificar también puntos de corte definidos.
- Los BMT Subsidiarios demuestran la modulación del tratamiento en tejidos no tumorales y pueden servir de alternativa en la monitorización del efecto farmacológico como punto final clínico útil (3, 5, 9, 10).

Los estudios sobre marcadores pronósticos en Oncología Clínica tienen como objetivo investigar su asociación individual o colectiva con el evento evolutivo de interés que suele ser la recaída, muerte del paciente o ambas,

medidas por tiempo a progresión, intervalo o supervivencia libre de enfermedad (ILE/SLE) y supervivencia global (SG) relacionada con la enfermedad (11, 12).

Metodología de estudio.

Para la validación de los BMT en la práctica clínica se han propuesto tres fases, desde exploratorias iniciales generadoras de hipótesis identificando marcadores de interés, hasta la confirmación prospectiva a gran escala.

- Los estudios Fase I son análisis exploratorios precoces diseñados con objeto de identificar marcadores potenciales y generar hipótesis para una investigación posterior.
- Los estudios Fase II continúan la investigación exploratoria para estimar una relación entre marcador y pronóstico que permita discriminar entre pacientes de alto y bajo riesgo para un determinado comportamiento evolutivo con resultado de progresión de enfermedad o muerte.
- Los Fase III son estudios de confirmación a gran escala que validan hipótesis iniciales de las fase II. Su diseño está fundamentado en un protocolo de estudio prospectivo y sus resultados suelen alcanzar un nivel elevado de evidencia (12, 13).

Son propuestas similares a las fases de estudio I-V de BMT relacionados con ensayos clínicos farmacológicos (12, 13, 14, 15). Los modelos de regresión multivariantes Cox son el método de elección para el análisis de los datos de supervivencia que ofrecen los estudios de BMT pronósticos (12, 16).

La aceptación de BMT para su empleo rutinario debe cumplir una serie de requisitos (17):

- Su determinación debe estar disponible y ser reproducible con un control de calidad adecuado.
- Deben de procurar un valor añadido sustancial al sistema pronóstico reconocido.
- Su validación debe estar basada en estudios clínicos fase III confirmados de forma independiente.

El panel de expertos de la American Society of Clinical Oncology (ASCO) diseñó el sistema TMUGS (por Tumor Marker Utility and Grading System) como escala de utilidad al objeto de determinar niveles de evidencia para el empleo en la clínica de un marcador en investigación (18).

Por recomendación de los grupos de NCI-EORTC se han desarrollado las guías REMARK (por Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies) para facilitar información relevante del diseño de estudios, hipótesis de trabajo, características de los pacientes y las muestras, métodos de análisis y valoración estadística con objeto de facilitar comunicaciones completas y transparentes, que permitan contrastar los resultados expuestos y el contexto para establecer conclusiones adecuadas (19).

Técnicas de análisis para BMT.

La nosología de la enfermedad cancerosa como se conoce en la actualidad está basada en la localización tumoral, tipo histológico, grado de diferenciación y estadio. La clasificación fenotípica de tumores que incluye datos histológicos y morfométricos puede ser optimizada mediante la incorporación de información derivada del conocimiento de sus mecanismos moleculares facilitando el desarrollo de clasificaciones integrales de tumores, mecanicistas, pronósticas y etiológicas mediante la implementación del diagnóstico molecular avanzado (20).

La aplicación de técnicas moleculares para el estudio de las neoplasias ha redundado en el conocimiento de su etiología y patogénesis, desarrollo de nuevas clasificaciones clínicas relevantes, y caracterización de BMT con potencial importancia diagnóstica, pronóstica y/o predictiva.

Se han descrito técnicas de análisis para secciones tisulares como Inmunohistoquímica (IHQ), FISH/ISH y métodos que emplean DNA, RNA o proteínas extraídas de muestras tumorales (PCR, Southern, Northern o Western blotting) así como procedimientos de alto rendimiento como aCGH, micromatrices de DNA o tisulares y microdissección/captura con láser (5, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27).

Con la información recabada de la historia clínica del paciente, los informes patológicos deben integrar criterios diagnósticos morfológicos convencionales con datos derivados de la visualización de proteínas en secciones tisulares por IHQ y técnicas moleculares de análisis de DNA y/o RNA, FISH/ISH, de uso cada vez más extendido, con finalidad de describir la Morfología Molecular del tumor como nuevo paradigma de estudio (20, 26, 28).

La IHQ es un método analítico que permite la localización de constituyentes proteicos tisulares en base al reconocimiento antigénico específico. Su desarrollo en patología quirúrgica se ha visto favorecido por avances en la amplificación de señal para mejorar su sensibilidad, recuperación antigénica que permite tinciones consistentes y la incorporación de anticuerpos específicos (29). Los datos derivados del análisis inmunohistoquímico tisular pueden ser empleados con criterios diagnósticos de confirmación tumoral, tipo y estirpe así como BMT con diferentes finalidades.

El estudio de la expresión de proteínas tisulares por IHQ es un ensayo de fácil acceso para la validación de los datos recopilados desde técnicas genómicas y proteómicas de alto rendimiento. Tiene una aplicación sencilla en los Laboratorios de Patología que, junto con sistemas TMA y técnicas automatizadas para captura-análisis de imagen, la hacen una herramienta muy útil para el estudio de BMT con capacidad pronóstica y predictiva (30, 31).

Las técnicas de IHQ pueden adquirir el rango de inmunoensayo semi o cuantitativo con la implementación del Test Total en sus fases pre-analítica, analítica y post-analítica que incluye una serie de recomendaciones para la adquisición de especímenes, fijación, recuperación antigénica, procesado, tinción, interpretación y comunicación de resultados (28, 32) que figuran en los programas de control de calidad.

Carcinomas Colorrectales.

Características generales.

El Carcinoma Colorrectal (CCR) es una de las neoplasias más comunes en los Países Occidentales. El número de casos nuevos estimados para el año

2006 en el ámbito de la Unión Europea (EU25) fue de 297.000 para ambos sexos, lo que supone el 15% y la segunda causa más frecuente. Con 139.400 defunciones (11.4-12.7%) fue la segunda causa de muerte atribuida a enfermedad cancerosa (33). En nuestro País, representa la tercera causa de morbi-mortalidad por enfermedad cancerosa con 22.000 casos nuevos estimados por año para ambos sexos con tasas ajustadas x100000 habitantes de 54.4 para varones y 25.4 para mujeres, siendo responsable de 13.075 defunciones que se corresponden al 12-15% del total de casos por cáncer (34).

Aunque su etiología se desconoce, datos derivados de estudios epidemiológicos observacionales, caso-control y de cohortes han permitido definir ciertos factores de riesgo ligados al CCR como la edad superior a los 60 años, historia personal de tumores previos, agregación familiar tumoral de primer o segundo grado, ciertas patologías asociadas, enfermedad inflamatoria intestinal crónica o bien factores ambientales relacionados con el estilo de vida occidental como consumo de dietas ricas en grasas y/o carnes rojas, obesidad, sedentarismo y hábito tabáquico (35, 36, 37, 38, 39, 40).

El CCR es una enfermedad heterogénea que se puede presentar en tres escenarios clínicos diferentes. Más del 80% son considerados esporádicos o incidentales, 5-10% de los casos se desarrollan en el contexto de síndromes hereditarios y el 1-2% se asocian con enfermedad intestinal inflamatoria crónica. En el 75% de los casos no es posible establecer algún factor de riesgo definido en los pacientes diagnosticados, aunque en el 20% de ellos se puede constatar cierto patrón de agregación familiar tumoral (34, 36, 39).

Aproximadamente el 70% de los tumores se localizan en colon y el 30% en recto. La configuración macroscópica de los CCR puede ser razonablemente categorizada como exofítica (polipoide) o plana (infiltrativos o ulcerados). Estos patrones de crecimiento están condicionados tanto por la localización anatómica como por la extensión de la enfermedad, y pueden solaparse en ocasiones dando lugar a dificultades de interpretación o estadificación, por lo que el Colegio Americano de Patólogos (CAP) no ha hecho una recomendación de consenso al respecto (41, 42).

Desde el punto de vista histopatológico, entre el 85-90% de los CCR son adenocarcinomas tipo NOS sin características morfológicas especiales; las variedades mucinosa y los carcinomas de células en anillo de sello representan el 2-5% de los casos. Las recomendaciones de consenso del CAP sugieren un sistema doble de bajo y alto grado, definidos por morfología nuclear o patrón tubular, para la clasificación del grado histológico con una frecuencia para tumores de alto grado entre el 20-30%. Sin embargo, las comunicaciones descriptivas de tres grados, bien, moderadamente diferenciados o indiferenciados con porcentajes 20/60/20 son habituales en la literatura. El borde externo tumoral puede adoptar características infiltrativas y de *pushing* según la interfase tumor-estroma sea irregular o delimitada. La invasividad del margen tumoral se considera de alto grado en el 30% de los casos (≥ 10 focos por campo x 250) valorada por la desdiferenciación tumoral (por *tumor budding*) además de la invasión linfovascular, perineural y la respuesta estromal desmoplásica e inflamatoria como otras variables de interés (41, 42).

Diagnóstico y tratamiento.

La investigación de síntomas guía por técnicas de imagen y endoscopia completa con biopsia tumoral permitirán establecer el diagnóstico de confirmación y localización de la enfermedad, despistar patologías intestinales asociadas y estimar la extensión inicial de enfermedad que será definitivamente definida por el estudio patológico de la pieza tumoral quirúrgica (39, 43). Se recomienda el sistema TNM desarrollado por la AJCC/UICC para la estadificación definitiva de los CCR ya que describe la extensión del tumor a través de la pared intestinal y la posible invasión ganglionar o metástasis a distancia (Tabla nº 1) (44, 45).

El abordaje terapéutico del cáncer de colon se debe contemplar desde una aproximación multidisciplinar que incluya el empleo de cirugía y tratamientos sistémicos en base a su estratificación por factores de riesgo. Las técnicas quirúrgicas implican la resección en bloque del tumor con márgenes adecuados (al menos 5 cm) y linfadenectomía regional (más de 12 gánglios mesentéricos aislados) y su intención inicial suele ser curativa. El estudio patológico final de la pieza quirúrgica deberá facilitar información sobre el tipo

INTRODUCCION

histológico, grado de diferenciación y extensión del tumor así como de su localización, tamaño, grado de afectación de la circunferencia intestinal, obstrucción, perforación o presencia de satelitosis, adenomas u otras lesiones sincrónicas. La estadificación patológica postquirúrgica definitiva de la enfermedad y la valoración de factores pronósticos clínico-patológicos servirá de base para la decisión sobre el empleo de tratamientos sistémicos y/o locorregionales complementarios (39, 46).

Entre el 70-75% de los pacientes se presentan en la clínica como enfermedad no metastásica y las supervivencias relativas a 5 años se sitúan en el 89.9% para enfermedad localizada, 69.6% para enfermedad con extensión regional y sobre el 11.9% para enfermedad metastásica (Tabla nº 2) (47).

El tratamiento adyuvante está indicado para pacientes en estadio TNM III y II de alto riesgo (definidos por hallazgos de tumores indiferenciados, invasión linfo-vascular, obstrucción intestinal, menos de 12 gánglios linfáticos examinados, invasión perineural, perforación y márgenes positivos o indeterminados). Se emplea quimioterapia (QT) basada en Fluoropirimidinas (FPs) en dobletes con un impacto significativo sobre la supervivencia global (SG) (39, 46, 48-51).

El objetivo del tratamiento para enfermedad avanzada y/o recurrente es la paliación. Se suelen emplear esquemas de combinación de quimioterapia y/o bioterapia (QT/BT) que permiten alcanzar supervivencias medianas superiores a los 20 meses con una buena calidad de vida (35, 39).

En cáncer de colon, las recaídas se producen en los primeros 3 años y pueden ser reconocidas de forma precoz mediante seguimiento exhaustivo clínico, analítico con marcadores séricos convencionales y de imagen, ya que permite el rescate quirúrgico de enfermedad oligometastásica principalmente hepática con porcentajes de SG a 5 años hasta del 50% (39, 46, 52, 53).

Carcinogénesis colorrectal.

El CCR se desarrolla como resultado de la acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas que dan lugar a la transformación del epitelio colorrectal normal en neoplásico (54).

La pérdida de estabilidad genómica es un paso molecular y fisiopatológico clave en el proceso de carcinogénesis ya que facilita la adquisición de mutaciones múltiples asociadas a tumor (54, 55, 56). Se han identificado varias formas de inestabilidad genómica relacionadas con factores causales (36, 38, 54, 57, 58):

- Inestabilidad cromosómica (o CIN). Se describe en más del 85% de los CCRs esporádicos y es el mecanismo de carcinogénesis de FAP. Se caracteriza por numerosos cambios en la estructura y número de copias cromosómicas que contribuye a aneuploidía tumoral. Es el mecanismo de inactivación de genes supresores APC, p53, familia SMAD y varios oncogenes.
- Defectos de reparación de DNA o Inestabilidad de Microsatélites (IMS). La inactivación somática adquirida por silenciamiento de genes codificadores de proteínas de reparación de desarreglos de bases o MMR (por *mismatch-repair* genes) debido a metilación aberrante de MLH1 está relacionada con el síndrome de Lynch o HNPCC y el 15% de los CCRs esporádicos. La IMS debida a inactivación de genes MMR se reconoce por mutaciones de pauta de lectura (por *frameshift mutation*) en las repeticiones de microsatélites a lo largo del genoma. Su diagnóstico se basa en la pérdida de expresión en al menos dos de cinco marcadores estándar de MS por técnicas de IHQ o moleculares en pieza tumoral. La vía mutadora de microsatélites parece iniciarse con cambios en la vía Wnt/Wingless y comparte ciertas alteraciones de MSS CCR.
- Metilación aberrante de DNA o Fenotipo Metilador de islas CpG (CIMP). Se observa en el 15% de CCRs y afecta a deficiencias en el sistema de reparación de desarreglos de bases (por *mismatch repair*) por pérdida de MLH1 debida a metilación aberrante. El

CCR expresa inestabilidad epigenómica bien como hipometilación global o como fenotipo metilador de islas CpG o CIMP (por *CpG island methylator phenotype*) definido como metilación de tres o más lugares de marcador de localización específica e implica a genes como MLH1 y MINT1-3 (59).

Se han descrito otras vías relacionadas con procesos de carcinogénesis específicos para pólipos serrados (por *serrated pathway*) ligada a mutaciones frecuentes de B-Raf y a la enfermedad intestinal inflamatoria crónica con expresión precoz mutacional de p53, tardía de APC e hipermetilación de p16^{INK4a} (57, 58).

El status genómico global (IMS), inestabilidad cromosómica (status CIN) y status epigenómico (CIMP) pueden determinar significativamente las características clínicas, patológicas y biológicas de los CCRs (60). El modelo clásico de progresión única lineal (secuencia pólipo-carcinoma) propuesto por Vogelstein y cols (the “Vogelgram”), que describe una vía única iniciada por la pérdida bialélica de APC y caracterizada por la acumulación secuencial de mutaciones asociadas a cambios sincrónicos de fenotipo histológico (61), podría ser completado con la incorporación de los hallazgos descritos.

Probablemente, el CCR esporádico derive de al menos tres vías paralelas distintas con diferentes lesiones precursoras, cambios genéticos y epigenéticos y curso evolutivo (60, 62, 63):

- Vía caracterizada por CIMP, mutaciones B-Raf, adenoma serrado, MLH1 y MSI con tumores de localización proximal, buen pronóstico, responsable del 10-20% de los casos.
- Vía con expresiones de CIMP, mutaciones de K-ras y APC, adenomas vellosos, con mal pronóstico y escasas respuestas a QT con FPs y BT tipo Cetuximab que se estiman entre 10-30%.
- Vía con mutación inicial de APC, con adenomas tubulares, alteraciones posteriores de p53 y CIN que incluirían los casos típicos de CCRs de localización distal estimados entre el 50-70%.

Las alteraciones genómicas descritas permiten la adquisición de mutaciones somáticas múltiples asociadas a tumor que facilitan el desarrollo de las características definitorias del fenotipo maligno (*hallmarks of cancer*) que confieren ventajas selectivas de proliferación y expansión clonal de las células transformadas (64). Constituyen un principio organizativo para la comprensión de la complejidad de la enfermedad cancerosa y pueden servir de base para el desarrollo de aproximaciones terapéuticas más eficaces.

Incluyen las siguientes alteraciones fisiopatológicas celulares:

- Señalización proliferativa crónica sostenida por disregulación de factores de crecimiento y sus receptores,
- Evasión de supresores de crecimiento,
- Alteraciones de la maquinaria central de ciclo celular y defectos en la reparación de DNA.
- Resistencia a la muerte celular programada o apoptosis,
- Inmortalidad replicativa persistente, angiogénesis inducida, y
- Activación de invasión y/o metástasis.

Sin embargo, son necesarios más estudios al respecto relacionados con metodología de análisis de alteraciones génicas descritas, marcadores fiables y controles que permitan definir las diferentes entidades de CCRs para su aplicación clínica rutinaria, ya que los conocimientos actuales no explican en su totalidad el comportamiento de las neoplasias en la clínica humana (59, 61, 62).

Factores pronósticos en Carcinomas de Colon.

La estimación del pronóstico de los CCR se basa esencialmente en el estadio de la enfermedad o extensión anatómica definido por las categorías TNM del sistema de estadificación de la UICC/AJCC, derivado de la información del estudio patológico de la pieza tumoral resecada durante el tratamiento quirúrgico. Otros factores de impacto pronóstico reconocidos no dependientes del estadio son el grado de diferenciación, la dediferenciación del frente invasivo tumoral (por *tumor budding*), invasión linfo-vascular ILV), infiltración linfocítica TILs tumoral o peritumoral y la configuración de los bordes tumorales (36, 39, 65-67).

El CAP publicó un documento de consenso sobre factores pronósticos para CCR en relación con niveles de evidencia significativos estratificados en cuatro categorías tras una revisión exhaustiva de la literatura disponible. La Categoría I incluye factores confirmados para su utilidad clínica basada en numerosos estudios publicados con suficiente número de casos y significación estadística (nivel de evidencia I) e incluye pT, pN, invasión linfática y vascular, tumor residual tras la cirugía y elevación preoperatoria de CEA. La categoría II A incluye grado de diferenciación tumoral, status de margen radial, y tumor residual a la resección. La categoría II B incluye tipo histológico, IMS, LOH de 18q y configuración de los bordes tumorales. Los factores para categoría III son BMT moleculares, invasión perineural, densidad microvascular, índices de proliferación y respuesta inflamatoria peritumoral (68).

El estadio tumoral pT4, nivel de CEA preoperatorio < 5 ngr/ml, infiltración linfovascular y/o perineural, obstrucción y/o perforación como formas de presentación clínica y el muestreo inadecuado de ganglios linfáticos regionales analizados se han perfilado como factores clínico-patológicos de riesgo en análisis uni y multivariantes, que se traducen en incrementos de recaídas e ILEs inferiores para pacientes con cáncer de colon en estadio II (69, 70, 71).

Estudios sobre BMT en CCR.

Los factores pronósticos esenciales y adicionales mencionados con la estadificación clínico-patológica TNM como *gold estándar*, influyen de forma independiente el curso evolutivo del CCR (72) pero están sometidos a sesgos nada despreciables por variaciones en el procesado e interpretación de las piezas tumorales (68). Pueden ayudar a predecir el curso evolutivo de diferentes cohortes de pacientes pero en modo alguno proporcionan una información pronóstica y/o predictiva individualizada.

Los avances en genómica, proteómica y patología molecular han generado nuevos BMT candidatos con valor clínico potencial en el manejo del CCR. Se han descrito numerosas proteínas y marcadores genéticos al objeto de redefinir la información pronóstica y predecir el beneficio de los tratamientos sistémicos (4,72).

Se han iniciado caracterizaciones moleculares de los tumores con BMT potenciales como IMS, deleciones de 18q, densidad microvascular (MVD), moléculas de superficie celular y otras aproximaciones que incluyen la valoración de genes supresores de tumores (p53, DCC, LOH 1p, 8p, 5q, 17p), oncogenes (K-ras, c-myc), genes relacionados con apoptosis (Bcl-2, Bax, APAF-1), con la síntesis de DNA (TS, TP), factores de crecimiento (TGF α , TGF β , HER-2/neu, EGFR), MMR (MSH2, MLH1), relacionados con angiogénesis (VEGF), reguladores de ciclo celular (ciclinas, p21, p27, p16), moléculas de adhesión y genes de glicoproteínas (CD44, E-cadherin, ICAM-1), marcadores de invasión (MMPs, UTPa), índices de proliferación (Ki-67, MIB1, PCNA), sobre-expresión de microRNA, aberraciones epigenéticas (metilación), tamaño de telómeros y antioxidantes. Ninguno de estos BMT se ha empleado de forma rutinaria en la práctica clínica ya que no han sido validados en ensayos clínicos fase III prospectivos a gran escala (5, 73-79).

El Update Committee propuesto por la ASCO (por American Society of Clinical Oncology) recomienda el empleo rutinario de niveles de CEA preoperatorio para apoyar estadificación, planificación quirúrgica y para seguimiento posterior de pacientes con CCR; no han encontrado datos suficientes para el uso de p53, Ras, TS/DPD, IMS, LOH 18q o DCC (76). Similares recomendaciones han sido comunicadas por el EGMT (European Group on Tumor Markers) sobre el empleo de BMT para determinar pronóstico o predicción de respuesta a tratamiento en pacientes con CCR (77).

Descripción de los BMT tumorales para estudio.

La carcinogénesis humana se entiende como un proceso multipaso de alteraciones genéticas y epigenéticas, esencialmente somáticas, caracterizado por inestabilidad genómica que facilita la adquisición de las seis alteraciones en la fisiología de la célula neoplásica que colectivamente facilitan el crecimiento y progresión tumoral (55, 56, 61, 64).

Entre los BMT moleculares que más interés han suscitado en diferentes tumores sólidos y para CCR en particular se encuentran:

- Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) y su vía de señalización.
- Genes Estimuladores de Proliferación como la Cox-2.
- Genes Supresores de Crecimiento o Reguladores Genómicos esenciales como la p53.
- Ki-67 como Marcador de proliferación.
- Genes Reguladores del Ciclo Celular como Ciclina D1, p21, p27.
- Genes Reguladores de Síntesis y Reparación del DNA como Timidilato Sintasa (TS).

Estudios preliminares han demostrado su expresión alterada en CCR con una posible utilidad para algunos de ellos como BMT pronósticos y/o predictivos de respuesta a diferentes fármacos anti-diana muy prometedores recientemente incorporados a la práctica clínica cotidiana (72).

Receptor del Factor Epidérmico de Crecimiento EGFR.

Los receptores de superficie celular integran numerosas señales extracelulares que regulan diversas vías de señalización y respuestas celulares adecuadas. Los receptores de tirosina cinasa (por *RTKs*) son un subgrupo de proteínas transmembrana con actividad tirosina cinasa intrínseca que determinan funciones celulares como crecimiento, diferenciación, motilidad celular o supervivencia (80).

El estudio de secuencias genómicas humanas ha permitido definir un grupo no redundante de 518 genes de proteínas cinasas, 90 TKs y 43 TKs-like (81). La superfamilia de receptores tirosina cinasa subclase I incluye cuatro receptores distintos EGFR: ErbB1/EGFR, ErbB2/Her 2, ErbB3/Her 3, y erbB4/Her 4 con similitud estructural.

Epidermal Growth Factor Receptor (*OMIM*131550, UniprotKB/SwissProt P00533*) es una glicoproteína transmembrana de 170 kDa compuesta por una cadena polipéptídica única de 1186 aa codificada por un gen localizado en el cromosoma 7, posición 7p 12.1-12.3 que contiene 28 exones extendidos sobre

INTRODUCCION

190.000 nucleótidos. Se caracteriza por una estructura modular consistente en dominio extracelular amino-terminal de unión a ligando a través de subdominios I-III (codificado por exones 1-14), segmento lipofílico transmembrana α -helicoidal (exón 15) y dominio intracelular citoplásmico carboxi-terminal (exones 16-20) con actividad proteína tirosina cinasa (82-87) (OMIM Johns Hopkins University, UniProtKB/Swiss-Prot data base) (Diagrama/Figura nº 1).

EGFR recibe señales extracelulares de pequeñas moléculas peptídicas o ligandos autocrinos entre los que se incluyen EGF-like, TGF- α y neuroregulinas. Su unión al dominio extracelular da como resultado una serie de cambios conformacionales que facilitan su dimerización, bien homo o heterodimerización, y la transactivación de la porción TK intracelular por autofosforilización. Los residuos fosforilados TK sirven de localizaciones de unión a moléculas adaptadoras y de señal que dan lugar a la activación de numerosas vías de señalización intracelular posteriores al receptor (*downstream signal pathways*) (86-89) (Diagrama/Figura nº 2).

Las vías efectoras mejor caracterizadas de EGFR son Ras-Raf-MAP cinasa (vía proliferativa), PI3K-Akt (vía apoptótica), JAK/STAT y PLC γ -PKC. Su activación traslada al núcleo diferentes programas transcripcionales mediadores de respuestas celulares que incluyen división celular, proliferación, apoptosis, motilidad, invasión, adhesión y reparación celular (86, 88, 90, 91). La atenuación de la señal de EGFR es debida esencialmente a la infra-regulación del receptor e implica su internalización y degradación lisosómica (87, 90, 92).

EGFR es un regulador clave del desarrollo celular normal así como un factor esencial en diferentes fenómenos fisiopatológicos. La expresión aberrante o funcional anómala de EGFR juega un papel crucial en el desarrollo y evolución de numerosos tumores humanos entre ellos del CCR (87, 93, 94). Datos circunstanciales e indirectos derivados de estudios experimentales in vitro/in vivo y sobre muestras tisulares de pacientes sugieren la implicación de EGFR en la carcinogénesis colorrectal. Líneas celulares derivadas de CCR poseen niveles de mRNA EGFR así como tasas de ligandos más elevadas y en modelos animales, los tumores inducidos por carcinógenos como AOC y DMO

muestran incrementos de TGF- α , así como de autofosforilización y actividad tirosina cinasa de EGFR. En ratones APC^{Min} cruzados con animales deficitarios en actividad EGFR y en aquellos otros expuestos a bloqueos farmacológicos de actividad TK, se observa una disminución claramente sustancial en la formación de pólipos adenomatosos (95).

EGFR se encuentra anormalmente activado en el CCR. Se han descrito diferentes mecanismos de regulación alterada del sistema EGFR-ligando que incluyen: incrementos de producción autocrina/paracrina de ligandos y niveles de proteína, mutaciones activadoras, fallos en su infra-regulación y *cross-talk* con sistemas heterólogos de receptores (87, 88). La expresión alterada de EGFR se ha comunicado hasta en el 80% de los CCR mediante diferentes métodos de estudio como la detección de amplificación génica, mutaciones, y niveles elevados de transcritos mRNA o proteínas por técnicas de IHQ, Western blotting analysis, FISH y ELISA (89, 96).

La posible asociación de sobre-expresión de EGFR con diferentes parámetros clínico-patológicos no ha sido claramente demostrada en los CCR. (89, 97-100, 102-104, 107, 108). No han sido descritas inicialmente diferencias entre la sobre-expresión de EGFR con edad, sexo, y localizaciones tumorales iniciales. La expresión de proteína EGFR ha sido comparada con el grado de diferenciación tumoral con resultados controvertidos ya que hay estudios muestran una clara correlación (98, 99) no confirmada en otras series (97, 100, 102, 103, 104, 107, 108). Algunos autores sugieren que la expresión de EGFR se comporta de forma heterogénea en diferentes regiones del tumor con mayor expresión en el frente invasivo y se correlaciona con estadio TNM al momento del diagnóstico, lo que podría sugerir un papel favorecedor en el proceso de invasión o progresión tumoral (102, 104, 108). La relación entre la expresión de EGFR en tumor primario y enfermedad linfática y/o metastásica tampoco ha sido uniformemente demostrada (98, 99).

El valor pronóstico de la expresión de EGFR en CCR resulta igualmente controvertido ya que mientras en algunas series no ha sido posible demostrar una relación pronóstica independiente (99, 104), otros estudios lo han

relacionado con cursos evolutivos desfavorables (98, 100, 101, 106). La expresión incrementada de EGFR se asoció con una reducción de ILEs o SGs en el 52% de los estudios analizados en una revisión sistemática (110).

Todos estos datos enfatizan la necesidad de investigaciones con estudios confirmatorios adicionales sobre el papel de la expresión anómala del EGFR en el manejo del CCR.

Ciclooxigenasa Cox-2.

Las Ciclooxigenasas (Cox o Prostaglandina Endoperóxido Sintetasas) son enzimas clave en la formación de Prostaglandinas (PGs). Constituyen las dianas moleculares mejor definidas para AINEs, tienen un papel relevante en la homeostasis tisular, en procesos fisiopatológicos como dolor, fiebre e inflamación así como en los procesos de carcinogénesis de diferentes tumores sólidos (111-113).

Las Cox se comportan como hemoproteínas bifuncionales unidas a la membrana celular con acciones catalizadoras *rate limiting* en la bioxigenación del ácido araquidónico esterificado para formar PGG₂ y reducción peroxidativa posterior para PGH₂, que es reconvertido en diferentes PGs estructurales (PGE₂, PGD₂, PGF₂, PGI₂) y tromboxanos A₂ por la acción de sintasas PG específicas. Se han descrito 3 isoformas de Cox que incluyen la Cox-1 de expresión constitutiva, la forma inducible Cox-2 y una variedad *splicing* de Cox-1 implicada en procesos febriles y dolor denominada Cox-3. Son homodímeros de aproximadamente 600 aa que contienen 4 oligosacáridos ricos en manosa que facilitan el plegado proteico y su degradación. Comparten un 60% de homología estructural tridimensional y cada subunidad dimérica consiste en 4 dominios: péptido de señal amino-terminal, dimerización, unión a membrana y catalítico con localizaciones activas Cox-peroxidasa (114-117).

Cox-1 es una isoforma constitutiva implicada en el mantenimiento de la homeostasis celular codificada por el gen PTGS1 localizado en el cromosoma 9 (9q32-9q33.3) de 11 exones a través de 40 Kb que codifica para un Cox-1

INTRODUCCION

mRNA de 2.8 kb. Se comporta como un gen *housekeeping* responsable de la producción de PGs que controlan procesos fisiológicos normales incluyendo citoprotección gástrica, función renal y hemostasia (112, 114, 115, 117).

Cox-2 prostaglandina H1 sintasa o prostaglandina peroxidasa sintasa 2 (OMIM*600262, UniprotKB/SwissProt P35354) es indetectable en condiciones fisiológicas, excepto en algunas localizaciones, pero es inducida con rapidez por hormonas, citoquinas, mitógenos, factores de crecimiento y promotores tumorales. El gen PTGS2 está localizado en el cromosoma 1(1q25.2-25.3) y compuesto por 10 exones a lo largo de 7.5 Kb con mRNA de 4.5 Kb; codifica una proteína de alrededor de 600 aa y 68 kDa en su forma no modificada y hasta 75-80 kDa tras modificaciones postraslacionales por glicosilación. Se puede definir como un gen de *respuesta inmediata* que contribuye a diferentes procesos patológicos inflamatorios y participa en la carcinogénesis de una gran variedad de tumores sólidos de origen epitelial. Se diferencia estructuralmente de Cox-1 en la sustitución de isoleucina 590 por valina alrededor del canal de substrato y la inserción adicional de 18 aa a nivel C terminal que le confiere mayor sensibilidad a AINEs, espectro de unión más amplio a diferentes substratos y localización en membrana celular (112, 114-117) (OMIM Johns Hopkins University, UniProtKB/Swiss-Prot data base) (Diagrama/Figura nº 3).

Estudios epidemiológicos y experimentales han demostrado la implicación de Cox-2 en la Carcinogénesis del CCR. En modelos animales *knockout* manipulados genéticamente, se ha detectado expresión de Cox-2 en adenomas intestinales de roedores tratados con carcinógenos tipo AOM y en ratones APC^{Min(1)} portadores de mutaciones dominantes de alta penetrancia del gen murino APC. En modelos murinos de FAP, las deleciones del gen Cox-2 en ratones APC^{Δ716} se acompañan de una drástica reducción del número de pólipos intestinales en relación con animales Cox-2 *wild type* (por wt Cox-2 constitutivo). El tratamiento con AINEs tradicionales o inhibidores selectivos de Cox-2 reduce número de pólipos, tamaño tumoral y multiplicidad en modelos de cáncer de colon genético o inducido. Por otro lado, estudios epidemiológicos observacionales y caso-control han demostrado que la mortalidad asociada a

CCR se reduce entre el 40-50% en pacientes tomadores de AINEs bien en contexto de tumores esporádicos o FAP (112, 118).

Cox-2 está implicada en la carcinogénesis del CCR a través de la síntesis de PGE₂, entre otros productos moleculares, mediante la activación de carcinógenos, iniciación y promoción/proliferación tumoral, inhibición de apoptosis, estimulación de angiogénesis, facilitación de procesos de invasión y metástasis junto con supresión de inmunovigilancia (112, 119, 120). Todas estas acciones tienen lugar a través de diferentes vías de señalización como activación de EGFR, señalización mitogénica ERK2 (extracelular signal-regulated kinase 2) y transcripción de β catenina inducida por TCF con sobre-expresión de Ciclina D1 y VEGF (118,119) (Diagrama/Figura nº 4).

El mRNA y proteína Cox-2 se sobre-expresan entre el 70-90% de CCR humanos y en el 40% de los adenomas en relación con la mucosa normal. Se localiza de forma predominante en el citoplasma de las células tumorales y en menor intensidad en el estroma o epitelio normal (121- 133).

La sobre-expresión de Cox-2 en CCR se ha relacionado con tumores grandes, localizados en colon izquierdo, alto grado de diferenciación, invasión linfo-vascular, afectación ganglionar y estadios avanzados en algunos estudios seleccionados (123-128, 130-132).

El valor de la expresión de Cox-2 como factor pronóstico independiente para el curso evolutivo de pacientes con CCR es un tema controvertido. Mientras en algunos estudios, sus niveles tumorales elevados se relacionan con supervivencias menores, otros investigadores no han confirmado estas observaciones (123-128, 130, 133). No existe por tanto un consenso definitivo de relación entre expresión de Cox-2 y factores pronósticos clínico-patológicos convencionales ni con evolución de los pacientes con CCR en diferentes contextos clínicos.

Proteína Tumoral TP53.

p53 fue descrita inicialmente como una proteína nuclear copurificada con el antígeno T grande oncogénico del virus SV40, cuya inactivación era responsable de la transformación neoplásica de animales de experimentación por virus tumorales DNA, y más tarde, reconocido como el primer gen supresor de tumores en respuesta a situaciones de stress celular (134-136).

TP53 (OMIM*191170; UniProtKB/Swiss-Prot P04637) es un gen *gatekeeper* localizado en el brazo corto del cromosoma 17 en la posición 17p13.1 compuesto por 20kB de DNA y 11 exones con un transcrito mRNA de 3.0 kB más 1179 pb de estructura abierta para lectura. Codifica una fosfoproteína nuclear de 393 aa y Pm de 53 kDa caracterizada por 5 dominios estructurales y funcionales: dominio de transactivación (TAD; aa 1-40) requerido para la activación transcripcional; dominio rico en prolina (PRD; aa 61-94) que permite diferentes interacciones proteicas facilitando su estabilidad y actividad con señal de localización nuclear (NLS); dominio de unión a DNA (DBD; aa 100-300) para reconocimiento de regiones consenso de unión a promotores de genes diana; dominio de tetramerización (4D; aa 324-355) que incluye señales de exportación nuclear (NES), y dominio regulador negativo C-terminal (CTD; aa 360-393) que modula la especificidad de unión a DBD (137-139) (OMIM Johns Hopkins University, UniProtKB/Swiss-Prot data base) (Diagrama/Figura nº 5).

La TP53 se comporta como un factor de transcripción multifuncional implicado en el mantenimiento de la estabilidad genómica que controla la expresión de genes reguladores del ciclo celular, apoptosis, reparación de DNA y angiogénesis en respuesta a una gran variedad de señales de stress genotóxico intracelular por lo que se le reconoce como un gen *gatekeeper* o “guardián del genoma” (134, 136, 140) (Diagrama/Figura nº 6).

Diferentes observaciones han demostrado que el gen p53 y/o su proteína representan un papel esencial en el origen de las neoplasias debido a su actividad en la transformación viral y celular, desarrollo de neoplasias en ratones *knockout* para el gen p53, cánceres observados en familias con

síndrome de Li-Fraumeni e incidencias altas de mutaciones en diferentes neoplasias (141).

Alrededor del 50% de los tumores humanos presentan alteraciones estructurales de uno o los dos alelos de TP53 con pérdidas o expresión de formas mutantes inactivas y el resto sufren alteraciones funcionales por sobre-expresión de MDM2 o inactivación de inhibidor de ciclo celular p14^{ARF} entre otros (142). La frecuencia de mutaciones de TP53 en CCR se sitúa entre el 40-50% y hasta el 80% son mutaciones *missense* en las transiciones GC a AT de los dinucleótidos citosina guanina fosfato CpG, que tienen lugar de forma preferente en 5 codones *hotspot* 175, 245, 248, 273 y 282 e interfieren en general en la actividad de la proteína con el DNA. La gran mayoría se localizan en áreas altamente conservadas de los exones 5 a 8 y en 3 dominios principales de p53 (L2, L3 y LSH/loop-sheet-helix). Se acompañan de pérdida alélica en 17p que define su rol como gen supresor de tumores (57, 143-145).

Se han empleado diferentes métodos para la identificación de las alteraciones de p53 siendo la secuenciación de DNA el *gold estándar* mediante técnicas basadas en PCR como DGGE, SSCP o bien RT-PCR y secuenciación directa. La sobre-expresión de proteína TP53 ha sido considerada como un marcador subsidiario de presencia de mutaciones y la gran mayoría de estudios clínicos han utilizado técnicas de IHQ con rendimientos similares a los test moleculares, de citometría de flujo o ensayos funcionales. La correlación entre el status génico y la inmunotinción positiva se estima entre el 65-75% y ninguna de las técnicas empleadas alcanza una fiabilidad del 100% en la detección de anomalías de p53 (135, 137, 144, 146). La frecuencia de mutaciones en CCR se sitúa entre 35-60% (145, 147-151) y la sobre-expresión proteica, con rangos similares, entre el 30-60% (101, 152-163).

La sobre-expresión de TP53 o bien su mutación se han relacionado con la edad y el sexo de los pacientes, tumores de colon distal, estadios avanzados, invasión linfo-vascular, variedades mucinosas, afectación ganglionar y aneuploidía; con expresión de GSTT1 wt, p27^{Kip1}, hMLH1/hMSH2

y ausencia de fenotipos IMS o CIMP. Sin embargo, no se ha observado una relación consistente con tamaño tumoral inicial, mutación de K-ras, Braf o APC, Bcl-2, Ki-67 o MVD (145, 148, 150-152, 156, 157, 160-162).

Las alteraciones de p53 se han comportado como factor pronóstico desfavorable en diferentes escenarios clínicos de enfermedad con incrementos de recurrencias, ILEs tras cirugía y SGs bajas así como escasas respuestas a tratamientos sistémicos o intra-arteriales con quimioterapia basada en FPs. Pero no en todas las series publicadas se ha podido demostrar su asociación con tumores colorrectales agresivos ni su capacidad predictivo-pronóstica (101, 145, 149, 151, 153-157, 159, 160). Los resultados de una revisión sistemática han demostrado que pacientes cuyos tumores son portadores de p53 alterada tienen un riesgo incrementado de muerte, sobre todo en grupos de buen pronóstico basal, sin verse influenciado su curso evolutivo por la administración de QT (164). Son necesarios por tanto más estudios de investigación del papel pronóstico de TP53 en CCR, y las técnicas de IHQ son un medio accesible y sencillo para la valoración de sus alteraciones.

Antígeno de Proliferación pKi-67.

pKi-67 (OMIM*176741, UniProtKB/Swiss-Prot P46013) es una proteína nuclear no histona definida originalmente por el prototipo de anticuerpo monoclonal (Ac Mo) generado mediante inmunización de ratones con núcleos de la línea celular L428 de linfomas Hodgkin (Ki por Kiel y 67 por el número de plato de la clona original) de estructura no homologable a otros péptidos conocidos, caracterizada por estudios de inmunoclonación y Northern blot analysis (165, 166) (OMIM Johns Hopkins University, UniProtKB/Swiss-Prot data base).

La clonación de pKi-67 cDNA y de su locus génico ha permitido describir un gen de gran tamaño localizado en el brazo corto del cromosoma 10 (10q25 qter) de 12.5 Kb que contiene 15 exones (167). Codifica una glicoproteína nuclear que puede ser aislada en células proliferantes en dos isoformas con 395 y 345 kD generadas por *splicing* alternativo de Ki-67 mRNA precursor de 8.9 a 12.5 Kb analizados por técnica Northern blot. El exón 13 codifica la mayor

INTRODUCCION

parte de pKi-67 (hasta 6845 pb) y contiene 16 *Ki-67 repeats* que suponen del 70 al 79% de las secuencias de lectura abierta de las dos isoformas; dentro de los *repeats* se encuentran secuencias *Ki-67 motifs* de 22 aa muy conservadas que codifican para los epítomos Fkel y Fkelf reconocidos por el anticuerpo original (166, 168).

La proteína sufre procesos de fosforilización y defosforilización durante la mitosis; es transportada de forma eficiente al núcleo celular ya que en su estructura se han reconocido hasta 10 "*nuclear targeting signals*". Los residuos de aa altamente conservados en *Ki-67 repeats* pueden estar implicados en la formación de su estructura o aspectos funcionales, especialmente el residuo cisteína en posición 8, y la presencia de localizaciones múltiples *PEST* representan señales para degradación proteolítica rápida (166, 169-171).

Los estudios de caracterización inicial demostraron que el AcMo Ki-67 reacciona con un antígeno nuclear humano que está presente en las células proliferantes pero no en quiescentes. Un análisis detallado del ciclo celular concluyó que pKi-67 nuclear se expresa de forma predominante en todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2, M) excepto en el periodo quiescente G0; por tanto, lo confirma como un marcador operacional excelente para determinar la fracción de crecimiento de una población celular (166).

La vida media de pKi-67 se ha estimado entre 60-90 minutos y su expresión es el resultado de la síntesis de novo asociada con degradación regulada que implica al proteasoma siendo indetectable en los procesos de DNA repair. La regulación precisa de pKi-67 durante el ciclo celular así como su localización celular puede ser crucial para su actividad biológica (166, 170).

La función exacta de pKi-67 se desconoce pero se trata de una proteína fosforilada vía serina-treonina con un papel decisivo en la división celular. Su supresión por incorporación de nucleótidos antisentido marcados con [³H] timidina en líneas celulares IM-9, microinyección de anticuerpos bloqueantes o inhibición de defosforilización previenen la proliferación celular. Se ha sugerido su participación en la organización del DNA por su localización extranucleolar

en fase G1 precoz y un papel crucial en la síntesis de ribosomas durante la división celular, ya que sus niveles se correlacionan bien con el porcentaje de síntesis proteica (166, 170-172) (Diagrama/Figura nº 7).

La pKi-67 se emplea de forma rutinaria como marcador subsidiario de proliferación celular ya que no se expresa en células quiescentes. El AcMo estándar para detectar pKi-67 en tejidos fijados es MIB-1 y su positividad se estima a partir del porcentaje de tinción nuclear celular (166, 170).

El pKi-67 LI (por *labeling Index*) se correlaciona con otros biomarcadores convencionales de proliferación como fracción de fase S medida por citometría de flujo, índice mitótico y captación in vivo de BrdUrd y Mcm-2. Sin embargo, la relación con PCNA o la DNA ploidía no ha sido del todo concluyente (171, 173).

La expresión de pKi-67 medida por IHQ o el MIB-1/Ki-67 LI se ha analizado en una amplia variedad de tumores sólidos y linfomas permitiendo predecir su curso evolutivo (170, 171, 174). En CCR se han comunicado porcentajes de positividad, Ki-67 LI o scores altos hasta del 70% (límites 26-77%) que se han relacionado con diferentes características clínico-patológicas convencionales como edad, tamaño tumoral, grado de diferenciación, afectación ganglionar y estadio global definitivo (154, 161, 175-185).

La sobre-expresión de pKi-67 tumoral se asocia con cursos evolutivos desfavorables en pacientes con CCR en diferentes contextos clínicos pero su relevancia no está suficientemente contrastada (154, 178, 179, 182-184).

Regulador de Ciclo Celular Ciclina D1.

La regulación de la progresión de fase G1 a S está alterada en las neoplasias humanas debido a su función integradora de señales de factores de crecimiento con la red génica del ciclo celular. El complejo ciclina D1/CDK4 es una de las moléculas disreguladas con mayor frecuencia en tumores humanos y se cree que contribuye de manera decisiva a la transformación neoplásica tanto como al crecimiento tumoral (186-188).

INTRODUCCION

La ciclina D1 (OMIM* 168461; UniProtKB/Swiss-Prot P24385) es una proteína de localización predominante nuclear de 295 aa y Pm de 36 kDa codificada por el gen CCDN1 (PRAD1) localizado en el cromosoma 11 posición 11q13 que contiene 5 exones, transcrito de 4,5 Kb y secuencia codificadora CDS 148-1035 (OMIM Johns Hopkins University, UniProtKB/Swiss-Prot data base). Pertenece al grupo de ciclinas G1 o *Start* junto con otras ciclinas D (D1, D2, D3) y C que comparten una región común de 100 aa o *cyclin box*, requerida para la formación de complejos con CDK, y una región C-terminal *Pest* rica en prolina, ácido glutámico, serina y treonina esencial para su renovación (189, 190) (Diagrama/Figura nº 8).

La ciclina D1 actúa como una subunidad alostérica reguladora de CDK4/6 con las que forma complejos holoenzimáticos promocionando la progresión a través del *punto R* de restricción de la fase G1 del ciclo celular. Se comporta como un *sensor mitogénico* que transmite señales desde el ambiente extracelular al centro de la maquinaria del ciclo celular ya que su expresión y acumulación depende de entradas mitogénicas extracelulares (186, 191, 192). Las señalizaciones específicas, que incluyen activación de receptores de factores de crecimiento y moléculas de adhesión mediadas por integrinas, activan a su vez, la transcripción, traslación y degradación de ciclina D1 integrando señales mitogénicas, diferenciación y anclaje en el complejo regulador del ciclo celular (187). La transcripción incrementada está mediada por la vía Ras-Raf-MEK (MAPK kinase)-ERK; la traslación se activa por la vía PI3K/Akt mediada por Ras, y la vía PI3K-Akt-GSK3 β disminuye su exportación nuclear y degradación proteasómica 26S en citoplasma (186-188, 193).

La función más relevante de Ciclina D1 es la promoción de la proliferación celular como regulador de CDK4 y CDK6 con los que forma complejos catalíticos que implican la inactivación por fosforilización de Rb y la liberación de factores de transcripción E2F facilitando la activación de la expresión de una red de genes reguladores de la transición G1/S, función que se ve favorecida por el secuestro de inhibidores de CDK como p21^{Cip1} y p27^{Kip1} (186-188, 192, 194). Se han descrito funciones no catalíticas independientes de CDK como regulación transcripcional, secuestro de p21^{Waf1/Cip1} y p27^{Kip1} por

complejo ciclina D1/CDK4-6, así como participación en regulación de expresión génica implicada en replicación y *checkpoint* de DNA como respuesta a agresiones genómicas facilitando proliferación celular, crecimiento, migración y diferenciación celular (192, 195, 196) (Diagrama/Figura nº 9).

La disregulación de la expresión de ciclina D1 o activación de CDK definen uno de los *hallmarks* de cáncer, ya pueden facilitar la proliferación celular independiente de la regulación extracelular o por sobrepasar puntos de control (*checkpoints*) que aseguran la integridad y estabilidad genómica (197).

El gen CCND1 se comporta como un oncogen *driver* en cáncer humano. La homeostasis de la ciclina D1 está frecuentemente disregulada y análisis moleculares han revelado su sobre-expresión mediante mecanismos múltiples como alteraciones genómicas tipo translocaciones cromosómicas, amplificación génica y polimorfismos; regulación post-trascricional como diana de la acción de microRNAs y estabilización proteica post-traslacional por alteración de exportación nuclear y proteolisis (186, 188, 192).

Estudios experimentales han demostrado que el complejo ciclina D1-CDK4 induce inestabilidad genómica en modelos murinos y líneas celulares derivadas de tumores humanos; su actividad cinasa es necesaria para el desarrollo normal de los animales, y crítica en los procesos de iniciación o mantenimiento de ciertos tumores sólidos incluso en combinación con otros oncogenes (188, 198, 199).

La mayoría de los cánceres más comunes presentan porcentajes de amplificación de CCND1 entre el 15 y 40% que se amplía hasta el 80% cuando se estudia la sobre-expresión de CCND1 mRNA y proteína Ciclina D1 (196).

La expresión alterada de ciclina D1 juega un papel relevante en la carcinogénesis del CCR como han demostrado estudios experimentales y datos clínicos. La activación de Ciclina D1 debida a mutaciones en la vía de señalización APC/Wnt/ β catenina contribuye a la iniciación de las neoplasias de colon (200) y su expresión reducida minimiza la predisposición al desarrollo de

neoplasias GI en ratones transgénicos (201). La expresión y/o amplificación del gen CCND1 se ha observado entre el 48 y 52% de los CCR (202, 203) mientras que la sobre-expresión de proteína Ciclina D1 evaluada mediante técnicas de IHQ se incrementa hasta el 60% en diferentes series de pacientes afectos de CCR (178, 184, 204-211).

La sobre-expresión de proteína ciclina D1 y/o su alteración génica se ha relacionado con ciertas características demográficas y clínico-patológicas desfavorables como edades más tempranas (209), localizaciones proximales y tumores indiferenciados (205, 207), histología mucinosa (211), invasión local, afectación ganglionar y estadios más avanzados (203, 204).

Los datos publicados que relacionan Ciclina D1 y curso evolutivo de los pacientes resultan controvertidos. La sobre-expresión de proteína se ha relacionado con mal pronóstico en tres estudios (178, 204, 210), buen pronóstico en tres (184, 207, 209), y no ha sido relevante en otros tres. (202, 205, 211).

Regulador de Ciclo Celular p21^{waf1/cip1}.

La p21^{waf1/cip1} es un inhibidor bien caracterizado de CDKs que pertenece a la familia de proteínas Cip/Kip de CKIs (por *cyclin-dependent inhibitors*), junto con p27^{Kip1} y p57^{Kip2}, implicado en la regulación del ciclo celular de numerosos organismos. Todos ellos contienen una región conservada de secuencias en el dominio terminal NH₂ requerida y suficiente para la inhibición de complejos holoenzimáticos ciclina/CDK esenciales en diferentes fases de transición del ciclo celular, mientras que las regiones carboxi-terminales son variables en tamaño y función. (212-214).

La p21^{waf1/cip1} es una proteína de 164 aa y 18 kDa calculada por SDS-PAGE, descrita mediante técnicas de inmunoprecipitación de ciclina D y CDK2, con localización principal nuclear (215, 216). Está codificada por el gen CDKN1A (por *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*; OMIM* 116899; UniProtKB/Swiss-Prot P38936) clonado inicialmente mediante técnicas de hibridación sustractiva y sistemas de dos híbridos de levaduras en

INTRODUCCION

experimentos diseñados al objeto de identificar proteínas sobre-reguladas por p53 y de interacción con complejos CDK2. Se ha localizado en el cromosoma 6 posición 6 p21.2 por técnicas de FISH y está compuesto por tres exones (68, 450 y 1600 pb) que transcriben un mRNA de 21,1kb detectado en estudios preliminares mediante Northern blot analysis. (215, 216-220) (OMIM Johns Hopkins University, UniProtKB/Swiss-Prot data base) (Diagrama/Figura nº 10).

La expresión de p21^{waf1/cip1} se incrementa por mecanismos dependientes o no de p53 tras exposición a diferentes estímulos como daño a DNA, stress oxidativo, citocinas y mitógenos, virus tumorales y agentes anticancerosos, activando una serie de funciones biológicas esenciales que incluyen parada del ciclo celular, replicación o reparación de DNA, transcripción génica, diferenciación, senescencia, apoptosis y motilidad celular (219-221).

La p21^{waf1/cip1} es un regulador negativo del ciclo celular que inhibe la actividad cinasa de complejos CDKs, CDK2-1 y ciclinas E-A a través de sus secuencias homólogas amino-terminales o bien por fosforilización de CDK2-1 en su segmento de activación. Da lugar a la detención de ciclo en el *checkpoint* G1 por su localización nuclear con intervención del supresor tumoral p53. Interfiere con la actividad de DNA polimerasa dependiente de PCNA e inhibe la replicación del DNA y/o modula procesos de reparación de DNA a través de su dominio carboxi-terminal. Participa en la regulación transcripcional mediante inhibición de complejos CDK-ciclina, unión con ciertos factores transcripcionales como NF-κB, Myc, E2F, STAT3 y ER, y regulando la actividad de cofactores como p300/CBP. Modula procesos pro y antiapoptóticos en diferentes contextos celulares mediados por caspasas-3 p53 dependientes. También puede controlar procesos de reparación de DNA en relación con su capacidad inhibitoria de ciclo, competitividad con PCNA, regulación de NER, y facilita la motilidad celular mediada en este caso por RhoGPT (220-225) (Diagrama/Figura nº 11).

La p21^{waf1/cip1} se regula por mecanismos transcripcionales dependientes de p53 como vías Hras-Raf-MAPK, participación de receptores nucleares RHOD, familia Klf-KLF4 y CDX2. La estabilidad de mRNA p21^{waf1/cip1} está

mediada por microRNAs no codificantes o proteínas de unión, tiene lugar mediante procesos de fosforilización en diferentes residuos y la degradación se efectúa en el proteasoma por ubiquitinización con la participación de complejos de ligasas E3 (221, 226).

Estudios experimentales en líneas celulares y modelos murinos han confirmado la función de p21^{waf1/cip1} como regulador del *checkpoint* G1 y supresor de tumores. Células deficientes en p21^{waf1/cip1} no detienen su ciclo celular tras activación por p53 en respuesta a daño de DNA. Ratones *knockout* o *null* deficitarios de p21^{waf1/cip1} son más susceptibles a desarrollar tumores inducidos por carcinógenos químicos e irradiación y la combinación con otros *knockout* genéticos como Muc2^{-/-} y Apc 1638^{+/-} facilita la formación de tumores espontáneos. Por otro lado, la transfección de p21 cDNA y sobre-expresión de p21^{waf1/cip1} inhiben el crecimiento en diferentes líneas celulares y reducen el desarrollo de tumores en ratones atímicos. La infra-regulación de p21^{waf1/cip1} se correlaciona de forma inversa con alteraciones génicas tipo IMS en CCR, independientemente del estado de p53, lo que daría a entender que la pérdida de protección contra inestabilidad genómica por parte de p21^{waf1/cip1} contribuye a los procesos de carcinogénesis (220, 221, 227-232).

La disregulación de p21^{waf1/cip1} se observa con frecuencia en una gran variedad de tumores humanos pero las mutaciones de regiones codificantes del gen CDKN1A son muy raras. No obstante, alteraciones genéticas y/o epigenéticas por hipermetilación de regiones ricas en G:C de su promotor, cercanas al lugar de inicio de transcripción e incluso de sus reguladores p53 y c-Myc, son hallazgos muy comunes (218, 224, 233, 234).

Las alteraciones en la expresión de p21^{waf1/cip1} en CCR han sido evaluadas mediante técnicas de IHQ y análisis genético por RT-PCR detectándose hasta en el 70% de los adenomas y entre 30-80% de los tumores esporádicos. En algunos estudios su falta de expresión se ha relacionado con factores pronósticos convencionales desfavorables y estadios avanzados pero su valor pronóstico no ha sido totalmente confirmado con los estudios disponibles (154, 208, 209, 235-247).

Regulador de Ciclo Celular p27^{Kip1}.

p27^{Kip1} fue identificado como un inhibidor del ciclo celular responsable de la detención de crecimiento inducida por TGF- β e inhibición de contacto. Pertenece a la familia Cip/Kip de inhibidores universales de las cinasas dependientes de ciclinas junto con p21^{Waf1/Cip1} y p57^{Kip2} que se caracterizan por su homología de secuencia y especificidad de acción sobre CDK (por *Cyclin-dependent kinase*) *master timekeepers* del ciclo celular (248-250).

El gen p27^{Kip1} o CDKN1B (por *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 B*; OMIM* 6000778, UniProtKB/Swiss-Prot P46527) está localizado en el cromosoma 12p3, unión de 12p12-12p13.1, con una región codificante de 2 exones que transcribe mRNA de 2.5 Kb. Codifica una fosfoproteína nuclear de 198 aa y Pm de 22 kDa en la que se identifican dos regiones principales: dominio N-terminal con homología a p21^{Cip1} y p57^{Kip2} con capacidad de inhibición de la actividad cinasa de los complejos ciclina-CDK, y dominio C-terminal con una extensión de 23 aa que contiene una localización de consenso para fosforilización Cdc2 que interacciona con numerosas proteínas en procesos no relacionados con el control de ciclo celular, en particular por localizaciones en el compartimento citosólico celular. Otras dos regiones adicionales descritas en la secuencia de p27^{Kip1} son: una señal de localización nuclear bipartita (*NLS*, identificada entre aa 153-169) reconocida por importinas alfa/beta que permite su transporte nuclear y una señal de exportación nuclear supuesta (*NES*, identificada entre aa 32-45). (OMIM Johns Hopkins University, UniProtKB/Swiss-Prot data base) (248, 250-252) (Diagrama/Figura nº 12).

p27^{Kip1} actúa como inhibidor de la actividad de complejos ciclina E-CDK2 y ciclina D-CDK4 en respuesta a diferentes estímulos antimitogénicos por lo que modula la transición de fases G1 a S del ciclo celular impidiendo la fosforilización de proteína Rb. En la fase precoz G1 promueve el ensamblaje e importación nuclear del complejo ciclina-CDK4-6 por lo que sus acciones son duales dependiendo de fase del ciclo y contexto celular. Por su localización citoplásmica modula la motilidad celular e interacciona con la matriz extracelular por mecanismos ligados a la actividad de la familia de RhoGPTasas. En diferentes modelos celulares, la sobre-expresión de p27^{Kip1}

facilita los mecanismos de apoptosis mediados por activación de procaspasa 3 (220, 248, 251, 252, 253-256).

Los niveles de p27^{Kip1} están influenciados por una serie de factores que incluyen inhibición de contacto y densidad celular, señales de diferenciación, adhesión a matriz celular y señales estimuladoras/supresoras de crecimiento (256, 257).

La actividad de p27^{Kip1} está modulada por su concentración, fosforilización, localización subcelular e interacciones proteicas (251). Se han descrito diferentes factores de transcripción que controlan la expresión génica de CDKN1B, entre ellos, la familia Forkhead box clase O (Fox O), menin, complejo c-myc-max y familia de factores de transcripción E2F1 (251-253, 256). La traslación de mRNA CDKN1B es máxima en fases G0 y G1 precoz decreciendo con la progresión de ciclo tras estímulos mitógenicos, y está mediada por 5'UTR del CDKN1B en regiones ORF/IRES, diferentes proteínas como miembros de PTB y ELAV además de la función infra-reguladora de miRNAs (220, 248, 251, 252, 256, 258) (Diagrama/Figura nº 13).

La regulación de los niveles de proteína p27^{Kip1} es esencialmente post-transcripcional por mecanismos de proteólisis nuclear mediada por el complejo ligasa ubiquitina E3 SCF-Skp2, y citoplásmica por la vía KPC tras su exportación nuclear (252, 259, 260). Otros mecanismos implicados son la regulación transcripcional del promotor y de la traslación de su mRNA, secuestro por complejos ciclina D-CDK4-6 y su distribución compartimental durante la progresión del ciclo celular (255, 256).

p27^{Kip1} (gen CDKN1B) ha sido implicado en procesos de carcinogénesis o progresión tumoral en modelos murinos y numerosas neoplasias humanas (220, 251, 261, 262).

Estudios experimentales en modelos murinos *knockout* han demostrado que la pérdida de p27^{Kip1} tiene un efecto directo en los procesos de carcinogénesis. p27^{Kip1} funciona como un gen supresor de tumores con

fenotipo haploinsuficiente *dependiente de dosis* ya que ratones heterocigóticos p27^{+/-} con pérdida de copia de gen CDKN1B desarrollan tumores pituitarios espontáneos tardíos y son más sensibles a la inducción tumoral por carcinógenos; así mismo ratones p27 *null* desarrollan mayor porcentaje de tumores politópicos. Se comporta como un factor *rate-limiting* en el desarrollo tumoral ya que ratones p27 *null* cruzados con otros *knockout* homo o heterocigotos para p53, PTEN, pRB, p16, INK4/ARF y APC incrementan progresivamente los porcentajes de formación de neoplasias en diferentes localizaciones (220, 251, 263, 264). La reducción de p27^{Kip1} acelera los procesos de carcinogénesis gastrointestinal en ratones con mutación APC^{min+} pero no de Smad3 (264).

CDKN1B p27^{Kip1} es un gen supresor de tumores atípico ya que sus mutaciones somáticas en locus específico o deleciones son muy infrecuentes en tumores humanos (265). Sin embargo, está disregulado habitualmente debido a reducción de niveles de proteína p27^{Kip1}, secuestro en los complejos ciclina-CDK, y localizaciones subcelulares citoplásmicas anómalas. Las células normales de tejidos quiescentes expresan niveles elevados de p27^{Kip1}, mientras que en células proliferantes como las criptas intestinales, lesiones hiperplásicas y preneoplásicas sus niveles son inferiores (220, 256).

Estudios realizados mediante técnicas de IHQ han demostrado que la mayoría de los tumores sólidos humanos más frecuentes muestran niveles de expresión de proteína p27^{Kip1} baja o ausente en más del 50-70% de los casos. Su disregulación se asocia con fenotipos clínico-patológicos agresivos, pronóstico desfavorable así como respuestas reducidas a tratamientos quimioterápicos y frente a dianas moleculares (248, 256, 266, 267).

Las alteraciones de la expresión de la proteína p27^{Kip1} en CCR han sido estudiadas esencialmente por técnicas de IHQ objetivándose niveles bajos o ausentes hasta en el 60% de los casos (153, 155, 209, 268-282). Su disregulación se ha asociado con fenotipos agresivos, tumores grandes, de localizaciones derechas, indiferenciados, mucinosos y estadios avanzados (153, 269, 270, 275-278, 282). Se comporta como un marcador evolutivo de

mal pronóstico independiente de otros factores convencionales con ILEs y SGs disminuidas (153, 268-271, 273-275, 277, 278, 280, 281).

Regulador de Síntesis y Reparación de DNA Timidilato Sintasa.

La Timidilato Sintasa (TS) es una enzima clave en la vía de síntesis y reparación de DNA representando una diana celular de gran interés para la inhibición por fármacos como FPs (283).

La proteína Timidilato Sintasa (*TYMS*, *OMIM*188350*; *UniProtKB/Swiss-Prot P04818*) está compuesta de 313 aa con Pm de 35.7 kD y codificada por el gen *TYMS*, localizado en el segmento 18q21.31-qter del cromosoma 18, que contiene 7 exones a lo largo de 30 Kb con dos localizaciones principales de mRNA en una secuencia invertida (*OMIM* Johns Hopkins University, *UniProtKB/Swiss-Prot* data base) (Diagrama/Figura nº 14).

Su estructura cristalográfica es la de un homodímero obligado con dos localizaciones activas formadas por residuos de ambos monómeros. En cada monómero se han descrito dos dominios principales: un dominio grande conservado (*LD large domain* aa 1-98; 130-313) y uno pequeño variable (*SD small domain*; aa 99-129). Las regiones más importantes de proteína Timidilato Sintasa (pTS) son: el asa catalítica (*CL* aa 184-189) que contiene el C195, y reacciona con el carbón C6 de dUMP formando un complejo covalente; el asa interfaz (*HIL* aa 144-158); el asa alrededor de R50, y la región C terminal (*CT* aa 308-313) (284, 285).

La pTS es una proteína citosólica dimérica muy conservada a través de las especies, que está implicada en una serie de vías complejas relacionadas con otros enzimas dependientes de folatos mediante funciones catalíticas y reguladoras (285). Se comporta como una enzima fase S con actividad limitada (*rate limiting*) que cataliza la metilación reductiva de dUMP por CH₂H₄Pte-Glu para generar dTMP y dihidrofolato (Ciclo TS en relación con otras enzimas como DHFR y SHMT); es la única fuente de novo para dUMP necesario para la síntesis y reparación de DNA e indispensable para las células con actividad divisional (286). Como proteína reguladora interacciona con su propio mRNA

INTRODUCCION

mediante un mecanismo de *feedback* y con otras secuencias de regulación de proteínas relacionadas con el ciclo celular, reparación de DNA, transcripción y apoptosis (287, 288).

Los niveles de pTS están regulados a nivel transcripcional por numerosos factores proteicos que incluyen a los miembros de la familia del gen E2F1, p53 y c-myc, esenciales en la transición de la fase G1 a S del ciclo celular. La degradación de pTS humana se lleva a cabo por el proteasoma 26 S mediante mecanismos independientes de ubiquitina a través de la región N-terminal polipeptídica (287-291) (Diagrama/Figura nº 15).

Estudios experimentales han demostrado que la expresión ectópica de pTS catalítica activa es suficiente para inducir fenotipo transformado en células eucariotas, que se manifiesta por el desarrollo de focos celulares, crecimiento independiente de anclaje, y formación de tumores en ratones atímicos. Por el contrario, niveles comparables de dos mutantes de TS portadores de mutaciones puntuales únicas dentro del dominio catalítico no tienen actividad transformadora. Además, la sobreexpresión de pTS da lugar a muerte celular por apoptosis después de la retirada del suero. Estos datos demuestran que pTS exhibe una actividad *oncogen-like* y sugiere nexos de unión entre la síntesis de DNA TS regulada y la inducción de fenotipo neoplásico (292). Por otro lado, la expresión y actividad de pTS en líneas celulares tumorales proliferantes de cáncer humano está relacionada de forma directa con el tiempo de doblamiento celular (293).

En los últimos 40 años se han diseñado varios fármacos inhibidores de pTS, bien en el lugar de unión al sustrato dUMP, como son las FPs o bien más específicos de acción en la unión con el cofactor folato como Pemetrexed o Raltritexed, con el objetivo de lograr el cese de la proliferación y crecimiento celulares, ya que la reacción modulada por pTS es la única fuente intracelular de novo de dTMP (288). En diferentes líneas celulares tumorales y tejidos de biopsia de pacientes con cáncer se han demostrado niveles altos de pTS inducidos por el tratamiento de inhibidores específicos que tiene efecto sobre

su eficacia y puede promover fenómenos de resistencia secundaria, aunque recientemente cuestionados por los resultados de un meta-análisis así como por estudios preclínicos en xenotransplantes de tumores humanos o líneas celulares tumorales in vitro (291, 294-297).

Numerosos estudios clínicos han demostrado un incremento de niveles de TS mRNA y de proteína TS en los CCR. La determinación de la expresión de TS en CCR puede efectuarse mediante análisis inmunohistoquímico, técnicas moleculares como RT-PCR y ensayos enzimáticos (297- 299). Se han comunicado niveles altos de pTS en diferentes contextos clínicos de CCR con una mediana de 55-59% (límites entre 21.35 y 86%), generalmente mediante técnicas de IHQ, AcMo específicos y valoración semicuantitativa (155, 156, 300-303, 305-312). La proporción mediana de casos con expresión de niveles altos suele ser similar en contextos de enfermedad avanzada y no metastásica con 53% (14-80%) vs 50% (19-77%) respectivamente (299). El grado de inmunoreactividad para pTS es superior en tumores primarios comparados con las correspondientes metástasis (297).

Los niveles altos de pTS se han relacionado con edades superiores y tendencia en sexo masculino, localizaciones izquierdas de colon o rectales, tumores diferenciados, infiltración linfo-vascular y estadios avanzados (156, 302, 303, 306, 308-311, 313). En enfermedad avanzada se correlacionan con tumores grandes, recurrencias abdominales y expresiones superiores en tumor primario que en localizaciones metastásicas (297).

El curso evolutivo de los pacientes con CCR se ha correlacionado con la expresión de pTS. Para enfermedad avanzada, sus niveles altos condicionan respuestas objetivas inferiores a tratamientos sistémicos basados en FPs y supervivencias más cortas, mientras que para enfermedad localizada, se asocia con ILEs y SGs disminuidas aunque algo modificables con el empleo de quimioterapia adyuvante (156, 300, 302-306, 311, 314).

La necesidad de optimizar el valor de los factores pronósticos esenciales como el TMN y otros factores clínico-patológicos accesorios justifican el desarrollo de nuestro estudio sobre BMT en CCR, ya que pueden ayudar a definir su expresión y contemplar la enfermedad desde un punto de vista molecular, establecer subgrupos pronósticos definidos y evitar los sesgos inherentes a un sistema de estadificación, para pT y definición de afectación ganglionar, en ocasiones con dificultades de reproductibilidad.

En definitiva, los diferentes BMT relacionados con la señalización y valoración de proliferación celular (EGFR, Cox-2, pKi-67), reguladores de estabilidad genómica (p53), reguladores del ciclo celular (ciclina D1, p21 y p27) y de síntesis/replicación de DNA (TS) se sobre-expresan de forma muy prevalente en los CCR, parecen definir poblaciones tumorales concretas que no siempre se relacionan con factores pronósticos clínico-patológicos convencionales de enfermedad y su curso evolutivo. Se pueden incluir en la categoría IIB del CAP y son susceptibles de estudios confirmatorios de transferencia generadores de hipótesis.

Hemos planteado un estudio retrospectivo Fase II en cohortes de pacientes afectos cáncer de colon esporádico en diferentes escenarios clínicos con la finalidad de describir nuestra propia experiencia con factores pronósticos convencionales, estudiar la expresión por técnicas de IHQ de cada uno de los BMT elegidos, tratar de evaluar su capacidad pronóstica y su utilidad clínica.

HIPÓTESIS DE TRABAJO.

- El CCR se comporta como una compleja enfermedad heterogénea clínica y biológica. La expresión de ciertos biomarcadores moleculares de alteraciones en la señal de proliferación, reguladores de ciclo celular y de reparación de DNA con especial relevancia en funciones celulares tumorales pueden correlacionarse con diferentes fenotipos clínico-patológicos y con cursos evolutivos específicos.
- Su análisis puede ayudar a diferenciar grupos de riesgo de pacientes con características clínico-biológicas específicas que podrían beneficiarse de tratamientos diferentes en intensidad y diseño e incluso incorporar nuevos fármacos moduladores de algunas de estas dianas moleculares.

OBJETIVOS.

Los objetivos del estudio son:

- Describir las características clínico-patológicas de la cohorte de pacientes incluida, tratamientos empleados, resultados y curso evolutivo.
- Determinar la expresión de EGFR, Cox-2, p53, pKi-67, ciclina D1, p21, p27 y TS mediante técnicas de Inmunohistoquímica.
- Relacionar las características clínico-patológicas convencionales con la expresión de cada uno de los biomarcadores estudiados.
- Relacionar la expresión de los BMT entre sí para intentar establecer subgrupos con perfiles específicos moleculares tumorales.
- Definir el valor pronóstico de los factores clínico-patológicos convencionales y de BMT analizados.
- Establecer subgrupos clínico-biológicos con valor específico en la evolución de la cohorte de pacientes estudiada.

**PACIENTES, MATERIAL Y
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.**

Selección de Pacientes y Material.

Se trata de un estudio retrospectivo de cohortes de pacientes afectos de carcinoma de colon esporádico histológicamente confirmado. Este proyecto fue aprobado por la Comisión de Investigación, Comité Ético y de Estudios Clínicos del Hospital Universitario de la Ribera (HUdR).

Se han incluido los casos consecutivos evaluados, diagnosticados y tratados en nuestro Hospital desde el año 1999 al 2001. En todos ellos se procedió a un diagnóstico de confirmación y extensión convencional con historia clínica, analítica, marcadores, endoscopia e imagen clasificándose por el Sistema TNM de la AJCC/UICC de 2002 para su estadificación (Tabla nº 1) (44, 45).

El tratamiento se efectuó con arreglo a los protocolos vigentes en la Institución. La enfermedad local, localmente avanzada o metastásica única se trató mediante resección quirúrgica en bloque del segmento afecto y linfáticos de drenaje, junto con eventual metastatectomía, seguida de quimioterapia sistémica, indicada según estadio y/o grupos de riesgo y basada en FPs.

Los pacientes tratados cumplían una serie de criterios básicos para su atención y valoración. Los criterios de inclusión en el estudio fueron los siguientes: edad mayor de 18 años sin límites superiores, buen estado clínico funcional con PS ECOG ≤ 2 , confirmación histológica tumoral, cualquier estadio de enfermedad, ausencia de tratamientos previos sistémicos y/o radioterápicos,

expectativa de vida superior a los 6 meses, consentimiento informado por escrito rutinario para procedimientos quirúrgicos y de tratamientos sistémicos. Los criterios de exclusión fueron: presencia de enfermedad sistémica o psiquiátrica grave que desaconsejara su tratamiento, imposibilidad geográfica o física de seguimiento, segunda neoplasia sincrónica o metacrónica e historia de cáncer de colon hereditario, FAP y/o HNPCC o síndrome de Lynch.

El seguimiento se efectuó con criterios NCCN o ESMO y la respuesta al tratamiento para enfermedad metastásica fue evaluada siguiendo los criterios convencionales OMS y del sistema RECIST. La supervivencia global, causa específica o no, y el intervalo o supervivencia libre de enfermedad así como el tiempo a la progresión se han definido por criterios estándar OMS (315).

La definición de fracaso primario a tratamiento fue la evidencia de enfermedad documentada por métodos clínicos, radiológicos o histológicos. El seguimiento para supervivencia global (SG), definida como el intervalo en meses entre el inicio del tratamiento en este caso cirugía inicial y el éxitus del paciente causa específica o no, se contabilizó desde la fecha inicial del procedimiento terapéutico. La supervivencia o intervalo libre de enfermedad (SLE/ILE) en meses fue definida como el intervalo entre la fecha del inicio del tratamiento y el primer evento de enfermedad y se consideró fallo en el tiempo a las recaídas locales, abdominales y a distancia/viscerales.

En el momento de la evaluación del curso evolutivo de los pacientes se definieron los siguientes grupos: vivo libre de enfermedad, vivo con enfermedad, éxitus con y sin enfermedad y perdido para seguimiento. Se estudió además el patrón de recaída de enfermedad como primer evento negativo de evolución.

La base de datos inicial recogió las características clínico-patológicas convencionales de los pacientes incluidos en el estudio, tratamientos ofertados, valoración convencional de respuesta, seguimiento y status específico como punto final de evaluación. Se recogieron datos respecto de edad, sexo, niveles de CEA y CA 19.9 séricos, localización tumoral, tamaño, características

macroscópicas, tipo histológico, grado de diferenciación, extensión tumoral en la pared intestinal, presencia de pólipo en área tumoral, infiltración linfocelular, presencia de factores de riesgo como obstrucción, perforación o infiltración a órganos vecinos, estado de los márgenes quirúrgicos, estado de los ganglios examinados del total remitido para su valoración y estadificación definitiva pT, pN, pM y estadio global. Se valorará la secuencia de tratamientos iniciales, tipo de cirugía y radicalidad, esquemas de quimioterapia adyuvante y/o de enfermedad avanzada o recaída, y por último, status de los pacientes, seguimiento, medias de supervivencia global e intervalo libre de enfermedad o tiempo a la progresión.

Para el planteamiento del estudio, desarrollo y comunicación de resultados seguimos las recomendaciones de las guías REMARK para estudios pronósticos sobre BMT (19).

La búsqueda bibliográfica se efectuó a través del programa PubMed.gov para literatura biomédica de la US National Library of Medicine NIH, Bethesda, Maryland, USA, con las palabras clave colorectal cancer, prognostic factors, biomarkers, EGFR, Cox-2, TP53, Ki-67, p21, p27 y Thymidylate Synthase. Para su lectura, análisis, interpretación y contextualización de nuestros resultados seleccionamos aquellas comunicaciones que incluyeran más de 100 pacientes en los estudios experimentales, publicadas en revistas de alto impacto, con revisores contrastados en lengua inglesa, y que reflejaran apropiadamente el estado de investigación clínico y básico.

Metodología Experimental.

El estudio histopatológico y de BMT moleculares fue efectuado en el Laboratorio de Anatomía Patológica del HUdR por un especialista experto en patología colorrectal que confirmó diagnóstico inicial, estadificación histopatológica definitiva y seleccionó el material viable adecuado para la investigación.

Se ha analizado la expresión proteica por Inmunohistoquímica de EGFR, COX-2, p53, ciclina D1, Ki-67, p21, p27 y TS. El procedimiento de investigación

empleado en el estudio fue efectuado con arreglo a los estándares para IHQ sobre secciones en parafina en mucosa normal y frente tumoral invasivo. Se basó en los siguientes pasos que se detallan a continuación:

Procesamiento de las muestras.

Todas las muestras tisulares que procedían de piezas de resección intestinal fueron fijadas en formol tamponado al 10%, procesadas de forma rutinaria para su diagnóstico y estadificación postquirúrgica, e incluidas en bloques de parafina según método convencional. Del archivo histopatológico se eligió el bloque más representativo de la lesión del que se obtuvieron 9 cortes seriados de 4µm de grosor en un micrótopo de rotación destinados al estudio IHQ objetivo de este trabajo.

Estudio de IHQ.

Para las técnicas inmunohistoquímicas se siguió el procedimiento ENVISION™ (DAKO Cytomation) o método de polímero en dos pasos, de uso habitual en la mayoría de Laboratorios de Patología por su rendimiento al emplear amplificación de señal con polímeros marcados con HRP (Horse Radish Peroxidase) (Diagramas/Figuras nº 16 y 17º).

La desparafinización, rehidratación y recuperación antigénica se realizó de forma simultánea a 90°C y calor húmedo con los portaobjetos con cortes tisulares inmersos en una solución de Dako Wash Buffer S3006 con un aparato específico de uso (PT Link de Dako, código PT101).

