

---

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

## FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

"ESTUDIO DE LAS MUCINAS Y DE ANTIGENOS CARBOHIDRATOS  
ASOCIADOS AL CANCER COLORRECTAL".

Tesis presentada en esta Facultad por el:  
Médico ARIEL OSVALDO ZWENGER  
para optar al grado académico de **Dr. en MEDICINA**

Directores de Tesis

**Prof. Dra. María Virginia Croce:**

Profesora Adjunta de la Cátedra de Histología, Embriología y Citología "B" de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP- Investigadora Principal de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

**Prof. Dra. Amada Segal-Eiras:**

Profesora Adjunta de la Cátedra de Patología "B" de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP

Directora del Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA). Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP

Investigadora Principal del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET.

---

---

## Agradecimientos

- A la Dra. Prof. María Virginia Croce por ser mi guía en el desarrollo del presente trabajo de tesis y por su profesionalismo, apoyo y perseverancia.
  - A la Dra. Prof. Amada Segal-Eiras por creer en mí y abrirme las puertas del CINIBA para emprender el camino de la investigación.
  - Al Sr. Decano de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP y a los profesores de esta alta Casa de Estudios por permitirme desarrollar los trabajos de investigación en esta Unidad Académica.
  - Al Servicio de Patología del Hospital Provincial Neuquén “Dr. E. Castro Rendón”, en especial al Dr. Gabriel Grosman por su invaluable colaboración en este trabajo.
  - A la Lic. Sandra Demichelis por su experta asistencia en el análisis estadístico.
  - A mis compañeros del CINIBA y en especial al Dr. Martín Rabassa por su apoyo.
  - Al Jefe del Servicio de Oncología y Prof. de la Cátedra de Anátomo-Histología de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Dr. Juan Eduardo Pérez por confiar en mí y enseñarme a ser no sólo buen Oncólogo sino también a un Oncólogo bueno.
  - A la Bioquímica Graciela Gigola por su colaboración y aliento permanente, y a la Bióloga Fernanda Delías por la edición de imágenes.
  - Al Comité de Investigación del Hospital General de Agudos “Dr. José Penna” de Bahía Blanca, los Doctores Germán Rammallo, Carlos Wisniousky y Juan Eduardo Pérez, por apoyarme al presentar este proyecto de tesis en dicha institución.
  - Al Jefe de Servicio de Patología Hospital General de Agudos “Dr. José Penna” de Bahía Blanca, Dr. Jorge Blasco.
  - A los directivos del Hospital Provincial Neuquén “Dr. E. Castro Rendón”, Neuquén, por facilitarme el camino para poder llevar a cabo mi trabajo de tesis.
  - A mis colegas del Servicio de Oncología del Hospital Provincial Neuquén “Dr. E. Castro Rendón”, Neuquén.
-

---

Esta tesis se la dedico a mis padres  
y a todos aquellos que me brindaron su apoyo.

---



---

## Índice Principal

Introducción.....	1
Objetivos.....	84
Materiales.....	86
Métodos.....	101
Resultados.....	109
Discusión.....	224
Conclusión.....	272
Resumen.....	277
Referencias bibliográficas.....	282
Índice de tablas y figuras.....	378

---

---

# Introducción

## Índice de la introducción

El cáncer en el pasado.....	4
El cáncer en nuestro tiempo.....	6
Cáncer colorrectal.....	8
Biología tumoral.....	8
La secuencia adenoma-carcinoma.....	8
Múltiples pasos en el proceso de carcinogénesis.....	9
Tipos histológicos.....	12
Categorías pronósticas.....	13
Epidemiología.....	15
Factores de riesgo.....	16
Manifestaciones clínicas.....	21
Localización del cáncer colorrectal.....	22
Enfermedad metastásica.....	22
Estadificación.....	22
Marcadores tumorales.....	25
Pronóstico.....	25
Tratamientos quimioterápicos adyuvantes.....	27
Tratamiento del CCR en estadio II.....	28
Tratamiento del CCR en estadio III.....	32
Factores moleculares predictivos.....	33
Los antígenos tumorales tienen su propia historia.....	34
Las mucinas humanas.....	38
Estructura de las mucinas.....	40
Mucinas de unión a membrana.....	41
Mucinas secretadas que forman geles.....	42
Glicosilación de mucinas.....	43
Estructura y biosíntesis de los antígenos de O-glicosilación simple.....	44
O-glicosilación incompleta y cáncer.....	45
¿Por qué se expresan antígenos de O-glicosilación incompleta en el cáncer?.....	48
“core 2”.....	49
MUC1.....	50

• Glicosilación de MUC1.....	51
• MUC1 y adhesión celular.....	52
• MUC1 y el sistema inmune.....	53
• Propiedades inmunomoduladoras de MUC1.....	54
• Respuesta inmune humoral de MUC1.....	54
• Respuesta inmune celular a MUC1.....	56
MUC2.....	57
MUC5AC.....	60
Los antígenos del grupo sanguíneo Lewis.....	61
<i>Sialil Lewis a</i> .....	62
<i>Lewis x</i> .....	63
<i>Sialil Lewis x</i> .....	64
<i>Lewis y</i> .....	65
Antígenos tumorales asociados al CCR.....	66
Mucinas relacionadas con el CCR.....	66
MUC1.....	66
MUC2.....	68
MUC5AC.....	69
Antígenos carbohidratos asociados a mucinas relacionados con el CCR.....	70
<i>Tn</i> .....	70
<i>Sialil Lewis a</i> .....	71
<i>Lewis x</i> .....	73
<i>Sialil Lewis x</i> .....	74
<i>Lewis y</i> .....	75
Otros antígenos relacionados con el CCR.....	76
Antígeno Carcinoembrionario.....	76
<i>β-catenina</i> .....	78
Antígenos tumorales asociados a resistencia al tratamiento quimioterápico.....	81
La importancia de encontrar subgrupos poblacionales que se beneficien con un determinado tratamiento quimioterápico.....	82



## El cáncer en el pasado

Sin duda los seres humanos han batallado contra el cáncer a través de su existencia. Se han encontrado signos de cáncer en huesos de momias egipcias y peruanas que datan de más de 3000 años a.C. En 1962, Edwin Smith encontró en Luxor, Egipto, el escrito más antiguo que existe en donde se describen ocho casos de cáncer de mama o úlceras tratadas con cauterización. Este documento también refiere que “no hay tratamiento” para el cáncer (Murton LT *et al*, 1997; Idalia FE *et al*, 2000).

El término “cáncer” deriva del griego “karkinos” o cangrejo, el cual hace referencia a los vasos sanguíneos de los tumores o garras de cangrejo y fue Hipócrates el primero en usar la palabra “carcinosis” y “carcinoma” para describir a los tumores, (The American Society Inc, 2002, 2005). Hipócrates (400 a.C.), conocido como el padre de la Medicina, propuso la Teoría Humoral de la Medicina, en la cual el cuerpo está compuesto por cuatro fluidos o humores: sangre, flema, bilis amarilla y bilis negra. Cualquier cambio en el balance de estos humores causaría cáncer, más específicamente se consideraba que el exceso de bilis negra estaría relacionada con el cáncer.

En 168 a.C., Galeno, médico romano, también apoyó la teoría de los humores. Él sostuvo que el cáncer podía ser curado en etapas precoces y que los tumores avanzados podrían ser curados operándolos cortando alrededor del área afectada o por cauterización. Galeno además consideraba que la dieta poco saludable y la mala vida estaban directamente relacionadas con el cáncer (Gurunluoglu R *et al*, 2003).

Por su parte, M. Maimónides (1190 d.C.) quién escribió diez tratados de Medicina, fue el primero que se refirió a que los tumores grandes podrían ser curados por escisión más allá de su raíz y del tejido sano de su alrededor (Rosner F *et al*, 1998). En 1713 d.C., Bernardino Ramazzini notó entre las monjas una ausencia de cáncer de cuello uterino y una elevada frecuencia de cáncer de mama, concluyendo que el cáncer podría ser causado por el estilo de vida. Su aporte también llevó a descubrir la importancia de los factores hormonales en el cáncer (The American Society Inc, 2002, 2005).

Más adelante, en 1761 Giovanni Morgagni, relacionó por primera vez la enfermedad con los hallazgos patológicos los cuales ayudaron a fundar el estudio del cáncer. Poco después, Perciwal Pott (1775) descubrió que los trabajadores de las chimeneas tenían más riesgo de adquirir cáncer de escroto debido a la acumulación de hollín en dicha localización, ésto llevó al estudio de la exposición ocupacional a carcinógenos (Morton LT *et al*, 1997; The American Society Inc, 2002, 2005).

Un hecho significativo en la historia fue la fundación en 1779 del primer Hospital de Cáncer en la ciudad de Reims, Francia, el cual poco después fue removido del centro de la ciudad por la creencia de que el cáncer era contagioso (Morton LT *et al*, 1997).

A principios del siglo XIX Joseph Claude Reclamer (1829) reconoce por primera vez las metástasis cancerígenas fue y Johannes Müller (1838) sienta las bases para establecer la histología patológica como un brazo independiente de la ciencia, demostrando que el cáncer esta constituido por células (Morton LT *et al*, 1997).

Entre 1863 y 1867, Rudolph Ludwing Karl Virchow escribió por primera vez siete artículos y un trabajo de tres volúmenes sobre tumores malignos (Britanic Online, 2005). Poco tiempo después, Alexander Freund llevó a cabo con éxito la primera histerectomía abdominal en un cáncer de útero (Morton LT *et al*, 1997) mientras que Theodore Billroth en 1881 llevó a cabo la primera resección de cáncer pilórico así como también la primera resección de esófago por cáncer (Castiglioni A *et al*, 1941).

En la década del '90 del siglo XIX, Steven Paget, propuso su teoría del cáncer "semilla y sólido"; analizó varias autopsias de mujeres con cáncer de mama y encontró que el patrón de metástasis no era randomizado. Es así que propuso que la célula tumoral (semilla) tendría una afinidad por ciertos órganos (sólidos), por lo cual la metástasis sería el resultado de la compatibilidad de esa "semilla" con su "sólido" (Pantel K *et al*, 1999; Fidler IJ *et al*, 2002).

En 1890, William Steward Halsted realizó la primera mastectomía radical en el cáncer de mama (Udwablia FE *et al*, 2000). Unos años más tarde, en 1895, Wilhelm Conrad Röntgen descubre los Rayos-X que permitieron la detección de tumores corporales en etapas tempranas y no invasores (Morton LT *et al*, 1997).

A principios del siglo pasado, Theodore Boveri (1914) propuso la teoría de la mutación somática del cáncer que sostenía que el cáncer era causado por cromosomas animales (Udwabia FE *et al*, 2000) mientras que el Premio Nobel de 1926 Johannes Andreas Crib Fibiger fue por su trabajo: “Los nematodos causan cáncer en ratones”; hallazgo que fue pasible de ser reproducido por otros científicos (Raju TNK *et al*, 1998).

En 1946 Louis Goodman estudió al agente químico de la mostaza nitrogenada durante la segunda guerra mundial descubriendo su uso terapéutico en ciertos tipos de cánceres como el linfoma de Hodgkin, linfosarcomas y leucemias. En 1960 Howard Temin propuso la hipótesis del DNA provirus en el cáncer, refiriéndose a que ciertos ARN virus podrían ser capaces de insertarse en el material genético de la célula huésped llevando así al desarrollo de cáncer. En 1976 Harold E. Verms y J. Michel Bishop descubrieron el primer oncogen celular, el src (Marx JC *et al*, 1989), mientras que Stephen H. Friend y colaboradores (1986) aislaron el primer gen supresor de tumores Rb (por retinoblastoma). Este gen también fue el primero en ser asociado con una forma familiar de cáncer.

En 1995 se realiza la primer técnica de DNA microarray para medir la expresión genética en plantas. Esta tecnología se usaría posteriormente para detectar cánceres humanos y caracterizar la sensibilidad de células tumorales a los tratamientos oncológicos (Shenna H *et al*, 1995, Wulfkuhle J *et al*, 2004). En 1999 se logra por primera vez convertir una célula epitelial humana y un fibroblasto en una célula tumoral (Hahn WC *et al*, 1999).

### **El cáncer en nuestro tiempo**

Los cambios demográficos, económicos y ambientales han repercutido en todos los aspectos de nuestra vida, y entre ellos, en la incidencia de enfermedades como el cáncer. La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) ha estimado que en el año 2002 hubo 10,9 millones de casos nuevos de cáncer y 6.723.887 muertes por cáncer en todo el mundo. Estas cifras representan un incremento de 22% en la incidencia y mortalidad por cáncer en comparación con las cifras del año 1990; según la OMS el número de casos se elevaría a 15 millones para el año 2020 (Parkin DM *et al*, 2002).

Las formas más frecuentes de presentación de cáncer también han cambiado en espacio y tiempo. Más de un millón de casos nuevos de cáncer de pulmón, mama, colon y estómago se presentaron al comenzar el siglo XXI; el número de casos nuevos de cáncer de próstata, hepatocarcinoma y de cuello uterino estuvo en o por encima del medio millón; con menor, pero importante frecuencia se presentaron el cáncer de esófago, vejiga, linfoma-leucemia, cáncer de cavidad oral, páncreas, faringe, riñón y otros que totalizaron los 10.862.496 casos de cáncer registrados en el año 2002 en el mundo (Parkin DM *et al*, 2005).

El siglo XXI encuentra al mundo claramente dividido en dos: el mundo desarrollado y el que no ha alcanzado el desarrollo. La Agencia Internacional Contra el Cáncer ha determinado que la mayoría (53%) de casos de cáncer y 60% de las muertes por cáncer ocurrieron en los países del tercer mundo. Más aún se han encontrado marcadas diferencias en la incidencia de las diferentes neoplasias en países pobres y países desarrollados. El cáncer de pulmón, colon, mama y próstata conforman el 60% de todos los casos de cáncer en el mundo desarrollado; en cambio el cáncer de estómago, hepatocarcinoma y cáncer de cuello uterino son tan poco frecuentes que sumados no alcanzan al 10% de los casos de cáncer en los países afluentes.

En el mundo de los pobres, los cánceres de pulmón, estómago, mama, cuello uterino, esófago, colon, cavidad oral y el hepatocarcinoma constituyeron más del 60% de todos los casos ocurridos el año 2002; con menor frecuencia se presentaron el cáncer de la próstata, ovario, vejiga, páncreas, riñón y endometrio (Santisteban AS *et al*, 2006).

## Cáncer colorrectal

### Biología tumoral

#### La secuencia adenoma-carcinoma

Se cree que la mayoría de los cánceres colorrectales (CCR) comienzan en adenomas (pólipos adenomatosos) displásicos.

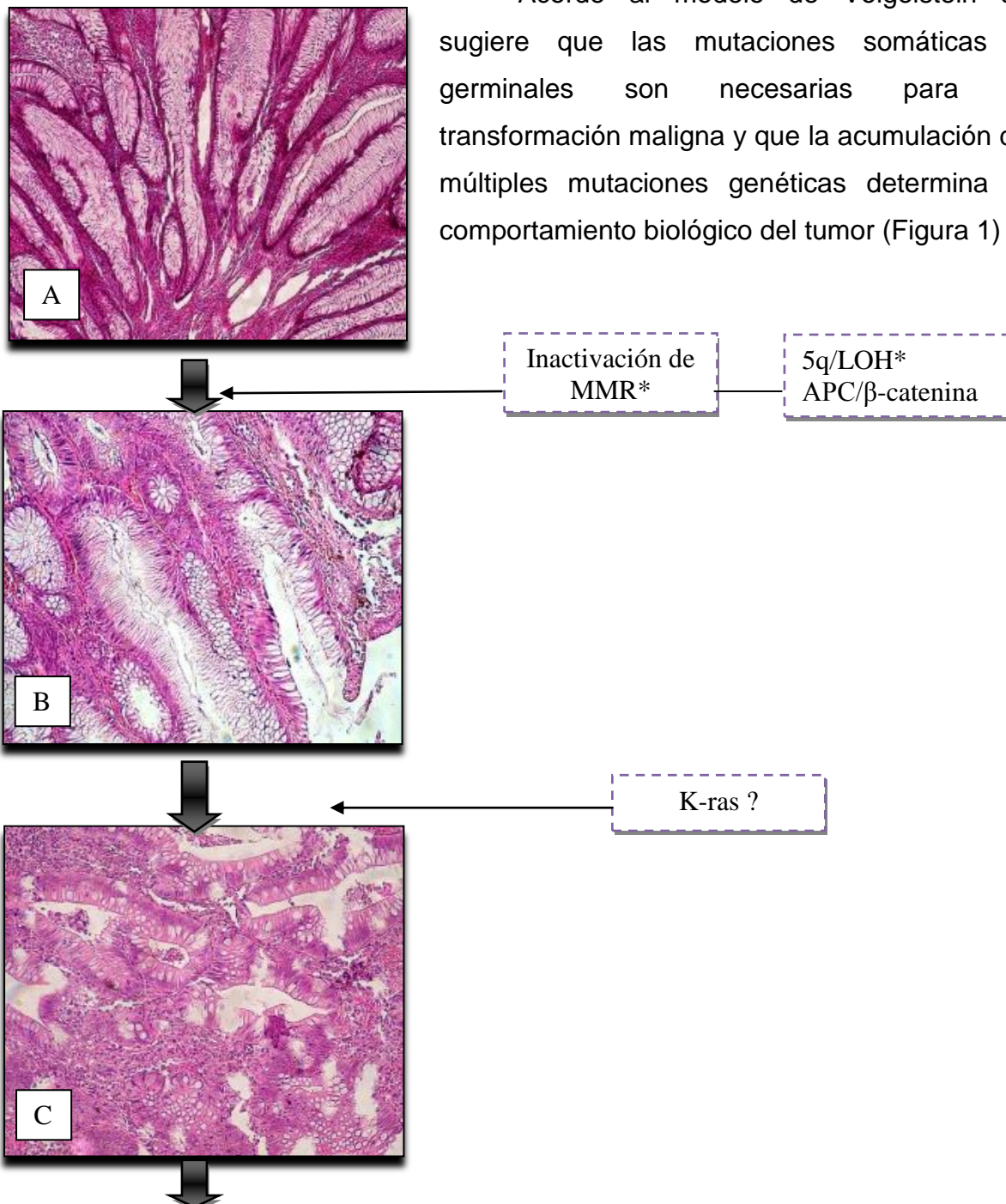
Los pólipos adenomatosos se forman en el colon cuando los mecanismos regulatorios epiteliales de renovación se interrumpen. Las células de la superficie que tapizan el intestino son constantemente perdidas dentro de la luz intestinal debido a apoptosis y exfoliación y deben ser continuamente reemplazadas. Típicamente, la proliferación ocurre exclusivamente en la base de la cripta mientras que la diferenciación celular ocurre a medida que las células se acercan a la superficie. Este proceso ordenado está muy interrumpido en los adenomas, pudiendo resultar en displasia y, eventualmente, progresar al adenocarcinoma e invadir.