Los portaobjetos se trasladaron al inmunoteñidor automático Autostainer Plus (S3800) de Dako para su procesado mediante los reactivos incluidos en el Kit Envisión HRP Dual Link Rabbit/Mouse de Dako (código K4061) que incluye el sistema de detección, cromógeno y los tampones de lavados intermedios. El proceso completo se realizó en base a un polímero que contenía el Ac secundario y peroxidasa que se revela posteriormente con diaminobenzideína dando lugar a un precipitado coloreado visible a microscopía óptica.

Se han empleado los siguientes AcMo (Tabla nº 3) por sus especificidades para reconocimiento antigénico analizadas por métodos de

transferencia Western blotting, inmunoprecipitados, análisis SDS-PAGE y ensayos ELISA en diferentes líneas celulares (Dako Cytomation Specific Monoclonal Antibody Data Base).

Cada una de las técnicas se realizó a la vez para el corte problema y para un corte control positivo, previamente testado para cada una de ellas. Se incluyó también un control negativo para cada anticuerpo. La laminillas de inmunotinción de los BMT fueron interpretadas por un solo patólogo experto.

Método de cuantificación de marcadores.

La inmunoreactividad de los BMT se ha expresado como el ratio entre el porcentaje de áreas inmunopositivas en relación con la valoración de la sección completa de tejido neoplásico viable. La expresión de los BMT ha sido valorada mediante un método semicuantitativo basado en el porcentaje de células teñidas y en la intensidad de tinción:

Porcentaje de células teñidas:

- 1: menos del 30%.
- 2: del 30 a 60%.
- 3: del 60 a 100%.

Intensidad de la tinción:

- 1: intensidad leve.
- 2: intensidad moderada.
- 3: intensidad fuerte.

La lectura se realizó con un microscopio Nikon-Eclipse, E 800 y la puntuación definitiva se estableció con una escala de 0 a 3 (Tabla nº 4). Se consideró expresión +1: puntuaciones 1, 2 y 3; expresión +2: 4, 5 y expresión +3: 6. Establecimos de manera aleatoria empírica una subclasificación de baja y alta expresión con puntos de corte 0-1 vs 2-3.

Se consideró positiva cualquier expresión para inmunotinción en diferentes localizaciones para Ac Mo específicos. El patrón de inmunotinción celular de anti-EGFR fue de membrana y/o citoplasmático mientras que para Anti-COX-2 fue citoplasmático. Generalmente, las células marcadas por el

anticuerpo para p53 presentan un patrón de tinción nuclear, pero en algunos casos se ha observado tinción citoplásmica. Las células marcadas por el anticuerpo para Ki-67 muestran un patrón de tinción nuclear, excepto en las células mitóticas, en las que el anticuerpo marca a los cromosomas y al citoplasma. Las células marcadas por el anticuerpo para Ciclina D1, p21 y p27 presentan un patrón de tinción nuclear. El patrón de tinción celular para anti-TS fue citoplasmático, perinuclear y nuclear (Dako Cytomation data base).

Análisis Estadístico.

La estrategia de análisis estadístico se desarrolló en 3 fases:

1. Análisis descriptivo. Las variables incluidas en el estudio fueron resumidas mediante diferentes estadísticos descriptivos de acuerdo a la naturaleza de las mismas:

- 1.1. Variables cuantitativas: medidas de tendencia central (media o mediana, según la distribución gaussiana o no de los valores) y de dispersión (desviación estándar acompañando a la media, intervalo intercuartílico acompañando a la mediana)
- 1.2. Variables cualitativas y ordinales: frecuencias absolutas (número) y relativas (porcentajes).

2. Análisis bivalente.

2.1. Relación entre variables independientes

- Relación entre variables clínico-patológicas y BMT.
- Relación entre BMT dicotomizados: negativo/positivo y Alta /Baja Expresión.

Se analizaron mediante pruebas de Ji cuadrado o el test exacto de Fisher para bajo número de efectivos esperados.

2.2. Correlación entre marcadores tumorales ordinales (expresión 0-3).

La relación entre los marcadores se analizó mediante el coeficiente de regresión no paramétrico de Spearman (Rho)

2.3 Relación entre variables independientes (clínicopatológicas, BMT) y dependientes (SG, SLE).

La asociación entre estas variables se realizó mediante técnicas de análisis de supervivencia al tener que utilizar datos censurados para los tiempos de supervivencia global (casos vivos en la última visita y

casos perdidos para el seguimiento) y para el tiempo libre de enfermedad (casos vivos sin enfermedad o que habían muerto sin enfermedad y casos que se habían perdido para el seguimiento).

Se estimaron los tiempos medianos y medios de supervivencia según con el método de Kaplan-Meier, comparando los tiempos entre las categorías de las variables independientes mediante prueba de log-rank.

3. Análisis multivariante.

Se construyeron modelos de regresión multivariante de Cox de riesgos proporcionales.

3.1. Construcción del modelo basal

En primer lugar se construyó un modelo basal con aquellas variables clinicopatológicas que tuvieran una relación significativa con los tiempos de supervivencia mediante una estrategia hacia delante (forward) entrando como variables candidatas aquellas que mostraron al menos un relación significativa para una $p < 0,20$ con los tiempos de supervivencia.

3.2. Estimaciones para los marcadores tumorales

En una segunda fase, sobre el modelo basal se introdujeron los diferentes marcadores tumorales, tanto como variables dicotómicas (negativo/positivo) como ordinal (0 a 3).

Todas las estimaciones se mostraron como hazard ratio (HR) y su correspondiente intervalo de confianza del 95% (IC95%). En todos los casos se ha considerado el valor de p para un test bilateral con un nivel de significación del 5%. Los cálculos del análisis estadístico se realizaron con el programa estadístico SPSS, versión 12.0.

El cálculo, validación del tamaño muestral y potencia del estudio se realizó con el módulo de tiempos de supervivencia del programa Ene3 (Departamento de Biometría de GSK).

RESULTADOS.

Pacientes y tratamiento.

Se han estudiado las muestras de tejidos tumorales de 123 pacientes tratados entre Enero de 1999 y Abril de 2001 con las siguientes características clínico-demográficas (Tabla nº 5): la edad mediana fue de 70 años (límites entre 31 y 89); 68 pacientes fueron varones y 55 mujeres; en 14 casos se constató algún tipo de agregación tumoral familiar. 38 tumores se localizaron en colon derecho y 85 en colon izquierdo; las características macroscópicas tumorales fueron: exofítico en 36 casos, polipoide en 42 casos, anular en 34 casos y mixto en 11 casos; en 11 casos se constató pólipo preexistente a tumor. Los subtipos histológicos fueron: 118 casos adenocarcinomas y 5 cumplían los criterios de carcinomas mucinosos; el grado de diferenciación tumoral fue: grado 1 en 55 casos, grado 2 en 56 y grado 3 en 12 casos; la infiltración linfo-vascular fue positiva en 81 casos. La cifras de marcadores tumorales séricos con determinaciones iniciales de CEA disponible para 78 pacientes estuvieron incrementadas > 5 ngr/ml en 45 casos y en 71 pacientes con CA 19.9 analizado encontramos cifras $>$ de 39 U/ml en 20 casos. Por estadios, la distribución para extensión local de la enfermedad fue de 2 casos para T1, 13 para T2, 92 para T3 y 16 casos para T4; la valoración ganglionar fue negativa en 74 casos y positiva en 49 casos, N1 en 32 y N2 en 17 casos; en 19 casos se constató enfermedad avanzada inicial por metástasis hepáticas. La estadificación global definitiva fue: Estadio I en 12 casos, II en 59; III en 33 y 19 casos en estadio IV.

RESULTADOS

En 16 casos presentaron características clínicas de obstrucción, perforación y/o invasión de órganos adyacentes, en 4 casos persistía tumor microscópico y la mediana de ganglios linfáticos regionales resecados fue de 7 (límites 2-26).

Los pacientes fueron orientados para diferentes secuencias terapéuticas según su estadificación inicial y la localización tumoral concreta. Los tratamientos empleados fueron: cirugía exclusiva en 47 pacientes; en 66 pacientes, la cirugía se completó con quimioterapia adyuvante con esquemas basados en FPs, esencialmente con 5 fluorouracilo modulado con leucovorin (esquema convencional de la Clínica Mayo tipo 5FU+LV) y en 19 casos quimioterapia con intención paliativa por enfermedad metastásica constatada; en 2 con radioterapia y en 8 pacientes con radio-quimioterapia combinada. Las técnicas quirúrgicas empleadas fueron: resección segmentaria en 107 casos, colectomía total en 4 casos y cirugías más agresivas en 12 casos.

El tratamiento quirúrgico fue definido radical en 97 casos y paliativo en 26 casos, bien por afectación metastásica inicial en 19 de ellos o bordes afectos en 7 casos. En 61 pacientes se empleó quimioterapia complementaria tipo 5FU+LV, en 1 paciente el esquema Folfox y en 4 de ellos quimioterapia oral.

Resultados del estudio de marcadores tumorales.

El análisis inmunohistoquímico de sobre-expresión de EFG_r, Cox-2, p53, Ki-67, Ciclina D1, p21, p27 y TS se efectuó en 123 muestras tumorales de cáncer colon esporádico primario con los resultados que se describen en las tablas nº 6 y 7 (Diagramas/Figuras nº 18 y 19).

Expresión de EGFR.

El status de expresión inmunohistoquímica de membrana y/o citoplásmica de EGFR fue positivo en 54 de 123 muestras tumorales (43.9%). Las categorías de expresión positiva por porcentaje de células teñidas fueron: grado +1 en 23 casos (18.7%), grado +2 en 15 casos (12.2%) y grado +3 en 16 casos (13%); baja expresión en 92 casos (74.79%) y expresión alta en 31 casos (25.21%).

Expresión de Cox-2.

La expresión citoplásmica de proteína Cox-2 fue positiva en 53 de 123 muestras tumorales (43.1%). Las categorías de expresión positiva fueron: grado +1 en 26 casos (21.1%), grado +2 en 20 casos (16.3%) y grado +3 en 7 casos (5.7%); La expresión fue baja en 96 casos (78%) y alta en 27 casos de los 123 (22%).

Expresión de TP53.

La inmunotinción nuclear fue positiva para TP53 en 78 de 123 muestras tumorales (63.4%). Las categorías de expresión positiva fueron: grado +1 en 18 casos (14.6%), grado +2 en 28 casos (22.8%) y grado +3 en 32 casos (26%); baja expresión en 63 casos (51.2%) y expresión alta en 60 casos (48.8%).

Expresión de Marcador de Proliferación pKi-67.

El patrón de tinción nuclear para pKi67 fue positivo en 75 de 123 muestras tumorales (61%). Las categorías de expresión positiva fueron: grado +1 en 37 casos (30.1%), grado +2 en 25 casos (20.3%) y grado +3 en 13 casos (10.6%); baja expresión en 85 casos (69.1%) y expresión alta en 38 casos de 123 (30.9%).

Expresión de Reguladores del Ciclo Celular.

La Inmunotinción nuclear para Ciclina D1 fue positiva en 48 muestras tumorales de 123 (39%). Las categorías de expresión positiva fueron: grado +1 en 21 casos (17.1%), grado +2 en 19 casos (15.4%) y grado +3 en 8 casos (6.50%); baja expresión en 96 casos (78%) y expresión alta en 27 casos (22%).

El análisis de la proteína p21^{waf1/cip1} resultó positivo para tinción nuclear en 26 casos (21.1%) mientras que en 97 muestras (78.9%) no se constató expresión proteica. Las categorías de expresión positiva fueron: grado +1 en 17 casos (13.8%), grado +2 en 4 casos (3.3%) y grado +3 en 5 casos (4.1%); baja expresión en 114 casos (92.7%) y expresión alta en 9 casos (7,3%).

La inmunotinción nuclear de p27^{Kip1} fue positiva en 46 de 123 muestras tumorales (37.4%). Las categorías de expresión positiva fueron: grado +1 en 8

RESULTADOS

casos (6.50%), grado +2 en 15 casos (12.2%) y grado +3 en 23 casos (18.7%); baja expresión en 85 casos (69.1%) y expresión alta en 38 (30.9%).

Expresión de Timidilato sintasa.

El patrón de tinción citoplásmico y nuclear para pTS fue positivo en 81 de 123 muestras tumorales (57.7%). Las categorías de expresión positiva fueron: grado +1 en 32 casos (26.0%), grado +2 en 21 casos (17.1%) y grado +3 en 18 casos (14.6%); baja expresión en 84 casos (68.3%) y expresión alta en 39 casos (31.7%).

Correlaciones clínico-patológicas y marcadores tumorales.

En primer lugar analizamos la relación de las características clínicas y patológicas convencionales con cada uno de los marcadores biológicos escogidos y con posterioridad la relación entre la expresión de los diferentes marcadores entre sí con los resultados detallados a continuación.

Relación de FP convencionales con EGFr.

La positividad de la expresión de EGFr o sus niveles alto o bajo no se ha relacionado con la mediana de edad de la serie completa (p 0.58-0.87), sexo (p 0.67-0,44), localización tumoral derecha vs izquierda (p 0.36-0,85), grado de diferenciación (p 0.87-1), infiltración LV (p 0.58-0,29), cifras de CEA (p 0.80-0,78) y CA 19.9 (p 0.93-1) séricas preoperatorias, nivel de infiltración tumoral pT (p 0.22), afectación ganglionar pN (p 0.36), metástasis presentes pM (p 0.86-0,25) y estadio TMN global definitivo (p 0.58-0,44). Se ha observado una tendencia significativa entre la ausencia de expresión de EGFRr y el tipo histológico mucinoso (p 0,067), no confirmada en análisis discriminativo (p 0,33) así como entre la expresión baja de EGFr y estadio pT avanzado de infiltración tumoral local (p 0,04) (Tabla nº 8).

Relación de FP convencionales con Cox-2.

La positividad de la expresión de Cox-2 o sus niveles alto o bajo no se ha relacionado con la mediana de edad (p 0.99-0.58), sexo (p 0.53-0.64), localización tumoral inicial (p 0.35-0.87), histología tipo adenocarcinoma o

mucinoso (p 0.069-0.23), grado de diferenciación (p 0.92-0.32), ILV (p 0.073-0.92), niveles de CEA sérico (p 0.86-0.61) o CA 19.9 (p 0.29-0.90), nivel de invasión tumoral local (p 0.53-0.16), afectación ganglionar (p 0.15-0.32), presencia de metástasis iniciales (p 0.92-0.19). Tampoco la expresión de Cox-2 se ha asociado con el estadio global de presentación de enfermedad (p 0,92) mientras que fueron más frecuentes las categorías de expresión baja para cada uno de los estadios analizados con diferencias estadísticamente significativas (p 0.05) (Tabla nº 9).

Relación de FP convencionales y expresión de TP53.

La positividad de la expresión nuclear de TP53 o sus niveles alto o bajo no se relacionó con el sexo (p 0.14-0.76), grado de diferenciación (p 0.57-0.18), infiltración linfo-vascular (p 0,35-p,018), cifras de CEA (p 0.41-0.62) o CA 19.9 séricos preoperatorios (p 0.20-0.10), Estadio pT (p 0.80-0.63), afectación metastásica inicial (p 0.31-0.17) o estadio global (p 0.30-0.20). Se ha observado una tendencia a la significación entre la expresión positiva de TP53 y localizaciones tumorales izquierdas (p 0,097) mientras que expresiones bajas fueron significativamente más frecuentes en tumores de localización derecha (p 0,03). La variedad histológica mucinosa se ha relacionado con una tendencia a la ausencia de expresión de TP53 (p 0,059) no confirmada en el análisis de score discriminativo (p 0,19). No se han encontrado diferencias para afectación ganglionar entre TP53 negativa y positiva (p 0.13) pero estadios N1-2 se asociaron con scores de expresiones altas (p 0.025) (Tabla nº 10).

Relación de FP convencionales y expresión de pKi-67.

La positividad de la expresión de pKi-67 o sus niveles de alta o baja expresión no se han relacionado con la mediana de edad (p 0.89-0.11), sexo (p 0.86-0.24), localización tumoral (p 0.26-0.17), tipo histológico (p 0.38-0.59), grado de diferenciación (p 0.46-0.51), ILV (p 0.35-0.69), cifras de CA 19.9 sérico (p 0.86-0.17), invasión tumoral (p 0.20-0.30), afectación ganglionar (p 0.67-0.65), enfermedad metastásica inicial (p 0.83-0.31) y estadio global definitivo (p 0.89-0.60). Tan solo los niveles de CEA sérico con valores

normales ≤ 4.6 ngr/ml se han relacionado de forma significativa con expresiones bajas de pKi-67 (84.8 vs 15.2%, p 0.03) (Tabla nº 11).

Relación de FP convencionales y expresión de Ciclina D1.

La positividad de la expresión de Ciclina D1 o sus niveles alto o bajo no se han relacionado con la mediana de edad (p 0,38-0,58), sexo (p 0,59-0,36), localización tumoral inicial (p 0,95-0,87), tipo histológico (p 1,0-1,0), grado histológico (p 0,91-0,72), ILV (p 0,16-0,72), niveles séricos de CA 19.9 (p 0,83-0,74), Estadio T (p 0,42-0,86), afectación ganglionar (p 0,48-0,58), enfermedad metastásica inicial (p 0,76-0,62) ni estadio global I-IV (p 0,95-0,86). Niveles de CEA séricos $< 4,6$ ngr/ml se han relacionado con tendencia significativa a baja expresión de Ciclina D1 (p 0,07) (Tabla nº 12).

Relación de FP convencionales y expresión de p21^{waf1/cip1}.

La positividad de la expresión de p21^{waf1/cip1} o sus niveles de expresión alto o bajo no se han relacionado con la mediana de edad (p 0,91-0,17), sexo (p 0,24-0,73), localización tumoral inicial (p 0,99-1,0), tipo histológico (p 0,95-1,0), grado de diferenciación (p 0,25-1,0), ILV (p 0,15-0,49), niveles séricos de CEA (p 0,58-0,72) o CA 19.9 (p 0,53-0,43), Estadio T (p 0,96-0,63), afectación ganglionar N (p 0,29-0,68), metástasis iniciales (p 1,0-0,63) y estadio global (p 0,31-0,52) (Tabla nº 13).

Relación de FP convencionales y expresión de p27^{Kip1}.

La positividad de la expresión de p27^{Kip1} o sus niveles de alta o baja expresión (Tabla nº 14) no se han relacionado con la mediana de edad (p 0,39-0,42), sexo (p 0,83-1,0), localización tumoral (p 0,62-0,25), tipo histológico (p 1,0-0,96), grado de diferenciación (p 0,76-0,89), ILV (p 0,50-0,42), cifras de CEA sérico (p 0,71-0,65) o CA 19.9 (p 0,65-0,83), afectación ganglionar (p 0,80-0,96), enfermedad metastásica inicial (p 0,64-0,94) y estadio global definitivo (p 0,90-1,0). Se ha observado una tendencia a la significación entre niveles de invasión tumoral avanzados pT3-4 y expresión baja de p27 (p 0,09).

Relación de FP convencionales y expresión de pTS.

La positividad de la expresión de pTS o sus niveles alto o bajo no se han relacionado con la mediana de edad (p 0,20-0,54), sexo (p 0,31-0,83), localización tumoral (p 0,98-0,69), tipo histológico (p 1,0-0,32), grado de diferenciación (p 0,20-0,52), ILV (p 0,92-0,90), cifras de CEA sérico (p 0,23-0,71) o CA 19.9 (p 0,12-0,65), invasión tumoral pT (p 0,98-0,32) y enfermedad metastásica inicial (p 0,62-0,58). La afectación ganglionar fue superior en los casos con expresión positiva de pTS (73.5 vs 26.5%; p 0,004) no confirmada para expresión alta o baja (p 0,56). La expresión de pTS positiva se relacionó de forma significativa con el estadio III (84.8 vs 15.2%; p 0,001) pero no para expresión alta o baja (p 0,74) (Tabla nº 15).

Correlaciones entre diferentes biomarcadores.

Las correlaciones entre diferentes biomarcadores se han analizado como expresiones positivas o negativas y con posterioridad por el nivel de expresión discriminatorio bajo o alto.

Correlaciones para EGFr.

La expresión positiva de EGFr (Tabla nº 16) se ha relacionado con la positividad de TP53 en el 51.3% de los casos (p 0.030). No se ha asociado significativamente con expresión de Cox-2 (p 0.92), Ciclina D1 (p 0.28), p21^{waf1/cip1} (p 0.25), p27^{Kip1} (p 0.94), pKi-67 (p 0.25) o pTS (p 0.95).

Los niveles de expresión bajos y altos de EGFr (Tabla nº 16) se relacionaron con la expresión discriminativa de TP53 (p 0.004), pero no fueron significativos para Cox-2 (p 0.69), pKi-67 (p 0.28), Ciclina D1 (p 0.27), p21^{wa1/cip1} (p 0.56), p27^{kip1} (p 0.52) o bien pTS (p 0.21).

Correlaciones para Cox-2.

La expresión positiva de Cox-2 (Tabla nº 17) se ha asociado de forma significativa con Ciclina D1 (54.2%; p 0.047), p27^{kip1} (54.3%; p 0.051) y pTS (52.1%; p 0.018). No se han encontrado relaciones con la expresión de EGFr (p 0.92), TP53 (p 0.54), pKi-67 (p 0.17) y p21^{waf1/cip1} (p 0.72).

En el análisis discriminativo de expresión baja o alta (Tabla nº 17), Cox-2 se relacionó con tendencia a la significación a la expresión de TP53 baja (p 0.07) sin ninguna otra asociación con EGFr (p 0.45), pKi-67 (p 0.21), Ciclina D1 (p 0.11), p21^{waf1/cip1} (p 0.98), p27^{kip1} (p 0.43) y pTS (p 0.25).

Correlaciones para TP53.

La expresión positiva de TP53 (Tabla nº 18) se ha relacionado con expresión de EGFr (74.1%; p 0.030) y tendencia hacia a la significación con pTS (70.4%; p 0.059). Las correlaciones fueron negativas para expresión de Cox-2 (p 0.54), pKi-67 (p 0.58), Ciclina D1 (p 0.83), p21^{waf1/cip1} (p 0.49) y p27^{kip1} (p 0.40).

Analizada por expresión baja o alta (Tabla nº 18), TP53 se ha asociado significativamente con EGFr (71%; p 0.004) y con tendencia significativa para Cox-2 (p 0.07). De nuevo las correlaciones con pKi-67 (p 0.86) Ciclina D1 (p 0.44), p21^{waf1/cip1} (0.74), p27^{kip1} (p 0.86) y pTS (p 0.71) fueron negativas.

Correlaciones para pKi-67.

La expresión positiva de pKi-67 (Tabla nº 19) se ha asociado con tendencia a la significación a expresión de pTS (67.6%; p 0.078) pero no con expresiones de EGFr (p 0.25), Cox-2 (p 0.17), TP53 (p 0.58), Ciclina D1 (p 0.92), p21^{waf1/cip1} (p 0.95), p27^{kip1} (p 0.12).

Para niveles de expresión bajos o altos, no encontramos correlación alguna de pKi-67 con EGFr (p 0.28), Cox-2 (p 0.21), TP53 (p 0.86), Ciclina D1 (p 0.53), p21^{waf1/cip1} (p 0.56), p27^{kip1} (p 0.75) o pTS (p 0.22) (Tabla nº 19).

Correlaciones para Ciclina D1.

La expresión positiva de Ciclina D1 (Tabla nº 20) se ha asociado con las expresiones de Cox-2 (49.1%; p 0.047), p21^{waf1/cip1} (57.7%; p 0.028) y p27^{Kip1} (52.2%; p 0.021). No se objetivaron relaciones de significación con expresiones de EGFr (p 0.28), TP53 (p 0.83), pKi-67 (p 0.92) ni pTS (p 0.22).

RESULTADOS

La expresión baja de Ciclina D1 (Tabla nº 20) tan solo se ha relacionado con expresiones de p21^{waf1/cip1} (80.7%; p 0.01) y p27^{Kip1} (88.2%; p 0.00004). No se han observado asociaciones con expresiones de EGFr (p 0.27), Cox-2 (p 0.11), TP53 (p 0.72), pKi-67 (p 0.53) ni pTS (p 0.50).

Correlaciones para p21^{waf1/cip1}.

La expresión negativa de p21^{waf1/cip1} (Tabla nº 21) se ha relacionado significativamente con la ausencia de expresión de Ciclina D1 (85.3%; p 0.028) No encontramos ningún otro tipo de asociación entre p21^{waf1/cip1} y expresiones de EGFr (p 0.25), Cox-2 (p 0.72), TP53 (p 0.49), pKi-67 (p 0.95), p27^{kip1} (p 0.14) o pTS (p 0.18).

El nivel de expresión bajo de p21^{waf1/cip1} (Tabla nº 21) se ha relacionado de forma significativa con Ciclina D1 (95.8%; p 0.01) pero no con EGFr (p 0.56), Cox-2 (p 0.98), TP53 (0.67), pKi-67 (p 0.56), p27^{kip1} (p 0.87) ni pTS (p 0.91).

Correlaciones para p27^{kip1}.

La expresión negativa de p27^{kip1} (Tabla nº 22) se ha relacionado con expresión negativa de Cox-2 (47.2%, p 0.051) y Ciclina D1 (50%, p 0.021). No encontramos relaciones entre p27^{kip1} y expresión de EGFr (p 0.94), TP53 (p 0.40), pKi-67 (p 0.12) y p21^{waf1/cip1} (p 0.58).

La expresión discriminativa baja de p27^{Kip1} se ha relacionado fuertemente con baja expresión de Ciclina D1 (63%, p 0.00004); expresiones de EGFr (p 0.52), Cox-2 (p 0.43), TP53 (p 0.86), pKi-67 (p 0.75), p21^{waf1/cip1} (p 0.87) y pTS (p 0.98) no se han relacionado con expresión baja o alta de p27^{Kip1} (Tabla nº 22).

Correlaciones para pTS.

La expresión positiva de pTS (Tabla nº 23) se ha asociado con Cox-2 (69.8%; p 0.018), TP53 (64.1%; p 0.059) y para pKi-67 con tendencia a la

RESULTADOS

significación (64%; p 0.078). No se relacionó con EGFr (p 0.95), Ciclina D1 (p 0.22), p21^{waf1/cip1} (p 0.18) o p27^{kip1} (p 0.58).

Por nivel de expresión alto o bajo (Tabla nº 23) no encontramos relación de pTS con expresión de EGFr (p 0.21), Cox-2 (p 0.25), TP53 (p 0.71), pKi-67 (p 0.98), Ciclina D1 (p 0.50), p21^{waf1/cip1} (p 0.91) ni para p27^{kip1} (p 0.98).

Las correlaciones entre las intensidades de los diferentes biomarcadores estudios se recogen en la Tabla nº 24, que resume los datos previamente descritos para cada uno de ellos.

Seguimiento y status de los pacientes.

Con una mediana de seguimiento de 90 meses (límites 77-103), 64 pacientes permanecen vivos y 57 (46.35%) libres de enfermedad; se contabilizaron 56 exitus, 37 (30.08%) por enfermedad causa-específica y 19 (15.45%) por otras causas no relacionadas con enfermedad tumoral; 2 (2.43%) pacientes se perdieron para seguimiento. El patrón de recaída demostró ser esencialmente visceral (hepático y pulmonar) y abdominal (peritoneal) con dos neoplasias metacrónicas digestivas.

Correlaciones evolutivas.

La mediana de Supervivencia Libre de Enfermedad (o ILE) actuarial (Figura nº 1) de los 97 pacientes en estadios I-III ha sido de 103+ meses (IQR de >68, límites 3-103) y la media de 79 meses (IC95%: 71-87 meses). Se excluyeron el análisis aquellos pacientes catalogados en estadio IV y con evolución al exitus en el primer mes después de la cirugía.

La mediana de Supervivencia Global para toda la cohorte de 123 pacientes (Figura nº 2) se sitúa en 103+ meses (IQR > 73 meses, límites 3-103) y la media en 72 meses (IC95%: 65-89 meses).

Análisis de Supervivencia Libre de Enfermedad.

El análisis de SLE fue efectuado en primer lugar en relación con la influencia de los FPC y posteriormente se valoró el impacto de los biomarcadores estudiados, por expresión y valor discriminativo bajo vs alto.

SLE para Factores Pronósticos Convencionales.

La SLE fue superior para estadios ganglionares negativos (mediana de 102+ vs 41nc meses; media de 87 vs 59 meses; p 0.009; HR 3.36), estadios precoces (mediana 102+ vs 41nc meses, media 87 vs 59 meses, p 0.009; HR 3.35); observamos una tendencia a la significación de la infiltración linfocelular ausente (mediana actuarial 103+ vs 99+ meses, media 83 vs 63 meses; p 0.061; HR 2.12) (Tabla nº 25) (Figuras nº 3 al 11).

La SLE no se ha relacionado con edad (p 0.25), sexo (p 0.82), localización tumoral inicial (p 0.69), tipo histológico (p 0.44), grado de diferenciación (p 0.75), cifras de CEA (p 0.44) o CA 19.9 séricas (p 0.13) ni nivel de invasión de tumor primario T (p 0.29); la administración de QT adyuvante fue valor pronóstico discriminativo pero tiene un interés relativo puramente descriptivo (81 vs 50 me; p <0.001) (Tabla nº 25) (Figuras nº 3 a 12).

SLE para Biomarcadores.

La supervivencia libre de enfermedad en 97 pacientes catalogados como Estadios I-III no se ha visto influida por la expresión positiva de EGFr (p 0.46), Cox-2 (p 0.26), TP53 (p 0.97), pKi-67 (p 0.31), Ciclina D1 (p 0.66), p21^{waf1/cip1} (p 0.80), p27^{kip1} (p 0.44) ni de pTS (p 0.26) (Tabla nº 26) (Figuras nº 13 a 28).

Los niveles de expresión baja o alta (Tabla nº 27) tampoco han influido de forma significativa en la SLE para expresiones de EGFr (p 0.70), Cox-2 (p 0.84), p53 (p 0.63), Ciclina D1 (p 0.48), p21^{waf1/cip1} (p 0.64), p27^{kip1} (p 0.94) o pTS (p 0.77). Sin embargo, hemos observado una tendencia para la significación entre niveles de pKi-67 con baja expresión y SLE más prolongada (mediana de 103+ vs 102 + meses, medias de 84 vs 66 meses; p 0.065; HR 2.03) (Tabla nº 26) (Figuras nº 13 a 28).

Análisis de Supervivencia global.

El análisis de para SG fue efectuado en primer lugar en relación con la influencia de FPC y posteriormente se valoró la influencia de los biomarcadores estudiados, por expresión y valor discriminativo bajo vs alto.

Supervivencia global para Factores Pronósticos Convencionales.

El incremento de la supervivencia global de la cohorte de pacientes estudiada se ha asociado significativamente con edad inferior a 70 años (mediana 103+ vs 59 meses, media 80 vs 61 meses; p 0.009; HR 2.15), grados de diferenciación tumoral I-II (medianas de 103+ vs 22 meses, medias 75 vs 44 meses; p 0.009; HR 2.79), ausencia de infiltración linfovascular (medianas de 103+ vs 30 meses, medias de 82 vs 50 meses, p 0.0001; 3.07), cifras séricas de CEA ≤ 5 ngr/ml (medianas de 100+ vs 59 meses, medias 84 vs 58 meses; p 0.0024; HR 3.42) o CA 19.9 (medianas de 102+ vs 21 meses, medias de 80 vs 40 meses; p 0.0002; HR 3.92), Estadio N negativo (medianas de 102+ vs 44 meses, medias de 80 vs 25 meses; p <0.0001; HR 2.44), Estadios I-III (medianas de 102-103+ vs 82-73 meses, medias 82-73 vs 25 meses; p <0.0001; HR 1.61). El empleo de QT adyuvante incremento de forma sustancial el pronóstico de los pacientes (>103 vs 32 me; p < 0.0001) pero su valor sigue siendo puramente descriptivo (Tabla nº 28).

El sexo (p 0.60), localización tumoral (p 0.83), histología (p 0.88) ni el nivel de invasión del tumor primario (p 0.25) se relacionaron con la expectativa de SG (Tabla nº 28) (Figuras nº 29 a 38).

Supervivencia Global para Biomarcadores.

La supervivencia global de la cohorte completa de pacientes incluidos en el estudio no se ha visto influenciada por la expresión positiva de EGFr (p 0.55), Cox-2 (p 0.62), TP53 (p 0.81), pKi-67 (p 0.53), Ciclina D1 (p 0.53), p21^{waf1/cip1} (p 0.86), p27^{Kip1} (p 0.52) o pTS (p 0.60) (Tabla nº 29) (Figuras nº 39 a 54).

La supervivencia global aumentada se asoció de forma significativa con expresiones bajas de pKi-67 (medianas de 103+ vs 59 meses, medias de 77 vs 59 meses; p 0.030; HR 1.90). No se relacionó para expresiones bajas o altas de EGFr (p 0.14), Cox-2 (p 0.60), TP53 (p 0.80), Ciclina D1 (p 0.86), p21^{waf1/cip1} (p 0.98), p27^{Kip1} (p 0.46) o pTS (p 0.62) (Tabla nº 30) (Figuras nº 39 a 54).

Análisis Multivariante

El análisis multivariante por el modelo de regresión de Cox fue efectuado para 97 pacientes en estadios I-III y para la SG en 113 pacientes para todos los estadios de enfermedad, una vez descartados para valoración 10 casos de muerte precoz perioperatoria.

Modelo multivariante para SLE.

En el análisis multivariante (Tablas nº 31, 32, 33), tan solo el estadio global TNM (I-II vs III, HR 3.36; p 0.002) y los niveles de expresión de pKi-67 (HR 2.29; p 0.04) se han asociado de forma significativa con la SLE. Los expresiones positivas o niveles de los biomarcadores explorados, EGFr, Cox-2, TP53, pKi-67, Ciclina D1, p21^{waf1/cip1}, p27^{kip1} y pTS, carecieron de valor pronóstico independiente alguno (HR 0.51-1.67; p>0.10).

Modelo multivariante para Supervivencia global.

En el análisis de regresión de Cox (Tablas nº 34, 35, 36), la mediana de edad (HR 2.02; p 0.019), infiltración linfovascular (HR 1.81; p 0.08), grado de diferenciación (HR 2.42, p 0.037), estadio global TNM (HR 1.41-5.49; p<0.001), cifras de CA 19.9 sérico >39 U/ml (HR 3.04; p 0.032) y expresión alta/baja de pKi-67 (HR 1.85; p 0.047) han sido factores significativos para supervivencia, mientras que tanto la expresión de los demás biomarcadores EGFR, Cox-2, TP53, Ciclina D1, p21^{waf1/cip1}, p27Kip1 y pTS así como sus niveles bajos o altos no alcanzaron valor pronóstico independiente (HR 0.71-1.73; p>0.09).

DISCUSIÓN.

Consideraciones sobre el Cáncer de Colon y Factores pronósticos.

Heterogeneidad y necesidad de BMT de optimización.

Hemos completado un estudio fase II observacional analítico longitudinal de cohortes retrospectivo para pacientes diagnosticados de cáncer de colon en diferentes contextos clínicos y tratados en nuestra Institución, con objeto de valorar la capacidad pronóstica de diferentes BMT implicados esencialmente en procesos de proliferación, su regulación y la síntesis/reparación de DNA.

Las recomendaciones de la guías REMARK para estudios pronósticos sobre BMT (19, 316) nos han servido de base para el diseño, desarrollo, análisis y comunicación de resultados de nuestro trabajo, ya que permiten la valoración y evolución del nivel de evidencia científica desde estudios básicos hasta revisiones sistemáticas y meta-análisis (12).

El cáncer de colon se comporta como una enfermedad heterogénea desde el punto de vista demográfico, clínico, patológico así como de respuesta y evolución a tratamientos similares (47, 317).

Nuestra serie se ha caracterizado por pacientes con edades medianas por encima de los 68 años, predominio del sexo masculino, tumores con localización inicial izquierda y tamaño de 5 cm, grados de diferenciación 1 y 2, predominio de pT3 y pN0, sin metástasis iniciales en más del 80%. Sus características no difieren sustancialmente de las cohortes del SEER excepto para un porcentaje algo elevado de tumores bien diferenciados (47, 317).

Hasta el 75% de los pacientes afectos de cáncer de colon se presentan en la clínica con enfermedad localizada y la cirugía con intención curativa es el tratamiento de elección, seguida de quimioterapia (QT) adyuvante para grupos de riesgo en estadio II y estadios III con un impacto significativo sobre las supervivencias a 5 y 10 años. El empleo de esquemas basados en FPs durante 6 meses reduce el riesgo de muerte en un 30% que equivale a una ganancia de vida adicional de 10-15%; la incorporación de oxaliplatino aporta un incremento a SLE de 7% y del 4.2% para SG en estadios III. El empleo de QT adyuvante en estadios II convencionales es una cuestión controvertida por la ausencia de estudios prospectivos (39, 46, 48-50, 51, 318).

Para enfermedad avanzada, los tratamientos de QT basados en la combinación de FPs con oxaliplatino y/o irinotecan junto con terapias biológicas como anticuerpos monoclonales humanizados tipo Cetaximab, Panitumumab o Bevacizumab pueden lograr porcentajes de respuestas objetivas altos que se acompañan de buenos índices de calidad de vida y alcanzar supervivencias medianas que superan los 20-24 meses (318, 319).

Nuestros pacientes con enfermedad no metastásica fueron tratados mediante abordajes quirúrgicos estándar y esquemas de quimioterapia complementaria basada en FPs según grupos de riesgo ya que el oxaliplatino no se había incorporado como doblete habitual en este contexto. La bioterapia convencional actual se incluyó años después de forma estandarizada y basada en determinados estudios moleculares y/o perfiles clínicos concretos.

El cáncer de colon es una enfermedad de curso evolutivo heterogéneo no necesariamente ominoso y supervivencias que varían significativamente según la estadificación tumoral inicial. En la actualidad, el estadio patológico TNM es el factor pronóstico más determinante para predecir el curso evolutivo de la enfermedad (46, 318).

Un estudio a gran escala que ha incluido datos del SEER U.S.A. National Cancer Registry sobre el seguimiento entre enero de 1991 y diciembre de 2000 de 119.363 pacientes con cáncer de colon estadificados con arreglo a

DISCUSIÓN

los criterios de la 6ª edición del sistema TNM/AJCC, ha comunicado una supervivencia global específica del 65.2% a 5 años (317).

Con las modificaciones de la última edición TNM, la supervivencias específicas por estadio fueron 93.2% para estadio I, 84.7% para estadio IIa, 72.2% para estadio IIb, 83.4% para estadio IIIa, 64.1% para estadio IIIb, 44.3% para estadio IIIc y 8.1% para estadio IV; destacan las cifras de supervivencia significativamente mejores para pacientes en estadios IIIa frente a estadios IIb (83.4% vs 72.2%; $0 < 0.001$) (317).

Nuestros resultados, evaluados en medidas de tendencia central, han seguido el mismo patrón evolutivo para las diferentes categorías de estadificación incluso con una mediana de adquisición de adenopatías regionales para su análisis inferior a 12. A pesar de las recomendaciones sobre la extensión de la linfadenectomía y número de ganglios a estudiar, la estadificación pN definitiva sigue siendo un tema de controversia ya que su rendimiento está influenciado por el estadio pT global asociado y quizás nuevas aproximaciones como el mapeo de ganglio centinela junto con estudios de IHQ y PCR ayuden a mejorar su rendimiento (26, 42, 46).

Más del 35% de los pacientes diagnosticados fallecerá a los 5 años, y de ellos, el 8% en estadio I, del 13 al 18% en estadio II, y entre el 17 y 56% de pacientes en estadio III con un patrón de recaída, esencialmente sistémico, de predominio hepático, peritoneal y pulmonar (46), que confirman nuestros datos.

Otro análisis basado en la U.S National Cancer Database ha demostrado una supervivencia a 5 años del 59.8% para estadios IIIa, 42% para estadios IIIb y 27.3% para estadios IIIc con cáncer de colon (320).

El 40-50% de los pacientes en estadio III de enfermedad se curan con cirugía y hasta el 30% recaerán a pesar del tratamiento con QT; para estadio II las cifras se sitúan entre el 60-70% de curaciones y el 15-20% de recaídas (319, 321, 322).

Los criterios pronósticos convencionales no son por tanto suficientes para predecir la recaída de enfermedad en un paciente individual y/o su modulación por tratamiento adyuvante, debido a diferentes comportamientos evolutivos para estadios concretos del sistema TNM, ni se dispone de factores predictivos suficientemente contrastados de respuesta a tratamientos QT/BT para la enfermedad avanzada (73, 323). De hecho, la medicina personalizada requiere del desarrollo y aplicación de BMT tumorales pronósticos, predictivos y farmacodinámicos que faciliten las decisiones terapéuticas (319).

El carcinoma de colon incluye una serie heterogénea y compleja de enfermedades que se desarrollan por la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas facilitando la adquisición de características esenciales del cáncer, por lo que es previsible que tumores con perfil biológico similar se comporten de forma clínica parecida. Todas estas características y los eventos predecesores están siendo fuentes de nuevos BMT que ayudarán a identificar subtipos tumorales moleculares y comprender mejor la fisiopatología molecular de la enfermedad (323).

Los BMT más estudiados en la actualidad para cáncer de colon son las alteraciones adquiridas o somáticas de los tipos de inestabilidad genómica y su conocimiento deriva de estudios generadores de hipótesis fase I-II con una evidencia inicial limitada sobre su valor pronóstico (73).

El desarrollo de nuevos BMT ha dependido esencialmente del empleo de técnicas de bajo rendimiento para análisis de DNA, RNA y de proteínas frente a las tecnologías de alto rendimiento como matrices tisulares o de ácidos nucleicos DNA/RNA (21). Los estudios de proteómica, basada en anticuerpos monoclonales específicos fundamentados en la estrategia de aplicación de reactivos in situ tisulares o celulares, pueden demostrar la presencia y distribución espacial del BMT, preservan la integridad morfológica y son de fácil implementación en Servicios de Patología y Oncología Molecular (21, 324).

La disponibilidad de un Laboratorio que contaba con patólogos expertos en técnicas inmunohistoquímicas, su aplicación rutinaria en tumores sólidos e

investigación previa en proyectos de transferencia clínica junto con una amplia experiencia en los Servicios Clínicos Hospitalarios, nos hizo orientar nuestro estudio hacia la valoración de diferentes BMT por inmunotición en el cáncer de colon para conocer su implicación pronóstica.

Las seis características esenciales del cáncer (por *hallmarks of cancer*) son capacidades distintivas y complementarias que permiten el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica. Sirven de base para la comprensión de los complejos mecanismos fisiopatológicos moleculares de la enfermedad cancerosa y se les han incorporado dos más, reprogramación del metabolismo energético y evasión de la destrucción inmune en un mecanismo de *cross-talk* de reciente descripción (64, 325).

Por otro lado, los tumores que se desarrollan en un tejido concreto tienen cambios genómicos diferentes que definen cada neoplasia individual en términos del mecanismo molecular implicado (326). El crecimiento y supervivencia de algunas células cancerosas depende esencialmente de la activación de un oncogén único o *fenómeno de adicción oncogénica* que puede ser evaluado por las técnicas observacionales de tinción inmunohistoquímicas y que es el paradigma diagnóstico-terapéutico para la aplicación de diferentes fármacos anti-diana para tumores sólidos (326, 327).

Todas estas consideraciones clínicas y biológicas relacionadas con el CCR, junto con la introducción bibliográfica inicial, nos han servido como fundamento en el desarrollo y discusión de nuestro trabajo. Para cada uno de los BMT estudiados interpretamos los resultados obtenidos en el contexto de la hipótesis prefijada de partida y otros estudios relevantes comunicados en la literatura especializada en relación con metodología de análisis y rendimiento; relación con otros BMT como reflejo de la influencia sobre otros *hallmarks* de cáncer y mecanismos de *cross-talk*; correlaciones con los factores clínico-patológicos más relevantes; y, por último, el impacto pronóstico sobre la cohorte de pacientes tratada.

Comentarios sobre resultados del estudio.

Contextualización bibliográfica.

EGFR y su vía de señalización.

Las alteraciones del eje de señalización EGFR intervienen de forma decisiva en la carcinogénesis y progresión tumoral del CCR a través de su influencia en la regulación diferentes *hallmarks* de la enfermedad. EGFR se ha convertido en una de las dianas terapéuticas más estudiadas en el tratamiento de la enfermedad cancerosa y del CCR en particular. Su sobre-expresión parece ser un factor esencial en el comportamiento tumoral agresivo, pero su impacto pronóstico y valor predictivo de sensibilidad a fármacos o radiaciones ionizantes no ha sido completamente dilucidado. (86, 87, 89, 328).

Metodología y Rendimiento.

La expresión de EGFR en muestras tumorales se ha valorado mediante detección de amplificación génica, mutaciones y niveles elevados de transcritos mRNA o proteínas. El método más frecuentemente empleado ha sido la inmunotinción por IHQ aunque también se han comunicado estudios de valoración mediante Western blotting, FISH/CISH y ELISA (96, 328).

En nuestro trabajo sobre la expresión de EGFR mediante técnicas de IHQ y AcMo H11 en una cohorte de 123 pacientes con cáncer de colon hemos detectado sobre-expresión en el 44% de los casos (69 de 123 muestras) con porcentajes de score alto (+2/3) en el 25.21% (31 de 123 muestras).

En 17 estudios publicados entre 1990 y 2011 se ha analizado la expresión de EGFR en CCR por IHQ y los porcentajes de positividad varían entre el 30% hasta el 85% de los casos (Tabla nº 37) (97-109, 329-332). Nuestros hallazgos estarían en la línea de resultados sobre el 50%, comunicados en 7 estudios (97, 100, 102, 107, 109, 329, 330).

La diversidad en la expresión de EGFR se podría explicar por tratarse de estudios retrospectivos con cohortes de pacientes en diferentes estadios de enfermedad y localizaciones, tanto CCR como colon exclusivas, empleo de

diferentes anticuerpos como R1, 2-18C9, 113, 31G7, proveedores Dako o Zymed, y valoraciones de positividad dispares con puntos de corte diferentes, del 1-10% con scores de 0-3 y hasta >6. Los resultados de expresión con kit de Dako y puntos de corte >1% son sensiblemente superiores (59-85% vs 44%) a los encontrados en nuestra experiencia (97-109, 329-332).

El nivel de sobre-expresión de EGFR depende de la duración del almacenamiento de las secciones tisulares archivadas y en CCR no deberían exceder tiempos de lectura de 9 meses, para evitar falsos negativos, con unas condiciones de fijación específicas para el kit DakoCytomation EGFRpharmaDx (333). Los resultados de la expresión del EGFR por técnicas de IHQ con clones EGFRpharmaDx y 317G7 son similares con una correlación excelente entre el sistema de puntuación manual y automático (334).

Dos experiencias comunicadas en la literatura con kits de Ventana y Zymed parecen ofrecer el mejor rendimiento para valoración de EGFR, pero la ausencia de un sistema de puntuación bien definido hace aconsejable su correlación con amplificación de FISH para selección de tratamientos con cetuximab (335), ya que la valoración de EGFR por IHQ como test predictivo para la eficacia de AcMo puede ser inadecuada (328).

En cuanto a la expresión de EGFR en diferentes estadios de carcinogénesis CCR, se ha descrito que su expresión tumoral suele ser superior con respecto de la mucosa normal adyacente o adenomas a distancia (50 vs 40%) (97), similar entre la expresión en tumor primario y metástasis ganglionares y/o viscerales (109) con grado de concordancia del 40.4% (99) y no confirmado en otro estudio (105).

Correlaciones de EGFR con otros BMT.

En nuestra experiencia, la sobre-expresión de EGFR se ha relacionado de forma directa con TP53 positiva quizás debido a la puesta en marcha de mecanismos reguladores antiproliferativos; si bien, este dato no lo hemos podido contrastar en estudios similares publicados (97-109; 329-332).

No encontramos ninguna otra relación con los otros BMT estudiados. Sin embargo, se han comunicado correlaciones positivas entre la inmunexpresión de EGFR, expresiones altas de Cox-2, pKi-67 (103), TGF- α , MAPK y S6K (108) y de forma inversa con proteínas fosforiladas pAkt y pMAPK (109). Estos hallazgos pondrían sugerir mecanismos de intercomunicación *cross-talk* de proteínas estimuladoras de proliferación, sus ligandos y la regulación de adhesión celular e invasividad, pero no con activación de proteínas fosforiladas *downstream* activadas. No se han descrito relaciones con dinucleótido polimórfico *repeat (CA)_n DR* en el intrón 1 de EGFR, otros miembros de la familia Erbb por la expresión de Her-2 ni de IMS como mecanismo esencial de carcinogénesis (99, 102, 330).

La sobre-expresión de EGFR por IHQ se ha correlacionado con amplificación génica por FISH en el 58% de los casos (102); hallazgo no confirmado en otro estudio mediante técnica de CISH (105), lo que sugiere que ninguna de las dos técnicas son excluyentes entre sí debido a la inestabilidad de amplificación génica (Tabla nº 37).

Relación de EGFR con FCP convencionales.

En nuestro estudio hemos encontrado una relación estadísticamente significativa entre la expresión de EGFR (positividad y/o intensidad) para extensión pT e histología mucinosa que no se ha confirmado para el resto de los diferentes parámetros clínico-patológicos convencionales.

Análisis similares han sido efectuados en 13 estudios publicados entre 1990 y 2011 con diferentes cohortes de pacientes y metodología de análisis (Tabla nº 38) (97-100,102-104, 107, 108, 329-332). La expresión de EGFR en membrana se correlacionó con el grupo de pacientes con edad más avanzada (107) mientras que el sexo careció de significación estadística.

Las diferentes localizaciones del tumor primario y su tamaño no se han correlacionado con expresión específica de EGFR ni con elevaciones de CEA (104). La expresión EGFR con intensidad +3 y el grado de diferenciación tienen tendencia a la relación estadísticamente significativa (98); la frecuencia de

DISCUSIÓN

expresión a niveles altos de proteína EGFR es inferior para los tumores bien-moderadamente diferenciados con respecto a los indiferenciados (99) mientras que en otros dos estudios, la intensidad de tinción para EGFR es mayor en tumores indiferenciados y presencia de dediferenciación tumoral ó áreas de *budding* (330, 332).

La invasión extramural y perineural se han asociado de forma independiente con incrementos de porcentajes medios de EGFR celular +3 y los tumores mucinosos o de células en anillo de sello fueron generalmente tinción EGFR positiva +3 (98).

En nuestra experiencia, la edad, sexo, tamaño tumoral inicial y/o localización, grado de diferenciación, tipo histológico o ILV no fueron diferentes para expresión positiva de EGFR y/o scores altos ($p > 0.05$ para todos ellos). No se describe en la literatura referencia alguna a los tipos histopatológicos concretos.

Observamos en nuestro estudio una correlación positiva entre la expresión de EGFR y el nivel de infiltración tumoral pT ($p 0.04$) que no se confirmó para el resto de parámetros TNM. La sobre-expresión de EGFR es más frecuente para estadio tumoral pT3 que para más avanzados (pT3 85 vs pT4 59%; $p 0.006$) (104), pero también, para estadios IV vs menos avanzados (76 vs 58.8%; $p 0.06$) con scores de positividad +2-3 mayores (109). Tumores de colon con tinción intensa EGFR +3 se han relacionado más frecuentemente con estadio III vs II (87 vs 73%; $p 0.03$) (330). En 6 estudios no se ha encontrado relación entre sobre-expresión de EGFR y características clínico-patológicas convencionales (97, 100, 102, 103, 329, 331).

No podemos vincular su expresión con factores pronósticos convencionales, excepto para el nivel de invasión del tumor, por lo que parece que la expresión proteína EGFR podría comportarse como una variable de predicción evolutiva a considerar en ciertos contextos clínicos.

Expresión de EGFR y Relación Pronóstica.

En nuestro estudio no hemos demostrado un significado pronóstico de la expresión de EGFR en cáncer de colon esporádico ya que las diferencias para supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global no alcanzaron una significación estadística concluyente.

El valor pronóstico de la expresión de EGFR en CCR ha sido valorado en 10 estudios publicados entre 2001 y 2011 mediante técnicas de IHQ completadas con FISH/CISH en 2 estudios (Tabla nº 39) y en 6 de ellos se ha encontrado algún tipo de correlación positiva en el análisis de su implicación predictiva para intervalo libre de enfermedad o supervivencia global (98-101, 104, 106, 329-332).

La sobre-expresión de EGFR y/o intensidades de alto score (+2/3) en tumores de colon se correlacionan con incrementos de recaídas e ILEs inferiores con HR de 1.21 (p 0.042) y en los análisis multivariantes, EGFR se comporta como variable independiente para ambos parámetros intermedios (101, 106, 332). En nuestro estudio, la SLE no se ha visto influida por la expresión de EGFR (p 0.46; HR 1.32) ni por su intensidad alta +2/3 (p 0.70; HR 1.19)

La sobre-expresión de EGFR +2/3 o +3 en las regiones profundas de tumores de pacientes afectos de cáncer de colon en estadio IV se correlacionó con supervivencias sensiblemente inferiores (p 0.052) con respecto de porcentajes de inmunoreactividad bajos +1 o nulos (98). La supervivencia mediana de pacientes afectos de neo de colon con alto grado de expresión de EGFR ($\geq 2+$) fue de 4.5 años frente a los 5.5 años con tumores negativos o de baja expresión (100) y la sobre-expresión de EGFR es predictor de supervivencia inferior a 10 años o global (101, 106).

Estudios recientes en cáncer de colon han demostrado que las expresiones de EGFR con scoring alto se asocian con supervivencias inferiores a 5 años con porcentajes de 72.3% frente a 83.9% (HR 2.57, p 0.014) en tumores con expresión baja o ausente (330, 332). En los análisis

multivariantes, la intensidad de EGFR analizada como variable independiente se asoció con significación borderline (HR 1.15, p 0.086) con la supervivencia global en un modelo que incluyó edad, estadio tumoral, grado histológico y status de MMR (332) mientras que en otro estudio, el EGFR incrementado fue una variable independiente predictiva de supervivencia global inferior con HR de 1.53, p 0.029) (330).

No hemos podido demostrar diferencias de SG relacionadas con expresión de EGFR (p 0.55; HR 1.19) ni para diferentes scores de inmunotinción (p 0.14; HR 1.57). En otros 4 estudios no se ha descrito relación pronóstica alguna para la expresión de EGFR tanto para ILE como SG (99, 104, 329, 331).

Las evidencias actuales no permiten considerar EGFR como factor pronóstico en CCR y/o de colon a la vista de los resultados de nuestro estudio y la revisión de la literatura, debido a los resultados controvertidos y ausencia de estudios fase III, revisiones sistemáticas o meta-análisis. Para una correcta valoración del papel del EGFR como factor pronóstico en CCR y/o colon son necesarios estudios a gran escala que incluyan pacientes en diferentes contextos clínicos, metodología y cuantificación de positividad homogéneas con seguimientos a largo plazo.

Proteína Cox-2.

La disregulación de la vía Cox-2/PGE₂ parece influenciar la carcinogénesis colorrectal promoviendo el mantenimiento y progresión tumoral, facilitando la diseminación metastásica e incluso participando en los procesos de iniciación (336). A través de receptores EP, la PGE₂ activa múltiples vías de señalización intracelular que incluyen la transactivación de EGFR; activación de señales extracelulares reguladas por ERK, la transcripción de factores activadores proteína-1 y c-myc, y activación de β catenina dependiente de la transcripción de TCF (337) (Diagrama/Figura nº 4b). Numerosos estudios experimentales y clínicos han demostrado el papel de Cox-2 la carcinogénesis del CCR, posible valor como BMT pronóstico y/o predictivo y su modulación por inhibidores selectivos (338).

Metodología y Rendimiento.

Los resultados de nuestro estudio han demostrado sobre-expresión constitutiva de proteína Cox-2 por análisis de IHQ en cáncer de colon. La inmunoreactividad de proteína COX-2 citoplasmática con AcMo CK294 se observó en el 43.1% de tumores (53/123 muestras) y su nivel de expresión fue alto en el 22% (27/123 muestras).

La valoración de la expresión de Cox-2 se ha efectuado habitualmente mediante técnicas de IHQ aunque también por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real). La prevalencia de la inmunorreactividad de Cox-2 varía ampliamente desde 35.5 al 100% con la mayoría de los estudios con valores entre el 70-90% (123-133, 339-345) (Tabla nº 40). Nuestros resultados de sobre-expresión del 43% han sido inferiores aunque similares a otros estudios con porcentajes del 35.5 y 42.4% (340, 342).

Estas diferencias en la prevalencia de expresión quizás son debidas a diferentes circunstancias como los métodos de fijación tisular y procesamiento, variación en la recuperación antigénica, así como los anticuerpos monoclonales comerciales empleados. Quizás el factor más importante para esta diversidad de resultados pueda ser el sistema de evaluación de la inmunotinción positiva. El método más empleado es el sistema de puntuación semicuantitativo basado en el porcentaje de células teñidas y/o su intensidad de tinción, bien por valoración manual o análisis de imagen automatizado. Los puntos de corte para definir la positividad de expresión de Cox-2 tampoco son homogéneos y van desde porcentajes celulares > 10% a puntuaciones score \geq 2-3 por Cox-2 immunoreactivity score/IRS y unidades arbitrarias continuas (AU arbitrary units) con expresión de descriptores estratificados en cuartiles (123-133, 339-345).

La frecuencia e intensidad de tinción para Cox-2 se incrementa de forma sustancial desde la mucosa normal a adenomas, tumor primario, metástasis ganglionares y viscerales (124, 126, 130). Se ha descrito una fuerte correlación entre mRNA y expresión de proteína Cox-2 ($p < 0.002$) por lo que se puede deducir que la inmunoeexpresión es un buen marcador subsidiario de la expresión génica de Cox-2 (340). La expresión de mRNA Cox-2 en muestras

tisulares de CCR analizadas por ensayo de RT-PCR fue del 80% (28/35 casos) y del 31.4% (11/35 casos) en tejido normal (129). (Tabla nº 40). Son datos que indicarían la participación de Cox-2 en las diferentes fases de la carcinogénesis del CCR y su implicación en la progresión tumoral.

Correlaciones de Cox-2 con otros BMT.

En nuestra serie, no hemos encontrado una asociación significativa entre los tumores con expresión de proteína Cox-2 positiva y la expresión de EGFR, TP53, Ki-67 y p21^{waf1/cip1}. En otros estudios, los casos de expresión alta de proteína Cox-2 se han asociado con la sobre-expresión de EGFR (131) mientras que la relación ha sido negativa en otro estudio (342).

Tumores con expresión positiva de Cox-2 se han relacionado con porcentajes de fracción de células en fase S elevados medidos por citometría de flujo (124) mientras que tumores con alto índice de proliferación, valorado por la expresión de pKi-67, se relacionaron de forma negativa o inversa con Cox-2 (128, 131), por lo que no se puede confirmar influencia concreta de Cox-2 sobre la proliferación tumoral del CCR medida con estos BMT (Tabla nº 40).

Se puede deducir, por tanto, que los mecanismos de *cross-talk* entre diferentes proteínas proliferativas no han podido ser del todo demostrados, si bien algunos estudios van en esa línea, mientras que su expresión se relaciona con otros *hallmarks* de invasividad, angiogénesis y con ciertos aspectos de defectos de reparación de DNA o IMS.

La relación de la expresión de Cox-2 con el oncogén Her2/neu c-erb2 ha sido negativa en un estudio (128) y positiva en otro (342). En tres estudios no se han objetivado incrementos de expresión nuclear de p53 y/o expresiones de bajo nivel con la sobre-expresión de Cox-2 (127, 340, 341). La expresión de proteína Cox-2 positiva se ha relacionado con la densidad microvascular (por MVD) valorada por inmunotinción positiva a CD34 con valores superiores en más del 50% (123) y con la expresión tanto de VEGF como de MMP (132). Por último, la expresión de Cox-2 fue inversamente proporcional en tumores que expresaban MSS y CIMP-L (341).

La expresión positiva de Cox-2 en nuestro estudio se ha relacionado con expresiones de Ciclina D1, p27^{waf1/cip1} y pTS aunque no hemos encontrado evidencias en la literatura que confirmen estas observaciones.

Relación de Cox-2 con FCP Convencionales.

Numerosos estudios han evaluado la relación entre expresión de Cox-2 y las características clínico-patológicas en CCR (Tabla nº 41) (123-128, 130-132, 339-332, 345). La edad y el sexo de los pacientes no se han relacionado con la expresión de Cox-2 en ninguno de ellos (123-128, 130-132, 339-342, 345). Los porcentajes de expresión de Cox-2 fueron superiores en tumores localizados inicialmente en colon (124) o bien proximales vs distales (341).

Los resultados de algunos estudios han demostrado una correlación significativa entre expresión de Cox-2 y ciertos hallazgos patológicos desfavorables como tumor voluminoso (123, 130, 131), tumores indiferenciados (123, 125), incremento de profundidad de invasión (125, 130), infiltración linfocelular (127, 130), afectación ganglionar (130, 132, 345) y estadios TNM o Dukes avanzados (123-125, 130, 132, 342, 345).

Sin embargo, otros investigadores han encontrado que la expresión de Cox-2 se relacionó de forma inversa con el tamaño tumoral (131), grado de diferenciación bajo (131, 341, 342) y tumores en estadios más precoces (340). En nuestra serie, hemos encontrado una relación directa entre la expresión baja de Cox-2 (0-1+) para cada estadio global TNM ($p < 0.05$).

En nuestra experiencia no hemos podido demostrar una relación significativa entre la expresión de proteína Cox-2 estudiada por técnicas de inmunohistoquímica y características clínico-patológicas como edad, sexo, localización tumoral, tamaño, grado de diferenciación, invasión tumoral (categoría pT), afectación ganglionar (categoría pN) e infiltración linfocelular.

Estos hallazgos son similares a los resultados comunicados en tres estudios (126, 128, 339) y pueden ser el reflejo de la participación de Cox-2 en la fase de iniciación tumoral más que en la progresión del proceso de

carcinogénesis del CCR (339), si bien, este hecho no se puede concluir fehacientemente por la controversia que supone los datos no homogéneos recogidos en la literatura y su comportamiento como variable independiente.

Expresión de Cox-2 y Relación Pronóstica.

En nuestro estudio, la expresión de Cox-2 y/o sus diferentes niveles de expresión no se han relacionado con el curso evolutivo de la cohorte de pacientes analizada.

El valor pronóstico de la expresión de Cox-2 en CCR se ha estudiado esencialmente mediante técnicas de IHQ y ha sido evaluado en 15 estudios publicados entre 2000 y 2011 que han incluido 3539 pacientes (límites/estudio 100-747; todos > 100 pacientes) con enfermedad no metastásica en 7 estudios y estadios globales en 8 estudios (Tabla nº 42) (123-128, 130, 133, 339-345).

En tres estudios, la sobre-expresión de proteína Cox-2 se ha relacionado con ILEs inferiores en pacientes tratados con intención curativa (125, 343, 345) confirmándose como variable independiente desfavorable para desarrollo de recurrencias con ORR de 0.711 (p 0.045) y HR de 0.335 (p<0.05) (125, 345). Sin embargo, en otros dos estudios, la expresión de Cox-2 no se relacionó con la aparición precoz de recaídas y/o intervalos libres de enfermedad tanto en análisis uni o multivariantes con otras variables (133, 342); son hallazgos consistentes con los de nuestro estudio en el que no pudimos demostrar una relación positiva de expresión del BMT pCox-2 con porcentajes de recaída tumoral e ILEs diferentes.

La expresión de proteína Cox-2 se ha relacionado con pronóstico desfavorable en varios estudios ya que pacientes con tumores de expresión positiva tienen SGs inferiores comparadas con aquellos de expresión negativa (123, 130, 341, 343-345) comportándose como una variable independiente en los análisis multivariantes con RR 0.560-4.114 y p 0.0113-0.056 (130, 343).

En el análisis univariante de resultados de una cohorte de más de 600 pacientes en estadios I-IV TNM, la positividad de Cox-2 se asoció con un incremento no significativo de la mortalidad específica para cáncer de colon

(HR 1.37; p 0.17) mientras que en el modelo multivariante ajustado a otras variables pronósticas clínicas, patológicas y moleculares, positividad de Cox-2 se relacionó con un incremento significativo en mortalidad específica (HR 1.70; p 0.029) y un efecto significativamente adverso para Cox-2 positiva (p 0.04) en pacientes con tumores que no expresaron proteína p53 (341). En otro estudio a gran escala que incluyó 747 pacientes, los análisis univariantes y multivariantes demostraron una falta de relación entre la inmunexpresión de pCox-2 y la SGs y DFS de la serie estadiificada tras tratamientos quirúrgicos iniciales, independientemente del punto de corte para IRS-Cox-2, y tan solo la afectación ganglionar se comportó como una variable independiente (133).

En nuestra experiencia no hemos podido demostrar una relación significativa entre la expresión de proteína Cox-2 y/o sus niveles de expresión con la supervivencia de una cohorte de pacientes en estadios TNM I-IV. En 8 estudios publicados en ese mismo periodo de tiempo, la expresión de proteína Cox-2 determinada por técnicas de IHQ no se ha relacionado con la supervivencia de los pacientes tanto en enfermedad no metastásica como en estadios globales amplios incluidos 6 análisis multivariantes (124, 126-128, 133, 339, 340, 342).

No es posible establecer el valor de Cox-2 como factor pronóstico en el cáncer de colon y/o CCR por la falta de homogeneidad en los estudios comunicados debido al empleo de diferentes técnicas de medición, poblaciones heterogéneas y seguimientos diferentes. El desarrollo metodológico estandarizado implementado en estudios fase III es prioritario para definir el valor de Cox-2 como BMT pronóstico en este contexto clínico.

TP53.

La TP53 es el gen supresor de tumores más estudiado en la biología molecular de las neoplasias y la activación de su vía transcripcional constituye uno de los principales reguladores de las respuestas celulares a stress oncogénico. En la mayoría de los tumores sólidos incluido el CCR se han demostrado mutaciones y/o alteraciones de expresión proteica que han servido

de base para su estudio como factor pronóstico así como para otros aspectos terapéuticos de la enfermedad (140, 346).

Metodología y Rendimiento

En nuestro estudio observamos sobre-expresión de proteína p53 por IHQ y AcMo DO-7 en el 63.3% de las muestras de cáncer de colon analizadas, correspondientes a 78 de 123 pacientes y con score alto del 48.8%; estas cifras de rendimiento son similares a las comunicadas en la literatura (Tabla nº 43) con el empleo de técnicas de IHQ (101, 152-154, 155-157, 159-163, 246, 347-349) y que van del 37 al 63%, más del 50% en 12 estudios y para cáncer de colon exclusivo del 50 al 61% (101, 152, 153, 161, 163, 347).

En la identificación de inmunotinciones de pTP53 se han empleado esencialmente AcMo DO-7 o Pb-1801 (Tabla nº 43) (164) con valores de corte para positividad de expresión nuclear del >1% al >10%. El porcentaje de mutaciones para p53 descrito para estudios de PCR/secuenciación, técnicas SSCP o DDGE se sitúa entre el 20-60% (145, 147-152) y del 42% en la serie con mayor número de casos publicada (145). La sensibilidad y/o especificidad de la IHQ para la detección de sobre-expresión de TP53 con valores de $\geq 20\%$ como punto de corte, en comparación con la secuenciación/SSCP, está entre el 85 y 63% (152); así mismo, la secuenciación permite examinar mutaciones específicas y mejorar la capacidad discriminativa con TP53 nativa.

Correlaciones de TP53 con otros BMT

En nuestra serie hemos observado una correlación positiva entre la sobre-expresión de TP53 y de EGFR, confirmada para la discriminación por expresión alta. Con respecto de la pTS, su relación ha tendido a la significación pero no ha sido confirmada para expresiones altas. Ningún otro BMT se relacionado con la positividad de expresión de TP53.

Se han comunicado análisis de relaciones de TP53 con otros BMT en diferentes estudios mutacionales o de expresión de p53 por IHQ (Tabla nº 43) (147-149, 151-153, 156, 158, 161, 163, 246, 340, 347, 349, 351) que se detallan a continuación. La sobre-expresión y/o mutación de TP53 se ha

relacionado con positividad para K-ras (152) pero estos hallazgos no han sido confirmados por análisis mutacional así como tampoco su correlación con alteraciones de oncogenes Braf o APC (148, 149), lo que dificulta el entendimiento de su papel en los mecanismos de transformación y progresión tumoral. Pacientes con genotipo GSTP1 *wild type* suelen tener un riesgo menor para mutaciones de p53 (147), lo que sugiere la participación de polimorfismos específicos en las alteraciones moleculares de enzimas metabolizadores xenobióticos y su relación con factores diéticos específicos.

La sobre-expresión de TP53 se ha relacionado con expresiones altas de p27^{Kip1}, VEGF, pTS, pKi-67 y CA-IX (153, 156, 349, 351) pero no con expresiones de Cox-2 o p21^{waf1/cip1} (246, 340), es decir, con otros *hallmarks* característicos del CCR, facilitadores de disregulación de ciclo celular, síntesis/reparación de DNA y angiogénesis. No existe relación alguna con la expresión de Bcl-2 ni medidas de MCV (161, 163), no pudiéndose confirmar hipótesis previas sobre relación con ciertos parámetros de angiogénesis y/o apoptosis disreguladas.

No encontramos en nuestro estudio relaciones de expresión de TP53 con alteraciones de Cox-2, p21^{waf1/cip1} y/o p27^{Kip1}. Hemos observado una relación directa entre expresiones de TP53 y pTS (74%; p 0.030) confirmada en otro estudio (156). No hemos encontrado ninguna otra comunicación que confirme nuestro hallazgo de relación positiva con EGFR.

Mientras que las mutaciones de TP53 se relacionan con MSS-H (151) y expresión de hMLH1/hMSH2 (158), su sobre-expresión es mucho menos frecuente en tumores con MSI (152, 163, 347).

Relación de TP53 con FPC convencionales.

Hemos encontrado una relación estadísticamente significativa entre expresiones bajas de TP53 con localizaciones derechas y expresiones altas para tumores pN1-2 junto con una tendencia hacia la significación entre su sobre-expresión con edad inferior a 70 años y adenocarcinomas. Sin embargo, expresión de TP53 por inmunotinción no se relacionó con otras características

clínico-patológicas convencionales como sexo, grado de diferenciación, niveles de MT séricos y estadio pTNM global. Otros estudios han comunicado resultados similares (156, 150, 161, 163, 246, 350).

Ciertas características clínico-patológicas se han asociado con las alteraciones de TP53 en 17 estudios publicados entre 2004 y 2012 (145, 148, 150-152, 156, 157, 160, 161, 163, 246, 340, 347, 348, 30, 351) (Tabla nº 44). Mutaciones de TP53 y/o la sobre-expresión de proteína se ha relacionado con edad más avanzada (152, 340), al contrario que nuestros hallazgos, y sexo (152), localizaciones tumorales iniciales en colon distal o recto (153, 145, 160, 162, 347), similares a nuestro estudio, y no relacionadas con el tamaño inicial (145, 148, 150, 151, 156, 160, 161, 246, 340, 347, 348, 351).

La sobre-expresión de proteína TP53 ha sido más frecuente en tumores bien o moderadamente diferenciados en comparación con los indiferenciados (162, 351) y con grados de infiltración local (pT) o estadios más avanzados, (152, 347, 348, 351) como también se ha observado en los estudios que describen alteraciones mutacionales (148, 145, 151). En nuestra experiencia, las expresiones de score alto de TP53 (61.2%, p 0.025) se relacionaron con afectaciones ganglionares pN1-2.

Otros autores han comunicado una relación significativa entre las aberraciones de TP53 y características de mal pronóstico como infiltración linfo-vascular, afectación ganglionar tumoral y niveles de CEA sérico elevados (145, 157, 340, 348, 351), que no hemos podido documentar.

Expresión de TP53 y Relación Pronóstica.

En nuestra experiencia, la expresión de proteína TP53 por análisis inmunohistoquímica no ha condicionado el curso evolutivo de la cohorte estudiada de pacientes afectos de cáncer de colon ya que no hemos encontrado diferencias significativas relacionadas con recurrencia de enfermedad e intervalo libre de progresión ni supervivencia global.

En 18 estudios publicados entre 2004 y 2012 se ha evaluado el significado pronóstico de las mutaciones de TP53 o sobre-expresión de

DISCUSIÓN

proteína TP53 (Tabla nº 45) (101, 145, 149, 151, 153-157, 159-162, 246, 340, 347, 349, 350).

La sobre-expresión de proteína TP53 se ha relacionado con incrementos para recaída tumoral e intervalos libres de enfermedad significativamente inferiores en 5 estudios de cohortes de pacientes con cáncer de colon (101, 153) y/o tumores colorrectales (151, 156, 157) confirmándose como una variable independiente en análisis multivariantes en 4 de ellos con HR entre 2.76 a 8.1 (101, 151, 153, 157). Los ILEs en nuestro estudio no fueron diferentes para la sobre-expresión de TP53 (HR 0.99; p 0.97) ni para sus valores altos (HR 1.21; p 0.62).

La expresión de proteína TP53 se ha relacionado con cursos evolutivos desfavorables para CCR medidos a supervivencia global como punto final de valoración (Tabla nº 45). En diferentes cohortes de pacientes con cáncer de colon (101, 153) y CCR (159, 162, 340) el pronóstico para p53 positiva es significativamente desfavorable con HR entre 3.66 y 11.31, independientemente de la presentación clínica de la enfermedad no metastásica vs avanzada. Tanto las mutaciones de TP53 como su sobre-expresión se han mostrado como factores pronósticos adversos para supervivencia en CCR (151). Las alteraciones de TP53 se comportan como variables independientes de mal pronóstico en CCR, con supervivencias a largo plazo más limitadas y HR de 1.8-6.01 en varios análisis multivariantes, que confirman los datos previos (101, 151, 153, 340). Sin embargo, en dos estudios, la ausencia de proteína TP53 nuclear se asoció con supervivencias inferiores con HR entre 1.38 y 2.48 (154, 155).

En nuestra experiencia, la supervivencia de la cohorte de pacientes estudiada no fue diferente para sobre-expresión de TP53 (HR 1.08; p 0.81) ni para expresiones altas (HR 1.08; p 0.80). Otros estudios tampoco han confirmado la utilidad pronóstica de TP 53 y/o su expresión proteica por técnicas de IHQ (149, 160, 349, 350).

El significado pronóstico y predictivo de las mutaciones de TP53 ha sido evaluado por el TP53 Colorectal International Collaborative Group en 3582 pacientes con CCR divididos por localización tumoral y análisis de exones 4 al 8 por secuenciación. Las delecciones con pérdidas de aminoácidos se asociaron con supervivencias inferiores en tumores de colon distal; las mutaciones del exón 5 mostraron una tendencia a la significación estadística para supervivencia global en tumores de colon proximal, y el empleo de QT adyuvante mejoró el pronóstico para el grupo de de tumores en estadio Dukes C con TP53 wt y aquellos proximales con TP 53 mutada (145).

Una revisión sistemática publicada en 2005 investigó el efecto de las anomalías de la expresión del gen TP53 sobre el pronóstico de pacientes con CCR, valoradas bien por IHQ o análisis de secuenciación. El análisis de los datos de 168 estudios que incluyeron 18776 pacientes ha demostrado que globalmente los ptes con tumores que expresan TP53 alterada tienen un riesgo incrementado de muerte (RR para IHQ 1.32 vs análisis mutacional 1.31); el impacto adverso de TP53 anormal es mayor en pacientes con riesgo basal bajo de muerte (buen pronóstico RR/mutada 1.63 vs 1.04); no existe influencia alguna de TP53 alterada sobre la evolución de los pacientes tratados con QT, y se asocia con un fallo de respuesta a tratamientos radioterápicos (RR mutada 1.49) en pacientes con cáncer de recto. Por tanto, TP53 alterada condiciona el curso evolutivo de los pacientes con CCR en ciertas circunstancias (164).

Nuestro estudio no aporta un resultado positivo que nos permita incorporar TP53 en la práctica clínica habitual y por los datos bibliográficos, es difícil establecer su valor pronóstico salvo para análisis mutacional y para determinados contextos clínico-patológicos.

Marcador de Proliferación Ki-67.

La pKi-67 es un marcador de células tumorales en proliferación de uso habitual en Laboratorios de Patología. Estudios de inmunoscreening en library de expresión de cDNA, análisis de secuencia genómica, de células híbridas somáticas humanas-roedores e ISH han permitido describir su estructura proteica, sus propiedades, su gen codificador, localización y secuencias. Sin

embargo, no se ha avanzado de forma sustancial en el conocimiento de su función, más allá de la fosforilización vía serina-treonina, por falta de homologías con otras proteínas y la dificultad de manejo con las técnicas de Biología Molecular o Genética (171, 173, 174).

Se ha incorporado al arsenal diagnóstico de Linfomas y Tumores sólidos así como también en los análisis discriminativos de lesiones como melanomas, CIN, carcinomas basalooides y displasias asociadas a colitis ulcerosa. Su valor pronóstico ha sido contrastado sobre todo en linfomas no hodgkinianos, tumores de mama y próstata. La experiencia en CCR en este sentido ha estado limitada a unos pocos estudios con características heterogéneas y su relevancia no ha podido ser del todo definida. Su expresión en muestras tumorales puede ser evaluada por técnicas de IHQ en tejido fijado o bien por RT-PCR a nivel de pKi-67 mRNA e incluso ISH (171, 173, 174).

Metodología y Rendimiento.

La expresión de pKi-67 en nuestro estudio fue evaluada mediante técnicas de IHQ con Ac Mo de ratón antihumano clona MIB-1, con rendimiento por método semicuantitativo de positividad en 75 de 123 (61%) muestras tumorales con patrón de tinción nuclear y un 30% de expresión alta (+2-3).

Entre 1988 y 2012 se han comunicado 19 estudios retrospectivos sobre la expresión de Ki 67 en CCR (Tabla nº 46), todos ellos con más de 100 casos (límites 97-661) (154, 161, 175-185, 351-356). Los Ac Mo empleados fueron exclusivamente clonas Ki-67 y MIB-1, definiéndose su inmunexpresión con métodos semicuantitativos como Ki 67 index, LI, IP o MIB-1 index o bien puntos de corte >10% a \geq 50% (154, 175-184). Se han considerado positivities para porcentajes de inmunotinción nuclear exclusiva, entre 10-50% para alta expresión, con resultados de índices medios sobre el 50% (límites entre 23 y 79%) con tendencia de mayor expresión en estudios más recientes (161, 185, 351-356). Nuestro rendimiento es similar para expresión de positividad, algo menor para scores altos, pero en la línea de los estudios comentados.

La expresión de pKi-67 en tumor primario o metástasis suele ser similar y los índices Ki-67 en tejido tumoral son superiores a mucosa normal (178).

Correlaciones de pKi-67 con otros BMT

En nuestra serie hemos encontrado una tendencia a la correlación positiva entre la expresión de pKi-67 y pTS que no se confirmó cuando se discriminó para bajo vs alto grado; los índices de otros biomarcadores EGFR, COX-2, p53 y reguladores de ciclo celular, Ciclina D1, p21^{waf1/cip1}, TP53 no se asociaron con pKi-67.

Experiencias preliminares con un número escaso de casos han descrito una falta de relación entre la inmunotinción de pKi-67 positiva y valores de SPFs/PFs por Citometría de Flujo, mientras que los índices de proliferación tumoral determinados por expresión de pKi-67 y PCNA se correlacionaron significativamente entre sí (357). El pKi-67 index se relaciona de forma significativa con la expresión de mRNA evaluado por qRT-PCR y por tanto es un buen BMT subsidiario de alteraciones moleculares de proliferación (358). Por último, en un estudio comparativo se objetivó que las medianas de LI para diferentes métodos variaron significativamente con valores más elevados para LI Ki67 (42.5%) que para LI Brd Urd LI-IHQ/FCM (18.9-10.7%; p 0.0121) (359).

Se han descrito correlaciones estadísticamente significativas entre Lis Ki-67 y tinciones positivas para TP53 (161, 181, 184, 351) que no pudimos confirmar en nuestra serie, así como BMT de apoptosis Bcl-2 (184) y angiogénesis por cuantificación de MVC (161). Tumores con baja intensidad para pTS tienen una tendencia a inmunotinción alta de pKi-67 con dos métodos de cuantificación diferentes (181), a diferencia de la relación positiva de ambos BMT en nuestro estudio. La expresión de p27^{kip1} no se ha relacionado con Ki-67 LI (177), que tampoco nosotros objetivamos. Las correlaciones entre el índice de proliferación pKi-67 con la regulación master transcripcional, apoptosis, angiogénesis y apoptosis defectivas para los CCR están por dilucidar.

Se ha comunicado una asociación significativa entre índices altos de genes implicados en silenciamiento epigenético y regulación de ciclo celular como EZH2 e incremento de proliferación celular tumoral valorado por expresión de pKi-67 (352). La tinción positiva de pKi-67 fue más frecuente en casos con inmunotinción de Ubiquitina D independiente de su intensidad, lo que sugiere una correlación estadística entre expresión de UBD y pKi-67 así como su posible papel en la progresión de CCR por su implicación en alteraciones de apoptosis, ciclo celular y CIN (353). Las expresiones bajas de factor de transcripción mitocondrial mtTFA tienden a correlacionarse con índices de pKi-67 (356).

No hemos encontrado en la literatura estudios con suficiente número de pacientes que nos permitan comparar nuestros resultados al respecto de expresiones de EGFR, Cox-2, Ciclina D1 o p21^{waf1/cip1} así como tampoco orientaciones comparativas con otros índices de proliferación excepto un grupo que comunicó una correlación negativa débil entre el score pKi-67 y el número de figuras mitóticas (176) (Tabla nº 46).

Relaciones de pKi-67 con FCP convencionales.

En nuestra experiencia, la expresión de pKi-67 discriminativa no se ha relacionado con ninguna de las características clínicas o patológicas de valor pronóstico en CCR excepto de forma significativa con niveles de CEA normales y niveles de expresión bajos.

En 12 estudios publicados entre 1992 y 2010 (Tabla nº 47), la expresión de pKi-67 *labeling index* o scores se han relacionado con diferentes características clínico-patológicas convencionales (161, 176, 178, 180-183, 185, 351-353, 355).

La expresión de scores de pKi-67 altos se ha relacionado con pacientes de edades superiores a 70 años (181) pero no con sexo (161, 176, 178, 181, 182, 351-353, 355). Estos hallazgos no se confirmaron en nuestro estudio.

No se ha objetivado asociación alguna entre pKi-67 y localización inicial tumoral (161, 178, 181, 182, 351-353, 355) si bien niveles altos de pKi-67 son más frecuentes en tumores con tamaños iniciales superiores a 5 cm (182). En nuestra serie, no constatamos diferencias de sobre-expresión de pKi-67 tanto para localización, tamaño y estadio tumoral inicial.

Los tumores indiferenciados expresan niveles más elevados de pKi-67 o LI/scores frente a bien o moderadamente diferenciados (180, 182). La expresión de pKi-67 alta se relaciona con tumores indiferenciados (182, 355) y los LI Ki-67 de tumores mucinosos suelen ser inferiores frente a tumores bien diferenciados (180) sin relación alguna con la infiltración linfo-vascular tumoral (353). El grado de diferenciación, ILV y el subtipo histopatológico no influyeron para la expresión de pKi-67 en nuestra experiencia.

En dos estudios, los índices de pKi-67 elevados se han relacionado con estadios precoces Dukes A o TNM I frente a estadios más avanzados donde se encuentran infra-expresados (176, 185). Al contrario, en tres estudios, la expresión de pKi-67 o índices de proliferación altos son significativamente superiores para estadios pT o globales más avanzados (182, 183, 353).

En 4 estudios publicados en el mismo periodo de tiempo, no se han encontrado relaciones significativas entre la expresión de pKi-67 con características clínico-patológicas de las cohortes de pacientes analizadas en diferentes situaciones clínicas (161, 178, 351, 352). La percepción del comportamiento de pKi-67 como una variable independiente de los parámetros pronósticos convencionales fue un hallazgo similar en nuestro estudio.

Expresión de pKi-67 y Relación Pronóstica.

No encontramos una influencia significativa entre la expresión de pKi-67 y el curso evolutivo de una cohorte de pacientes heterogénea afectos de cáncer de colon, valorado por mediantes de ILE y SG, pero las expresiones bajas se han relacionado con supervivencias globales más prolongadas con una tendencia similar para la ILE.

En 15 estudios publicados entre 1992 y 2012 se ha analizado el papel pronóstico del pKi-67/MIB-1 labeling index/scores (Tabla nº 48) (154, 161, 176, 178, 179, 181-185, 352-356).

Los porcentajes de recaídas de enfermedad tras tratamiento quirúrgico más altos e ILEs más reducidos se han relacionado con índices de proliferación pKi-67 elevados (161, 178, 179, 353), excepto en un estudio donde los valores de pKi-67 $\geq 40\%$ se asociaron con incrementos de SLE en estadio II-III de pacientes con cáncer de colon y tratamientos con QT adyuvante (352). En dos análisis multivariantes, la expresión de pKi-67 se comporta como una variable independiente para SLE disminuida con HR entre 1.84 y 9.89 (179, 161) mientras que en otro, los índices de pKi-67 $\geq 40\%$ se asocian de forma independiente con SLE incrementada con HR de 0.55 (352). En nuestra experiencia, la mediana de SLE fue superior para expresiones bajas de pKi-67 con tendencia a la significación estadística (HR 2.03; p 0.065) que se confirmó en el análisis multivariante (HR 2.29; p 0.04).

La expresión de pKi-67 o valores con escores altos (Tabla nº 48) se ha relacionado con pronóstico desfavorable medido en SGs globales o causa específicas para CCR y de colon en concreto (178, 179, 182-184, 353, 355) excepto en un estudio donde valores de pKi 67 > mediana se asoció a supervivencia superior (154). La expresión de pKi-67 se comportó como una variable independiente pronóstica para supervivencias inferiores en 4 análisis multivariantes con HR entre 0.74 y 4.29 (161, 179, 183, 355). La supervivencia de nuestra serie fue significativamente superior para expresión baja de pKi-67 (HR 1.90; p 0.030).

La expresión de pKi-67 medida por técnicas de IHQ es un marcador útil de proliferación celular, su rendimiento es similar al de otros marcadores específicos considerados como *gold estándar* siendo un BMT fácil de efectuar, económico y reproducible. Los hallazgos contradictorios de correlación entre variables clínico-patológicas y curso evolutivo pueden ser el resultado de una marcada heterogeneidad de la expresión de pKi-67 en CCR, de metodologías

empleadas, sus contextos clínicos y porque no representa un evento carcinogénico per se sino que refleja el status de proliferación celular.

En definitiva, para la incorporación de pKi-67 en la práctica clínica diaria como parámetro básico o farmacodinámico se requieren metodologías estandarizadas, scoring homogéneos, análisis estadísticos potentes y valoración de índices de calidad inter-laboratorios así como su inclusión como puntos finales de investigación en estudios clínicos a gran escala con diferentes escenarios de enfermedad que permitan establecer su valor pronóstico y predictivo.

Estudio de los Reguladores del Ciclo Celular.

Expresión de proteína Ciclina D1.

Ciclina D1 está disregulada con frecuencia en tumores humanos y puede constituir un biomarcador de fenotipo canceroso y progresión de enfermedad. La función activadora de CDK4-6 es el mecanismo de acción mejor documentado en sus acciones oncogénicas (196).

Se han identificado más de 100 proteínas que interaccionan con Ciclina D1 en líneas celulares humanas, implicadas en el control del ciclo celular, regulación transcripcional, reparación de DNA, metabolismo de RNA, plegamiento proteico y organización de estructuras celulares. Por tanto, la alteración de Ciclina D1 en tumores no solo promueve la proliferación independiente de mitógenos sino que afecta a otras vías con consecuencias oncogénicas como angiogénesis, por activación de VEGF, duplicación centrosómica y respuesta a daño de DNA (196, 360).

Metodología y Rendimiento.

La activación de Ciclina D1 ha sido implicada en la carcinogénesis del CCR junto con otras alteraciones moleculares (193, 196, 200, 201, 361). Estudios preliminares demostraron que la proteína Ciclina D1 nuclear está sobre-expresada entre el 30-40% de los CCR y/o adenomas pero no en pólipos hiperplásicos y/o mucosa normal (362, 363).

En nuestro estudio hemos examinado la expresión de proteína Ciclina D1 en una cohorte heterogénea de carcinomas de colon mediante una técnica de IHQ para la que se eligió el AcMo DCS-6 de Dako, valoración con sistema de puntuación (score) semicuantitativo, punto de corte para positividad de >1% de células con tinción nuclear y score +2/3 para alta expresión. El 39% (48/123) de las muestras tumorales fueron positivas para tinción nuclear y la alta expresión +2/3 se evidenció en el 22% (22/123) de ellas.

Se han comunicado sobre-expresiones de Ciclina D1 del 46.5 al 83.2% (Tabla nº 49) mediante análisis inmunohistoquímico con diferentes AcMo, incluso con plataformas de TMA (Tissue Microarrays), valoradas por método semicuantitativo de forma habitual con porcentaje de células teñidas y/o intensidad de tinción con puntos de corte de > 1% a > 20% y scores entre +3-6; la mediana de positividad está sobre el 55% algo mayor que la obtenida en nuestro estudio (204, 205, 207-209, 364-367). Son resultados muy superiores a los logrados por otros autores que comunican rangos entre el 5.9 y 28.4% (184, 206, 211, 368). La sobre-expresión de Ciclina D1 de localización citoplásmica ha sido analizada en 2 estudios con rangos entre 31 a 41.3% e inferiores a expresión nuclear (184, 207).

Estos límites tan amplios pueden depender de las técnicas empleadas como AcMo diferentes (Bcl-1, DCS-6, P2D11F11, R124, SP4), estado del tejido de partida, sistemas de puntuación o *scoring systems*, valores para puntos de corte, localización de inmunotinción (nuclear y/o citoplásmica) y poblaciones estudiadas (cohortes con enfermedad no metastásica, grupos heterogéneos y enfermedad avanzada exclusiva. La positividad con técnicas y AcMo DCS-6 similares a la nuestra oscila entre el 5,9 y 83.2% quizás influidos por la heterogeneidad poblacional y material archivado del que se parte (205-207, 211, 365-367).

En 2 estudios se analizó la expresión del gen CCND1 por técnicas de RT-PCR con un 55% de copias génicas extra sin relación con la expresión proteica (202) y un 48.64% de expresión de gen CCND1 relacionado con expresión de proteína ciclina D1 (203). La sobre-expresión de mRNA Ciclina

D1 ha sido también analizada por RT-PCR con otros biomarcadores en tumores colorrectales avanzados (210).

Correlaciones de Ciclina D1 con otros BMT

En nuestro estudio, la sobre-expresión de Ciclina D1 se correlaciona positivamente con la expresión de Cox-2 y reguladores del ciclo celular, p21^{waf1/cip1} y p27^{kip1} pero no con expresiones de EGFR, pKi-67, TP53 ni pTS.

La sobre-expresión de Ciclina D1 se ha relacionado con tumores con alto índice de proliferación, valorado por niveles de positividad elevados de PCNA (204, 209), mientras que en otro estudio se observó una relación inversa entre expresión de Ciclina D1 citoplásmica y LI Ki 67 (205).

La Ciclina D1 se ha asociado con la expresión de CDKi p21^{waf1/cip1} y p27^{kip1} (207, 209, 211, 364) que confirmarían el papel regulador negativo del ciclo celular de estas proteínas pero no con TP53 (206) como sería de esperar por su función facilitadora de estabilidad genómica. Los hallagos de nuestro estudio confirman estas observaciones.

Expresiones elevadas de Ciclina D1 se han asociado con tumores tipo MSI-H, CIMP-H (CpG island methylator phenotype) (364) y mutaciones de gen Braf (364, 365). Por último, la activación de p-Stat5 se ha relacionado con expresiones elevadas de Ciclina D1 (366) (Tabla nº 49).

Son observaciones que parecen confirmar la relación del promotor de progresión de ciclo checkpoint Ciclina D1 con índices de proliferación y la expresión de reguladores negativos, expresiones más frecuentes en tumores con IMS y/o con fenotipo mutador, y activadores transcripcionales.

Relación de Ciclina D1 con FCP convencionales.

En nuestra experiencia, la expresión de Ciclina D1 o sus niveles discriminativos no se ha relacionado con parámetros clínico-patológicos pronósticos convencionales; hallagos que han sido confirmados por otros autores con series de pacientes y contextos similares (178, 202, 208, 365, 366)

La expresión de proteína Ciclina D1 y/o expresión génica de CCND1A ha sido analizada con respecto a la información clínico-patológica detallada disponible para pacientes afectados de CCR en 14 estudios publicados entre 1997 y 2011 (Tabla nº 50) y se han descrito diferentes relaciones (178, 202-205; 207-209, 211, 364-368).

En términos de edad de presentación, los pacientes con niveles bajos de Ciclina D1 tumoral fueron más jóvenes (66 vs 70 años; p 0.042) para puntos de corte $\geq 5\%$ (212) y fracción (266) sin diferencia alguna para sexo (178, 203, 207-209, 364-366, 368). La expresión positiva de Ciclina D1 se ha asociado con localizaciones tumorales proximales o de colon derecho (205, 207, 364) y tumores indiferenciados en comparación con bien diferenciados (205, 207) pero no con su tamaño inicial. Las diferencias demográficas, de localización tumoral inicial y grado de diferenciación en nuestro estudio no se han relacionado con expresión de Ciclina D1. Los tumores con niveles altos de Ciclina D1 citoplásmica tuvieron menor infiltración linfocitaria en el margen invasivo (205) y diferenciación mucinosa (211).

La sobre-expresión de Ciclina D1 nuclear, citoplásmica y génica CCND1 se ha asociado de manera significativa con infiltración linfo-vascular tumoral y estadios avanzados de enfermedad tanto por clasificación TNM o por el sistema de Astler-Coller (203, 204, 211, 364, 367) que no evidenciamos en nuestra experiencia.

La tendencia a la significación estadística que encontramos entre expresiones bajas de Ciclina D1 y cifras de CEA sérico normal no ha sido previamente comunicada en la literatura revisada y podrían expresar su falta de relación con una supuesta carga tumoral alta y/o enfermedad subclínica.

Expresión de Ciclina D1 y Relación Pronóstica.

Un objetivo final del estudio ha sido examinar la relación entre la expresión de proteína Ciclina D1 y el curso evolutivo de pacientes con cáncer de colon en estadios I-IV. Nuestros resultados indican que la positividad o expresión proteica o niveles altos no se asocian con pronóstico desfavorable ni

para porcentaje de recaídas, ILE ni SG. Otros 2 estudios han confirmado la falta de relación pronóstica de ciclina D1 (202, 211).

La posibilidad de recaída de enfermedad en pacientes tratados mediante cirugía con intención curativa ha sido analizada en tres estudios (Tabla nº 51). La SLE para los pacientes con tumores Ciclina D1 nuclear positiva (+2) fue significativamente inferior en relación con niveles bajos (+1) o ausencia de expresión (36 vs 91-79%; p 0.01); el efecto de otras variables presumiblemente asociadas con ILE fue estudiado por análisis multivariante mediante el modelo de Cox y las metástasis ganglionares se comportan como el factor predictivo más importante seguido de profundidad de invasión tumoral, status de ciclina D1 y TP53 (204). La SLE fue inferior para pacientes con estadio tumoral B de Dukes y Ciclina D1 citoplásmica positiva (p 0.024) sin confirmar en el análisis multivariante (178). En otro estudio no se pudo establecer una relación estadística significativa entre el riesgo de recaída y la expresión de proteína Ciclina D1 (211). La sobre-expresión de Ciclina D1 o sus valores altos no influyó en los ILEs de nuestra serie (HR 1.96-0.71; p 0.65-0.48), tendencia confirmada en el análisis multivariante.

La influencia de la expresión de proteína Ciclina D1 sobre la supervivencia de pacientes afectos de cáncer colorrectal en diferentes escenarios clínicos ha sido evaluada 9 estudios (Tabla nº 51) con resultados diferentes (178, 184, 205, 207, 209, 364-367).

La sobre-expresión de Ciclina D1 nuclear y citoplásmica se ha relacionado con cursos evolutivos favorables, medidos en supervivencias globales y causa específica, para CCR y tumores de colon, estadios Dukes B y sobre todo en varones (184, 205, 207, 364, 367); su valor pronóstico estadísticamente significativo tan solo ha sido confirmado en dos análisis multivariantes con HR entre de 0.47 y 0.57 (207, 364).

En un estudio que incluyó mas de 600 pacientes, la probabilidad de supervivencia específica de cáncer de colon a 5 años en los pacientes con tumores Ciclina D1 positivos fue mayor (83 vs 73%; p 0.006) y en el modelo

multivariante de Cox ajustado para predictores potenciales de evolución, se asoció con mortalidad cáncer específica (HR 0.57; IC95%: 0.39-0.84) y mortalidad global (HR 0.74; IC 95%: 0.57-0.98 p 0.0369) significativamente inferiores, de manera independiente de las características clínico-patológicas convencionales y otras variables moleculares como TP53, p21, p27, K-ras, Braf, metilación de LINE-1, IMS y CIMP (364).

Similar comportamiento se ha comunicado en una cohorte completa de 527 pacientes con cancer de colon, en los cuales la sobre-expresión de Ciclina D1 se asoció con supervivencia causa-específica prolongada (hazard ratio (HR) 0.69, p 0.026), más acentuada en el subgrupo de varones (HR 0.48, p < 0.001); pero su valor pronóstico no se confirmó en el análisis multivariante (367) y los autores sugieren una posible hormono-dependencia de la enfermedad.

Sin embargo, en tres estudios se ha descrito un valor pronóstico desfavorable para la expresión de Ciclina D1, con supervivencias globales significativamente inferiores que no pudieron ser confirmadas en los modelos de análisis de Cox (178, 365, 366).

En otros tres estudios no se demostraron diferencias pronósticas significativas relacionadas con la sobre-expresión de proteína Ciclina D1 (202, 210, 211). Observamos la misma ausencia de comportamiento discriminativo ya que la supervivencia global de nuestros pacientes no se ha visto influenciada de forma significativa con la sobre-expresión o sus valores altos en el análisis univariante (HR 1.20-0.86; p 0.53-0.86) ni en el modelo de Cox.

No es posible establecer conclusiones definitivas sobre el papel de la expresión de Ciclina D1 determinada por IHQ como BMT de valor pronóstico en el manejo del CCR, bien derivadas de nuestro estudio ni de los datos de la literatura ya que se basan en estudios esencialmente retrospectivos, con número variable de pacientes incluidos, diferentes contextos clínicos y localizaciones anatómicas iniciales, técnicas diferentes con rendimientos dispares y seguimientos no homogéneos. Los dos estudios a gran escala son retrospectivos e incluyen contextos clínicos de pacientes diferentes, si bien, la

percepción es de un valor pronóstico favorable para la sobre-expresión del BMT. Carecemos de estudios fase III prospectivos a gran escala y de meta-análisis que faciliten evidencias con gran fortaleza estadística de su papel discriminador sobre el curso evolutivo de la enfermedad.

Regulador del Ciclo Celular p21^{waf1/cip1}.

El CKIs p21^{waf1/cip1} es un regulador negativo del ciclo celular fase G1 dependiente de TP53 que actúa por inhibición de la actividad de los complejos ciclina/cdk2 y bloqueo de la síntesis/reparación del DNA por unión a PCNA. Su regulación está alterada en cánceres humanos pudiéndose comportar como gen supresor tumoral u oncogén debido a su configuración estructural especial y localización subcelular (219-221, 369-371).

La actividad supresora tumoral se fundamenta en su papel de inductor de detención de crecimiento, diferenciación y senescencia celulares. p21^{waf1/cip1} es efector *master* de vías supresoras tumorales múltiples que promueven numerosas actividades antiproliferativas por regulación de expresión génica directa a través de interacciones proteicas independientes de CDKs y PCNA. La transcripción estabilidad, localización celular y, por tanto, la actividad de p21^{waf1/cip1} está regulada por múltiples factores de transcripción, ligasas ubiquitina, y proteína cinasas. p21^{waf1/cip1} inhibe apoptosis mediante acción sobre ciclo celular ya que permite síntesis y reparación de DNA dañado, unión a Ask1 (por apoptosis signal-regulating kinase 1), interacción con moléculas pro-apoptóticas como procaspasa 3 o caspasa 8 o por inducción de parada de ciclo celular al unirse a complejos ciclina E/cdk2 y ciclina A (219-221, 369-371).

En otros contextos, induce fenómenos pro-apoptóticos en respuesta a fármacos como cisplatino y 5 fluorouracilo, incremento de expresión de Bax, antagonización de bcl-2 e IL-3 dependiente. Estudios recientes sugieren un papel oncogénico de p21^{waf1/cip1} en ciertos contextos por su papel anti-apoptótico y facilitador del ensamblaje ciclinas D-cdk4-6 (219-221, 369-371).

La disregulación de p21^{waf1/cip1} se observa con frecuencia en una gran variedad de tumores humanos pero las mutaciones de regiones codificantes del

gen CDKN1A son muy raras; no obstante alteraciones genéticas y/o epigenéticas por hipermetilación de regiones ricas en G:C en su promotor cercanas al lugar de inicio de transcripción e incluso de sus reguladores TP53 y c-Myc son hallazgos muy comunes (218, 224, 233, 234).

Metodología y Rendimiento.

Los resultados de nuestro estudio han documentado expresión positiva de p21^{waf1/cip1} de localización nuclear del 20% analizado por técnicas de IHQ con AcMo murino anti p21^{cip1/waf1} humano clon SX 118 en 123 casos de cáncer de colon en diferentes estadios de enfermedad I-IV clasificación TNM.UICC con predominio abrumador de baja expresión (score 0-1) hasta en el 92% de ellos.

La expresión de proteína p21^{waf1/cip1} ha sido evaluada por técnicas de IHQ en 16 estudios publicados entre 1997 y 2011 (Tabla nº 52) (154, 208, 209, 236-240, 242-246, 372). La sobre-expresión mediana se sitúa en torno al 50% con límites tan amplios como 21 a 68% y en 7 estudios los valores porcentuales superan el 50% (límites 50-80%) (236, 237, 240, 242, 245, 372).

Nuestros hallazgos son similares a los publicados por otros autores con sobre-expresión de p21^{waf1/cip1} entre el 21 y 47% (154, 208, 209, 237, 239, 241, 243, 246, 247). Quizás estos resultados tan dispares están condicionados por las diferentes cohortes de pacientes incluidas, muestra tumoral de partida, metodología de estudio, diferentes AcMo (Sc187, EA10, NCWAF 1, 4D10, CP74, SX118), puntos de corte para positividad (entre >1% y >20%) y sistemas de puntuación (scores de +3 a +7).

Correlaciones de p21^{waf1/cip1} con otros BMT.

En nuestro estudio la expresión positiva o alta de p21^{waf1/cip1} se relacionó de forma significativa con la expresión de ciclina D1 pero no con expresiones de EGFr, Cox-2, TP53, pKi-67, p27^{kip1} o pTS. Expresiones positivas o altas de proteína p21 se han relacionado con expresión de Ciclina D1 (209), de forma similar a nuestros hallazgos; estos hallazgos indicarían la puesta en marcha de un regulador negativo de ciclo celular ante la presencia de promotores de la proliferación tumoral. No hemos encontrado datos en la literatura de la relación

entre p21^{waf1/cip1} y expresiones de EGFR, Cox-2, p27^{kip1}, pKi-67 o pTS con casuísticas superiores al menos de 100 casos.

La relación de p21^{waf1/cip1} con otros biomarcadores ha sido evaluada en 12 estudios publicados entre 1997 y 2011 (Tabla nº 52) (208, 209, 236-239, 242, 243, 245-247). La ausencia de expresión de proteína p21^{waf1/cip1} o sus niveles de expresión bajos se correlacionan de forma inversa con la expresión de proteína TP53 o mutada por análisis de IHQ o SSCP (208, 236-239, 241), en tres estudios no se halló asociación alguna (243, 245, 246) y en uno se relacionó de forma significativa con la sobre-expresión de TP53 ($p < 0.0001$) (247). Se han comunicado correlaciones inversas con expresión de Ciclina D1, bcl-2, MSI-H, CIMP-H o mutaciones de gen Braf y PI3KCA (208, 238, 242).

Estudios experimentales han demostrado que la expresión de pTS está sobre-regulada en células HCT116 de CCR humano y que la actividad del promotor de TS está infra-regulada por expresión ectópica de p21^{waf1/cip1}. La sensibilidad a 5FU de células de CCR en cultivo se incrementa con la reducción de pTS inducida por CDKi (370). Por otro lado, las señales activadas por estrógenos/progesterona dan lugar a efectos de inhibición de crecimiento de células de cáncer de colon por sobre-expresión de numerosos reguladores de ciclo celular.

Relaciones de p21^{waf1/cip1} con FPC convencionales.

Nuestros datos no han revelado correlación alguna entre la sobre-expresión de proteína p21^{waf1/cip1} y edad, sexo, localización inicial tumoral, tamaño, clasificación WHO histopatológica, grado de diferenciación, ILV, BMT séricos y estadio TNM UICC, por lo que parece comportarse como una variable independiente.

La relación entre la expresión de p21^{waf1/cip1} alterada y diferentes características clínico-demográficas y parámetros pronósticos convencionales ha sido valorada en 12 estudios publicados entre 1997 y 2011 (Tabla nº 53) (208, 209, 236, 238, 239, 240, 243-247, 372).

DISCUSIÓN

Ni la edad ni el sexo de los pacientes se ha relacionado con expresiones anómalas de p21^{waf1/cip1} (208, 209, 238, 240, 243, 245-247, 372), pero sí con comorbilidades como obesidad valorada por IMC (247). Los datos demográficos y sus relaciones no fueron diferentes para expresión de p21^{waf17cip1} en nuestra cohorte de pacientes.

En la mucosa intestinal normal, la inmunoreactividad de p21^{waf/cip1} se ha observado en los núcleos del 1/3 superior de las criptas del epitelio superficial, en adenomas sobre las áreas superficiales de la subvariedad tubular y en el fondo de las papilas de los vellosos (236, 239). La incidencia de expresión intensa de p21^{waf1/cip1} es muy superior en tumores primarios que en adenomas y/o adenocarcinomas derivados de adenomas (236) pero sensiblemente inferior para estadios avanzados, lo que podría indicar su participación en la progresión del CCR, asociación con senescencia de la mucosa del colon y su inducción por una vía independiente de TP53. Su expresión es más frecuente en aquellos tumores con diferenciación mucinosa (245).

La sobre-expresión de p21^{waf1/cip1} fue superior en tumores de localización proximal o de colon frente a tumores rectales (209, 238, 246) mientras que en otro estudio los tumores derechos expresan porcentajes inferiores (208). Los tumores con alto grado de expresión de p21^{waf17cip1} fueron de forma significativa mayoritariamente bien diferenciados en un estudio (243) mientras que en otro, la ausencia de p21^{waf17cip1} se relacionó con grados tumorales bajos (247); en ocho estudios no se constató relación alguna entre estas variables, (208, 209, 238-240, 245, 246, 372) que confirman nuestras observaciones.

La inmunoreactividad positiva para p21^{waf17cip1} en intensidad, porcentaje o scores moderados ó altos se ha relacionado de forma inversa con el estadio tumoral de los pacientes. Su ausencia o porcentajes de expresión bajos es significativamente más frecuente para niveles profundos de invasión tumoral, metástasis ganglionares y estadios TNM III-IV o C-D de Astler-Coller (208, 236, 238, 239, 243, 372); en 5 estudios no se encontró correlación alguna entre estas variables (209, 238, 245-247).

En un estudio no se ha encontrado relación alguna entre expresión de p21^{waf1/cip1} y ningún parámetro clínico-patológico convencional (240) en la línea de nuestros hallazgos.

Expresión de p21^{waf1/cip1} y Relación Pronóstica.

En nuestro estudio no hemos encontrado relación alguna entre la sobre-expresión de p21^{waf1/cip1} por técnicas de inmunohistoquímica y el curso evolutivo de una cohorte heterogénea de pacientes con cáncer de colon estadio I-IV, una vez valoradas la SLE y la SG de la serie como puntos finales de medida.

La relación entre la ausencia de expresión de p21^{waf17cip1} y el pronóstico en diferentes contextos clínicos de pacientes con CCR ha sido evaluado en 12 estudios publicados entre 1999 y 2011 (Tabla nº 54) con resultados no concluyentes (154, 208, 209, 238-241, 244-247, 372).

La sobre-expresión de proteína p21^{waf17cip1} en CCR se ha relacionado con un índice de recaídas inferior e ILEs mucho más prolongados que en aquellos casos con ausencia de expresión o scores bajos (238, 239, 246, 372); estos datos fueron confirmados en tan solo un análisis multivariante su valor predictivo independiente para recaída e ILE con un HR de 0.97 (239). Por el contrario, la ausencia de expresión de p21^{waf17cip1} se asoció con mejor ILE para el análisis de log rank test (246). Los ILEs en nuestro estudio no fueron diferentes (HR 1.12; p 0.80) para sobre-expresión de p21^{waf1/cip1}.

Se ha encontrado una relación significativa entre la sobre-expresión de proteína p21^{waf1/cip1} e incrementos de supervivencia específica de CCR y/o global en diferentes contextos de pacientes con CCR (154, 208, 238-240, 244, 246, 372); datos no confirmados en un estudio que consideró a p21^{waf1/cip1} como variable de análisis aislada, mientras que otros autores han comunicado una mejor SG para pacientes con tumores que no la expresan (246).

En cuatro análisis multivariantes se ha constatado que la expresión positiva de p21^{waf1/cip1} ejerce una influencia positiva independiente sobre la SG de forma aislada o ajustada para otras variables pronósticas convencionales

para HR de 0.97-3.06 (239, 240, 247, 372). La pérdida de p21^{waf1/cip1} se asoció de forma independiente con baja mortalidad específica por cáncer de colon con HR de 0.58 ajustado a variables como MSI, CIMP y LINE-1, con diferencias para la edad < 60 años con HR de 4.09, y el pronóstico adverso valorado por IMC se limitó a casos que expresaban p21^{waf1/cip1} con HR de 5.85 (247). La supervivencia es más prolongada para pacientes en estadio B2-C de Astler-Colles tratados con QT adyuvantes que expresan p21^{waf1/cip1} nuclear (372).

La ausencia de valor pronóstico de sobre-expresión de p21^{waf1/cip1} encontrada en nuestra experiencia (HR 0.94, p 0.86) ha sido compartida por otras series publicadas con cohortes de pacientes, técnicas de valoración y análisis similares (154, 208, 209, 238, 241, 244, 245) no pudiéndose concretar su incorporación como factor pronóstico molecular a las guías de manejo del CCR ya que los estudios a gran escala y no prospectivos han sido todos ellos negativos (241, 244, 247).

Regulador de Ciclo celular p27^{Kip1}.

La expresión de p27^{Kip1} se encuentra alterada en los procesos de carcinogénesis de la mayoría de los tumores humanos más prevalentes. Mientras que las mutaciones que afectan al gen CDKN1A son muy infrecuentes, se han descrito numerosas alteraciones en su metabolismo que incluyen reducción de los niveles proteícos por proteólisis acelerada o traslación del transcrito anormal, secuestro en los complejos ciclina D-CDK y relocalización citosólica celular. Las alteraciones de p27^{Kip1} se han correlacionado con un peor pronóstico y respuestas deficientes a tratamientos convencionales (256, 373). Se han comunicado disminuciones en la sobre-expresión de proteína p27^{Kip1} por inmunotinción en linfomas y tumores sólidos, sin cambios en niveles de mRNA y que puede ser atribuida a proteólisis acelerada, inhibición de la traslación mediada por miRNA o ambos procesos (256, 373-375).

Metodología y Rendimiento.

Hemos estudiado de forma retrospectiva el status de la proteína p27^{Kip1} en una cohorte de 123 pacientes afectos de cáncer de colon en estadios I-IV con técnicas de IHQ y AcMo SX53G8 valorado con una escala semicuantitativa. La expresión nuclear positiva de p27^{Kip1} en nuestra experiencia fue del 37.4%, con puntuaciones altas (score 2-3) en el 30.9 % de los tumores.

La sobre-expresión de p27^{Kip1} ha sido evaluada mediante técnicas de IHQ en 22 estudios publicados entre 1997 y 2012 (Tabla nº 55) que han incluido cohortes heterogéneas de pacientes. La expresión de proteína p27^{Kip1} en diferentes series ha variado desde el 13 al 90% con diferentes tipos de AcMo, puntos de corte y puntuaciones (153, 155, 209, 269-282, 376-379).

La inmunotinción nuclear exclusiva para p27^{Kip1} con scores 0-2, definidos por porcentaje de células teñidas con puntos de corte entre >1-25% para positividad, se sitúan entre el 13 y 86% (153, 155, 209, 269, 270, 275-278, 280-282, 376, 378, 379). Las valoraciones positivas nucleares y citoplásmicas van del 20 al 70-90% (209, 268, 271, 274, 275, 278, 377) y la inmunotinción citoplásmica exclusiva se constata en el 49% (273, 275, 278).

Sistemas de puntuación con scores basados tanto en intensidad como porcentaje celular de 0-2, y más elaborados de 0-8, sitúan valores altos de expresión entre el 62 y 70% (275, 280). La expresión nuclear de p27^{Kip1} se ha valorado en un TMA junto a otros BMT mediante un método semicuantitativo por número relativo de células positivas tumorales con scores porcentuales sucesivos al 5% y análisis de curvas ROC/AUC con valores del 0.853 (IC 95%: 0.504-0.661) (281).

Con el empleo de AcMo Dako SX53G8 las valoraciones positivas están entre el 46 y 52% (153, 272, 273, 278), algo superiores a las de nuestro estudio, quizás debido a que los bloques tumorales antiguos pueden tener una calidad reducida de tinción para p27^{Kip1} (276). Para otros AcMo como clon 57, K25020, IB4, F8, DCS72, clon 57), los rangos oscilan entre el 13 y el 80% con mediana aproximada del 50% (209, 268-271, 274, 275, 280, 282, 376, 378).

Correlaciones de p27^{Kip1} con otros BMT.

En nuestra experiencia, la ausencia de expresión de p27^{Kip1} nuclear se asoció de forma significativa con falta de expresión de Cox-2 y Ciclina D1, mientras que la asociación para niveles bajos de expresión tan solo se mantuvo para baja expresión de Ciclina D1. No encontramos ninguna relación con la expresión de EGFR, TP53, Ki-67, p21^{waf1/cip1} ni para pTS.

La expresión de p27^{Kip1} se ha correlacionado de forma significativa con Ciclina D1 en tumores colorrectales primarios (209), tumores con MSI, alteración de la expresión de Mlh1, Msh2 o Fhit (277) y cohortes de pacientes tratadas con hormonoterapia sustitutiva (280) por lo que se intuye su participación activa en la vía genética de IMS para el desarrollo de ciertos CCR. La sobre-expresión de p27^{Kip1} se ha relacionado de forma inversa con tumores que expresan Cox-2, p21^{waf1/cip1}, TP53, MSI-H, CIMP-H, mutación de Braf (279, 377) y por ubiquitina ligasa subunidad 2 SKP2 (378), como mecanismo de regulación negativa de ciclo celular por estímulos oncogénicos, fallos de regulación genómica y degradación proteasómica.

En tres estudios no se objetivó relación alguna entre p27^{Kip1} y expresión de IA (por apoptotic index), pKi-67, TP53 (270, 272, 275), p73 y DCC (272). No hemos encontrado ningún dato en la literatura de correlación entre expresión de p27^{Kip1} y EGFR o pTS (Tabla nº 55). Su papel regulador negativo de ciclo celular y sobre-expresiones de BMT relacionados con proliferación y control genómico no queda definitivamente demostrado por los resultados de estudios comentados.

Relación de p27^{Kip1} con FCP convencionales.

En nuestro estudio, no hemos encontrado relación alguna entre la expresión de p27^{Kip1} y cualquiera de las variables clínico-demográficas o patológicas analizadas, edad y/o sexo, localización inicial tumoral, tamaño, grado de diferenciación, ILV y/o estadio tumoral.

En 12 estudios publicados entre 1999 y 2009 se han analizado las relaciones de la expresión de p27^{Kip1} y los FCP convencionales (Tabla nº 56) (153, 209, 269-272, 275-278, 282, 377) con resultados controvertidos.

La edad al diagnóstico de los pacientes no se ha relacionado con p27^{Kip1} en 10 estudios (153, 209, 269-272, 275, 276, 282, 377) mientras que la ausencia de expresión de p27^{Kip1} se ha relacionado con un predominio de pacientes de sexo femenino en un estudio de cohortes para cáncer de colon, localización de la expresión del BMT y IMC (377). Tumores de localización proximal se han asociado significativamente con expresiones bajas o ausentes de proteína p27^{Kip1} en tres estudios (275, 277, 377) y en uno de ellos tan solo en estadio III (275); esta relación no ha sido demostrada para medidas de tamaño inicial (153, 270, 275, 276).

Mientras que la ausencia de expresión de p27^{Kip1} se ha relacionado con tumores indiferenciados (269, 277) o tumores indiferenciados circunscritos a estadio II (275), en otros estudios, la expresión positiva o elevada, se ha relacionado con tumores predominantemente bien diferenciados (276, 377). La mediana de expresión de p27^{Kip1} fue superior en tumores con infiltración linfática o venosa (270) y su ausencia se ha relacionado con diferenciación histológica mucinosa (277, 282).

La expresión ausente o baja de p27^{Kip1} se ha correlacionado con estadios tumorales más avanzados de clasificación de Dukes, metástasis ganglionares o a distancia en tres estudios (153, 269) mientras que en otro, la expresión mediana de proteína fue mayor en estadios precoces (270) y con infiltración profunda de la pared intestinal (275).

Expresión de p27^{Kip1} y Relación Pronóstica.

La expresión de p27^{Kip1} no se ha relacionado con el curso evolutivo de los pacientes de afectos de cáncer de colon de nuestro estudio, medido por puntos finales ILE o SG. Similares resultados han sido comunicados en otras cinco series de cohortes heterogéneas de CCR (155, 209, 272, 276, 282).

El valor pronóstico de la expresión de p27^{Kip1} ha sido analizado en 19 estudios publicados entre 1997 y 2009 (Tabla nº 57) (153, 155, 209, 268-278, 280-282, 376, 377) y se han encontrado ciertas relaciones positivas en 14 de ellos (nº de pacientes: 103-630).

En 5 de 19 estudios revisados (nº pacientes: 104-187), la expresión positiva o con scores altos de p27^{Kip1} se ha relacionado con ILEs a 5 años o tiempos medianos de SLE significativamente superiores en relación con grupos de pacientes con niveles de p27^{Kip1} tumoral bajos o ausentes (153, 269, 274, 277, 280) dato no confirmado para enfermedad en estadio III. En 3 análisis multivariantes, p27^{Kip1} se comportó como una variable independiente favorable para predicción de tiempo libre de recaídas en pacientes con CCR con HR/RR entre 2.21-20.85 (153, 269, 280).

En 12 de 19 estudios revisados (número de pacientes: 104-630), la expresión positiva o elevada de p27^{Kip1} se ha relacionado con probabilidad de supervivencia mayor que para pacientes cuyos tumores expresan niveles bajos o ausentes de proteína de forma global (153, 268-271, 273, 274, 277, 278, 281, 377), para estadio II (277) o III exclusivo (275, 376).

En 8 análisis multivariantes (número de pacientes: 104-601), se ha demostrado que la expresión de p27^{Kip1} positiva o elevada se asocia con incrementos de RR/HR de 0.62 a 9.35 veces para muerte por neoplasia colorrectal (153, 268-271, 273-275, 281) o limitado para estadio III (275, 376). Sin embargo, en una cohorte de pacientes con cáncer de colon en diferentes estadios, la expresión de p27^{Kip1} citoplásmica se ha asociado con menor porcentaje de mortalidad cáncer específica con HR de 0.77, significativa en análisis multivariante con HR de 0.63 tras ajuste con otros predictores potenciales de SG; pacientes con expresión de p27^{Kip1} alterada tumoral (positivos para localización citoplásmica o con ausencia de expresión de proteína) se asociaron con menor mortalidad por cáncer con HR de 0.63 en los multivariantes (377).

En un estudio retrospectivo sobre el valor pronóstico de la expresión de p27^{Kip1} a gran escala que incluyó 601 pacientes en estadio III de CCR y tratamiento adyuvante, se ha descrito supervivencia global inferior para grupos con ausencia de p27^{Kip1} (66% vs 75%, log-rank p 0.021) y no se influenció por esquemas diferentes de tratamiento sistémico complementario (IFL vs FL); la combinación del status de p27^{Kip1} con MMR identificó un subgrupo pequeño de pacientes que se benefició del esquema IFL medido en ILE (81 vs 47%; log-rank p 0.042) pero no en la SG (81 vs 60%; log-rank p 0.128) (376).

Diferentes estudios no han demostrado correlación estadística por análisis multivariante entre la reducción de proteína nuclear p27^{Kip1}, valorada con Ac anti-p27 SX53G8 de Dako, y la evolución de los pacientes (155, 276, 277), con una tendencia de resultados similares a nuestra experiencia.

Los datos referentes a la correlación entre alteraciones de p27^{Kip1} y cursos evolutivos agresivos están basados en análisis casi exclusivos de expresión proteica nuclear mediante técnicas de IHQ e interpretación de dudosa homogeneidad, ya que se han empleado diferentes parámetros de medida como porcentaje de núcleos p27^{Kip1} positivos e intensidad, su contenido global y localización subcelular. Los puntos de corte para positividad y los sistemas de puntuación son diferentes y no hay evidencias cuantitativas sobre niveles nucleares y/o citosólicos de proteína. Por último, el valor pronóstico de la expresión citosólica de p27^{Kip1} es desconocido (373, 375).

Como hemos podido comprobar, en los últimos años un buen número de estudios han evaluado el significado pronóstico de la expresión de p27^{Kip1} en CCR, esencialmente mediante técnicas de IHQ aunque también con análisis WB, en diferentes escenarios clínicos con resultados dispares. Para su aplicación en la clínica es necesario resolver cuestiones de control de calidad para metodología de procesado (almacenamiento y fijación), tinción (elección del AcMo y concentraciones), procedimientos estándar de scoring y puntos de corte (definición de alta y baja expresión de p27^{Kip1}) y localización subcelular (nuclear y/o citoplásmica).

Timidilato Sintasa.

El estudio de sobre-expresión de pTS en CCR ha sido objeto de un intenso estudio a nivel clínico en los últimos 10 años. Se han aplicado diferentes técnicas de análisis con rendimientos adecuados y se ha estudiado su relación con características pronósticas estándar así como su influencia en el curso evolutivo de la enfermedad en diferentes contextos (298, 300, 315). Niveles elevados de actividad pTS se han identificado como BMT pronósticos de interés para CCR, quizás relacionados con un epifenómeno secundario a la proliferación aberrante de las células tumorales. No obstante, la expresión ectópica de pTS humana puede transformar células murinas in vitro e in vivo lo que podría interpretarse como un papel causal en los procesos de carcinogénesis (292, 298).

Metodología y Rendimiento.

En nuestro estudio hemos encontrado una positividad para sobre-expresión de Timidilato Sintasa por técnicas de IHQ con AcMo TS 106 en 71 de 123 (57.7%) muestras de pacientes con carcinomas de colon en diferentes contextos clínicos y en 39 de ellas (31.7%) se definieron scores altos +2-3 basados un método semicuantitativo.

La sobre-expresión de pTS ha sido valorada en 25 estudios publicados entre 2000 y 2012 (Tabla nº 58) casi en exclusividad por análisis de IHQ (155, 156, 300-313, 380-388) aunque en 4 estudios se midió mRNA TS por técnicas de RT-PCR (304, 313, 382, 385) y en 1 se cuantificaron los niveles de proteína TS por ensayo ELISA (388). La mediana de sobre-expresión alta de pTS se ha situado entre 45-50% con límites amplios del 21.35 al 86%; en 11 estudios (número de pacientes >100; entre 103 y 945 por estudio) los porcentajes altos de expresión están por debajo del 50% (155, 300, 303, 305-307, 309, 312, 380, 381, 384, 387). En 5 estudios los porcentajes comunicados han sido más elevados con límites entre 58 y 86% (156, 301, 302, 308, 310, 311, 386) en la línea de los resultados obtenidos en nuestro estudio.

Una de las experiencias más amplias comunicadas ha sido un análisis prospectivo *blinded* en 967 pacientes con CCR para determinación de pTS por IHQ, AcMo TS 106 y un rendimiento para alta expresión del 58% con scores 2-3 categorizados semicuantitativamente por intensidad de cromógeno (311). El rendimiento de la determinación por IHQ de sobre-expresión de pTS en un estudio retrospectivo a gran escala de 1389 pacientes con CCR fue del 71% valorado con un método similar (386).

El análisis de mRNA TS ha sido efectuado en 4 estudios por técnicas de RT-PCR con rendimientos normalizados relacionados con β actina de referencia del 0.75 a 11.3 ratios de expresión, sin diferencias a partir de material analizado, tejido congelado vs parafinado, con una buena correlación al respecto de la puntuación semicuantitativa por IHQ pero no con diferentes genotipos de 5'-TSER (304, 313, 383, 386). Los niveles medianos de expresión de pTS analizados por ensayo ELISA se han situado en 20 ngr/mgr de tumor analizado (388).

Correlaciones de pTS con otros BMT.

La sobre-expresión de pTS se ha relacionado en nuestra experiencia de forma directa con expresión de Cox-2 y con tendencia a la significación con pKi-67 y TP53. En dos estudios, la pTS se ha relacionado con la expresión nuclear de TP53 con un grado de concordancia hasta del 60% y $\kappa > 0.94$ (156, 311) similar a los hallazgos de nuestra investigación; son observaciones que se podrían explicar por la persistencia de división celular sin reparación de DNA o apoptosis y modulación directa de expresión de pTS por TP53wt.

La intensidad score 3 de pTS se ha relacionado de forma inversa a la expresión de niveles altos de pKi-67 (305) al revés de lo ocurrido en nuestro estudio.

La expresión de pTS es más frecuente en tumores MSI-H, copias de genes TYMP valoradas por FISH y expresiones de DPYD o TYMP (312, 380, 387); estos hallazgos hacen pensar que marcadores de IMS están relacionados con la variabilidad de expresión génica de pTS y con niveles de expresión de

enzimas relacionados con sensibilidad a FPs. pTS se ha relacionado de forma inversa con expresión de CDKi p16^{INK4a} y hMLH1 (306, 307).

Diferentes grados de ploidía, MVD, expresión de VEGF, MSI, MMR, 17p, OPRT y DPA no se han correlacionado con pTS sobre-expresada, indicando independencia con hallmarks relacionados con angiogénesis, alteraciones génicas de IMS y enzimas marcadores de respuesta a FPs (303, 310, 388)

No hemos encontrado datos publicados que confirmen nuestros hallazgos sobre la correlación de pTS con sobre-expresión de Cox-2, ni de forma inversa con otras proteínas estimuladoras de proliferación como EGFR ni con reguladores del ciclo celular, p21^{waf1/cip1} o Ciclina D1 (tabla nº 58).

Relación de pTS con FCP convencionales.

No hemos observado ningún tipo de relación significativa entre la sobre-expresión de pTS y cualquier parámetro clínico-patológico convencional con valor pronóstico.

En 12 estudios publicados entre 2000 y 2012 se ha encontrado alguna relación entre la sobre-expresión y/o niveles altos de pTS con alguna característica demográfica o clínico-patológica convencional (Tabla nº 59) (156, 302, 303, 306, 308, 310, 311, 313, 381, 383, 387, 388).

Se ha comunicado una relación directa entre valores medianos altos de células tumorales positivas para pTS con grupos de pacientes de edades superiores a los 60 años con una tendencia para sexo masculino (303) y alta expresión de TYMS con edades superiores a 80 años en comparación con edades más tempranas (387). La edad y/o sexo de los pacientes de nuestra cohorte no influyó de forma decisiva en la expresión tumoral de pTS.

Tumores de localizaciones derechas expresan significativamente niveles de pTS más bajos que en el colon distal y/o recto (302, 381) pero en otro estudio, la mediana de score histológico para expresión nuclear de pTS en tumores proximales es de 2 a 3 veces mayor (383). Las medianas de porcentaje para inmunotinción celular positiva de pTS son muy superiores en

tumores bien o moderadamente diferenciados (303) y la expresión de mRNA TS es significativamente inferior para grados de diferenciación altos G3 que en más diferenciados G2 (313). Tumores con infiltración LV y diferenciación mucinosa expresan valores medianos de positividad para pTS inferiores (303, 308). No encontramos en nuestro estudio diferencia alguna entre la expresión de pTS y localizaciones tumorales, grado de diferenciación e ILV.

En pacientes con estadios Dukes B2, C, y D o con metástasis ganglionares N2 se encuentran niveles de expresión pTS nuclear tumoral más elevados que en otros contextos (306, 310) y niveles de invasión tumoral pT3/T4 se relacionan con scores positivos de pTS más altos (156). En otros dos estudios se han comunicado hallazgos contradictorios; la expresión de pTS tumoral se relaciona de forma inversa con estadio patológico (311) y la baja expresión de pTS es más frecuente en estadio III vs II (381). En nuestra experiencia, los niveles de expresión de pTS no se han correlacionado con el estadio inicial de presentación de la enfermedad.

Expresión de pTS y Relación Pronóstica.

En nuestro trabajo no hemos demostrado una relación significativa entre la sobre-expresión de pTS o scores altos con el curso evolutivo de una cohorte heterogénea de pacientes con cáncer de colon valorados con puntos finales de SLE y SG.

En 21 estudios publicados entre 2000 y 2012 se ha valorado la correlación de la sobre-expresión de pTS y/o mRNA TS con el pronóstico de diferentes cohortes de pacientes (Tabla nº 60) (155, 156, 300-306, 308-311, 313, 380-382, 384-387).

El curso evolutivo de CCR para SLEs/ILEs se ha visto influenciado por la sobre-expresión de pTS y/o su mRNA en cuatro estudios. Expresión de pTS con niveles altos/scores +2-3 se ha relacionado con incremento del número de recaídas e ILEs sensiblemente inferiores incluso en series con estadios Dukes C y sin tratamiento con QT adyuvante (156, 302, 305, 306). La asociación de

DISCUSIÓN

niveles altos de pTS y TP53 positiva se ha confirmado en el grupo de pacientes con periodos libres de enfermedad menores (156, 305).

La expresión de niveles mRNA TS bajos ≤ 0.6 junto con DPD > 0.4 se asoció con los menores porcentajes de supervivencia libre de recurrencias de enfermedad (304). El número alto de copias génicas de TYMS se ha relacionado con intervalos libres de enfermedad inferiores (380). En tres análisis multivariantes, la expresión alta de pTS o el número de copias génicas de TYMS se confirma como una variable independiente desfavorable para SLE, con HR de 0.42-1.6, junto con estadios avanzados Dukes y metástasis ganglionares (302, 306, 380).

Las sobre-expresiones altas de pTS se han asociado con cursos evolutivos desfavorables medidos en SGs significativamente inferiores a diferencia de scores bajos en pacientes tratados con cirugía exclusiva mientras que se ha objetivado una mejora de porcentajes de supervivencia en estadios C Dukes tratados con quimioterapia adyuvante basada en FPs para tumores con sobre-expresiones de pTS asociadas con TP53 positiva (156, 300, 302, 305, 306).

En 4 análisis multivariantes, pTS alta se confirma como una variable independiente de mal pronóstico con HR de 0.39 a 1.6 junto con estadio y metástasis ganglionares, con beneficios confirmados con el empleo de QT adyuvante (156, 300, 305, 306). Números de copias altos de gen TYMPS valorados por FISH se relacionan con riesgos incrementados de muerte por tumor en pacientes con cáncer colorrectal en estadios II-IV que se confirman en análisis multivariante ajustado por estadio, invasión vascular y obstrucción intestinal a la resección quirúrgica con un HR de 1.6 (380).

A diferencia de estos hallazgos, otros autores han comunicado peor pronóstico con supervivencia significativamente inferiores para pacientes con valores de pTS bajos y en combinación con niveles de DPD altos en estadios II (HR 1.69/p 0.019) y III tratados con cirugía exclusiva, si bien, esta tendencia no fue confirmada en el análisis multivariante (381).

En esta línea, valores altos de mRNA TS elevados con puntos de corte > 0.6 se asocian con supervivencias más prolongadas, incluso en combinación con valores altos de DPD, que se confirman como variable independiente en el análisis multivariante de Cox (HR de 3.6) junto con estadio TNM (304). En un estudio comparativo de expresión de pTS por IHQ, mRNA TS por RT-PCR y estudios génicos de polimorfismos, tan solo el genotipo 2R7-R de 5'-T5ER se correlacionó significativamente con supervivencias inferiores y fue un marcador pronóstico desfavorable e independiente en el análisis multivariante (385).

El status de expresión de pTS y su influencia pronóstica ha sido evaluado por meta-análisis en 3500 pacientes con CCR, con el HR como medida de evaluación principal. Los niveles de pTS se han estudiado por IHQ o cuantificación de mRNA TS por RT-PCR con gran variabilidad de tamaño muestral. Los HR para SGs han sido 1.79 (IC95%: 1.34-2.26) en enfermedad avanzada y 1.35 (IC95%:1.07-1.80) para enfermedad no metastásica. Quizás los tumores que expresan niveles elevados de pTS parecen tener un pronóstico peor, sin embargo, los autores recomiendan metodología más robusta para definir de manera concluyente el valor de pTS (311).

Con resultados similares a los nuestros, 13 estudios no han podido demostrar influencia directa de la expresión de pTS sobre el curso evolutivo de la enfermedad (155, 301, 303, 306, 308-311, 313, 382, 384, 386, 387).

La sobre-expresión de pTS no puede considerarse un BMT rutinario para evaluar a priori el pronóstico de los CCRs en diferentes contextos clínicos. Para su interpretación, tan solo podemos basarnos en unos pocos análisis multivariantes de estudios fase II retrospectivos y heterogéneos o de una revisión sistemática con algunos sesgos reconocidos que adolecen de una metodología consistente.

Los estudios a gran escala no han constatado el valor de predicción del curso evolutivo de los CCRs para pTS tanto aquellos con diseño retrospectivo como prospectivo. En lo que se refiere al análisis por IHQ se han empleado sistemas de detección, AcMo, y sistemas de puntuación dispares que hacen que su interpretación no sea concluyente.

Comentarios sobre nuestro estudio y sus limitaciones.

Las recomendaciones de las guías REMARK para estudios pronósticos de BMT nos ha servido de base para el planteamiento, desarrollo y análisis de los resultados de nuestro estudio. Le dan, por tanto, el rigor exigido para su validación como estudio fase II para BMT convencionales.

La disponibilidad de acceso a la base de datos diagnóstica por ICD-O, al archivo de piezas tumorales parafinadas del Servicio de Patología y las historias clínicas del HUdR nos ha permitido recabar de forma exhaustiva la información referente a las características demográficas y clínico-patológicas de los pacientes incluidos en nuestro estudio, así como desarrollar el análisis experimental de los BMT propuestos. Todo ello fue recogido en un cuestionario específico para su tratamiento estadístico.

El planteamiento del estudio fue fundamentado por una revisión exhaustiva de la literatura y del estado de la cuestión para cada BMT. Puesto que disponíamos de especialistas expertos en técnicas de IHQ decidimos desarrollar un estudio fase II, en este caso retrospectivo por una cuestión de información de seguimiento y análisis de curso evolutivo de la serie a largo plazo. Los pacientes fueron diagnosticados, estadificados y tratados de forma homogénea con arreglo a los protocolos actualizados del momento, lo que ha permitido una perspectiva de análisis adecuada; quizás información relevante a las cifras de MT séricos no fue todo lo completa que hubiésemos deseado.

El estudio de los BMT se efectuó con técnicas de IHQ estandarizadas en el Servicio de Anatomía Patológica y la lectura e interpretación por un Patólogo experto en tumores gastrointestinales. El rendimiento para los BMT se ha situado en límites intermedios e incluso bajos para algunos de ellos, que puede atribuirse a defectos propios derivados del estudio de material archivado con desnaturalización proteica que impidió la recuperación antigénica adecuada, ya que los sistemas de puntuación empleados para su cuantificación no diferían de otros estudios de forma sustancial. Incluso defectos iniciales en la manipulación de la pieza tumoral después de la cirugía, con periodos de anoxia

DISCUSIÓN

ex vivo prolongados y fijación defectuosa o excesiva, pudieron ser responsables de estos posibles déficits.

Las características clínico-demográficas de nuestra serie no difieren de forma sustancial de las definidas en otros estudios a gran escala y su curso evolutivo con un seguimiento superior a 90 meses es homologable a los hallazgos comunicados por otros investigadores.

El diseño del trabajo cumple los criterios de un estudio observacional, analítico, longitudinal de cohortes retrospectivo. En cuanto al tamaño muestral necesario para detectar un efecto determinado (ej $HR > 2$) con una potencia (80%) y confianza determinada (95% o riesgo alfa 5%) serían necesarios al menos 57 pacientes por grupo para un total de 114 pacientes y un número de eventos de 66. Por otro lado, para el cálculo de la potencia del estudio una vez conocimos los resultados para un $HR > 2$ y un tamaño del grupo de referencia de 60 pacientes, la potencia para detectar esta diferencia como significativa al nivel del 5% es del 82.3%. En resumen, la muestra es lo suficientemente grande con 123 pacientes y 66 eventos como para detectar una asociación clínicamente relevante como estadísticamente significativa.

En nuestra experiencia, la expresión baja de pKi-67 se perfila como un buen dato de curso evolutivo favorable. No nos ha sido posible confirmar el valor pronóstico del resto los BMT incorporados al análisis uni o multivariante. Por otro lado, la utilidad pronóstica de las características clínico-patológicas convencionales en nuestra serie ha quedado demostrada con un significado estadístico evidente.

La contextualización de nuestros resultados con las diferentes series publicadas nos ha permitido contrastar que la mayoría son estudios retrospectivos con metodologías experimentales diferentes e incluyen poblaciones heterogéneas con cáncer colorrectal, no exclusivo de colon, con lo representa para su historia natural y tratamiento. Menos de un 20% de los estudios revisados correspondían a cohortes de cáncer de colon exclusivo y aquellos que han reclutado un gran número de pacientes no tienen un diseño

prospectivo fase III. Los tiempos de seguimiento y por tanto la validación de eventos de las diferentes cohortes de pacientes ha sido heterogénea y tampoco se han comunicado en todos ellos de forma sistemática análisis uni y multivariantes para la evaluación de significado pronóstico de SLE y SG como puntos finales de estudio. Tan solo han estado disponibles dos revisiones sistemáticas para TP53 y pTS pero ningún meta-análisis.

Todos estos datos los hemos podido aportar con la metodología comentada y creemos pueden suponer un valor añadido a nuestros hallazgos a pesar de los inconvenientes de ser un estudio retrospectivo. Por todo ello, el valor de las alteraciones de la expresión de las proteínas BMT analizados por IHQ no puede contemplarse como criterio pronóstico estándar para el manejo del CCR. La expresión de pKi-67 se podría considerar para su empleo cotidiano discriminativo de pacientes de alto riesgo, pero quizás precisa de estudio confirmatorio a gran escala.

Para conocer el valor de diferentes BMT como factor pronóstico y/o predictivo en el manejo de los pacientes con cáncer de colon y/o colorrectal es preciso desarrollar estudios clínicos fase III que cumplan en su planteamiento, desarrollo y comunicación los criterios REMARK mencionados, que a su vez, serán la base para diferentes meta-análisis contextualizados y su posterior implementación en la práctica clínica cotidiana.

BMT en las Guías de Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de Colon.

En la actualidad se encuentran disponibles diferentes guías para el manejo del cáncer de colon como las diseñadas por la NCCN, ESMO, ASCO y SEOM. En ellas, se recogen los niveles de evidencia para las aproximaciones diagnósticas y terapéuticas locales y/o sistémicas de los diferentes contextos clínicos de la enfermedad (NCCN Guidelines 2013, 389-391).

Con respecto a la utilidad de los BMT, se recomienda el estudio de IMS por IHQ para pacientes en estadio II, ya que aquellos con MSI-H tienen buen pronóstico y no se benefician de QT basada en FPs. Para la enfermedad avanzada se sugiere el análisis estándar en tumor primario y/o metástasis de

mutaciones en codones 12 o 13 del exón 2 del gen K-ras y del gen V600E- Braf por técnicas de secuenciación o hibridación in situ, ya que pacientes con tumores *wild type* se beneficiarán de la incorporación al tratamiento de AcMo como Cetuximab y Panitumumab. Ningún otro BMT o técnicas de alto rendimiento para DNA o RNA forman parte de procedimientos de análisis para uso rutinario pronóstico y/o predictivo en cáncer de colon (NCCN Guidelines 2013, 389-391).

Perspectivas de Investigación de BMT en Cáncer de Colon.

La medicina personalizada en el manejo de la enfermedad cancerosa tiene como objetivo el conocimiento de las características subyacentes de una patología concreta, tanto del tumor como del huésped, con objeto de ofrecer alternativas terapéuticas individualizadas. La investigación de BMT nuevos para cáncer de colon pasa por la comprensión de su fisiopatología molecular y de la disponibilidad de tecnologías que permitan establecer perfiles de DNA, RNA, proteínas y metabólicos. La incorporación de técnicas de alto rendimiento a gran escala como el screening mutacional múltiple, secuenciación de nueva generación o tecnologías basadas en matrices permitirán la determinación de número de copias, metilación y/o expresiones proteicas que pueden ser analizadas con herramientas bioinformáticas para proveer firmas y algoritmos pronósticos y/o predictivos en la caracterización rutinaria de los tumores así como para su orientación terapéutica (392, 393).

El desarrollo de la Epidemiología Patológica Molecular, en el que cada factor etiológico sospechoso intenta ser relacionado con cambios moleculares específicos, y el screening sistemático de las alteraciones moleculares con estas nuevas tecnologías, posibilitará definir nuevos genes *drivers* y *passangers* que están siendo recogidos en el catálogo *COSMIC*. El estudio molecular de los *hallmarks* del cáncer de colon inicialmente descritos con la inclusión reciente de la reprogramación del metabolismo energético, evasión del sistema inmune y del microambiente tumoral, permitirá seguir definiendo adicciones oncogénicas, vías de señalización, shock oncogénico, y letalidad sintética que pueden ser la base para ensayos sistematizados (295, 325, 393).

Alteraciones genómicas como mutaciones, número de copias/fusiones, expresión génica de RNA y epigenética pueden ser analizadas con tecnologías de alto rendimiento como detección de mutación multiplex, secuenciación de nueva generación, aCGH (por micromatrices de hibridación comparativa), SNPs (por matrices de polimorfismos de nucleótidos únicos)/estudios GWAS (por estudios de asociación amplios de genoma) y matrices de metilación. El *Total Cancer Genoma Atlas (TCGA)* tiene como finalidad la caracterización y descripción del mapa físico y molecular de la enfermedad cancerosa para su manejo clínico. El rendimiento en cáncer de colon o CCR de *Oncotype Dx Colon Cancer test*, *ColoPrint assays*, *GWAS analysis* así como otras firmas génicas está siendo validado en estudios clínicos a gran escala como puntos de análisis pronóstico/predictivo subsidiarios (395-399).

La proteómica basada en anticuerpos es una estrategia de análisis orientada para su generación sistemática y uso específico en la exploración del proteoma celular (324). Las técnicas de IHQ de uso común en los laboratorios de Patología facilitan información relevante para el diagnóstico y tratamiento de diferentes tumores; es un método de estudio relativamente sencillo, de bajo coste y fácil disponibilidad, susceptible para incorporación de automatización y reproducible, pero son necesarias una serie de recomendaciones para su homologación desde la estandarización de las diferentes fases de estudio, sistemas de valoración y scores consensuados.

La implementación del Test Total para IHQ es esencial. Para la fase pre-analítica debe estandarizarse la selección del test, tipo de muestra, adquisición, tiempo de prefijación y transporte, tipo y tiempo total de fijación así como temperatura de procesado. Para la fase analítica, los procedimientos de recuperación antigénica, selección de Ac primarios, protocolo de marcado de reactivos, control de selección, certificado de entrenamiento de técnicos y programa de certificación del Laboratorio. Finalmente, para la fase post-analítica, la valoración del control de funcionamiento, descripción de resultados, interpretación y comunicación de resultados y disponibilidad de un patólogo entrenado con EMC para IHQ (28, 32, *ICH Staining Methods*, Dako North America, Carpinteria, California 2009).

El proteoma celular puede ser escaneado mediante sistemas de detección de alto rendimiento como TMA, RPPAs para estudio de fosfoproteoma junto con técnicas de scoring automatizadas para la medición de la intensidad de la inmunotinción y localización subcelular con datos que están perfilando el *Human Protein Atlas Portal*. Ayudarán a comprender las modificaciones proteicas post-traslacionales que afectan al desarrollo, progresión del tumor y su respuesta al tratamiento inicial planteado en diferentes contextos de la enfermedad (392, 400-403) (Diagrama/Figura nº 20).

Otras investigaciones en marcha de interés incluirían la valoración de células circulantes y/o stem cells séricas (404, 405).

Para perfilar el verdadero valor de los BMT analizados en nuestro trabajo, sería necesario el desarrollo de estudios fase III prospectivos asociados a ensayos clínicos de nuevos tratamientos con objetivos bien diseñados, que incluyan cohortes de pacientes homogéneas quizás para diferentes estadios TNM, metodologías de análisis con las fases pre-analítica y analítica bien definidas, empleo de AcMo de alto rendimiento, sistemas de interpretación y puntuación estandarizados, seguimiento a largo plazo sobre todo en los estadios precoces con suficiente números de eventos, y análisis estadísticos potentes.

Por otro lado, la información de los hallazgos de diferentes líneas de investigación para cada uno de ellos puede ayudar a incorporar información relevante y proteínas para futuros estudios de BMT. Conocer su expresión óptima standarizada, sus vías de señalización activadas y regulación, y los diferentes mecanismos de cross-talk es una prioridad que puede mejorar el conocimiento de su verdadera influencia en el desarrollo y progresión del CCR.

La investigación de la red de la familia ERBB, y del EGFR en particular, sus vías de señalización, modularidad y asas de control múltiple, estados de bi-estabilidad, y su relación con múltiples mutaciones oncogénicas permitirán conocer mejor su papel en la fisiopatología molecular de la enfermedad y de los mecanismos de resistencia a los fármacos anti-diana actuales (406, 407).

La comprensión de la influencia de la vía de señalización Cox-2/PGE₂ en la carcinogénesis de CCR por modulación de los diferentes *hallmarks* de la enfermedad, receptores prostanoideos, 15-hidroxyprostaglandin dehydrogenase y transportadores de prostaglandinas, relaciones con el microambiente tumoral a través de sus relaciones con HIF factor-1 y función β catenina, mecanismos de *cross-talk* con la red EGFR, receptores de activación de peroxisoma (PPAR γ), regulaciones transcripcionales y postranscripcionales, como miRNAs, ARE-binding proteins, 3'UTR pueden ser la fuente de nuevos BMT, servir de base para nuevas terapias antidiana y para el desarrollo de programas de quimioprevención (336, 337, 408).

Las líneas de investigación para TP53 se vislumbran en el conocimiento de actividades no relacionadas con su función como supresor tumoral *wild type*. Diferentes proteínas TP53 mutantes, conformacionales o por contacto de DNA, adquieren propiedades oncogénicas que les permiten la promoción de invasión, metástasis, proliferación y supervivencia celular tumoral; inciden sobre numerosas activaciones transcripcionales de genes activadas por p53, y estas contribuciones diferentes a los fenómenos de carcinogénesis pueden ser evaluadas en modelos murinos mutantes para TP53. Es de interés el estudio de otros miembros de la familia TP53 como p63 y p73; papel de la vía defectiva Rb-E2f-MdM2-p53, influencias sobre la expresión de p21^{waf1/cip1}, sobre el SIPS en modelos preclínicos y radiaciones ionizantes así como el papel de las sublocalizaciones celulares sobre sus actividades transcripcionales (409-413).

Son necesarios estudios de investigación que permitan dilucidar las importantes funciones básicas de pKi-67, dada su expresión necesaria en procesos proliferativos, sus relaciones con otros reguladores de ciclo celular y vías de señalización intracelular, quizás con la incorporación de nuevos Ac Mo como MIB-5 o TEC-3 y técnicas de *tissue microarrays*, que permitan el acceso al estudio de un amplio rango de modelos animales y líneas celulares. Es de especial relevancia clínica, el análisis de correlación entre niveles de transcrito Ki-67 mRNA y la expresión de proteína por inmunotinción (171, 357-359).

Numerosos estudios han demostrado que la regulación alterada de la vía Ciclina D1-RB-E2F es de una gran trascendencia en el desarrollo de los tumores humanos más frecuentes por su relación como substratos específicos entre sí y funciones reguladoras de síntesis de DNA, contribuyendo de forma decisiva la amplificación, mutación y sobre-expresión de Ciclina D1 con funciones catalíticas y no catalíticas alteradas. La adición de tumores a Ciclina D1 por mecanismos de disregulación de la vía RB-E2F, mutación, amplificación y sobre-expresión o bien por otros eventos oncogénicos alternativos; el efecto de la co-amplificación y sobre-expresión de oncogenes que comparten amplicones de 11q13, el estudio de los mecanismos de resistencia a inhibición de Ciclina D1 o CDK4-6, y el efecto funcional de la sublocalización celular citoplásmica, son áreas de interés para investigaciones futuras (196, 414).

Se puede considerar a p21^{waf1/cip1} como una proteína de comportamiento dual, con efectos potencialmente beneficiosos pero también deletéreos en su expresión en células tumores. Los mecanismos de sublocalización citoplásmica capaces de influenciar ciertas vías de señalización que promueven fenómenos antiapoptóticos como la activación de Procaspasa-1 y SEK/JNK (370, 371) deben ser mejor evaluados.

El desarrollo de estudios prospectivos en poblaciones tumorales concretas, la estandarización de los pasos de estudio y su relación con otros BMT de proliferación, apoptosis e invasividad/metástasis mediante técnicas de análisis de alto rendimiento *tissue microarray* nos permitirá perfilar el status definitivo del estudio rutinario de p27^{Kip1} como discriminante en la caracterización biológica tumoral y definición más precisa de tratamiento complementarios y/o nuevas dianas. Sus actividades funcionales en relación con la sublocalización celular deben ser mejor definidos (256, 374-376).

El análisis de muestras con tecnologías a gran escala como pTS *tissue microarrays*, expresiones génicas por CGH arrays, estudios de polimorfismos o miRNAs con la catalogación de firmas genéticas tumorales nos permitan avanzar en el conocimiento del papel de pTS en el cáncer de colon (415-417).

Todas estas vías de investigación pueden ofrecer la oportunidad de mejorar el conocimiento de la carcinogénesis colorrectal, incorporar a la práctica nuevos BMT pronósticos/predictivos en ocasiones relacionados al desarrollo de nuevos fármacos, que deben ser validados por estudios exploratorios, fases III a gran escala, y meta-análisis para su incorporación a las guías clínicas de manejo del CCR (396).

Las nuevas aproximaciones multidimensionales de estudio como la Biología de Sistemas, que incorpora información biológica y biomédica a conceptos físicos, facilitarán el desarrollo de la medicina personalizada para la enfermedad cancerosa tanto en cuidados estándar como en investigación de transferencia, especialmente de fármacos anti-diana de las alteraciones en los genes *drivers*, *adición oncogénica tumoral* y abordaje sistemático de los diferentes *hallmarks cancer genetic alterations*. Requerirá de un amplio abordaje que va desde la estratificación del riesgo para prevención, screening, tratamiento y programas de largos supervivientes donde las tecnologías en entornos CLIA para análisis de perfiles genómicos y/o proteómicos tendrán un papel esencial permitiendo nuevas dimensiones de valoración de los BMT de riesgo específico para prevención, pronósticos, predictivos y de respuesta (Diagramas/figuras nº 20, 21, 22 y 23) (405, 418, 419, 420, 421, 422).

CONCLUSIONES.

1º. El cáncer de colon es una enfermedad heterogénea desde los puntos de vista clínico-patológico y molecular.

2º. Nuestra serie se ha caracterizado por pacientes de edad avanzada sin diferencias para sexo, tumores de predominio izquierdo, histología de adenocarcinoma NOS, distribución convencional en grados de diferenciación, y estadios TNM localizados (pT3 y I-II).

3º. Para tratamientos homogéneos y largo seguimiento de los pacientes con una mediana de 90 meses, el curso evolutivo medido por ILE y SG se comporta de forma similar a estudios clínicos a gran escala.

4º. La expresión constitutiva de los diferentes BMT estudiados, promotores de proliferación EGFR y Cox-2, supresor tumoral TP53, marcador de proliferación celular pKi-67, reguladores de ciclo celular Ciclina D1, p21^{waf1/cip1} y p27^{Kip1}, y pTS implicada en la síntesis/reparación de DNA, ha sido muy heterogénea con límites entre 21 y 63%.

5º. La correlación entre diferentes BMT sugieren mecanismos co-reguladores y de *cross-talk*. La sobre-expresión de EGFR se ha relacionado con sobre-expresión de TP53; Cox-2 con Ciclina D1, p27^{Kip1} y pTS; TP53 con pTS; pKi-67 con pTS; y la expresión de Ciclina D1 con Cox-2, p21^{waf1/cip1} y p27^{Kip1}.

CONCLUSIONES

6º. Las expresiones de BMT EGFr, Cox-2, TP53, pKi-67, Ciclina D1 y pTS se han asociado de forma estadísticamente significativa con ciertas localizaciones tumorales iniciales, niveles de CEA, estadios pT1-2, pN1-2 y TNM global III.

7º. El curso evolutivo de nuestra cohorte de pacientes se ha visto influenciado esencialmente por diferentes factores pronósticos convencionales que, en el análisis multivariante, han sido: el estadio global TNM para ILEs y edad, ILV, grado de diferenciación y estadio global TNM para SGs.

8º. Tan solo la expresión baja de pKi-67 se ha relacionado de forma significativa con ILEs y SGs favorables en el análisis univariante, así como en el modelo de regresión multivariante de Cox. El resto de los BMT estudiados no se han comportado como variables pronósticas independientes.

9º. En definitiva, son necesarios estudios fase III prospectivos a gran escala, con metodologías analíticas optimizadas para IHQ, que permitan evaluar el valor pronóstico de estos BMT en cohortes de pacientes con cáncer de colon tratados de forma homogénea y seguimiento a largo plazo. Quizás técnicas de alto rendimiento así como otras aproximaciones a las alteraciones génicas de la enfermedad, nos ayuden a mejorar en el conocimiento de su fisiopatología molecular y, por tanto, en el manejo de los pacientes de forma personalizada para diferentes situaciones clínicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Sanchez A. Pronóstico. En Medicina Interna. Farreras-Rozman. Elsevier España. Madrid. 3ª edición. 2004; pp: 20-22.
2. McKillop W. The Importance of Prognosis in Cancer Medicine. In Prognostic Factors in Cancer, edit by Gospodarowicz M, O'Sullivan B, Sobin LH. Wiley & Sons. New Jersey. 3th edn. 2006; pp: 3-21.
3. Gospodarowicz M, O'Sullivan B, Koh ES. Principles of Documenting Prognosis and Prognosis Factors in Cancer. In Prognostic Factors in Cancer, edit by Gospodarowicz M, O'Sullivan B, Sobin LH. Wiley & Sons. New Jersey. 3th edn. 2006; pp: 23-38.
4. Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. Nat Rev Cancer 2005; 5: 845-856.
5. Iqbal S, Stoehlmacher J, Lenz HJ. Tailored chemotherapy for colorectal cancer: a new approach to therapy. Cancer Invest 2004; 22 (5): 762-773.
6. Atkinson AJ, Magnuson WG, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ et al. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther 2001; 69 (3): 89-95.
7. Hayes DF. Biomarkers. In Cancer. Principles and Practice of Oncology. Edit by De Vita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. Lippincott, Williams & Wilkins. 8th edn. Philadelphia 2008; pp: 774-780.