La hipótesis de que el CCR invasor se desarrolla de precursores precancerosos intermedios está basada en datos patológicos, epidemiológicos y clínicos. Resumido brevemente, los carcinomas tempranos pueden detectarse frecuentemente dentro de pólipos adenomatosos grandes; estas áreas de cambios adenomatosos también pueden a veces ser encontradas alrededor de los CCR. Los adenomas y los carcinomas se hallan en similar distribución a través del intestino grueso; pero los adenomas se observan típicamente 10-15 años previos al cáncer tanto en el tipo esporádico como en el familiar. Por otro lado, se ha demostrado en estudios controlados que la remoción de los pólipos reduciría la incidencia de CCR (Winawer SJ *et al*, 1993).

**Múltiples pasos en el proceso de carcinogénesis**

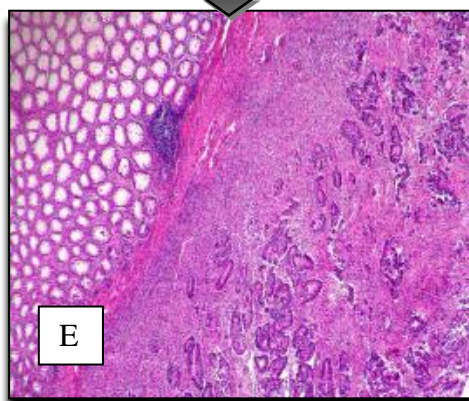
Se cree que los cambios genéticos conducen a la transformación del epitelio colónico normal al cáncer invasor. En 1990, Fearon y Vogelstein describieron la base molecular del CCR como un proceso con múltiples etapas en el cual cada evento genético acumulado confiere una ventaja selectiva de crecimiento en la célula del epitelio colónico. Estudios posteriores han servido para refinar más esta hipótesis.

Acorde al modelo de Vogelstein se sugiere que las mutaciones somáticas o germinales son necesarias para la transformación maligna y que la acumulación de múltiples mutaciones genéticas determina el comportamiento biológico del tumor (Figura 1)





**Figura 1:** Alteraciones somáticas en la carcinogénesis. En las figuras muestran, a 400X, los cortes histológicos coloreados con la técnica hematoxilina-eosina de: A) una mucosa colónica normal, B) un adenoma con displasia leve, C) un adenoma con displasia moderada, D) un adenoma con displasia severa y E) un adenocarcinoma de colon. \*MMR: enzima reparadora del ADN alterado, LOH: pérdida de heterocigocidad; DCC: delección en el gen del cáncer de colon y APC: gen de la poliposis adenomatosa coli.



18q/LOH\*  
(DCC/SMAD4/SMAD2 17q  
LOH)  
P53

**Tumor metastásico**

Las mutaciones en la línea germinal son comunes en los síndromes hereditarios (ej., APC, HNPCC) mientras que los cánceres esporádicos resultan de la acumulación de mutaciones múltiples. La mutación en el gen APC, una característica común tanto en CCR esporádico como en el hereditario, ocurre tempranamente, mientras que el gen supresor de tumores p53 generalmente ocurre tardíamente.

Además de las mutaciones puntuales, existen otros cambios genéticos que están implicados en la tumorigénesis los cuales pueden incluir la alteración de la metilación del DNA, reordenamiento de genes, amplificaciones, sobreexpresión y delecciones. Todos estos cambios (hereditarios o adquiridos) pueden ser agrupados acorde a su secuencia molecular genética; por ejemplo, la inestabilidad

cromosómica (CIN) resulta de “ganancia de función” de mutaciones. Esto puede resultar tanto de la activación de vías que promueven el crecimiento incluyendo oncogenes, o bien, por la disminuida actividad de genes supresores o vías apoptóticas. En todos estos casos hay una ganancia de la actividad funcional. La alteración epigenética tal como la metilación de DNA y la pérdida del imprinting puede dejar silente la expresión de ciertos genes (Das PM *et al*, 2004; Shen L *et al*, 2005).

Se sabe que la inactivación transcripcional causada por la metilación del promotor CpG, de los genes supresores de tumor, puede ser un mecanismo importante de carcinogénesis humana. En el CCR se ha demostrado que un cierto número de genes supresores tales como el *CDKN4A* (el gen p16), el *MGMT* y el *MLH1* pueden ser silenciados por la metilación de los promotores (Ogino S, 2006). Los CCR que tienen una alta frecuencia de metilación de algunos CpG son referidos como tumores CIMP (por CpG Island hyperMethylation Phenotype) (Weisenberger DJ *et al*, 2006). Los CCR CIMP-positivos tendrían un comportamiento clínico, patológico y molecular distinto tales como asociaciones con tumores proximales, ser pacientes de sexo femenino, tumores mucinosos y de pobre diferenciación, poseer inestabilidad microsatélite (MSI), tener una alta mutación BRAF y baja mutación TP53 (Ogino S *et al*, 2006).

También se ha observado que las células con capacidad deficiente en reparación del DNA debido al silenciamiento de genes MMR acumulan errores en el ADN a través del genoma. La “huella” biológica sería la acumulación de anomalías en secuencias correctas de bases nucleotídicas que son reparados docenas a cientos de veces dentro del genoma; estos son llamados microsatélites, y los tumores son descritos como de fenotipo de alta inestabilidad microsatélite (MSI-H).

Las mutaciones en la línea germinal en uno de los genes MMR parece ser el defecto genético subyacente en muchos parientes con HNPCC. Por otra parte, la MSI también es encontrada en aproximadamente 15% de los CCR esporádicos, pero muchos de ellos también son debido a la metilación asociada a CIMP y al silencio transcripcional de *MLH1* (Weisenberger DJ *et al*, 2006).

En el CCR con MSI-H, se ha descrito una alta incidencia de mutaciones somáticas tanto en BRAF como en K-ras (Rajagopalan H, 2002; Domingo E, 2005). Más específicamente, se ha descubierto recientemente que las mutaciones en el



gen BRAF ocurren en los CCR esporádicos con MSI-H los cuales no tendrían mutaciones en el gen Ras (también conocido como K-ras), en cambio los CCR relacionados con HNPCC se presentarían con mutaciones tanto en BRAF como en el gen Ras. Las mutaciones BRAF son particularmente prevalentes en fumadores con CCR esporádico (Samowitz WS *et al*, 2006). Los adenomas serrados, que a veces están asociados con MSI y que además presentan una lesión precursora para CCR esporádico MSI positivos, frecuentemente se comportan activando mutaciones en BRAF.

Una parte de los tumores esporádicos que no exhiben CIN o MSI tienen CIM (MSI-/LOH-) (Goel A *et al*, 2007). Es así que habría al menos tres vías separadas y distintas que llevarían a la tumorigénesis colorrectal: 1) la vía de inestabilidad cromosómica (Fearon ER *et al*, 1990), 2) la vía MSI caracterizada por CIMP, el cual abarca no sólo una condición hereditaria tal como HNPCC sino también una parte de los CCR esporádicos, y 3) la vía de la metilación (MSI-/LOH-).

### Tipos histológicos

A pesar de las diferencias macroscópicas entre los CCR del lado derecho e izquierdo, ambos son similares. La gran mayoría son adenocarcinomas, los cuales además pueden clasificarse según el grado histológico. En la Tabla 1 se muestran los distintos tipos histológicos de CCR.

**Tabla 1:** Clasificación de la OMS de carcinomas de colon y recto.

Carcinoma in situ/ displasia severa
Adenocarcinoma
Adenocarcinoma Mucinoso (coloide) (>50 % mucina)
Carcinoma en anillo de sello (>50 % células en anillo de sello)
Carcinoma células escamosas (epidermoide)
Carcinoma adenoescamoso
Carcinoma a células pequeñas (oat cell)
Carcinoma medular
Carcinoma indiferenciado
Otros (ej., carcinoma papilar)

Aunque ha sido aceptado universalmente que el grado histológico tiene implicancias pronósticas, el mismo está sujeto a la subjetividad del observador (Compton CC *et al*, 2002). La mayoría de los sistemas de estadificación divide a los tumores mediante de grados:

- **Grado 1:** bien diferenciados (glándulas bien formadas)
- **Grado 2:** moderadamente diferenciados (menor presencia de glándulas)
- **Grado 3:** pobremente diferenciados (muy pocas o ninguna glándula con células infiltrando estructuras sólidas en hojas o cordones)
- **Grado 4:** indiferenciados (marcada atipia celular, pleomorfismo y alto índice mitótico)

Muchos trabajos reúnen a los tumores bien diferenciados y moderadamente diferenciados en bajo grado y separan a los pobremente diferenciados e indiferenciados como de alto grado (Greene *et al* F, 2002).

Los tumores que producen gran cantidad de mucinas (más del 50% de la masa tumoral) son clasificados como carcinomas mucinosos; este tipo histológico acontece en el 11-17% de todos los CCR (Minsky BD *et al*, 1990; Green JB *et al*, 1993). Los carcinomas mucinosos se hallan preferentemente en el recto y colon sigmoideo, generalmente cuando son diagnosticados se encuentran en estadios más avanzados (Consorti F *et al*, 2000).

En algunos carcinomas no formadores de glándulas, la mucina intracelular puede ser una característica dominante que desplaza el núcleo celular de su sitio; si la masa tumoral está compuesta por más del 50% por este tipo de células el tumor es clasificado como carcinoma de células en anillo de sello. Este tipo de tumores acontece en el 1-2% de todos los CCR; éstos son una variante agresiva, con una propensión a la diseminación intramural y la carcinomatosis peritoneal (Green JB *et al*, 1993; Nissan A *et al*, 1999; Psathakis D *et al*, 1999).

### **Categorías pronósticas**

El sistema de estadificación TNM del 2002 incorporó elementos de la extensión anatómica del tumor determinados por métodos clínicos y patológicos. Un elevado número de factores pronósticos han sido identificados, algunos de los cuales pueden predecir los resultados y la decisión del tratamiento. Basándose en la observación tumoral, en 1999, el College of American Pathologists (CAP) realizó

una conferencia en factores pronósticos (Prognostic Factors Consensus Conference) para evaluar el rol biológico, genético, molecular y otros factores (Campton CC *et al*, 2000).

Los factores pronósticos fueron agrupados dentro de categorías que reflejan la estrecha relación entre la evidencia publicada que demuestra su valor pronóstico. Fueron definidos así las siguientes categorías:

- **Categoría I:** definitivamente el factor posee un sustento bibliográfico de importancia pronóstica y puede ser usado para el manejo de los pacientes. Ej.: Extensión local del tumor, ganglios regionales, micrometástasis ganglionar, invasión vascular, tumor residual (R1) y CEA plasmático.
- **Categoría IIA:** el factor fue extensamente estudiado clínica y biológicamente, demuestra tener valor pronóstico y/o valor predictivo de respuesta al tratamiento; asimismo, son de suficiente importancia como para ser incluidos en el informe patológico pero su importancia clínica aún no está validada en estudios estadísticos sólidos. Ej.: grado histológico, margen circunferencial (radial) y tumor residual luego del tratamiento neoadyuvante.
- **Categoría IIB:** el factor muestra ser promisorio en múltiples estudios pero los datos son insuficientes para ser incluidos en las dos categorías previas. Ej.: tipo histológico, inestabilidad microsatélite, delación 18q y borde tumoral
- **Categoría III:** no hay suficientes estudios que determinen el valor pronóstico del factor. Ej.: contenido ADN, densidad microvascular, moléculas de la superficie celular [moléculas HLA clase I o II, CA 19-9, CA 72-4, *sialyl Lewis x* o *sialosyl-Tn*, activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) e inhibidor tipo 2 del activador del plasminógeno (PAI-2), glicoproteína-72, glicoproteína-P (producto del gen MDR), mucina MUC1, E-caderina, integrinas, colágeno tipo IV, gelatinasa-B (MMP-9), laminina y tenascina], fibrosis peritumoral y respuesta inflamatoria, diferenciación neuroendocrina focal y actividad proliferativa.
- **Categoría IV:** son factores, bien estudiados y demostrados, que no tienen implicancia pronóstica. Ej.: tamaño tumoral.

## Epidemiología

Si bien no se cuenta en nuestro país con un Registro Nacional de Cáncer, la incidencia de los diferentes tipos de cáncer fue estimada por la Agencia Internacional de Investigaciones en Cáncer (IARC) dependiente de la Organización Mundial de la Salud a partir de los registros de mortalidad del Ministerio de Salud de la Nación. En la publicación Globocan 2000, la IARC estimó que en la Argentina en el año 2000 se produjeron alrededor de 10.300 casos de CCR, ubicándolo en el segundo lugar en incidencia luego del cáncer de mama y delante del cáncer de pulmón. Los últimos datos de mortalidad por diferentes causas en Argentina se hallan publicados en el Anuario 2002 de la Dirección de Estadísticas e Informaciones en salud del Ministerio de Salud de la Nación. En esta publicación, el número de muertes por CCR llegó a 5.700 personas en el año 2002, situándolo en el segundo lugar detrás del cáncer de pulmón y delante del cáncer de mama, próstata y estómago, en ese orden. Ésta cifra permite calcular alrededor de 15 muertes al día por CCR en Argentina.

La edad es el mayor factor de riesgo para el CCR esporádico. Es raro que se diagnostique antes de los 40 años, la incidencia comienza a incrementarse significativamente entre los 40-50 años, y el índice de incidencia aumenta en cada década sucesiva (Eddy DM *et al*, 1990). El riesgo promedio de desarrollar CCR en toda la vida es cerca del 5%, de los que lo desarrollan un 90% ocurre luego de los 50 años. La incidencia es mayor en pacientes con condiciones específicas que predisponen al desarrollo de CCR.

En Estados Unidos, el índice de incidencia declinó significativamente (3%) entre 1998 y 2003, luego de permanecer relativamente estable entre 1992 a 1998. Sin embargo, la incidencia de cáncer de colon ascendente se ha ido incrementando particularmente en mujeres (Howe HL *et al*, 2006). Se han observado tanto en Estados Unidos (Howe HL *et al*, 2006) como en otros países (Stewart RJ *et al*, 1983; Thorn M *et al*, 1998) un gradual cambio hacia cánceres de colon derecho o proximales. Datos obtenidos del National Cancer Database sugieren que la proporción de tumores proximales del ángulo esplénico se ha incrementado de 51 a 55 % para todas las lesiones de colon entre 1988 a 1993 (Jessup JM *et al*, 1996). El incremento en la incidencia es en los tumores primarios cecales (Vukasin AP *et al*, 1990).

Los cambios en la distribución anatómica del CCR puede ser, en parte, relacionado con el mejoramiento en el diagnóstico y tratamiento, y a un aumento en el screening por sigmoidoscopia flexible con remoción de los pólipos adenomatosos en el colon descendente, pero también quizás, debido a un verdadero aumento en la incidencia de cáncer colon cecal y ascendente (Stewart RJ *et al*, 1983; Schub R *et al*, 1986). En concordancia con esta hipótesis, se ha observado una mejoría en la sobrevida a los 5 años para cánceres de colon transverso e izquierdo, pero no para tumores del lado derecho (Kawazuma Y *et al*, 1999)

Globalmente, la incidencia de CCR varía; es alta en América del Norte, Australia y Europa del Norte y Oeste; los países en desarrollo tienen bajos índices, particularmente en Asia y África (Parkin DM *et al*, 1999). Las diferencias geográficas quizás sean atribuibles a la diferencia dietaria y la exposición ambiental que se impone sobre una susceptibilidad determinada genéticamente.

El índice de mortalidad por CCR ha ido declinando progresivamente desde la mitad de la década del '80 en Estados Unidos y en muchos otros países occidentales. Esta mejoría puede ser atribuida, al menos en parte, a la detección de la enfermedad en estadios tempranos, y a los más efectivos tratamientos; en particular, la terapia adyuvante. Estados Unidos tiene uno de los índices más bajos de mortalidad por CCR a pesar de tener una alta incidencia. Los datos recolectados de la Surveillance, Epidemiology, and End Results Reporting (SEER) Program of the United States National Cancer Institute sugieren que el 61% de todos los pacientes con cáncer colorrectal tratados (todos los estadios y sitios combinados) sobreviven a los 5 años (Ries L *et al*, 1998). En contraste, las tasas más bajas de sobrevida a los 5 años se encuentran en China y Europa del Este (32 y 30 % respectivamente) (Parkin DM *et al*, 1999).