8. Henry NL, Hayes DF. Clinical importance of prognostic factors: moving from scientifically interesting to clinically useful. In Principles of Molecular Oncology. Edit by Bronchud MH et al. Humana Press. 3th edn. New Jersey 2008; pp: 27-41.
9. Hammond MEH, Taube SE. Issues and barriers to development of clinically useful tumor markers: a development pathway proposal. Semin Oncol 2002; 29 (3): 213-221.
10. Sargent D, Allegra C. Issues in clinical trial design for tumor marker studies. Semin Oncol 2002; 29 (3): 222-230.
11. Hemingway H. Prognosis research: Why is Dr. Lydgate still waiting? J Clin Epidemiol 2006; 59: 1229-1238.
12. Riley RD, Sauerbrei W, Altman DG. Prognostic markers in cancer: the evolution of evidence from single studies to meta-analysis, and beyond. Br J Cancer 2009; 100: 1219-1229.
13. Hayden JA, Cote P, Steenstra IA, Bombardier C, QUIPS-LBP Working Group. Identifying phases of investigation helps planning, appraising, and applying the results of explanatory prognosis studies. J Clin Epidemiol 2008; 61: 552-560.
14. Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, Potter JD, Thompson ML, Thornquist M et al. Phases of biomarker development for early detection of cancer J Natl Cancer Inst 2001, 93: 1054-1061.
15. Ransohoff R. How to improve reliability and efficiency of research about molecular markers: roles of phases, guidelines, and study design. J Clin Epidemiol 2007, 60: 1205-1219.
16. Sauerbrei W, Royston P, Binder H. Selection of important variables and determination of functional forms for continuous predictors in multivariable model building. Stat Med 2007; 26; 5512-5528.
17. Altman DG, Lyman GH. Methodological challenges in the evaluation of prognostic factors in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 1998; 52: 289-303.
18. Hayes DF, Bast RC, Desch CE et al. Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. J Natl Cancer Inst 1996; 88: 1456-1466.

19. McShane L, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Cark GM. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J Natl Cancer Inst* 2005; 97 (16): 1180-1184.
20. Costa J. Advanced Molecular Diagnosis. In *Cancer. Principles and Practice of Oncology*. Edit by De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Lippincott, Williams & Wilkins. 7^a edn. Philadelphia 2005; pp: 581-587.
21. Costa J, Cordon-Cardo C. Cancer Diagnosis: Molecular Pathology. In *Cancer. Principles and Practice of Oncology*. Edit by De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Lippincott, Williams & Wilkins. 6^a edn. Philadelphia 2001; pp: 641-657.
22. Ross JS. Molecular diagnostic assays in breast cancer. In *Molecular Oncology in Breast Cancer*. Edit by Ross JS, Hortobagyi GN. Jones & Barlett Pub. Massachusetts 2005; pp: 13-34.
23. Netto GJ, Saad RD. Diagnostic molecular pathology. An increasingly indispensable tool for practicing pathologist. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 1339-1348.
24. Papadopoulou N, Kinzler KW, Vogelstein B. The role of companion diagnostic in the development and use of mutation-targeted therapies. *Nat Biotech* 2006; 24 (8): 985-995.
25. Wiczorek T, Longtine JA. The role of molecular probes and other markers in the diagnosis and characterization of malignancy. In *Colorectal cancer*. Edit by Meyerhardt J, Saunders M. Mosby Elsevier. Edimburgh. 2007; pp: 11-22.
26. Lugli A, Jass JR. Gastrointestinal cancer: Pathology and molecular pathology. In *Principles and Practice of Gastrointestinal Oncology*. Edit by Kelsen DP, Daly JM, Kern SE, Levin B, Tepper JE, Van Cutsem. Lippincott Williams and Wilkins. 2th edn. Philadelphia. 2008; pp: 15-26.
27. Kulasingam V, Diamantidis EP. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat Clin Pract Oncol* 2008; 5 (10): 588-598.
28. Taylor CR. Standardization in immunohistochemistry: the role of antigen retrieval in molecular morphology. *Biotech Histochem* 2006; 81 (1): 3-12.

29. Westra W. Surgical Pathology. In *Clinical Oncology*. 3th edn; edit by Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG. Elsevier, Philadelphia; 2004; pp: 300-304.
30. Warford A, Howat W, McCafferty J. Expression profile by high-throughput immunohistochemistry. *J Immunol Methods* 2008; 290 (1-2): 81-92.
31. Sullivan CAW, Chung GG. Biomarker validation: in situ analysis of protein based expression using semiquantitative immunohistochemistry-based techniques. *Clin Colorectal Cancer* 2008; 7 (3): 172-177.
32. Taylor CR, Levenson RM. Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology* 2006; 49: 411-424.
33. Ferlay F, Autier M, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007; 18: 581-592.
34. Cabanes A, Pérez-Gómez B, Aragonés N, Pollán, M, López-Abente G. Monitorización de la situación del cáncer en España, 1975-2006. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. Junio de 2009.
35. Niederhuber JE, Cole CE, Grochow L, Jacoby RF, Lee FT, Mooney M et al. Colon Cancer. In *Clinical Oncology*. 3th edn; edit by Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG. Elsevier, Philadelphia; 2004; pp: 1877-1941.
36. Weitz J; Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler M. Colorectal cancer. *Lancet* 2005; 365: 153-65.
37. Kulke MH, Turner JR, Meyerhardt J. Colorectal cancer: epidemiology, histology, diagnosis and staging. In *Colorectal Cancer*. Edit by Meyerhardt J, Saunders M. Mosby Elsevier. Philadelphia. 2007; pp: 23-56.
38. Fearon ER, Bommer GT. Molecular biology of colorectal cancer. In *Cancer principles and practice*. 8th edition. Edit by De Vita VT, Lawrence TS, Rosenberg S. Wolters Kluwer. Philadelphia. 2008; pp: 1218-1232.
39. Libutti SK, Saltz LB, Tepper JE. Colon cancer. In *Cancer principles and practice*. 8th edition. Edit by De Vita VT, Lawrence TS, Rosenberg S. Wolters Kluwer. Philadelphia. 2008; pp: 1232-1285.

40. Jacobs ET, Thompson PA, Martinez ME. Environmental and lifestyle issues in colorectal cancer. In Principles and Practice of Gastrointestinal Oncology. Edit by Kelsen DP, Daly JM, Kern SE, Levin B, Tepper JE, Van Cutsem. Lippincott Williams and Wilkins. 2 edn. Philadelphia 2008; pp: 511-526.
41. Wittekind Ch. Pathology in Colorectal cancer. Edit by Cassidy S, Johnstone P, Van Cutsem E. Informa Health Case USD, Inc, New York 2007; pp: 103-123.
42. Smyrk T. Colorectal cancer: pathology. In Principles and Practice of Gastrointestinal Oncology. Edit by Kelsen DP, et al. Lippincott Williams and Wilkins. 2 edn. Philadelphia 2008; pp: 555-565.
43. Chin ID, Paun BC. Colorectal cancer: anatomy and staging. In Principles and Practice of Gastrointestinal Oncology. Edit by Kelsen DP, Daly JM, Kern SE, Levin B, Tepper JE, Van Cutsem. Lippincott Williams and Wilkins. 2th edn. Philadelphia 2008; pp: 567-579.
44. Green FL, Page DL, Fleming ID et al. Eds. AJCC Cancer staging manual. 6th edn. New York, NY; Springer. 2002.
45. Sobin LH, Wittekind Ch. Eds. UICC classification of Malignant Tumors, 6th edn. New York. Willey. 2002.
46. Van Cutsem E, D'Hoore A, De Vleeschouwer C, Decaestecker J, Penninckx F. Colon cancer: management of locoregional disease. In Principles and Practice of Gastrointestinal Oncology. Edit by Kelsen DP, Daly JM, Kern SE, Levin B, Tepper JE, Van Cutsem. Lippincott Williams and Wilkins. 2th edn. Philadelphia 2008; pp: 581-592.
47. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Altekruse SF et al. (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations), National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09.
48. Chau I, Cunningham D. Adjuvant therapy in colon cancer-what, when and how?. Ann Oncol 2006; 17: 1347-1359.
49. Cunningham D, Starling N. Adjuvant chemotherapy of colorectal cancer. Lancet 2007; 370: 1980-81.
50. Sargent DJ, Patiyil S, Yothers G, Haller DH, Gray R, Benedetti J et al. End Points for Colon Cancer Adjuvant Trials: Observations and

- Recommendations based on Individual Patient Data from 20,898 Patients Enrolled onto 18 Randomized Trials from the ACCENT Group. *J Clin Oncol* 2007; 10: 4569-4574.
51. André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Toulam C et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3109-16.
52. Wolpin BM, Mayer RJ. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology* 2008; 134: 1296-1310.
53. Chau I, Cunningham D. Treatment in advanced colorectal cancer: what, when and how?. *Br J Cancer* 2009; 100: 1704-1719.
54. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metast Rev* 2004; 23:11-27.
55. Lengauer C, Kinzler K, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancer. *Nature* 1998; 396: 643-649.
56. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Rev* 2004; 10 (8): 789-799.
57. Grady WM. Colorectal cancer: molecular biology and genetics. In *Principles and Practice of Gastrointestinal Oncology*. Edit by Kelsen DP, Daly JM, Kern SE, Levin B, Tepper JE, Van Cutsem. Lippincott Williams and Wilkins. 2th edn. Philadelphia. 2008; pp: 539-553.
58. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular basis of colorectal cancer. *New Engl J Med* 2009; 361: 2449-60.
59. Weisenberg DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MD et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006; 38 (7): 787-793.
60. Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn* 2008; 10 (1): 13-27.
61. Fearon E, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
62. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; 50: 113-30.

63. Issa JP. Colon cancer: it's CIN or CIMP. *Clin Cancer Res* 2008; 1 (14): 5939-5940.
64. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
65. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol* 2003; 16 (4): 376-388.
66. Turner RR, Li C, Compton CC. Newer pathologic assessment techniques for colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13 (22 suppl): 6871s-6876s.
67. Zlobec I, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer: a critical review. *J Clin Pathol* 2008; 61 (5): 561-9.
68. Compton CC, Fielding P, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR et al. Prognostic factors in colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 979-994.
69. Quah HM, Chou JF, Gonen M, Shia J, Schrag D, Landmann RG et al. Identification of patients with high-risk stage II colon cancer for adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum* 2008; 51 (5): 503-7.
70. Figueredo A, Coombes ME, Mukherjee S. Adjuvant therapy for completely resected stage II colon cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; 16(3): CD005390.
71. Gertler R, Rosenberg R, Schuster T, Friess H. Defining a high-risk subgroup with colon cancer stages I and II for possible adjuvant therapy. *Eur J Cancer* 2009; 45: 2992-2999.
72. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlison I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 489-499.
73. Graziano F, Cascinu S. Prognostic molecular markers for planning adjuvant chemotherapy trials in Dukes' B colorectal cancer patients: how much evidence is enough?. *Ann Oncol* 2003; 14: 1026-1038.
74. Benderdraf R, Lalum H, Pyrhönen S. Prognostic and predictive molecular markers in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2004; 24: 2519-2530.
75. Allen WL, Johnston PG. Role of genomic markers in colorectal cancer treatment. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4545-4552.

76. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, MacDonald J et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5313-5327.
77. Duffy MJ, Van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Holinski-Feder E, Klapdor R et al. Tumor markers in colorectal cancer: European group on tumor markers (EGMT) guidelines for clinical use. *Eur J Cancer* 2007; 43: 1348-1360.
78. Berardi R, Giampieri R, Di Pietro PM, Scartozzi M, Cascinu S. Molecular factors in the treatment of B stages of colon cancer. *Cancer Chemother* 2008; 3:97-117.
79. Ramos FJ, Taberero J. Biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Chemother* 2008; 3: 194-203.
80. Prenzel N, Fisher OM, Streit S, Hart S, Ulrich A. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocrine-Related Cancer* 2001; 8: 11-31.
81. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002; 298:1912-1934.
82. Haley J, Whittle N, Bennet P et al. The human EGF receptor gene: structure of the 110 kb locus and identification of sequences regulating its transcription. *Oncogene Res* 1987; 1: 375-396.
83. Olayioye MA, Neve R, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signalling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO* 2000; 19: 3159-3167.
84. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untagling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell* 2001; 2:127-137.
85. Arteaga CL. Targeting HER I/EGFR: a molecular approach to cancer therapy. *Semin Oncol* 2003; 30 (3): 3-14.
86. Mendelshon J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21 (14): 2787-2799.
87. Zandi R, Larsen AB, Andersen P, Stockhausen MT, Poulsen HS. Mechanisms of oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell Signalling* 2007; 19: 2013-2023.

88. Hynes NE, Lane HA. ErbB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 341-354.
89. Spano JP, Fagard R, Soria JC, Rixe O, Khayat D, Milano G. Epidermal growth factor receptor signalling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives. *Ann Oncol* 2005; 16:189-194.
90. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signaling mechanism and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 2001; 37: S3-S8.
91. Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. *Exper Cell Res* 2003; 284: 2-13.
92. Shtiegman K, Yarden Y. The role of ubiquitylation in signaling by growth factors: implications to cancer. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 29-40.
93. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exper Cell Res* 2003; 284: 99-110.
94. Gschwind A, Fisher OM, Ulrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 361-370.
95. Penault-Llorca F, Bibeau F, Arnould L, Bralet MP, Rochaix P, Sabourin JC. EGFR expression in colorectal cancer and role in tumorigenesis. *Bull Cancer* 2005; 92: S5-11.
96. Dei Tos AP, Ellis I. Assessing epidermal growth factor receptor expression in tumors: what is the value of current test methods?. *Eur J Cancer* 2005; 41: 1383-1392.
97. Koretz K, Schlag P, Moller P. Expression of epidermal growth factor receptor in normal colorectal mucosa, adenoma, and carcinoma. *Virchows Arch* 1990; 416 (4): 343-349.
98. Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma. *Cancer* 2001; 92: 1331-1346.
99. McKay JA, Murray LJ, Curran S, Ross VG, Clark C, Murray GI et al. Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. *Eur J Cancer* 2002; 38 (17): 2258-2264.
100. Khorana AA, Ryan CK, Cox C, Eberly S, Sahasrabudhe DM. Vascular endothelial growth factor, CD 68, and epidermal growth factor receptor expression and survival in patients with Stage II and Stage III colon

- carcinoma: a role for the host response in prognosis. *Cancer* 2003; 97 (4): 960-968.
101. Resnick MB, Routhier J, Konkin T, Sabo E, Pricolo VE. Epidermal growth factor receptor, c-MET, beta-catenina, and p53 expression as prognostic indicators in stage II colon cancer: a tissue microarray study. *Clin Cancer Res* 2004; 10 (9): 3069-3075.
 102. Ooi A, Takenaha T, Li X, Suzuki S, Kunitomo K, Iino H et al Protein overexpression and gene amplification of HER-2 and EGFR in colorectal cancers: an immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization study. *Mod Pathol* 2004; 17 (8): 895-904.
 103. Cecarelli C, Piazzini G, Paterini P, Pantaleo MA, Taffurelli M, Santini D et al. Concurrent EGFR and Cox-2 expression in colorectal cancer: proliferation impact and tumor spreading. *Ann Oncol* 2005; 16 (suppl 4): 74-79.
 104. Spano JP, Lagorce C, Atlan D, Milano G, Domont J, Benamouzig R et al. Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol* 2005; 16: 102-108.
 105. Shia J, Klimstra DS, Li AR, Quin J, Satz L, Teruya-Feldstein J et al. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Mod Pathol* 2005; 18 (10): 1350-6.
 106. Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, De Vita F, Castellano P, Orditura M et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in colon cancer patients undergoing curative surgery. *Ann Surg Oncol* 2006; 13 (6): 823-835.
 107. Kountourakis P, Pavlakis K, Psyrris A, Rontogianni D, Xiros N, Patsouris E et al. Clinicopathological significance of EGFR and Her-2/neu in colorectal carcinomas. *Cancer J* 2006; 12 (3): 229-236.
 108. Tampellini M, Longo M, Cappia S, Bacillo E, Alabiso I, Volante M et al. Co-expression of EGF receptor, TGFalpha and S6 kinase is significantly associated with colorectal carcinomas with distant metastases at diagnosis. *Virchows Arch* 2007; 450 (3):321-328.
 109. Scartozzi M, Bearzi I, Berardi R, Mandolesi A, Pierantoni C, Cascinu S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) downstream signalling pathway

- in primary colorectal tumours and related metastatic sites: optimising EGFR-targeted treatment options. *Br J Cancer* 2007; 97 (1): 92-7.
110. Nicholson RI, Gee JMW, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001; 37: S9-S15.
111. Gupta RA, DuBois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibitors of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* 2001; 1:11-21.
112. Sinicrope FA, Gill S. Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23 (1-2): 63-75.
113. Koehne CH, Dubois RN. COX-2 inhibition and colorectal cancer. *Semin Oncol* 2004; 31 (2): 12-21.
114. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 145-182.
115. Garavito RM, Malkowski MG, DeWitt DL. The structures of prostaglandin endoperoxidase H synthases-1 and 2. *Prostaglandins others Lipid Mediat* 2002; 68-69: 129-152.
116. Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol* 2002; 190: 279-286.
117. Simmons DL, Bittling RM, Hla T. Cyclooxygenases isoenzymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 2004; 56:387-437.
118. Méric JP, Rottey S, Olausson K, Soria JC, Khayat D, Rixe, O et al. Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. *Crit Rev Hematol Oncol* 2006; 59: 51-64.
119. Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, Isaacs WB, De Marzo AM. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Letters* 2004; 215: 1-20.
120. Eisinger AL, Prescott SM, Jones DA, Stafforini DM. The role of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in colon cancer. *Prostaglandins and other Lipid Mediators* 2007; 82: 147-154.
121. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhia A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107 (4): 1183-1188.

122. Dimberg J, Samuelson A, Hugander A, Soderkvist P. Differential expression of cyclooxygenase 2 in human colorectal cancer. *Gut* 1999; 45 (5): 730-732.
123. Masunaga R, Kohno H, Dhar DK, Ohno S, Shiabkita M, Kinugasa S et al. Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2000; (6): 4064-4068.
124. Zhang H, Sun XF. Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with advanced stages of colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2002; 97 (4): 1037-1041.
125. Yamauchi T, Watanabe M, Kubota T, Hasegawa H, Ishii Y, Endo T et al. Cyclooxygenase-2 expression as a new marker for patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2002; 45:98-103.
126. Wu AW, Gu J, Ji JF, Li ZF, Xu GW. Role of COX-2 in carcinogenesis of colorectal cancer and its relationship with tumor biological characteristics and patient's prognosis. *World J Gastroenterol* 2003; 9 (9): 1990-1994.
127. Liang JT, Huang KC, Jeng YM, Lee PH, Lai HS, Hsu HC. Microvessel density, cyclooxygenase 2 expression, K-ras mutation and p53 overexpression in colonic cancer. *Br J Surg* 2004, 91 (3): 355-361.
128. Kim JY, Lim SJ, Park K. Cyclooxygenase-2 and c-erbB-2 expression in colorectal carcinoma assessed using tissue microarrays. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004; 12 (1): 67-70.
129. Wu AW, Gu J, Li ZF, Ji JF, Xu GW. COX-2 expression and tumor angiogenesis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10 (16): 2323-2326.
130. Soumaoro L, Uetake H, Higuchi T, Takagi Y, Enomoto M, Sigihara K. Cyclooxygenase-2 expression. A significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8465-8471.
131. Ceccarelli C, Piazi G, Paterini P, Pantaleo MA, Taffurelli M, Santini D et al. Concurrent EGFRr and Cox-2 expression in colorectal cancer: proliferation impact and tumor spreading. *Ann Oncol* 2005; 16 (suppl 4): 74-79.

132. Xiong B, Sun TJ, Hu WD, Cheng FL, Mao M, Zhou YF. Expression of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2005; 11 (8): 1105-1108.
133. Fux R, Schwab M, Thon KP, Gleiter CH, Fritz P. Cyclooxygenase-2 expression in human colorectal cancer is unrelated to overall patient survival. *Clin Cancer Res* 2005; 11 (13): 4754-4760.
134. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408: 307-310.
135. Liu MC, Gelmann EP. p53 gene mutations: case study of a clinical marker for solid tumors. *Semin Oncol* 2002; 3: 246-257.
136. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 275-283.
137. Tullo A, D'Erchia AM, Sbisá E. Methods for screening tumors for p53 status and therapeutic exploitation. *Expert Rev Mol Diagn* 2003; 3 (3): 289-301.
138. Toledo F, Wahk GM. Regulation of the p53 pathway: in vitro hypothesis in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 909-923.
139. Jorger AC, Fersh AR. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem* 2008; 77: 557-82.
140. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 749-758.
141. Levine AJ, Hu W, Feng Z. The p53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differentiation* 2006; 13: 1027-1036.
142. Polager S, Ginsberg D. p53 and E2f: partners in life and death. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 738-748.
143. Beroud C, Soussi T. The UMD-p53 database: new mutations and analysis tools. *Hum Mutat* 2003; 21: 176-181.
144. Iacopetta B. TP 53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat* 2003; 21 (3): 271-276.
145. Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia N et al. TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2005; 23 (30): 7518-28.

146. Soussi T, Beroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev* 2001; 1: 1-8.
147. Ferraz JM, Zinzindohoue F, Lecomte T, Cugnenc PH, Lorient MA, Beaune P et al. Impact of GSTM1, GSTP1 and NAT2 genotypes on KRAS2 and TP53 gene mutations in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2004; 110: 183-7.
148. Calistri D, Rengucci C, Seymour I, Lattuneddu A, Polifemo AM, Monti F et al. Mutation analysis of p53, K-ras, and Braf genes in colorectal cancer progression. *J Cell Physiol* 2005; 204 (2): 484-8.
149. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJ. The prognostic significance of K-ras, p53 and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut* 2005; 54 (9): 1283-6.
150. Hsieh JS, Lin SR, Chang MY, Chen FM, Lu CY, Huang TJ et al. APC, K-ras and p53 gene mutations in colorectal cancer patients: correlation clinicopathological features and postoperative surveillance. *Am Surg* 2005, 71 (4): 336-43.
151. Chang SC, Lin JK, Yang SH, Wang HS, Li AF, Chi CW. Relationship between genetics alterations and prognosis in sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer* 2006; 118: 1721-1727.
152. Curtin K, Slattery ML, Holubkov R, Edwards S, Holden JA, Samowitz WS. p53 alterations in colon tumors: a comparison of SCCP/sequencing and immunohistochemistry. *Appl Morphol* 2004; 12 (4): 380-386.
153. Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, De Vita F, Castellano A et al. Determination of molecular marker expression can predict clinical outcome in colon carcinomas. *Clin Cancer Res* 2004; 10 (10): 3490-9.
154. Prall F, Ostwald C, Nizze H, Barten M. Expression profiling of colorectal carcinomas using tissue microarrays: cell cycle regulatory proteins p21 p27 and p53 as immunohistochemical prognostic markers in univariate and multivariate analysis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004; 12 (2): 111-21.
155. Rosati G, Chiacchio R, Reggiardo G, Sanctis D, Manzione L. Thymidilate synthase expression, p53, bcl-2, ki-67 and p27 in colorectal cancer: relationship with tumor recurrences and survival. *Tumor Biol* 2004; 26 (5-6): 258-63.

156. Broll R, Busch P, Duchrow M, Oevermann E, Schawandner O, Farke S et al. Influence of thymidilate synthase and p53 expression on clinical outcome in patients with colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2005; 29 (2): 94-102.
157. Diez M, Pollán M, Ramos P, Villeta R, Ratia T, Hernández P et al. Variation in the prognostic value of p53 protein in relation to tumoral stage in patients with colorectal adenocarcinoma. *Cir Esp* 2005; 77 (4): 213-20.
158. Park IJ, Kim HC, Kim JS, Yu ES, Yu CS, Kim JC. Correlation between hMLH1/hMSH2 and p53 protein expression in sporadic colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2005; 53 (62): 450-4.
159. Losi L, Ponti G, Di Gregorio C, Marino M, Rossi G, Pedroni M et al. Prognostic significance of histological features and biological parameters stage I (pT1 and pT2) colorectal carcinoma. *Pathol Res Pract* 2006; 202: 663-670.
160. Popat S, Chen Z, Zhao D, Pan H, Nearle N, Chandler I et al. A prospective blinded analysis of thymidilate synthase and p53 expression as prognostic markers in the adjuvant treatment of colorectal cancer. *Ann Oncol* 2006; 17: 1810-1817.
161. Fernández-Cebrián JM, Nevado M, Vorwald P, Pardo M, Martín J, Pacheco P et al. Can the clinical outcome in stage II colon carcinomas be predicted by determination of molecular marker expression?. *Clin Transl Oncol* 2007; 9: 663-670.
162. Lan YT, Chang SC, Li AF, Lin TC, Chen WS, Jiang JK et al. p53 protein accumulation as a prognostic marker in sporadic colorectal cancer. *J Colorectal Dis* 2007; 22: 499-506.
163. Nehls O, Okech T, Hsieh CJ, Enzinger T, Sarabia M, Borchard F et al. Studies on p53, Bax, and bcl-2 protein expression and microsatellite instability in stage III (UICC) colon cancer treated by adjuvant chemotherapy: major prognostic impact of proapoptotic BAX. *Br J Cancer* 2007; 96: 1409-1418.
164. Munro AJ, Lain S, Lane DP. p53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. *Br J Cancer* 2005; 92 (5): 434-444.

165. Gerdes J, Li L, Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991; 138 (4): 867-873.
166. Scholzen T, Dimmer C, Wohlenberg C et al. Novel splice forms of the Ki-67 mRNA. *Eur J Cell Biol* 1997; 72: 40-44.
167. Duchrow M, Schluter C, Wohlenberg C, Flad HD, Gerdes J. Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. *Cell Prolif* 1996; 29:1–12.
168. Kubbuta MH, Key G, Duchrow, Schluter C, Flad HD, Gerdes J. Epitope analysis of antibodies recognising the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by the antibody. *J Clin Pathol* 1994; 47: 524-528.
169. Wu Y, Luo H, Kanaan N, Wu J. The proteasome controls the expression of proliferation-associated nuclear antigen Ki-67. *J Cell Biochem* 2000; 76: 596-604.
170. Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception?. *Histopathology* 2002; 40: 2-11.
171. Urruticoechea A, Smith IA, Dowsett M. Proliferation marker ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7212-7220.
172. Schmidt MH, Broll R, Bruch HP, Bögler O, Duchrow M. The proliferation marker pKi-67 organizes the nucleolus during the cell cycle depending on Ran and Cyclin B. *J Pathol* 2003; 199: 18–27.
173. Spyrtos F, Ferrero-Pous M, Trassard M et al. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implications of the MIB-1 cutoff value. *Cancer* 2002, 94:2151-2159.
174. Endl E, Gerdes J. The Ki-67 protein: fascinating forms and unknown function. *Exp Cell Res* 2000; 182:311-322.
175. Shepherd NA, Richmen PI, England J. Ki-67 derived proliferative activity in colorectal adenocarcinoma with prognostic correlations. *J Pathol* 1988; 155: 213-219.

176. Kubota Y, Petras RE, Easley KA, Bauer TW, Tubss RR, Fazio V W. Ki-67-determined growth fraction versus standar staging and grading parameters in colorectal carcinoma. *Cancer* 1992; 70: 2602-9.
177. Palmqvist R, Stenling R, Öberg A, Landberg G. Prognostic significance of 27kip1 expression in colorectal cancer: a clinico-pathological characterization. *J Pathol* 1999; 188: 18-23.
178. Bhatavdekar JM, Patel DD, Chikhlikar PR, Shah NG, Vora HH, Ghosh N et al. Molecular markers are predictors of recurrence and survival in patients with Dukes B and Dukes C colorectal adenocarcinomas. *Dis Colon Rectum* 2001; 44:523-533.
179. Weber JC, Nakano H, Bachellier P, Oussoultzoglou E, Inoue K, Shimura H et al. Is a proliferation index of cancer cells a reliable prognostic factor after hepatectomy in patients with colorectal liver metastases?. *Am J Surg* 2001; 182: 81-88.
180. Akino F, Mitomi H, Nakamura T, Ohtani Y, Ichinoe M, Okayasu I. High apoptotic activity and low ephitelial cell proliferation with underexpression of p21^{Waf1/cip1} and p27^{Kip1} of mucinous carcinomas of the colorectum. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 908-915.
181. Allegra CJ, Parr AL, Wold LE, Mahoney MR, Sargent DJ, Jonshton P et al. Investigation of the prognostic and predictive value of thymidylate synthase, p53, and Ki-67 in patients with locally advanced colon cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20:1735-1743.
182. Scopa CD, Tsamandas CD, Zolota V, Kalofonos HP, Batistatou A, Vagianos C. Potential role of bcl-2 and Ki-67 expression and apoptosis in colorectal carcinoma. *Digest Dis Sci* 2003; 48 (10): 1990-1997.
183. Valera V, Yokoyama M, Walter B, Okamoto H, Suda T, Hatakeyama K. Clinical significance of Ki-67 proliferation index in disease progresion and prognosis of patients with resected colorectal carcinoma. *Br J Surg* 2005; 92: 1002-1007.
184. Hilska M, Collan YU, Laine VJO, Kössi J, Hirsimäki P, Laato M et al. The significance of tumor markers for proliferation and apoptosis in predicting survival in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 2197-2208.
185. Cohen T, Prus D, Shia J, Abu-Wasel B, Pinto MG, Freund HR et al. Expression of p53, p27 and ki-67 in colorectal cancer patients of various

- ethnic origins: clinical and tissue microarray based analysis. *J Surg Oncol* 2008; 97 (5): 416-422.
186. Diehl JA. Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biol Ther* 2002; 1(3): 226-231.
187. Musgrove EA. Cyclins. Roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation. *Growth Factors* 2006; 24 (1): 13-19.
188. Kim JK, Diehl JA. Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. *J Cell Physiol* 2009; 220: 292-296.
189. Viallard JF, Lacombe F, Belloc F, Pellegrin JL, Reiffers J. Molecular mechanisms controlling the cell cycle: main considerations and implications in oncology. *Cancer Radiother* 2001; 5: 109-129.
190. Vermeulen K, Van Bockstaele DRV, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2003; 36: 131-149.
191. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; 13:1501-1512.
192. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004; 145 (12): 5439-5447.
193. Alao JP. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Molecular Cancer* 2007; 2 (6):24- 39.
194. Tashiro E, Tsuchiya A, Imoto M. Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. *Cancer Sci* 2007; 98 (5): 629-635.
195. Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control *Gene* 2002; 299:35-55.
196. Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 558-571.
197. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:153-166.
198. Lee YM, Sicinski P. Targeting cyclins and cyclin-dependent kinases in cancer. *Cell Cycle* 2006; 5 (18): 2110-2114.

199. Aggarwall P, Lessie MD, Lin DI, Pontano L, Gladden AB, Nuskey B et al. Nuclear accumulation of cyclin D1 during phase S inhibits Cul4-dependent Cdt proteolysis and triggers p53-dependent DNA replication. *Genes Dev* 2007; 21: 2908-2922.
200. Tetsu O, McCormick F. β -catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; 398:422-426.
201. Hult J, Wang C, Albanese C, Di Vizio D, Mahmood R, Augenlicht LH et al. Cyclin D1 genetic heterozygosity regulates colonic epithelial cell differentiation and tumor number in ApcMin mice. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 7598-7611.
202. Bondi J, Husdal A, Bukholm G, Nesland JM, Bakka A, Bukholm IR. Expression and gene amplification of primary (A, B1, D1, D3 and E) and secondary (C and H) cyclins in colon adenocarcinomas and correlation with patient outcome. *J Clin Pathol* 2005; 58 (5): 509-14.
203. Balcerczak E, Pasz-Walczak G, Kumor P, Panczyk M, Kordek R, Wierzbicki R et al. Cyclin D1 protein and CCDN1 gene expression in colorectal cancer. *EJSO* 2005; 31:721-726.
204. Maeda K, Chung YS, Kang SM, Ogawa M, Onoda N, Nakata B et al. Overexpression of cyclin D1 and p53 associated with disease recurrence in colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1998; 74: 310-315.
205. Palmqvist R, Stenling R, Öberg A, Landberg G. Expression of cyclin D1 and retinoblastoma protein in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1999; 34 (10): 1575-1581.
206. Bukholm IK, Nesland JM. Protein expression of p53, p21(Waf1/Cip1), bcl-2, Bax, cyclin D1 and pRb in human colon carcinomas. *Virchows Arch* 2000; 436 (3):224-8.
207. Holland TA, Elder J, McCloud JM, Hall C, Deakin M, Fryer A et al. Subcellular localization of cyclin D1 protein in colorectal tumors is associated with p21 (Waf1/Cip 1) expression and correlates with patient survival. *Int J Cancer* 2001; 95 (5): 20-6.
208. Pasz-Walczak G, Kordek R, Faflik M. p21(Waf1) expression in colorectal cancer: correlation with p53 and cyclin D1 expression, clinicopathological parameters and prognosis. *Pathol Res Pract* 2001; 197: 683-689.

209. McKay JA, Douglas JJ, Ross VG, Curran S, Loane JF, Ahmed FY et al. Analysis of cell-cycle checkpoint proteins in colorectal tumours. *J Pathol* 2002; 196:386-393.
210. Lassman S, Tang L, Capanu M, Brabletz T, Schöflin A, Zurhausen A et al. Predictive molecular markers for colorectal cancer patients with resected liver metastasis and adjuvant chemotherapy. *Gastroenterology* 2007; 133 (6):1831-9.
211. Ioachim E. Expression patterns of cyclins D1, E, and cyclin-dependent kinase inhibitors p21 waf1/cip1, p27 kip1 in colorectal carcinoma: correlation with other cell cycle regulators (pRb, p53 and ki67 and PCNA) and clinicopathological features. *Int J Clin Pract* 2008; 62 (11): 1736-43.
212. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; 13: 1501-1512.
213. Hengst L, Reed SI. Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998; 227: 25-41.
214. Gartel AL, Tyner AL. The growth-regulatory role of p21 (Waf1/cip1). *Progr Mol Subcell Biol* 1998; 20:43-71.
215. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*; 1993; 366:701-704
216. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75 (4): 805-816.
217. El-Diery WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75 (4): 817-825.
218. Javelaud D, Besançon F. CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Hematol*. April 2001.
219. Ocker M, Schneider-Stock R. Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21^{WAF1/CIP1}. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 1367-1374.
220. Abukhdeir AM, Park BO. p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med* 2008; 10:1-16.
221. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 400-414.

222. Gartel AL, Tyner AL. The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2002; 1:639-649.
223. Liu S, Bishop WR, Liu M. Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat* 2003; 6 (4). 183-95.
224. Gartel AL, Radhakrishnan SK. Lost in transcription: p21 repression, mechanism, and consequences. *Cancer Res* 2005; 65:3980-85.
225. Child ES, Mann DJ. The intricacies of p21 phosphorylation. Protein/protein interactions, subcellular localization. *Cell Cycle* 2006; 5 (12): 1313-1319.
226. Gartel AL, Tyner AL. Transcriptional regulation of the p21 (WAF1/CIP1) gene. *Exp Cell Res* 1999; 246(2): 280-289.
227. Martin-Caballero J, Flores JM, Garcia-Palencia P, Serrano M. Tumor susceptibility of p21Waf1/Cip1-deficient mice. *Cancer Res* 2001; 61:6234-6238.
228. Poole AJ, Heap D, Carroll RE, Tyner A L. Tumor suppressor functions for the Cdk inhibitor p21 in the mouse colon. *Oncogene* 2004; 23: 8128–8134.
229. Barboza JA, Liu G, Ju Z, El-Naggar AK, Lozano G. p21 delays tumor onset by preservation of chromosomal stability. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2006; 103: 19842-19847.
230. Yang WC et al. Targeted inactivation of the p21 (WAF/cip1) gene enhances Apc-initiated tumor formation and the tumor-promoting activity of a Western-style high-risk diet by altering cell maturation in the intestinal mucosa. *Cancer Res* 2001; 61: 565-569.
231. Yang W et al. Inactivation of p21 WAF1/CIP1 enhances intestinal tumor formation in Muc2^{-/-} mice. *Am Pathol* 2005; 166: 1239-1246.
232. Ogino S. et al. Down-regulation of p21 (CDKN1A/CIP1) is inversely associated with microsatellite instability and CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *J Pathol* 2006; 210: 147-154.
233. Shioara M, Koike K, Komiyama A, Koeffler HP. p21 WAF1 mutations and human malignancies. *Leuk Lymphoma* 1997; 26:35-41.
234. Fang JY, Lu YY. Effects of histone acetylation and DNA methylation of p21 (Waf1) regulation. *World J Gastroenterol* 2002; 8 (3): 400-405.

235. Doglioni C, Pelosiot P, Laurino L, Macri E, Meggiolaro E, Favrettii F, Barbareschis M. p21/WAF1/CIP1 expression in normal mucosa and in adenomas and adenocarcinomas of the colon: its relationship with differentiation. *J Pathol* 1996; 179: 248-253.
236. Yasui W, Akama Y, Yokozaki H, Semba S, Kudo Y, Shimamoto F et al. Expresión of p21^{WAF1/CIP1} in colorectal adenomas and adenocarcinomas and its correlation with p53 protein expression. *Pathol Int* 1997; 47: 470-477.
237. Girlando S, Slomp P, Caffo O, Amichetti M, Togni, Dvornik G et al. p21 Expression in colorectal carcinomas: a study on 103 cases with analysis of p53 gene mutation/expression and clinico-pathological correlations. *Virchows Arch* 1999; 435:559–565.
238. Viale G, Pellegrini C, Mazzarol G, Maisonneuve P, Silverman ML, Bosari S. p21WAF1/CIP1 expression in colorectal carcinoma correlates with advanced disease stage and p53 mutations. *J. Pathol* 1999; 187: 302–307.
239. Ropponen KM, Kellokoski JK, Lipponen PK, Pietiläinen T, Eskeliken MJ, Alhava EM et al. p21/WAF1 expression in human colorectal carcinoma: association with p53, transcription factor AP-2 and prognosis. *Br J Cancer* 1999; 81:133-140.
240. Zirbes TK, Baldous SE, Moening SP, Nolden S, Kunze D, Shafiadeh ST et al. Prognostic impact of p21/waf1/cip1 in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2000; 89: 14-18.
241. Watanabe T, Wu T, Catalano PJ, Ueik T, Satriano R, Haller DG et al. Molecular predictors of survival afer adyuvant chemotherapy for colon cancer. *NEJM* 2001; 344(16): 1196-1206.
242. Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Ogawa A, Dorfman I, Loda M et al. Down-regulation of p21(CDKN1A/CIP1) is inversaly associated with microsatellite instabiity and CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *J Pathol* 2006; 210:147-154.
243. Mitomi H, Ohkura Y, Fukui N, Kanazawa H, Kishimoto I, Nakamura T et al. p21^{Waf1/Cip1} expression in colorrectal carcinomas is related to Kras mutations and prognosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19 (10): 883-889.

244. Tornillo L, Lugli A, Zlobec I, Willi N, Glatz K, Lehman F et al. Prognostic value of cell cycle and apoptosis regulatory proteins in mismatch repair-proficient colorectal cancer. *Am J Pathol* 2007; 127: 114-123.
245. Lam AKY, Ong K, Ho YH. hTERT expression in colorectal adenocarcinoma: correlations with p21, p53 expressions and clinicopathological features. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23: 587-594.
246. Noske A, Lipka S, Budczies J, Müller K, Loddenkemper C, Bhur HJ et al. Combination of p53 expression and p21 loss has an independent prognostic impact on sporadic colorectal cancer. *Oncology Rep* 2009; 22:3-9.
247. Ogino S, Nosho K, Shima K, Baba Y, Irahara N, Kirkner GJ et al. p21 Expression in colon cancer and modifying effects of patient age and body mass index on prognosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18 (9): 2513–2521.
248. Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, Kulig E, Qian X, Cheville JC et al. p27^{kip1}: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol* 1999; 154 (2): 313-323.
249. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; 13:1501-1512.
250. Viglietto G, Motti ML, Fusco A. Understanding p27Kip1 deregulation in cancer. Downregulation or mislocalization?. *Cell Cycle* 2002; 1 (6): 394-400.
251. Belletti B, Nicoloso MS, Schipacassi M, Chimienti E, Berton S, Lovat F et al. p27^{kip1} functional regulation in human cancer: a potential target for therapeutics designs. *Current Medicinal Chemistry* 2005; 12: 1589-1605.
252. Borriello A, Cucciolla V, Oliva A, Zappia V, Ragione FD. p27^{Kip1} metabolism. *Cell Cycle* 2007; 6 (9): 1053-1061.
253. Sgambato A, Cittadini A, Faraglia B, Weinstein IB. Multiple functions of p27^{Kip1} and its alterations in tumor cells: a review. *J Cell Physiol* 2000, 183: 18-27.
254. Larrea MD, Wander SA, Slingerland JM. p27 as Jekyll and Hyde. Regulation of cell cycle and cell motility. *Cell Cycle* 2009; 8 (21): 3455-3461.

255. Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends in Cell Biol* 2003; 13 (2): 65-69.
256. Chu IM, Hengs L, Slingerland JM. The cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 253-267.
257. Philipp-Staheli P, Payne SR, Kemp CJ. p27 (kip1): regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer. *Exp Cell Res* 2001; 264: 148-168.
258. Le Sage C, Nagel R, Agami R. Diverse ways to control p27^{Kip1} function: miRNAs come into play. *Cell Cycle* 2007; 6:2742-2749.
259. Susaki E, Nakayama KI. Multiple mechanisms for p27^{Kip1} translocation and degradation. *Cell Cycle* 2007; 24: 3015-3020.
260. Vervoorts J, Lüscher B. Post-translational regulation of the tumor suppressor p27^{Kip1}. *Cell Mol Life Sci* 2008, 65: 3255-3264.
261. Polyak K. The p27^{Kip1} tumor suppressor gene: still a suspect or proven guilty?. *Cancer Cell* 2006; 11:352-354.
262. Koff A. How to decrease p27^{Kip1} levels during tumor development. *Cancer Cell* 2006; 2:75-76.
263. Fero MI, Randel F, Gurley KF, Roberts JM, Kemp CJ. The murine gene p27^{Kip1} is haplo-insufficient for tumor suppression. *Nature* 1998; 396: 177-180.
264. Philipp-Staheli P, Kim KH, Payne S, Gurley KE, Kiggitt D, Longton G et al. Pathway-specific tumor suppression: reduction of p27 accelerates gastrointestinal tumorigenesis in Apc mutant mice, but not in smad3 mutant mice. *Cancer Cell* 2002; 1: 355-368.
265. Ponce-Castaneda MV, Lee MH, Latres E, Polyak K, Lacombe L, Montgomery K et al. p27^{Kip1}: chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors. *Cancer Res* 1995; 55:1211-1214.
266. Slingerland JM, Pagano M. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol* 2000; 183: 10-17.
267. Nicleleit I, Zender S, Kosstaz U, Malek NP. p27^{Kip1}: a target for tumor therapies?. *Cell Division* 2007; 2:13.

268. Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med.* 1997; 3 (2); 231-234.
269. Belluco C, Esposito G, Bertorelle R, Del Mistro AR, MD, Fascina A, Vieceli G et al. Absence of the cell cycle Inhibitor p27Kip1 protein predicts poor outcome in patients with stage I-III colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 1999, 6 (1): 19-25.
270. Tenjo T, Toyoda M, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T, Tanaka K et al. Prognostic significance of p27(kip1) protein expression and spontaneous apoptosis in patients with colorectal adenocarcinomas. *Oncology* 2000; 58 (1): 45-51.
271. Yao Y, Eu KW, Choen FS, Cheah PY. Down-regulation of p27 is a significant predictor of poor overall survival and may facilitate metastasis in colorectal carcinomas. *Int. J. Cancer* 2000; 89: 213–216.
272. Zhang H, Sun XF. Loss of p27 expression predicts poor prognosis in patients with Dukes´B stage or proximal colorectal cancer. *Int J Oncol* 2001; 19:49-52.
273. Kobayashi K, Shiraishi T, Tonouchi D, Miki C, Konoumi M. 5-FU improves p27-related poor prognosis in patients with Astler-Coller B2-C colorectal carcinomas. *Oncol Rep* 2002; 9:29-33.
274. Rossi HA, Liu Q, Banner B, Hsieh CC, Savas C, Savarese D. The prognostic value of invariant chain (II) and Her-2/neu expression in curatively resected colorectal cancer. *Cancer J* 2002; 8:268-275.
275. Manne U, Jhala NC, Jones J, Weiss HL, Chatla C, Meleth S, et al. Prognosis significance of p27 (kip-1) expresión in colorectal adenocarcinomas is associated with tumor stage. *Clin Cancer Res.* 2004; 10 (5); 1743-1752.
276. Wu JT, Kakar S, Nelson RL, Mihalov ML. Prognostic Significance of DCC and p27Kip1 in Colorectal Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005; 13 (1): 45-54.
277. Sarli L, Bottarelli L, Azzoni C, Campanini N, Di Cola G, Barilli AL et al. Loss of p27 expression and microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *Surg Oncol* 2006; 15 (2): 97-106.

278. Watson NFS, Durrant LG, Scholefield JH, Madjd Z, Scrimgeour D, Spendlove I et al. Cytoplasmic expression of p27^{kip1} is associated with a favourable prognosis in colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol* 2006; 12 (39): 6299-6304.
279. Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Yamaji T, Loda M, Fuchs CS. Loss of nuclear p27 (CDKN1B/KIP1) in colorectal cancer is correlated with microsatellite instability and CIMP. *Mod Pathol* 2007; 20 (1): 15-22.
280. Li M, Li JY, Zhao AL, He JS, Zhou LX, Li YA et al. Survival stratification panel of colorectal carcinoma with combined expression of carcinoembryonic antigen, matrix metalloproteinases-2 and p27 kip1. *Dis Colon Rectum* 2007; 50 (11): 1887-1898.
281. Zlobec I, Minoo P, Baumhoer D, Baker K, Terracciano L, Jass JR et al. Multimarker phenotype predicts adverse survival in patients with lymph node-negative colorectal cancer. *Cancer* 2008; 112 (3): 495-502.
282. Cohen T, Prus D, Shia J, Abu-Wasel B, Pinto MG, Freund HR et al. Expression of p53, p27 and ki-67 in colorectal cancer patients of various ethnic origins: clinical and tissue microarray based analysis. *J Surg Oncol* 2008; 97 (5): 416-422.
283. Longley, D. B., Harkin, D. P. and Johnston, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:330–338.
284. Berger SH, Berger FG, Lebioda L. Effects of ligand binding and conformational switching on intracellular stability of human thymidilate synthase. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1696 (1): 15-22.
285. Costi MP, Ferrari S, Venturelli A, Caló S, Tondi D, Barlocco D. Thymidilate synthase structure, function and implications in drug discovery. *Current Medicinal Chemistry* 2005; 12: 2241-2258.
286. Carreras CW, Santi DV. The catalytic mechanism and structure of thymidilate synthase. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 721-762.
287. Liu J, Schmitz JC, Lin X, Tai N, Yan W, Farrell M et al Thymidilate synthase as a translational regulator of cellular gene expression. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1587: 174-182.

288. Chu E, Callender MA, Farrell MP, Schmitz JC. Thymidilate synthase inhibitors as anticancer agents: from bench to bedside. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003; 52 (1): S80-S89.
289. Forsthoefel AM, Peña MM Xing YY, Rafique Z, Berger FG. Structural determinants for the intracellular degradation of human thymidylate synthase. *Biochemistry* 2004; 43:1972–1979.
290. Peña MM, Xing YY, Koli S, Berger FG. Role of N-terminal residues in the ubiquitin-independent degradation of human thymidylate synthase. *Biochem J* 2006; 394; 355-363.
291. Ackland SP, Clarke SJ, Beale P, Peters GJ. Thymidilate synthase inhibitors. *Update on Cancer Therapeutics* 2006; 1: 403-427.
292. Rahman L, Voeller D, RahmanM, Lipkowitz S, Allegra C, Barret JC et al. Thymidilate synthase as an oncogen: a novel role for an essential DNA synthesis enzyme. *Cancer Cell*; 2004; 5: 341-350.
293. Derenzini M, Montanaro L, Treré D, Chillá A, Tazzari PL, Dall’Olio F et al. Thymidylate synthase protein expression and activity are related to the cell proliferation rate in human cancer cell lines. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2002; 55:310–314.
294. Peters GJ, Backus HHJ, Freemantle S, van Triest B, Codacci-Pisanelli G, van der Wilt CL et al. Induction of thymidilate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1587: 194-205.
295. Banerjee D, Mayer-Kuckuk P, Capioux G, Budak-Alpdogan Y, Gorlick R, Bertino JR. Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidilate synthase. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1587: 164-173.
296. Showalter SL, Showalter TN, Witkiewicz A, Havens R, Kennedy EP, Hucl T e al. Evaluating the drug-target relationship beteewn thymidilate synthase expression and tumor rersponse to 5-fluorouracil. *Cancer Biol Ther* 2008; 7 (7): 986-994.
297. Aschele C, Lonardi S, Monfardini S. Thymidilate synthase expression as a predictor of clinical response to fluropyrimidine-based chemotherapy in advaced colorectal cancer. *Cancer Treat Rev* 2002; 28:27-47.

298. Bertino JR, Banerjee D. Is the measurement of thymidylate synthase to determine suitability for treatment with 5-Fluoropyrimidines ready for prime time?. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1235-1239.
299. Popat S, Matakidou A, Houlston RS. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2004; 22 (3): 529-536.
300. Takenoue T, Nagawa H, Matsuda K, Fujii S, Nita ME, Hatano K et al. Relation between thymidylate synthase expression and survival in colon carcinoma, and determination of appropriate application of 5-fluorouracil by immunohistochemical method. *Ann Surg Oncol* 2000; 7 (3): 193-198.
301. Tomiak A, Vincent M, Earle CC, Johnston PG, Kocha W, Taylor M et al. Thymidylate synthase expression in stage II and III colon cancer. *Am J Clin Oncol* 2001; 24 (6): 597-602.
302. Edler D, Glimelius B, Hallström M, Jakobsen A, Jonston P, Magnusson I et al. Thymidylate synthase expression in colorectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1721-1728.
303. Nanni O, Volpi A, Frassinetti GL, De Paola F, Granato AM, Dubini A et al. Role of biological markers in the clinical outcome of colon cancer. *Br J Cancer* 2002; 87: 868-875.
304. Kornmann M, Schwabe W, Sanders S, Kron M, Strater J, Polat S et al. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression levels: predictors for survival in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4166-4174.
305. Allegra C, Paik S, Colangelo L, Parr A, Kirsch I, Kim G et al. Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Duke's B and C colon cancer: a national cancer institute-national surgical adjuvant breast and bowel project collaboration study. *J Clin Oncol* 2003; 21: 241-250.
306. Kamoshida S, Matsuoda H, Shiogama K, Matsuyama A, Shimomura R, Inada K et al. Immunohistochemical analysis of thymidylate synthase, p16 (INK4a), cyclin-dependent kinase 4 and cyclin D1 in colorectal cancers receiving preoperative chemotherapy: significance of p16

- (INK4a)-mediated cellular arrest as an indicator of chemosensitivity to 5-fluorouracil. *Pathol Int* 2004; 54: 564-575.
307. Ricciardiello L, Ceccarelli C, Angiolini G, Pariali M, Chieco P, Paterni P et al. High thymidylate synthase expression in colorectal cancer with microsatellite instability: implications for chemotherapeutic strategies. *Clin Cancer Res* 2005; 11 (11): 4243-4340.
308. Westra JL, Hollema H, Schaapveld M, Platteel I, Oien KA, Keith WN et al. Predictive value of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase protein expression on survival in adjuvantly treated stage III colon cancer patients. *Ann Oncol* 2005; 16: 1646-1653.
309. Aguiar S, Lopes A, Soares FA, Rossi BM, Ferreira FO, Nakagawa WT et al. Prognostic and predictive value of thymidylate synthase expression in patients with non-metastatic colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 2005; 25 (pub).
310. Sinicrope FA, Rego R, Halling KC, Foster NR, Sargent DJ, La Plant B et al. Thymidylate synthase expression in colon carcinomas with microsatellite instability. *Clin Cancer Res* 2006; 12(9): 2738-2744.
311. Popat S, Wort R, Houlston RS. Inter-relationship between microsatellite instability, thymidylate synthase expression, and p53 status in colorectal cancer and implications for chemoresistance. *BMC Cancer* 2006; 6: 150.
312. Odin E, Wettergren Y, Nilsson S, Carlsson G, Gustavson B. Colorectal carcinomas with microsatellite instability display increased thymidylate synthase gene expression levels. *Clin Colorectal Cancer* 2007; 6 (10): 720-27.
313. Lassman S, Henning M, Rosenberg R, Nährig J, Schreglmann J, Krause J et al. Thymidine phosphorylase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase mRNA expression in primary colorectal tumors-correlation to tumor histopathology and clinical follow-up. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21: 238-247.
314. Qiu LX, Tang Q, Bai JL, Qian XP, Li RT, Liu BR et al. Predictive value of thymidylate synthase expression in advanced colorectal cancer patients receiving fluoropyrimidine-based chemotherapy: Evidence from 24 studies. *Int J Cancer* 2008; 123: 2384-2389.

315. Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M. Reporting results of cancer treatment. *Cancer* 1988; 47: 207-214.
316. Mallet S, Timmer A, Sauerbrei W, Altman DG. Reporting of prognostic studies of tumor markers: a review of published articles in relation to REMARK guidelines. *Br J Cancer* 2010, 102: 173-180.
317. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer Sixth Edition Staging. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:1420-5.
318. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B et al. Colorectal cancer. *Lancet* 2010; 375: 1030-1047.
319. Catenacci DVT, Kozloff M, Kindler HL. Personalized colon cancer care in 2010. *Semin Oncol* 2011; 38 (2): 284-308.
320. Green F, Steward A, Norton H. A new TNM staging strategy for node positive (stage III) colon cancer: an analysis of 50.042 patients. *Ann Surg* 2002; 236: 416-421.
321. Grothey A. Adjuvant chemotherapy in colon cancer-is it worth it? *Eur J Cancer* 2010; 46: 1768-9.
322. Sargent D, Sobrero A, Grothey A, O'Connell MJ, Buyse M, André T et al. Evidence for cure by adjuvant therapy in colon cancer: observations based on individual patient data from 20.898 patients on 18 randomized trials. *J Clin Oncol* 2009; 27: 872-7.
323. Van Scahaeybroeck S, Allen WL, Turkington RC, Johnston PG. Implementing prognostic and predictive biomarkers in CRC clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol* 2010; 8: 222-232.
324. Brennan DJ, O'Connor DPO, Rexhepaj E, Ponten F, Gallagher WM. Antibody-based proteomics: fast-tracking molecular diagnostics in oncology. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 605-627.
325. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 4: 646-674.
326. Harris TJR, McCormick F. The molecular pathology of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2010, 7: 251-265.
327. Weinstein IB, Joe A. Oncogene addiction. *Cancer Res* 2008, 68: 3077-3080.

328. Valentini AM, Pirelli M, Caruso ML. EGFR-targeted therapy in colorectal cancer: does immunohistochemistry deserve a role in predicting the response to cetuximab?. *Curr Opin Mol Ther* 2008; 10 (2): 124-131.
329. Leung SP, Griffith OL, Masoudi H, Gown A, Jones S, Phang T et al. Clinical utility of type 1 growth factor receptor expression in colon cancer. *Am J Surg* 2008; 195: 604-610.
330. Ljuslinder I, Melin, B, Henrikson ML, Öberg A, Palmqvist R. Increased epidermal growth factor receptor expression at the invasive margin is a negative prognostic factor in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2011; 128: 2031-2037.
331. Molalei M, Pejhan S, Nayer BN, Moradi A, Ghiasi S, Zali MR. Human epidermal growth factor receptor-2 family in colorectal adenocarcinoma: correlation with survival and clinicopathological findings. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; 21: 289-293.
332. Rego RL, Foster NR, Smyrk TC, Le M, O'Connell MJ, Sargent DJ, Windschitl H et al. Prognostic effect of activated EGFR expression in human colon carcinomas: comparison with EGFR status. *Br J Cancer* 2010; 102:165-172.
333. Atkins D, Reiffen KA, Tegtmeier CL, Winther H, Bonato MS, Storkel S. Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 2004; 52 (7): 893-901.
334. Bhargava R, Chen B, Klimstra DS, Saltz LB, Hedvat C, Tang LH et al. Comparison of two antibodies for immunohistochemical evaluation of epidermal growth factor receptor expression in colorectal carcinomas, adenomas, and normal mucosa. *Cancer* 2006; 106: 1857-62.
335. Penault-Llorca F, Cayre A, Arnould L, Bibeau F, Bralet MP, Rochaix P et al. Is there an immunohistochemical technique definitively valid in epidermal growth factor receptor assessment?. *Oncology Reports* 2006; 16:1173-1179.
336. Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Willimas AC, Paraskeva C et al. The Cox-2/PGE₂ pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumor microenvironment. *Carcinogenesis* 2009; 30 (3): 377-386.

337. Wu WK, Sung JJ, Lee CW, Yu J, Cho CH. Cyclooxygenase-2 in tumorigenesis of gastrointestinal cancers: an update on the molecular mechanisms. *Cancer Letters* 2010; 295: 7-16.
338. Wang WK, DuBois RN. The role of Cox-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene* 2010; 29: 781-788.
339. Zafirellis K, Agrogiannis G, Zachaki A. Prognostic value of Cox-2 immunohistochemical expression evaluated by quantitative image analysis in colorectal cancer. *APMIS* 2008; 116 (10): 912-22.
340. Lim SC, Lee TB, Choi CH, Ryu SY, Min YD, Kim KJ. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 expression and nuclear p53 accumulation in patients with colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2008; 97 (1): 51-56.
341. Ogino S, Kirker GJ, Nosho K, Irahara N, Kure S, Shima K et al. Cyclooxygenase-2 expression and nuclear p53 accumulation in patients with colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2008; 1 (97): 51-56.
342. Antonacopoulou AG, Tsamandas AC, Petsas T, Liava A, Scopa CD, Papavassiliou AG et al. EGFR, HER-2 and COX-2 levels in colorectal cancer. *Histopathology* 2008; 53 (6): 698-706.
343. Zhou ZG, Wu XJ, Li LR, Peng ZH, Ding PR, Wang RJ et al. A multivariate analysis of prognostic determinants for stages II and III colorectal cancer in 141 patients. *Chin Med J* 2011; 124 (14): 2132-2135.
344. Sundov Z, Kunac N, Capkun V, Kalebic M, Druzijanic N, Puljak L et al. Cyclooxygenase-2 in Dukes B colon cancer. *Hepogastroenterology* 2011; 58 (107-108): 763-768.
345. Peng ZH, Wan DS, Li LR, Chen G, Lu ZH, Wu XJ et al. Expression of COX-2, MMP-2 and VEGF in stage II and III colorectal cancer and the clinical significance. *Hepatogastroenterology* 2011; 58 (106): 369-76.
346. Wiman KG. Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to the cancer patient. *Oncogene* 2010; 29: 4245-4252.
347. Zaanan A, Culliere-Dartigues P, Guilloux A, Parc Y, Louvet C, de Gramont A et al. Impact of p53 expression and microsatellite instability on stage III colon cancer disease-free survival in patients treated by 5-fluorouracil and leucovorin with or without oxaliplatin. *Ann Oncol* 2010; 21: 772-780.

348. Yu SJ, Yu JK, Ge WT, Hu HG, Yuan Y, Zheng S. SPARCL1, Shp2, MSH2, E-cadherin, p53, ADCY-2 and MAPK are prognosis-related in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2011; 17 (15): 2028-2036.
349. Lastraioli E, Bencini L, Bianchini E, Romoli MR, Crociani O, Giomoni E et al. hERG1 channels and Glut-1 as independent prognostic indicators of worse outcome in stage I and II colorectal cancer: a pilot study. *Translational Oncology* 2012; 5 (2): 105-112.
350. Vidaurreta M, Maestro ML, Sanz-Casla MT, Rafael S, Veganzones S, de la Orden V et al. Colorectal carcinoma prognosis can be predicted by alterations in gene p53 exons 5 and 8. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23 (6): 581-6.
351. Huh JW, Lee JH, Kim HR. Expression of p16, p53 and Ki-67 in colorectal adenocarcinoma: a study of 356 surgically resected cases. *Hepatogastroenterology* 2010; 57 (101): 734-40.
352. Fluge O, Gravdal K, Carlsen E, Vonen B, Kjellevolds K, Refsum S et al. Expression of EZH2 and Ki-67 in colorectal cancer and associations with treatment response and prognosis. *Br J Cancer* 2009; 101: 1282-1289.
353. Yan DW, Li DW, Yang YX, Xia J, Wang XL, Zhou CZ et al. Ubiquitin D is correlated with colon cancer progression and predicts recurrence for stage II-III disease after curative surgery. *Br J Cancer* 2010; 103: 961 – 969.
354. Ong CW, Kim LG, Kong HH, Low LY, Iacopetta B, Soong R et al. CD133 expression predicts for non-response to chemotherapy in colorectal cancer. *Modern Pathology* 2010; 23: 450–457.
355. Ma YL, Peng JY, Zhang P, Liu WJ, Huang L, Qin HL. Immunohistochemical analysis revealed CD34 and Ki67 protein expression as significant prognostic factors in colorectal cancer. *Med Oncol* 2010; 2009; 27 (2): 304-309.
356. Nakayama Y, Yamahuchi M, Minagawa N, Torige T, Izumi H, Kohno K et al. Clinical significance of mitochondrial transcription factor A expression in patients with colorectal cancer. *Oncology Reports* 2012; 27: 1325-1330.

357. Linden MD, Ma CK, Kubus J, Brown RD, Zarbo RJ. Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen tumor proliferative indices in DNA diploid colorectal adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol* 1993; 100: 206-212.
358. Duchrow M, Häsemayer S, Broll R, Bruch HP, Windhövel U. Assessment of proliferative activity in colorectal carcinomas by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Cancer Invest* 2001; 19 (6): 588-596.
359. Le Pessot F, Michel P, Paresy M, Lemoine F, Hellot MF, Paillot B et al. Cell proliferation in colorectal adenocarcinomas: comparison between Ki-67 immunostaging and bromodeoxyuridine uptake detected by immunohistochemistry and flow cytometry. *Pathol Res Pract* 2001; 197: 411-418.
360. Jirawatnotai S, Hu Y, Michoski W, Elias JE, Becks L, Bienvenu F et al. A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by protein interactome analyses in human cancers. *Nature* 2011, 474: 230-234.
361. Kim JK, Diehl JA. Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. *J Cell Physiol* 2009; 220: 292-296.
362. Arber N, Hibshoost H, Moss SF, Sutter T, Zhang Y, Begg M et al. Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology* 1996; 110 (3): 669-74.
363. McKay JA, Douglas JJ, Ross VG, Curran S, Ahmed FY, Loane JF et al. Expression of cell cycle control proteins in primary colorectal tumors does not always predict expression in lymph node metastases. *Clin Cancer Res* 2000; 6 (3): 1113-8.
364. Ogino S, Nosho K, Irahara N, Kure S, Shima K, Baba Y et al. A cohort study of cyclin D1 expression and prognosis in 602 colon cancer cases. *Clin Cancer Res* 2009; 15 (3): 4431-4438.
365. Saridaki S, Papadatos-Pastos D, Tzardi M, Mavroudis D, Bairaktari E, Arvanity H et al. BRAF mutations, microsatellite instability status and cyclin D1 expression predict metastatic colorectal patients' outcome. *Br J Cancer* 2010; 102: 1762-1768.
366. Mao Y, Li Z, Lou C, Zhang Y. Expression of phosphorylated Stat5 predicts expression of cyclin D1 and correlates with poor prognosis of colonic adenocarcinoma. *Int J Colorectal Dis* 2011; 26:29–35.

367. Wangefjord S, Manjer J, Gaber A, Nodin B, Eberhard, Jirström K. Cyclin D1 expression in colorectal cancer is a favorable prognostic factor in men but not in women in a prospective, population-based cohort study. *Biology of Sex Differences* 2011, 2:10.
368. Noshu K, Kawasaki T, Chan AT, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner GJ et al. Cyclin D1 is frequently overexpressed in microsatellite unstable colorectal cancer, independent of CpG island methylator phenotype. *Histopathology* 2008; 53 (5): 588–598.
369. Cazzalini O, Scovassi AI, Savio M, Stivala LA, Prosperi E. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21^{CDKN1A} in the DNA damage response. *Mutation Res* 2010; 704: 12-20.
370. Cmielova J, Rezacova M. p21 protein and its function based on a subcellular localization. *J Cell Biochem* 2011; 112: 3502-3506.
371. Stivala LA, Cazzalini O, Prosperi E. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{CDKN1A} as a target of anticancer drugs. *Curr Cancer Drug Targets* 2012; 12: 85-96.
372. Sulzyc-Bielicka V, Domagala P, Urasinska E, Bielicki D, Safranow K, Domagala W. Expression of p21WAF1 in Astler–Coller stage B2 colorectal cancer is associated with survival benefit from 5FU-based adjuvant chemotherapy. *Virchows Arch* 2011; 458:431–438.
373. Borriello A, Bencivenga D, Criscuolo M, Caldarelli I, Cucciolla V, Tramontano A et al. Targeting p27^{Kip1} protein: its relevance in the therapy of human cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2011; 15 (6): 677-93.
374. Wander SA, Zhao D, Slingerland JM. p27: A Barometer of Signaling Deregulation and Potential Predictor of Response to Targeted Therapies. *Clin Cancer Res* 2010; 17 (1): 12–8.
375. Hershko DD. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a prognostic biomarker and potential therapeutic target. *Futur Oncol* 2010; 6 (12): 1837-1847.
376. Bertagnolli MM, Warren RS, Niedzwiecki D, Mueller E, Compton CC, Redston M et al. p27Kip1 in stage III colon cancer: implications for outcome following adjuvant chemotherapy in cancer and leukemia group B protocol 89803. *Clin Cancer Res* 2009; 15 (6): 2116-22.

377. Ogino S, Shima K, Nosho K, Irahara N, Baba Y, Wolpin BM et al. A cohort study of p27 localization in colon cancer, body mass index and patient survival. *Cancer Epidemiol Biomarker Res* 2009; 18(6): 1849-1858.
378. Handra-Luca A, Olschwang S, Fléjou J. SMAD4 protein expression in colorectal adenocarcinomas. *Virchows Arch* 2011; 459:511–519.
379. Lin JH, Morikawa T, Chan AT, Kuchiba A, Shima K, Nosho K et al. Postmenopausal hormone therapy is associated with a reduced risk of colorectal cancer lacking CDKN1A expression. *Cancer Res* 2012; 72 (12); 3020-28.
380. Jensen SA, Vainer B, Witton CJ, Jorgensen JT, Sorensen JB. Prognostic significant of numeric aberrations of genes for thymidilate synthase, thymidine phosphorylase and dihydrofolate reductase in colorectal cancer. *Acta Oncol* 2008; 47 (6): 1054-61.
381. Soong R, Shah N, Salto-Tellez M, Tai BC, Soo RA, Han HC et al. Prognostic significance of thymidilate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase protein expression in colorectal cancer patients treated with or without 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Ann Oncol* 2008; 19 (5): 915-19.
382. Yamada H, Inuma H, Watanabe T. Prognostic value of 5-fluorouracil metabolic enzyme genes in Dukes' stage B and C colorectal cancer patients treated with oral 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. *Col Rep* 2008; 19 (3): 729-35.
383. Sulzyc-Bielicka V, Domagala P, Majdanik E, Chosia M, Bielicki D, Kladny J et al. Nuclear thymidilate synthase expression in sporadic colorectal cancer depends on the site of the tumor. *Virchows Arch* 2009; 454 (6): 695-702.
384. Kostopoulous I, Karavasilis V, Karina M, Bobos M, Xiros N, Pentheroudakis G et al. Topoisomerase I but not thymidilate synthase is associated with improved outcome in patients with resected colorectal cancer treated with irinotecan containing adjuvant chemotherapy. *BMC Cancer* 2009; 24 (9): 339.
385. Ren DN, Kim IY, Koh SB, Chang SJ, Eom M, Yi SY et al. Comparative analysis of thymidilate synthase at the protein, mRNA, and DNA levels

- as prognostic markers in colorectal adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2009; 100 (7): 546-52.
386. Kalberg M, Ohrling K, edler D, Hallstrom M, Ullen H, Ragnhammar P. Prognostic and predictive value of thymidylate synthase expression in primary colorectal cancer. *Anticancer Res* 2010; 30:645-652.
387. Goto T, Shinmura K, Yokamizo K, Sakuraba K, Kitamura Y, Shirahata A et al. Expression levels of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase, and thymidine phosphorylase in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res* 2012; 32: 1757-1762.
388. Sumi T, Katsumata K, Tsuchida A, Ishizaki T, Shimazu M, Aoki T. Correlations of clinicopathological factors with protein expression levels of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and orotate phosphoribosyltransferase in colorectal Cancer. *Chemotherapy* 2010; 56:120–126.
389. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Brouquet A, Cervantes A. Primary colon cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010; 21 (suppl 5): v70-v77.
390. Van Cutsem E, Nordlinger B, Cervantes A on behalf of the ESMO Guidelines Working Group. Advanced colorectal cancer: ESMO clinical practice guidelines for treatment. *Ann Oncol* 2010, 21 (suppl 5): v93-97.
391. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for Kras gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 2009; 27 (12): 2091-2096.
392. Stricker T, Catenacci DVT, Seiwert TY. Molecular profiling of cancer. The future of personalized cancer medicine: a primer on cancer biology and the tools necessary to bring molecular testing to the clinic. *Semin Oncol* 2012; 38 (2): 173-185.
393. Kelloff GJ, Sigman CC. Cancer biomarkers: selecting the right drug for the right patient. *Nat Rev Drug Discovery* 2012; 11 (3): 201-14.

394. Ogino S, Chan AT, Fuchs CS, Giovannucci E. Molecular pathologic epidemiology of colorectal neoplasia. An emerging transdisciplinary and interdisciplinary field. *Gut* 2011; 60 (3): 397-411.
395. Schweiger MR, Hussong M, Röhr C, Lehrach H. Genomics and epigenomics of colorectal cancer. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2013; 5 (2): 205-19.
396. Kelley RK, Vernook AP. Prognostic and predictive markers in stage II colon cancer: is there a role for gene expression profiling?. *Clin Colorectal Cancer* 2011; 10 (2): 73-80.
397. Roth AD, Delorenzi M, Tejper S, Yan P, Klingbiel D, Fiocca R et al. Integrated analysis of molecular and clinical prognostic factors in stage II/III colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104 (21): 1635-46.
398. Kennedy RD, Bylesjo M, Kerr P, Davidson T, Black JM, Kay EW et al. Development and independent validation of a prognostic assay for stage II colon cancer using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *J Clin Oncol* 2011; 29 (35): 4620-6.
399. Hinonue T, Weisenberger DJ, Lange CP, Shen H, Byun HM, Van den Berg D et al. Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Genome Res* 2012; 22 (2): 271-82.
400. Ju J. miRNAs as biomarkers in colorectal cancer diagnosis and prognosis. *Bioanalysis* 2010; 2 (5): 901-906.
401. Rossi S, Di Narzo AF, Mestdagh P, Jacobs B, Bosman BT, Gustavsson B et al. microRNAs in colon cancer: a roadmap for discovery. *FEBS Lett* 2012; 586 (19): 3000-7.
402. Schetter AJ, Okayama H, Harris CC. The role of microRNAs in colorectal cancer. *Cancer J* 2012; 18 (3): 244-52.
403. Qi P, Du X. The long non-coding RNAs, a new cancer diagnostic and therapeutic gold mine. *Modern Pathology* 2013; 26: 155-165.
404. Torino F, Bonmassar E, Bonmassar I, De Vecchis L, Barnabei A, Zuppi C et al. Circulating tumor cells in colorectal cancer patients. *Cancer Treat Rev* 2013; Jan 30. doi: 10.1016/j.ctrv.2012.12.007. [Epub ahead of print].
405. Aggarwall C, Meropol NJ, Punt CJ, Ianotti N, Saidman BH, Sabbath KD et al. Relationship among circulating tumor cells, CEA and overall

- survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2013, 24: 420-8.
406. Lièvre A, Blons H, Laurent-Puig P. Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer. *Oncogene* 2010, 29: 3033-3043.
407. Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets system biology. *Nat Rev Cancer* 2012; 12 (8): 553-63.
408. Dixon DA, Blanco FA, Bruno A, Patrignani P. Mechanistic aspects of Cox-2 expression in colorectal neoplasia. *Recent Results in Cancer Res* 2013; 191:7-37.
409. Freed-Pastor WA, Prives C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes & Development* 2012; 26: 1268-1286.
410. Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Murray D. New insights into p53 signalling and cancer cell response to DNA damage. *J Biomed Biotechnol* 2012; 170325.
411. Inonue K, Kurabayashin A, Shuin T, Ohtsuki Y, Furihata M. Overexpression of p53 protein in human tumors. *Med Mol Morphol* 2012; 45: 115-123.
412. Jackson JG, Lozano G. The mutant p53 mouse as a preclinical model. *Oncogene* 2013; Jan 14, doi: 10.1038/onc.2012.610.
413. Muller PA, Vousden KH. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol* 2013; 15 (1): 2-8.
414. Moore JD. In the wrong place at the wrong time: does cyclin mislocalization drive oncogenic transformation?. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 201-208.
415. Lurje G, Manegold PC, Ning Y, Pohl A, Zhang W, Lenz HJ. Thymidylate synthase gene variations: predictive and prognostic marker. *Mol Cancer Ther* 2009; 8 (5):1000–7.
416. Pohl A, Lenz HJ. Individualization of Therapy for Colorectal Cancer Based on Clinical and Molecular Parameters. *Gastrointest Cancer Res* 2008; 2 (suppl 2): S38-S41.
417. Tejpar S, Bertagnolli M, Bosman F, Lenz HJ, Garraway L, Waldman F et al. Prognostic and Predictive Biomarkers in Resected Colon Cancer: Current Status and Future perspectives for Integrating Genomics into Biomarker Discovery, *The Oncologist* 2010; 15: 390-404.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

418. Dancey JE, Dobbin KK, Groshen S, Jessup JM, Hruszkewycz AH, Koehler M et al. Guidelines for the development and incorporation of biomarker studies in early clinical trials of novel agents. *Clin Cancer Res* 2010; 16 (6): 1745-55.
419. Gonzalez-Angulo AM, Hennessy BT, Mills GB. Future of personalized medicine in oncology: a system biology approach. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2777-83.
420. Meric-Bertram F, Mills GB. Overcoming implementation challenges of personalized cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2012; 9: 542-548.
421. MacConaill LE. Existing and emerging technologies for tumor genomic profiling. *J Clin Oncol* 2013; 31: 1815-1824.
422. Bertram FM, Farhangfar C, Mendelshon J, Mills GB. Building a personalized medicine infrastructure at a major cancer center. *J Clin Oncol* 2013; 31: 1849-1857.

RESUMEN.

Título.

“Valor pronóstico de la expresión de EGFRr, Cox-2, TP53, Reguladores del Ciclo Celular, Ki-67 y Timidilato Sintasa en el Cáncer de Colon Esporádico”.

Introducción.

El cáncer de colon se caracteriza por su heterogeneidad clínico-patológica y biológica. El sistema de estadificación TNM, grado de diferenciación, desdiferenciación del frente invasivo, invasión linfo-vascular y configuración de los bordes tumorales son los principales factores pronósticos asociados a tumor. Sin embargo se han mostrado insuficientes para predecir el curso evolutivo individual de los pacientes con tratamientos similares. La incorporación de BMT derivados del conocimiento de la fisiopatología molecular tumoral podrían contribuir a optimizar los factores pronósticos y predictivos clínico-patológicos convencionales. Entre los BMT moleculares que más interés han suscitado en diferentes tumores sólidos y para CCR en particular se encuentran el Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico y su vía de señalización; oncogenes reguladores como la Cox-2; genes supresores de crecimiento o reguladores genómicos esenciales como la TP53; activadores y reguladores del ciclo celular como Ciclina D1, p21^{waf1/cip1}, p27^{Kip1}; pKi67 como marcador de proliferación así como reguladores de síntesis y reparación del DNA Timidilato Sintasa (pTS).

Hemos desarrollado un estudio retrospectivo fase II analítico observacional analítico longitudinal en una cohorte sucesiva de pacientes con cáncer de colon confirmado con objeto de valorar la expresión de cada BMT, su relación con los FPC convencionales y su valor pronóstico.

Pacientes, Material y Metodología Experimental.

Se han evaluado las muestras tumorales correspondientes a 123 pacientes sucesivos con las siguientes características demográficas y clínico-patológicas: edad mediana de 70 años (límites 31-89) con ligero predominio de sexo masculino (55.3%). Tumores de localización preferente izquierda (69.1%), adenocarcinomas (95.9%), grados II-III (56.3%), infiltración linfo-vascular (65.9%) y MT séricos CEA (57.7%) y CA 19.9 (28.2%) elevados. La distribución por estadios fue pT1-T2 en el 12.2%, pT3 en 74.8% y pT4 en 13%; pN1-2 en 39.8% y M0 en el 84.6% de los casos. Para estadio global, el 57.8% fueron estadios I-II, 26.8% estadios III y 15.4% estadios IV. La expresión de de BMT fue analizada por técnicas de IHQ en tejidos parafinados con AcMo específicos (EGFr clon H11, Cox-2 clon CX294, p53 clon DO-7, ki-67 clon MIB 1, Ciclina D1 clon DCS6, p21 clon SX118, p27 clon SX53G8 y TS clon TS106 de Dako Cytomation System). La desparafinización, rehidratación y recuperación antigénica se realizó de forma simultánea a 90°C con los portas tisulares inmersos en una solución Dako Wash Buffer S3006 en aparato específico (PT Link de Dako, código PT 101). Los portaobjetos fueron trasladados al inmunoteñidor automático Autostainer Plus (S3800, Dako) para su tratamiento con los reactivos incluidos en el Kit Envision HRP Dual Link Rabbit/Mouse de Dako (Código K4061) y que incluían el sistema de detección, cromógeno y los tampones de lavado intermedios. La positividad fue definida por inmunotinción para AcMo específico y evaluada por método semicuantitativo en una escala de 0-3. En el tratamiento estadístico de los datos se efectuó un análisis descriptivo inicial con medidas de tendencia central/dispersión, frecuencias absolutas y relativas; análisis bivalente mediante test ji cuadrado, de Fisher, Spearman, Kaplan-Meier y log-rank test seguido de análisis multivariante con modelos de regresión múltiple de Cox.

Resultados.

La expresión de proteína EGFR fue positiva en 54 muestras tumorales (43.9%), Cox-2 en 53 (43.1%), TP53 en 78 (63.4%), pKi-67 en 75 (61%), Ciclina D1 en 48 (39%), p21^{waf1/cip1} en 26 (21.1%), p27^{Kip1} en 46 (37.4%) y pTS en 71 (57.7%). No encontramos correlaciones significativas entre los diferentes BMT y los FCP convencionales excepto para bajas expresiones de EGFr con estadio pT3 (p 0.04), de Cox-2 para estadio global I-II (p 0.05), de TP53 para estadios pN0 (p 0.025) y pTS positiva para estadio pN1-2 (p 0.004) o III (p 0.001). Hemos constatado una correlación positiva de expresiones de EGFr con TP53; Cox-2 con Ciclina D1, p27^{Kip1}, pKi-67 o pTS; Ciclina D1 con expresiones de p21^{waf1/cip1} o p27^{Kip1} (test de Spearman p <0.05). La expresión baja de pKi-67 se ha relacionado con ILEs (p 0.06) o SGs superiores (p 0.030). No pudimos demostrar un valor pronóstico independiente del curso evolutivo en nuestra cohorte de pacientes para el resto de los BMT estudiados (log-rank test; p>0.20). En el análisis univariante, para ILE fueron significativos ILV (p 0.061), estadio pN (p 0.009) y global (p 0.009) mientras que para SG fueron ILV (p 0.0001), CEA y CA 19 9 (p<0.0024), estadio pN (p<0.0001) y global (p<0.0001). En el modelo multivariante de Cox, para ILE fue significativo el estadio TNM (p 0.002) y para SG, la edad (p 0.019), grado de diferenciación (p 0.037) y estadio TNM (p<0.001).

Conclusiones.

En nuestra experiencia, los BMT se han sobre-expresado en rangos intermedios-bajos con respecto a estudios comunicados en la literatura, de forma independiente de los factores pronósticos clínico-patológicos convencionales excepto subgrupos de EGFr, Cox-2, TP53 y pTS. Tan solo la expresión baja de pKi-67 ha discriminado grupos de pacientes con mejor curso evolutivo mientras ninguno de los demás BMT ha demostrado un valor independiente como factor pronóstico. Son necesarios estudios prospectivos bien diseñados con métodos de análisis estandarizados e incorporación de nuevas tecnologías de alto rendimiento que permitan una valoración completa del papel de estos BMT en la carcinogénesis y manejo del CCR en diferentes situaciones clínicas.

ANEXO: FIGURAS.

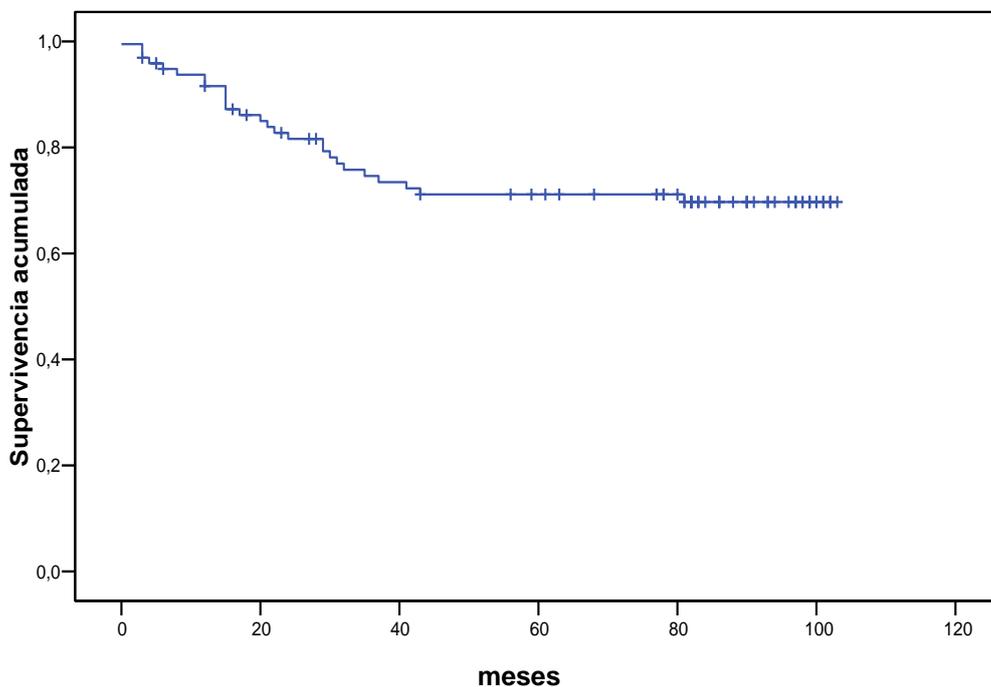


Figura nº 1. ILE de la cohorte estudiada.

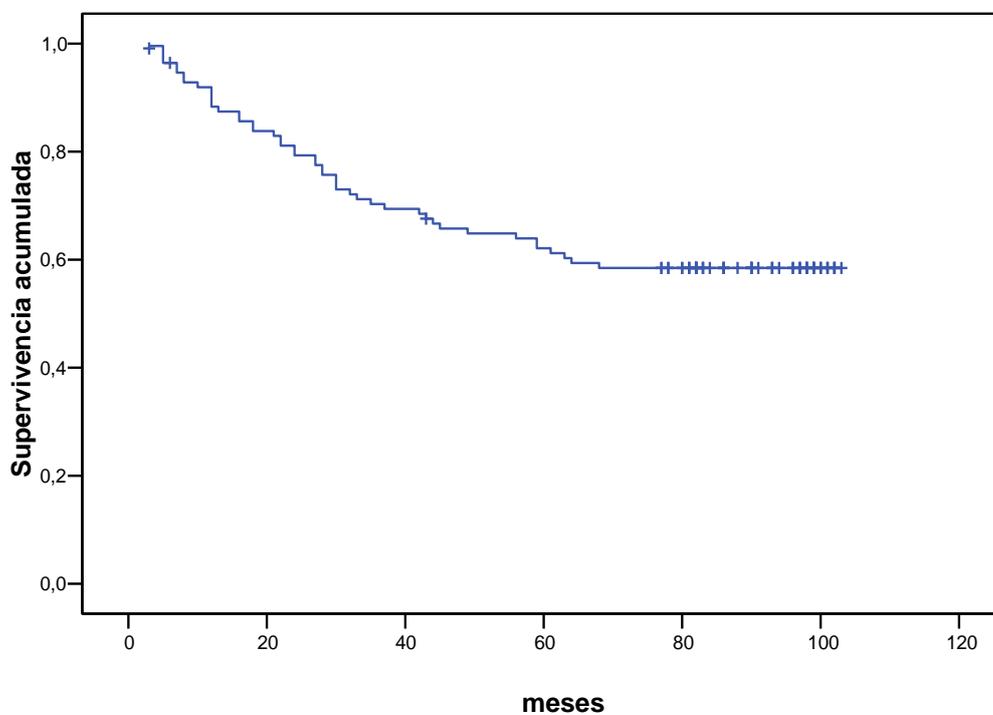


Figura nº 2. SG de la cohorte estudiada.

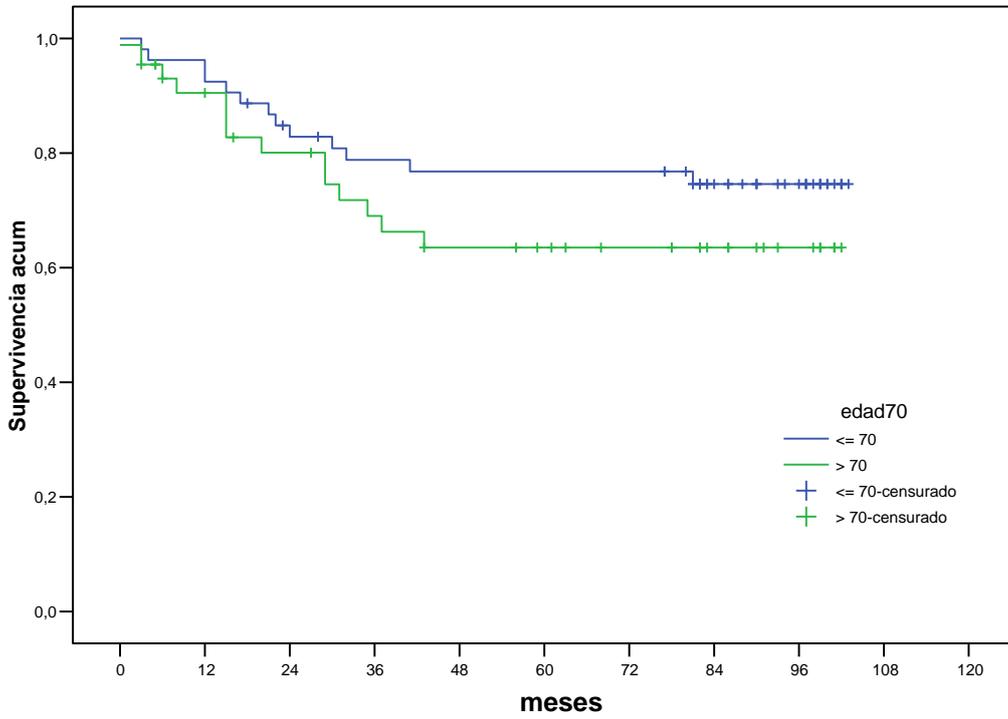


Figura nº 3. ILE por edad.

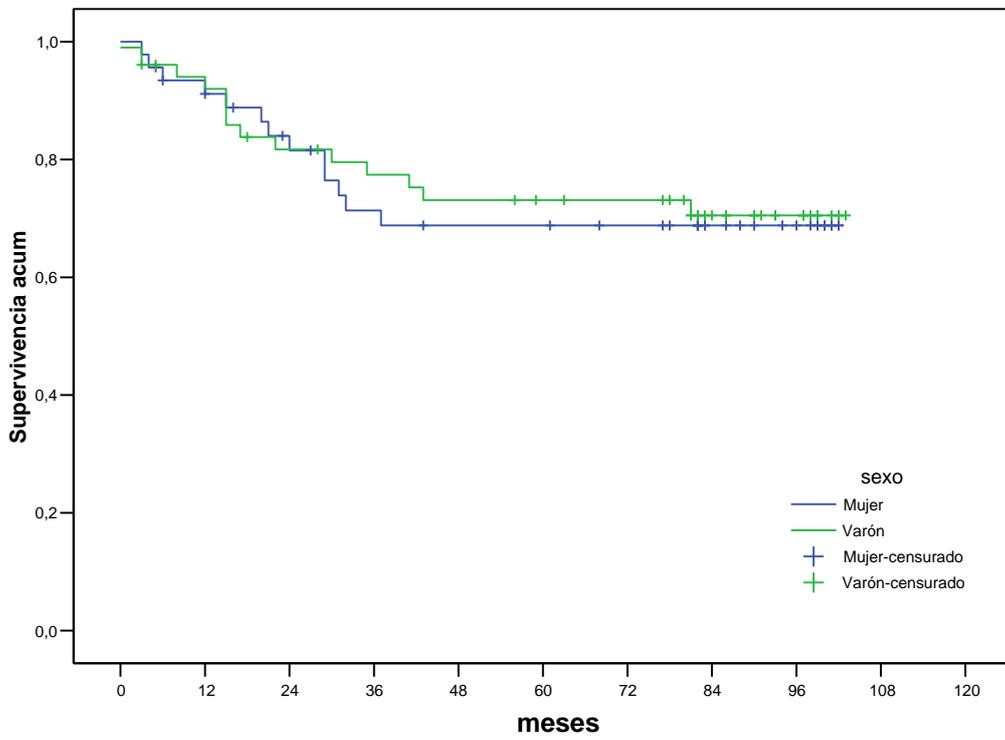


Figura nº 4. ILE por sexo.

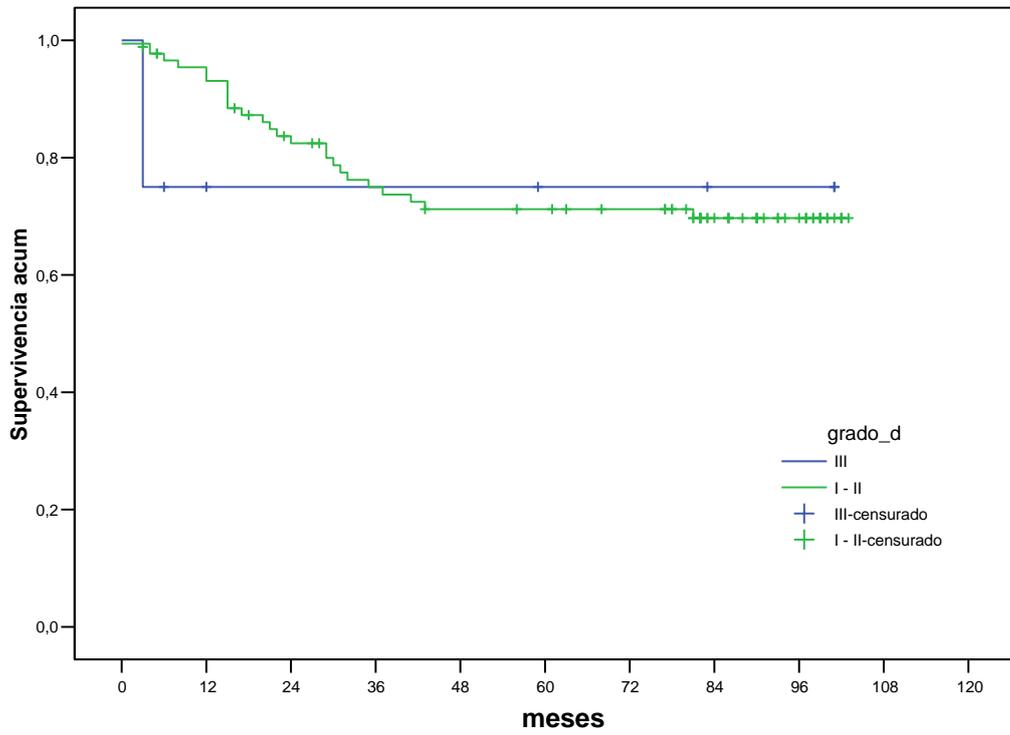


Figura nº 5. ILE por grado de diferenciación.

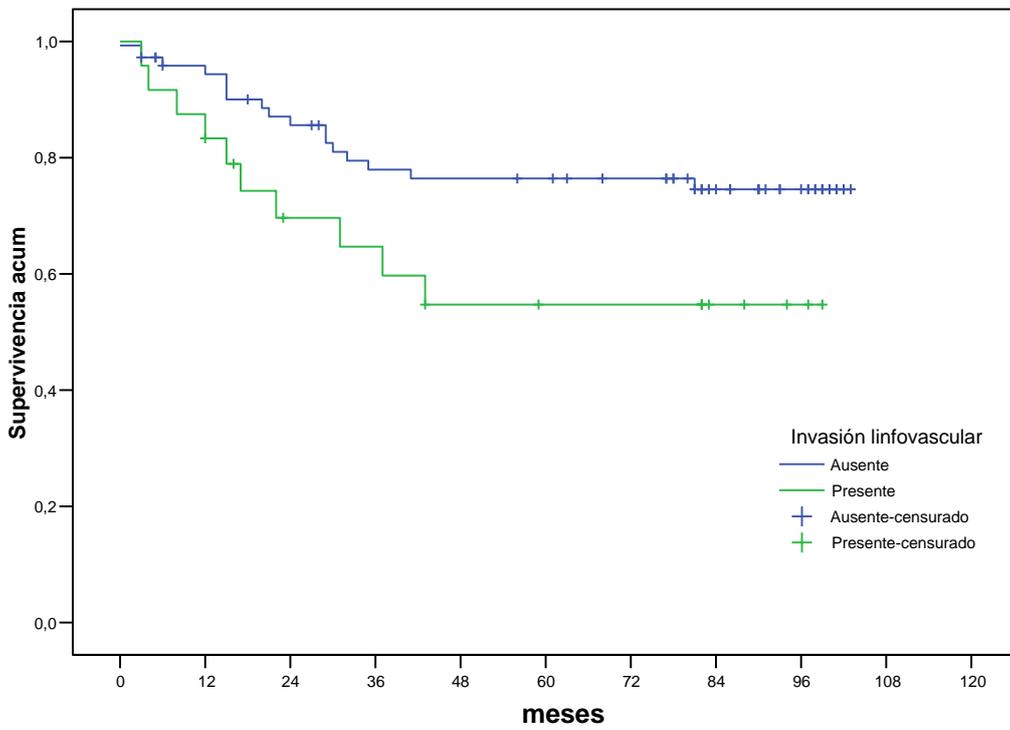


Figura nº 6. ILE por ILV.

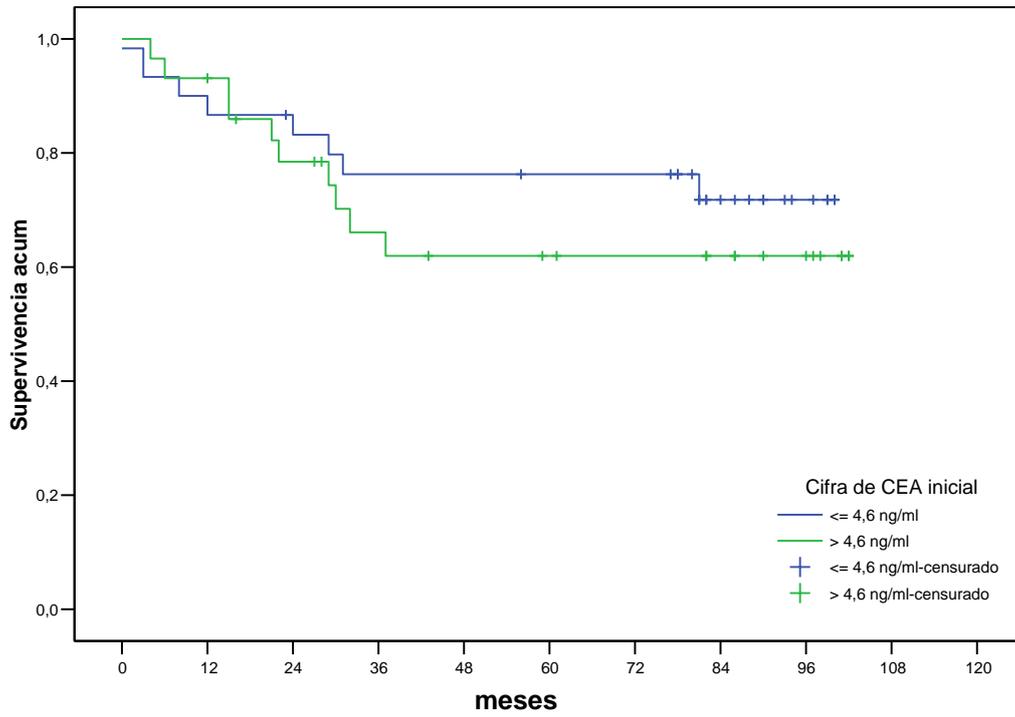


Figura nº 7. ILE por CEA sérico.

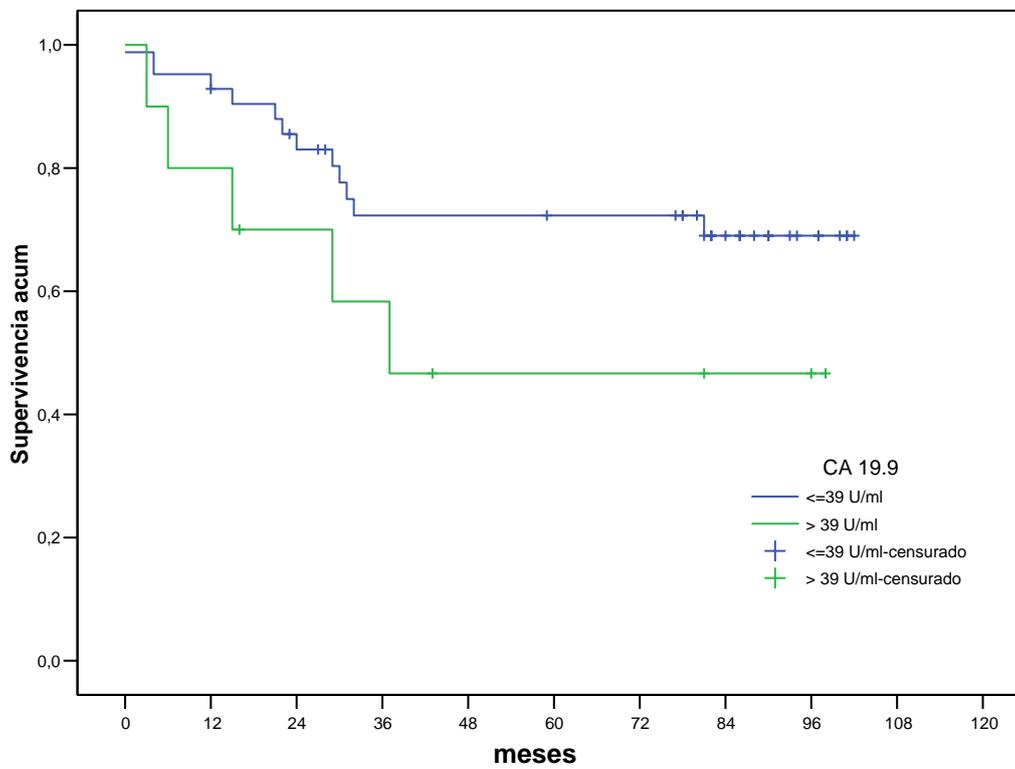


Figura nº 8. ILE por CA 19.9 sérico.

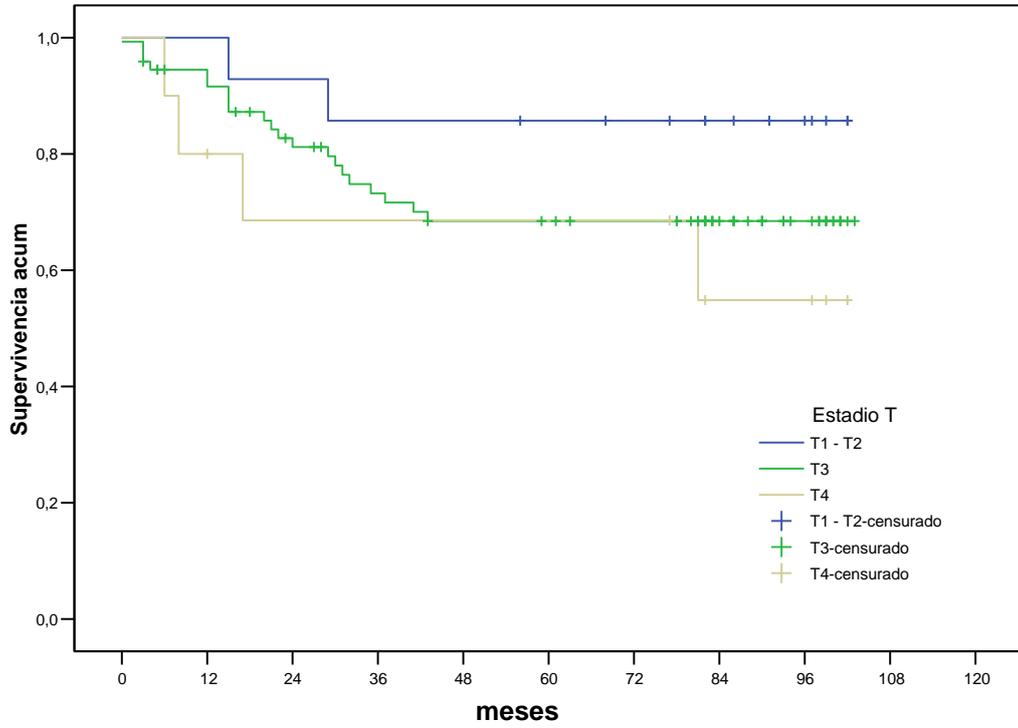


Figura nº 9. ILE por Estadio T.

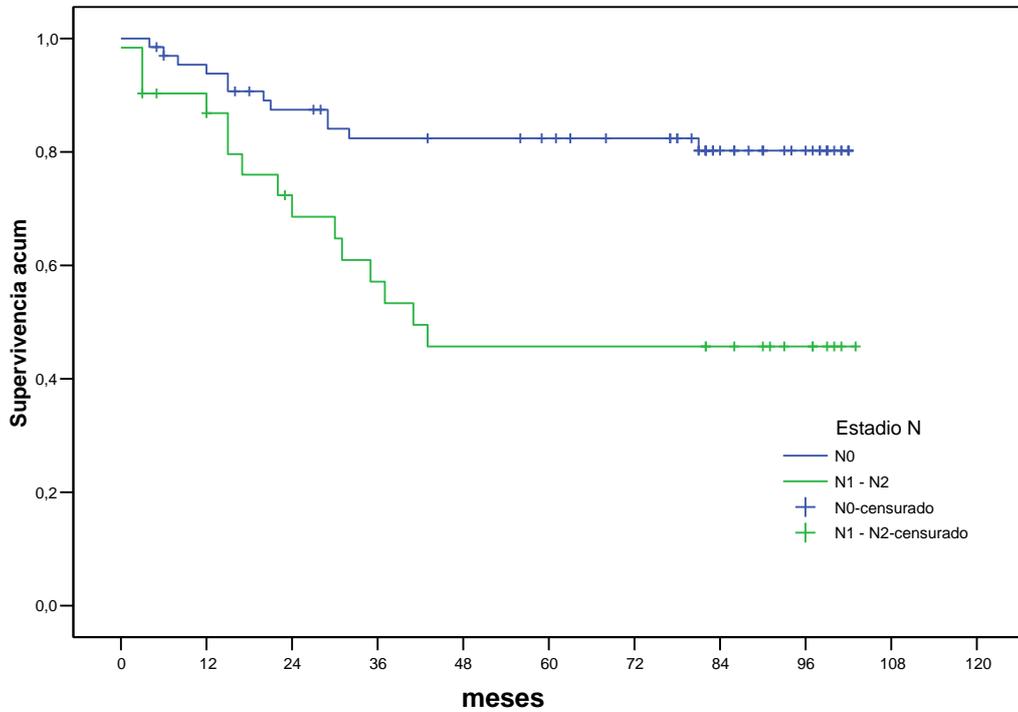


Figura nº 10. ILE por Estadio N.

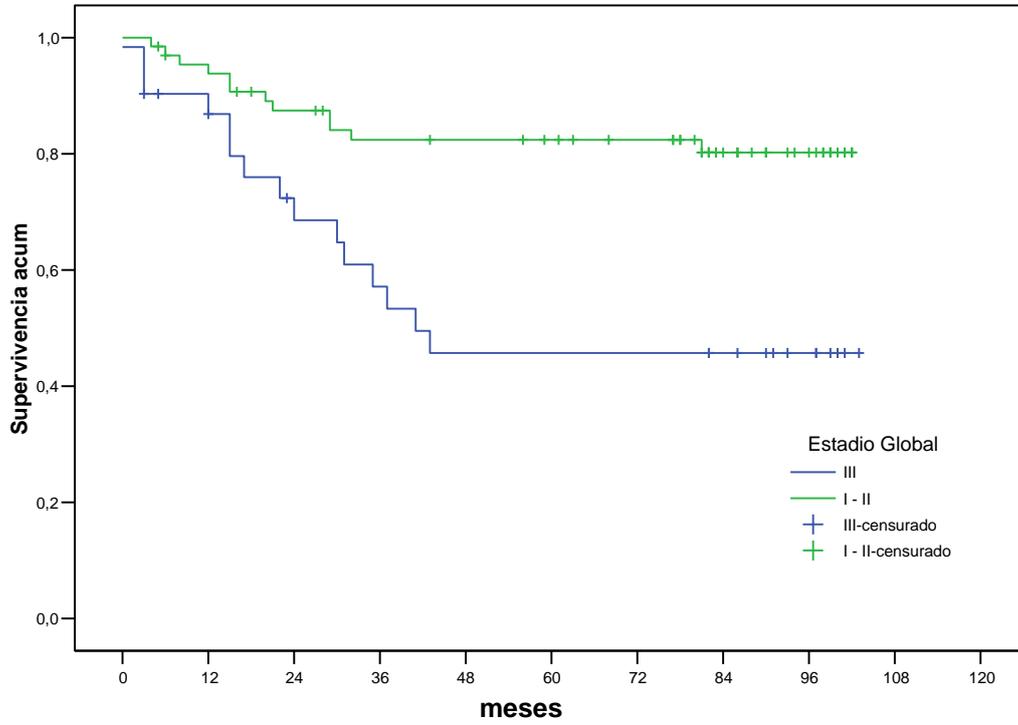


Figura nº 11. ILE por Estadio Global.

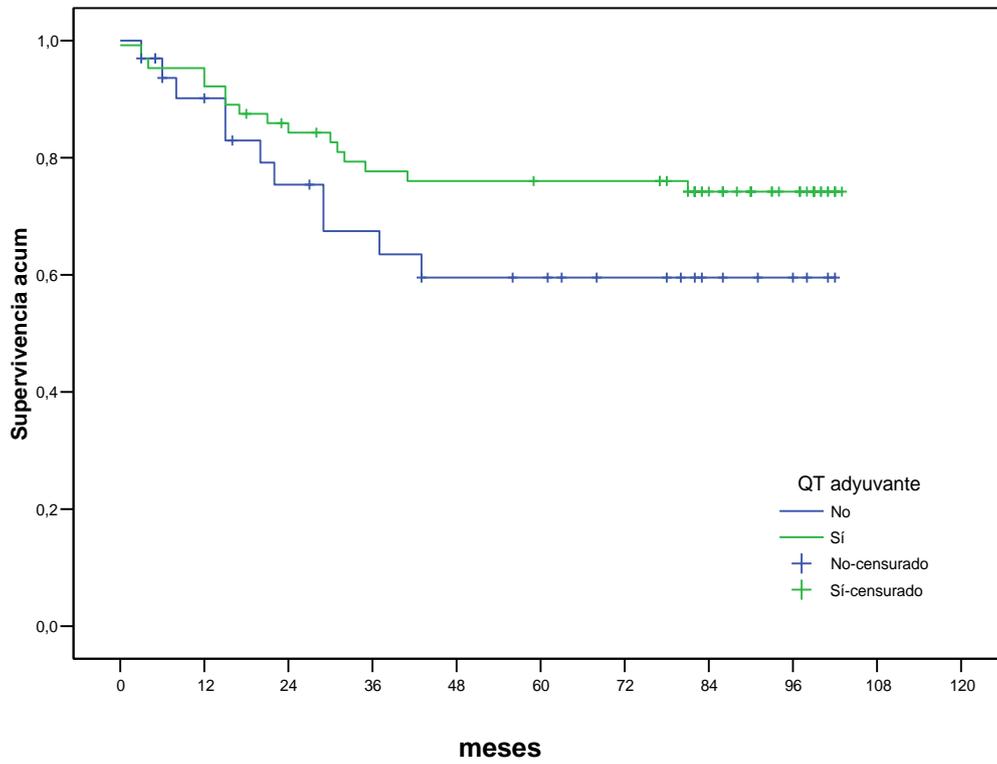


Figura nº 12. ILE y QT adyuvante.

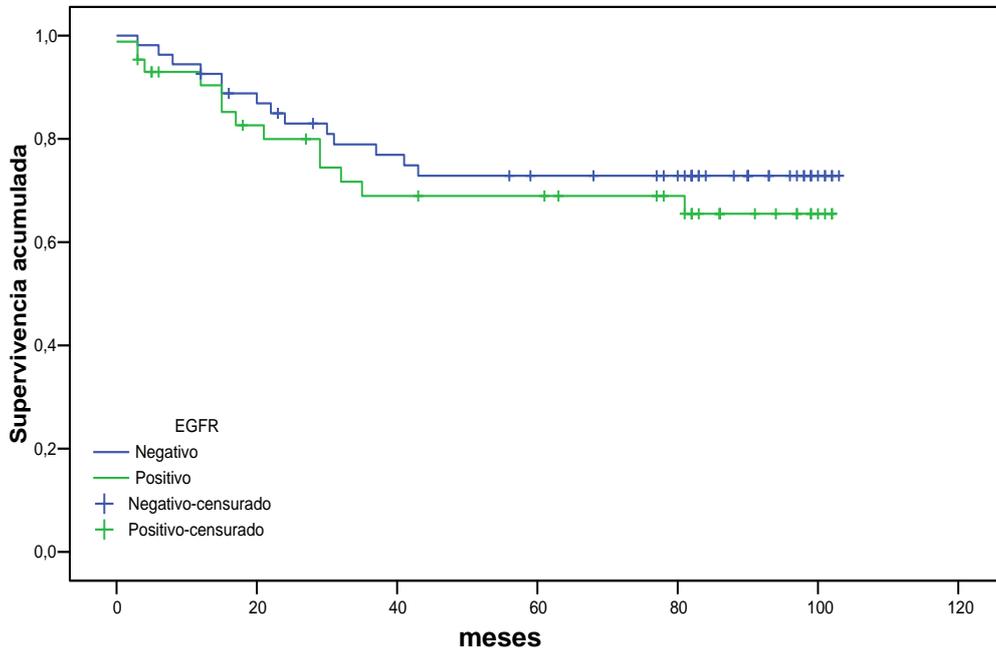


Figura nº 13. ILE por expresión de EGFR.

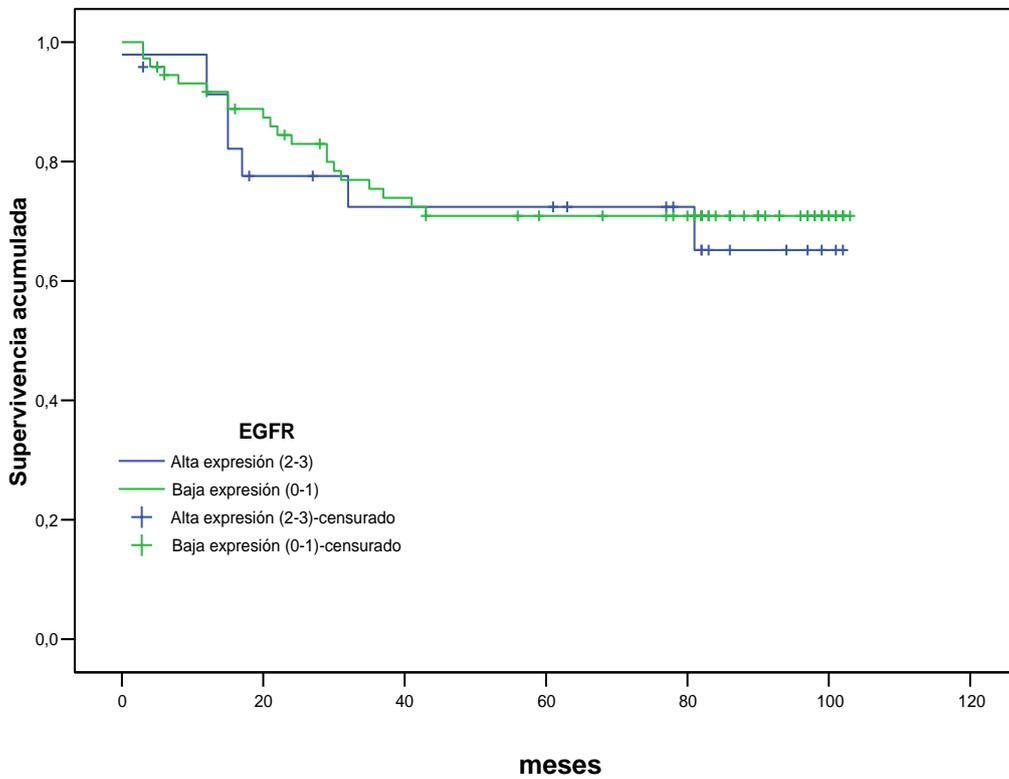


Figura nº 14. ILE por score de EGFR.

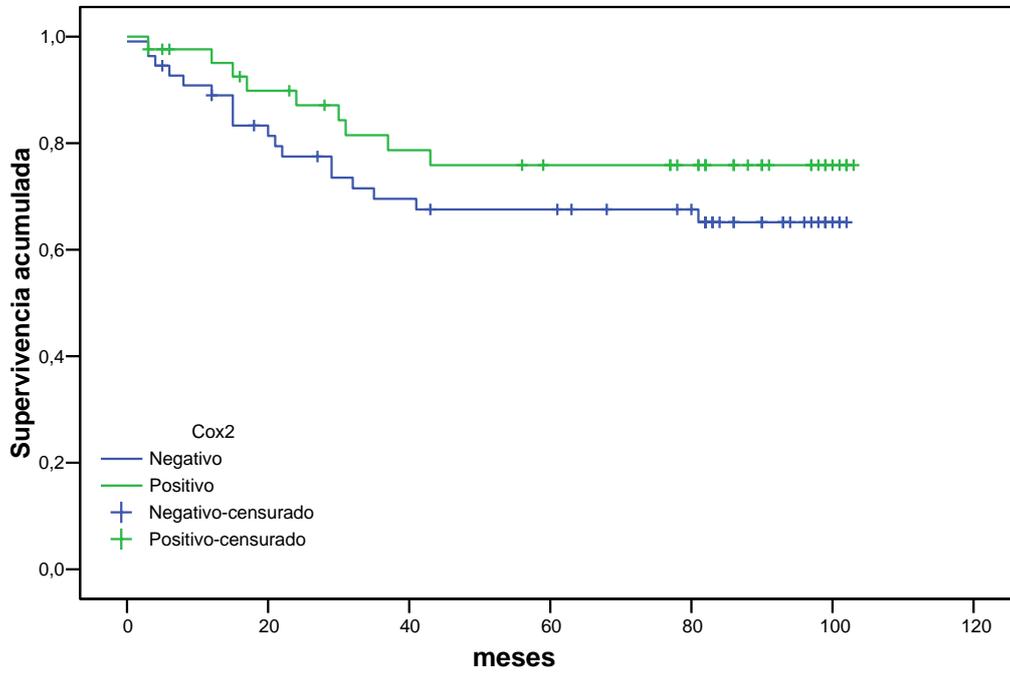


Figura nº 15. ILE por expresión de Cox-2.

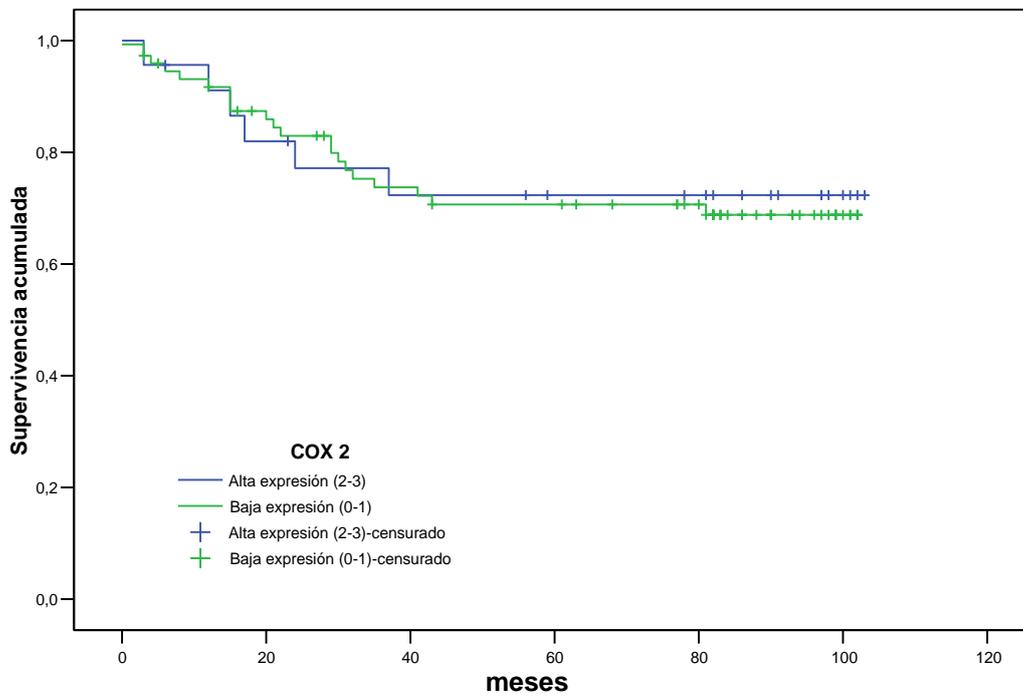


Figura nº 16. ILE por score de Cox-2.

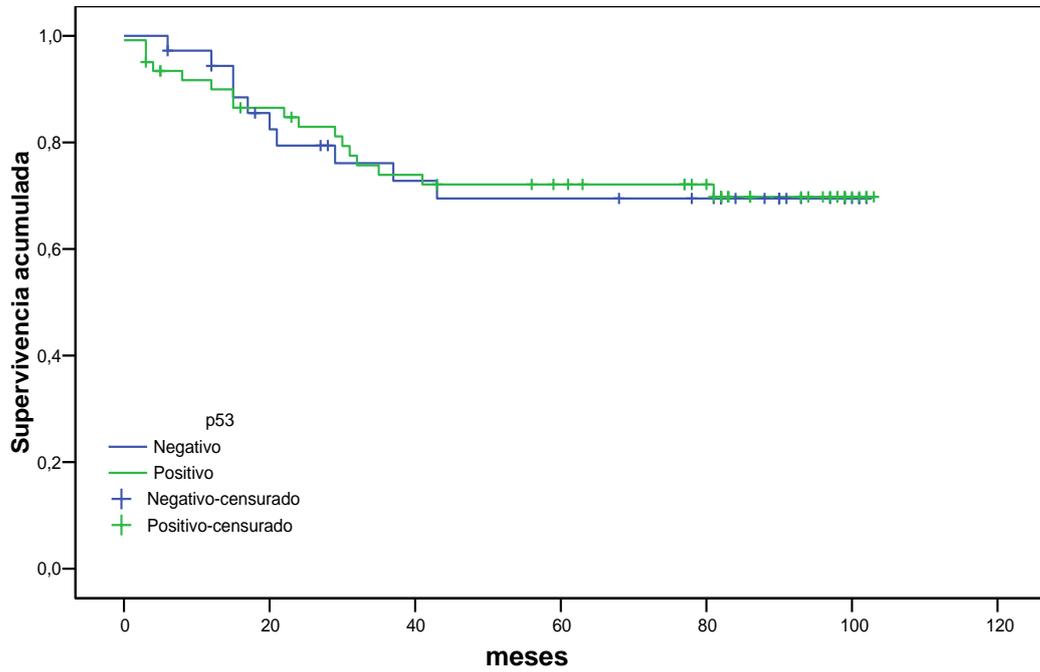


Figura nº 17. ILE por expresión de TP53.

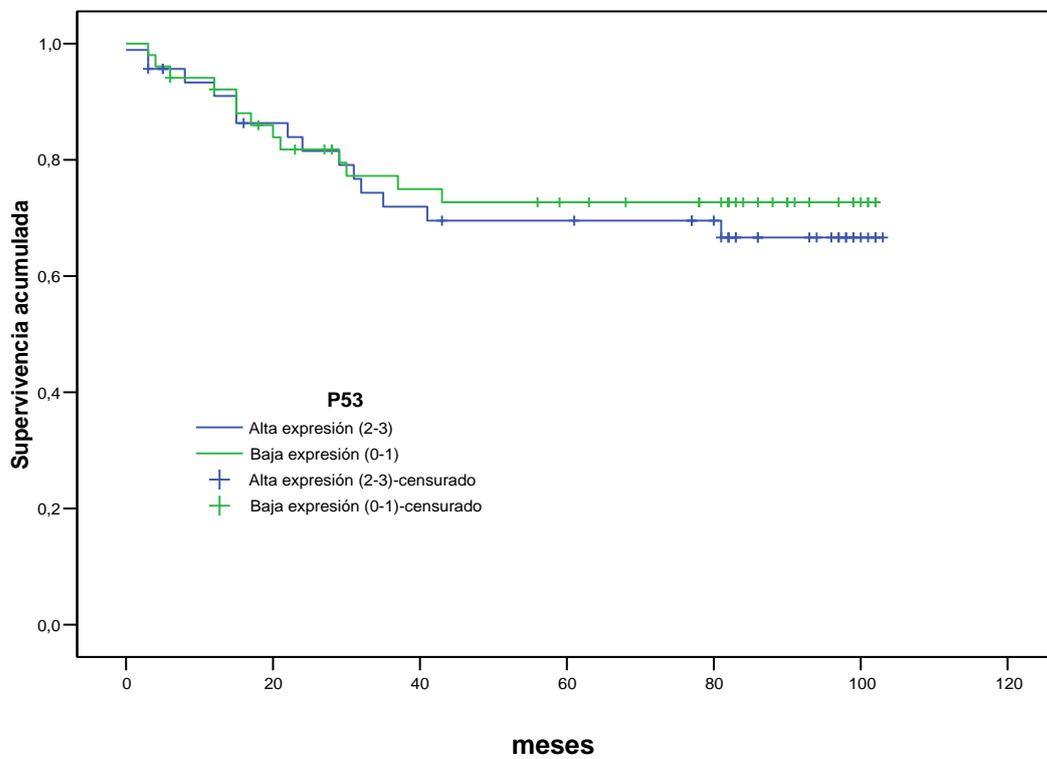


Figura nº 18. ILE por score de TP53.

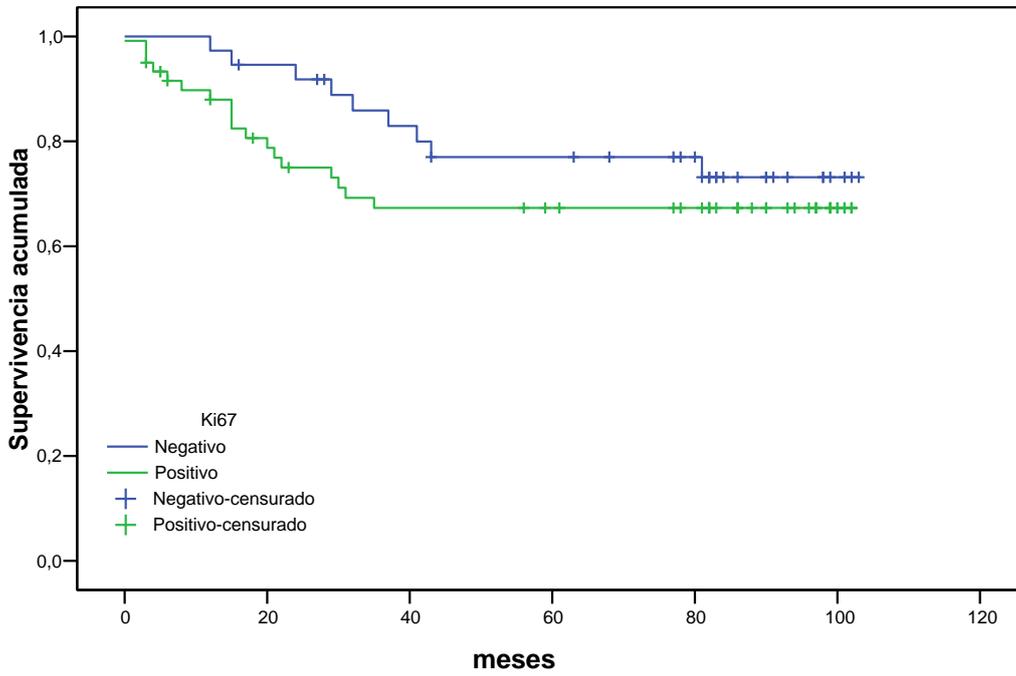


Figura nº 19. ILE por expresión de pKi-67.

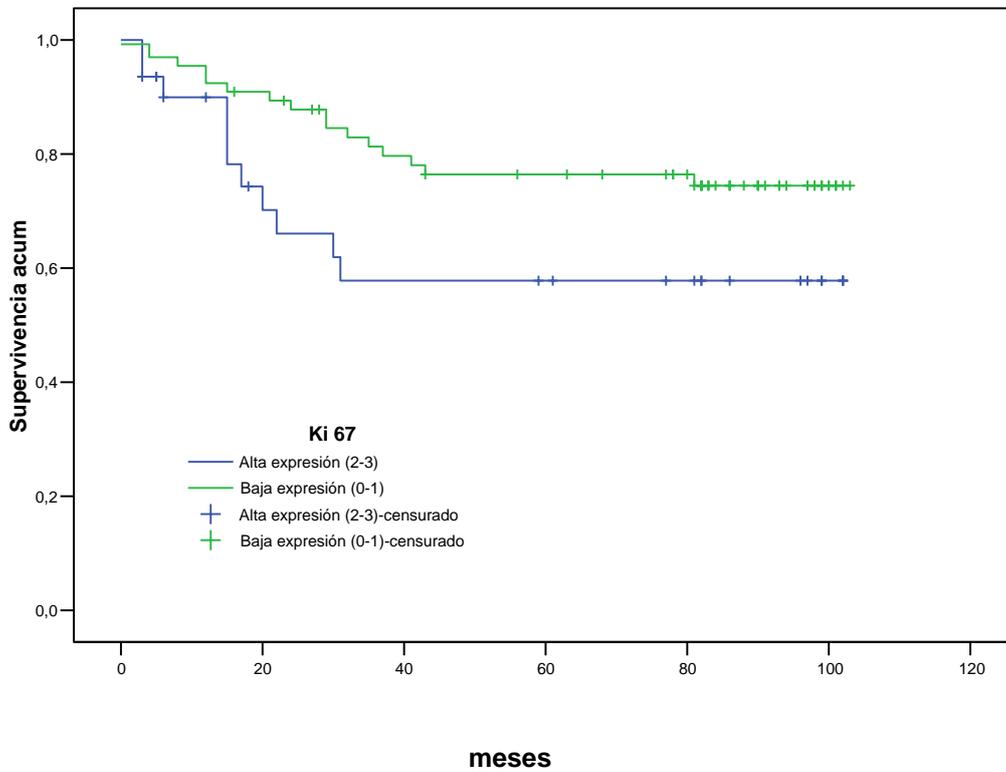


Figura nº 20. ILE por score de pKi-67.

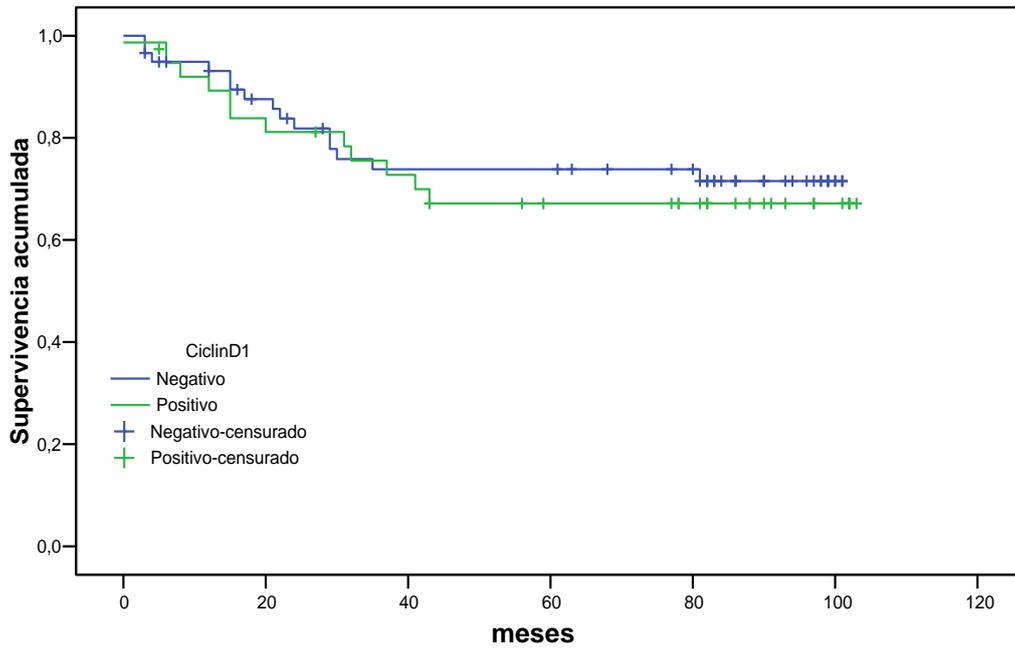


Figura nº 21. ILE por expresión de Ciclina D1.

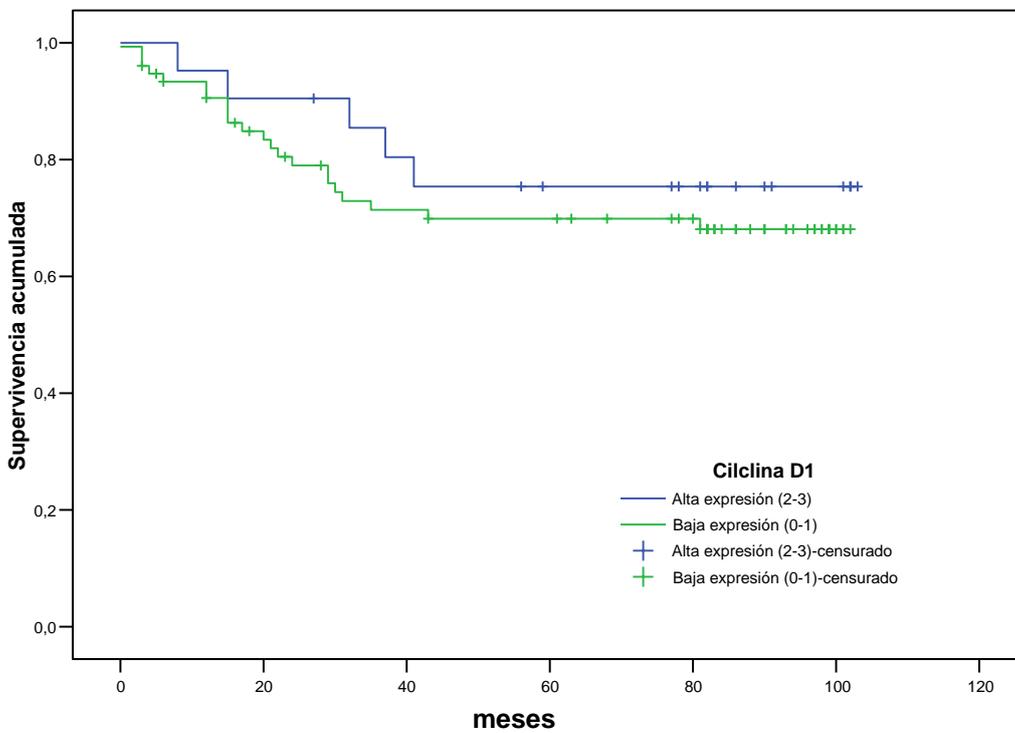


Figura nº 22. ILE por score de Ciclina D1.

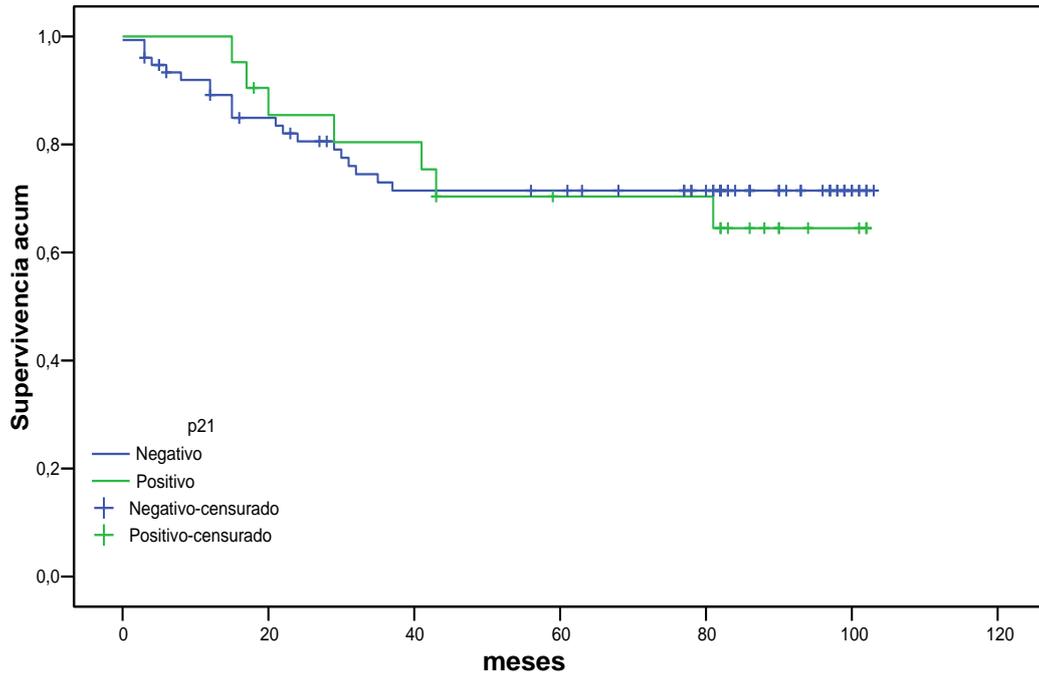


Figura nº 23. ILE por expresión de p21^{waf1/cip1}.

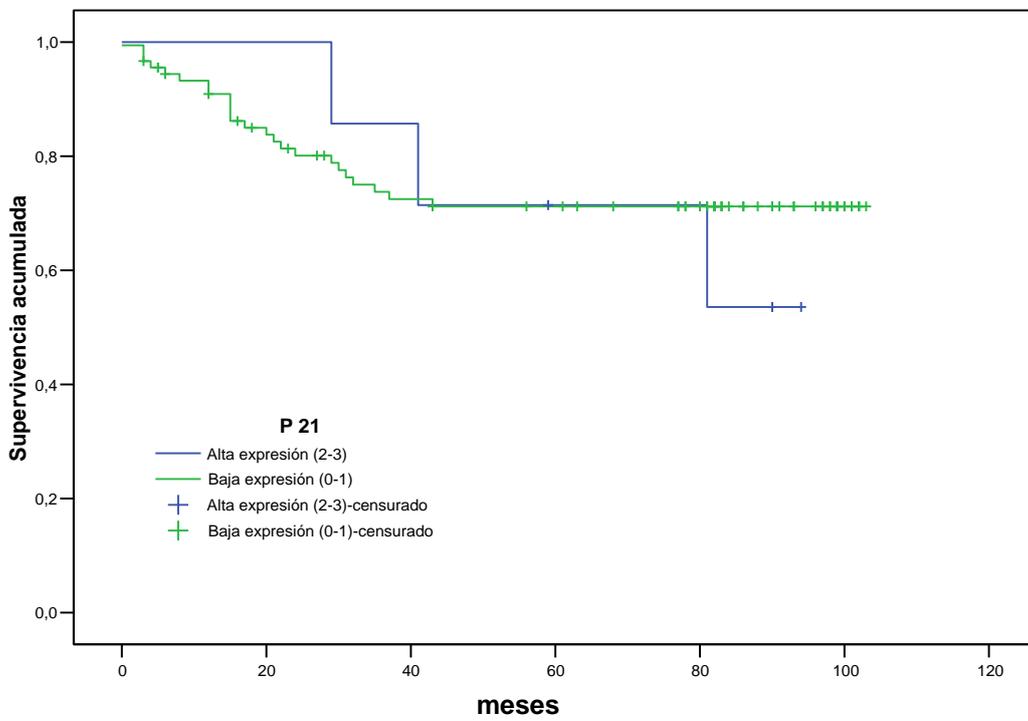


Figura nº 24. ILE por score de p21^{waf1/cip1}.

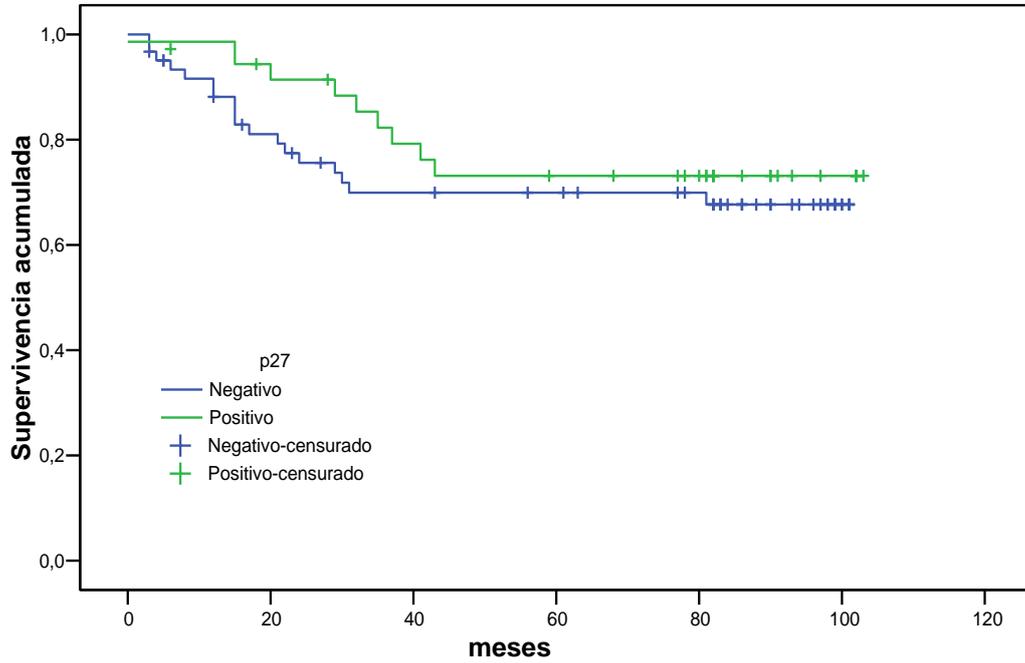


Figura nº 25. ILE por expresión de p27^{Kip1}.

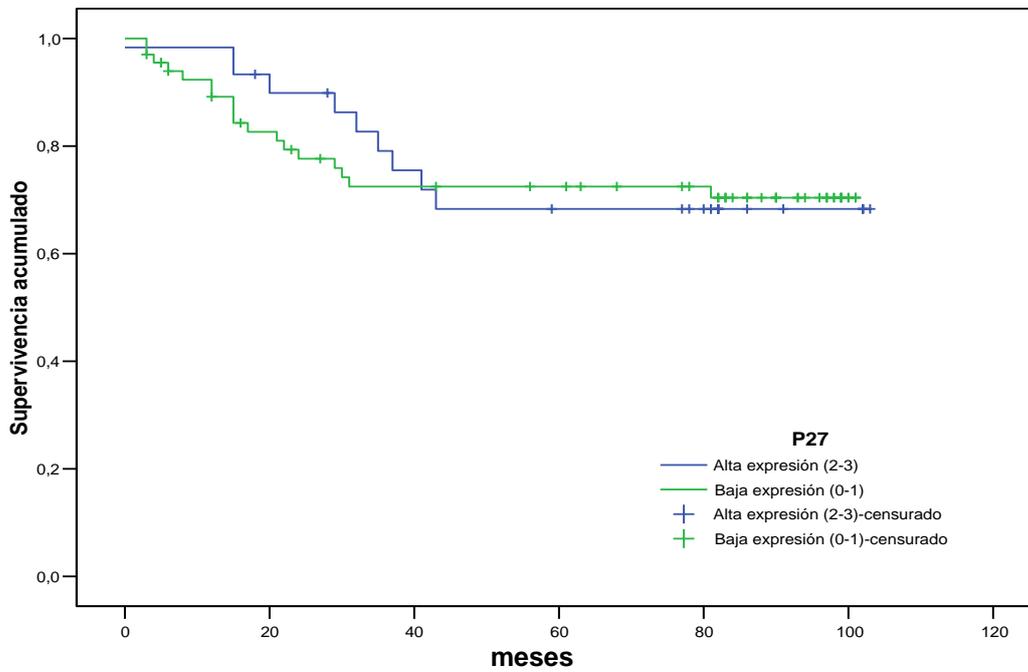


Figura nº 26. ILE por score de p27^{Kip1}.

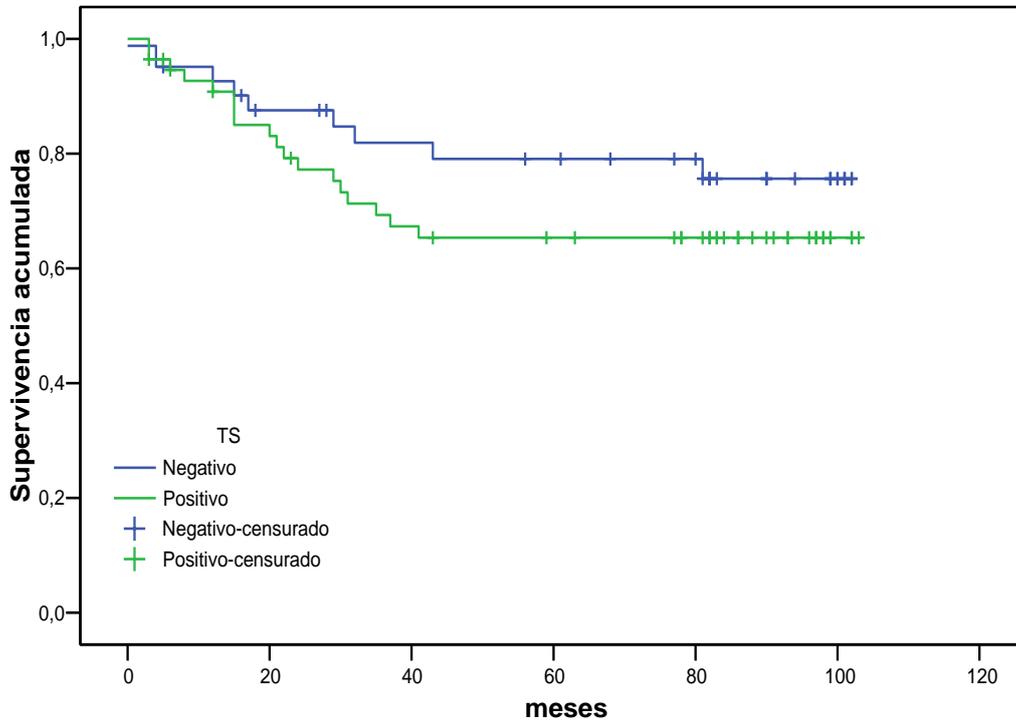


Figura nº 27. ILE por expresión de pTS.

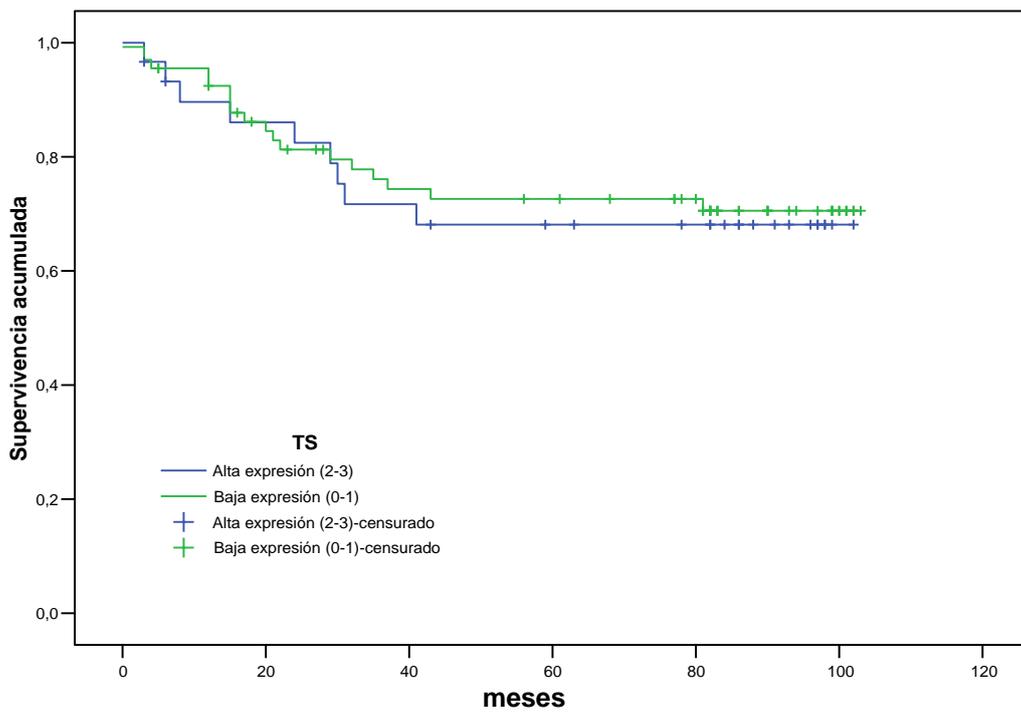


Figura nº 28. ILE por score de pTS.

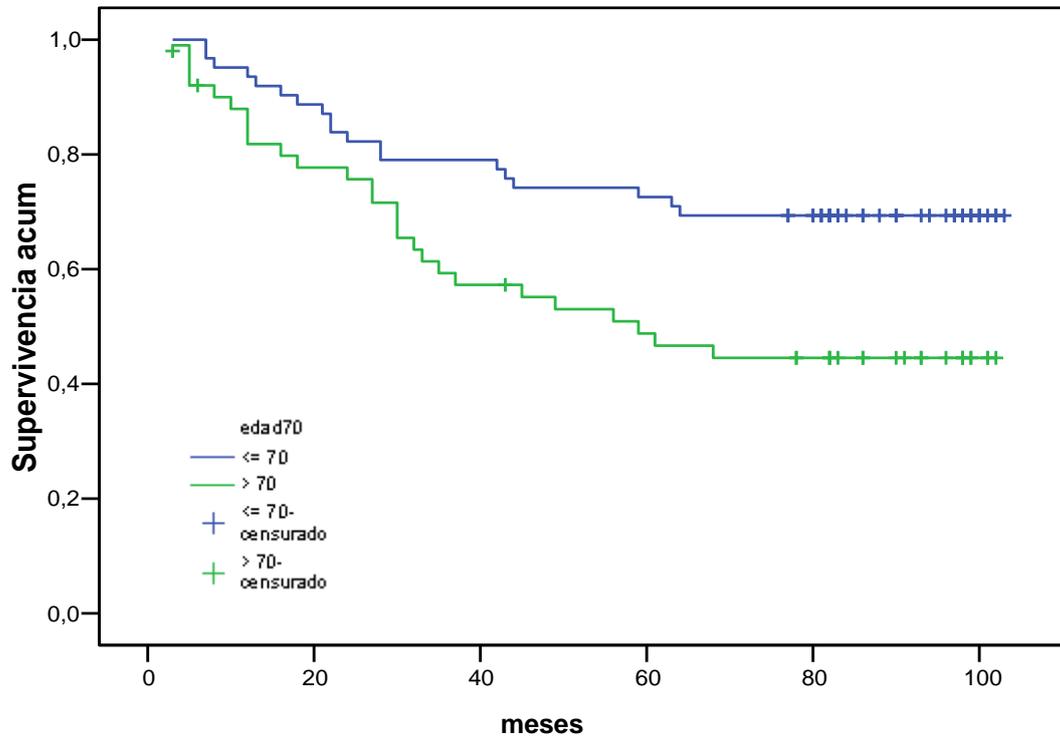


Figura nº 29. SG por edad

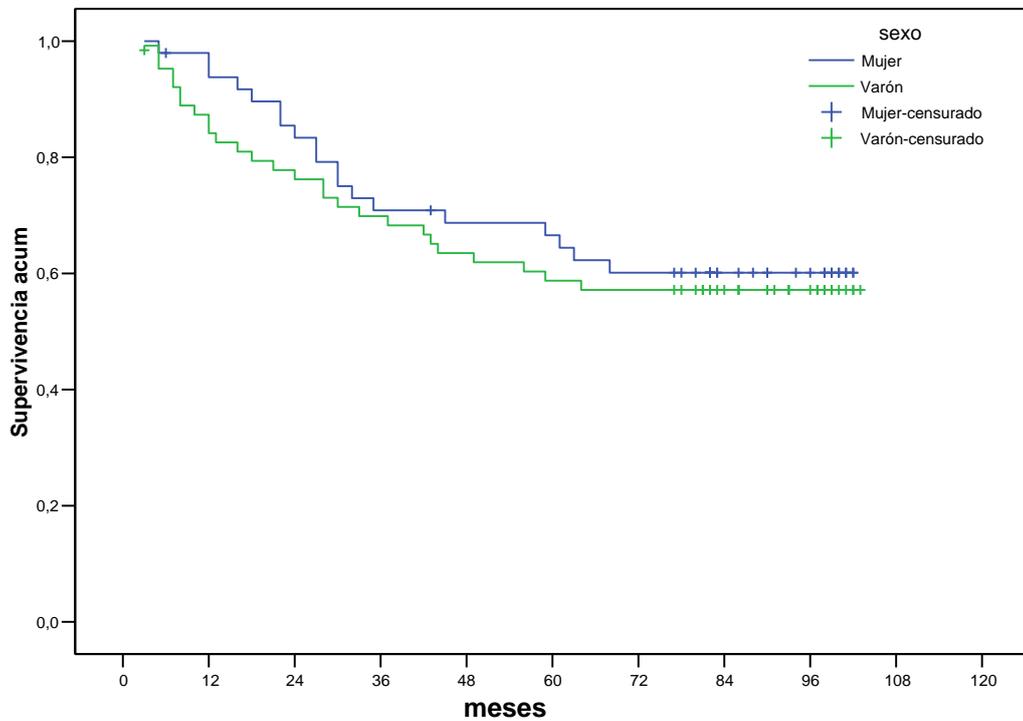


Figura nº 30. SG por sexo.

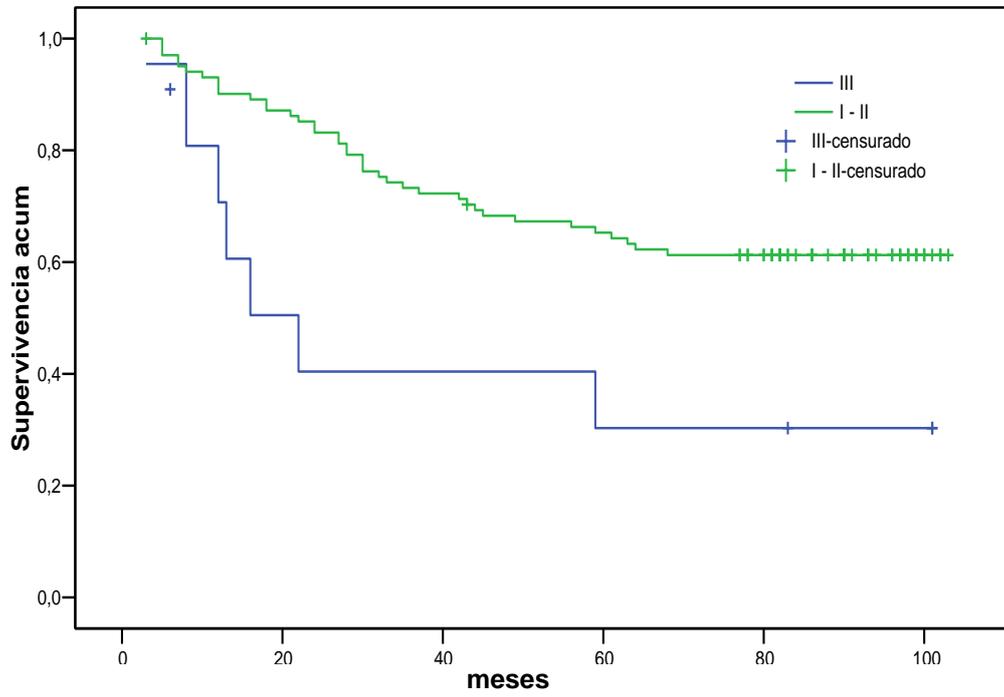


Figura nº 31. SG por grado de diferenciación.

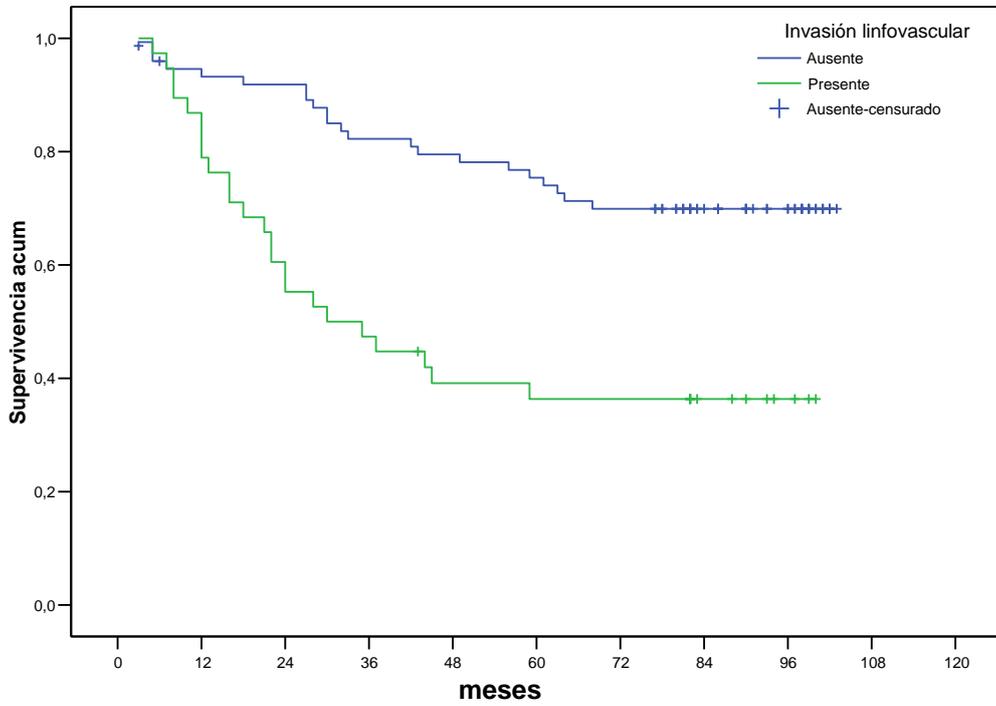


Figura nº 32. SG por ILV.