### **Factores de Riesgo**

El medio ambiente y los factores genéticos pueden incrementar la probabilidad de desarrollar CCR. El actual conocimiento de la patogenia molecular del CCR (tanto esporádico como familiar) está evolucionando rápidamente. En este sentido, los hallazgos han llevado a la identificación de varios desórdenes genéticos específicos, los cuales están relacionados a una transmisión autosómica

dominante. La poliposis adenomatosa familiar (PAF) y el cáncer colorrectal no-polipósico hereditario (HNPCC) son más frecuentes en familias con síndromes con cáncer de colon, pero juntas estas dos condiciones (PAF y HNPCC) acontecen en menos del 5% de los casos de CCR (Ponz de Leon M *et al*, 1993)

- **Poliposis adenomatosa familiar:** La PAF y sus variantes (Síndrome de Gardner, Turcot y poliposis adenomatosa coli-APC) ocurren en menos del 1% de los pacientes con cáncer colorrectal. En la PAF, los numerosos adenomas aparecen durante la infancia; los síntomas se presentan aproximadamente a los 16 años y en el 90% de los casos no tratados el cáncer de colon se descubre a los 45 años. Una forma atenuada de APC tiene el mismo riesgo alto de cáncer de colon y se presenta a la misma edad pero está caracterizado por menos adenomas (Burt RW *et al*, 1995). Otra variante de APC ocurre en el 6% de la población judía askenazi, la cual se asocia con un 20-30% de riesgo de cáncer de colon sin asociarse a poliposis (Laken SJ *et al*, 1997). Sin embargo, en sí mismo, la PAF no agrega riesgo más allá que el de la historia familiar de primer grado, y es además de limitada utilidad. La PAF es causada por mutaciones en el gen APC (*adenomatous polyposis coli*) el cual está localizado en el cromosoma 5 (Burt RW, 1995).
- **Cáncer colorrectal no polipósico hereditario (HNPCC):** Es un síndrome autosómico dominante, el cual es más común que la PAF, y acontece en aproximadamente 1-5% de todos los adenocarcinomas colónicos. La HNPCC se ha comenzado a denominar como Síndrome de Lynch en honor a Henry Lynch, quien publicó en 1966 por primera vez la historia de 2 familias con predisposición al cáncer de colon, sentando así las bases para la definición de cáncer hereditario. Este está causado por mutaciones en uno de los genes de reparación biológica, hMLH1, hMSH2, hMSH6, y PMS2. El Síndrome de Lynch está primariamente caracterizado por presentarse a edad temprana y predomina en el colon derecho. La media de edad al diagnóstico es de 48 años, pero en algunos pacientes se presenta a los 20 años. Cerca del 70% de la lesiones primarias son proximales o en el ángulo esplénico del colon, y aproximadamente el 10% tendría cáncer sincrónico, es decir simultáneos en dos o más lugares diferentes separados por colon normal, o metacrónico el

cual se produce por el desarrollo de un nuevo tumor en un sitio no anastomótico en al menos 6 meses luego del diagnóstico inicial. Sin embargo, los cánceres extracolónicos son también comunes, incluido el cáncer endometrial, el cual se desarrolla en el 40% de las mujeres que portan el gen en familias afectadas. Otros sitios de alto riesgo de formación neoplásica incluyen ovario, estómago, intestino delgado, sistema hepatobiliar y pelvis renal o uréter.

- **Historia personal o familiar de cáncer esporádico o poliposis adenomatosa:** Estos pacientes tienen un riesgo de desarrollar futuros cánceres de intestino grueso. En pacientes sometidos a resección de un único CCR, los pacientes pueden desarrollar en los próximos 5 años 1,5-3% cáncer metacrónico. Una historia personal de pólipo adenomatoso mayor a 1 cm y de pólipos con histología tubulovillosa o villosa también tienen incrementado el riesgo de CCR, particularmente si son múltiples (Atkin WS *et al*, 1992). El Riesgo Relativo (RR) de estos pacientes es de 3,5-6,5%. Por otro lado, los pacientes con tumores menores a 1cm con adenoma tubular no tienen incrementado el riesgo (Atkin WS *et al*, 1992). La historia familiar también es un importante factor de riesgo de enfermedad esporádica; con un único primer grado (padre, hermano o hijo) el riesgo aumenta 1,7 veces respecto a la población general. El riesgo se ve además aumentado en caso de que hubiera familiares de primer grado con cáncer de colon o si el primer caso (índice) sea diagnosticado antes de los 55 años. Una historia familiar de pólipos grandes (>1cm) o adenomas colónicos de alto grado histológico es probable que tengan el mismo significado que una historia familiar con cáncer colorrectal (Winawer SJ *et al*, 1996).
- **Enfermedad inflamatoria intestinal:** La asociación entre colitis ulcerosa (CU) crónica y neoplasia colónica está bien documentada. La pancolitis confiere un aumento del riesgo de CCR 5-15 veces mayor que la incidencia esperada en la población general; el RR de la enfermedad en el lado izquierdo es 3 veces más elevado que en el lado derecho. En comparación, el riesgo no parece incrementarse significativamente en la proctitis sola (Ekbohm A *et al*, 1990). La incidencia estimada de cáncer de colon es del 0,5% por año para pacientes con

una duración de 10-20 años de la enfermedad; luego, el riesgo aumenta a 1% por año. Muchos trabajos científicos sugieren que la co-ocurrencia de colitis ulcerosa y colangitis esclerosante primaria identificada en un subgrupo de pacientes tendrían mayor riesgo (D'Haens GR *et al*, 1993; Brentnall TA *et al*, 1996). El riesgo de cáncer de colon comienza cerca de los 8-10 años del diagnóstico inicial de la pancolitis y 15-20 años de la colitis limitada al colon izquierdo. La probabilidad de desarrollar cáncer se incrementa con la duración, en la cuarta década más del 30% de los pacientes con pancolitis desarrollan cáncer de colon (Ekbohm A *et al*, 1990). Aunque hay mucha menos información respecto a la pancolitis causada por la Enfermedad de Crohn, el riesgo relativo de malignidad colónica es similar a la CU extensa (Guillen CD *et al*, 1994). La inflamación sistémica por sí misma puede ser un factor de riesgo para cáncer de colon, se ha observado en pacientes tratados crónicamente con anti-inflamatorios no esteroideos un descenso de la incidencia de este tipo de cánceres. Por otra parte, en un estudio caso-control, se encontró que los pacientes con niveles elevados de proteína C se asociarían con un aumento del riesgo de cáncer colorrectal entre los pacientes con "riesgo medio" (Erlinger TP *et al*, 2004). Sin embargo esta relación no ha sido demostrada por otros investigadores (Zhang SM *et al*, 2005).

- **Diabetes mellitus (DBT) e insulino resistencia:** Gran cantidad de evidencia sugiere que la DBT está asociada con un aumento del riesgo de cáncer colorrectal (Nilsen TI *et al*, 2001; Yamagishi S *et al*, 2005). Un meta-análisis de 15 estudios (seis casos control y nueve cohortes) el cual incluyó un total de 2.593.935 participantes estimó un riesgo de CCR entre los diabéticos del 30% respecto a los no-diabéticos (RR 1.30, 95% CI 1.20-1.40) (Larsson SC *et al*, 2005). Una posible explicación de la relación entre DBT y CCR sería la hiperinsulinemia. La insulina es un factor de crecimiento importante tanto para las células de la mucosa colónica como para las células colónicas tumorales (Watkins LF *et al*, 1990; Giovannucci E *et al*, 1995). En una cohorte de 14.960 hombres en seguimiento prospectivo también observó que la concentración sanguínea del factor de crecimiento similar insulina (IGF-I) y el IGF unida a proteína-3 (IGFBP-3) influyen en el riesgo de cáncer colorrectal (Ma J *et al*, 1999). Una relación similar fue hallada entre los niveles de péptido-C (un



indicador de la producción de insulina) y el riesgo de CCR en una cohorte de individuos seguidos en el Physicians Health Study, independientemente de los niveles de IGF-I o IGFBP-3 (Ma J *et al*, 2004).

- **Colecistectomía:** En algunos trabajos científicos se ha descrito la existencia de una relación entre la colecistectomía y el cáncer de colon derecho; tal es el caso de un estudio de 278.460 pacientes seguidos por más de 33 años luego de la cirugía. Los pacientes que habían sido sometidos a colecistectomía tenían un mayor riesgo de cáncer de colon derecho (HR 1.16) pero no de colon izquierdo (Lagergren J *et al*, 2001). Varios meta-análisis han confirmado esta asociación con el cáncer de colon proximal (Mercer PM *et al* 1995; Todoroki I *et al*, 1999).
- **Alcohol:** Se ha observado una asociación entre el consumo de alcohol y el aumento de riesgo de CCR en varios estudios (Longnecker MP *et al*, 1990; Ye W *et al*, 2003). En ocho estudios de cohorte se estimó que el riesgo fue modestamente incrementado, particularmente en aquellos que consumen más de 45 g/d (RR ajustado 1.41, 95% CI 1.16-1.72) (Harnack L *et al*, 2002). El riesgo puede estar relacionado tanto con la interferencia de la absorción de folatos por el alcohol como por la disminución de la ingesta de los mismos (Giovannucci E *et al*, 1995; Harnack L *et al*, 2002).
- **Obesidad:** Dos grandes estudios prospectivos de cohorte han mostrado que la obesidad confiere un aumento del riesgo de desarrollar CCR en 1,5 veces respecto a la población con peso normal (índice de masa corporal 18,5 a 24,9 kg/m<sup>2</sup>) (Giovannucci E *et al*, 1995; Martinez ME *et al*, 1996). Además, se ha observado que la obesidad también incrementa la probabilidad de morir por CCR (Calle EE *et al*, 2003; Dignam JJ *et al*, 2006).
- **Otros factores de riesgo:** En el CCR se describen otros factores de riesgo tales como:
  - La presencia de enfermedad coronaria ha sido asociada a un aumento del riesgo de CCR y adenomas de alto grado (Chan AO *et al*, 2007).

- El hábito tabáquico ha sido asociado con una mayor incidencia (Sturmer T *et al*, 2000) y mortalidad por CCR (Chao A *et al*, 2000; Colangelo LA *et al*, 2004). También se lo ha asociado con un aumento del riesgo de pólipos adenomatosos, particularmente los grandes y con características displásicas (Botteri E *et al*, 2008).
- Los pacientes con irradiación previa, con una latencia de 5-10 años, parecen tener mayor riesgo de CCR (Sandler RS *et al*, 1983).
- Los pacientes acromegálicos tienen incrementado el riesgo de adenomas colónicos (22%) y de cánceres gastrointestinales (Delhougne B *et al*, 1995; Fukuda I *et al*, 2001).
- La relación entre la mutación del gen BRCA asociada con el cáncer de mama y el cáncer de colon es poco clara, algunos estudios derivados de la Breast Cancer Linkage Consortium han informado sobre un aumento de 2 veces el riesgo cáncer de colon para las portadoras del gen BRCA1 mutado (Brose MS *et al*, 2002; Thompson D *et al*, 2002). Otras series de publicaciones no han confirmado tal asociación (Niell BL *et al*, 2004; Kirchoff T *et al*, 2004).

### **Manifestaciones clínicas**

La mayoría de los pacientes que presentan CCR tienen dolor abdominal (44%), hematoquecía o melena (40%), cambios en el hábito evacuatorio (43%), debilidad (20%), anemia sin otros síntomas gastrointestinales (11%) y pérdida de peso (6%) (Steinberg SM *et al*, 1986; Speights VO *et al*, 1991). La presencia de síntomas parece tener alguna importancia pronóstica ya que los pacientes que son sintomáticos al momento del diagnóstico tienen un mal pronóstico (Copeland EM *et al*, 1968; Beahrs OH *et al*, 1971). En un único informe, el índice de supervivencia a los 5 años para pacientes sintomáticos y asintomáticos fue 49 y 71% respectivamente (Beahrs OH *et al*, 1971). Un dato importante es que los síntomas parecen estar inversamente relacionados con la supervivencia en el cáncer de colon, pero no para el cáncer de recto (Polissar L *et al*, 1981). Sin embargo, sorprendentemente la duración de los síntomas no está relacionada con el pronóstico. La obstrucción intestinal y/o perforación, aunque poco comunes, están asociadas a mal pronóstico, independientemente del estadio (Steinberg SM *et al*, 1986; Griffin MR *et al*, 1987;

Crucitti F *et al*, 1991). Los tumores que se presentan con hemorragia tienen mejor pronóstico debido a la tendencia de ser diagnosticados más tempranamente (Wolmark M *et al*, 1983; Chapuis PH *et al*, 1985).

### **Localización del cáncer colorrectal**

La localización del tumor primario también puede tener un significado pronóstico. Para cada estadio, los cánceres que se presentan por arriba o debajo de la reflexión peritoneal (rectosigmoide y recto) tienen un peor índice de supervivencia a los 5 años que aquellos que se presentan más proximalmente (Wolmark M *et al*, 1983; Halvorsen TB *et al*, 1990). Además, dentro del recto los cánceres distales tienen peor pronóstico que las lesiones más proximales.

### **Enfermedad metastásica**

Aproximadamente el 20% de los pacientes tienen enfermedad metastásica distante al momento de la presentación (Jemal A *et al*, 2008). Las células del CCR pueden diseminarse vía linfática y/o hematológica, así como también por contigüidad o transperitoneal. La mayoría de los sitios metastásicos corresponden a los ganglios linfáticos regionales, el hígado, pulmón y peritoneo.

Debido a que el drenaje venoso del tracto intestinal se realiza por el sistema porta linfático, el primer sitio de diseminación hematológica sería el hígado, seguido del pulmón, hueso y muchos otros sitios incluido el cerebro. Sin embargo, los tumores que se desarrollan en el recto distal pueden metastatizar inicialmente al pulmón debido a que el drenaje venoso del recto inferior drena a la vena cava inferior en vez de a la vena porta.

### **Estadificación**

Dos sistemas de estadificación han sido usados para definir la extensión de la enfermedad al momento del diagnóstico, la estadificación de sistema TNM (Tabla 2) de la American Joint Committee on Cancer (AJCC) y la clasificación Dukes (Tabla 3).

La clasificación de Dukes (1932) fue originalmente desarrollada para el cáncer colorrectal y luego modificada (Tabla 3) por Astler-Coller (1954) para proveer un método organizado para clasificar la extensión de la enfermedad y planear un tratamiento, estimar el pronóstico y medir los resultados del tratamiento.

Subsecuentemente, la American Joint Committee on Cancer (AJCC) desarrolló el sistema TNM, que en su más reciente versión del 2002 (Cancer Staging Manual, 6th ed, Greene, FL, Page, DL, Fleming, ID, et al. Springer-Verlag, New York, 2002. p.114), divide al Estadío III en categorías pronósticas diferentes: A, B y C, dependiendo de la profundidad de invasión del tumor primario y del número de ganglios linfáticos involucrados. Actualmente, es ésta la estadificación más utilizada para el CCR.

**Tabla 2:** Estadificación TNM para CCR.

Tumor primario (T)*	
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ; intraepitelial (dentro de la membrana basal glandular) o invasión de la lamina propia (intramucosa)
<b>T1</b>	Tumor que invade submucosa
<b>T2</b>	Tumor que invade la muscular
<b>T3</b>	Tumor que invade a través de la muscular dentro de la subserosa o dentro del tejido pericólico no peritonizado o perirrectal
<b>T4</b>	Tumor que invade directamente otros órganos y estructuras, y/o perfora el peritoneo visceral <sup>&amp;</sup>
Ganglios linfáticos regionales (N) <sup>#</sup>	
<b>Nx</b>	Ganglios regionales no pueden ser evaluados
<b>N0</b>	Ningún ganglio regional metastásico
<b>N1</b>	Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales
<b>N2</b>	Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales
Metástasis a distancia (M)	
<b>Mx</b>	Metástasis a distancia que no puede ser evaluada
<b>M0</b>	Ninguna metástasis a distancia
<b>M1</b>	Metástasis a distancia

\*La completa resección del tumor primario debería tener reflejado por designación el estado del margen radial (la superficie adyacente quirúrgicamente disecada en el punto más profundo de la invasión tumoral más allá de la pared del intestino grueso).

R0: completa resección, con todos los márgenes negativos.

R1: incompleta resección tumoral con márgenes microscópicamente comprometidos.

R2: incompleta resección con gran tumor residual que no fue resecado.

<sup>&</sup>La invasión directa en T4 incluye invasión de otros segmentos del colon por la vía serosa. El tumor que está adherido a otros órganos o estructuras macroscópicamente es clasificado como T4; sin embargo, si no hay tumor en la adhesión debería ser clasificado como pT3.

La sub-estadificación V y L debería ser usada para denotar la presencia o ausencia de invasión vascular o linfática, respectivamente.

<sup>#</sup>Un nódulo tumoral en el tejido adiposo pericorrecal en presencia de un carcinoma primario, sin evidencia histológica que corresponda a un ganglio linfático residual, debería ser clasificado como un ganglio regional metastásico si el nódulo tiene la forma y contorno suave de un ganglio linfático mientras que si tiene un contorno irregular éste debería ser clasificado en la categoría T y también codificada como V1 (invasión venosa microscópica) o V2 (si este fue groseramente evidente) debido a la gran probabilidad de que éste represente una invasión venosa tumoral.

**Tabla 3:** Estadificación comparativa del CCR por la AJCC (v.2002), la modificada por Aster-Coller y la de Duke.

Sistema de estadificación del cáncer colorrectal por la AJCC, la modificada por Astler-Coller (MAC) y la clasificación de Duke.					
	TNM			MAC*	Duke's
<b>Estadío 0</b>	Tis	N0	M0	-	-
<b>Estadío I</b>	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	B1	A
<b>Estadío IIA</b>	T3	N0	M0	B2	B
<b>IIB</b>	T4	N0	M0	B3	B
<b>Estadío IIIA</b>	T1-2	N1	M0	C1	C
<b>IIIB</b>	T3-4	N1	M0	C2/3	C
<b>IIIC</b>	Cualquier T	N2	M0	C1/2/3	C
<b>Estadío IV</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1	D	D

\*MAC: modified Astler-Coller (MAC)

**A:** El tumor esta limitado a la mucosa y submucosa, no involucra ganglios linfáticos

**B1:** Hay invasión de la muscularis propia, no involucra ganglios linfáticos.

**B2:** Hay invasión de la serosa, no involucra ganglios linfáticos.

**B3:** Hay invasión fuera de la pared con adherencia o invasión de órganos o estructuras adyacentes, no involucra ganglios linfáticos.

**C1:** La misma penetración que B1 pero con metástasis en ganglios linfáticos.

**C2:** La misma penetración que B2 pero con metástasis en ganglios linfáticos.

**C3:** La misma penetración que B3 pero con metástasis en ganglios linfáticos.

**D:** metástasis a distancia.

### **Marcadores tumorales**

El CCR ha sido asociado con diferentes marcadores tumorales tales como el antígeno carcinoembrionario (CEA) y antígeno carbohidrato *sialil Lewis a* (CA 19-9). Sin embargo, debido a que estos marcadores también se detectan en enfermedades benignas no son útiles para diagnosticar CCR, especialmente en la enfermedad temprana (van der Schouw YT *et al*, 1992; Macdonald JS *et al*, 1999). El CEA puede estar aumentado en diversas patologías tales como la gastritis, úlcera péptica, diverticulitis, enfermedad hepática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, DBT y cualquier estado inflamatorio agudo o crónico (Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Adopted on May 17, 1996 by the American Society of Clinical Oncology. J Clin Oncol, 1996).

Un panel de expertos en marcadores tumorales en cáncer de mama y colorrectal reunidos en la American Society of Clinical Oncology (ASCO) ha recomendado que los niveles tanto de CEA como de CA19-9 no deben ser usados como test de screening para CCR (Locker GY *et al*, 2006). Una recomendación similar ha sido hecha por el European Group on Tumor Markers (Duffy MJ *et al*, 2003).