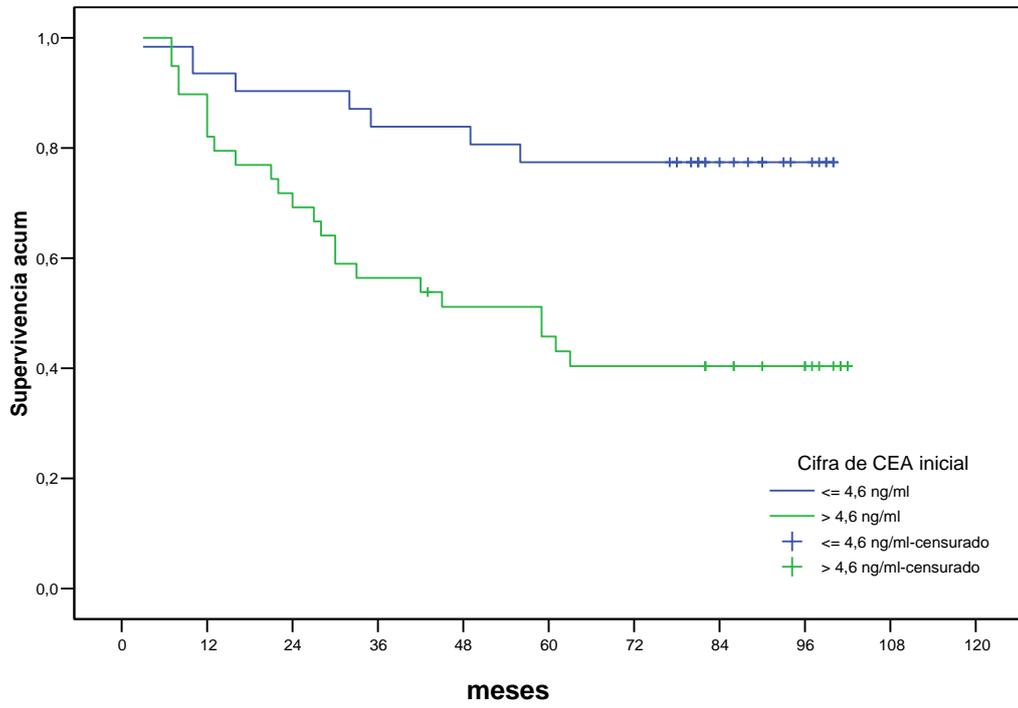


Figura nº 33. SG por CEA sérico inicial.

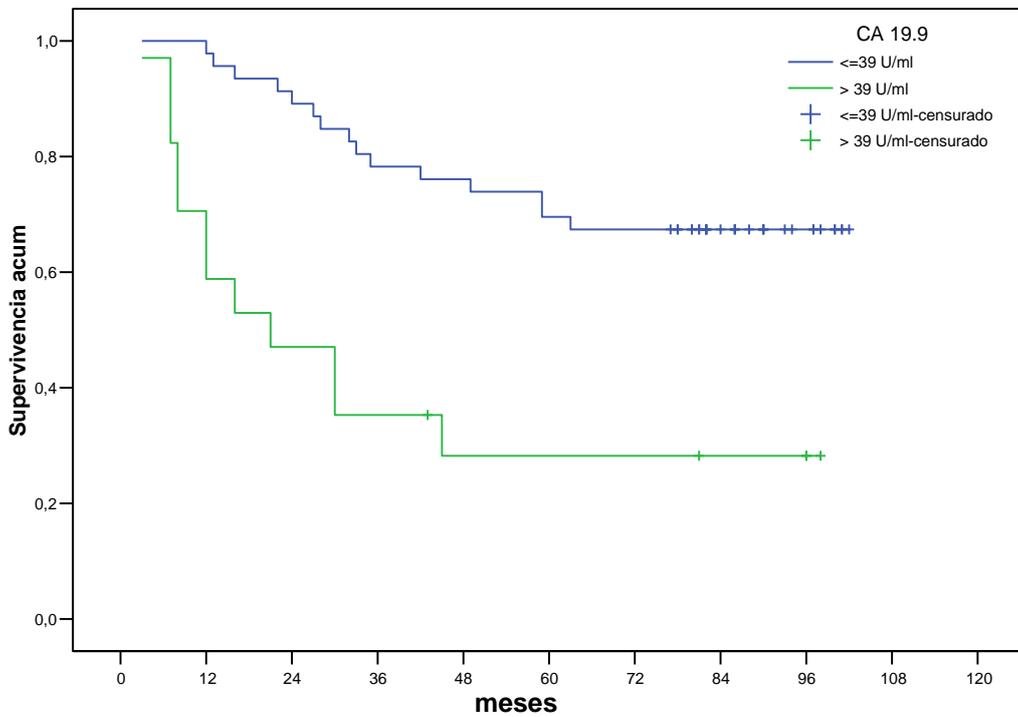


Figura nº 34. SG por CA 19.9 sérico inicial.

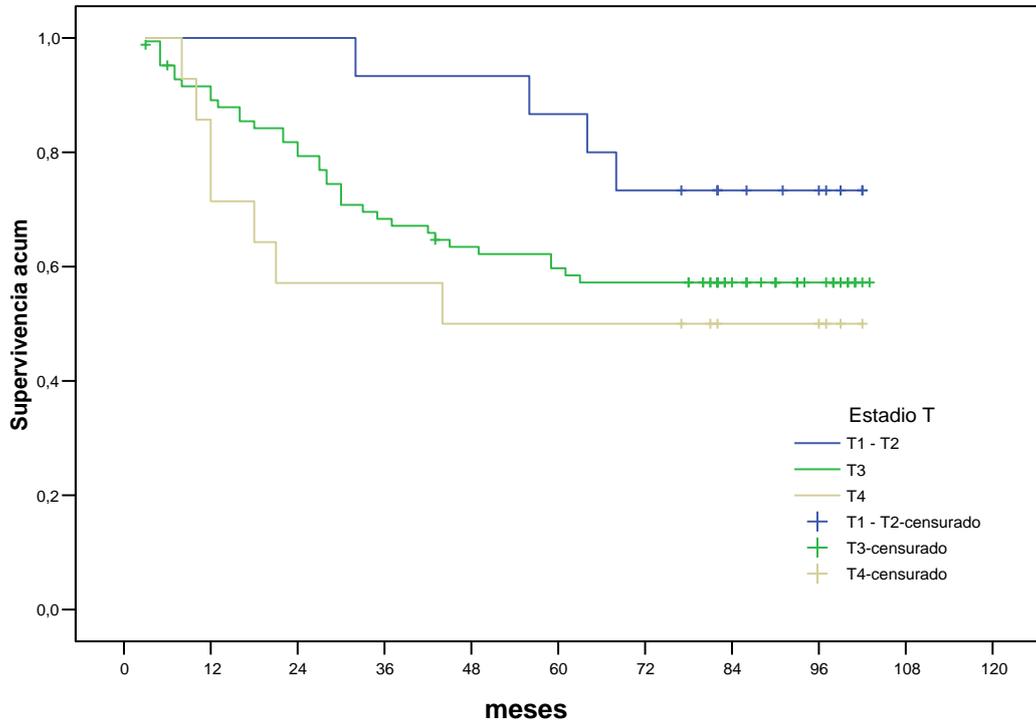


Figura nº 35. SG por Estadio T.

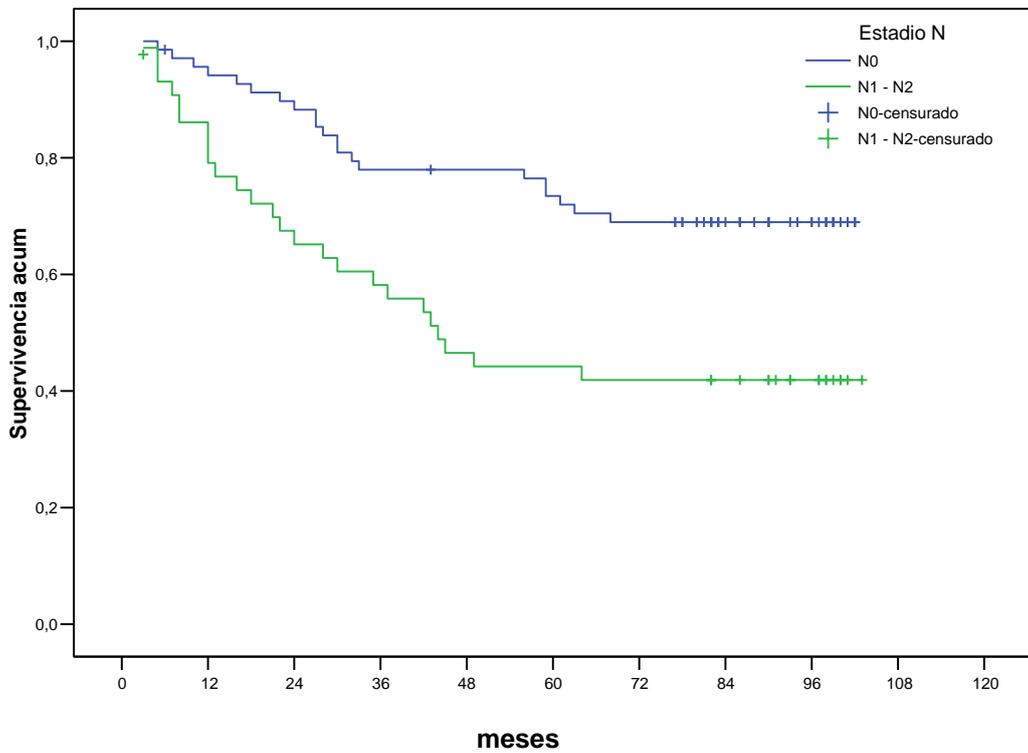


Figura nº 36. SG por estadio N.

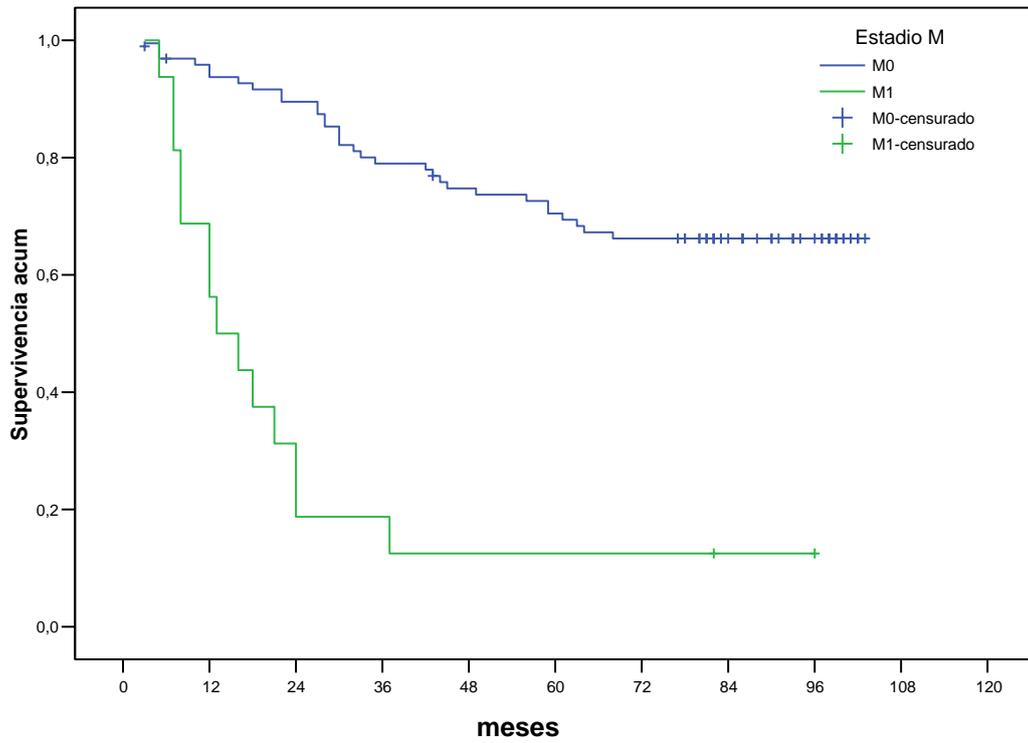


Figura nº 37. SG por Estadio M.

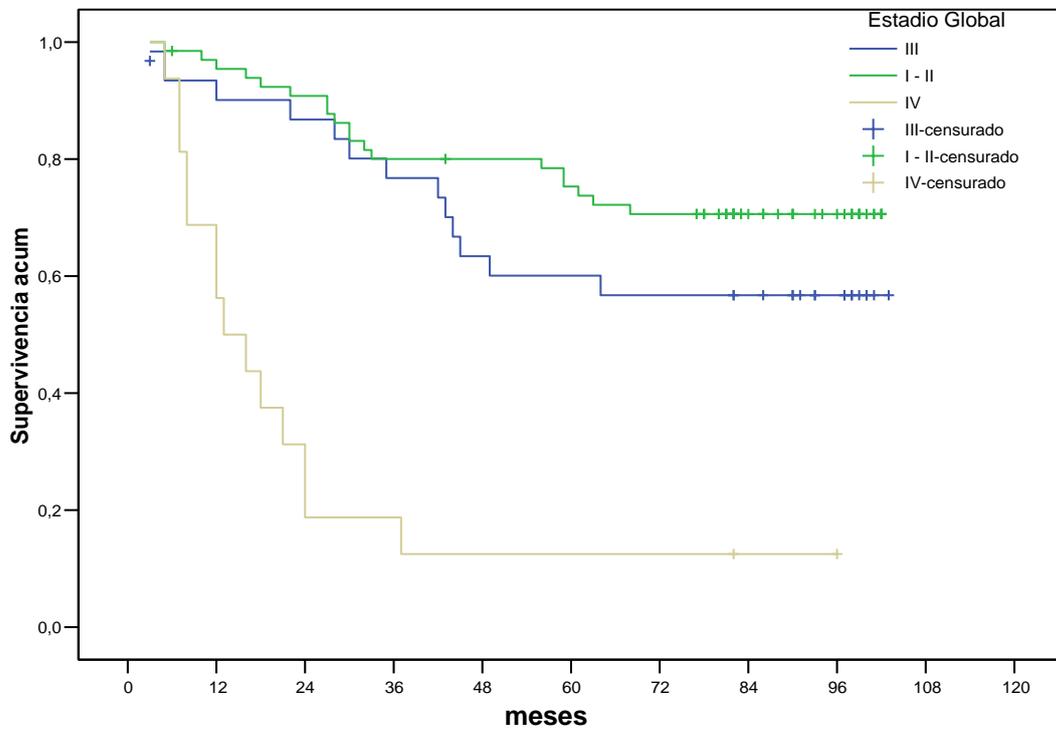


Figura nº 38. SG por Estadio Global.

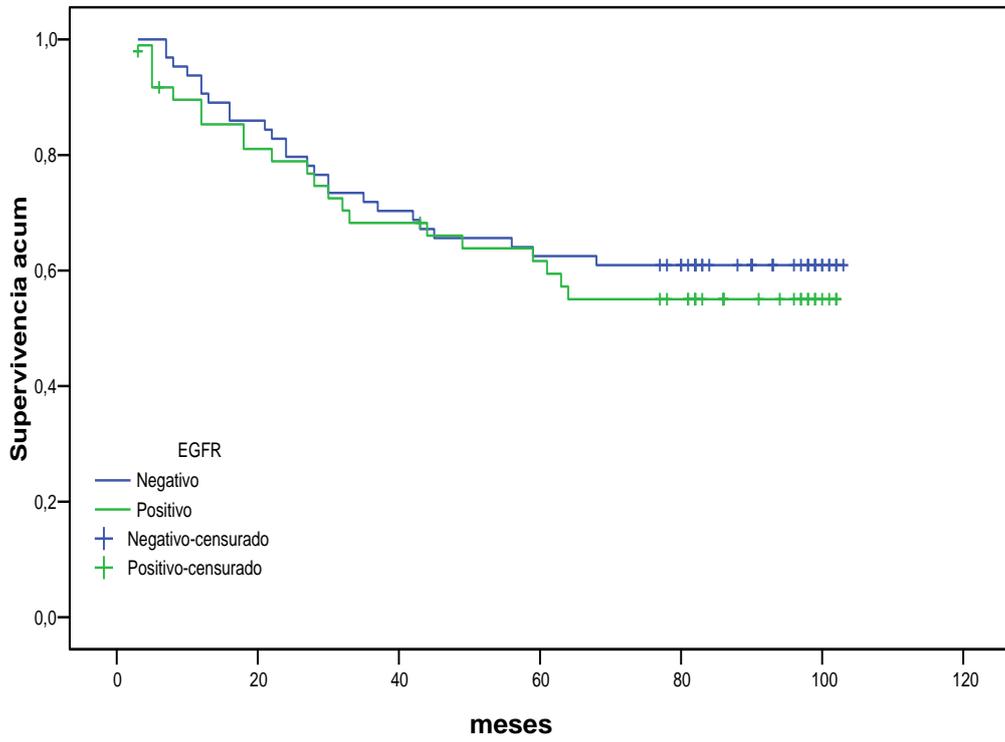


Figura nº 39. SG para expresión de EGFR

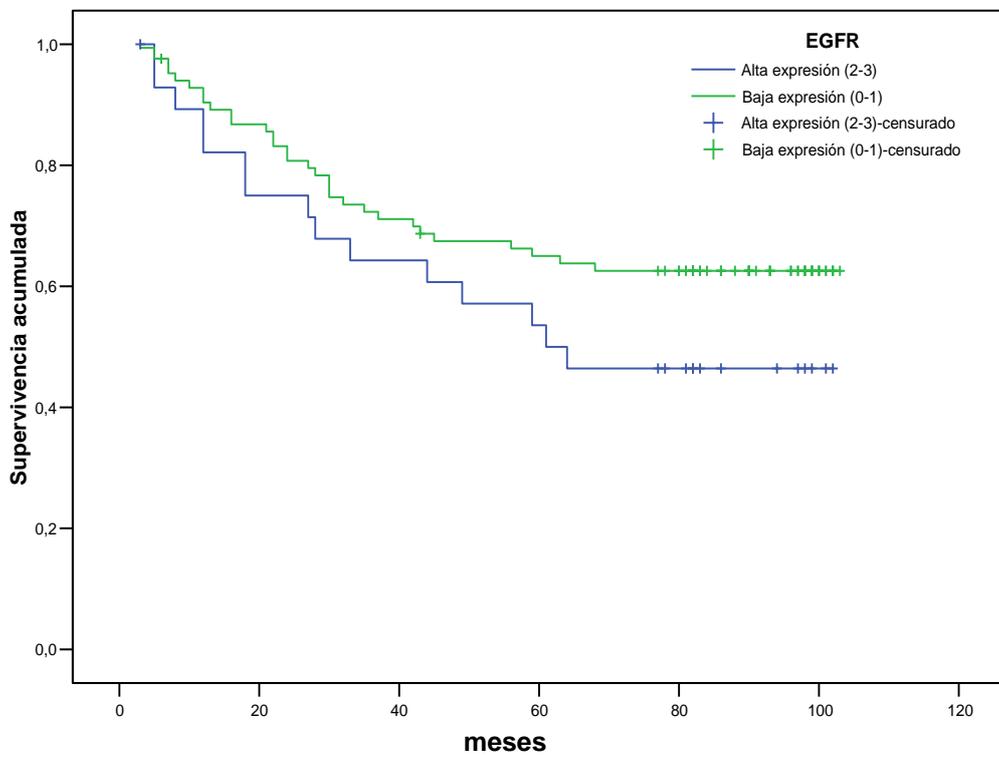


Figura nº 40. SG por score de EGFR.

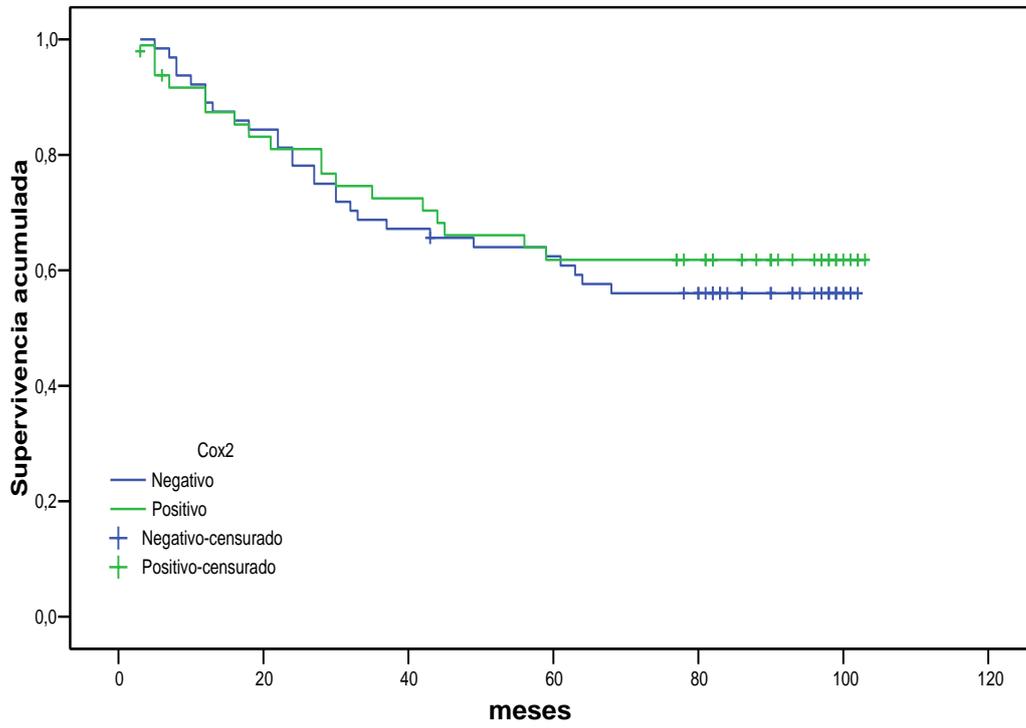


Figura nº 41. SG para expresión de Cox-2.

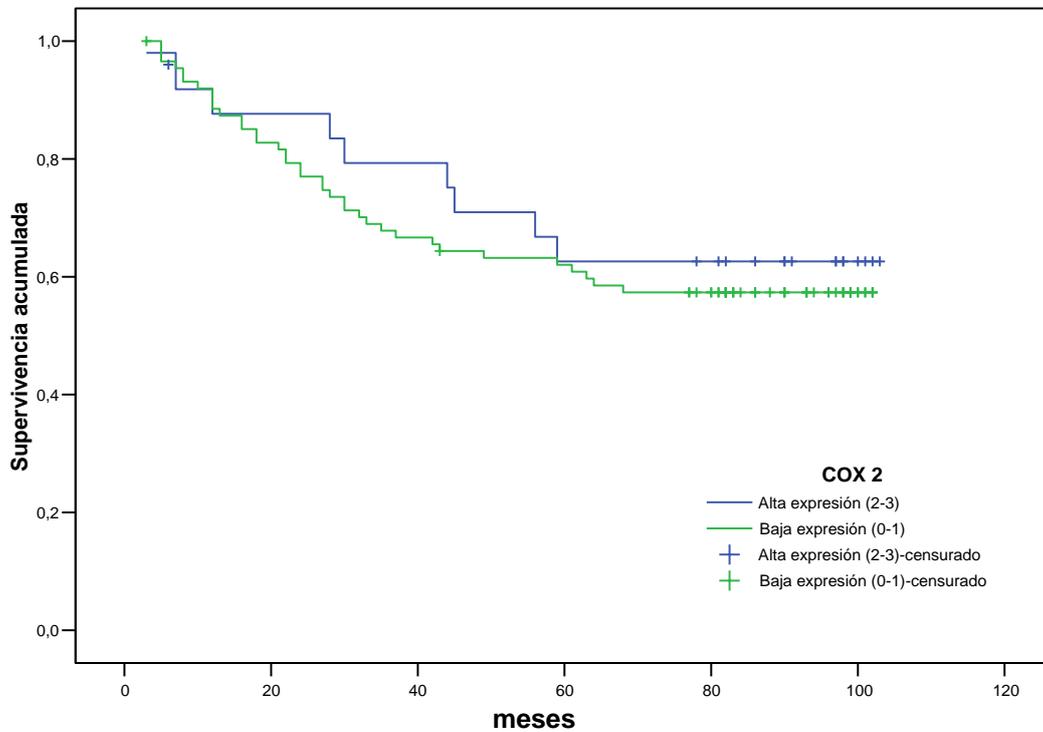


Figura nº 42. SG para score de Cox-2.

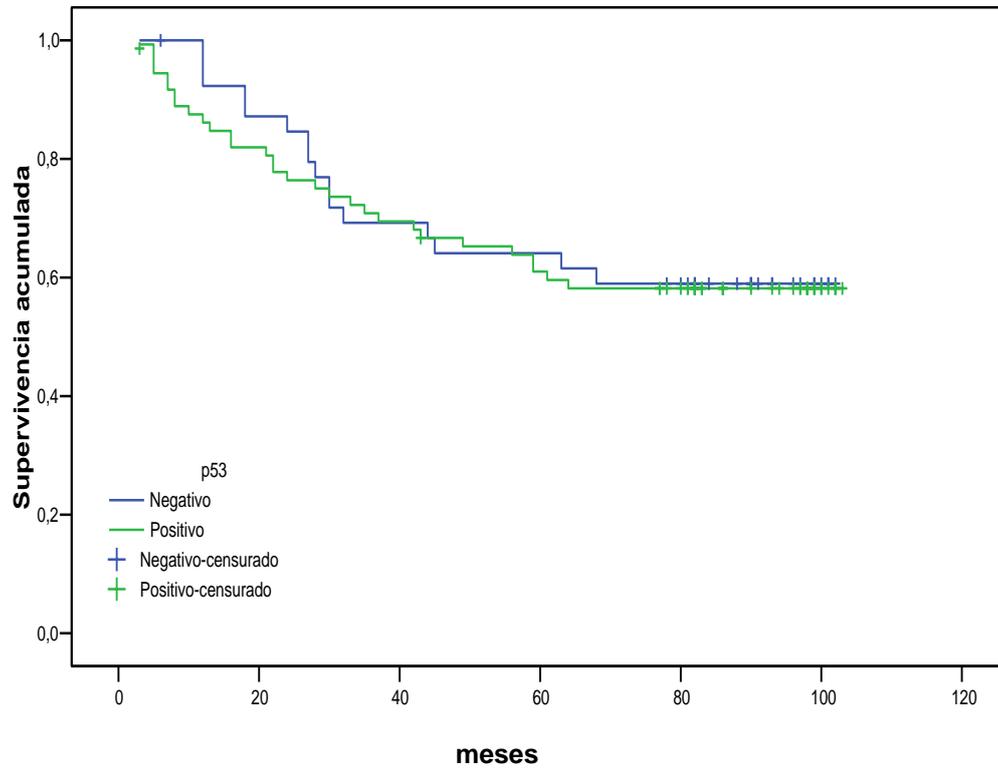


Figura nº 43. SG por expresión de TP53.

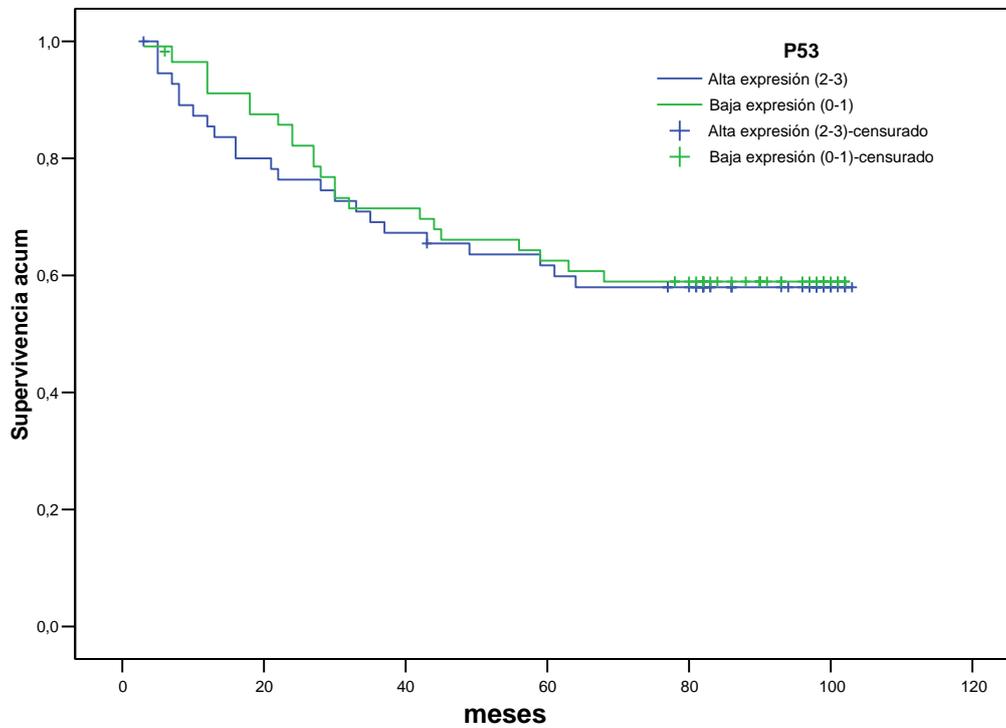


Figura nº 44. SG por score de TP53.

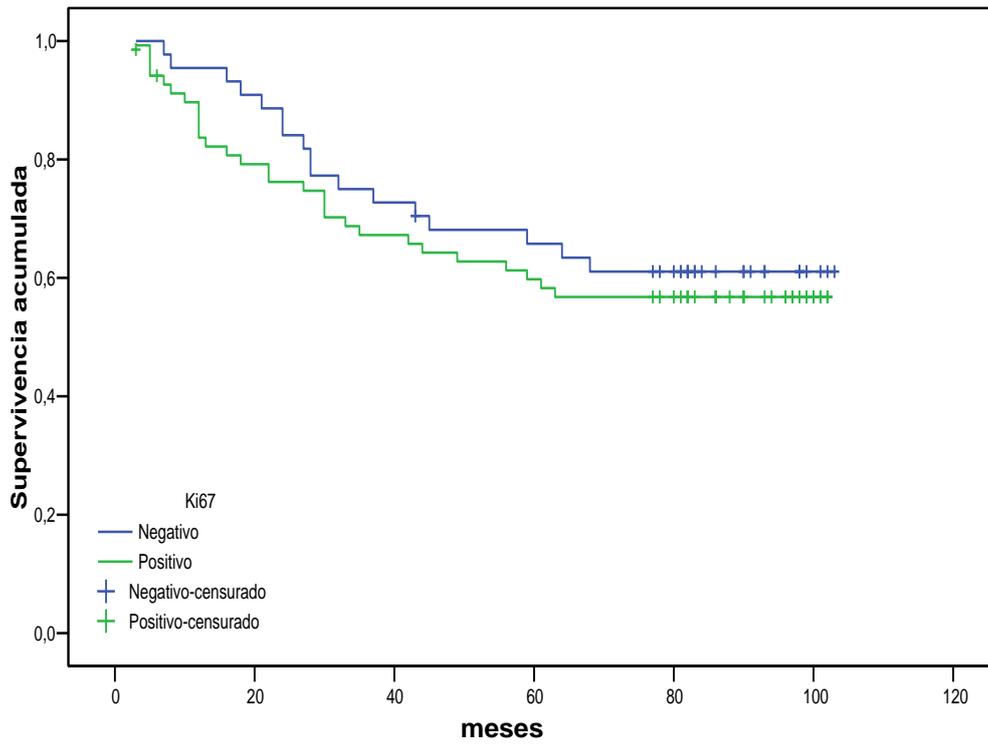


Figura nº 45. SG por expresión de pKi-67.

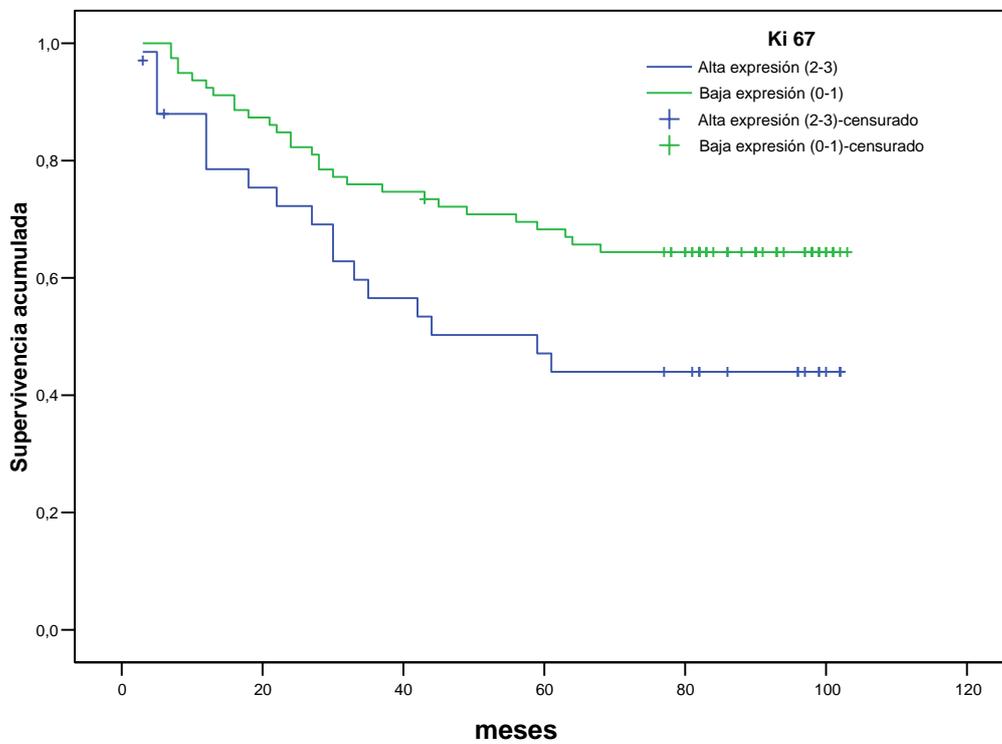


Figura nº 46. SG por score de pKi-67.

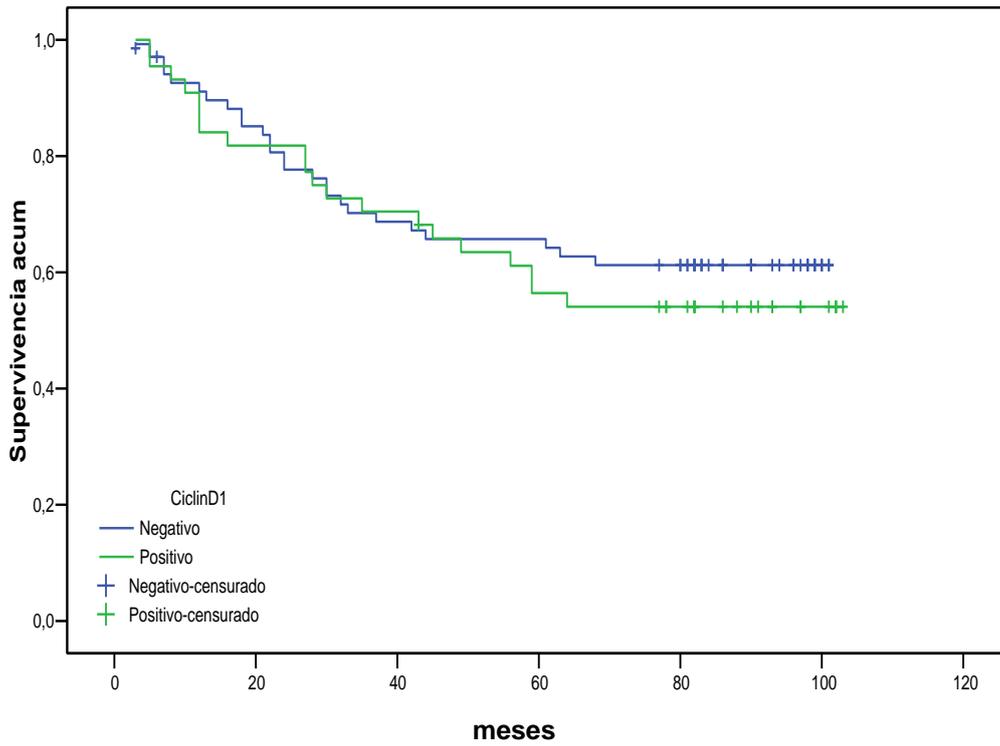


Figura nº 47. SG por expresión de Ciclina D1.

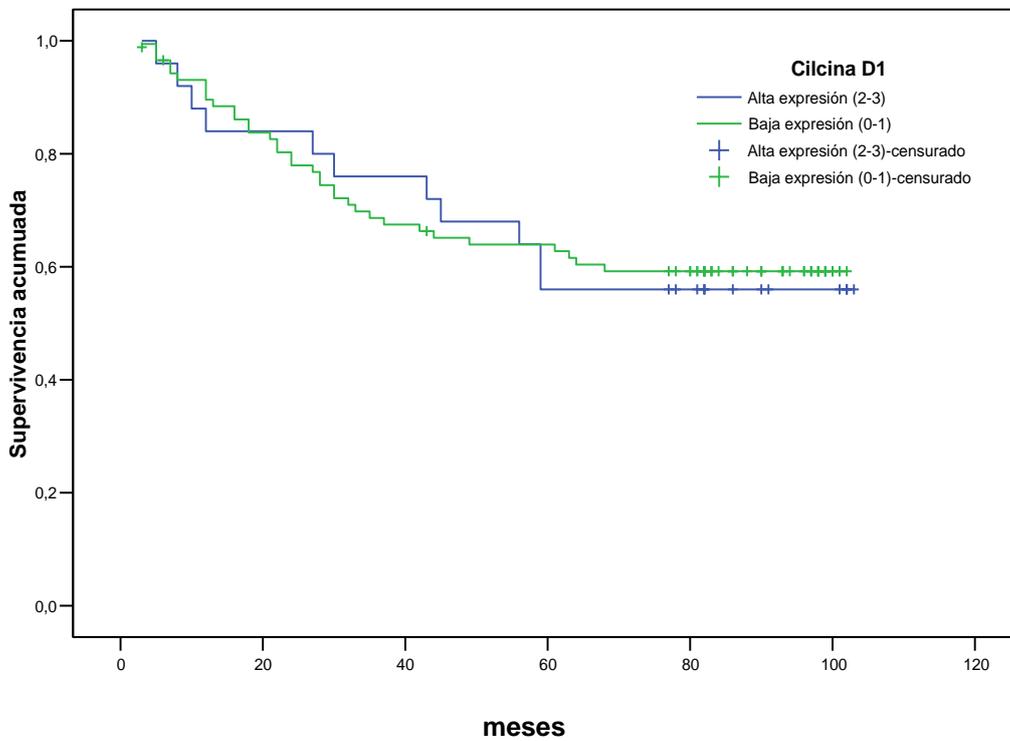


Figura nº 48. SG por score de Ciclina D1.

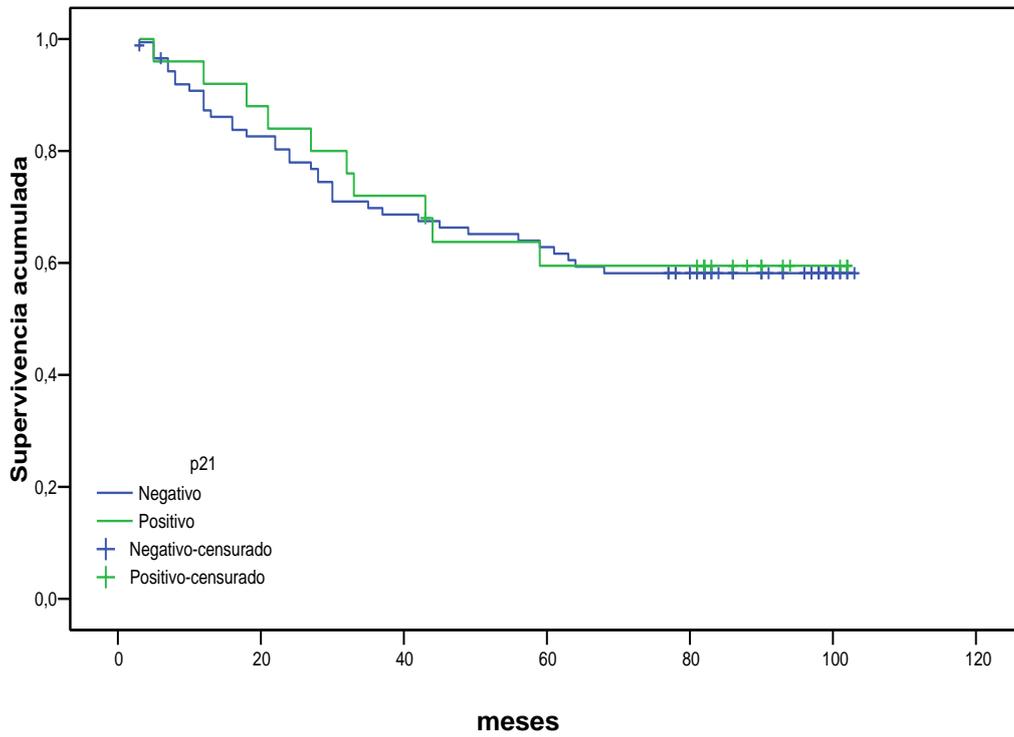


Figura nº 49. SG por expresión de p21^{waf1/cip1}.

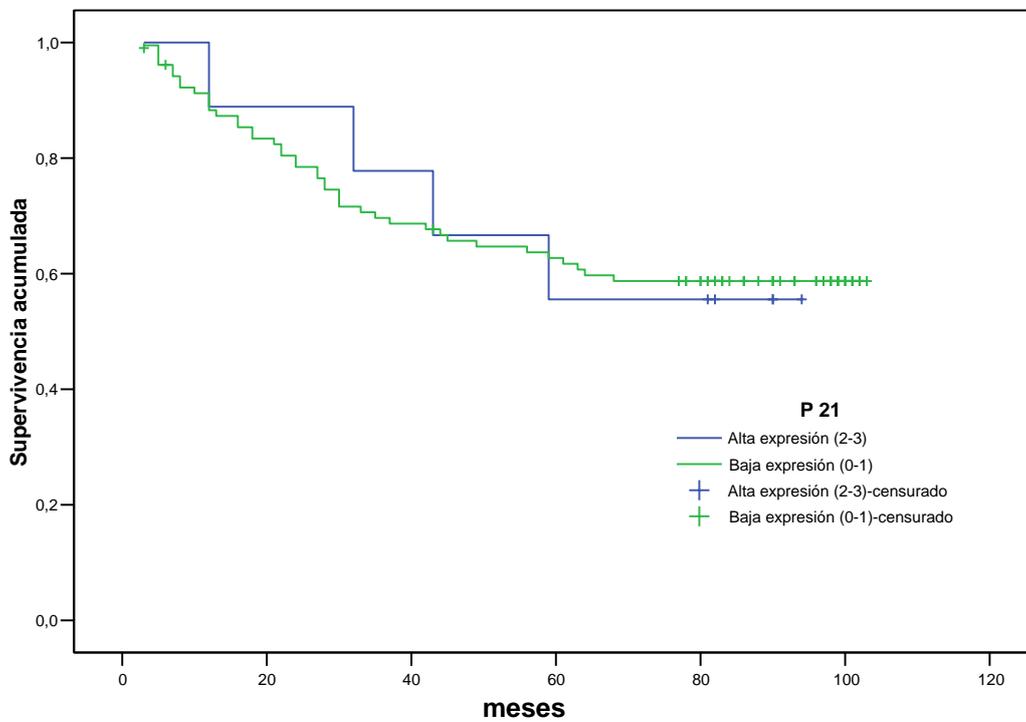


Figura nº 50. SG por score de p21^{waf1/cip1}.

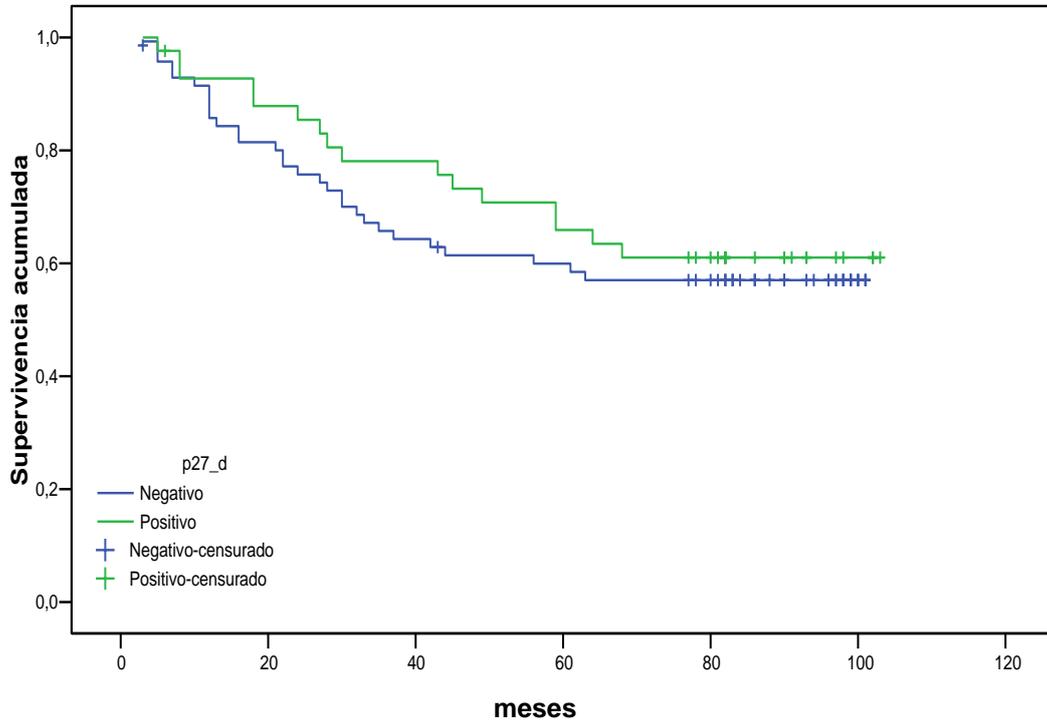


Figura nº 51. SG por expresión de p27^{Kip1}.

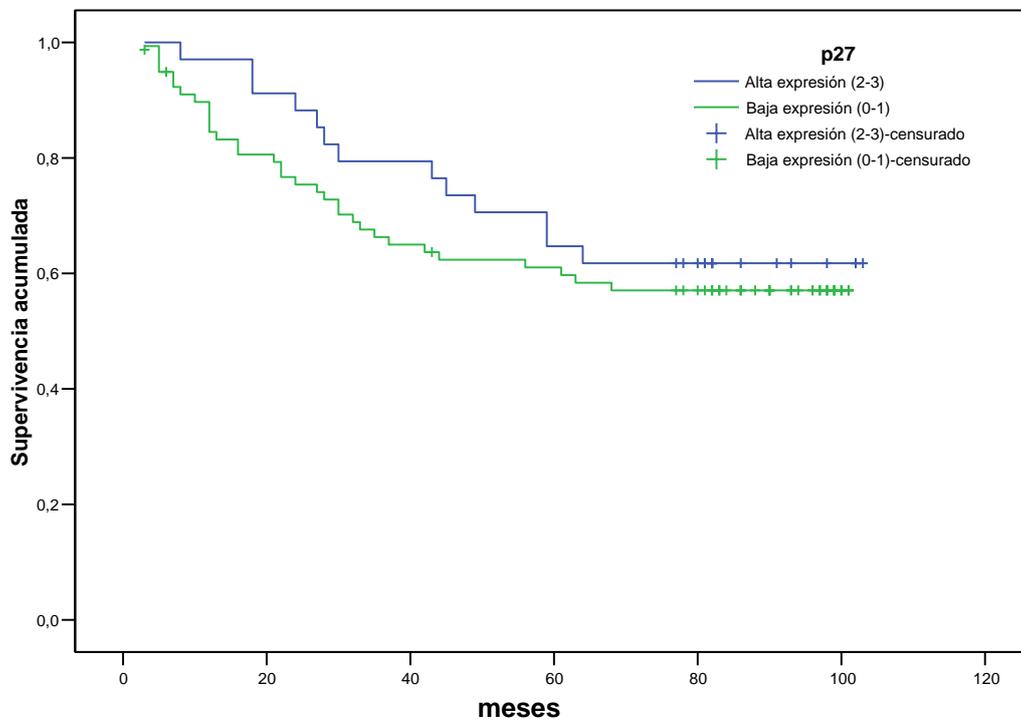


Figura nº 52. SG por score de p27^{Kip1}.

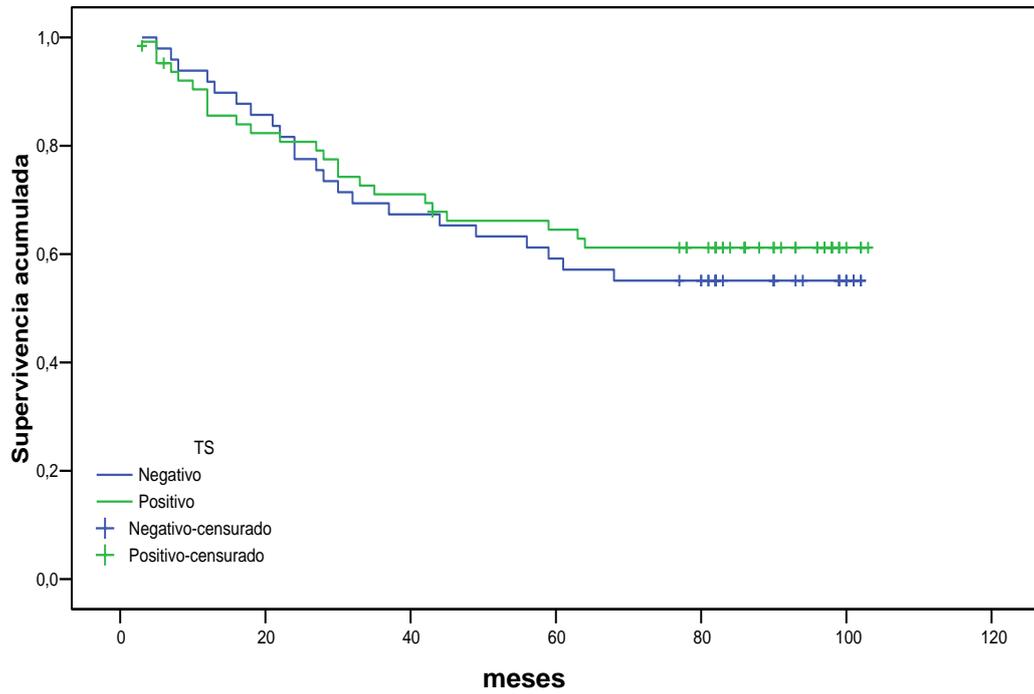


Figura nº 53. SG por expresión de pTS.

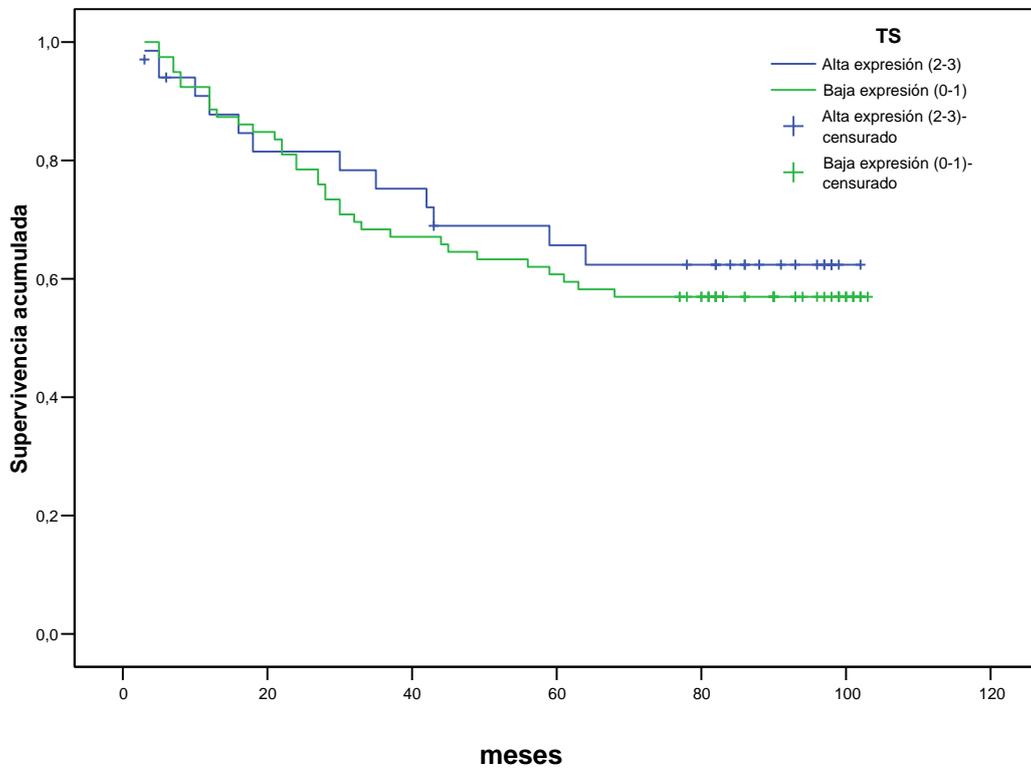


Figura nº 54. Supervivencia por score de pTS.

ANEXO: TABLAS.

Tabla nº 1.

Sistema de estadificación TNM para Cáncer de colon.

T-Tumor Primario

Tx	Tumor primario no puede ser valorado
T0	No evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ: intraepitelial o invasión de la lámina propia
T1	Tumor invade la submucosa
T2	Tumor invade la muscularis propia
T3	Tumor se extiende a través de la muscularis propia en la subserosa o en los tejidos pericólicos o perirectales no peritonelizados
T4	Tumor invade directamente otros órganos o estructuras y/o perfora peritoneo visceral

N-Linfáticos regionales.

Nx	Linfáticos regionales no pueden ser valorados
N0	Ausencia de metástasis linfáticas regionales
N1	Metástasis en 1-3 ganglios regionales
N2	Metástasis en 4 o más ganglios regionales

M-Metástasis a distancia.

Mx	Metástasis no pueden ser valoradas
Mo	Ausencia de metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia presentes

Estadificación Global.

Estadio	T	N	M
Estadio I	T1-T2	N0	M0
Estadio IIA	T3	N0	M0
Estadio IIB	T4	N0	M0
Estadio IIIA	T1-2	N1	M0
Estadio IIIB	T3-T4	N1	M0
Estadio IIIC	cT	N2	M0
Estadio IV	cT	cN	M1

Tabla nº 2. Distribución de CCR por Estadios y SG a 5 años.

Estadio al Diagnóstico	Distribución de Estadios (%)	SG relativa a 5 años (%)
Localizada	39	89.9
Regional	36	69.6
M+ a Distancia	20	11.9
Desconocido	5	33.9

Tomada de Howlader N et al. SEER 2009.

Tabla nº 3. Anticuerpos empleados y diluciones.

Anticuerpo	Catálogo nº	Clon	Proveedor	Dilución
EGFr	M3563	H11	Dako	1:1200
Cox-2	N1606	CK294	Dako	1:100
p53	N1581	DO7	Dako	1:25-50
Ciclina D1	N1619	DCS6	Dako	1:100
p21	M7202	SX118	Dako	1:25-50
p27	M7203	SX53G8	Dako	1:25-50
Ki-67	N1633	MIB1	Dako	1:75-150
TS	N605	TS106	Dako	1:50

Tabla nº 4. Escala de valoración de la Inmunotinción de BMT

Porcentaje/Intensidad	Leve	Moderada	Intensa
<30%	1/1	1/2	1/3
30-60%	2/1	2/2	2/3
>60%	3/1	3/2	3/3

Tabla nº 5. Características clínico-patológicas de los pacientes.

Características		Número	%
Pacientes		123	100
Edad años	Mediana	70	
	Límites	31-89	
Sexo	Varón	68	55.3
	Mujer	55	44.7
Localización	Derecha	38	30.9
	Izquierda	85	69.1
Histología	Adenocarcinomas	118	95.9
	Mucinosos	5	4.1
Grado	I	55	44.7
	II	56	45.5
	III	12	9.8
Infiltración LV	Positiva	81	65.9
	Negativa	42	34.1
CEA	≤ 5 ngr/ml	33	42.3
	> 5 ng/ml	45	57.7
CA 19.9	≤ 39 U/ml	51	71.8
	> 39 U/ml	20	28.2
Estadio pT	T1	2	1.6
	T2	13	10.6
	T3	92	74.8
	T4	16	13
Estadio pN	N0	74	60.2
	N1	32	26
	N2	17	13.8
Estadio pM	M0	104	84.6
	M1	19	15.4
Estadio Global	I	12	9.8
	II	59	48
	III	33	26.8
	IV	19	15.4

Tabla nº 6. Resultados de expresión de Marcadores moleculares.
Estudio semicuantitativo.

Marcador	Resultado	Número	%
EGFR	Negativo	69	56,1
	Positivo	54	43,9
	1	23	18,7
	2	15	12,2
	3	16	13,0
Cox 2	Negativo	70	56,9
	Positivo	53	43,1
	1	26	21,1
	2	20	16,3
	3	7	5,7
p53	Negativo	45	36,6
	Positivo	78	63,4
	1	18	14,6
	2	28	22,8
	3	32	26,0
Ki67	Negativo	48	39,0
	Positivo	75	61,0
	1	37	30,1
	2	25	20,3
	3	13	10,6
Ciclina D1	Negativo	75	61,0
	Positivo	48	39,0
	1	21	17,1
	2	19	15,4
	3	8	6,5
p21	Negativo	97	78,9
	Positivo	26	21,1
	1	17	13,8
	2	4	3,2
	3	5	4,1
p27	Negativo	77	62,6
	Positivo	46	37,4
	1	8	6,5
	2	15	12,2
	3	23	18,7
TS	Negativo	52	42,3
	Positivo	71	57,7
	1	32	26,0
	2	21	17,1
	3	18	14,6

Tabla nº 7. Expresión de BMT. Score bajo y alto.

Marcador	Score	Número	%
EGFR	Baja (0-1)	92	74.79
	Alta (2-3)	31	25.21
Cox-2	Baja (0-1)	96	78
	Alta (2-3)	27	22
p53	Baja (0-1)	63	51.2
	Alta (2-3)	60	48.8
Ki-67	Baja (0-1)	85	69.1
	Alta (2-3)	38	30.9
Ciclina D1	Baja (0-1)	96	78
	Alta (2-3)	27	22
p21	Baja (0-1)	114	92.7
	Alta (2-3)	9	7.3
p27	Baja (0-1)	85	69.1
	Alta (2-3)	38	30.9
TS	Baja (0-1)	84	68.3
	Alta (2-3)	39	31.7

Tabla nº 8. Correlaciones clínico-patológicas y expresión de EGFR.

Características	EGFR		p	EGFR		p
	Negativo Número (%)	Positivo Número (%)		Baja expresión	Alta Expresión	
Edad						
≤70	38 (58,5%)	27 (41,5%)	0,58	49 (75,4%)	16 (24,6%)	0,87
>70	31 (53,4%)	27 (46,6%)		43 (74,1%)	15 (25,9%)	
Sexo						
Varón	37 (54,4%)	31 (45,6%)	0,67	49 (72,1%)	19 (27,9%)	0,44
Mujer	32 (58,2%)	23 (41,8%)		43 (78,2%)	12 (21,8%)	
Localización						
Derecha	19 (50,0%)	19 (50,0%)	0,36	28 (73,7%)	10 (26,3%)	0,85
Izquierda	50 (58,8%)	35 (41,2%)		64 (75,3%)	21 (24,7%)	
Histología						
Adenoca	64 (54,2%)	54 (45,8%)	0,067	87 (73,7%)	31 (26,3%)	0,33
Mucinosos	5 (100,0%)	0 (0%)		5 (100%)	0 (0%)	
Grado						
I-II	62 (55,9%)	49 (44,1%)	0,87	83 (74,8%)	28 (25,2%)	1
III	7 (58,3%)	5 (41,7%)		9 (75%)	3 (25%)	
Infiltración LV						
Ausente	44 (54,3%)	37 (45,7%)	0,58	63 (77,8%)	18 (22,2%)	0,29
Presente	25 (59,5%)	17 (40,5%)		29 (69%)	13 (31%)	
CEA						
≤ 4,6 ngr/ml	20 (60,6%)	13 (39,4%)	0,80	27 (81,8%)	6 (18,2%)	0,78
> 4,6 ng/ml	26 (57,8%)	19 (42,2%)		35 (77,8%)	10 (22,2%)	
CA 19,9						
≤ 39 U/ml	30 (58,8%)	21 (41,2%)	0,93	41 (80,4%)	10 (19,6%)	1
> 39 U/ml	12 (60,0%)	8 (40,0%)		16 (80%)	4 (20%)	
Estadio						
T1-T2	10 (66,7%)	5 (33,3%)	0,22	13 (86,7%)	2 (13,3%)	0,04
T3	53 (57,6%)	39 (42,4%)		71 (77,2%)	21 (22,8%)	
T4	6 (37,5%)	10 (62,5%)		8 (50%)	8 (50%)	
Estadio						
N0	44 (59,5%)	30 (40,5%)	0,36	58 (78,4%)	16 (21,6%)	0,26
N1-N2	25 (51,0%)	24 (49,0%)		34 (69,4%)	15 (30,6%)	
Estadio						
M0	58 (55,8%)	46 (44,2%)	0,86	80 (76,9%)	24 (23,1%)	0,25
M1	11 (57,9%)	8 (42,1%)		12 (63,2%)	7 (36,8%)	
Estadio Global						
I-II	42 (59,2%)	29 (40,8%)	0,58	55 (77,5%)	16 (22,5%)	0,44
III	16 (48,5%)	17 (51,5%)		25 (75,8%)	8 (24,2%)	
IV	11 (57,9%)	8 (42,1%)		12 (63,2%)	7 (36,8%)	

Tabla nº 9. Correlaciones clínico-patológicas y expresión de Cox-2.

Características	COX-2		p	COX-2		p
	Negativa Número (%)	Positiva Número (%)		Baja expresión	Alta Expresión	
Edad						
≤70	37 (56,9%)	28 (43,1%)	0,99	52 (80%)	13 (20%)	0,58
>70	33 (56,9%)	25 (43,1%)		44 (75,9%)	14 (24,1%)	
Sexo						
Varón	37 (54,4%)	31 (45,6%)	0,53	52 (76,5%)	16 (23,5%)	0,64
Mujer	33 (60,0%)	22 (40,0%)		44 (80%)	11 (20%)	
Localización						
Derecha	24 (63,2%)	14 (36,8%)	0,35	30 (78,9%)	8 (21,1%)	0,87
Izquierda	46 (54,1%)	39 (45,9%)		66 (77,6%)	19 (22,4%)	
Histología						
Adenoca	65 (55,1%)	53 (44,9%)	0,069	91 (77,1%)	27 (22,9%)	0,23
Mucinosos	5 (100,0%)	0 (0%)		5 (100%)	0	
Grado						
I-II	63 (56,8%)	48 (43,2%)	0,92	88 (79,3%)	23 (20,7%)	0,32
III	7 (58,3%)	5 (41,7%)		8 (66,7%)	4 (33,3%)	
Infiltración LV						
Ausente	47 (58,0%)	34 (42,0%)	0,73	63 (77,8%)	18 (22,2%)	0,92
Presente	23 (54,8%)	19 (45,2%)		33 (78,6%)	9 (21,4%)	
CEA						
≤ 4,6 ngr/ml	19 (57,6%)	14 (42,4%)	0,86	24 (72,7%)	9 (27,3%)	0,61
> 4,6 ng/ml	25 (55,6%)	20 (44,4%)		35 (77,8%)	10 (22,2%)	
CA 19,9						
≤ 39 U/ml	30 (58,8%)	21 (41,2%)	0,29	39 (76,5%)	12 (23,5%)	0,90
> 39 U/ml	9 (45,0%)	11 (55,0%)		15 (75,0%)	5 (25,0%)	
Estadio						
T1-T2	7 (46,7%)	8 (53,3%)	0,53	9 (60%)	6 (40%)	0,15
T3	55 (59,8%)	37 (40,2%)		73 (79,3%)	19 (20,7%)	
T4	8 (50,0%)	8 (50,0%)		14 (87,5%)	2 (12,5%)	
Estadio						
N0	46 (62,2%)	28 (37,8%)	0,15	60 (81,1%)	14 (18,9%)	0,32
N1-N2	24 (49,0%)	25 (51,0%)		36 (73,5%)	13 (26,5%)	
Estadio						
M0	59 (56,7%)	45 (43,3%)	0,92	79 (76%)	25 (24%)	0,19
M1	11 (57,9%)	8 (42,1%)		17 (89,5%)	2 (10,5%)	
Estadio Global						
I-II	45 (63,4%)	26 (36,6%)	0,92	58 (81,7%)	13 (18,3%)	0,05
III	14 (42,4%)	19 (57,6%)		21 (63,6%)	12 (36,4%)	
IV	11 (57,9%)	8 (42,1%)		17 (89,5%)	2 (10,5%)	

Tabla nº 10. Correlaciones clínico-patológicas y expresión de TP53.

Características	p53		p	p53		p
	Negativa Número (%)	Positiva Número (%)		Baja expresión	Alta Expresión	
Edad						
≤70	19 (29,2%)	46 (70,8%)	0,073	29 (44,6%)	36 (55,4%)	0,12
>70	26 (44,8%)	32 (55,2%)		34 (58,6%)	24 (41,4%)	
Sexo						
Varón	21 (30,9%)	47 (69,1%)	0,14	34 (50%)	34 (50%)	0,76
Mujer	24 (43,6%)	31 (56,4%)		29 (52,7%)	26 (47,3%)	
Localización						
Derecha	18 (47,4%)	20 (52,6%)	0,097	25 (65,8%)	13 (34,2%)	0,03
Izquierda	27 (31,8%)	58 (68,2%)		38 (44,7%)	47 (55,3%)	
Histología						
Adenoca	41 (34,7%)	77 (65,3%)	0,059	59 (50%)	59 (50%)	0,19
Mucinosos	4 (80,0%)	1 (20,0%)		4 (80%)	1 (20%)	
Grado						
I-II	42 (37,8%)	69 (62,2%)	0,57	58 (52,3%)	53 (47,7%)	0,49
III	3 (25,0%)	9 (75,0%)		5 (41,7%)	7 (58,3%)	
Infiltración LV						
Ausente	32 (39,5%)	49 (60,5%)	0,35	45 (55,6%)	36 (44,4%)	0,18
Presente	13 (31,0%)	29 (69,0%)		18 (42,9%)	24 (57,1%)	
CEA						
≤ 4,6 ngr/ml	14 (42,4%)	19 (57,6%)	0,41	18 (54,5%)	15 (45,5%)	0,62
> 4,6 ng/ml	15 (33,3%)	30 (66,7%)		22 (48,9%)	23 (51,1%)	
CA 19,9						
≤ 39 U/ml	21 (41,2%)	30 (58,8%)	0,20	29 (56,9%)	22 (43,1%)	0,10
> 39 U/ml	5 (25,0%)	15 (75,0%)		7 (35,0%)	13 (65%)	
Estadio						
T1-T2	5 (33,3%)	10 (66,7%)	0,80	6 (40%)	9 (60%)	0,63
T3	33 (35,9%)	59 (64,1%)		49 (53,3%)	43 (46,7%)	
T4	7 (43,8%)	9 (56,3%)		8 (50%)	8 (50%)	
Estadio						
N0	31 (41,9%)	43 (58,1%)	0,13	44 (59,5%)	30 (40,5%)	0,025
N1-N2	14 (28,6%)	35 (71,4%)		19 (38,8%)	30 (61,2%)	
Estadio						
M0	40 (38,5%)	64 (61,5%)	0,31	56 (53,8%)	48 (46,2%)	0,17
M1	5 (26,3%)	14 (73,7%)		7 (36,8%)	12 (63,2%)	
Estadio Global						
I-II	30 (42,3%)	41 (57,7%)	0,30	41 (57,7%)	30 (42,3%)	0,20
III	10 (30,3%)	23 (69,7%)		15 (45,5%)	18 (54,5%)	
IV	5 (26,3%)	14 (73,7%)		7 (36,8%)	12 (63,2%)	

Tabla nº 11. Correlaciones clínico-patológicas y expresión de pKi67.

Características	Ki67		p	Ki67		p
	Negativo Número (%)	Positivo Número (%)		Baja expresión	Alta Expresión	
Edad						
≤70	25 (38,5%)	40 (61,5%)	0,89	49 (87,4%)	16 (24,6%)	0,11
>70	23 (39,7%)	35 (60,3%)		36 (62,1%)	22 (37,9%)	
Sexo						
Varón	27 (39,7%)	41 (60,3%)	0,86	50 (73,5%)	18 (26,5%)	0,24
Mujer	21 (38,2%)	34 (61,8%)		35 (63,6%)	20 (36,4%)	
Localización						
Derecha	12 (31,6%)	26 (68,4%)	0,26	23 (60,5%)	15 (39,5%)	0,17
Izquierda	36 (42,4%)	49 (57,6%)		62 (72,9%)	23 (27,1%)	
Histología						
Adenoca	45 (38,1%)	73 (61,9%)	0,38	81 (68,6%)	37 (31,4%)	0,59
Mucinosos	3 (60,0%)	2 (40,0%)		4 (80%)	1 (20%)	
Grado						
I-II	45 (40,5%)	66 (59,5%)	0,46	78 (70,3%)	33 (29,7%)	0,51
III	3 (25,0%)	9 (75,0%)		7 (58,3%)	5 (41,7%)	
Infiltración LV						
Ausente	34 (42,0%)	47 (58,0%)	0,35	55 (67,9%)	26 (32,1%)	0,69
Presente	14 (33,3%)	28 (66,7%)		30 (71,4%)	12 (28,6%)	
CEA						
≤ 4,6 ngr/ml	11 (33,3%)	22 (66,7%)	1	28 (84,8%)	5 (15,2%)	0,03
> 4,6 ng/ml	15 (33,3%)	30 (66,7%)		28 (62,2%)	17 (37,8%)	
CA 19,9						
≤ 39 U/ml	19 (37,3%)	32 (62,7%)	0,86	39 (76,5%)	12 (23,5%)	0,17
> 39 U/ml	7 (35,0%)	13 (65,0%)		12 (60%)	8 (40%)	
Estadio						
T1-T2	6 (40,0%)	9 (60,0%)	0,20	9 (60%)	6 (40%)	0,30
T3	39 (42,4%)	53 (57,6%)		67 (72,8%)	25 (27,2%)	
T4	3 (18,8%)	13 (81,3%)		9 (56,3%)	7 (43,8%)	
Estadio						
N0	30 (40,5%)	44 (59,5%)	0,67	50 (67,6%)	24 (32,4%)	0,65
N1-N2	18 (36,7%)	31 (63,3%)		35 (71,4%)	14 (28,6%)	
Estadio						
M0	41 (39,4%)	63 (60,6%)	0,83	70 (67,3%)	34 (32,7%)	0,31
M1	7 (36,8%)	12 (63,2%)		15 (78,9%)	4 (21,1%)	
Estadio Global						
I-II	29 (40,8%)	42 (59,2%)	0,89	48 (67,6%)	23 (32,4%)	0,60
III	12 (36,4%)	21 (63,6%)		22 (66,7%)	11 (33,3%)	
IV	7 (36,8%)	12 (63,2%)		15 (78,9%)	4 (21,1%)	

Tabla nº 12. Correlaciones clínico-patológicas y expresión de Ciclina D1.

Características	Ciclina D1		p	Ciclina D1		p
	Negativa Número (%)	Positiva Número (%)		Baja expresión	Alta Expresión	
Edad						
≤70	42 (64,6%)	23 (35,4%)	0,38	52 (80%)	13 (20%)	0,58
>70	33 (56,9%)	25 (43,1%)		44 (75,9%)	14 (24,1%)	
Sexo						
Varón	40 (58,8%)	28 (41,2%)	0,59	51 (75%)	17 (25%)	0,36
Mujer	35 (63,6%)	20 (36,4%)		45 (81,8%)	10 (18,2%)	
Localización						
Derecha	23 (60,5%)	15 (39,5%)	0,95	30 (78,9%)	8 (21,1%)	0,87
Izquierda	52 (61,2%)	33 (38,8%)		66 (77,6%)	19 (22,4%)	
Histología						
Adenoca	72 (61,0%)	46 (39,0%)	1	92 (78%)	26 (22%)	1
Mucinosos	3 (60,0%)	2 (40,0%)		4 (80%)	1 (20%)	
Grado						
I-II	67 (60,4%)	44 (39,6%)	0,91	87 (78,4%)	24 (21,6%)	0,72
III	8 (66,7%)	4 (33,3%)		9 (75%)	3 (25%)	
Infiltración LV						
Ausente	53 (65,4%)	28 (34,6%)	0,16	64 (79%)	17 (21%)	0,72
Presente	22 (52,4%)	20 (47,6%)		32 (76,2%)	10 (23,8%)	
CEA						
≤ 4,6 ngr/ml	22 (66,7%)	11 (33,3%)	0,42	29 (87,9%)	4 (12,1%)	0,07
> 4,6 ng/ml	26 (57,8%)	19 (42,2%)		32 (71,1%)	13 (28,9%)	
CA 19,9						
≤ 39 U/ml	32 (62,7%)	19 (37,3%)	0,83	41 (80,4%)	10 (19,6%)	0,74
> 39 U/ml	12 (60,0%)	8 (40,0%)		15 (75%)	5 (25%)	
Estadio						
T1-T2	7 (46,7%)	8 (53,3%)	0,42	11 (73,3%)	4 (26,7%)	0,86
T3	57 (62,0%)	35 (38,0%)		72 (78,3%)	20 (21,7%)	
T4	11 (68,8%)	5 (31,3%)		13 (81,3%)	3 (18,8%)	
Estadio						
N0	47 (63,5%)	27 (36,5%)	0,48	59 (79,7%)	15 (20,3%)	0,58
N1-N2	28 (57,1%)	21 (42,9%)		37 (75,5%)	12 (24,5%)	
Estadio						
M0	64 (61,5%)	40 (38,5%)	0,76	82 (78,8%)	22 (21,2%)	0,62
M1	11 (57,9%)	8 (42,1%)		14 (73,7%)	5 (26,3%)	
Estadio Global						
I-II	44 (62,0%)	27 (38,0%)	0,95	56 (78,9%)	15 (21,1%)	0,88
III	20 (60,6%)	13 (39,4%)		26 (78,8%)	7 (21,2%)	
IV	11 (57,9%)	8 (42,1%)		14 (73,7%)	5 (26,3%)	

Tabla nº 13. Correlaciones clínico-patológicas y expresión de p21^{waf1/cip1}.

Características	p21		p	p21		p
	Negativo Número (%)	Positivo Número (%)		Baja expresión	Alta Expresión	
Edad						
≤70	51 (78,5%)	14 (21,5%)	0,91	58 (89,2%)	7 (10,8%)	0,17
>70	46 (79,3%)	12 (20,7%)		56 (96,6%)	2 (3,4%)	
Sexo						
Varón	51 (75,0%)	17 (25,0%)	0,24	62 (91,2%)	6 (8,8%)	0,73
Mujer	46 (83,6%)	9 (16,4%)		52 (94,5%)	3 (5,5%)	
Localización						
Derecha	30 (78,9%)	8 (21,1%)	0,99	35 (92,1%)	3 (7,9%)	1
Izquierda	67 (78,8%)	18 (21,2%)		79 (92,9%)	6 (7,1%)	
Histología						
Adenoca	93 (78,8%)	25 (21,2%)	0,95	109 (92,4%)	9 (7,6%)	1
Mucinosos	4 (80,0%)	1 (20,0%)		5 (100%)	0	
Grado						
I-II	86 (77,5%)	25 (22,5%)	0,25	103 (92,8%)	8 (7,2%)	1
III	11 (91,7%)	1 (8,3%)		11 (91,7%)	1 (8,3%)	
Infiltración LV						
Ausente	67 (82,7%)	14 (17,3%)	0,15	76 (93,8%)	5 (6,2%)	0,49
Presente	30 (71,4%)	12 (28,6%)		38 (90,5%)	4 (9,5%)	
CEA						
≤ 4,6 ngr/ml	28 (84,8%)	5 (15,2%)	0,58	29 (87,9%)	4 (12,1%)	0,72
> 4,6 ng/ml	36 (80,0%)	9 (20,0%)		41 (91,1%)	4 (8,9%)	
CA 19,9						
≤ 39 U/ml	40 (78,4%)	11 (21,6%)	0,53	44 (86,3%)	7 (13,7%)	0,43
> 39 U/ml	17 (85,0%)	3 (15,0%)		19 (95,0%)	1 (5%)	
Estadio						
T1-T2	12 (80,0%)	3 (20,0%)	0,96	13 (86,7%)	2 (13,3%)	0,63
T3	72 (78,3%)	20 (21,7%)		86 (93,5%)	6 (6,5%)	
T4	13 (81,3%)	3 (18,8%)		15 (93,8%)	1 (6,3%)	
Estadio						
N0	56 (75,7%)	18 (24,3%)	0,29	68 (91,9%)	6 (8,1%)	0,68
N1-N2	41 (83,7%)	8 (16,3%)		46 (93,9%)	3 (6,1%)	
Estadio						
M0	82 (78,8%)	22 (21,2%)	1	97 (93,3%)	7 (6,7%)	0,63
M1	15 (78,9%)	4 (21,1%)		17 (89,5%)	2 (10,5%)	
Estadio Global						
I-II	53 (74,6%)	18 (25,4%)	0,31	65 (91,5%)	6 (8,5%)	0,52
III	29 (87,9%)	4 (12,1%)		32 (97,0%)	1 (3,0%)	
IV	15 (78,9%)	4 (21,1%)		17 (89,5%)	2 (10,5%)	

Tabla nº 14. Correlaciones clínico-patológicas y expresión de p27^{Kip1}.