Sin embargo, los niveles sanguíneos de CEA sí tienen utilidad pronóstica en pacientes con nuevo diagnóstico de CCR. Los pacientes con niveles preoperatorios de CEA mayores a 5 ng/ml tienen peor pronóstico en cualquier estadio respecto de aquellos con niveles bajos. Además, los niveles pre-operatorios elevados que no se normalizan luego de la cirugía implican la presencia de enfermedad residual y la necesidad de otra evaluación. Las guías de ASCO han recomendado que los niveles de CEA sean obtenidos pre-operatoriamente en pacientes con cáncer colorrectal confirmado histológicamente. Dichos datos deberían agregarse al estadio, planificación del tratamiento quirúrgico y servir para el asesoramiento del pronóstico (Locker GY *et al*, 2006).

### **Pronóstico**

Debido al gran número de estudios correlativos que exploraron el significado pronóstico de varias características histológicas, moleculares y clínicas, la

estadificación patológica al momento del diagnóstico sería el mejor indicador de pronóstico a largo plazo tanto para el cáncer de colon como el de recto. Las características más importantes son la presencia de metástasis a distancia, la extensión de cáncer local, la positividad ganglionar (particularmente el número de ganglios linfáticos involucrados) y la enfermedad residual.

El índice de sobrevida a los 5 años en una serie de 119.000 pacientes con cáncer de colon tratados entre 1991 y 2000, clasificados con la más reciente estadificación TNM, fueron los siguientes (O'Connell JB *et al*, 2004):

- estadio I ( $T_{1/2}N_0$ ): 93 %
- estadio IIA ( $T_3N_0$ ): 85 %
- estadio IIB ( $T_4N_0$ ): 72 %
- estadio IIIA ( $T_{1/2}N_1$ ): 83 %
- estadio IIIB ( $T_{3/4}N_1$ ): 64 %
- estadio IIIC ( $_{\text{cualquier}}TN_2$ ): 44 %
- estadio IV ( $_{\text{cualquier}}T_{\text{cualquier}}NM_1$ ): 8 %

Los índices de sobrevida en pacientes con estadio II son variables y dependen del número de ganglios linfáticos analizados (Swanson RS *et al*, 2003).

Para el cáncer rectal los índices de sobrevida a los 5 años tienden a ser un poco más bajos (Jessup JM *et al*, 1998; Gunderson LL *et al*, 2004). En particular, la sobrevida de los pacientes con estadio III además de depender de la extensión de los

**Tabla 4:** Sobrevida global (SG) a los 5 años según el estadio T y N.

Estadio T	Estadio N	Nº ptes (%)	SG
$T_{1/2}$	$N_1$	355	79
	$N_2$	226	67
$T_3$	$N_0$	1060	75
	$N_1$	887	60
	$N_2$	935	44
$T_4$	$N_0$	111	65
	$N_1$	62	35
	$N_2$	108	37

ganglios linfáticos también depende del estadio T (Tabla 4); por ejemplo, cuando los datos del National Cancer Database fueron clasificados acorde al subgrupo del estadio III, los índices de sobrevida a los 5 años fueron (Greene FL *et al*, 2004):

- estadio IIIA ( $T_{1/2}N_1$ ): 55.1 % (n=1043 pacientes)
- estadio IIIB ( $T_{3/4}N_1$ ): 35.3 % (n=2856 pacientes)
- estadio IIIC ( $_{\text{Cualquier}}TN_2$ ): 24.5 % (n=2088 pacientes)

Resultados similares se obtuvieron de 5 estudios randomizados con tratamiento adyuvante llevados a cabo por United States Cooperative Groups (Gunderson LL *et al*, 2004).

El sistema TNM del 2002 reflejó la correlación entre los subgrupos del estadio III con el pronóstico de la enfermedad obteniéndose así tres categorías: A, B y C. Estos resultados fueron estimados a partir de estudios en los cuales la resección quirúrgica no fue precedida de terapia neoadyuvante.

### **Tratamientos quimioterápicos adyuvantes**

La resección quirúrgica es el único tratamiento curativo para la enfermedad locorregional. Se piensa que la recurrencia en los pacientes que se someten a una resección potencialmente curativa es debida a micrometástasis clínicamente ocultas presentes en el momento de la cirugía. El objetivo del tratamiento post-operatorio (adyuvante) es erradicar estas micrometástasis, y así aumentar el índice de curación.

Los primeros estudios de monoterapia con 5-Fluorouracilo (5-FU) fallaron en demostrar un beneficio en la sobrevida en relación con la resección quirúrgica como único tratamiento (Buyse M *et al*, 1988). El interés por la quimioterapia adyuvante resurgió a fines de la década del '80 cuando algunos estudios sugirieron un beneficio de los regímenes combinados con 5-FU (Wolmark N *et al*, 1988, Wolmark N *et al*, 2000), y por el descubrimiento de moduladores de la actividad del 5-FU tales como la leucovorina (LV) y levamisole (LVM), un agente inmunomodulador (Grem JL *et al*, 1989).

El primer estudio a gran escala que demostró beneficio en la sobrevida con adyuvancia en el cáncer de colon fue el National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) C-01, en el que se randomizó a 1166 pacientes con cáncer de colon estadio II y III a recibir cirugía exclusivamente, inmunoterapia no específica con BCG (Bacillus Calmette-Guérin) o quimioterapia MOF (Vincristina, Semustina y 5-FU) (Wolmark N *et al*, 1988). MOF fue asociada con un beneficio significativo en la sobrevida a los 5 años comparados con la cirugía como único tratamiento o BCG; este beneficio no se prolongó más allá de los 8-10 años de sobrevida (Smith RE *et al*, 2004). Estudios sucesivos demostraron la inferioridad



del 5-FU/LVM comparado con 5-FU/LV (Wolmark N *et al*, 1999; Porschen R *et al*, 2001).

La quimioterapia adyuvante ha demostrado en primera instancia beneficio sobre la cirugía exclusiva, luego se demostró la superioridad del esquema 5-FU/LV respecto al esquema MOF (Wolmark N *et al*, 1993) y más recientemente se comprobó que el agregado de Oxaliplatino al esquema 5-FU/LV (ej. el régimen FOLFOX el consta de Oxaliplatino + 5-FU/LV con una corta administración de 5-FU en infusión continua acorde al régimen de “de Gramont”) es más beneficioso aún.

### Tratamiento del CCR en estadio II

Los beneficios de un tratamiento adyuvante han sido claramente demostrados en pacientes con enfermedad metastásica en ganglios. En contraste, el valor de este tratamiento en cáncer de colon estadio II permanece controvertido debido a los resultados contradictorios obtenidos a partir de:

- **Estudios randomizados con población combinada:** Muchos estudios han seleccionado pacientes con estadio II y III; estos análisis demostraron que existen beneficios en la sobrevida global (SG) y el tiempo libre de enfermedad (TLE) con la adyuvancia con 5-FU u Oxaliplatino respecto a la cirugía exclusiva (Wolmark N *et al*, 1988; Laurie JA *et al*, 1989; Francini G *et al*, 1994; IMPACT 1995; Zaniboni A *et al*, 1998; O'Connell MJ *et al*, 1997; Andre T *et al*, 2004). Sin embargo, en muchos casos, los beneficios fueron estadísticamente significativos sólo para aquellos pacientes con estadios III de la enfermedad. La posibilidad de que exista un beneficio en el tratamiento adyuvante en estadio II fue sugerida por los siguientes estudios:

- **El estudio Dutch:** realizado en 1.029 pacientes con resección cáncer de colon o rectal estadio II (n=468) o estadio III (n=561) asignó un año de tratamiento con 5-FU/LVM y lo comparó con ningún tratamiento quimioterápico (Taal BG *et al*, 2001). La quimioterapia fue asociada con una mejoría significativa en la SG a los 4 años tanto para estadio III (56 versus 44%) como para el estadio II (78 versus 70%).
- **Análisis Intergroup:** incluyó una base de datos de 3.302 pacientes con estadio II y III de cáncer de colon quienes fueron randomizados para comparar

5-FU/LV o LVM con cirugía exclusiva (Gill S *et al*, 2004). En el análisis multivariado ajustado para los tres mayores factores pronóstico (estadío pT, grado histológico y estadío pN), la quimioterapia adyuvante fue asociada con una reducción relativa del 30% en el riesgo de recurrencia y un 26% en la reducción del riesgo de muerte en general. El efecto del tratamiento fue claro en ambos estadíos; para los pacientes con ganglios negativos, el beneficio se observó en una mejoría del TLE (76 versus 72 %) mientras que sólo se observó una tendencia en la SG a los 5 años (81 versus 76%).

- **Análisis Ontario Group:** En el 2004 el Cancer Care Ontario Practice Guideline Initiative realizó una revisión sistemática de la terapia sistémica adyuvante para el estadío II. Se incluyeron 37 estudios y 11 meta-análisis y un total de 1016 pacientes; se comparó 5-FU/LVM versus ningún tratamiento. Figueredo y colaboradores (2004) concluyeron que la terapia adyuvante está asociada con beneficio en el TLE pero éste sería mínimo y no necesariamente se asociado a un mejoramiento de la SG.
- En un cuestionario de la **American Society of Clinical Oncology (ASCO)**, se realizó un meta-análisis separado en un subgrupo de 12 estudios (4.187 pacientes) en el cual una rama del estudio consistía en cirugía exclusivamente y la otra con al menos un régimen con 5-FU. En este caso la quimioterapia fue asociada con un pequeño pero significativo mejoramiento del TLE (5-10%), pero esto no se trasladó en una diferencia significativa en la SG (riesgo relativo 0.87, 95% CI 0.75 a 1.10,  $p = 0.07$ ).
- **Revisión de la base de datos SEER:** similares conclusiones fueron encontradas en un análisis de datos de la Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) de pacientes con estadío II de cáncer de colon basado en si recibieron o no quimioterapia adyuvante (Schrag D *et al*, 2002). Se concluyó en este meta-análisis que no hubo tendencia significativa en mejoría de la SG que favorezca a la quimioterapia (a los 5 años la SG fue del 78% versus 75 %, HR 0.91, 95% CI 0.77 a 1.09).
- **Estudios randomizados sólo con pacientes con estadío II:** Se realizaron los siguientes estudios en este grupo de pacientes:
  - **QUASAR:** en este estudio se randomizaron 3.238 pacientes (91% estadío II) con cáncer de colon (71%) y cáncer de recto (29%), sometidos a cirugía, a

recibir 5-FU/LV con o sin LVM o ningún tratamiento quimioterápico (Moore HC *et al*, 1999; Quasar Collaborative Group, 2007). La media de seguimiento fue 5.5 años. La adyuvancia fue asociada con un riesgo significativamente menor de recurrencia (HR 0.78, 95% CI 0.67-0.91) y muerte (HR 0.82, 95% CI 0.70-10.95), la cual significó sólo un 3-4% de beneficio absoluto en la SG a los 5 años.

- **IMPACT B2:** constituyó en el análisis de una base de datos de 1.016 pacientes con estadio IIA ( $T_3N_0$ ) en el cual se comparó la observación versus quimioterapia con 5-FU/LV; el mismo no encontró diferencias estadísticamente significativas (76% versus 73%) en el TLE, mientras que la SG a los 5 años se mantuvo sin cambios (82% versus 80%).
- **INT-0035:** este estudio incluyó 318 pacientes con enfermedad reseca estadio IIA ( $T_3N_0$ ), los cuales fueron agrupados en pacientes con tratamiento quimioterápico con 5FU/LVM versus observación. Este estudio también falló en demostrar ventajas del tratamiento adyuvante.
- **Estudio australiano:** incluyó 500 pacientes con estadio IIA/B ( $T_{3/4}N_0$ ) los que fueron randomizados a recibir tratamiento con 5-FU/LV versus observación. Este estudio también falló en demostrar algún beneficio en términos SG o TLE.

En conjunto, los estudios anteriores sugieren que la magnitud del beneficio del tratamiento adyuvante para los pacientes con estadio II es pequeña, pero también se puede observar que el beneficio relativo en la respuesta a la quimioterapia basada en 5-FU (medido como riesgo relativo o absoluto) es similar en los estadios II y III. Esto sugiere que el beneficio de la quimioterapia puede ser independiente del riesgo absoluto de recurrencia. Este hecho ha impulsado los esfuerzos para utilizar factores pronóstico clinicopatológicos y moleculares con el fin de seleccionar grupos de pacientes con alto riesgo de enfermedad en estadio II, los cuales podrían beneficiarse con el tratamiento adyuvante. Entre los pacientes con estadio II con características clinicopatológicas que están asociadas con mal pronóstico se incluyeron:

- estadio pT4 (O'Connell JB *et al*, 2004),
- tumores histológicamente pobremente diferenciados (incluidos los tumores en anillo de sello y mucinosos) (Gill S *et al*, 2004),

- invasión linfovascular peritumoral (LVI) (Michelassi F *et al*, 1991; Sternberg A *et al*, 1999),
- obstrucción intestinal o perforación (Chen HS *et al*, 2000; Faivre-Finn C *et al*, 2002; Petersen VC *et al*, 2002),
- margen estrecho, indeterminado o positivo, inadecuada muestra ganglionar (<13 ganglios en el espécimen quirúrgico) (Chang GJ *et al*, 2007),
- altos niveles sanguíneos de CEA (>5 ng/dl) pre-operatorios.

Sin embargo, la magnitud del riesgo que confieren estas características relativas al estado ganglionar (particularmente la contribución independiente de la perforación u obstrucción) es difícil de estimar mediante la bibliografía. En base a esto, en el año 2000, el College of American Pathologists realizó un consenso y reconoció que el estadio pT<sub>4</sub>, el estado ganglionar, LVI, altos niveles sanguíneos pre-operatorios de CEA y el tumor residual pertenecen a la *categoría I* de factores pronóstico (ver página 14) (Compton CC *et al*, 2000).

Asimismo, hay poca evidencia que indique que los pacientes con cualquiera de estas características de alto riesgo tengan probablemente un mayor beneficio con quimioterapia que aquellos sin las mismas. Se han realizado pocos estudios respecto al beneficio en este subgrupo de pacientes con estadio II. La NCCTG fue el único análisis en el que se estudió la quimioterapia adyuvante basada en 5-FU en pacientes con estadio II con alto riesgo, dentro de un análisis que incluyó también pacientes con estadio III (O'Connell MJ *et al*, 1997). Aunque se observó un claro beneficio con la quimioterapia adyuvante en la población combinada (estadio II y III), los resultados no fueron clasificados acorde al estadio de la enfermedad inicial. El estudio MOSAIC (el cual comparó FOLFOX versus cirugía exclusiva) fue el único en el que se encontró una tendencia en la mejoría con FOLFOX (82 versus 75%, HR 0.74), pero al trasladarse el análisis al subgrupo de pacientes con estadio II con tumores de alto riesgo no se encontró beneficio en la SG (de Gramont A *et al*, 2007).

En el análisis realizado por el US Intergroup, los pacientes con ganglios negativos con tumores estadio pT<sub>4</sub> no tuvieron resultados significativamente mejores con quimioterapia adyuvante o cirugía exclusiva (la SG a los 5 años fue 72 versus 69%) (Gill S *et al*, 2004). En este estudio no se evaluó el impacto de la

obstrucción, el nivel de CEA pre-operatorio o el número total de ganglios analizados.

A pesar de todos estos estudios, no hay suficientes datos directos de investigaciones controladas randomizadas que sustenten un beneficio de la quimioterapia adyuvante en pacientes con cualquiera de estas características de alto riesgo.

Un panel de expertos reunidos por ASCO (Benson AB *et al*, 2004) y la NCCN (National Comprehensive Cancer Network Guidelines on Treatment of Colon Cancer) elaboró guías de consenso respecto a este tema. Esta guía sugiere que la terapia adyuvante debe ser discutida con aquel paciente que tenga inadecuada muestra ganglionar (<13 ganglios), estadio pT<sub>4</sub>, perforación intestinal al momento del diagnóstico, LVI, tumor histológicamente pobremente diferenciado con invasión neural (sólo ASCO) u obstrucción al momento de la presentación (sólo NCCN).

### **Tratamiento del CCR en estadio III**

El beneficio de la quimioterapia adyuvante, aproximadamente 30% de reducción del riesgo de recurrencia de la enfermedad y un 22-32% de reducción en la mortalidad, ha sido demostrado claramente en el estadio III.

La recomendación es un curso de seis meses de FOLFOX, 5-FU/LV ó de Capecitabina monoterapia en pacientes quienes probablemente no toleren el Oxaliplatino (Grado de evidencia IA).

Para pacientes que tengan una contraindicación de Oxaliplatino (por ejemplo: neuropatía pre-existente), una opción aceptable es un curso de 6 a 8 meses de 5-FU/LV. Un régimen ampliamente aceptado es el de Roswell Park, el cual consiste en la administración semanal de 5-FU (500 mg/m<sup>2</sup>) + altas dosis de LV (500 mg/m<sup>2</sup>) por 6 a 8 semanas por un total de 4 ciclos (Heller DG *et al*, 2005). Otra opción es el régimen de Gramont: LV 200mg/m<sup>2</sup> administrado en 2 hs seguido por 5-FU 400 mg/m<sup>2</sup> en bolo y luego 600mg/m<sup>2</sup> en 22hs, en dos días consecutivos, cada 2 semanas) (André T *et al*, 2007).

Una alternativa es un tratamiento de 6 meses con Capecitabina oral 2500 mg/m<sup>2</sup> diaria por 14 días, cada 21 días.

En el ámbito del tratamiento adyuvante no se recomienda utilizar Bevacizumab ni Irinotecan, ambas recomendaciones son de Grado de evidencia IA.

## Factores moleculares predictivos

Actualmente, un área de activa investigación está constituida por el impacto de factores moleculares en el pronóstico y en la respuesta al tratamiento adyuvante en pacientes con estadio II y III de CCR; tal es el caso de la delección de 18q (Gal R *et al*, 2004), la sobreexpresión de timidilato sintetasasa y/o su genotipo (Lacopetta B, 2001; Dotor E *et al*, 2006), mutación en p53 (Westra JL *et al*, 2005), ADN diploide, inestabilidad microsatélite (Popat S *et al*, 2005), expresión génica (Wang Y *et al*, 2004; Eschrich S *et al*, 2005; Barrier A *et al*, 2005), células tumorales circulantes o diseminadas (Koch M *et al*, 2006).

Se han obtenido datos preliminares respecto a factores moleculares predictivos de respuesta (Jen J *et al*, 1994; Shibata D *et al*, 1996; Barratt PL *et al*, 2002; Ribic CM *et al*, 2003; Wang Y *et al*, 2004; Popat S *et al*, 2004; Carethers JM *et al*, 2004; Zlobec I *et al*, 2008), particularmente identificando pacientes con enfermedad en estadio II resecada cuyo pronóstico es similar a los del estadio III. Según estos estudios ningún marcador molecular único o múltiple sería capaz de identificar consistentemente subgrupos de pacientes a los cuales podría beneficiar (o no) un tratamiento adyuvante.

Este tema constituye un área de gran interés; es por ello que se están realizando estudios randomizados (ej. ECOG E5202, 2007) acerca del uso de perfiles moleculares que evalúen el pronóstico o bien permitan seleccionar pacientes para la quimioterapia adyuvante. Hasta el presente no se han obtenido resultados concluyentes (Benson AB *et al*, 2004; Locker GY *et al*, 2006).

## Los antígenos tumorales tienen su propia historia

La inmunología hizo su aparición a principio del siglo XX con Paul Ehrlich, quien la definía como la defensa del organismo contra todo intruso (o agente no-propio) en oposición a la protección de los tejidos normales que eran lo propio con la connotación del *horror autotoxicus*. Incluía al tumor dentro de la denominación de lo no-propio o intruso (Shimkin MB *et al*, 1977).

A principios del siglo XX surgió “el ratón” como la gran vedette del cáncer experimental. Los primeros investigadores que trasplantaron tumores de un ratón a otro observaron fluctuaciones de 0 a 100% de “tomas” hasta que Bittner, en la década del treinta, seleccionó “altos respondedores” versus “bajos respondedores” a injertos tumorales. Curiosamente, siempre se insistía en “el rechazo” con la connotación de “rechazo al intruso, contrario a la naturaleza”. Ya en 1910, Peyton Rous, después de muchos experimentos, concluía que “todos los neoantígenos tumorales son compartidos con tejidos normales”.

En la década del 30 del siglo XX, Little, Snell, Strong y otros en el Jackson Memorial Laboratory iniciaron la endocría programada de ratones, estableciendo distintas cepas singénicas al cruzar hermano con hermana durante 20 generaciones. Gorer mapeó los antígenos de histocompatibilidad del ratón, el sistema H-2, y demostró que no se rechazaban los tumores trasplantados en ratones singénicos, ni tampoco en los de cepas que compartían el mismo H-2. Por ese descubrimiento fue Snell quien compartió el Premio Nobel 1980 con Dausset y Benacerraf pues Gorer ya había muerto (Pasqualini CD *et al*, 1996).

Alrededor de 1950 aparecieron las primeras evidencias a favor de la inmunogenicidad de los tumores en ratones. Prehn y Main (Pasqualini CD *et al*, 1996) demostraron que tumores inducidos por agentes carcinogénicos, como el metilcolantreno, eran rechazados en ratones previamente inmunizados o “vacunados” con el mismo tumor pero que no había inmunidad cruzada entre un tumor y el otro. En cambio, en los tumores inducidos por virus, ya fuera de Gross, Moloney, Friend, etc., había una fuerte inmunidad cruzada entre tumores inducidos por el mismo virus. En 1960, Klein y colaboradores (Pasqualini CD *et al*, 1996) demostraron que el tumor autóctono podía inmunizar a su huésped, es decir, al extirparlo y reinocularlo en el mismo ratón no llegaba a desarrollarse. Se habló

entonces de antígenos tumor-específicos en contraposición a antígenos tumor-asociados (con tejidos normales). Sin embargo, años más tarde, Hewitt (Pasqualini CD *et al*, 1996) demostraba que tumores nacidos espontáneamente en ratones y ratas no eran inmunogénicos, hallazgo que reabrió la discusión.

En la década de 1950, Medawar y Burnet (Pasqualini CD *et al*, 1996) introdujeron el concepto de tolerancia inmunológica, y ganaron el Premio Nobel en 1960 al demostrar que ratones recién nacidos no rechazaban ni la piel ni los tumores alogeneicos (de otra cepa). Este hallazgo que se convirtió en dogma, ha sido cuestionado recientemente ya que el fenómeno ha demostrado ser dosis-dependiente (Ridge JP *et al*, 1996).

En 1958, N Kaliss demostró que el pretratamiento de un ratón con extractos acelulares de tumor inoculados 10 días antes del implante subcutáneo del mismo tumor conducía a una exacerbación del crecimiento tumoral, obviamente un efecto opuesto al rechazo. Esta observación en la época de inicio del laboratorio del Instituto de Investigaciones Hematológicas de la Academia Nacional de Medicina argentina condujo paulatinamente y por casualidad al “modelo del cilindro de vidrio” (cuerpo extraño). Este modelo, que consiste en trasplantar el tumor en la vecindad del cuerpo extraño implantado subcutáneamente en el flanco del ratón, se convirtió en un sistema de balanza que permitía el estudio de factores tanto de rechazo como de exacerbación tumoral. Al estudiar histológicamente el tumor alogénico implantado dentro del cilindro, en 1975 CD Pascualini y DA Filippa demostraron que todos los tumores crecían en forma homogénea hasta el día 14, momento clave a partir del cual el 50% iba al rechazo mientras que el otro 50% crecía rápidamente. Llamó mucho la atención que un mismo tumor alogénico (en ratones AKR) trasplantado en huéspedes singénicos (ratones BALB/c) llevara a un resultado del 50%, como si se tratara de un fenómeno librado al azar o “al caos”. Estos resultados llevaron a postular que el sistema inmune responsable del rechazo tumoral era también el responsable de su proliferación, lo que implicaba una llamativa bivalencia con un fino equilibrio. En este sentido, la adición de linfocitos alogeneicos (AKR) al implante tumoral conducía al 100% de rechazo, mientras que el pretratamiento con extractos acelulares del tumor llevaba al 100% de crecimiento tumoral. Esto último apoyaba la teoría de la inmuoestimulación tumoral propuesta por RT Prehn en 1996.



En 1970, F.M. Burnet habló de una surveillance o vigilancia inmunológica, término acuñado por Lewis Thomas. Tal postulación implicaba que el sistema inmune, a través de sus linfocitos T, eliminaba toda célula neoplásica naciente, simulando “el policía que rechazaba al intruso”. Esta hipótesis se convirtió rápidamente en dogma, más que todo por un fenómeno de wishful thinking (uno quería que fuera así). Pero el dogma tambaleó cuando O Stutman en 1978 demostró que los ratones nude o atímicos y por ende desprovistos de linfocitos T, no desarrollaban tumores espontáneos. Además, el descubrimiento de la importancia de los oncogenes y anti-oncogenes en la transformación neoplásica introdujo un nuevo paradigma según el cual la célula neoplásica era propia y no contraria a la naturaleza.

La vigilancia inmunológica fue paulatinamente reemplazada por la “teoría de la red” propuesta por Jerne, la que le valió el Premio Nobel 1984 junto con Milstein y Köhler. Esta teoría postula que para cada antígeno hay un anticuerpo que a su vez genera un anti-anticuerpo, formando una red de reacciones y contra reacciones que tiende a mantener un equilibrio, una homeostasis inmunológica. En cuanto al tumor, el organismo tanto lo rechazaría como exacerbaría su crecimiento, acentuando la comparación entre la relación tumor-huésped y madre-hijo o materno-fetal. Se pudo demostrar (Pasqualini CD *et al*, 1990) que en ambos casos, el crecimiento inicial dependía de una hiperestimulación de los linfocitos T.

La dicotomía de los linfocitos T con la separación de los CD4+ en Th1 y Th2 por Mossmann y colaboradores (1986) propuso en este doble juego. Los Th1 favorecerían el rechazo tumoral con la producción de IL-2 (interleukina-2), interferón y TNF (factor de necrosis tumoral) mientras que los Th2 favorecerían la tolerancia o exacerbación tumoral con la elaboración de IL-4, IL-5 y IL-10. Este modelo se ha complicado al introducirse en la balanza cada vez más linfoquinas que distorsionan enormemente el juego homeostático y por ende el resultado final.

Algo parecido ocurrió con el descubrimiento por Milstein y Köhler de los anticuerpos monoclonales que les valió compartir el Premio Nobel 1984 con Jerne. Inicialmente parecía la panacea fabricar un anticuerpo monoclonal contra el supuesto antígeno tumoral específico y el problema quedaría solucionado. Hubo respuestas positivas pero sólo esporádicamente. De nuevo la homeostasis inmunológica lo complicó todo. Se produce una verdadera “sopa” de linfoquinas, con efectos tanto agonistas como antagonistas, junto con una activa

metabolización por el organismo, lo que hace imposible predecir el resultado final. Esto explicaría de alguna manera los resultados comentados anteriormente del 50% de “tomas” y 50% de rechazo tumoral en un sistema lo más homogéneo posible del punto de vista genético (Filippa DA *et al*, 1975).

Darí­a la impresión de que con el advenimiento de la biología molecular se acumularon demasiados datos como para llegar a una explicación coherente del crecimiento tumoral. Hoy sabemos mucho más sobre la transformación neoplásica de una célula y estamos ya adoptando un quinto paradigma (Pasqualini CD *et al*, 2003). Se trata de la “teoría de la inflamación” que dice que no bastan las sucesivas mutaciones del ADN sino que se necesita el microambiente apropiado para iniciar la proliferación hacia un cáncer (Balkwill F *et al*, 2002; Coussens LM *et al*, 2002). Nuevamente, a Darwin necesitamos añadirle a Lamarck, es decir, se trataría siempre de la participación de ambos elementos, el genético y el ambiente. Las células transformadas quedarían latentes o “dormidas” hasta que su entorno “se inflame” provocando su proliferación y neovascularización, lo que vale decir que no hay crecimiento tumoral sin proceso inflamatorio. Este último consiste en el cross-talk entre linfocitos, macrófagos, células dendríticas y polimorfonucleares, etc., junto con la elaboración de una verdadera “sopa” de quimioquinas, linfoquinas, etc., todo lo cual formaría un rompecabezas que por ahora es imposible de armar en su totalidad (Egeblad M *et al*, 2002, 2005; Karin M *et al*, 2005; Zlotnik A *et al*, 2006; Condeelis J *et al*, 2006).

Recientemente, numerosos trabajos apoyan éste concepto (Silzle T *et al*, 2004) que algunos llaman cancer immunoediting (Dunn G *et al*, 2002). Dicho proceso consistiría en tres fases: eliminación, equilibrio y escape. La fase de eliminación corresponde al concepto original de inmunovigilancia inmunológica en el cual una célula cancerígena es reconocida exitosamente y eliminada por el sistema inmune retornando así el tejido a su estado normal. Las células no eliminadas completamente por el sistema inmune entrarían en la fase de equilibrio, donde un mecanismo hasta ahora poco entendido, controlaría el crecimiento tumoral. La constante interacción del sistema inmune con el tumor, y por un tiempo prolongado, podría finalmente “editar” o esculpir un fenotipo tumoral característico formando así tumores menos inmunogénicos entrando de esta manera a la última fase de “escape”. Los síntomas clínicos del cáncer se correlacionarían con esta última fase (Teng MWL *et al*, 2008).

## Las mucinas humanas

Los términos mucoso, mucinoso o mucina hacen referencia a la capa viscosa que recubre los epitelios de los órganos huecos del tracto digestivo, respiratorio y genitourinario, a la que históricamente se le asignó una función protectora frente a las agresiones tanto exógenas como endógenas. Las mucinas son el principal componente de esta capa viscosa y constituyen un grupo heterogéneo de moléculas glicoproteicas, filamentosas y de muy alto peso molecular. Su estructura característica se compone de un centro proteico al que se unen a numerosas cadenas de carbohidratos que conforman más de la mitad de su masa.

Con el tiempo, se ha transformado la concepción estática de las mucinas que las consideraba como un simple componente de una barrera defensiva. Numerosos estudios en el campo de la Genética, la Biología Molecular y de la Inmunología han involucrado a estas moléculas en eventos fisiológicos como la diferenciación de los epitelios, la reparación, la protección contra patógenos específicos y, por otra parte, en procesos patológicos como la fibrosis quística o la transformación neoplásica.

Las primeras investigaciones realizadas sobre mucinas se efectuaron a través de estudios bioquímicos que analizaron la composición glicoproteica de los tejidos glandulares de distintos mamíferos. Estos trabajos precursores no sólo determinaron la composición de carbohidratos y aminoácidos de las mucinas, sino que también permitieron sugerir que estas moléculas estaban compuestas por secuencias repetitivas de aminoácidos, ya que al realizar la digestión enzimática de la porción proteica, la proporción de aminoácidos en los polipéptidos producidos era idéntica a la hallada en la molécula intacta (Pigman W *et al*, 1973). Por aquel entonces las mucinas eran denominadas según su procedencia, por ejemplo, la mucina de la glándula submaxilar ovina o la mucina humana de la mama.

Otros trabajos que contribuyeron a caracterizar a las mucinas se valieron de la electroforesis en geles de poliacrilamida. En estos estudios se caracterizaron extractos de membranas celulares, en particular de las membranas de los glóbulos de grasa de la leche humana (Koblyka D y Carraway KL, 1972) los que poseían una fracción invariable de glicoproteínas de alto peso molecular (aproximadamente 240 kDa). Estas fracciones exhibían dos características particulares: primero, una

tinción anómala en los geles de poliacrilamida con el colorante azul de Coomassie y segundo, una variación importante en la distancia de migración en la electroforesis y por lo tanto en el cálculo de su peso molecular aparente. Los autores concluyeron que las glicoproteínas de esa fracción presentaban un contenido muy elevado de carbohidratos, lo que explicaba su comportamiento anómalo. A comienzos de la década del '80 M. Shimizu y K. Yamauchi (1982) lograron aislar por cromatografía en columna de sefarosa una fracción glicoproteica de alto peso molecular que denominaron PAS-0, rica en treonina, serina y prolina y cuyo peso molecular estaba conformado en más del 50% por carbohidratos.

Debido a su gran tamaño y complejidad, las mucinas constituían un desafío para su estudio desde el punto de vista bioquímico. Sin embargo, ya existía la concepción de dos grupos principales de mucinas, uno formado por las mucinas secretadas que formaban geles, y otro formado por las mucinas de membranas que integraban el glicocálix.

La denominación de las mucinas se realizó dependiendo del momento de su descubrimiento; se añade al prefijo MUC, un número del 1 en adelante siendo la primera estudiada la MUC1 y así en forma sucesiva.

Como hemos mencionado anteriormente, el desarrollo de la tecnología de anticuerpos monoclonales (AcMo) por G Köhler y C Milstein hacia fines de la década del '70 permitió realizar avances significativos en el estudio de los antígenos tumorales. Inicialmente se obtuvieron infinidad de AcMo a partir de diferentes materiales utilizados como inmunógenos, entre los que se encontraban las membranas de los glóbulos de grasa de la leche humana, (Taylor-Papadimitriou J *et al*, 1981; Xing PX *et al*, 1989) glicoproteínas urinarias (Price MR, 1990) y extractos de células tumorales (Metzgar RS *et al*, 1982; Szpak CA *et al*, 1984). A pesar de los diversos inmunógenos empleados, muchos de estos anticuerpos identificaban una molécula ampliamente glicosilada que pesaba aproximadamente 400 kDa, la que era particularmente inmunogénica en los ratones.

Las mucinas tienen un alto contenido de oligosacáridos agrupados, la glicosilación en el Oxígeno (unión-O) se produce en péptidos que se repiten en grupo o tándem (tándem repeat) ricos en treonina, serina y prolina. Las mucinas característicamente tienen un largo número de oligosacáridos relativamente cortos que contienen N-acetil-galactosamina O-glicosidicamente unidos a serina o treonina. Las glicoproteínas no mucinosas también pueden tener oligosacáridos

con unión-O, las cuales pueden ser indistinguibles de los oligosacáridos con unión-O de las mucinas, por lo cual la distinción entre mucinas y otras glicoproteínas que contienen carbohidratos tipo mucina es cuantitativa.

Los carbohidratos que contienen las mucinas maduras pueden ser responsables del 50-90% del peso de dichas glicoproteínas y esto usualmente ocurre en grupos. Estos grupos de oligosacáridos con unión-O resultan en regiones extendidas de moléculas que son altamente hidratadas, proteasa resistentes y con múltiples sitios de unión a anticuerpos específicos a carbohidratos así como a lectinas.

Las mucinas típicamente tienen oligosacáridos con unión al Nitrógeno (unión-N), como las glicoproteínas séricas. Esta unión es cuantitativamente menor que la unión-O pero puede ser responsable de importantes funciones de las mucinas. La distinción bioquímica entre mucinas y proteoglicanos, otra clase de glicoproteínas de alto peso molecular, es que las mucinas pierden el ácido urónico y la xilosa.

Aún cuando la porción de carbohidratos de las mucinas es su mayor característica, muchos de los recientes progresos en la comprensión de la biología de las mucinas han dependido de la caracterización de su fuente proteica (apomucinas).

### **Estructura de las mucinas**

Los genes de mucinas humanas, en general, muestran tres características comunes:

- un dominio nucleotídico de péptidos que se repiten en tándem (tándem repeats);
- un dominio peptídico que contiene un alto porcentaje de serina y treonina y
- un complejo de expresión ARN.

Los tándem repeats componen la columna vertebral de las mucinas; relacionado a estas estructuras las mucinas pueden clasificarse en tres distintas subfamilias: formadoras de geles, solubles y unidas a membranas. Cada miembro de una familia posee características comunes y probablemente funciones específicas. Por largo tiempo se pensó que tenían solamente función de proteger y lubricar las superficies epiteliales. El estudio de su estructura así como de la relación con el comportamiento celular que las mucinas facilitan ha permitido

demostrar su implicancia en el crecimiento, en el desarrollo fetal, en la renovación epitelial y la diferenciación, la integridad epitelial, carcinogénesis y metástasis (Moniaux N *et al*, 2001).

La superficie epitelial, incluido el epitelio colónico está cubierta y protegida por mucus constituido principalmente por mucinas. Debido a su función protectora en el colon normal, las alteraciones en las mucinas son una característica común en las neoplasias colónicas (Corfield AP *et al*, 2001).

Muchos órganos sintetizan más de una mucina, aunque un tipo de mucina en particular puede predominar en un órgano en particular. Una característica común en los tumores gastrointestinales es la pérdida de su especificidad. Por ejemplo, hay una aberrante expresión de mucinas tipo gástricas (MUC5AC) en adenomas colorrectales, un precursor de algunos tipos de cánceres de colon, y una aberrante expresión de mucinas tipo colónicas (MUC2) en la metaplasia intestinal, un precursor de algunos cánceres gástricos.