Características	p27		p	p27		p
	Negativo Número (%)	Positivo Número (%)		Baja expresión	Alta Expresión	
Edad						
≤70	43 (66,2%)	22 (33,8%)	0,39	47 (72,3%)	18 (27,7%)	0,42
>70	34 (58,6%)	24 (41,4%)		38 (65,5%)	20 (34,5%)	
Sexo						
Varón	42 (61,8%)	26 (38,2%)	0,83	47 (69,1%)	21 (30,9%)	1
Mujer	35 (63,6%)	20 (36,4%)		38 (69,1%)	17 (30,9%)	
Localización						
Derecha	25 (65,8%)	13 (34,2%)	0,62	29 (76,3%)	9 (23,7%)	0,25
Izquierda	52 (61,2%)	33 (38,8%)		56 (65,9%)	29 (34,1%)	
Histología						
Adenoca	74 (62,7%)	44 (37,3%)	1	81 (68,6%)	37 (31,4%)	0,96
Mucinosos	3 (60,0%)	2 (40,0%)		4 (80%)	1 (20%)	
Grado						
I-II	69 (62,2%)	42 (37,8%)	0,76	76 (68,5%)	35 (31,5%)	0,89
III	8 (66,7%)	4 (33,3%)		9 (75%)	3 (25%)	
Infiltración LV						
Ausente	49 (60,5%)	32 (39,5%)	0,50	54 (66,7%)	27 (33,3%)	0,42
Presente	28 (66,7%)	14 (33,3%)		31 (73,8%)	11 (26,2%)	
CEA						
≤ 4,6 ngr/ml	24 (72,7%)	9 (27,3%)	0,71	25 (75,8%)	8 (24,2%)	0,65
> 4,6 ng/ml	31 (68,9%)	14 (31,1%)		32 (71,1%)	13 (28,9%)	
CA 19,9			0,65			
≤ 39 U/ml	36 (70,6%)	15 (29,4%)	0,83	37 (72,5%)	14 (27,5%)	0,83
> 39 U/ml	13 (65,0%)	7 (35,0%)		14 (70%)	6 (30%)	
Estadio						
T1-T2	6 (40,0%)	9 (60,0%)	0,15	7 (46,7%)	8 (53,3%)	0,09
T3	60 (65,2%)	32 (34,8%)		65 (70,7%)	27 (29,3%)	
T4	11 (68,8%)	5 (31,3%)		13 (81,3%)	3 (18,8%)	
Estadio						
N0	47 (63,5%)	27 (36,5%)	0,80	51 (68,9%)	23 (31,1%)	0,96
N1-N2	30 (61,2%)	19 (38,8%)		34 (69,4%)	15 (30,6%)	
Estadio						
M0	66 (63,5%)	38 (36,5%)	0,64	72 (69,2%)	32 (30,8%)	0,94
M1	11 (57,9%)	8 (42,1%)		13 (68,4%)	6 (31,6%)	
Estadio Global						
I-II	45 (63,4%)	26 (36,6%)	0,90	49 (69%)	22 (31%)	1
III	21 (63,6%)	12 (36,4%)		23 (69,7%)	10 (30,3%)	
IV	11 (57,9%)	8 (42,1%)		13 (68,4%)	6 (31,6%)	

Tabla nº 15. Correlaciones clínico-patológicas y expresión de pTS.

Características	TS		p	TS		p
	Negativo Número (%)	Positivo Número (%)		Baja expresión	Alta Expresión	
Edad						
≤70	31 (47,7%)	34 (52,3%)	0,20	46 (70,8%)	19 (29,2%)	0,54
>70	21 (36,2%)	37 (63,8%)		38 (65,5%)	20 (34,5%)	
Sexo			0,31			
Varón	26 (38,2%)	42 (61,8%)	0,83	47 (69,1%)	21 (30,9%)	0,83
Mujer	26 (47,3%)	29 (52,7%)		37 (67,3%)	18 (32,7%)	
Localización						
Derecha	16 (42,1%)	22 (57,9%)	0,98	25 (65,8%)	13 (34,2%)	0,69
Izquierda	36 (42,4%)	49 (57,6%)		59 (69,4%)	26 (30,6%)	
Histología						
Adenoca	50 (42,4%)	68 (57,6%)	1	82 (69,5%)	36 (30,5%)	0,32
Mucinosos	2 (40,0%)	3 (60,0%)		2 (40%)	3 (60%)	
Grado						
I-II	49 (44,1%)	62 (55,9%)	0,20	77 (69,4%)	34 (30,6%)	0,52
III	3 (25,0%)	9 (75,0%)		7 (58,3%)	5 (41,7%)	
Infiltración LV						
Ausente	34 (42,0%)	47 (58,0%)	0,92	55 (67,9%)	26 (32,1%)	0,90
Presente	18 (42,9%)	24 (57,1%)		29 (69%)	13 (31%)	
CEA						
≤ 4,6 ngr/ml	17 (51,5%)	16 (48,5%)	0,23	24 (72,7%)	9 (27,3%)	0,71
> 4,6 ng/ml	17 (37,8%)	28 (62,2%)		31 (68,9%)	14 (31,1%)	
CA 19,9						
≤ 39 U/ml	23 (45,1%)	28 (54,9%)	0,12	36 (70,6%)	15 (29,4%)	0,65
> 39 U/ml	5 (25,0%)	15 (75,0%)		13 (65%)	7 (35%)	
Estadio						
T1-T2	6 (40,0%)	9 (60,0%)	0,98	8 (53,3%)	7 (46,7%)	0,32
T3	39 (42,4%)	53 (57,6%)		66 (71,7%)	26 (28,3%)	
T4	7 (43,8%)	9 (56,3%)		10 (62,5%)	6 (37,5%)	
Estadio						
N0	39 (52,7%)	35 (47,3%)	0,004	52 (70,3%)	22 (29,7%)	0,56
N1-N2	13 (26,5%)	36 (73,5%)		32 (65,3%)	17 (34,7%)	
Estadio						0,58
M0	43 (41,3%)	61 (58,7%)	0,62	70 (67,3%)	34 (32,7%)	0,58
M1	9 (47,4%)	10 (52,6%)		14 (73,7%)	5 (26,3%)	
Estadio Global						
I-II	38 (53,5%)	33 (46,5%)	0,001	49 (69%)	22 (31%)	0,74
III	5 (15,2%)	28 (84,8%)		21 (63,6%)	12 (36,4%)	
IV	9 (47,4%)	10 (52,6%)		14 (73,7%)	5 (26,3%)	

Tabla nº 16. Correlaciones de expresión de EGFR y otros BMT.

Biomarcadores	EGFR			EGFR			
	Negativo Número (%)	Positivo Número (%)	p	Baja expresión	Alta Expresión	p	
Cox-2				Cox-2			
Negativa	39 (55,7%)	31 (44,3%)	0,92	Baja Exp	71 (74%)	25 (26%)	0,69
Positiva	30 (56,6%)	23 (43,4%)		Alta Exp	21 (77,8%)	6 (22,2%)	
p53				p53			
Negativa	31 (68,9%)	14 (31,1%)	0,030	Baja Exp	54 (85,7%)	9 (14,3%)	0,004
Positiva	38 (48,7%)	40 (51,3%)		Alta exp	38 (63,3%)	22 (36,7%)	
Ki67				Ki-67			
Negativa	30 (62,5%)	18 (37,5%)	0,25	Baja Exp	66 (77,6%)	19 (22,4%)	0,28
Positiva	39 (52,0%)	36 (48,0%)		Alta Exp	26 (68,4%)	12 (31,6%)	
Ciclina D1				Ciclina D1			
Negativa	45 (60,0%)	30 (40,0%)	0,28	Baja Exp	74 (77,1%)	22 (22,9%)	0,27
Positiva	24 (50,0%)	24 (50,0%)		Alta Exp	18 (66,7%)	9 (33,3%)	
p21				p21			
Negativa	57 (58,8%)	40 (41,2%)	0,25	Baja Exp	86 (75,4%)	28 (24,6%)	0,56
Positiva	12 (46,2%)	14 (53,8%)		Alta Exp	6 (66,7%)	3 (33,3%)	
p27				p27			
Negativa	43 (55,8%)	34 (44,2%)	0,94	Baja Exp	65 (76,5%)	20 (23,5%)	0,52
Positiva	26 (56,5%)	20 (43,5%)		Alta Exp	27 (71,1%)	11 (28,9%)	
TS				TS			
Negativa	29 (55,8%)	23 (44,2%)	0,95	Baja Exp	60 (71,4%)	24 (28,6%)	0,21
Positiva	40 (56,3%)	31 (43,7%)		Alta Exp	32 (82,1%)	7 (17,9%)	

Tabla nº 17. Correlaciones de expresión de Cox-2 y otros BMT.

Biomarcadores	COX-2			COX-2			
	Negativa Número (%)	Positiva Número (%)	p	Baja expresión	Alta Expresión	p	
EGFr				EGFr			
Negativa	39 (56,5%)	30 (43,5%)	0,92	Baja Exp	71 (77,2%)	21 (22,8%)	0,45
Positiva	31 (57,4%)	23 (42,6%)		Alta exp	25 (80,6%)	6 (19,4%)	
p53				p53			
Negativa	24 (53,3%)	21 (46,7%)	0,54	Baja Exp	45 (71,4%)	18 (28,6%)	0,07
Positiva	46 (59,0%)	32 (41,0%)		Alta Exp	51 (85,0%)	9 (15%)	
Ki67				Ki67			
Negativa	31 (64,6%)	17 (35,4%)	0,17	Baja Exp	69 (81,2%)	16 (18,8%)	0,21
Positiva	39 (52,0%)	36 (48,0%)		Alta Exp	27 (71,1%)	11 (28,9%)	
Ciclina D1				Ciclina D1			
Negativa	48 (64,0%)	27 (36,0%)	0,047	Baja Exp	78 (81,3%)	18 (18,8%)	0,11
Positiva	22 (45,8%)	26 (54,2%)		Alta Exp	18 (66,7%)	9 (33,3%)	
p21				p21			
Negativa	56 (57,7%)	41 (42,3%)	0,72	Baja Exp	89 (78,1%)	25 (21,9%)	0,98
Positiva	14 (53,8%)	12 (46,2%)		Alta Exp	7 (77,8%)	2 (22,2%)	
p27				p27			
Negativa	49 (63,6%)	28 (36,4%)	0,051	Baja Exp	68 (80%)	17 (20%)	0,43
Positiva	21 (45,7%)	25 (54,3%)		Alta Exp	28 (73,7%)	10 (26,3%)	
TS				TS			
Negativa	36 (69,2%)	16 (30,8%)	0,018	Baja Exp	68 (81%)	16 (19%)	0,25
Positiva	34 (47,9%)	37 (52,1%)		Alta Exp	28 (71,8%)	11 (28,2%)	

Tabla nº 18. Correlaciones de expresión de TP53 y otros BMT.

Biomarcadores	p53			p	p53		
	Negativa Número (%)	Positiva Número (%)			Baja expresión	Alta Expresión	p
EGFr					EGFr		
Negativa	31 (44,9%)	38 (55,1%)	0,030	Baja Exp	54 (58,7%)	38 (41,3%)	0,004
Positiva	14 (25,9%)	40 (74,1%)		Alta exp	9 (29%)	22 (71%)	
Cox-2				Cox-2			
Negativa	24 (34,3%)	46 (65,7%)	0,54	Baja Exp	45 (46,9%)	51 (53,1%)	0,07
Positiva	21 (39,6%)	32 (60,4%)		Alta exp	18 (66,7%)	9 (33,3%)	
Ki67				Ki-67			
Negativa	19 (39,6%)	29 (60,4%)	0,58	Baja Exp	44 (51,8%)	41 (48,2%)	0,86
Positiva	26 (34,7%)	49 (65,3%)		Alta Exp	19 (50%)	19 (50%)	
Ciclina D1				Ciclina D1			
Negativa	28 (37,3%)	47 (62,7%)	0,83	Baja Exp	50 (52,1%)	46 (47,9%)	0,44
Positiva	17 (35,4%)	31 (64,6%)		Alta Exp	13 (48,1%)	14 (51,9%)	
p21				p21			
Negativa	34 (35,1%)	63 (64,9%)	0,49	Baja Exp	59 (51,8%)	55 (48,2%)	0,74
Positiva	11 (42,3%)	15 (57,7%)		Alta Exp	4 (44,4%)	5 (55,6%)	
p27				p27			
Negativa	26 (33,8%)	51 (66,2%)	0,40	Baja Exp	44 (51,8%)	41 (48,2%)	0,86
Positiva	19 (41,3%)	27 (58,7%)		Alta Exp	19 (50%)	19 (50%)	
TS				TS			
Negativa	24 (46,2%)	28 (53,8%)	0,059	Baja Exp	44 (52,4%)	40 (47,6%)	0,71
Positiva	21 (29,6%)	50 (70,4%)		Alta Exp	19 (48,7%)	20 (51,3%)	

Tabla nº 19. Correlaciones de expresión de pKi-67 y otros BMT.

Biomarcadores	Ki-67			p	Ki-67			p
	Negativa Número (%)	Positiva Número (%)			Baja expresión	Alta Expresión		
EGFr					EGFr			
Negativa	30 (43,5%)	39 (56,5%)	0,25	Baja Exp	66 (71,7%)	26 (28,3%)	0,28	
Positiva	18 (33,3%)	36 (66,7%)		Alta exp	19 (61,3%)	12 (38,7%)		
Cox-2				Cox-2				
Negativa	31 (44,3%)	39 (55,7%)	0,17	Baja Exp	69 (71,9%)	27 (28,1%)	0,21	
Positiva	17 (32,1%)	36 (67,9%)		Alta exp	16 (59,3%)	11 (40,7%)		
p53				p53				
Negativa	19 (42,2%)	26 (57,8%)	0,58	Baja Exp	44 (69,8%)	19 (30,2%)	0,86	
Positiva	29 (37,2%)	49 (62,8%)		Alta Exp	41 (68,3%)	19 (31,7%)		
Ciclina D1				Ciclina D1				
Negativa	29 (38,7%)	46 (61,3%)	0,92	Baja Exp	65 (67,7%)	31 (32,3%)	0,53	
Positiva	19 (39,6%)	29 (60,4%)		Alta Exp	20 (74,1%)	7 (25,9%)		
p21				p21				
Negativa	38 (39,2%)	59 (60,8%)	0,95	Baja Exp	78 (68,4%)	36 (31,6%)	0,56	
Positiva	10 (38,5%)	16 (61,5%)		Alta Exp	7 (77,8%)	2 (22,2%)		
p27				p27				
Negativa	26 (33,8%)	51 (66,2%)	0,12	Baja Exp	58 (68,2%)	27 (31,8%)	0,75	
Positiva	22 (47,8%)	24 (52,2%)		Alta Exp	27 (71,1%)	11 (28,9%)		
TS				TS				
Negativa	25 (48,1%)	27 (51,9%)	0,078	Baja Exp	61 (72,6%)	23 (27,4%)	0,22	
Positiva	23 (32,4%)	48 (67,6%)		Alta Exp	24 (61,5%)	15 (38,5%)		

Tabla nº 20. Correlaciones de expresión de Ciclina D1 y otros BMT.

Biomarcadores	Ciclina D1			p	Ciclina D1			p
	Negativa Número (%)	Positiva Número (%)			Baja expresión	Alta Expresión		
EGFr					EGFr			
Negativa	45 (65,2%)	24 (34,8%)	0,28	Baja Exp	74 (80,4%)	18 (19,6%)	0,27	
Positiva	30 (55,6%)	24 (44,4%)		Alta exp	22 (71%)	9 (29%)		
Cox-2				Cox-2				
Negativa	48 (68,6%)	22 (31,4%)	0,047	Baja Exp	78 (81,3%)	18 (18,8%)	0,11	
Positiva	27 (50,9%)	26 (49,1%)		Alta exp	18 (66,7%)	9 (33,3%)		
p53				p53				
Negativa	28 (62,2%)	17 (37,8%)	0,83	Baja Exp	50 (79,4%)	13 (20,6%)	0,72	
Positiva	47 (60,3%)	31 (39,7%)		Alta Exp	46 (76,7%)	14 (23,3%)		
Ki-67				Ki-67				
Negativa	29 (60,4%)	19 (39,6%)	0,92	Baja Exp	65 (76,5%)	20 (23,5%)	0,53	
Positiva	46 (61,3%)	29 (38,7%)		Alta Exp	31 (81,6%)	7 (18,4%)		
p21				p21				
Negativa	64 (66,0%)	33 (34,0%)	0,028	Baja Exp	92 (80,7%)	22 (19,3%)	0,01	
Positiva	11 (42,3%)	15 (57,7%)		Alta Exp	4 (44,4%)	5 (55,6%)		
p27				p27				
Negativa	53 (68,8%)	24 (31,2%)	0,021	Baja Exp	75 (88,2%)	10 (11,8%)	0,00004	
Positiva	22 (47,8%)	24 (52,2%)		Alta Exp	21 (55,3%)	17 (44,7%)		
TS				TS				
Negativa	35 (67,3%)	17 (32,7%)	0,22	Baja Exp	67 (79,8%)	17 (20,2%)	0.50	
Positiva	40 (56,3%)	31 (43,7%)		Alta Exp	29 (74,4%)	10 (25,6%)		

Tabla n° 21°. Correlaciones de expresión de p21^{waf1/cip1} y otros BMT.

Biomarcadores	p21			p21			p
	Negativa Número (%)	Positiva Número (%)		Baja expresión	Alta Expresión		
EGFr				EGFr			
Negativa	57 (82,6%)	12 (17,4%)	0,25	Baja Exp	86 (93,5%)	6 (6,5%)	0,56
Positiva	40 (74,1%)	14 (25,9%)		Alta exp	28 (90,3%)	3 (9,7%)	
Cox-2				Cox-2			
Negativa	56 (80,0%)	14 (20,0%)		Baja Exp	89 (92,7%)	7 (7,3%)	0,98
Positiva	41 (77,4%)	12 (22,6%)	0,72	Alta exp	25 (92,6%)	2 (7,4%)	
p53				p53			
Negativa	34 (75,6%)	11 (24,4%)	0,49	Baja Exp	59 (93,7%)	4 (6,3%)	0,67
Positiva	63 (80,8%)	15 (19,2%)		Alta Exp	55 (91,7%)	5 (8,3%)	
Ki-67				Ki-67			
Negativa	38 (79,2%)	10 (20,8%)	0,95	Baja Exp	78 (91,8%)	7 (8,2%)	0,56
Positiva	59 (78,7%)	16 (21,3%)		Alta Exp	36 (94,7%)	2 (5,3%)	
Ciclina D1				Ciclina D1			
Negativa	64 (85,3%)	11 (14,7%)	0,028	Baja Exp	92 (95,8%)	4 (4,2%)	0,01
Positiva	33 (68,8%)	15 (31,3%)		Alta Exp	22 (81,5%)	5 (18,5%)	
p27				p27			
Negativa	64 (83,1%)	13 (16,9%)	0,14	Baja Exp	79 (92,9%)	6 (7,1%)	0,87
Positiva	33 (71,7%)	13 (28,3%)		Alta Exp	35 (92,1%)	3 (7,9%)	
TS				TS			
Negativa	38 (73,1%)	14 (26,9%)	0,18	Baja Exp	78 (92,9%)	6 (7,1%)	0,91
Positiva	59 (83,1%)	12 (16,9%)		Alta Exp	36 (92,3%)	3 (7,7%)	

Tabla nº 22. Correlaciones de expresión de p27^{Kip1} y otros BMT.

Biomarcadores	p27			p27			p
	Negativa Número (%)	Positiva Número (%)		Baja expresión	Alta Expresión		
EGFr				EGFr			
Negativa	43 (62,3%)	26 (37,7%)	0,94	Baja Exp	65 (70,7%)	27 (29,3%)	0,52
Positiva	34 (63,0%)	20 (37,0%)		Alta exp	20 (64,5%)	11 (35,5%)	
Cox-2				Cox-2			
Negativa	49 (70,0%)	21 (30,0%)	0,051	Baja Exp	68 (70,8%)	28 (29,2%)	0,43
Positiva	28 (52,8%)	25 (47,2%)		Alta exp	17 (63%)	10 (37%)	
p53				p53			
Negativa	26 (57,8%)	19 (42,2%)	0,40	Baja Exp	44 (69,8%)	19 (30,2%)	0,86
Positiva	51 (65,4%)	27 (34,6%)		Alta Exp	41 (68,3%)	19 (31,7%)	
Ki-67				Ki-67			
Negativa	26 (54,2%)	22 (45,8%)	0,12	Baja Exp	58 (68,2%)	27 (31,8%)	0,75
Positiva	51 (68,0%)	24 (32,0%)		Alta Exp	27 (71,1%)	11 (28,9%)	
Ciclina D1				Ciclina D1			
Negativa	53 (70,7%)	22 (29,3%)	0,021	Baja Exp	75 (78,1%)	21 (21,9%)	0,00004
Positiva	24 (50,0%)	24 (50,0%)		Alta Exp	10 (37%)	17 (63%)	
p21				p21			
Negativa	64 (66,0%)	33 (34,0%)	0,13	Baja Exp	79 (69,3%)	35 (30,7%)	0,87
Positiva	13 (50,0%)	13 (50,0%)		Alta Exp	6 (66,7%)	3 (33,3%)	
TS				TS			
Negativa	34 (65,4%)	18 (34,6%)	0,58	Baja Exp	58 (69%)	26 (31%)	0,98
Positiva	43 (60,6%)	28 (39,4%)		Alta Exp	27 (69,2%)	12 (30,8%)	

Tabla nº 23. Correlaciones de expresión de pTS y otros BMT.

Biomarcadores	TS			p	TS		
	Negativa Número (%)	Positiva Número (%)			Baja expresión	Alta Expresión	p
EGFr							
Negativa	29 (42,0%)	40 (58,0%)	0,95	EGFr			0,21
Positiva	23 (42,6%)	31 (57,4%)		Baja Exp	60 (65,2%)	32 (34,8%)	
				Alta exp	24 (77,4%)	7 (22,6%)	
Cox-2				Cox-2			
Negativa	36 (51,4%)	34 (48,6%)	0,018	Baja Exp	68 (70,8%)	28 (29,2%)	0,25
Positiva	16 (30,2%)	37 (69,8%)		Alta exp	16 (59,3%)	11 (40,7%)	
p53				p53			
Negativa	24 (53,3%)	21 (46,7%)	0,059	Baja Exp	44 (69,8%)	19 (30,2%)	0,71
Positiva	28 (35,9%)	50 (64,1%)		Alta Exp	40 (66,7%)	20 (33,3%)	
Ki-67				Ki-67			
Negativa	25 (52,1%)	23 (47,9%)	0,078	Baja Exp	61 (71,8%)	24 (28,2%)	0,22
Positiva	27 (36,0%)	48 (64,0%)		Alta Exp	23 (60,5%)	15 (39,5%)	
Ciclina D1				Ciclina D1			
Negativa	35 (46,7%)	40 (53,3%)	0,22	Baja Exp	67 (69,8%)	29 (30,2%)	0,50
Positiva	17 (35,4%)	31 (64,6%)		Alta Exp	17 (63%)	10 (37%)	
p21				p21			
Negativa	38 (39,2%)	59 (60,8%)	0,18	Baja Exp	78 (68,4%)	36 (31,6%)	0,91
Positiva	14 (53,8%)	12 (46,2%)		Alta Exp	6 (66,7%)	3 (33,3%)	
p27				p27			
Negativa	34 (44,2%)	43 (55,8%)	0,58	Baja Exp	58 (68,2%)	27 (31,8%)	0,98
Positiva	18 (39,1%)	28 (60,9%)		Alta Exp	26 (68,4%)	12 (31,6%)	

Tabla n 24°. Relación entre la expresión de BMT moleculares.

BMT	CiclinD1	p27	TS	Cox2	Ki67	p53	p21	EGFR
CiclinD1	1,000	,291(**)	,163	,229(*)	-,020	,043	,242(**)	,117
	.	,001	,071	,011	,822	,640	,007	,199
p27	,291(**)	1,000	,052	,190(*)	-,097	-,003	,095	,052
	,001	.	,571	,035	,285	,974	,297	,571
TS	,163	,052	1,000	,231(*)	,174	,104	-,038	-,081
	,071	,571	.	,010	,054	,253	,677	,376
Cox2	,229(*)	,190(*)	,231(*)	1,000	,230(*)	-,101	-,009	-,020
	,011	,035	,010	.	,010	,267	,924	,827
Ki67	-,020	-,097	,174	,230(*)	1,000	,049	,009	,083
	,822	,285	,054	,010	.	,587	,920	,360
p53	,043	-,003	,104	-,101	,049	1,000	-,005	,222(*)
	,640	,974	,253	,267	,587	.	,954	,014
p21	,242(**)	,095	-,038	-,009	,009	-,005	1,000	,103
	,007	,297	,677	,924	,920	,954	.	,255
EGFR	,117	,052	-,081	-,020	,083	,222(*)	,103	1,000
	,199	,571	,376	,827	,360	,014	,255	.

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral). Test de Spearman.

Tabla nº 25. Supervivencia Libre de enfermedad (SLE) para FPC.

Características	SLE mediana (meses)	SLE media (meses)	HR (IC95%)	p(*)
Edad				
<70 (ref)	>103	83 (74 – 93)	1	0,25
≥70	>102	73 (60 – 85)	1,56 (0,73 – 3,33)	
Sexo				
Varón (ref)	>103	80 (70 – 91)	1	0,82
Mujer	>102	77 (65 – 88)	1,09 (0,51 – 2,32)	
Localización				
Derecha (ref)	>100	78 (65 – 91)	1	0,69
Izquierda	>103	78 (68 – 88)	1,19 (0,52 – 2,71)	
Histología				
Adenoca (ref)	>103	80 (72 – 88)	1	0,44
Mucinosos	>90	57 (21 – 92)	1,32 (0,64 – 2,71)	
Grado				
I-II (ref)	>103	79 (71 – 87)	1	0,75
III	>101	77 (47 – 106)	1,26 (0,30 – 5,33)	
Infiltración LV				
Ausente (ref)	>103	83 (75 – 92)	1	0,061
Presente	>99	63 (47 – 80)	2,11 (0,97 – 4,62)	
CEA				
≤ 5 ngr/ml (ref)	>100	79 (66 – 92)	1	0,44
> 5 ng/ml	>102	71 (56 – 87)	1,43 (0,56 – 3,64)	
CA 19,9				
≤ 39 U/ml (ref)	>102	79 (67 – 90)	1	0,13
> 39 U/ml	37 (nc)	56 (30 – 82)	2,17 (0,76 – 6,18)	
Estadio				
T1-2 (ref)	>102	91 (76 – 105)	1	0,29
T3	>103	77 (68 – 87)	2,42 (0,57 – 10,33)	
T4	>102	70 (44 – 97)	3,71 (0,68 – 20,30)	
Estadio				
N0 (ref)	>102	87 (79 – 95)	1	0,009
N1+2	41 (nc)	59 (44 – 75)	3,36 (1,57 – 7,19)	
Estadio				
M0 (ref)	>103	79 (71 – 87)	----	
Estadio Global				
I-II (ref)	>102	87 (79 – 85)	1	0,009
III	41 (nc)	59 (44 – 75)	3,36 (1,57 – 7,19)	

(n=97) HR: Hazard Ratio (Intervalo de Confianza del 95%)

Tabla nº 26. Supervivencia LE para BMT por expresión.

BMT Moleculares	SLE mediana (meses)	SLE media (meses)	HR (IC95%)	p(*)
EGFr				
Negativa	>103	81 (71 – 91)	1	0,46
Positiva	>102	75 (63 – 88)	1,32 (0,62 – 2,82)	
Cox-2				
Negativa	>102	74 (64 – 85)	1	0,25
Positiva	>103	84 (73 – 95)	0,63 (0,28 – 1,40)	
p53				
Negativa	>102	78 (65 – 90)	1	0,97
Positiva	>103	79 (69 – 89)	0,99 (0,45 – 2,15)	
Ki67				
Negativa	>103	85 (75 – 96)	1	0,31
Positiva	>102	74 (63 – 85)	1,51 (0,68 – 3,35)	
Ciclina D1				
Negativa	>101	79 (69 – 89)	1	0,65
Positiva	>103	76 (64 – 89)	1,19 (0,56 – 2,55)	
p21				
Negativa	>103	79 (70 – 88)	1	0,80
Positiva	>102	79 (64 – 94)	1,12 (0,47 – 2,64)	
p27				
Negativa	>101	75 (65 – 85)	1	0,45
Positiva	>103	83 (72 – 94)	0,73 (0,33 – 1,63)	
TS				
Negativa	>102	84 (73 – 95)	1	0,26
Positiva	>103	74 (64 – 85)	1,57 (0,71 – 3,50)	

(n=97) HR: Hazard Ratio (Intervalo de Confianza del 95%)

Tabla nº 27. Supervivencia LE para BMT por score.

BMT Moleculares	SLE mediana (me9)	SLE media (me)	HR (IC95%)	p(*)
EGFr				
Baja Expresión	>103	79 (71 – 88)	1	0,69
Alta Expresión	>102	77 (61 – 93)	1,19 (0,50 – 2,82)	
Cox-2				
Baja Expresión	>102	78 (69 – 87)	1	0,84
Alta Expresión	>103	80 (64 – 96)	0,91 (0,37 – 2,26)	
p53				
Baja Expresión	>102	80 (69 – 90)	1	0,62
Alta Expresión	>103	77 (66 – 89)	1,21 (0,57 – 2,57)	
Ki67				
Baja Expresión	>103	84 (75 – 92)	1	0,065
Alta Expresión	>102	66 (50 – 82)	2,03 (0,94 – 4,38)	
Ciclina D1				
Baja Expresión	>102	77 (68 – 86)	1	0,48
Alta Expresión	>103	84 (70 – 99)	0,71 (0,27 – 1,86)	
p21				
Baja Expresión	>103	79 (71 – 87)	1	0,64
Alta Expresión	>94	75 (56 – 94)	1,33 (0,40 – 4,43)	
p27				
Baja Expresión	>101	77 (68 – 87)	1	0,96
Alta Expresión	>103	79 (66 – 92)	0,98 (0,44 – 2,18)	
TS				
Baja Expresión	>103	80 (71 – 89)	1	0,78
Alta Expresión	>102	76 (62 – 90)	1,12 (0,50 – 2,50)	

(n=97) HR: Hazard Ratio (Intervalo de Confianza del 95%)

Tabla nº 28. Supervivencia Global para FP convencionales.

Características	Supervivencia global mediana (meses)	Supervivencia global media (meses)	HR IC 95%	p
Edad				
<70 (ref)	>103	80 (71 – 89)	1	0,009
≥70	59 (28 – 90)	61 (50 – 72)	2,15 (1,19 – 3,87)	
Sexo				
Varón (ref)	>103	70 (60 – 80)	1	0,60
Mujer	>102	74 (64 – 84)	0,86 (0,48 – 1,56)	
Localización				
Derecha (ref)	> 100	72 (60 – 84)	1	0,83
Izquierda	> 103	71 (62 – 80)	1,07 (0,57 – 2,01)	
Histología				
Adenoca (ref)	> 103	72 (65 – 79)	1	0,88
Mucinosos	> 90	58 (24 – 92)	1,12 (0,27 – 4,61)	
Grado				
I-II (ref)	>103	75 (67 – 82)	1	0,009
III	22 (8 – 36)	44 (19 – 69)	2,79 (1,24 – 6,26)	
Infiltración LV				
Ausente (ref)	>103	82 (75 – 90)	1	0,0001
Presente	30 (10 – 50)	50 (38 – 63)	3,07 (1,70 – 5,50)	
CEA				
≤ 5 ngr/ml (ref)	> 100	84 (73 – 95)	1	0,0024
> 5 ng/ml	59 (26 – 92)	58 (46 – 70)	3,42 (1,46 – 8,00)	
CA 19,9				
≤ 39 U/ml (ref)	>102	80 (70 – 89)	1	0,0002
> 39 U/ml	21 (3 – 39)	40 (22 – 58)	3,92 (1,82 – 8,47)	
Estadio				0,25
T1-2 (ref)	>102	89 (78 - 101)	1	
T3	>103	71 (62 – 79)	2,00 (0,71 – 5,65)	
T4	44 (NC)	60 (37 – 82)	2,75 (0,80 – 9,42)	
Estadio				0,0018
N0 (ref)	>102	81 (73 – 89)	1	
N1+2	44 (29 – 59)	57 (45 – 69)	2,44 (1,37 – 4,37)	
Estadio				<0,0001
M0 (ref)	>103	80 (73 -87)	1	
M1	13 (5 – 21)	25 (12 – 39)	6,84 (3,54 – 13,2)	
Estadio Global				<0,0001
I-II (ref)	>102	82 (74 – 80)	1	
III	>103	73 (59 – 86)	1,61 (0,79 – 3,26)	
IV	13 (5 – 21)	25 (12 – 39)	8,09 (3,95 – 16,6)	

(n = 113) HR: Hazard Ratio (Intervalo de Confianza del 95%)

Tabla nº 29. Supervivencia Global para BMT por expresión.

BMT Moleculares	Supervivencia global mediana (meses)	Supervivencia global media (meses)	HR IC 95%	p
EGFr				
Negativa	>103	74 (64 – 83)	1	0,55
Positiva	>102	69 (58 – 80)	1,19 (0,67 – 2,13)	
Cox-2				
Negativa	>102	70 (61 – 80)	1	0,62
Positiva	>103	74 (62 - 85)	0,86 (0,48 – 1,56)	
p53				
Negativa	>102	73 (61 – 84)	1	0,81
Positiva	>103	71 (62 – 80)	1,08 (0,59 – 1,97)	
Ki67				
Negativa	>103	76 (65 – 86)	1	0,53
Positiva	>102	69 (59 – 78)	1,21 (0,67 – 2,21)	
Ciclina D1				
Negativa	>101	72 (63 – 81)	1	0,53
Positiva	>103	70 (58 – 81)	1,20 (0,67 – 2,16)	
p21				
Negativa	>103	72 (63 – 80)	1	0,86
Positiva	>102	73 (58 – 87)	0,94 (0,46 – 1,89)	
p27				
Negativa	>101	68 (59 – 77)	1	0,52
Positiva	>103	76 (65 -87)	0,82 (0,45 – 1,50)	
TS				
Negativa	>102	70 (59 – 80)	1	0,60
Positiva	>103	73 (64 – 83)	0,86 (0,48 – 1,53)	

(n=113) HR: Hazard Ratio (Intervalo de Confianza del 95%)

Tabla nº 30. Supervivencia Global para BMT por score.

BMT Moleculares	Supervivencia global mediana (meses)	Supervivencia global media (meses)	HR IC 95%	p	
EGFr	Baja Expresión	>103	75 (67 – 83)	1	0,14
	Alta Expresión	61 (nc)	63 (49 -87)	1,57 (0,85 – 2,92)	
Cox-2	Baja Expresión	>102	70 (62 – 78)	1	0,60
	Alta Expresión	>103	76 (62 – 91)	0,82 (0,40 – 1,70)	
p53	Baja Expresión	>102	73 (63 – 82)	1	0,80
	Alta Expresión	>103	71 (60 – 80)	1,08 (0,61 – 1,92)	
Ki67	Baja Expresión	>103	77 (69 – 85)	1	0,030
	Alta Expresión	59 (23 – 95)	59 (45 – 73)	1,90 (1,05 – 3,44)	
Ciclina D1	Baja Expresión	>102	71 (63 – 80)	1	0,86
	Alta Expresión	>103	72 (57 – 87)	1,06 (0,54 – 2,09)	
p21	Baja Expresión	>103	72 (64 – 79)	1	0,98
	Alta Expresión	>94	68 (48 – 89)	1,01 (0,36 – 2,82)	
p27	Baja Expresión	>101	68 (60 – 77)	1	0,46
	Alta Expresión	>103	78 (66 – 89)	0,79 (0,42 – 1,50)	
TS	Baja Expresión	>103	71 (62 – 79)	1	0,62
	Alta Expresión	>102	74 (61 – 87)	0,85 (0,44 – 1,64)	

(n=113) HR: Hazard Ratio (Intervalo de Confianza del 95%)

**Tabla nº 31. Modelos multivariantes.
Indicador de Supervivencia Libre de Enfermedad.
(número de pacientes evaluados 97)**

Modelo basal

Variable	HR (IC95%)	p
Estadio Global		0,002
I-II (ref)	1	
III	3,36 (1,57 – 7,19)	

Asociación de los marcadores clásicos (CEA / CEA19.9) y nuevos BMT, ajustando por el modelo basal.

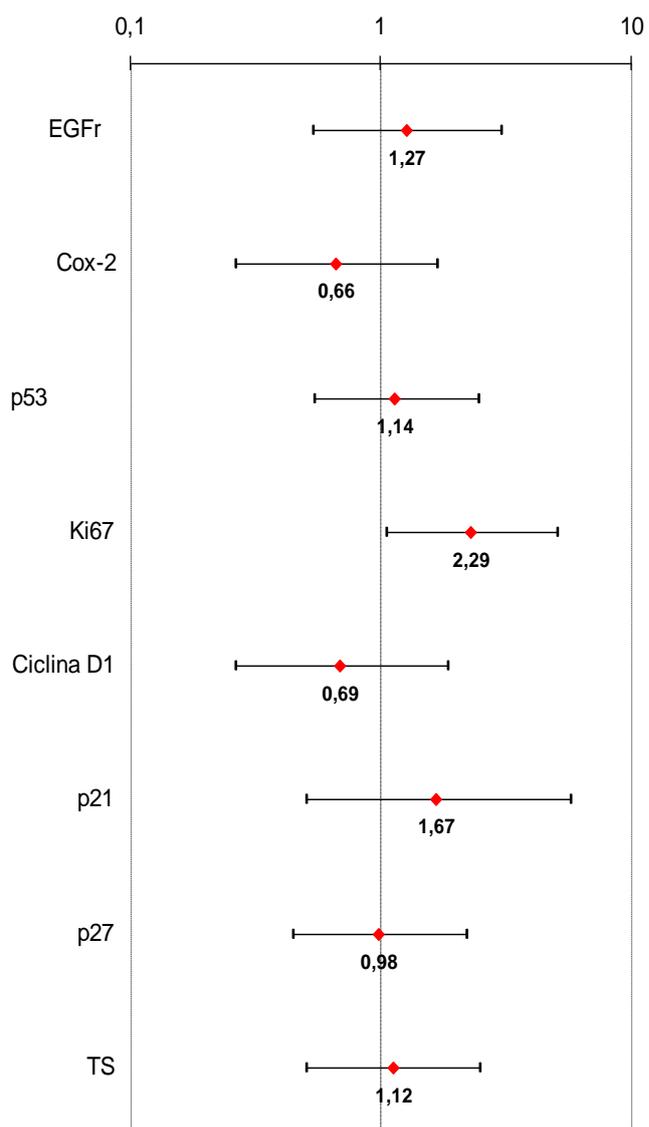
Marcador convencional			
BMT Serológico	Nivel de comparación	HR (IC95%)	p
CEA	> 5 ng/ml vs. ≤ 5 ngr/ml	1,33 (0,52 – 3,38)	0,55
CA 19.9	> 39 U/ml vs. ≤ 39 U/ml	2,36 (0,82 – 6,77)	0,11
Biomarcadores			
BMT Molecular	Nivel de comparación	HR (IC95%)	p
EGFr	Positivo vs negativo	1,26 (0,59 – 2,68)	0,55
Cox-2	Positivo vs negativo	0,51 (0,23 – 1,15)	0,10
p53	Positivo vs negativo	0,93 (0,42 – 2,03)	0,85
Ki67	Positivo vs negativo	1,40 (0,63 – 3,13)	0,41
Ciclina D1	Positivo vs negativo	1,17 (0,55 – 2,51)	0,68
p21	Positivo vs negativo	1,55 (0,63 – 3,77)	0,34
p27	Positivo vs negativo	0,70 (0,31 – 1,56)	0,38
TS	Positivo vs negativo	1,00 (0,42 – 2,39)	0,99
BMT Molecular	Nivel de comparación	HR (IC95%)	p
EGFr	Alta vs Baja expresión	1,27 (0,53 – 3,00)	0,59
Cox-2	Alta vs Baja expresión	0,66 (0,26 – 1,67)	0,38
p53	Alta vs Baja expresión	1,14 (0,54 – 2,43)	0,73
Ki67	Alta vs Baja expresión	2,29 (1,05 – 5,00)	0,04
Ciclina D1	Alta vs Baja expresión	0,69 (0,26 – 1,84)	0,46
p21	Alta vs Baja expresión	1,67 (0,50 – 5,69)	0,40
p27	Alta vs Baja expresión	0,98 (0,44 – 2,19)	0,96
TS	Alta vs Baja expresión	1,12 (0,50 – 2,48)	0,79

HR: Hazard Ratio (Intervalo de Confianza del 95%)

**Tabla nº 32. Modelo multivariante para ILE.
Asociación de los BMT ajustados por el modelo basal.**

BMT Molecular	Nivel	HR (IC95%)
EGFr	Negativo (ref)	1
	1	1,18 (0,45 – 3,09)
	2	1,80 (0,59 – 5,47)
	3	0,98 (0,28 – 3,43)
Cox-2	Negativo (ref)	1
	1	0,44 (0,13 – 1,51)
	2	0,58 (0,21 – 1,62)
	3	0,46 (0,06 – 3,46)
p53	Negativo (ref)	1
	1	0,66 (0,18 – 2,40)
	2	1,15 (0,45 – 2,94)
	3	0,88 (0,32 – 2,43)
Ki67	Negativo (ref)	1
	1	0,89 (0,33 – 2,41)
	2	0,87 (0,66 – 5,28)
	3	2,75 (0,91 – 8,32)
Ciclina D1	Negativo (ref)	1
	1	1,75 (0,71 – 4,30)
	2	0,69 (0,20 – 2,40)
	3	1,06 (0,24 – 4,64)
p21	Negativo (ref)	1
	1	1,36 (0,45 – 4,10)
	2	(nc)
	3	2,67 (0,79 – 9,03)
p27	Negativo (ref)	1
	1	(nc)
	2	1,18 (0,43 – 3,22)
	3	0,65 (0,22 – 1,91)
TS	Negativo (ref)	1
	1	0,89 (0,32 – 2,51)
	2	0,83 (0,24 – 2,82)
	3	1,34 (0,45 – 4,05)

Tabla nº 33. Hazards ratios de supervivencia libre de enfermedad (ajustados por modelo basal) - Alta vs Baja expresión.



**Tabla nº 34. Modelos multivariantes.
Indicador de Supervivencia Global.
(número de pacientes evaluado: 113)**

Modelo basal

Variable	HR (IC95%)	p
Edad		
<70 (ref)	1	0,019
≥70	2,02 (1,12 – 3,64)	
Infiltración LV		
Ausente (ref)	1	0,08
Presente	1,81 (0,93 – 3,52)	
Grado		
I-II (ref)	1	0,037
III	2,42 (1,05 – 5,58)	
Estadio Global		
I-II (ref)	1	<0,001
III	1,41 (0,68 – 2,90)	
IV	5,49 (2,47 – 12,23)	

**Asociación de los marcadores clásicos (CEA / CEA19.9) y nuevos BMT,
ajustando por el modelo basal:**

Marcador convencional			
BMT Serológico	Nivel de comparación	HR (IC95%)	p
CEA	> 5 ng/ml vs. ≤ 5 ngr/ml	1,86 (0,75 – 4,63)	0,18
CA 19.9	> 39 U/ml vs. ≤ 39 U/ml	3,04 (1,10 – 8,41)	0,032
BMT Molecular			
Biomarcadores			
EGFr	Positivo vs negativo	1,45 (0,79 – 2,67)	0,23
Cox-2	Positivo vs negativo	0,83 (0,45 – 1,54)	0,56
p53	Positivo vs negativo	1,07 (0,57 – 2,01)	0,83
Ki67	Positivo vs negativo	1,24 (0,67 – 2,29)	0,49
Ciclina D1	Positivo vs negativo	1,13 (0,62 – 2,08)	0,69
p21	Positivo vs negativo	0,85 (0,39 – 1,83)	0,67
p27	Positivo vs negativo	0,79 (0,43 – 1,46)	0,45
TS	Positivo vs negativo	0,77 (0,42 – 1,41)	0,39
BMT Molecular	Nivel de comparación	HR (IC95%)	p
EGFr	Alta vs Baja expresión	1,73 (0,93 – 3,24)	0,09
Cox-2	Alta vs Baja expresión	0,84 (0,39 – 1,82)	0,65
p53	Alta vs Baja expresión	1,04 (0,57 – 1,90)	0,90
Ki67	Alta vs Baja expresión	1,85 (1,01 – 3,40)	0,047
Ciclina D1	Alta vs Baja expresión	0,98 (0,49 – 1,96)	0,95
p21	Alta vs Baja expresión	0,73 (0,24 – 2,17)	0,57
p27	Alta vs Baja expresión	0,71 (0,37 – 1,37)	0,31
TS	Alta vs Baja expresión	0,86 (0,44 – 1,69)	0,66

HR: Hazard Ratio (Intervalo de Confianza del 95%)

**Tabla nº 35. Modelos Multivariantes para SG.
Asociación de BMT ajustados por el modelo basal.**

BMT Molecular	Nivel	HR (IC95%)
EGFr	Negativo (ref)	1
	1	0,96 (0,36 – 2,55)
	2	1,79 (0,76 – 4,20)
	3	1,66 (0,74 – 3,72)
Cox-2	Negativo (ref)	1
	1	0,86 (0,39 – 1,86)
	2	0,79 (0,31 – 2,01)
	3	0,85 (0,23 – 3,08)
p53	Negativo (ref)	1
	1	1,07 (0,43 – 2,68)
	2	1,22 (0,57 – 2,61)
	3	0,91 (0,40 – 2,08)
Ki67	Negativo (ref)	1
	1	0,83 (0,38 – 1,84)
	2	1,36 (0,61 – 3,01)
	3	2,58 (1,05 – 6,38)
Ciclina D1	Negativo (ref)	1
	1	1,31 (0,59 – 2,90)
	2	0,86 (0,35 – 2,12)
	3	1,43 (0,51 – 4,03)
p21	Negativo (ref)	1
	1	0,92 (0,36 – 2,35)
	2	0,19 (0,02 – 1,48)
	3	2,94 (0,85 – 10,2)
p27	Negativo (ref)	1
	1	1,25 (0,37 – 4,21)
	2	0,97 (0,37 – 2,57)
	3	0,63 (0,28 – 1,38)
TS	Negativo (ref)	1
	1	0,77 (0,35 – 1,69)
	2	0,94 (0,40 – 2,24)
	3	0,63 (0,23 – 1,71)

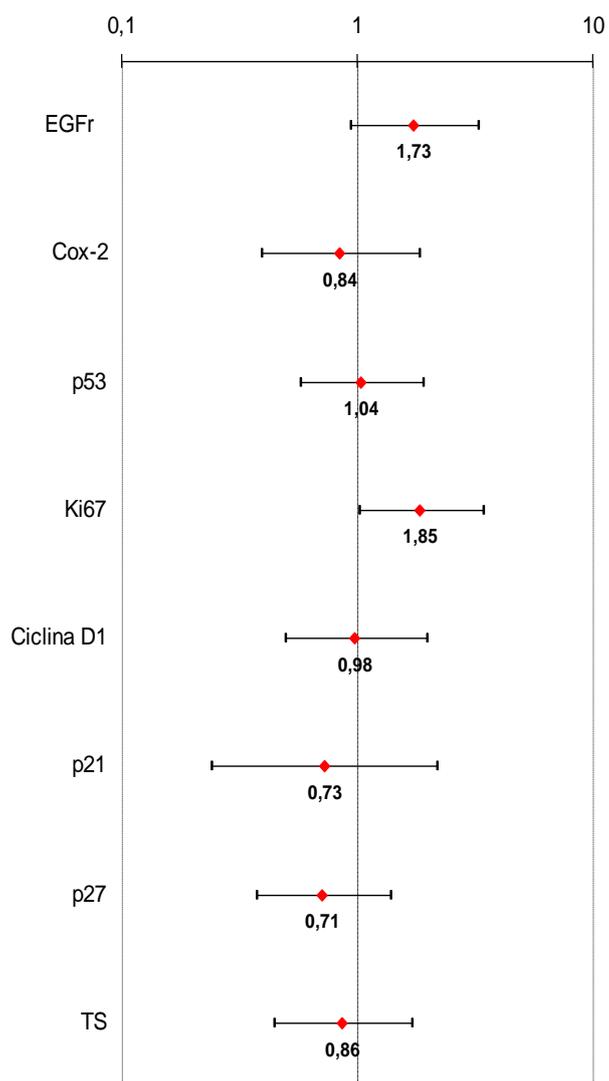
Tabla nº 36. Hazard ratios de Supervivencia Global (ajustados por modelo basal). Alta vs Baja expresión.

Tabla nº 37. Estudios de la Expresión de EGFR en CCR.

Autor/año	Ptes	Características	Técnica	Valoración	% de +	Otras Rel
Koretz 1990	144	Dukes A-D	IHQ/EGFR-R1	score \geq 1	50.7	MN47.7%; A40%
Goldstein 2001	102	TNM M1/colon	IHQ/Clon 2-18C9	score \geq 1	75.5	NC
McKay 2002	249	Dukes A-D	IHQ/EGFR113	\geq 5%	72.7	TP/M 40.5%;no (CA) _n DR
Khorana 2003	131	TNM II-III/colon	IHQ/Clon 2-18C9	\geq 2%	46	NC
Resnick 2004	134	TNM II/colon	IHQ/Dako pharmDx	score \geq 1	80	NC
Ooi 2004	244	TNM I-IV	IHQ-AcMo/FISH	score \geq 2/cluster+	43	Rel IHQ/FISH+3, no HER-2
Ceccarelli 2005	205	TNM I-IV	IHQ/Zymed	score 0-3+	84.4	Rel Cox-2/Ki-67
Spano 2005	150	TNM I-IV	IHQ/EGFR113	score \geq 6 ae	80	NC
Shia 2005	158	TP/M+	IHQ pharmaDx/CISH	score \geq 1/cop gen	TP85/M12	No rel técnicas
Galizia 2006	149	TNM I-III/colon	IHQ-AcMo	score \geq 1	35.6	NC
Kountourakis 2006	106	TNM I-IV	IHQ AcMo	score \geq 1	47.16	NC
Tampellini 2007	101	TNM I-IV	IHQ/Clon 2-18C9/31G7	score \geq 1	67.3	Rel TGF α , MAPK, S6K
Scartozzi 2007	98	TNM TP/M+	IHQ/Clon 2-18C9-31G7	\geq 1%	TP 52/M+45	Rel inv pAkt, pMAPK
Leung 2008	127	TNM TP/N	IHQ/AcMo	>1%	32/30	NC
Molalei 2009	115	TNM I-IV	IHQ/AcMo	Score 0-3/>1%	NC	NC
Rego 2010	388	TNM II-III/colon	IHQ/Dako pharmaDx	\geq 5%	59	Rel Ki-67 alto
Ljuslinder 2011	386	TNM I-IV/colon	IHQ/E30 Dako	Score 0-3/>10%	46/58	No rel IMS

MN: mucosa normal; A: adenoma; Me: membrana; Ci: citoplasma.

Tabla nº 38. Expresión de EGFR en CCR. Correlaciones con FPC.

Autor/año	Ptes	Edad	Sexo	Localización	Tamaño	Grado	Estadio	Otras
Koretz 1990	144	NC	NC	NS	NC	NS	NS	NS/histología
Goldstein 2001*	102	NS	NC	NS	NC	p 0.052	NC	p<0.023/histol/ILV
McKay 2002	249	NS	NS	NS	NC	p 0.014	NS	NC
Khorana 2003*	131	NS	NS	NC	NC	NC	NS	NC
Ooi 2004	244	NC	NC	NC	NC	NC	NS	NC
Ceccarelli 2005	205	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS/histología
Spano 2005	150	NS	NS	NS	NS	NS	p 0.006/pT	No rel nivel CEA
Kountoura 2006	106	p<0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NC
Tampellini 2007	101	NS	NS	NS	NS	NS	p 0.06	NC
Leung 2008*	127	NS	NS	NS	NC	NS	NS	NC
Molalei 2009	115	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NC
Rego 2010*	388	NS	NS	NS	NS	p 0.007	p 0.03	pN/p 0.09
Ljuslinder 2011	386	NS	NS	NS	NC	p 0.015	NS	Budding/p 0.001

NS: No significativo; NC: no comunicado; (*): colon.

Tabla nº 39. Estudios de EGFR en CCR. Relaciones pronósticas.

Autor/año	Ptes	Análisis Univariante		Análisis Multivariante	
		ILE	SG	ILE	HR/SG
Goldstein 2001*	102	NC	p<0.05/+2-3	NC	p<0.05/+2-3
McKay 2002	249	NC	NS	NC	NC
Khorana 2003*	131	NC	p 0.05/≥2+	NC	1.88/p 0.05/≥2+
Resnick 2004*	134	p 0.044	p 0.05	p 0.047	p 0.009
Spano 2005	150	NC	NS	NC	NS
Galizia 2006*	149	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05
Leung 2008*	127	NS	NS	NS	NS
Molalei 2009	115	NC	NS	NC	NC
Rego 2010*	388	HR 1.65/p 0.022	HR 1.55/p 0.047	HR 1.18/p 0.0415	HR 1.15/p 0.0862
Ljuslinder 2011	386	NC	p 0.006	NC	HR 1.53/p 0.029

NS: No significativo; NC: no comunicado, (*): colon.

Tabla nº 40. Estudios de expresión de Cox-2 en CCR.

Autor/año	Ptes	Características	Técnica	Valoración	Positivo %	Otras relaciones /BMT
Masunaga 2000	100	Dukes A-D	IHQ/AcMo	score>2	76	Rel MVD
Zhang 2002	112	Dukes A-D	IHQ/AcPo	≥10%	72	MN 17/M+100%; Rel %SPF
Yamahuchi 2002	232	TNM I-III	IHQ/AcMo	score ≥3	71.6	MN negativo
Wu 2003	170	TNM I-IV	IHQ/AcMo	score ≥2	84.9	T>A 58%>MN 24%
Liang 2004	114	TNM III /colon	IHQ/AcMo	≥ 10%	60.5	Rel con MVD, no p53, K-ras
Kim 2004	185	Dukes B-C	IHQ/AcMo	score≥3	94.3	No rel ki67,erbB2
Soumaoro 2004	288	TNM I-IV	IHQ/AcMo	score≥3	70.8	N+ 92% y M+ 100%
Wu 2004	170	TNM I-IV	IHQ/TA/RTPCR	score≥2/βactin	84.9/80	Rel VEGF/técnicas
Ceccarelli 2005	205	TNM II-IV	IHQ/AcMoC-20	score≥2	89.8	Rel EGFR; inv Ki67, ciclinaA
Xiong 2005	128	Dukes A-D	IHQ/AcMo	≥10%	67.9	Rel VEGF, MMP2/N+100%
Fux 2005	747	TNM I-IV	IHQ/AcMo1745	IRS score≥1	85.3	NC
Zafirellis 2008	132	TNM I-III	IHQ/AcMo229	medidas AU	100/20.31	NC
Lim 2008	231	TNM I-III	IHQ/AcMo	IRS≥3	42.4	No rel con p53
Ogino 2008	662	TNM I-IV	IHQ/AcMo	score ≥2	83	Rel inv p53, MSS, CIMP-L
Antonaco 2008	124	TNM I-IV	IHQ/RT-PCR	score≥2/Rel βactin	35.5	Rel HER2/técnica/no EGFR
Zhou 2011	141	TNM II-III/colon	IHQ/AcMo	NC	NC	NC
Sundov 2011	152	Dukes B	IHQ/AcMo	NC	NC	NC
Peng 2011	149	Todos	IHQ/AcMo	NC	60.4	NC

IRS: immunoreactivity score, AU: unidades arbitrarias/mediana.

Tabla nº 41. Expresión de Cox-2 en CCR. Estudios de Correlación con FPC.

Autor/año	Ptes	Edad	Sexo	Localización	Tamaño	Grado	Estadio	Otras
Masunaga 2000	100	NS	NS	NS	p 0.047	p 0.012	p 0.0002	NC
Zhang 2002	112	NS	NS	p 0.03	NC	NS	p 0.005	NS/patrón crecimiento
Yamahuchi 2002	232	NS	NS	NS	NC	p 0.033	p 0.020	Histol/RRH+/p <0.05
Wu 2003	170	NS	NS	NS	NC	NS	NS	ILV/NS
Liang 2004*	114	NS	NS	NS	NS	NS	NS	ILV/p 0.006
Kim 2004	185	NS	NS	NS	NS	NS	NS	ILV/NS
Soumaoro 2004	288	NS	NS	NS	p<0.0001	NS	p 0.0013	ILV/p 0.0123
Ceccarelli 2005	205	NS	NC	NS	p<0.05	p 0.004	NS	NC
Xiong 2005	128	NS	NS	NC	NC	NS	p<0.05	pT/N y M/ p<0.05
Zafirellis 2008	132	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS/pTpN
Lim 2008	231	NS	NS	NS	NC	NS	p 0.028	CEA preop/NS
Ogino 2008	662	NS	NS	p 0.005	NC	p 0.0003	NS	NC
Antonaco 2008	124	NS	NS	NS	NC	p<0.001	p<0.001	NC
Peng 2011	149	NC	NC	NC	NC	NC	p<0.05	pN/p<0.05

NS: no significativo; NC: no comunicado, (*): colon.

Tabla nº 42. Expresión de Cox-2 en CCR. Estudios de Relación Pronostica.

Autor/año	Ptes	Análisis Univariante		Análisis Multivariante	
		ILE	SG	ILE	SG
Masunaga 2000	100	NC	p 0.037	NC	NS
Zhang 2002	112	NC	NS	NC	NC
Yamahuchi 2002	232	p 0.002	NC	OR 0.711/p 0.045	NC
Wu 2003	170	NC	NS	NC	NS
Liang 2004*	114	NC	NS	NC	NS
Kim 2004	185	NC	NS	NC	NC
Soumaoro 2004	288	NC	p 0.0006	NC	HR4.1/p 0.0103
Fux 2005	747	NS	NS	NS	NS
Zafirellis 2008	132	NC	NS	NC	NC
Lim 2008	231	NC	NS	NC	NS
Ogino 2008	662	NC	p<0.05	NC	HR 2.12/p <0.05
Antonaco 2008	124	NS	NS	NS	NS
Zhou 2011*	141	p< 0.005	p<0.005	RR 0.33; p 0.028	RR 0.56; p 0.033
Sundov 2011	152	NC	P<0.001	NC	RR 1.14; p NS
Peng 2011	149	p<0.05	p<0.05	NC	NC

NC: no comunicado; NS: no significativo; HR: hazard ratio; RR: riesgo relativo; (*): colon.

Tabla nº 43. Estudios de expresión de TP53 en CCR.

Autor/año	Nºptes	Características	Técnica	Positividad	Otras
Curtin 2004*	268	Todos/colon	IHQ/SCCP	61-51%	Rel 77%; K-ras; Inv IMS
Ferraz 2004	165	Todos	PCR/secuenciación	57.5%	Rel GSTP1 wt
Galizia 2004*	104	Todos/colon	IHQ/AcMo	52%	Rel p27, VEGF
Prall 2004	184	Todos	IHQ/DO-7	58.36%	NC
Resnick 2004*	134	Estadio II/colon	IHQ/DO-7	54%	NC
Rosati 2004	103	Estadio Dukes B-C	IHQ/AcMo	59%	NC
Broll 2005	120	Todos	IHQ/DO-1	51%	Rel TS
Calistri 2005	100	Todos	SSCP	35%	No rel K-ras o Braf
Conlin 2005	107	Todos	Secuenciación	61%	No rel APC o K-ras
Diez 2005	288	Estadio I-III	IHQ/DO-7	59%	NC
Hsieh 2005	118	Estadio I-IV	PCR/SSCP	36.4%	NC
Park 2005	402	Todos	IHQ/AcMo	NC	Rel hMLH1/hMSH2
Russo 2005	3583	Estadio Dukes A-D	SSCP/DGGE/Directa	42%	NC
Chang 2006	213	Todos	PCR/secuenciación	45.1%	Rel MSS-H
Losi 2006	116	Estadio I	IHQ/AcMo	48%	NC
Popat 2006	755	Estadios I-III	IHQ/DO-7	60%	NC
Fernández 2007*	162	Estadio T3T4N0/colon	IHQ/DO-7	58%	No rel bcl2, ki67, MCV
Lan 2007	258	Estadio I-IV	IHQ/Pab 1801	37.6%	NC
Nehls 2007*	188	Estadio III/colon	IHQ/DO-1	50%	No rel con BSI/Bcl-2; inv con MSI
Lim 2008	231	Estadios I-III	IHQ/DO-7	46.8%	No rel con COX-2
Vidaurreta 2008	353	Estadios Dukes A-D	SSCP	19.7%	NC
Noske 2009	116	Estadios II-III	IHQ/Dako DO-7	63%	No rel con p21
Zaanani 2010*	233	Estadios III/colon	IHQ/DO-7	53%	Rel inv con IMS
Huh 2010	356	Estadios I-IV	IHQ/Dako	NC	Rel con ki-67 alto
Yu 2011	155	Estadios I-IV	IHQ/Dako	45.15%	NC
Lastraioli 2012	135	Estadios I-III	IHQ/Dako	39%	Rel VEGF-A y CA-IX

NC: no comunicado; (*): colon.

Tabla nº 44. Expresión de TP53 en CCR. Correlación con FCP.

Autor/año	Ptes	Edad	Sexo	Localización	Tamaño	Grado	Estadio	Otras
Curtin 2004*	268	p<0.05	p<0.05	p<0.05	NC	NC	p<0.05	NC
Calistri 2005	100	NS	NS	NS	NS	NS	p 0.05	NC
Broll 2005	120	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NC
Diez 2005	407	NS	NS	NS	NC	NS	NS	ILV/p 0.028/adenoca
Hsieh 2005	118	NS	NS	NC	NS	NS	NS	NC
Russo 2005	3583	NS	NS	p<0.05	NS	NS	p<0.05*	ILV/p<0.05 recto
Popat 2006	755	NS	NS	p<0.05	NS	NS	NS	NC
Chang 2006	213	NS	NS	NS	NS	NS	p 0.001	NC
Fernández 2007*	162	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NC
Lan 2007	258	NS	NS	p 0.038	NC	p 0.050	NS	NS/histología
Nehls 2007*	188	NS	NS	NS	NC	NS	NS	NC
Lim 2008	231	p 0.022	NS	NS	NS	NS	NS	CEA pre N/p 0.001
Vidaurreta 2008	353	NS	NS	NS	NC	NS	NS	NS/histología
Noske 2009	116	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NC
Zaanan 2010*	233	NS	NS	p<0.05	NS	NS	p<0.05	NC
Huh 2010	356	NS	NS	NS	NS	p 0.030	p 0.006	pN p<0.001; ILV p 0.058
Yu 2011	155	NS	NS	NS	NS	NS	p 0.024	pN p 0.003

NS: no significativo; NC: no comunicado; (*): colon.

Tabla nº 45. Estudios de TP53 en CCR. Relaciones pronosticas.

Autor/año	Ptes	Análisis Univariante		Análisis Multivariante	
		SLE	HR/SG	HR/ILE	HR/SG
Galizia 2004*	104	p 0.001	11.31/p 0.001	8.12/p 0.003	6.01/p 0.037
Prall 2004	184	NC	3.66/p<0.05	NC	1.83/p 0.003
Rosati 2004	103	NS	p<0.05	NS	2.48/p 0.035
Resnick 2004*	134	p 0.001	p 0.02	p 0.039	p 0.019
Broll 2005	120	p 0.044	NS	NC	NS
Conlin 2005	107	NC	NS	NC	NS
Diez 2005	288	p 0.010	NC	2.76/p 0.009	NC
Russo 2005	3583	NC	p<0.05/proximal	NC	2.52/p 0.007
Chang 2006	213	p<0.001	p<0.001	2.87/p<0.001	2.88/p<0.001
Losi 2006	116	NC	p<0.001	NC	NC
Popat 2006	755	NC	NS	NC	0.98/NS
Fernández 2007*	162	HR 1.2/NS	NC	NS	NC
Lan 2007	258	NS	p 0.037	NC	1.69/NS
Lim 2008	231	NC	p 0.027	NC	1.8/p 0.028
Vidaurreta 2008	353	NC	NS	NC	NC
Noske 2009	116	NC	NS	NC	NS/ p21-/p53+; p<0.05
Zaanan 2010*	233	NS	NC	p< 0.02/rel QT	NC
Lastraioli 2012	135	NC	NS	NC	NS

NS: no significativo; NC: no comunicado; (*): colon.

Tabla nº 46. Estudios de expresión de pKi-67 en CCR.

Autor/año	Ptes	Características	Técnica	Valoración	Positividad %	Rel otros BMT
Sheperd 1988	108	Dukes A-D	IHQ Ki67	Ki67 index	44.4	NC
Kubota 1992	100	Dukes A-D	IHQ Ki67	Ki67 score	34.6	Rel inv figuras mitosis
Palmqvist 1999	97	Dukes A-D	IHQ Ki67	Ki 67 LI	36.8	No rel p27
Bhatavdekar 2001	98	Dukes B-C	IHQ Ki67	Ki67 score	26	No dif TP y MN
Weber 2001	221	M+H	IHQ MIB1	Ki 67 LI	49	NC
Akino 2002	661	TNM I-IV	IHQKi67	Ki67 score	27.3	NC
Allegra 2002	465	Dukes B2-C*	IHQ MIB1	Ki67 score	40	Rel p53 y TS inv
Scopa 2003	117	Dukes A-D	IHQ Ki67	Ki 67 core	64	Rel con ABI
Prall 2004	184	TNM I-IV	TMA/IHQ/MIB1	MIB1 core	26.4	NC
Valera 2005	106	TNM I-IV	IHQ MIB1	Ki67 index	38	NC
Hilska 2005	363	Dukes A-D	IHQ MIB1	Ki67 LI	23	Rel p53 y bcl-2
Fernández 2007	162	TNM II*	IHQ/MIB1	≥30%	69.1	Rel con p53 y MVC
Cohen 2008	161	TNM I-IV	IHQ/MIB1	≥30%	77.4	NC
Fluge 2009	409	TNM II-III	TMA/IHQ/MB1	≥40%ae	NC	Rel proteína EZH2
Yan 2010	203	TNM I-IV*	TMA/IHQ/Dako	>10%	79	Rel UBD
Ong 2010	501	TNM I-IV	TMA/IHQ/AcMo	≥50%	70	NC
Huh 2010	356	TNM I-IV	IHQ/MIB-1	≥50%	52.48	Rel con p53
Ma 2010	152	TNM I-IV	IHQ/AcMo	>5% score >4	46.05	TP>MN
Nakayama 2012	105	TNM I-IV	IHQ/MIB1	Ki index >45%	49	Rel con mtTFA

IHQ: inmunohistoquímica; NC: no comunicado; (*): colon.

Tabla nº 47. Expresión de pKi-67 en CCR. Estudios de Correlación con FCP convencionales.

Autor/año	Ptes	Edad	Sexo	Localización	Tamaño	Grado	Estadio	Otras
Kubota 1992	100	NC	NC	NC	NC	NS	p 0.006	NC
Bhatavdekar 2001	98	NS	NS	NS	NC	NS	NS	NC
Akino 2002	661	NC	NC	NC	NC	p<0.0001	NC	Mucin p 0.001
Allegra 2002*	465	p 0.02	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Scopa 2003	117	NC	NC	NS	p<0.01	p<0.01	p<0.01	NC
Valera 2005	106	NC	NS	NC	NC	NS	p<0.001	NS/ILV
Fernández 2007*	162	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NC
Cohen 2008	161	NC	NC	NC	NC	NC	p<0.005	NC
Fluge 2009	409	NS	NS	NS	NC	NC	NS/p 0.07	NS/histología
Ma 2010	152	NC	NC	NS	NC	p<0.01	p<0.01	NC
Huh 2010	356	NS	p 0.083	NS	NS	NS	NS	NS/CEAp ILV
Yan 2010*	203	NS	NS	NS	NC	NS	p<0.001/pT	NS/ILV

NS: no significativo; NC: no comunicado; (*): colon.

Tabla nº 48. Estudios de pKi-67 en CCR. Correlaciones evolutivas.

Autor/año	Ptes	Análisis Univariante		Análisis Multivariante	
		ILE	SG	HR/ILE	HR/SG
Kubota 1992	100	NC	NS	NC	NC
Bhatavdekar 2001	98	p 0.004	p 0.006	NS	NS
Weber 2001	221	p 0.0109/TTP	p< 0.0001	1.84; p 0.014/TTP	2.76; p<0.0001
Allegra 2002*	465	NC	NS	NC	NC
Scopa 2003	117	NC	p<0.05	NC	NS
Prall 2004	184	NC	p 0.017	NC	NS
Valera 2005	106	NC	p 0.010	NC	0.74; p 0.032
Hilska 2005	363	NC	p 0.046/0.70*	NC	NS
Fernández 2007*	162	p 0.037	p 0.003	p<0.05	HR 9.89/p 0.034
Cohen 2008	161	NS	NS	NS	NS
Fluge 2009	409	p 0.01	NC	HR 0.55/p 0.014	NC
Yan 2010*	203	HR 2.06/p 0.027	p 0.032	HR 1.88/p 0.065	NS
Ong 2010	501	NC	NS	NC	NS
Ma 2010	152	NC	p<0.05	NC	HR 4.25/p<0.01
Nakayama 2012	105	NC	NS	NC	NS

NC: no comunicado; NS: no significado estadístico. (*): cáncer de colon.

Tabla nº 49. Estudios de Ciclina D1 y CCR. Técnicas y Rendimiento.

Autor/año	Pte	Características	Técnica	Valoración	Positividad %	Otras
Maeda 1997	101	TNM I-III	IHQ/Bcl-1	≥1%/score 2	46.54	Rel PCNA
Palmqvist 1998	97	Dukes A-C	IHQ/DCS-6	≥5%/score 3	56	No rel Ki67, cit-nuclear
Bukholm 2000	93	Dukes B-D*	IHQ/DCS-6	≥5%/score 2	8.6	No rel p53
Holland 2001	126	TNM I-IV	IHQ/DCS-6	≥10%/score 3	58.7	Rel p21
Bhatavdekar 2001	98	Dukes B-C	IHQ/P2D11F11	≥1%/score 3	31	No rel otros BMT
Pasz 2001	122	TNM I-IV	IHQ/R124	≥1%/score 5	100/55.7ae	Rel inv p21; no p53+
McKay 2002	249	Dukes A-D	IHQ/P2D11F11	≥5%/score 5	55	Rel p21, p27 y PCNA
Bondi 2005	219	Dukes A-D*	IHQ/RT-PCR	≥5%/HSA**	11/52.5	No rel amplificación/ciclinas
Balcerczak 2005	111	Astler A-D	IHQ/RT-PCR	>25%/β actina	62/48.64	Rel prot-gen
Hilska 2005	363	Dukes A-D	IHQ/P2D11F11	≥5%/score 3	27.54	No rel otros BMT
Lassmann 2007	94	Enf M+/Cir QIA	RT-PCRmRNA	Ratio/β actina	NC	NC
Ioachim 2008	97	TNM I-III	IHQ/DCS-6	> 5%	5.9	Rel p21
Nosho 2008	865	TNM I-IV	IHQ/TMA/AcMo SP4	>50%	28.4	Rel MSI/inv p21
Ogino 2009	602	TNM I-IV*	IHQ/SP4	>1%/score 3	55	Rel MSI, CIMP, Braf, p27; inv p21,p53
Saridaki 2010	144	TNM IV	IHQ/AcMo	Score +4%	62	Rel con Braf mut
Mao 2011	169	TNM I-IV*	IHQ/AcPo	Score+ >5%	56.2	Rel con p-Stat5
Wan Jefjord 2011	527	TNM I-IV	IHQ/TMA DSC6	Score +4	83.2	NC

NC. No comunicado. (*): colon; (**): resultados normalizados.

Tabla nº 50. Expresión de Ciclina D1 en CCR. Estudios de Correlación con FCP.

Autor/año	Pte	Edad	Sexo	Localización	Grado	Estadio	Otros
Maeda 1997	101	NC	NC	NS	NS	pT/p 0.02	Histol, ILV/NS
Palmqvist 1998	97	NC	NC	p 0.036	p 0.096	NS	ILV/p 0.014*
Holland 2001	126	NS	NS	p 0.005	p 0.035	NS	NC
Bhatavdekar 2001	98	NS	NS	NS	NS	NS	NC
Pasz 2001	122	NS	NS	NS	NS	NS	NC
McKay 2002	249	p 0.042	NS	NC	NS	NS	NC
Bondi 2005***	219	NC	NC	NC	NS	NS	NC
Balcerzack 2005	111	NS	NS	NS	NS	NS/p 0.01**	NS/ILV-histología
Ioachim 2008	97	NS	NS	NS	NS	p <0.03/pN 0.02	Mucinoso/p <0.01
Nosho 2008	865	NS	NS	p 0.009	NS	NS	p 0.01 anillo sello
Ogino 2009***	602	NC	NS	p 0.080	NS	p 0.054	NC
Saridaki 2010	144	NS	NS	NS	NS	NS	NC
Mao 2011***	169	NS	NS	NS	NS	NS	NS/tamaño
Wangefjord 2011	527	p 0.020	NC	NS	NS	pN/M p<0.05	Inv con pT, ILV p<0.05

NS: no significativo; NC: no comunicado. (*): localización citoplásmica; (**): CCND1 mRNA; (***): colon.

Tabla nº 51. Estudios de Ciclina D1 en CCR. Correlaciones evolutivas.

Autor/año	Ptes	Análisis Univariante		Análisis Multivariante	
		ILE	HR/SG	HR/ILE	HR/SG
Maeda 1997	101	p 0.01	NC	2.0/ p 0.03	NC
Palmqvist 1998	97	NC	NS/p 0.077 ⁴	NC	NC
Holland 2001	126	NC	p<0.05	NC	0.47/p 0.01
Bhatavdekar 2001	98	p 0.024 ¹	p 0.034/p 0.007 ¹	NS	NS
McKay 2002	249	NC	p 0.0266	NC	NS
Bondi 2005*	219	NC	NS	NC	NS
Hilska 2005	363	NC	p 0.013/p 0.042 ²	NC	NS
Lassmann 2007	94	p 0.05 ⁴	NS	NC	NC
Ioachim 2008	97	NS	NS	NS	NS
Ogino 2009*	602	NC	HR 0.64/p 0.0063	NC	HR 0.57/p 0.0048
Sidaraki 2010	144	p 0.03	p<0.01	NS	NS
Mao 2011*	169	NC	p 0.03	NC	NS/p 0.484
Wan Jefjord 2011	527	NC	HR 0.69/p0.026	NC	HR 1.08/NS

NC: no comunicado; NS: no significado; (1) Dukes B; (2): colon; (3): Dukes C; (4): RR hepática; (*): colon.

Tabla n° 52. Expresión de p21^{waf1/cip1} en CCR. Características, metodología y rendimiento.

Autor/año	Ptes	Características	Técnica	Valoración	Positivo	Marcadores
Yasui 1997	289	I-IV JCS	IHQ/Sc187	Score 3 +>5%	68%	Rel IHQ/WB e inv con p53
Girlando 1999	103	TNM I-III	IHQ/EA10	+>10%	39%	Rel inv p53 IHQ/SSCP
Viale 1999	191	TNM I-IV	IHQ/EA10	Score 3 +>10%	51%	Rel inv con p53, bcl-2
Ropponen 1999	162	TNM I-IV	IHQ /WAF1	Score 0-3+	33% ae	Rel AP-2; inv con p53.
Zirbes 2000	294	TNM I-IV	IHQ/Waf1	+ >5%	67%	NC
Pasz 2001	122	TNM I-IV	IHQ /4D10	LI 0-5 +	39%	Rel inv p53 y ciclina D1
Watanabe 2001*	460	TNM II-III	IHQ/AcMo	LI+5; +>5%	47%	Rel inv p53
McKay 2002	249	Dukes A-D	IHQ/EA10	+>5%	44.2%	Rel con ciclina D1
Prall 2004	184	TNM I-IV	IHQ /4D10	+<10%	42.9%	NC
Ogino 2006	737	TNM I-IV	IHQ /AcMo	+>5%	50%	Rel inv CIMP-H, MSI-H, Braf
Mitomi 2007	211	Dukes B-D	IHQ /EA10	+>20% ae	31/66%	Rel mut K-ras; no p53, bcl-2
Tornillo 2007	1420	TNM I-III	IHQ/AcMo	+>10%	NC	NC
Lam 2008	188	TNM I-IV	IHQ /CP74	+ 0-3+	62% ae	Rel hTERT; no con p53
Ogino 2009*	647	TNM I-IV	IHQ/TMA/AcMo	+>20%	21%	Rel p53,CIMP,Braf,PIK3CA
Noske 2009	116	TNM II-III	IHQ/SX118	+ > 5%	26.72%	No rel p53
Sulzyc 2011	275	Astler B2C	IHQ/Dako	+>1%	60.4%	NC

NC: no comunicado; (*): colon.

Tabla nº 53. Expresión de p21^{waf1/cip1} en CCR. Correlación con FCP convencionales.

Autor/año	Ptes	Edad	Sexo	Localización	Grado	TP/M+	Estadio	Otros
Yasui 1997	289	NC	NC	NC	NC	NC	p<0.05	TP>AD/p<0.05
Viale 1999	191	NS	NS	p 0.003	NS	NC	p 0.0307	NC
Roponnen 1999	162	NC	NC	NC	NS	NC	p< 0.001	NC
Zirbes 2000	294	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NC
Pasz 2001	122	NS	NS	p 0.002	NS	NC	p <0.05	NC
McKay 2002	249	NS	NS	p<0.05	NS	NC	NS	NC
Mitomi 2007	211	NS	NS	NS	p<0.001	NC	p 0.027	NC
Tornillo 2007	1420	NC	NC	p 0.011	NS	NC	NS	pN0/p<0.001
Lam 2008	188	NS	NS	NS	p 0.001	NC	NS	Mucinosos/p 0.01
Ogino 2009*	647	NS	NS	p<0.0001	p<0.0001	NC	NS	NS/H ^a familiar
Noske 2009	116	NS	NS	p 0.003	NS	NC	NS	NS/pN
Sulzyc 2011	275	NS	NS	NS	NS	NC	p 0.049	NC

NS: no significativo; NC: no comunicado; TP/M+: tumor primario/metástasis; (*): colon.

Tabla nº 54. Expresión de p21^{waf1/cip1} en CCR. Correlaciones evolutivas.