### **Mucinas de unión a membrana**

Las mucinas de unión a membrana incluyen los productos de los genes MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12 y MUC17. De todos estos, MUC1, MUC3, MUC4 y MUC12 tienen interés por su expresión en el colon normal y el cáncer de colon. Todas estas mucinas tienen un dominio de transmembrana con un gran dominio N-terminal extracelular mucin-like y un dominio citoplasmático C-terminal (Gendler S *et al*, 2001). Se cree que el dominio citoplasmático juega un rol en la transducción de señales. Por ejemplo, a diferencia de otras mucinas de membrana, MUC1 presenta una pérdida del dominio EGF-like; este dominio, existente en las otras mucinas de unión de membrana, podría estar involucrado en la modulación del crecimiento epitelial (Gendler SJ *et al*, 1991).

La mucina MUC1 ha sido bien caracterizada (Taylor-Papadimitriou J *et al*, 1990; Gendler SJ *et al*, 1991), está codificada por el gen MUC1 y tiene un largo dominio extracelular con un número variable (20-120 en diferentes individuos) de *tándem repeats* de 20 aminoácidos (PAPGSTAPPAHGVTSAPDTR). Muchos anticuerpos monoclonales de ratón reconocen la porción DTR del *tándem repeat* de MUC1. En humanos el más frecuente epítopo es el RPAPGS (Gendler SJ *et al*, 1995).

## Mucinas secretadas que forman geles

Los cuatro genes que codifican para mucinas secretadas que forman geles están en forma contigua en el cromosoma 11, en el siguiente orden MUC6/MUC2/MUC5AC/MUC5B, y parecen estar evolutivamente relacionadas. Cada una tiene una región central con un número variable de tándem repeats (VNTR), pero hay poca similitud entre las diferentes mucinas en las secuencias de codificación de péptidos VNTR ricos en treonina, serina y prolina. De todos modos, la secuencia exacta de los tándem repeats está pobremente conservada entre las especies, sugiriendo que el alto contenido de los aminoácidos treonina, serina y prolina son los más importantes en la función de las mucinas.

Estas mucinas tienen dos características estructurales, una es que conservan la presencia de secuencias homólogas con el factor von Willebrand D-dominio (vWD, que se piensa estaría involucrado en la oligomerización de las mucinas que forman geles) y la otra, es que presentan un nudo de cisteína C-terminal (CK, que se piensa estaría involucrada en el inicio de la dimerización de los monómeros de apomucinas). MUC2, MUC5AC y MUC5B también tienen secuencias homólogas al dominio C del factor von Willebrand (Brodt P *et al*, 1997) y dos de los siete dominios conservados de 108 aminoácidos ricos en cisteína.

En el tracto gastrointestinal las mucinas juegan un rol en el proceso fisiopatológico, en la progresión neoplásica y en la metástasis de la célula cancerígena colónica. MUC2 y MUC5AC son de especial interés por su expresión en el colon normal y en el cáncer de colon.

La mucina intestinal humana codificada por el gen MUC2 es la más producida por las células del intestino delgado y del colon (Allen A *et al*, 1998). La caracterización completa de MUC2 ha sido difícil debido a su gran longitud (40 kbp), a la naturaleza repetitiva del gen (50%), a su gran tamaño (600-5.000 kDa) y a su potencial para un procesamiento variable post-translacional de sus productos proteicos, los cuales contienen largos subdominios repetitivos. El cáncer de colon humano y las líneas celulares que derivan de esos tumores pueden diferir significativamente en la cantidad de MUC2 sintetizada y estas diferencias se pueden correlacionar con propiedades bioquímicas y biológicas las cuales tienen relevancia en la progresión metastásica del cáncer de colon.

Se han hallado similitudes entre la expresión de genes de MUC2 y MUC5AC tanto en el nivel de secuencia homóloga como en el mecanismo responsable del control de la transcripción de estas mucinas. Durante la carcinogénesis, los mecanismos regulatorios comunes (PKA, PKC, PKG, mecanismos dependientes de Ca<sup>2+</sup>, Sp1/Sp3) pueden aumentar la capacidad de las células secretoras de moco de expresar MUC2 y MUC5AC simultáneamente (van Seuning *et al*, 2001).

### **Glicosilación de mucinas**

La glicosilación es la modificación covalente más frecuente en las proteínas (Spiro RG *et al*, 2002); esta glicosilación ocurre por la unión de una o más cadenas de oligosacáridos a la secuencia aminoacídica, confiriéndole a la proteína diferentes cualidades estructurales y funcionales. La glicosilación contribuye, por ejemplo, en el correcto patrón de plegamiento de las proteínas, confiriéndoles mayor resistencia a las proteasas y mayor estabilidad ante modificaciones físico-químicas del medio, entre otras propiedades. Por otra parte, los carbohidratos cumplen funciones muy importantes en el reconocimiento biológico, uniéndose a diferentes moléculas (tales como las lectinas), mediando interacciones célula-célula y célula-matriz. La glicosilación es una modificación pos-transduccional que genera una gran diversidad, dada la variedad de glicanos que se pueden producir a partir de un número relativamente limitado de monosacáridos. El patrón de glicosilación de una proteína es dependiente del tipo celular que la produce, el que puede modificarse ante diversas situaciones fisiológicas o ante la presencia de enfermedades, lo que ha llevado a un importante desarrollo de la glicopatología. Existen dos tipos principales de glicosilación de proteínas: la *N*- y la *O*-glicosilación. La mayoría de las glicoproteínas presentan glicosilación de tipo *N*, caracterizada por la unión de la cadena oligosacárida a la secuencia peptídica, la cual se establece mediante un enlace entre una *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y un residuo de asparagina.

A diferencia de la *N*-glicosilación, se han identificado diferentes tipos de *O*-glicosilación. La más frecuente se encuentra determinada por la unión de un residuo de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) a serinas o treoninas presentes en el esqueleto polipeptídico. Este tipo de glicosilación se conoce como glicosilación tipo



mucina, debido a que determina la unión de las numerosas cadenas oligosacáridicas presentes en las mucinas (Hanisch FG *et al*, 2001).

Una proteína puede presentar únicamente carbohidratos con uniones de tipo *N*, o únicamente carbohidratos con uniones de tipo *O*, o una combinación de carbohidratos con ambos tipos de uniones. Dentro de las alteraciones moleculares más notorias de las células cancerosas se encuentra la expresión de antígenos producidos por *O*-glicosilación incompleta (Brockhausen I *et al*, 1999), los cuales han constituido la base de diferentes procedimientos de diagnóstico oncológico y evaluados en protocolos de inmunoterapia activa específica del cáncer (Danishefsky SJ *et al*, 2000).

### **Estructura y biosíntesis de los antígenos de *O*-glicosilación simple**

Esquemáticamente puede considerarse que las cadenas oligosacáridicas están constituidas por tres sectores principales:

- el “*core*” o región donde se encuentran los carbohidratos más cercanos al sitio de unión con la cadena peptídica,
- el “esqueleto”, que determina la longitud de la cadena carbohidratada y
- la región periférica donde habitualmente se encuentran los antígenos de grupo sanguíneo.

El “*core*” carbohidrato adquiere particular interés en relación al tema que estamos analizando. En el mismo se observan diferencias sustanciales entre las uniones de tipo *N* y las de tipo *O*, ya que todos los oligosacáridos con uniones de tipo *N* presentan el mismo tipo de “*core*”, independientemente de cual sea la elongación que ocurra posteriormente en la cadena carbohidratada. Ello se debe a que la *N*-glicosilación comienza con la síntesis de Glc3Man9GlcNAc2-Dolicolfosfato, el cual es transferido en bloque a la cadena peptídica naciente en el retículo endoplásmico.

La complejidad estructural de las cadenas oligosacáridicas de tipo *O* es mucho mayor comparada con las de tipo *N* lo cual se pone de manifiesto por la existencia de ocho tipos diferentes de carbohidratos “*core*” en la *O*-glicosilación, a partir de los cuales ocurre la elongación de la cadena oligosacáridica (Van den Steen P *et al*, 1998).

Esta gran diversidad, que hace extremadamente dificultosa la caracterización de los oligosacáridos con uniones de tipo O, es consecuencia de un complejo mecanismo de biosíntesis. Contrariamente a lo que sucede en el inicio de la N-glicosilación, en la O-glicosilación los azúcares son transferidos individualmente y después de terminada la síntesis de la cadena polipeptídica. Los antígenos de O-glicosilación simple corresponden a algunas de las estructuras del “core” de los O-glicanos.

La estructura de las cadenas carbohidratadas con uniones de tipo O varía según el tipo celular y el tejido analizado. Esta estructura depende, entre otros factores, del perfil de las glicosiltransferasas, de sus actividades relativas, de la localización subcelular de las enzimas y de las secuencias peptídicas glicosilables. La primera reacción de la O-glicosilación (adición de GalNAc a la cadena peptídica a partir del azúcar activado UDP-GalNAc) es catalizada por una familia de enzimas conocida como *UDP-GalNAc: polipéptido-N-acetilgalactosaminil-transferasas* (ppGalNAc-Ts), formando el antígeno *Tn* (GalNAc-O-Ser/Thr). A partir de esta estructura pueden formarse los diferentes “core”, mediante la acción de glicosiltransferasas específicas, que actúan de manera secuencial. Por ejemplo, el “core 1” se sintetiza por la adición a *Tn* de un residuo de galactosa, unida por un enlace  $\beta$ 1,3 al GalNAc, en una reacción catalizada por la “core 1”  $\beta$ 3Gal-T. Esta estructura, conocida también como antígeno *TF* o de Thomsen-Friedenreich (Gal $\beta$ 1,3GalNAc-O-Ser/Thr), formará posteriormente el “core 2”, mediante la acción de otra glicosiltransferasa, la  $\beta$ 1,6GlcNAc-T. El antígeno *sialil-Tn* (ácido siálico $\alpha$ 2,6GalNAc-O-Ser/Thr) se genera mediante la actividad de una sialiltransferasa que incorpora ácido siálico, en unión  $\alpha$ 2,6 al antígeno *Tn*. En este caso de los ocho “core” de la O-glicosilación hasta ahora descritos, no se pueden adicionar otros carbohidratos a la estructura *sialil-Tn*, para generar una cadena sacarídica más larga.

### **O-glicosilación incompleta y cáncer**

Como consecuencia de la transformación maligna ocurren cambios muy importantes en la glicosilación. Muchos de los marcadores fenotípicos utilizados para la identificación de carcinomas corresponden a estructuras de las cadenas de carbohidratos o a la fracción peptídica de las mucinas (Kim YJ *et al*, 1997). Se ha

comprobado que la mayoría de las células de carcinomas desarrollan una elongación incompleta de las cadenas sacarídicas con uniones de tipo O, formando estructuras menos complejas. Esto determina que algunos tipos de “core”, que en las células normales se encuentran enmascarados por la adición de otros azúcares, queden expuestos, resultando en la formación de nuevos antígenos asociados al cáncer. Los mejor caracterizados son los antígenos *Tn*, *TF* y *sialil-Tn*, presentes en más del 90% de los carcinomas, por lo que son considerados marcadores de tipo “pancarcinoma” (Hakomori S *et al*, 1989). Más recientemente, fueron identificadas otras dos estructuras asociadas a carcinomas humanos que corresponden a cadenas truncadas de O-glicanos: el “core 6” (Medina M *et al*, 1999) y el antígeno *Tk* (Meichenin M *et al*, 2000). Algunos de estos antígenos han mostrado ser biomarcadores tempranos de malignidad.

Se ha caracterizado al cáncer de mama en rata, inducido por N-nitrosometilurea (NMU), como un modelo para el estudio de *Tn* durante la carcinogénesis. Se ha observado que la expresión del antígeno *Tn* no sólo es detectable en el cáncer mamario inducido por NMU, sino también en el epitelio mamario iniciado hacia la carcinogénesis, indicando que *Tn* puede ser considerado como un biomarcador precanceroso en este modelo (Babino A, 2000).

Con respecto a los estudios en seres humanos, si bien los mismos aportan información parcial por las dificultades de evaluar procesos de carcinogénesis en seres humanos, diferentes observaciones sugieren que la expresión de *Tn* sería también un evento temprano en el desarrollo de ciertos cánceres. La expresión de *Tn* es un cambio específico en la progresión neoplásica desde el carcinoma *in situ* al carcinoma invasor en el cuello uterino (Terasawa K *et al*, 1996), mientras que la expresión de *sialil-Tn* tendría lugar precozmente durante la carcinogénesis mamaria humana (Cho SH *et al*, 1994). La simplicidad estructural del antígeno *Tn* contrasta con su amplio interés biomédico (Freire T *et al*, 2003). Diferentes estudios inmunohistoquímicos coinciden en la observación de que la expresión tumoral del antígeno *Tn* se correlaciona con una evolución desfavorable en los pacientes con cáncer. Por ejemplo, en pacientes con cáncer de cuello de útero la alta expresión de *Tn* se correlaciona con mayor invasión tumoral loco-regional y con menor supervivencia de los pacientes a los 5 años (Hirao T *et al*, 1993). Similares hallazgos se han comunicado a nivel de la supervivencia en dos estudios de pacientes con cáncer de mama (Springer GF *et al*, 1997). ¿A qué podría deberse un fenotipo tumoral

más agresivo cuando las células expresan Tn? Ello seguramente obedece a cambios en las propiedades de relación de las células cancerosas con su entorno. El crecimiento y la invasión tumoral involucra importantes interacciones célula-célula y célula-matriz, que requieren la participación de moléculas con diferentes tipos de estructuras glicosiladas y de lectinas capaces de reconocerlas. El antígeno *Tn* es una estructura que participa en diferentes tipos de adhesión, pudiendo ser reconocido por lectinas de los hepatocitos (Schlepper-Schäfer J *et al*, 1989) y de los macrófagos (Susuki N *et al*, 1996), así como por sialoadhesinas (Orntoft TF *et al*, 1999). El papel de *Tn* en la adhesión celular fue evaluado en células de cáncer de mama co-cultivadas con hepatocitos, observándose que la unión entre ambos tipos celulares fue inhibida específicamente con glicopéptidos *Tn* (Springer GF *et al*, 1983). A pesar de ser estructuras glicosiladas, estos antígenos pueden inducir respuestas inmunes efectivas contra células tumorales. Se ha demostrado que ratones inmunizados con mucinas ricas en *Tn* desarrollan una respuesta inmune, de tipo celular citotóxico, capaz de rechazar un implante letal de células tumorales (Singhal A *et al*, 1991). Por otra parte, Jensen y colaboradores (1997) demostraron que los glicopéptidos *Tn* se unen a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, pudiendo luego ser reconocidas por linfocitos T. Posteriormente, Galli-Stampino y colaboradores (1997) observaron que la estructura *Tn* no sólo podía ser reconocida por los linfocitos T sino que, además, su presencia tendría un papel decisivo en el reconocimiento anti-tumoral por parte del sistema inmune. La inmunización de ratones con glicopéptidos *Tn* sintéticos mostró una actividad inmunoprotectora anti-tumoral en un modelo murino (Lo-Man R *et al*, 1999). Recientemente se comprobó que la eficacia de la respuesta anti-tumoral, en el inmunógeno, depende de la densidad de residuos *Tn*, obteniéndose el mejor efecto inmunoprotector cuando los glicopéptidos presentan tres residuos *Tn* consecutivos (Lo-Man R *et al*, 2001). Todo esto ha llevado a que las vacunas sintéticas con *Tn* y *sialil-Tn* se consideren un nuevo blanco terapéutico en Oncología, particularmente en pacientes con enfermedad residual mínima (Springer GF *et al*, 1997), y estén siendo activamente evaluadas en diferentes modelos oncológicos (Danishefsky SJ *et al*, 2000).

---

## ¿Por qué se expresan antígenos de O-glicosilación incompleta en el cáncer?

De acuerdo con las características del proceso de O-glicosilación, la expresión celular de una estructura de glicosilación incompleta, como *Tn*, muy probablemente corresponda a una alteración cualitativa o cuantitativa en la expresión de glicosiltransferasas responsables de la O-glicosilación de proteínas (Brockhausen I *et al*, 1999) o a la disponibilidad de sustratos mucinosos accesibles a las mismas. Es posible que ante la agresión carcinogénica las células alteradas no expresen algunas glicosiltransferasas, por ejemplo, la que adiciona galactosa y/o N-acetilglucosamina al GalNAc de *Tn*, que tiene lugar en la elongación normal de las cadenas glicosídicas de tipo O. Hace algunos años se demostró que la acumulación de *Tn* en la enfermedad hemopoyética denominada *síndrome Tn* se debe a la completa, pero reversible, represión funcional del gen que codifica para la enzima “core 1”  $\beta 3Gal-T$ , debida a la metilación del ADN (Thurnher M *et al*, 1993). Se ha comprobado una desregulación en la expresión de algunas glicosiltransferasas por las células malignas, como la isoforma T3 de *ppGalNAc-T* en cáncer de colon. Esta enzima tiene mayor capacidad que las isoformas T1 y T2, expresadas en el colon normal, para introducir residuos GalNAc en sitios potenciales O-glicosilables de MUC2, lo que puede favorecer la formación de “clusters” de *Tn* (Inoue M *et al*, 2001). Esto tendría importancia en el reconocimiento inmune antitumoral, ya que los residuos *Tn* aislados no suelen ser reconocidos por los anticuerpos anti-*Tn*, los que reaccionan preferentemente con estructuras *Tn* organizadas en “clusters” (Osinaga E *et al*, 2000).

Otro mecanismo que puede conducir a la acumulación de la estructura *Tn* en las células malignas puede estar influenciado por la secuencia peptídica de la proteína. Se han identificado diferentes genes que codifican mucinas humanas, algunos de los cuales tienen expresión diferencial entre las células normales y las cancerosas, lo que conduce a la formación de mucinas glicosiladas de diferente manera (Moniaux N *et al*, 2001). Se ha demostrado que la especificidad de las *ppGal-NAc-Ts* (enzimas que sintetizan la estructura *Tn*) está determinada por la secuencia de aminoácidos en el péptido aceptor. Más aún, la segunda etapa enzimática en la O-glicosilación, en la que se forma el antígeno *TF* por la acción de la  $\beta 3Gal-T$ , también se encuentra controlada por la secuencia aminoacídica, lo que explica por qué no todos los sitios *Tn* son buenos sustratos para la  $\beta 3Gal-T$

(Granovsky M *et al*, 1994). Diferentes trabajos sugieren una importante desregulación en la expresión de los genes de mucinas durante la transformación maligna.

### **“core 2”**

Las mucinas tipo O-glicanos son las únicas que tienen agrupaciones de un largo número de O-glicanos. Estos O-glicanos contienen residuos de GalNac en los extremos, los cuales están unidos a residuos de serina o treonina en un polipéptido (Bierhuizen MF *et al*, 1994). Estas uniones de O-glicanos pueden ser clasificados dentro de varios grupos acorde a la estructura core (Schachter H *et al*, 1992). En muchas células, la estructura llamada core 1, Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNac, es la mayor constituyente de los O-glicanos.

Los core 1 oligosacáridos pueden ser convertidos a core 2 oligosacáridos, Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3(GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6)GalNac, cuando está presente la  $\beta$ 1,6-GlcNac transferasa (Cores2GlcNacT) (Piller F *et al*, 1988; Bierhuizen MF *et al*, 1992). Mediante el agrupado de oligosacáridos al core 2 se pueden formar carbohidratos ligandos tal es el caso del *sialil Lewis x* de las células sanguíneas; estas células contienen mucinas con core 2 unidos a oligosacáridos tales como NeuNAc $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1-4(Fuca $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6(NeuNAc $\alpha$  2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1-3)GalNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ Ser /Thr (Fukuda M *et al*, 1986; Wilkins PP *et al*, 1996).

Cuando los leucocitos son reclutados a los sitios de inflamación, las E- y P-selectinas expresadas en las células endoteliales activadas reconocen esos antígenos carbohidratos lo cual facilita la extravasación del leucocito (Lowe JB *et al*, 1990; Phillips ML *et al*, 1990; Hiraoka N *et al*, 1999; Bistrup A *et al*, 1999; Hemmerich S *et al*, 2001). También ha sido demostrada que la L-selectina media el rolling de los neutrófilos sobre la célula endotelial activada (Bargatze RF *et al*, 1994; Alon R *et al*, 1996).

El rol del *sialil Lewis x* en el core 2 unido a O-glicanos se ha demostrado por análisis en ratones mutados con deficiencia de Core2GlcNacT-I, obtenidos a través de recombinación homóloga (Ellies LG *et al*, 1998). Los leucocitos de estos ratones muestran una significativa reducción de la adhesión a L-, P-, y E-selectina lo que demuestra que los ligandos de estas selectinas están principalmente llevados por core 2 unidos a O-glicanos.

## MUC1

MUC1 es conocida por varios nombres, los más comúnmente usados son PEM (Polymorphic Epithelial Mucin), episialin, DUPAN-2, DF3, HMFG, EMA (epithelial membrane antigen), CD227 y MUC1 (100). Esta ha sido aislada de varios tejidos incluida las células epiteliales mamarias humanas (Gendler SJ *et al*, 1987 *et al*, 1990), células ováricas (Stern L *et al*, 1992) y células pancreáticas (Lan MS, 1990). Aunque en todos estos tejidos, las MUC1 apomucinas parece ser idénticas, cada tejido expresa distintas glicofomas con un peso molecular que varía desde 250 a 500 kDa en la glándula mamaria (Shimizu M *et al*, 1982) o mayor a 1000 kDa en el páncreas (Lan MS *et al*, 1987). La mucina MUC1 es un heterodímero con una fracción extramembrana que contiene una secuencia de 20aa repetidos en tándem (VNTR), una fracción de transmembrana y una cola citoplasmática (Gendler S *et al*, 1988).

En cuanto al ADNc, éste consiste en 7 exones; el exón 1 codifica para el péptido líder, el exón 2 para el dominio central del VNTR, y el exón 6 y 7 codifican para la secuencia transmembrana y la cola citoplasmática, respectivamente.

Anclada en la membrana con su fracción de O-glicano, MUC1 presenta una larga conformación extendida (Fontenot J *et al*, 1993). La carga negativa de MUC1 está llevada por la fracción glicano, la cual extiende la proteína a un tamaño de aproximadamente 500 nm (Jentoft N *et al*, 1990). Esta conformación provee a MUC1 de propiedades antiadhesivas (Ligtenberg MJ *et al*, 1992) directamente implicadas en la morfogénesis del tejido epitelial (Chambers JA *et al*, 1994), así como también en la progresión tumoral o la metástasis, ruptura de las interacciones célula-célula y/o célula-matriz. Sin embargo, las alteraciones en su glicosilación revelan numerosas situaciones patológicas (Reis CA *et al*, 1998) creando nuevos epitopes glicosídicos (*sialil lewis a* y *sialil lewis x*), los cuales pueden unirse a P- y E-selectinas (Majuri ML *et al*, 1992) e ICAM-1 (Regimbald L *et al*, 1996).

Por otra parte, una secuencia (SXXXXXSSL) de la cola citoplasmática de MUC1 puede interactuar directamente con  $\beta$ -catenina (Regimbald LH *et al*, 1996). La  $\beta$ -catenina es una proteína que tiene importantes funciones en la unión célula-célula por su interacción con E-caderina (Hulsken J *et al*, 1994). La  $\beta$ -catenina también se une a APC (adenomatous polyposis coli) (Munemitsu S *et al*, 1995), siendo éste un esencial compañero en la vía de señalización Wnt/Wnt-1

(Peifer M *et al*, 1996). La activación de esta vía resulta en la acumulación de  $\beta$ -*catenina* libre en el citoplasma debido a una inhibición de la GSK3- $\beta$  (Hinck L *et al*, 1994). Sea cual fuere la molécula que une a  $\beta$ -*catenina*, ambas moléculas se excluyen (MUC1 o APC) (Rubinfeld B *et al*, 1995). La sobreexpresión de APC reduce los niveles citoplasmáticos de  $\beta$ -*catenina* libre, lo cual hace que disminuyan los complejos  $\beta$ -*catenina*/E-caderina: como consecuencia, la adherencia intercelular disminuye (Peifer M *et al*, 1993). La formación de estos complejos está regulada por la fosforilación de la cola citoplasmática de cada molécula de unión a  $\beta$ -*catenina* por la GSK3- $\beta$  (Rubinfeld B *et al*, 1996). Luego de la fosforilación la  $\beta$ -*catenina* es degradada. La GSK3- $\beta$  es probable que también fosforile el sitio de unión de la  $\beta$ -*catenina* en la cola citoplasmática de MUC1 (Li Y *et al*, 1998). Cuando la mayor parte de la cola citoplasmática de MUC1 está fosforilada, la interacción con  $\beta$ -*catenina* es menor (Quin R *et al*, 2000). Los niveles relativos de MUC1, E-caderina,  $\beta$ -*catenina*, GSK3- $\beta$  y APC, son críticos para mantener la integridad del epitelio.

- **Glicosilación de MUC1**

Los oligosacáridos de MUC1 presentes en la leche están compuestos por N-acetilglucosamina (GlcNac), N-acetilgalactosamina (GalNac), galactosa, mucosa y ácido siálico (Shimizu y Yamauchi, 1982). La glicosilación de los sitios O-unión en las mucinas está iniciada por una familia de enzimas, *GalNac transferasas*, las cuales transfieren GalNac a los sitios de la cadena que tiene residuos serina y treonina. Estos residuos de GalNac y los residuos glicanos unidos son definidos como estructuras “*core*” las cuales permiten en el futuro la unión de monosacáridos; esta unión está a su vez catalizada por glicosiltransferasas específicas; de esta manera la cadena de carbohidratos se alarga y se ramifica.

La adición de GalNac a la serina o treonina está seguida por el agregado de galactosa en el *core 1* de los glicanos. La adición de GlcNac al *core 1* del glicano está catalizada por *2 $\beta$ 1,6GlcNac transferasa* llevando a la formación de *core 2*, el cual puede en el futuro extenderse por adición en los sitios de polilactosamina y terminar añadiendo ácido siálico, glucosa o galactosa (Hanisch FG *et al*, 1989, 1990). En la MUC1 normal, un promedio de 2,6 de los 7 sitios disponibles de O-



glicosilación por cada tándem están ocupados (Müller S *et al*, 1997; Hanisch FG *et al*, 1999).

En líneas celulares de cáncer de mama se ha demostrado una pérdida de la actividad de *GalNac transferasa* y un incremento en 10 veces de la  $\alpha 2$ -3sialil *transferasa* (Brockausen I *et al*, 1995; Whitehouse C *et al*, 1997). Esta característica explica en parte que, en los carcinomas, las cadenas laterales de carbohidratos son de cadena corta; así mismo explica la prematura sialilación de los sitios de la cadena, la cual previene futuros elongamientos de las mismas.

La cadena de carbohidratos truncada presente en los tumores es en sí misma inmunogénica (Ragupahi G *et al*, 1996). En MUC1 hay epitopes carbohidratos asociados a tumores tales como los antígenos relacionados con el grupo sanguíneo *Tn* ( $\text{GalNac}\alpha 1\text{-R}$ ) y *sialil-Tn* [ $\text{NeuAc}\alpha(2\text{-}6)\text{GalNac}\alpha 1\text{-R}$ ] así como también el antígeno Thomsen-Friedenrich (*TF* o *T*) [ $\text{Gal}\beta(1\text{-}3)\text{GalNac}\alpha 1\text{-R}$ ]. La limitada distribución de estos antígenos en los tejidos normales y el aumento de su expresión en una variedad de carcinomas (Zhang K *et al*, 1997) los hace un buen blanco para tratamientos inmunogénicos.

Asimismo, la expresión de los epitopes del grupo Lewis, arriba mencionados, es un hecho frecuente en los carcinomas.

- **MUC1 y adhesión celular**

Para que ocurra la invasión de las células tumorales son necesarios tanto la adhesión celular como la anti-adhesión, y en este sentido, MUC1 es posible que juegue un rol en ambos. La fuerte estructura glicosilada de la molécula de MUC1 le confiere propiedades tanto adhesivas como anti-adhesivas. El dominio extracelular de la molécula se extiende largamente sobre la membrana plasmática (Hilkens J *et al*, 1995) y produce un blindaje de la célula maligna. MUC1 sobresale respecto a otras moléculas de la superficie celular tales como aquellas involucradas en la interacción célula-célula (Wesseling J *et al*, 1995) y del reconocimiento inmunológico (van de Wiel-van Kemenade E *et al*, 1993). La sobreexpresión de MUC1 en toda la superficie celular hace decrecer la interacción célula-célula (Ligtenberg MJ *et al*, 1992) y la interacción célula-matriz, lo cual no permite la agregación de células epiteliales por interferencia con la adhesión mediada por integrinas (Wesseling J *et al*, 1995) y con E-caderinas (Kondo K *et al*, 1998).

Considerando que la célula epitelial puede adquirir propiedades invasoras cuando pierde ciertas moléculas de adhesión (Behrens J *et al*, 1989), la MUC1 podría tener un efecto antiadhesivo, favoreciendo la invasión por la célula tumoral del estroma subyacente, los vasos sanguíneos y linfáticos. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los dominios repetidos de MUC1 (Wesseling J *et al*, 1995) tanto naturales como inducidos por vacunación podrían unirse a MUC1 en la superficie celular interfiriendo con ella, y así restaurar la adhesión celular y limitar la invasión del cáncer.

Respecto al rol de la MUC1 y los antígenos carbohidratos expresados en las moléculas de adhesión, se sabe que éstos podrían promover la progresión tumoral. Estudios en líneas celulares de cáncer de colon han demostrado que los residuos de *sialyl Lewis x/a* median la adhesión de las células malignas de colon a la E-selectina (Zhang K *et al*, 1994; Sawada T *et al*, 1994). MUC1 es un ligando para la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Regimblad LH *et al*, 1996). La adhesión de las células malignas a la E-selectina e ICAM-1 de la superficie celular a través de la expresión de *sialyl Lewis x/a* en MUC1 favorecer la migración de las células tumorales desde el sitio del tumor a la circulación general. Las células tumorales dentro del torrente sanguíneo podrían luego, por el mismo mecanismo, adherirse al endotelio, salir de los vasos y metastatizar.

- **MUC1 y el sistema inmune**

En el cáncer la MUC1 puede expresar epítopes tanto de la región peptídica de su fracción extramembranosa (en el VNTR) como también carbohidratos (antígenos *T*, *Tn* y sus derivados sialilados) y del grupo Lewis. Por otra parte, recientes estudios han demostrado que MUC1 está expresada en células T activadas (Agrawal B *et al*, 1998), esto sugiere un rol fisiológico inmunoregulatorio de MUC1. El mecanismo exacto de la regulación inmune por MUC1 aún no está claro. Las distintas propiedades de MUC1 sustentan la hipótesis de que la MUC1 expresada por activación de células T puede ayudar activamente en la terminación de la respuesta inmune de la célula T, asimismo también podría tener un rol en el tráfico de linfocitos los órganos linfáticos (Agrawal B *et al*, 1998).

- **Propiedades inmunomoduladoras de MUC1**

La mucina MUC1 tiene una estructura muy compleja y, como se ha puesto en relevancia más arriba, además posee funciones tanto fisiológicas como patológicas. Tal es el caso de la habilidad a la evasión inmune, mediada por MUC1, en las células tumorales debida a su capacidad de inducir inmunosupresión por inhibición de la función inmune a través de la secreción de ciertos factores (Sulizeanu D *et al*, 1993). Se ha observado en pacientes con enfermedad maligna avanzada que la mucina MUC1 soluble inhibe la adhesión de las células que expresan tanto MUC1, ICAM-1 (Regimbald LH *et al*, 1996) ó E-selectina (Zhang K *et al*, 1994; Sawada T *et al*, 1994). Esto sugiere que MUC1 tendría un rol inmunosupresor cuando se halla en niveles elevados en la circulación. Asimismo, Regimbald y colaboradores (1996) observaron que la unión de MUC1 a ICAM-1 puede ser inhibida por el anticuerpo monoclonal B27.29, dirigido contra el centro proteico de MUC1 y el anticuerpo anti-ICAM-1. Esto sugeriría que el sitio de unión de ICAM-1 a la mucina MUC1 yace dentro del centro proteico el cual es expuesto en el cáncer debido al acortamiento de los carbohidratos de las cadenas laterales. Se ha sugerido que la elevada secuencia repetitiva en el péptido core de MUC1 podría llevar al reconocimiento simultáneo de diferentes epitopes, y por lo tanto, de distintas uniones cruzadas con el agregado de células T-específicas de mucinas. La glicosilación afectaría estas interacciones (Finn OJ *et al*, 1992, 1995). Paradójicamente, algunas células tumorales que expresan MUC1 pueden interactuar con las ICAM-1 de las células T provocando un co-estímulo, el cual es necesario para matar a las células T. Si el tumor produce una gran cantidad de MUC1 podría bloquear los sitios de unión de ICAM y contribuir al estado de anergia que en algunos casos se observa en el paciente con cáncer dado la falta de infiltración linfocitaria.

- **Respuesta inmune humoral de MUC1**

La MUC1 es capaz de inducir una respuesta inmune humoral en pacientes con cáncer. Se hallaron anticuerpos circulantes IgM en pacientes con cáncer de mama, colon y páncreas (Kotera Y *et al*, 1994) así como en personas sanas y en pacientes con tumores benignos y malignos de ovario (Richards ER *et al*, 1998).

Anticuerpos anti-MUC1 dirigidos al centro proteico de la molécula han sido descritos en colitis ulcerosa (Hinoda Y *et al*, 1993) así como también anticuerpos IgG MUC1 en pacientes con cáncer colorrectal (Nakamura H *et al*, 1998). En pacientes con cáncer de ovario se ha observado que las células B provenientes de ganglios linfáticos que drenan el tumor producen anticuerpos que reaccionan contra el centro proteico de MUC1 (Rughetti A *et al*, 1993; Petrarca C *et al*, 1996). Asimismo, se halló una correlación estadísticamente significativa entre la detección de células B reactivas contra MUC1 y la presencia de anticuerpos circulantes contra MUC1 (Petrarca C *et al*, 1999). Los pacientes con tumores benignos de mama y pacientes con cáncer de mama y ovario tienen anticuerpos anti-MUC1 formando complejos inmunes circulantes con MUC1 (Gourevitch MM *et al*, 1995; Croce MV *et al*, 1987 y 1995). Se han hallado también anticuerpos anti-MUC1 libres (tanto IgG como IgM) en la circulación de pacientes controles, pacientes con enfermedad benigna y maligna de mama (Croce MV *et al*, 1997; von Mensdorff-Pouilly S *et al*, 1998).

Los epitopes de MUC1 con los cuales reaccionan los anticuerpos monoclonales generalmente obtenidos de ratones son diferentes de los anticuerpos naturales o inducidos en seres humanos. Muchos de los anticuerpos monoclonales murinos generados contra MUC1 están dirigidos contra la secuencia PDTRPA del VNTR de MUC1 (Taylor-Papadimitriou J *et al*, 1991; Schol DJ *et al*, 1998), mientras que la respuesta inmune humoral humana está dirigida contra otras secuencias del mismo. Los anticuerpos humanos producidos por células B inmortalizadas obtenidas de los ganglios linfáticos de pacientes con cáncer de mama y ovario reconocen la secuencia APPAH del VNTR de MUC1 (Petrarca C *et al*, 1996). Las dos cadenas simples Fv del anticuerpo contra el centro proteico de MUC1 que se une a la célula tumoral y tejidos reconoce la secuencia PAPG(S) y (T)RPAPGSTAPPAH del centro proteico de MUC1 (Henderix P *et al*, 1998).

La mucina MUC1 también es expresada en una forma subglicosilada en el cáncer de mama en comparación con las muestras de tejido mamario normal; ésta característica proporcionó un potencial desarrollo científico para la inmunoterapia anti-tumoral. Alduri y colaboradores (1999) desarrollaron un anticuerpo de 30aa dirigido contra el epítipo APDTRPA de MUC1, el cual es reconocido por una variedad de anticuerpos monoclonales murinos y por algunas células T citotóxicas de pacientes inmunizados con cáncer epitelial.