Autor/año	Ptes	Análisis Univariante		Análisis Multivariante	
		ILE	SG	ILE	SG
Viale 1999	191	p 0.0009	p 0.0022	NS	NS
Ropponen 1999	162	p< 0.001	p< 0.001	RR 0.93; p<0.001	HR 0.33; p< 0.001
Zirbes 2000	294	NC	p 0.0051	NC	p 0.0174
Pasz 2001	122	NC	p 0.02	NC	NS
Watanabe 2001*	516	NC	NS	NC	NS
McKay 2002	249	NC	NS	NC	NS
Prall 2004	184	NC	p <0.05	NC	NS
Tornillo 2007	1420	NC	p<0.01	NC	NS
Lam 2008	188	NC	NS	NC	NS
Ogino 2009*	647	NC	NS	NC	HR0.71/p 0.035
Noske 2009	116	p 0.02	p 0.005	NC	NC
Sulzyc 2011	275	p 0.025/p 0.074	p 0.0079/p 0.008	p 0.035/p0.07	p 0.02/p 0.03

NS: no significativo; NC: no comunicado; (*): colon.

Tabla nº 55. Estudio de la expresión de p27^{kip1} en CCR. Técnicas y rendimiento

Autor/año	Ptes	Características	Técnica	Valoración	Positiva %	Otros marcadores
Loda 1997	149	Todos Estadios	IHQ/ clon 57	>1% score 2 nu cit	90	NC
Belluco 1999	124	TNM I-III	IHQ/clon 57	>1% score 2 nu	86	NC
Tenjo 2000	171	TNM I-IV	IHQ/K25020	>1% score 2 nu	51	No rel IA, Ki-67 y p53
Yao 2000	136	TNM I-IV	IHQ/K25020	>1% sore 6 nu cit	51/25	NC
Zhang 2001	168	Dukes A-D	IHQ/SX53G8	>10% cit	49	No rel p53, p73 y DCC
McKay 2002	249	Dukes A-D	IHQ clon IB4	≥1 score 2 nu±cit	21.3	Rel ciclina D1.
Kobayashi 2002	221	Todos estadios	IHQ clon SX53G8	> 10% cit	49	NC
Rossi 2002	187	TNM I-III	IHQ clon 57	≥25% nu score 3	37	NC
Galizia 2004	104	Dukes A-D/colon	IHQ clon SX53G8	>20% score 2 nu	46	NC
Rosati 2004	103	TNM II-III	IHQ/AcMo	>10% score 2 nu	73	NC
Manne 2004	206	TNM I-IV	IHQ clon IB4	≥50% score 2 nu cit	70	No rel p53
Wu 2005	168	TNM II-III	IHQ/AcMo	≥50% score 2 nu	54.2	NC
Sarli 2006	108	Todos Estadios	IHQ/AcMo	≥50% score 2 nu	69	Rel MSI, Mlh1, Msh2, Fhit
Watson 2006	462	TNM I-IV	IHQ clon SX53G8	>10% score 2 nu±ci	52/18	Rel nu+ vs cit+
Ogino 2007	706	TNM I-IV	IHQ/AcMo	>10% score 2 nu	67	Rel inv CIMP-H, MSI-H, Braf
Li 2007	127	TNM I-III	IHQ/AcMo F8	>1% score 8 nu	62.2	NC
Zlobec 2008	587	TNM II	IHQ/AcMo	>5%/ROC-AUC	AUC/0.58	NC
Cohen 2008	171	TNM I-IV	IHQ/TMA/DCS72	≥20% nu	54.2	NC
Bertagnolli 2009	601	TNM III	IHQ/ clon 57	>10% nu	62.8	Rel MMR-D
Ogino 2009	630	TNM I-IV	IHQ/AcMo	>20% nu ci	72-52	Rel inv con p21,p53, Cox-2*
Handra-Luca 2011	230	TNM I-IV	IHQ/clon 57	30% nu	13	Rel inv SKP2
Lin 2012	581	TNM I-IV	IHQ/AcMo	>20% nu	24	No rel HT recibida

nu: nuclear; cit: citoplasma; NC: no comunicada; TMA "tissue microarray análisis". *MSI-H, CIMP-H, Braf

Tabla nº 56. Expresión de p27^{kip1} en CCR. Estudios de relación con FCP convencionales.

Autor/año	Ptes	Edad	Sexo	Localización	Grado	Tamaño	Estadio	Otros
Belluco 1999	124	NS	NS	NS	p 0.020	NC	p 0.021	NC
Yao 2000	136	NS	NS	NS	NS	NC	NS	NC
Tenjo 2000	171	NS	NS	NC	NS	NS	p 0.0005	ILV p 0.04
Zhang 2001	168	NS	NS	NS	NS	NC	NS	NC
McKay 2002	249	NS	NS	NS	NS	NC	NS	NC
Galizia 2004*	104	NS	NS	NS	NS	NS	p 0.001	N y M, p<0.008
Manne 2004	206	NS	NS	p 0.001 D>I	p 0.016 (II)	NS	p 0.016 (pT)	NC
Wu 2005	168	NS	NS	NS	p 0.022	NS	NS	NC
Sarli 2006	108	NC	NC	p<0.01	p<0.01	NC	NS	Mucinosos p<0.001
Watson 2006	462	NC	NC	NC	NS	NC	NS	ILV/NS
Cohen 2008	171	NS	NC	NS	NC	NC	NS	Mucinosos/p 0.05
Ogino 2009	630	NS	p 0.004	p<0.0001	p<0.0001	NC	NS	NC

NC: no comunicada; NS: sin significado estadístico; (*): colon.

Tabla nº 57. Estudios de p27^{kip1} en CCR. Correlaciones evolutivas.

Autor/año	Ptes	Análisis Univariante		Análisis Multivariante	
		ILE	SG	ILE	SG
Loda 1997	149	NC	p 0.0014	NC	RR 2.9/p 0.003
Belluco 1998	124	p<0.01	p<0.01	RR 2.21; p 0.003	RR 2.53/p 0.005
Tenjo 2000	171	NC	p <0.05	NC	RR 0.429; p 0.0146
Yao 2000	136	NC	p 0.04	NC	NC
Zhang 2001	168	NC	NS/p 0.08	NC	NC
Kobayashi 2002	221	NC	p 0.0577	NC	NC
McKay 2002	249	NC	NS	NC	NS
Rossi 2002	187	p 0.06	p 0.02	HR 2; p 0.08	HR 3.33/p 0.01
Galizia 2004*	104	p 0.006	p 0.001	HR 20.85; p 0.001	HR 11.16; p 0.001
Rosati 2004	103	NS	NS	NC	NC
Manne 2004	206	NC	p 0.014	NC	HR 0.7/p 0.058
Wu 2005	168	NC	NS	NC	HR 1.15/NS
Watson 2006	462	NC	p 0.0359/cit	NC	HR 0.68/p 0.059 cit
Sarli 2006	108	p 0.072	p 0.069	NC	NC
Li 2007	127	p 0.0008	NC	RR 2.1/p 0.004	NC
Zlobec 2008	587	NC	p 0.006	NC	HR 0.63/p 0.031
Cohen 2008	171	NS	NS	NS	NS
Bertagnolli 2009	601	NS	p 0.021	NS	HR 0.74/p0.0448
Ogino 2009	630	NC	p<0.005	NC	HR 0.62/p<0.05

ILE: intervalo libre de enfermedad; SG: supervivencia global; NC: no comunicado; NS: no significativo; (*): colon.

**Tabla nº 58. Estudios de pTS en CCR. Metodología y rendimiento
Enfermedad Localizada y/o todos estadios.**

Autor/año	Ptes	Características	Método	Valoración	% TS alto	Otras
Takenoue 2000*	148	TNM I-IV	IHQ AcPo	Score ≥ 4 +	27.7	NC
Tomiak 2001*	210	TNM II-III	IHQ TS106	Score 2-3	60.47	NC
Edler 2002	862	Dukes B-C	IHQ TS106	Score 2-3	72	NC
Nanni 2002*	263	Dukes B2-C	IHQ TS106	$\geq 15\%$	45	No rel ploidia, MVD, VEGF
Kornmann 2003	295	TNM II-III	IHQ TS106 /RT-PCR	Rel β actina	TS>0.75	Rel IHQ y TSmRNA
Allegra 2003	706*	Dukes B-C	IHQ TS106	Score ≥ 3	30.81	Rel inversa con Ki-67
Rosati 2004	103	TNM II-III	IHQ AcMo	NC	15.6	NC
Kamoshida 2004	132	TNM II-III	IHQ AcPo	$\geq 30\%$	32	Rel inv TS con p16 ^{INK4a}
Ricciardiello 2005	192	TNM II-III-IV	IHQ TS106	Score 6-7	21.35	Rel inv hMLH1 y TS
Broll 2005	120	TNM I-IV	IHQ TS106	Score 2-3	59	Rel TSa y p53+ 60%
Westra 2005	391*	TNM I-III	TMA IHQ AcPo	Score 2-3	86	NC
Aguiar 2005	114	TNM II-III	IHQ TS106	Score 2-3	36	NC
Sinicrope 2006	320*	Dukes B2-C	IHQ TS106	Score 2-3	59	No rel MSI, MMR, p53, 17p
Lassmann 2006	102	TNM I-III	RT-PCR mRNA	Rel β actina	mediana \pm SD	NC
Popat 2006	967	TNM I-III	IHQ AcPo	Score 2-3	58	Rel con p53
Odin 2007	181	TNM I-IV	RT-PCR	Rel β actina	mediana \pm SD*	Rel TS y MSI-H; no TSER
Jensen 2008	314	TNM II-IV	IHQ TS106/FISH	Score 2-3	44/1.7 copias	Rel con TYMS genes
Soong 2008	945	TNM I-IV	TMA IHQ TS106	Score 3-4	39	NC
Yamada 2008	103	Dukes B-C	RT-PCR	Rel β actina	TS>1.58	NC
Sulzyc 2009	269	TNM I-IV	TMA/IHQ TS106	Score conv	Medianas	NC
Kostopoulos 2009	498	Dukes B-C	TMA/IHQ TS 106	Score 2-3	43	NC
Ren 2009	150	TNM I-III	IHQ TS106/RT-PCR	Score 3-4/ β act	37/11.3	No rel TSmRNA/5'-TSER
Karlberg 2010	1389	TNM II-III	IHQ/TS 106	Score 2-3	71	NC
Sumi 2010	202	Dukes A-D	ELISA	ng/mgr curva st	20.9 ngr/mgr	No rel OPRT, DPA
Goto 2012	180	TNM I-IV	RT-PCR mRNA	Rel β actina	mediana 50	Rel con DPYD y TYMP

NC: no comunicado; (*): colon.

**Tabla nº 59. Expresión de pTS en CCR.
Estudios de relación con FCP convencionales.**

Estudio	Ptes	Edad	Sexo	Localización	Grado	TP/M+	Estadio	Otros
Takenoue 2000*	148	NS	NS	NC	NS	NC	NS	NC
Tomiaik 2001*	210	NC	NC	NS	NS	NC	NS	NC
Edler 2002	862	NC	NC	p 0.02	NC	NC	NS	NC
Nanni 2002*	263	p 0.009	p 0.077	NS	p 0.013	NC	NS	ILV/ p<0.001
Kamoshida 2004	132	NS	NS	NS	NS	NC	p 0.001	N+/p 0.002
Broll 2005	483	NS	NS	NS	NS	NC	pT/p 0.009	Estadio p 0.072
Westra 2005*	391	NS	NS	NS	NS	NS	NS	Mucinoso/p 0.04
Aguiar 2005	114	NS	NS	NS	NS	NC	NS	NC
Sinicrope 2006*	320	NS	NS	NC	NC	NS	p<0.05/St B2C	NC
Lassmann 2006	102	NS	NS	NS	p 0.0014	NC	NS	NC
Popat 2006	967	NS	NS	NS	NS	NC	p 0.02	NS/tamaño
Soong 2008	945	NS	NS	p 0.0005	NS	NC	p 0.020	NC
Yamada 2008	103	NC	NC	NC	NS	NC	NS	NS/tamaño-ILV
Sulzyc 2009	269	NS	NS	p 0.0062	NS	NS	NS	NC
Karlberg 2010	1389	NC	NC	NS	NC	NC	NS	NC
Sumi 2010	202	NS	NS	NS	NS	NS	p 0.070	No rel pT pN
Goto 2012	180	p 0.018	NS	NS	NS	NS	NS	NC

NC: no comunicada; NS: sin significado estadístico; (*): colon.

**Tabla nº 60. Estudios de expresión de pTS en CCR.
Correlaciones evolutivas.**

Autor/año	Ptes	Análisis Univariante		Análisis Multivariante	
		ILE	SG	ILE	SG
Takenoue 2000*	148	NC	p 0.0003	NC	χ^2 7.88/ p 0.005
Tomiak 2001*	210	NS	NS	NC	NC
Edler 2002	862	p 0.04	p 0.04	p 0.05	p 0.05
Nanni 2002*	263	NS	NS	NS	NS
Kormann 2003	295	NC	p 0.032	NC	RR 3.6/p 0.030 +DPD
Allegra 2003*	706	p 0.004	p<0.05	p 0.04	HR 1.54/p 0.02
Rosati 2004	103	NS	NS	NS	NS
Kamoshida 2004	132	p<0.0001	p 0.001	p 0.002/HR 0.42	HR 0.39/p 0.005
Broll 2005	120	p 0.023	p 0.003	NC	χ^2 8.05/p 0.005
Westra 2005*	391	NS	NS	NC	NC
Aguiar 2005	114	NC	NS	NC	NS
Sinicrope 2006*	320	NS	NS	NS/HR 1.09	NS/HR 0.88
Lassmann 2006	102	NS	NS	NS	NS
Popat 2006	967	NC	NS/p 0.6	NC	NS/ HR 0.99 p 0.98
Jensen 2008	314	NC	NC	p 0.02/HR 1.6	HR 1.6/p 0.01
Soong 2008	945	NC	St II/HR 1.69 p 0.019	NC	NC
Yamada 2008	103	HR 1.26/NS	HR 1.45/NS	NS	NS
Kostopoulos 2009	498	NS	NS	HR 1.32/NS	HR 1.37/NS
Ren 2009	150	NC	NS/IHQ-RT-PCR	NC	p <0.05/gen 2R/3R
Karlberg 2010	1389	NS	NS	NS	NS
Goto 2012	180	NC	NS	NC	NC

NC: no comunicada; NS: sin significado estadístico; (*): colon.

**ANEXO: FIGURAS/DIAGRAMAS SOBRE BMT, METODOLOGÍA
EXPERIMENTAL e INMUNOTINCIONES.**

DIAGRAMA DE EGFr y VÍA DE SEÑALIZACIÓN

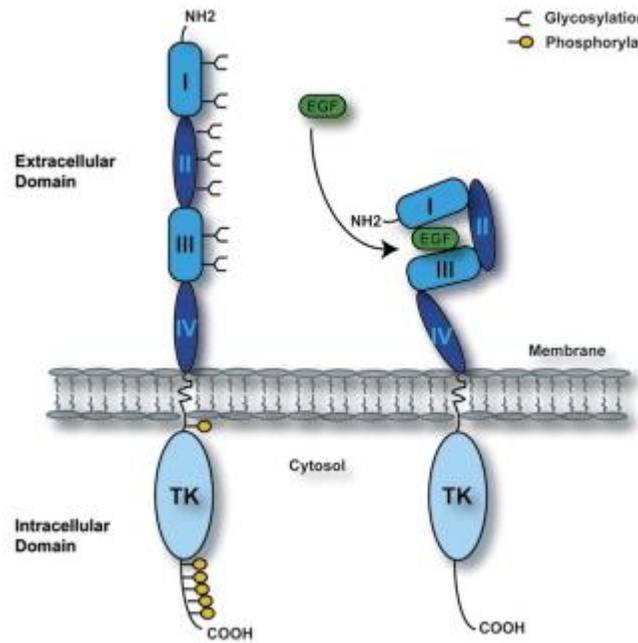


Figura nº 1. Estructura de EGFR.

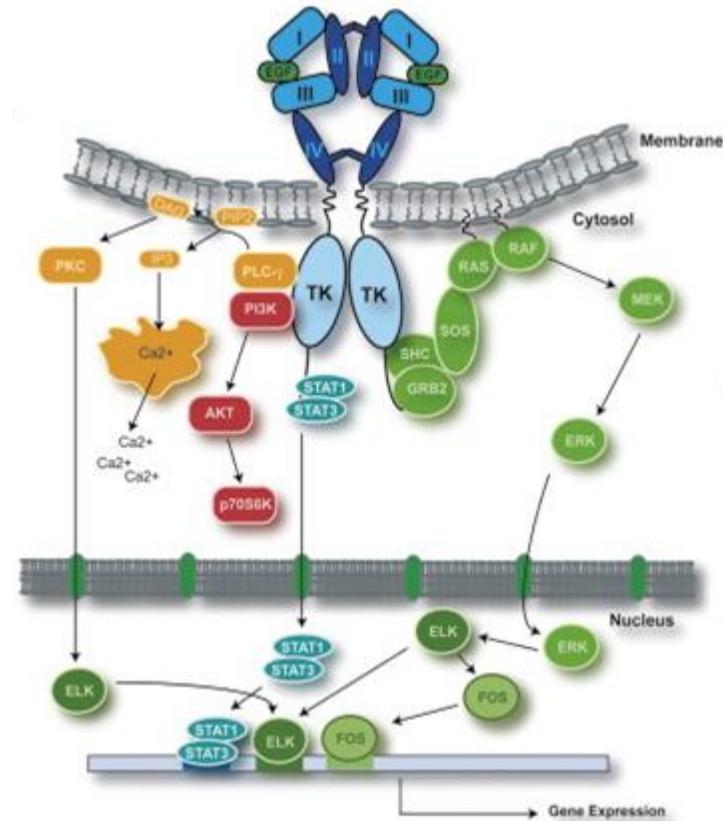


Figura nº 2. Vias de Señalización de EGFR.

Tomada de Zandi R et al. Cellular Signalling 2007; 19: 2013-2023.

DIAGRAMA DE Cox-2 y VÍA DE SEÑALIZACIÓN

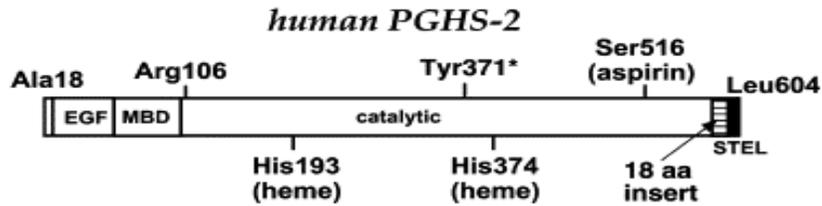


Figura nº 3. Estructura y dominios de Cox-2. Tomada de Garavito RM et al Prostagl Lip Med 2002; 68: 129.

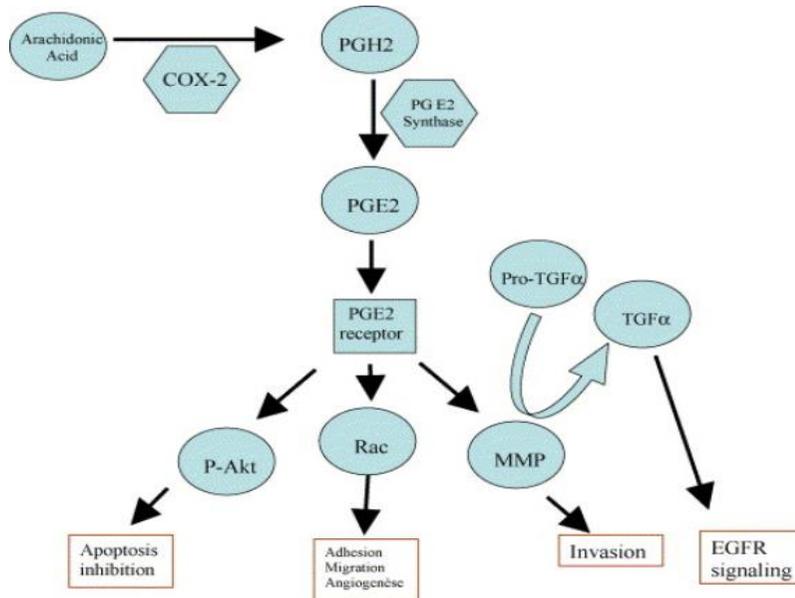


Figura nº 4. Vías de señal de Cox-2. Tomada de Meric JP et al Crit Rev Hematol Oncol 2006; 59:54

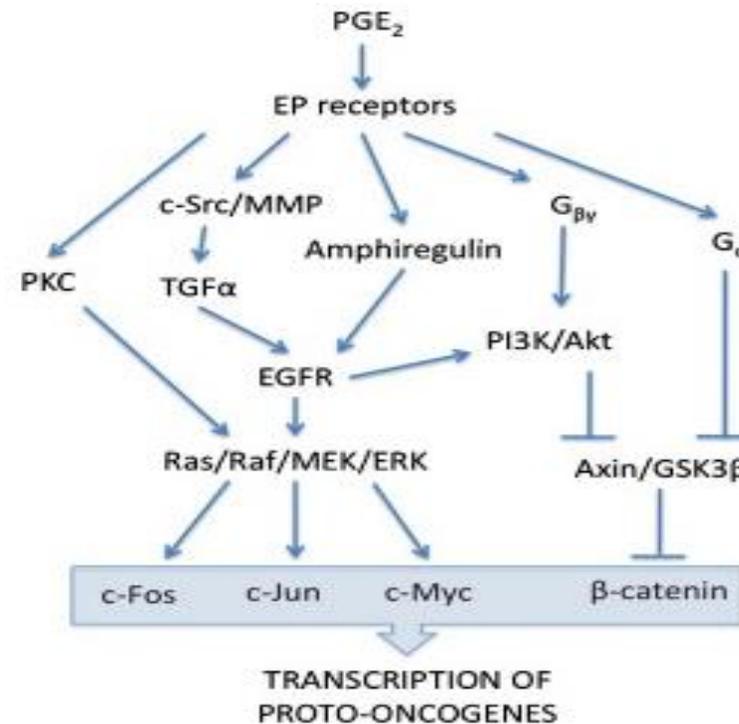
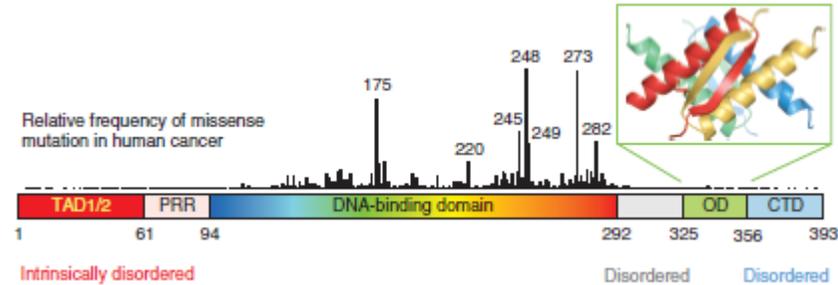


Figura nº 4b. Vía de señalización Cox-2/PGE₂. Tomada de Wu WK et al. Cancer Letters 2010; 295:7

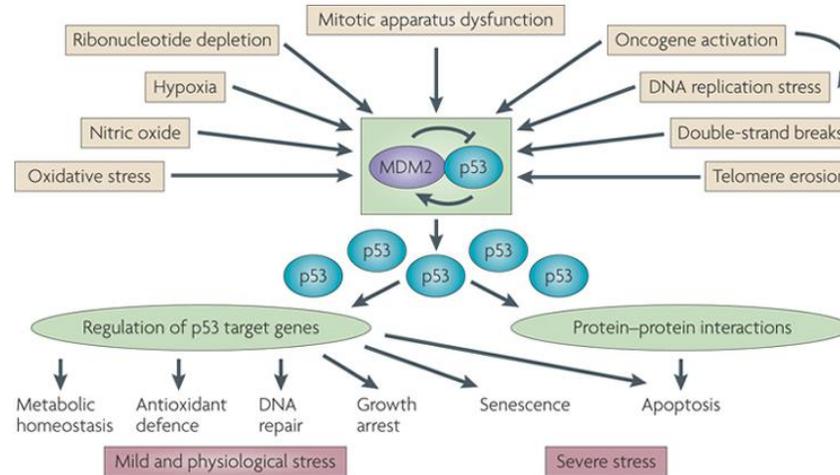
DIAGRAMA DE TP53 y VÍA DE SEÑALIZACIÓN

Figura nº 5. Estructura y dominios de p53.



Tomada de Joerger AC and Fersht AR. *Annu Rev Biochem* 2008; 77: 557-82.

Figura nº 6. Esquema de las vías de p53.



Tomada de Levine AJ and Oren M. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 749-758.

DIAGRAMA DE pKi-67 y PAPEL EN CICLO CELULAR

Figura nº 7. Expresión de pKi-67 y fases del Ciclo Celular.

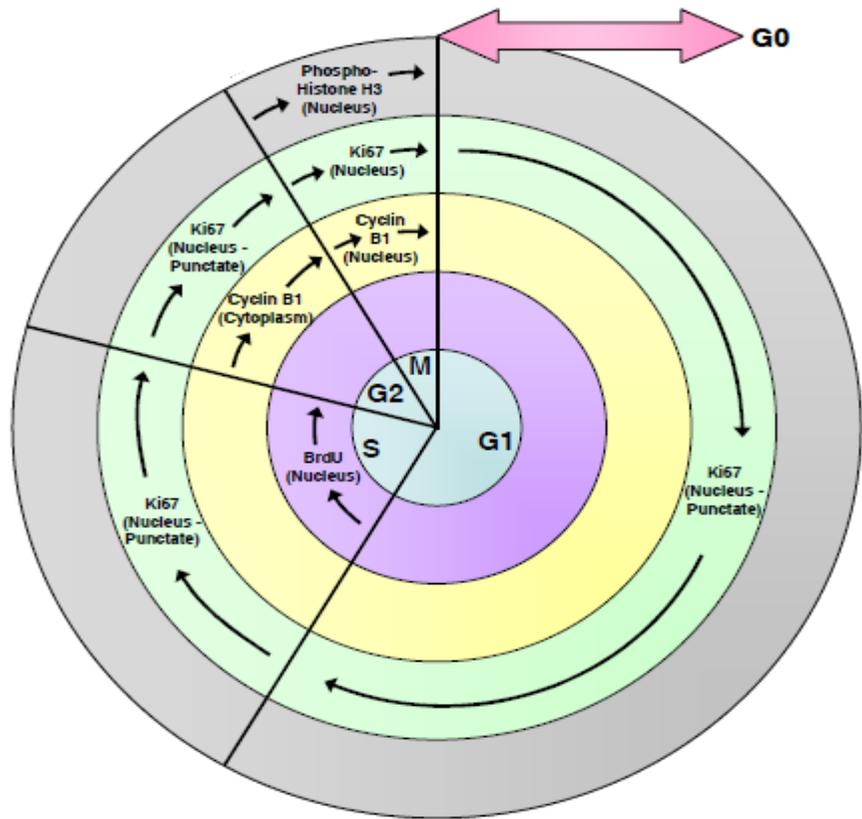


DIAGRAMA DE CICLINA D1 y VÍA DE SEÑALIZACIÓN

Figura nº 8. Diagrama de Ciclina D1 y sus dominios.

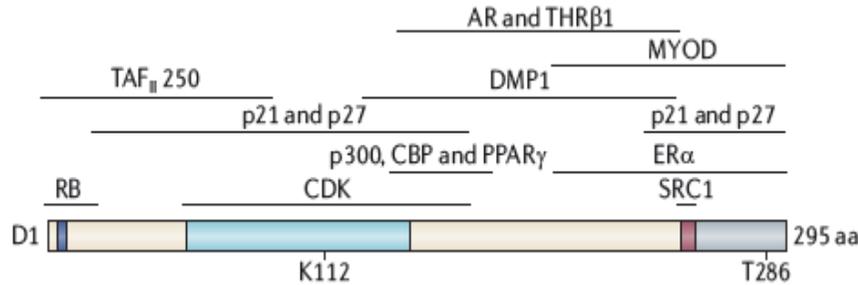
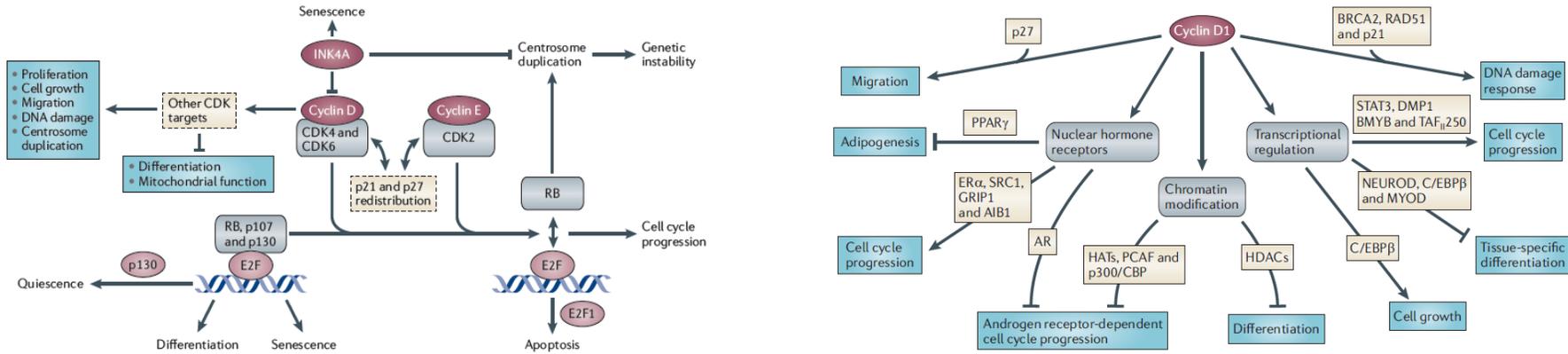


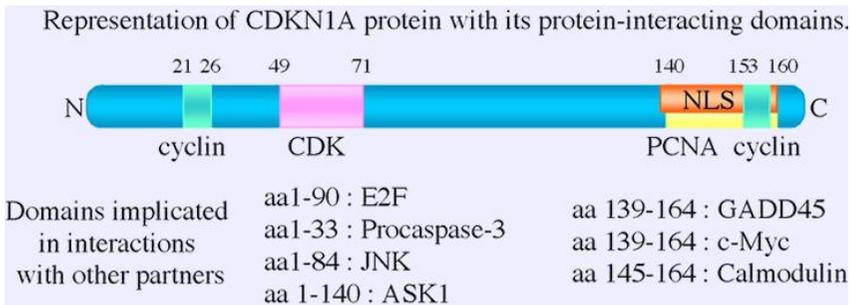
Figura nº 9. Vías de activación de Ciclina D1 dependientes o no de CDK.



Tomada de Musgrove EA et al. Nat Rev Cancer 2011; 11: 558-572.

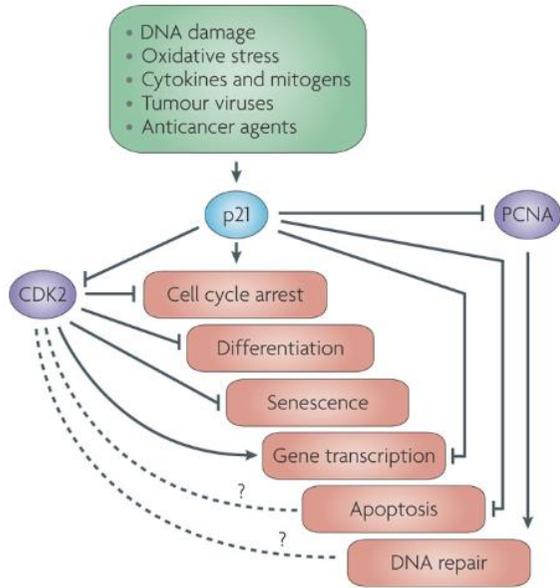
DIAGRAMA DE p21^{Waf1/Cip1} y RESPUESTAS CELULARES

Figura nº 10. p21^{Waf1/Cip1} gen y dominios estructurales.



Tomado de Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology 2001

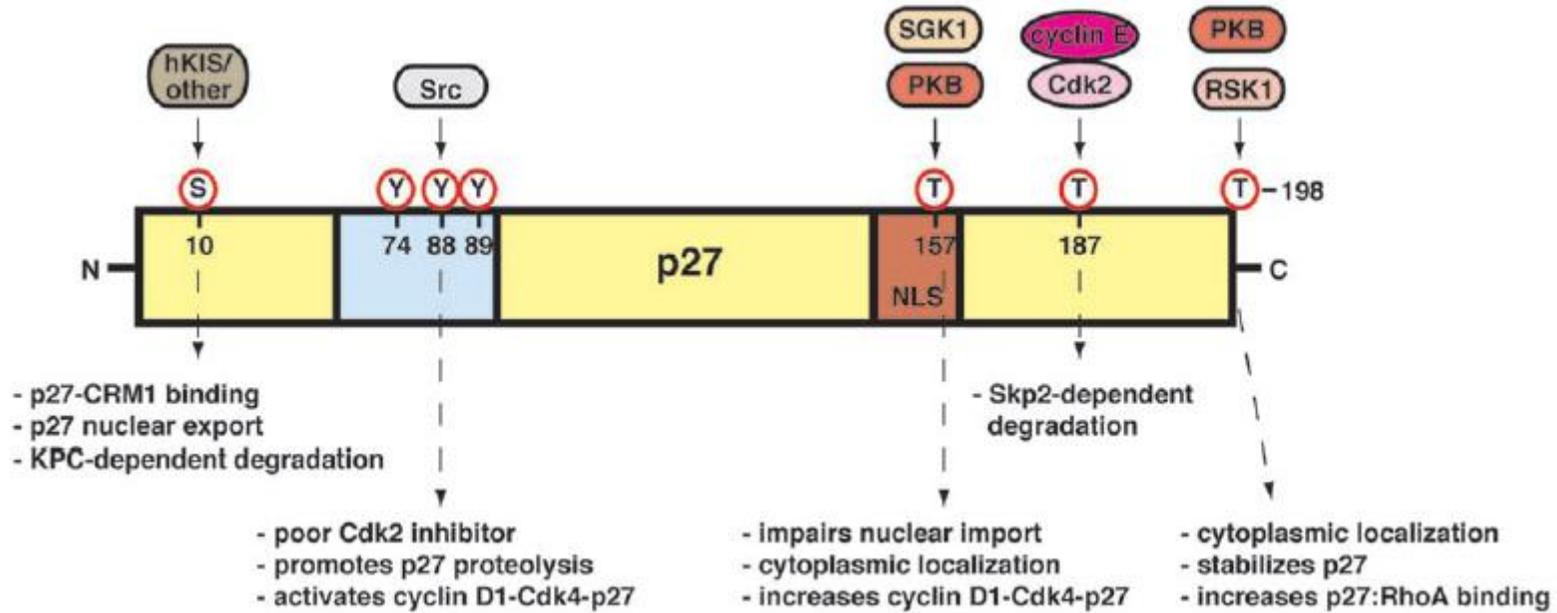
Figura nº 11. p21^{Waf1/Cip1} y Respuestas Celulares



Tomada de Abbas T and Dutta A. Nat Rev Cancer 2009; 9: 400-419

DIAGRAMA DE p27^{kip1} y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

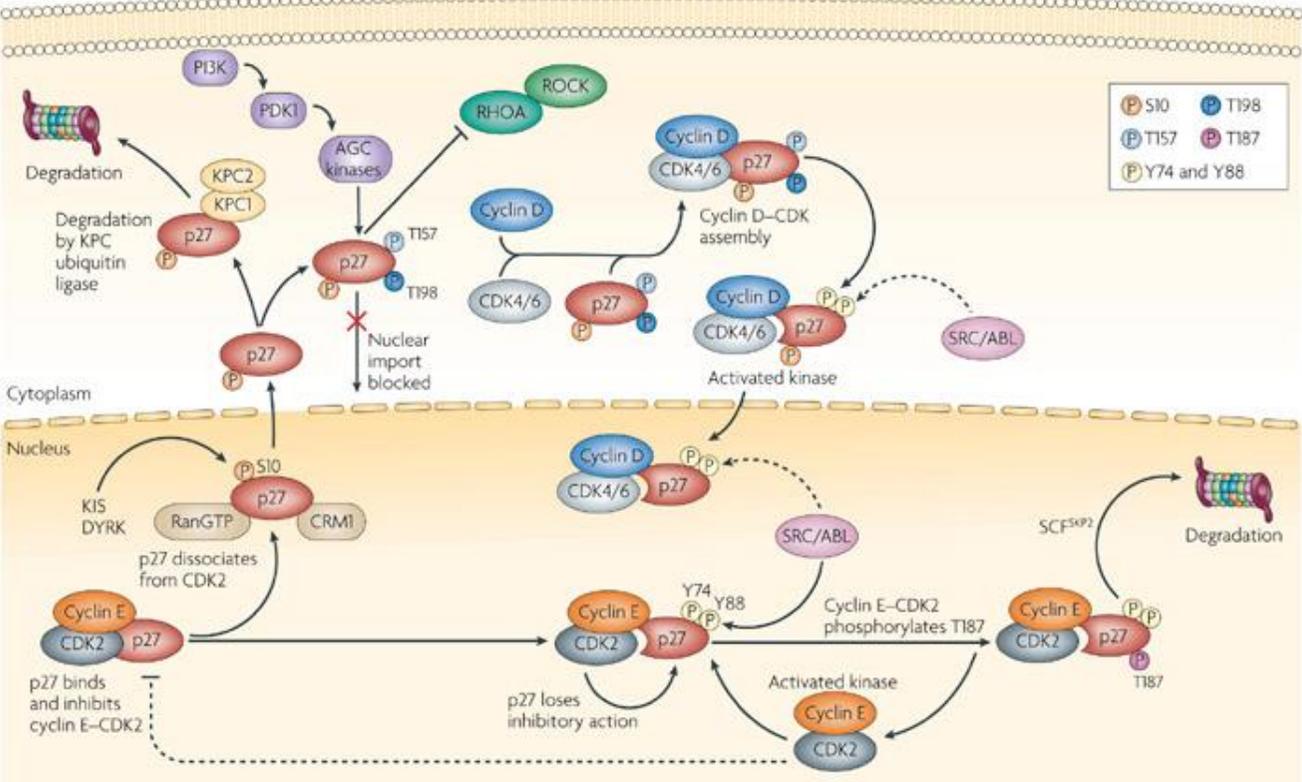
Figura nº 12. Diagrama de dominios de p27^{Kip1} y fosforilización.



Tomada de Larrea MD et al. Cell Cycle 2009; 8 (21): 3455-3461.

DIAGRAMA DE p27^{kip1} y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

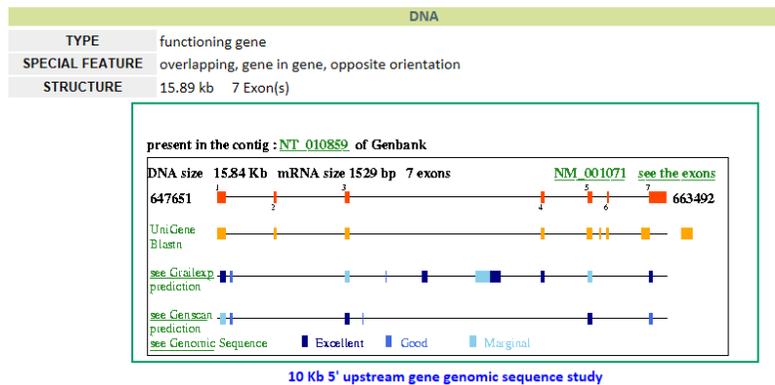
Figura nº 13. Vías de señalización que regulan p27.



Tomada de Chu IM and Slingerland JM. Nat Rev Cancer 2008; 8: 253-267.

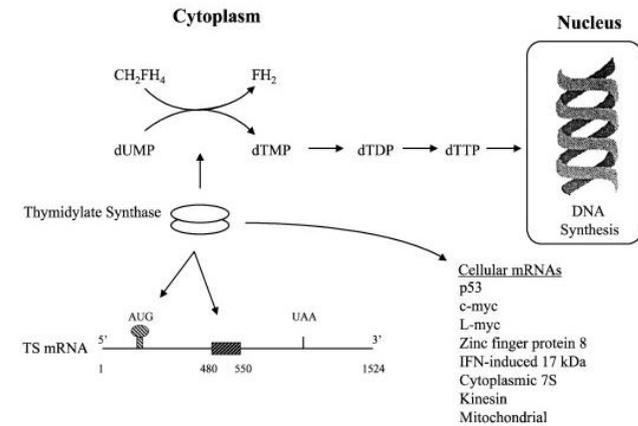
pTS y FUNCIÓN REGULADORA

Figura nº 14. Estructura del gen TYMS.



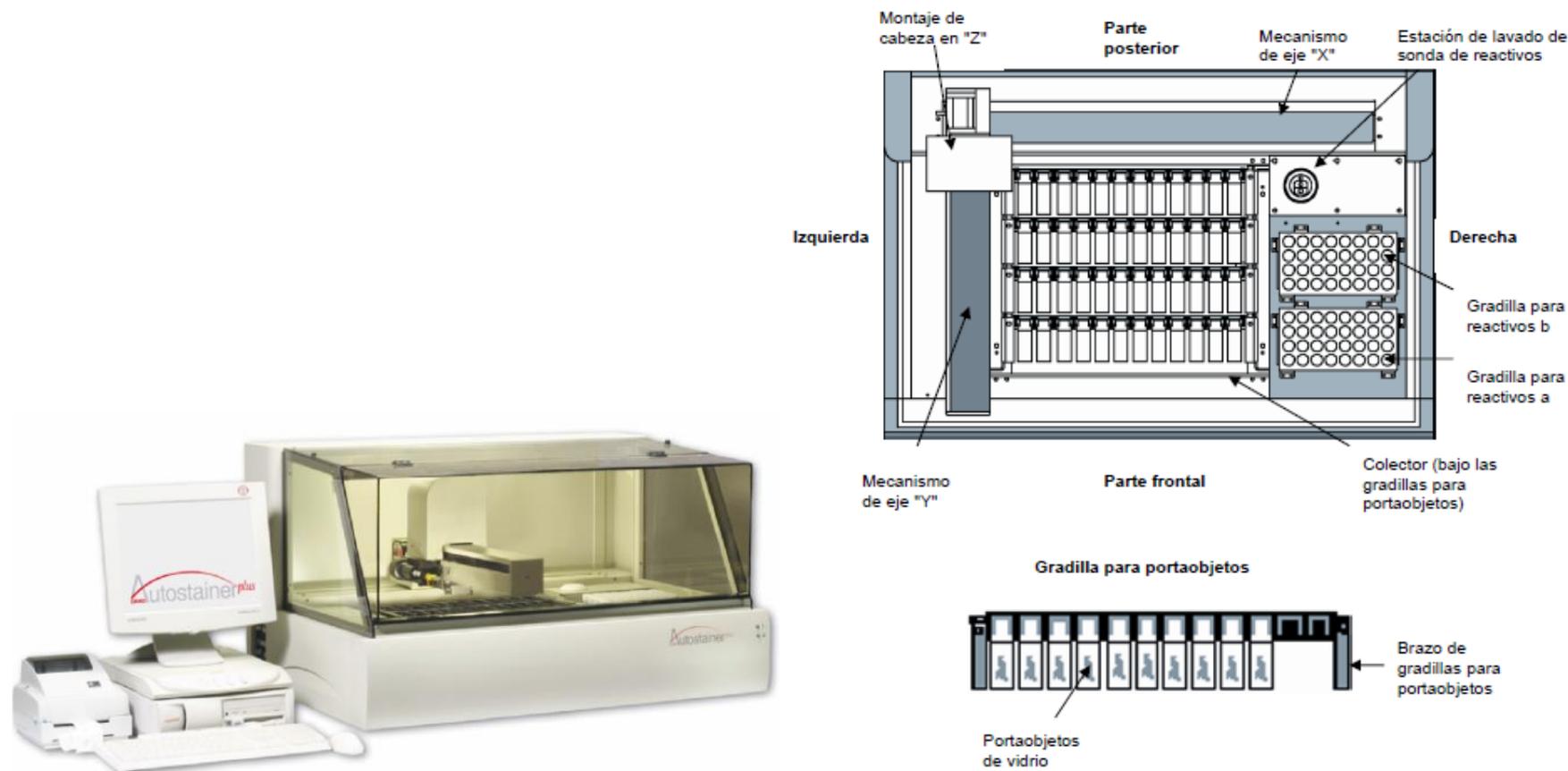
Tomada de genatlas.medicine.univ-paris5.fr.

Figura nº 15. Vías de TS como regulador traslacional.



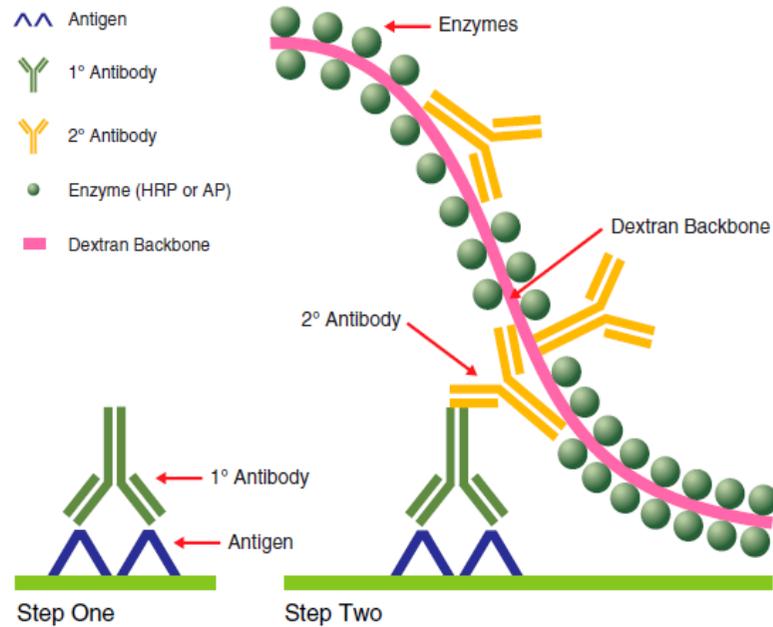
Tomada Liu J et al. *Biochem Biophys Acta* 2002; 1587: 174.

Figura nº 16. AUTOSTAINER PLUS de DAKO



Tomado de ICH Staining Methods, Dako North America, Carpinteria, California 2009

Figura nº 17. SISTEMA ENVISION™ DAKO

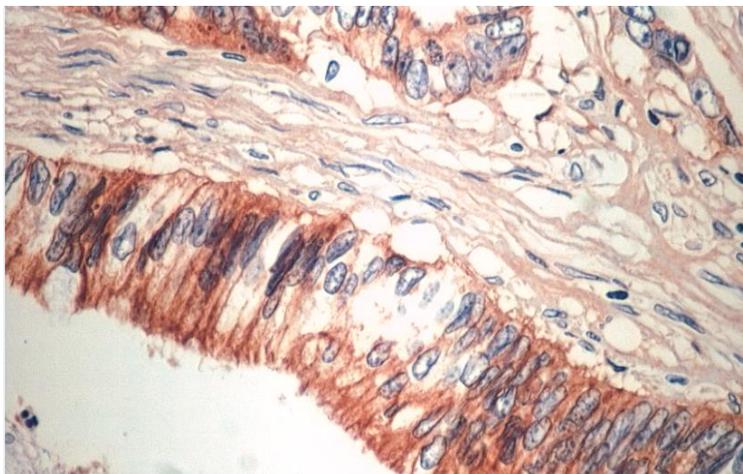


Two-Step Polymer Method (EnVision™).

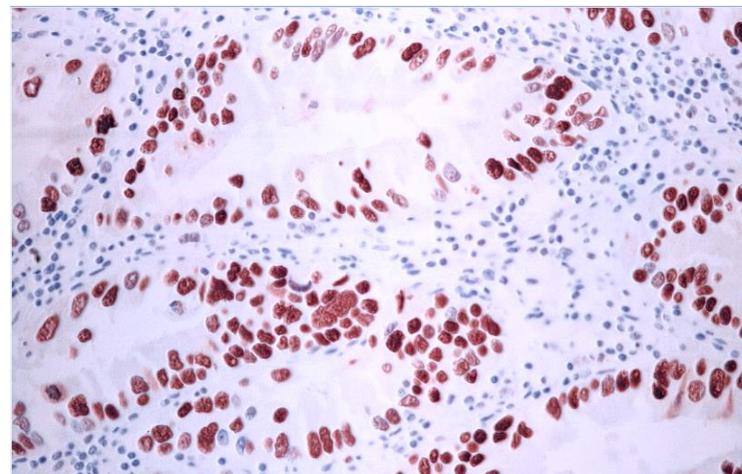
Tomado de ICH Staining Methods, Dako North America, Carpinteria, California 2009

Figura nº 18. INMUNOTINCIONES

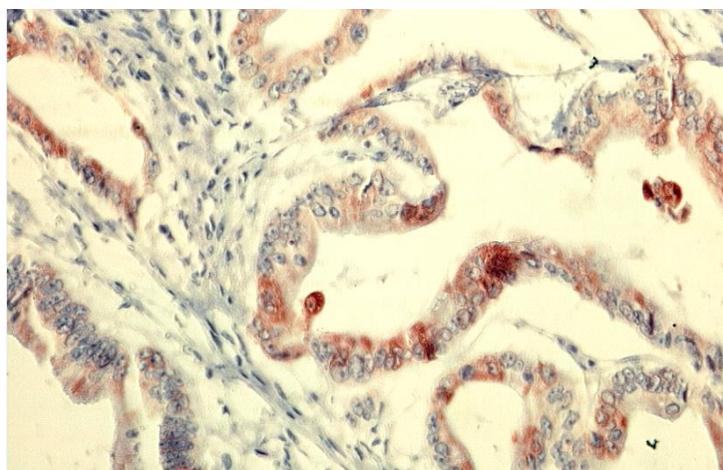
ESTUDIO DE BMT por IHQ



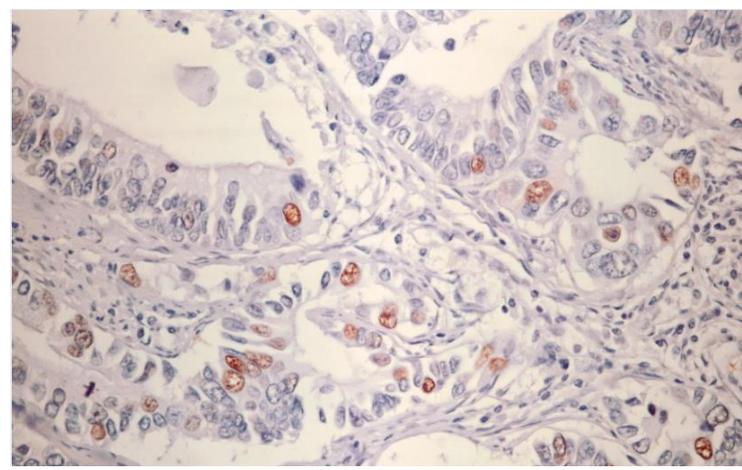
Inmunotinción EGFr



Inmunotinción TP53



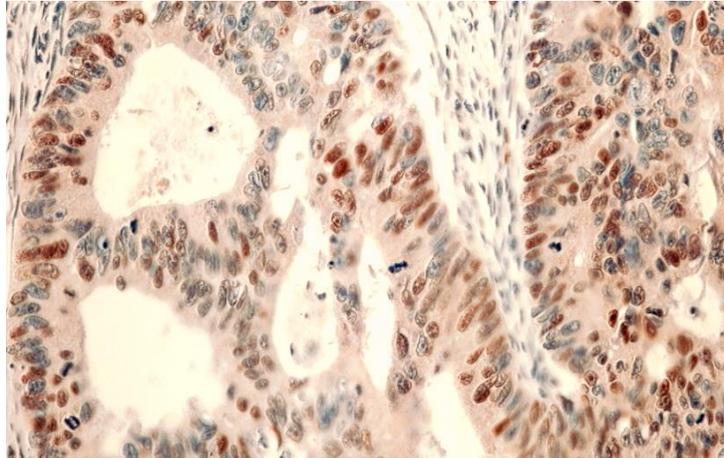
Inmunotinción pCox-2



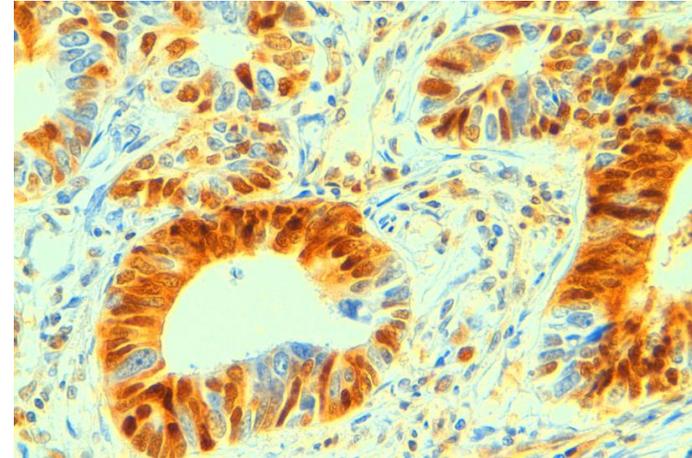
Inmunotinción pKi-67

Figura nº 19. INMUNOTINCIONES

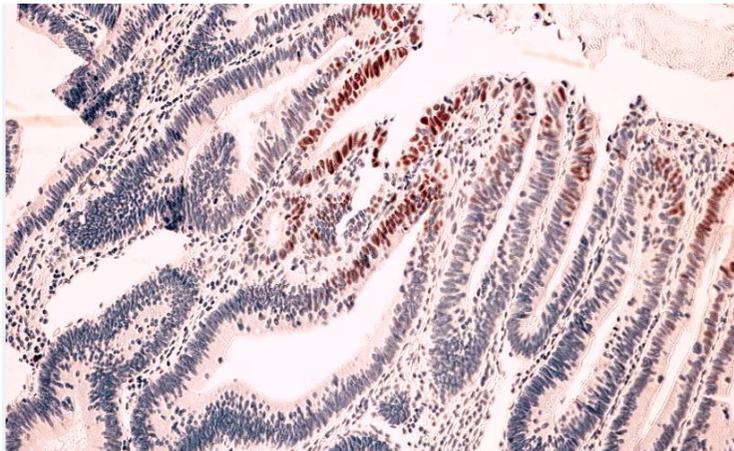
ESTUDIO DE BMT por IHQ



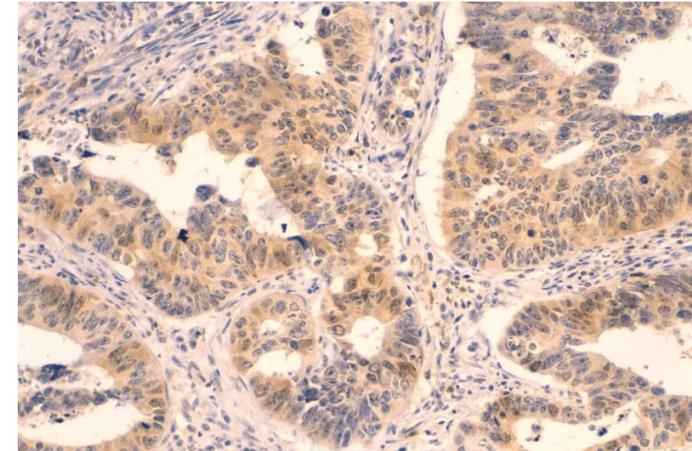
Inmunotinción Ciclina D1



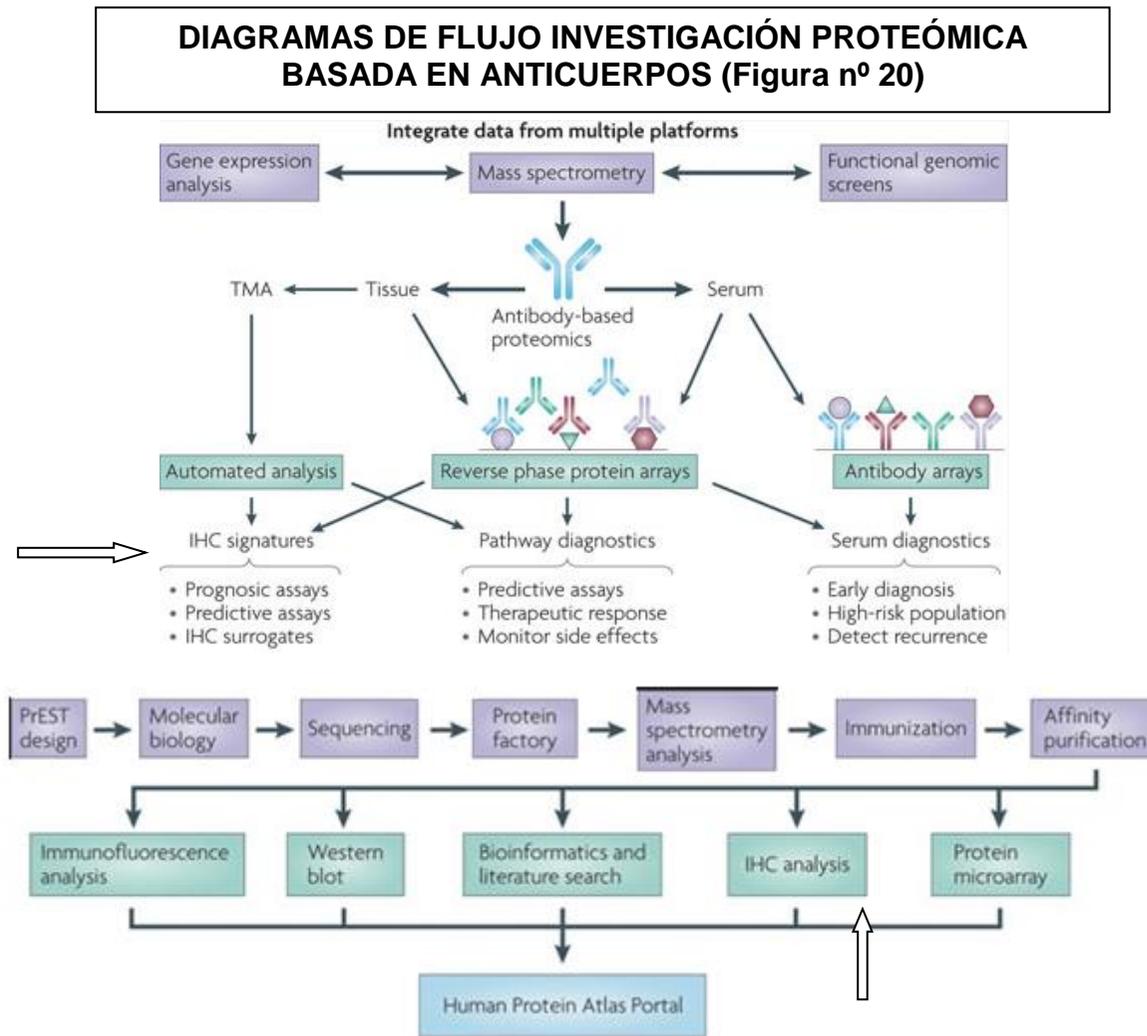
Inmunotinción p27^{Kip1}



Inmunotinción p21^{Waf1/cip1}



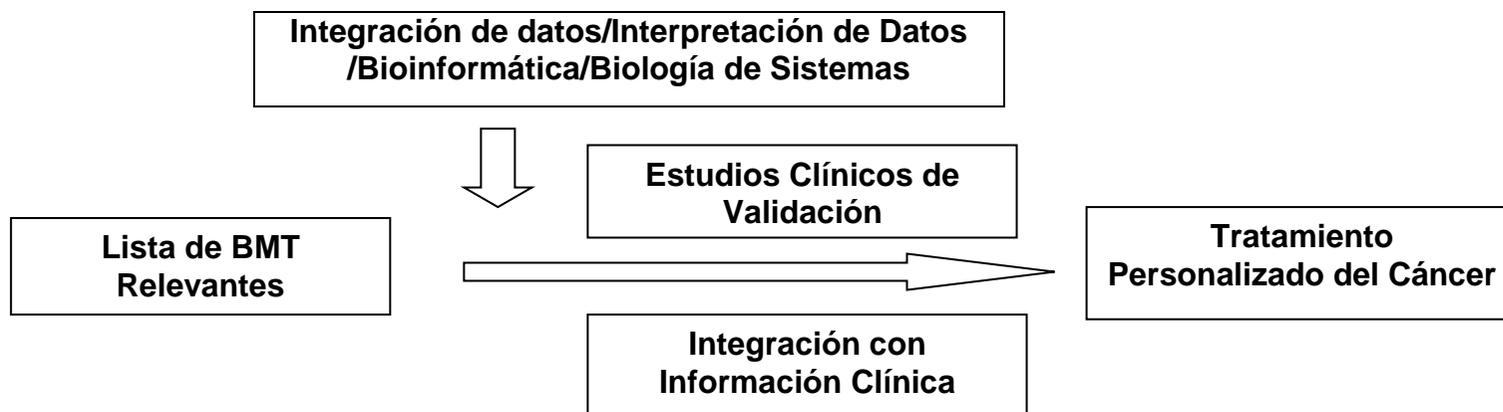
Inmunotinción pTS



Tomado de Brennan DJ et al. Nat Rev Cancer 2010; 10: 605

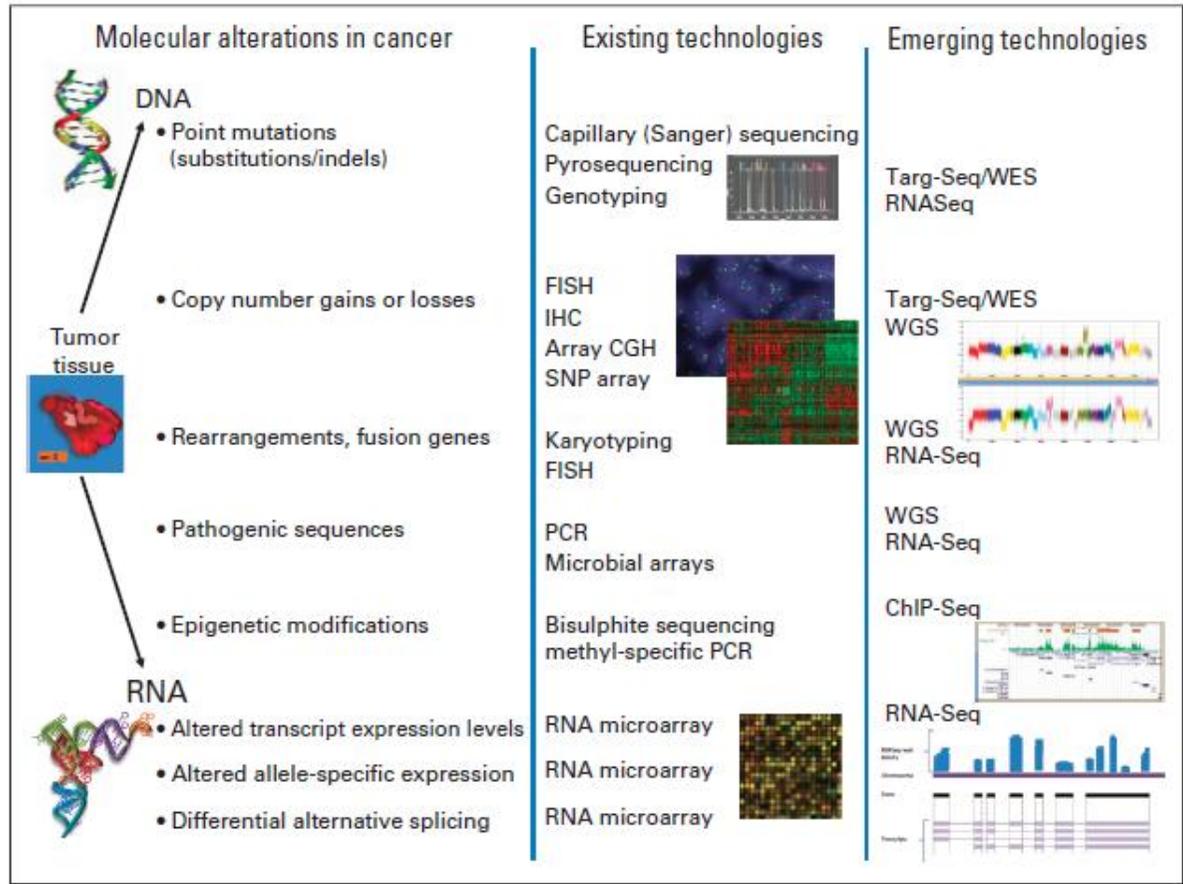
**Figura nº 21. Perspectivas de Investigación en BMT
DIAGRAMA PARA ESTUDIO DE PERFILES MOLECULARES**

Tipo de Perfil	Mutaciones (DNA)	Número de Copias/ Fusión (DNA)	Expresión Génica (RNA)	Epigenética (DNA)	Proteómica (Proteínas)
Rendimiento Bajo	Secuenciación Sanger	FISH, qPCR Citogenética	qPCR	Secuenciación Bisulfitos	Western Blotting ELISA
Rendimiento Medio	Detección Mutación Múltiple	Ensayos Multiplex	Detección Firma Genética	Matrices de Metilación	Matrices Proteínas MicroWestern
Rendimiento Alto	Secuenciación Siguiete Generación	aCGH Matrices de sNPs NGs	Matrices de Expresión Génica NGs	Secuenciación de 2ª Generación (NGS)	Espectrometría de Masas



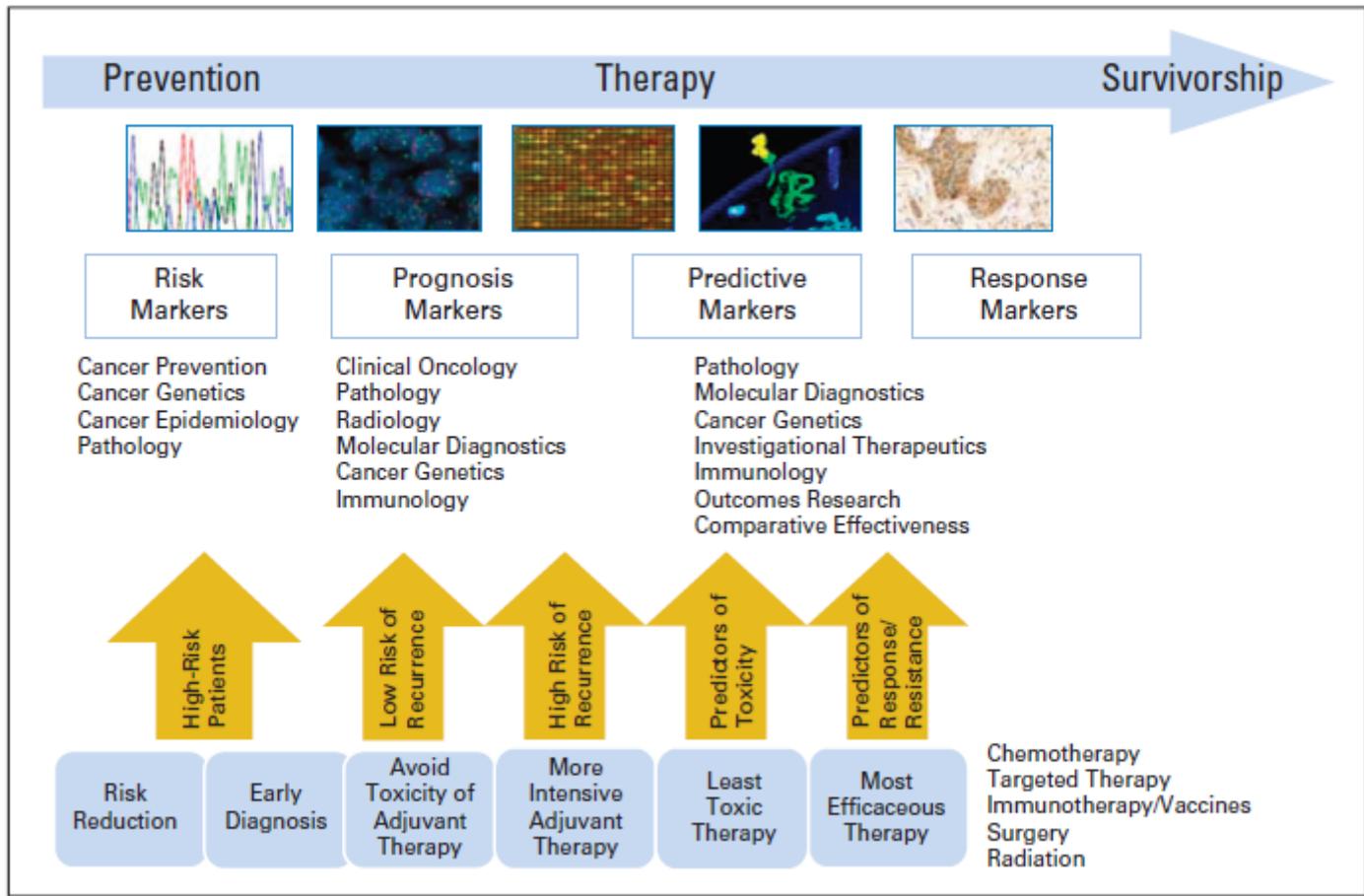
Tomado de Stricker T et al Semin Oncol 2011; 38 (2): 173-185

Figura nº 22. Diagrama de Categorías de Alteraciones Genómicas y Tecnología de Análisis



Tomado de McConaill LE. J Clin Oncol 2013; 31: 1815-1824.

Figura nº 23. Diagrama del Cuidado Personalizado del Cáncer.



Tomado de Meric-Berstam F et al. J Clin Oncol 2013; 31: 1849-1857.

ANEXO: CRITERIOS REMARK.

Criterios REMARK.

Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies.

INTRODUCCION

Estado del BMT examinado, objetivos del estudio e hipótesis prefijada.

MATERIAL y MÉTODOS

Pacientes

Describir las características de los pacientes, su fuente y criterios de inclusión/exclusión.

Describir los tratamientos recibidos y su fundamento.

Características de las muestras

Describir el tipo de material biológico empleado, incluyendo muestras control, preservación y almacenamiento.

Métodos del ensayo

Especificar el método de ensayo empleado y facilitar un protocolo detallado, incluyendo reactivos o kits específicos, procedimientos de control de calidad, valoración de reproducción, métodos de cuantificación, scoring y comunicación de protocolo. Especificar la relación del ensayo/estudio.

Diseño del estudio

Referenciar el método de selección de casos, incluir su intención retro o prospectiva, estratificación por FPC. Especificar el periodo de reclutamiento de pacientes, duración de estudio, seguimiento y medianas.

Definir de forma exhaustiva los puntos finales del estudio.

Referenciar todas las variables candidatas para inclusión en modelos predictivos.

Razonamiento del tamaño muestral.

Métodos de análisis estadístico.

Especificar los métodos estadísticos, incluyendo detalles del análisis de cada variable y para construcción de modelos, verificación y tratamiento de datos perdidos.

Clarificar como son contemplados los BMT en el análisis; si es relevante, comentar los puntos de corte.

RESULTADOS

Datos

Describir el flujo de pacientes a través del estudio, incluyendo el número de pacientes en cada estadio del análisis y razones de selección.

Comunicar la distribución de las características demográficas básicas, variables pronósticas estándar y BMT incluyendo los valores perdidos.

Análisis y presentación.

Mostrar la relación del BMT con las variables pronósticas estándar.

Presentar un análisis univariante mostrando la relación de cada BMT con el curso evolutivo y efecto estimado (HR y probabilidad de supervivencia)

Para análisis multivariantes clave, comunicar los efectos estimados (HR) con los intervalos de confianza del BMT y, al menos en el modelo final, todas las otras variables que pueden influir.

Para la comunicación de resultados, facilitar los efectos estimados con intervalos de confianza de un análisis que incluya BMT y FCP, independientemente de su significado pronóstico.

Comunicar, si se efectuaron, otras investigaciones como asunciones checking, análisis de sensibilidad y validaciones internas.

DISCUSIÓN.

Interpretar los resultados en el contexto de las hipótesis prefijadas y otros estudios relevantes, incluyendo la discusión sobre las limitaciones del estudio.

Discutir las implicaciones de su valor clínico y de investigaciones futuras.

ANEXO: ABREVIATURAS.

Abreviaturas por orden alfabético.

aCGH: Arrays for Comparative Genomic Hybridization
AINEs: Antiinflamatorios No Esteroideos
AJCC: American Joint Committee on Cancer
ASCO: American Society of Clinical Oncology
APAF-1: Apoptotic Protease Activating Factor 1
APC: Adenomatous Poliposis Coli
APC/Wnt/ β catenina
AOM: Azoxymethyne
Bax: Bcl-2 associates X protein
Bcl-2: B cell leukemia/lymphoma 2 gene
B-Raf: Downstream effector of K-ras/cellular response to growth receptor
CAP: Colegio Americano de Patólogos
CCR: Carcinoma Colorrectal
CDK: Cyclin-dependent kinase
CDX2: Marcador de diferenciación intestinal AcMo
CIMP: CpG Island Methylator Phenotype
Cip/Kip: CDK-interacting protein/Kinase inhibitor protein
CKIs: Cyclin-Dependent Inhibitors
CLIA: Clinical Laboratory Improvement Amendments
COSMIC: Catalogue of Somatic mutations in Cancer
DCC: Deleted Colon Cancer
DGGE: Denaturing Grading Gel electrophoresis
DHFR y SHMT Dihydrofolate Reductase and Serine Hydroxymethyltransfersase
DMO: Dimethylbenzidine
DPA: Dyhydropirimidine Dehydrogenase
DPYD Dihydropyrimidine Dehydrogenase
dTMP: Deoxythymidine-5'-Monophosphate
dUMP: Deoxyuridine -5'-Monophosphate
ELAV: Drosophila embryonic lethal abnormal vision-like 1
ELISA: ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas
EORTC: European Organization for Research and Treatment of Cancer

ANEXO. ABREVIATURAS

E2F: gen codificador de factores transcripcionales
ER: Estrogen Receptor
ESMO: European Society of Medical Oncology
EZH2: Histona-lisina metiltransferasa represor transcripcional/silenciador gen
FAP: Familial Adenomatous Polyposis
FCM: Flow Cytometry
FISH/ISH: Fluorescence In Situ Hybridization/ In Situ Hybridization
GSTP1: Glutathione S-Transferase 1
GWAS: Estudios de asociación amplios de genoma
Hallmarks of cancer: Características de Cancer
HIF factor-1: Hipoxia Inducible Factor 1
HNPCC: Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
HR: hazard ratio
ICDO: International Classification of Diseases for Oncology
IHQ: Inmunohistoquímica
IMS: Inestabilidad de Microsatélites
IMC: Índice de Masa Corporal
INK4/ARF: Inhibitors of CDK4
JAK/STAT: Janus kinases/Signal transducers and activators of transcription
Klf-KLF4: Krüppel-like factor 4
Knockout: Genetically engineered mouse replacing gene
KPC: Kip1 ubiquitination-promoting complex
LINE-1: LINE-1 (L1) retrotransposons are replicating repetitive elements
LOH de 18q: Loss of Heterozygosity 18q
Mcm-2: Minichromosome Maintenance protein 2
Mdm2: Mouse double minute 2
MIB1: Molecular Immunology Brostel 1
Microwestern: miniaturized, multiplex immunoblot assay.
MINT1-3: nuclear matrix platform integrates transcriptional responses
MLh1: MMR gene
MMPs: Matrix Metalloproteinase
MMR: Mismatch Repair
mt TFA: Factor A de Transcripción Mitocondrial
MSS: Microsatellite Stability

ANEXO. ABREVIATURAS

MVD: Microvascular density
Myc: oncogen myc
NCI: National Cancer Institute
NCCN: National Comprehensive Cancer Network
NER: Nucleotide Excision Repair
NF- κ B: Nuclear factor κ B
NIH: National Institute of Health
Null: Genetically engineered mouse without specific gene
OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man. Johns Hopkins University
OPRT: Orotate Phosphoribosyltransferase
ORF/IRES: Internal ribosome entry sites
p16^{INK4a}: Cyclin-dependent kinase inhibitor
PCR: Polymerase Chain Reaction
PCNA: Proliferative Antigen Nuclear Antigen
PEST: Región rica en prolina, ácido glutámico, serina y treonina de Ciclina
PGE₂: Prostaglandin E2
PGH₂: Unstable Endoperoxide Intermediate Prostaglandin H2
PI3K-Akt: Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt / regulator of cell survival
PI3K-Akt-GSK3 β : PI3K-Akt-Glycogen Synthase Kinase 3 β
PLC γ -PKC: Phospholipase C pathway
p300/CBP: cAMP response element-binding protein –binding protein
PPAR γ : Receptores de activación de peroxisoma
PTB: Polypyrimidine tract-binding proteins
PTEN: Phosphatase Protein Homologue to Tensine
PS ECOG: Performance Status Eastern Cooperative Oncology Group
pStat5: Signal transducer and activator of transcription-5
QT/BT: Quimioterapia/Bioterapia
Ras-Raf-MAP: Ras-Raf- Mitogen Activated Protein
Ras-Raf-MEK (MAPK kinase)-ERK (por *extracellular signal-regulated kinase*)
Rb: Retinoblastoma gene
Rb-E2f-Mdm2-p53: Vía de señalización y regulación de p53
REMARK: Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies
Rho: Cinasa relacionada con la motilidad celular
RPPAs: Reverse phase protein assays

ANEXO. ABREVIATURAS

RTKs: Receptores de Tirosina Cinasa
RT-PCR: Real Time-Polymerase Chain Reaction
SCF-Skp2; Skp Cullin F-box containing complex multiprotein ubiquitine ligase
SEER: Surveillance, Epidemiology and End Results National Cancer Data Base
SEK/JNK: JNK upstream kinase SEK-1
SIPS: Stress Premature Induced Senescence
SKP2: S-phase-kinase-associated protein 2
SMAD: factores de transcripción Smad.
SNOMED: Systematized Nomenclature of Medicine
SNPs: Matrices de polimorfismos de nucleótidos únicos.
SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism
STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription Protein 3
S6K: Ribosomal Protein S6 Kinase
TCF: Transcription Factor
TCGA: Total Cancer Genome Atlas
TGF α , TGF β : Transforming Growth Factor α β
TMA: Tissue Microarrays
TMUGS: Tumor Marker Utility and Grading System
TS, TP: Thymidilate Synthase; Thymidine Phosphorylase
TYMP: Thymidilate Synthase
UICC: International Union Against Cancer
UTPa: Urokinase Type Plasminogen Activator
VEGF: Vascular Endotelial Growth Factor
Waf 1: Wild type p53 activated protein 1
WHO: World Health Organization
Wnt/Wingless: Wnt/Wingless señales de activación
WT: Wild type