Las células tranfectadas con MUC1 son menos susceptibles de lisis por células efectoras citotóxicas (van de Wiel-van Kemenade E *et al*, 1993). Los anticuerpos anti-MUC1 podrían redistribuir MUC1 en la superficie celular y enmascarar los antígenos de la superficie involucrados en el proceso de reconocimiento inmune permitiendo la destrucción ósea metastásica por células del sistema inmune. Respecto a esto, es importante resaltar que se ha hallado la presencia de respuesta humoral a MUC1 en el suero de pacientes pre-tratados, lo cual estaría asociado con un beneficio en el TLE y en la SG en pacientes con cáncer de mama temprano (von Mensdorff-Pouilly S, 2000). Se observó además, un beneficio en la supervivencia entre las mujeres con cáncer de mama con altos niveles circulantes de MUC1 quienes también tenían complejos inmunes MUC1 antes de iniciar el tratamiento (von Mensdorff-Pouilly S, 1996).

- **Respuesta inmune celular a MUC1**

Finn OJ y colaboradores (1992) demostró por primera vez la presencia de una respuesta inmune celular a MUC1 en pacientes con cáncer. Otros autores hallaron que las células T citotóxicas (CTL) de pacientes con cáncer de mama, páncreas y ovario reconocerían péptidos del centro proteico de MUC1 y mediarían la lisis de tumores *in vitro* (Barnd L *et al*, 1989; Jerome KR *et al*, 1993; Ionnanides CG *et al*, 1993). Asimismo, se ha demostrado citotoxicidad contra MUC1 en pacientes con mieloma múltiple (Takahashi T *et al*, 1994). La respuesta proliferativa de células T contra MUC1 y péptidos de MUC1 está presente en las células mononucleares (PBMC) de sangre periférica de pacientes con cáncer de ovario. La respuesta inmune celular no está restringida a pacientes con tumores malignos sino también se encuentra en enfermedades benignas y situaciones fisiológicas. Agrawal B y colaboradores (1996) demostró la presencia de células T que proliferan específicamente en respuesta a MUC1 en mujeres multíparas, no así en las nulíparas.

Cuando se estimulan ratones contra MUC1, es posible inducir fácilmente una respuesta celular restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), pero éste no es el caso en los seres humanos en los cuales la respuesta contra MUC1 no está restringida por el MHC (Apostolopoulos V *et al*, 1995, 1998; Barnd DL *et al*, 1989; Takahashi T *et al*, 1994). La MUC1 asociada a tumores se comporta

como un antígeno multivalente con múltiples epitopes repetidos que se unen al receptor de células T (CTR) (Finn OJ *et al*, 1995).

El significado de la alteración de la glicosilación en la presentación antigénica, y su reconocimiento por el sistema inmune aún no está del todo esclarecido. La eficiencia del procesamiento y la consecuente estrecha actividad de CTL con MUC1 fueron inversamente correlacionadas con el grado de su glicosilación (Hiltbold EM *et al*, 1999). Asimismo, la respuesta celular a MUC1 podría estar exclusivamente dirigida contra los antígenos carbohidratos expresados en el cáncer. Se ha observado que los clones de CTL, obtenidos de linfocitos de los ganglios linfáticos de pacientes con cáncer colorrectal, y a los cuales se les extrajo MUC1, expresan sus receptores luego de la inhibición de la glicosilación. Esta inhibición puede ser nuevamente revertida cuando se agrega el anticuerpo contra el antígeno-T, el cual se encuentra expresado en los carcinomas asociados a MUC1.

### **MUC2**

La MUC2 se halla fuertemente expresada en células caliciformes de colon e intestino delgado humano. MUC2 fue el primer gen de mucina secretoria humana clonado y completamente secuenciada que codifica para el centro proteico (>5100 aa) de la mayor mucina secretoria (Gum JR Jr *et al*, 1992, 1994; Gendler SJ *et al*, 1995).

Las mucinas secretorias forman una barrera de mucus protector entre el epitelio y el medio ambiente dañino de la luz del tracto gastrointestinal (Forstner JF *et al*, 1978; Allen A *et al*, 1984).

El gen de la proteína MUC2 está caracterizado por secuencias que se repiten en tándem, ricas en treonina y serina, las cuales constituyen sitios para la adición de nuevas cadenas de oligosacáridos (Gum JR Jr *et al*, 1992, 1994; Tytgat KM *et al*, 1994; Gendler SJ *et al*, 1995, Allen A *et al*, 1998). Hasta la fecha, nueve genes de mucina epitelial humana han sido identificados y clonados por su único VNTR. Como se mencionó anteriormente, cuatro de éstos son expresados en células secretoras de moco en el locus del mismo cromosoma 11p15.5, en la secuencia MUC6, 2, 5AC y 5AB (Corfield AP *et al*, 1995; Pigny P *et al*, 1996).

La mayoría de las cadenas de oligosacáridos, los cuales comprometen entre el 50-85% del peso de la mucina están unidos por O-glicosilación a través de GalNac al sitio treonina y serina del centro proteico. Entre las diferentes mucinas, la cadena de oligosacáridos varía en longitud (la mucina colónica tiene 4-12 azúcares) y en la estructura antigénica. Hay un patrón estructural común en el esqueleto de las repeticiones de galactosa y las unidades de GlcNac, y las cadenas ramificadas terminales con los azúcares GalNac, fucosa o ácido N-acetilneuramínico (McCool DJ *et al*, 1994; Corfield AP *et al*, 1995; Allen A *et al*, 1998). La mucina colónica tiene una carga fuertemente negativa debido a su éster sulfato y al ácido N-acetilneuramínico terminal. Las mucinas secretorias están caracterizadas por polimerización covalente de su molécula ( $M_r$  2-3 x 10<sup>6</sup>) a través de puentes disulfuro en la larga mucina polimérica ( $M_r=10^7$ ). Esta estructura polimérica es esencial para formar mucinas que forman geles (Allen A *et al*, 1989, 1993). Las enzimas proteolíticas y los fármacos mucolíticos (ej. N-acetilsteína) disuelven el gel mucoso (mucólisis) ya sea por hidrólisis del centro proteico no glicosilado o bien por ruptura de los puentes disulfuros, de esta manera se logra fragmentar la mucina polimérica.

La proteína MUC2 contiene más de 5100 aa en su forma alélica común (Gum JR J *et al*, 1992, 1994). Hay dos regiones repetitivas centrales ricas en sitios de potencial O-glicosilación; el primero es un largo dominio de repetición en tándem de 23 aa (secuencia consenso PTTTPITTTTTVTPTPTGTQT), el cual comúnmente tiene 100 de tales repeticiones, aunque en algunas variantes alélicas ocurren entre 50-100 repeticiones. La segunda repetición rica en O-glicosilación es la secuencia repetitiva de un dominio de 347 aa, conteniendo repeticiones irregulares ricas en treonina/serina/ prolina, separados de la región de repeticiones en tándem por un segmento de 148 aa.

MUC2 también contiene cuatro D-dominios ricos en cisteína de aproximadamente 350 aa cada uno, tres dentro la región N-terminal de 1400 aa y uno en el residuo 984 de la región C-terminal. Estos dominios muestran un alto grado de secuencias homólogas con cuatro D-dominios del factor de agregación plaquetaria von-Willebrand. Estos dominios vWF son requeridos para la polimerización mediada por disulfuros, y el almacenamiento dentro de gránulos.

Por otra parte, son interesantes los sitios de unión a colágeno y a heparina presentes en la secuencia de MUC2, sugiriendo una potencial interacción con otras macromoléculas extracelulares.

La biosíntesis de MUC2 ha sido estudiada en líneas celulares epiteliales de colon humano (pre maligno y cáncer) y en explantos de mucosa colónica de rata (Tylgat KMAJ *et al*, 1994; McCool DJ *et al*, 1994; Asker N *et al*, 1995). Los experimentos con la técnica de pulse chase demostraron el primer estadio en la formación de una apoproteína O-glicosilada con GalNac. Subsecuentemente, se identificó una proteína más larga, un dímero de la apoproteína original, análoga a la dimerización en la biosíntesis vWF. La completa glicosilación del dímero ocurre en el aparato de Golgi. La cadena de oligosacáridos de más de 12 azúcares en longitud está formada por una gradual adición de residuos simples (como sustratos de azúcar nucleótido) cada uno mediado por enzimas glicosiltransferasas específicas (Allen A *et al*, 1989; Forstner JF *et al*, 1994). El patrón de glicosilación es conocido por ser diferente según el tejido, por lo cual es probable que la estructura del carbohidrato sea acorde al tejido en el cual la mucina se expresa. Se sabe que la N-glicosilación puede ser la señal para blancos subcelulares de una mucina que se está sintetizando, desde la inhibición hasta los procesos de arresto o de su biosíntesis (McCool DJ *et al*, 1995).

La degradación de la mucina gastrointestinal es compleja (Allen A *et al*, 1989; Forstner JF *et al*, 1994; Corfield AP *et al*, 1995). A través de las proteasas lumbinales digestivas lentamente se disuelve el gel del moco adherente; de esta manera, se liberan mucinas altamente glicosiladas y fragmentos resistentes para la futura degradación proteolítica. La erosión de las capas de gel de moco en la superficie epitelial dado por proteasas y por los mecanismos de desprendimiento (causado por la motilidad gastrointestinal, pasaje de heces, etc.) está normalmente balanceada por la secreción de mucus nuevo manteniéndose así la capa de gel adherente in vivo.

El desglose de las cadenas de oligosacáridos de los fragmentos de mucina altamente glicosilada ocurre sólo en el colon y es mediada por *exoglicosidasas* específicas, *sulfatasas* y *O-acetilasas* de la microflora intestinal (Corfield AP *et al*, 1995).

La función biológica primaria asignada a las mucinas de secreción gastrointestinal es la de formar una barrera de gel protectora entre el epitelio



subyacente y la luz, la cual particularmente en el colon, contiene microorganismos, hidrolasas, toxinas, etc. (Allen A *et al*, 1989, 1993; Forstner JF *et al*, 1994). Dentro de la matriz de la capa de moco adherente, continuo y grueso (150mm), hay un microambiente estable acuoso el cual es permeable a iones y proteínas de bajo peso molecular; además, provee una barrera física para moléculas de mayor tamaño, por ejemplo proteasas y algunas enzimas. Las cadenas de oligosacáridos de las mucinas simulan receptores de la superficie celular y por unión a microbios previenen la llegada de éstos a la superficie de la mucosa. La secreción de mucus también está impregnado con IgA secretoria, lisozima y una buena cantidad de dominios con radicales libres.

En el cáncer de colon, hay una disminución de la expresión de MUC2 y un aumento en la expresión de MUC1, MUC5 y MUC6 las cuales son sólo expresadas débilmente en el colon normal (Kim YS *et al*, 1996). Hay cadenas de oligosacáridos cortos con reducción de la ramificación, con reducida sulfatación y con reducida O-acetilación del ácido N-acetilneuramínico (Corfield AP *et al*, 1995). Aunque tales cambios no caben dudas de que son secundarios al cáncer, ellos podrían ser de gran valor para el desarrollo de procedimientos diagnósticos para conocer la agresividad tumoral. Curiosamente, MUC2 no se encuentra en el epitelio normal de la vejiga pero sí esta fuertemente expresada en el cáncer de vejiga (Bergeron A *et al*, 1996) por lo cual se dice que MUC2 generalmente se expresa en carcinomas mucinosos independientemente del tejido original (Hansk C, 1995). El conocimiento de la estructura y función de las mucinas secretadas y sus cambios durante la enfermedad sólo se produjo después del análisis de la mucina completa, enormemente dificultoso debido a su enorme complejidad.

### **MUC5AC**

La mucina MUC5AC se expresa en la zona apical de las células epiteliales mucosas de las glándulas del antro y cuerpo gástrico, el epitelio traqueobronquial, la superficie epitelial de la vesícula biliar y el epitelio del endocérvix (Audie JP *et al*, 1993; Gendler SJ *et al*, 1995; Porchet N *et al*, 1995; 1995; Ho SB *et al*, 1995; Reis CA *et al*, 1997; Gipson IK *et al*, 1997; Taylor KL *et al*, 1998; Sasaki M *et al*, 1999; Bartman AE *et al*, 1999; Bara J *et al*, 1998; Kocer B *et al*, 2004). La MUC5AC

también se encuentra en los tejidos fetales (Bara J *et al*, 1980, 1986) y en la mucosa colónica precancerosa y sólo en menos del 20% del colon normal (Bara J *et al*, 1984; Carrato C *et al*, 1994; Buisine MP *et al*, 1996; Bartman AE *et al*, 1999). Por otra parte, la expresión de novo fue demostrada en más del 55% de los pólipos colónicos. La MUC5AC también está altamente expresada en adenomas y sus niveles decrecen con el aumento del grado de displasia (Bara J *et al*, 1991; Buisine MP *et al*, 1996; Bartman AE *et al*, 1999; Lau SK *et al*, 2004). Menos del 30% de los carcinomas colorrectales expresan MUC5AC (Bara J *et al*, 1980; Kocer B *et al*, 2002). Sin embargo, en otro estudio, la expresión de novo de MUC5AC estuvo presente en 23/36 carcinomas colorrectales (Sylvester PA *et al*, 2001).

Un estudio publicado por B Kocer y colaboradores (2002), quienes obtuvieron 34,1% de expresión de MUC5AC en los CCR, enfatizó que la expresión de MUC5AC decrece con el aumento de la patología maligna y que dicha expresión se negativiza en tumores que tienen un comportamiento tumoral más agresivo. En ese estudio los pacientes tuvieron una sobrevida significativamente menor, por lo cual se sugiere que la ausencia de expresión de MUC5AC en carcinomas colorrectales podría ser un factor pronóstico negativo.

En otro artículo, B Kocer y colaboradores (2006) demostró que hay anticuerpos que naturalmente reaccionan contra el núcleo peptídico de MUC5AC en el suero de pacientes sanos, con pólipos y portadores de carcinoma colorrectal. En este trabajo, los pacientes con pólipos y la presencia de anticuerpos anti-MUC5AC séricos se correlacionó con la expresión de dicho antígeno en el tejido; por otra parte, en los pacientes con CCR la presencia de MUC5AC sérica se asoció con una disminución de la sobrevida.

### **Los antígenos del grupo sanguíneo Lewis**

Como ya hemos visto, el desarrollo tumoral se halla frecuentemente asociado con cambios en los carbohidratos de la superficie celular (Chen L *et al*, 1995; Yao M *et al*, 1998). La acumulación de precursores o la aparición de neoglicanos pueden constituir marcadores carbohidratos asociados a tumores humanos, particularmente los antígenos relacionados con ABH/Lewis. El esqueleto de estos antígenos usualmente consiste en uno o ambos de dos tipos de unidades de disacáridos conocidos como cadena 1 y cadena 2. Los isoantígenos del grupo

sanguíneo ABH tienen ambas estructuras (tipo 1 y 2), mientras que *Lewis a* y *sialil Lewis a* tienen sólo la cadena tipo 1, y *Lewis x* y *sialil Lewis x* tienen únicamente la cadena tipo 2 del antígeno carbohidrato. De todas maneras, la estructura química del epítipo de *Lewis a* y *sialil Lewis a* es isomérica, al igual que la de *Lewis x* y *sialil Lewis x*.

Los antígenos del grupo sanguíneo humano son en su mayoría alo-antígenos y están presentes en la superficie celular de los glóbulos rojos y varias células epiteliales. Como la mayoría de los tumores malignos humanos derivan de células epiteliales, los cambios en los antígenos del grupo sanguíneo constituyen un aspecto importante de la inmunología tumoral humana. En algunas localizaciones tumorales, la alteración de los antígenos relacionados con ABH/Lewis está asociada con la transformación, progresión tumoral y la subsecuente metástasis (Piere M *et al*, 1987; Shoreibah MG *et al*, 1992; Gu J, 1993; Chen L *et al*, 1995).

### ***Sialil Lewis a***

*Sialil Lewis a* es un tetrasacárido cuya estructura es NeuAc  $\alpha 2 \rightarrow 3$ Gal $\beta$ a1 $\rightarrow 3$ (Fuc  $\alpha 1 \rightarrow 3$ )GlcNAc $\beta$ 1-R. El antígeno *sialil Lewis a* fue descubierto por Koprowski y colaboradores en 1979 con el uso del anticuerpo monoclonal 19-9. Este antígeno fue encontrado en gran cantidad en la superficie de líneas celulares cancerígenas pancreáticas, colónicas y gástricas (Koprowski H *et al*, 1982; Falk KE *et al*, 1983). También en adenocarcinomas de colon, estómago, páncreas y vesícula biliar (Koprowski H *et al*, 1979; Atkinson BF *et al*, 1982; Sakamoto S *et al*, 1989), mientras que sólo una baja cantidad de antígeno *sialil Lewis a* se encuentra también presente en epitelios normales (Atkinson BF *et al*, 1982, Arends JW *et al*, 1983). Asimismo, este epítipo carbohidrato está expresado en células epiteliales fetales de diferentes órganos, mayormente de origen endodérmico (Olding LB *et al*, 1984).

Takada y colaboradores (1993) han observado que el *sialil Lewis a* puede servir como ligando a la molécula de adhesión-1 (ELAM-1) de los leucocitos endoteliales. Esto puede ayudar a la célula tumoral a adherirse a los vasos sanguíneos, a través de lo cual la célula tumoral hace el primer paso en la diseminación metastásica. *Sialil Lewis a* también puede actuar como factor tumoral

angiogénico (Tei K *et al*, 2002) y contribuir con el crecimiento tanto del tumor como de la metástasis, con mal pronóstico para los pacientes. Varios investigadores han tratado de probar esta hipótesis en una variedad de ensayos clínicos, pero hasta ahora no han surgido evidencias concluyentes (Arends JW *et al*, 1984; Walker RA *et al*, 1986; Asai S *et al*, 1994; Shimono R *et al*, 1994; Nakayama T *et al*, 1995; Ikeda Y *et al*, 1996; Tsumatori G *et al*, 1999; Nakagoe T *et al*, 2000). Tanto los trabajos de R. Shimono y colaboradores (n=149), T. Nakayama y colaboradores (n=309) como los de S. Asai y colaboradores (n=308) han hallado que la expresión del antígeno *sialil Lewis a* en tumores colorrectales es un marcador útil para evaluar la agresividad y el pronóstico de los pacientes. Por otra parte, T. Nakagoe y colaboradores (n=101) y J.W. Arends y colaboradores (n=311) coincidieron en que la presencia de *sialil Lewis a* en el cáncer colorrectal no se correlaciona con los parámetros conocidos para tener significancia pronóstica. Asimismo, R. A. Walker y colaboradores (1996) estudiaron 37 pacientes y no encontraron una correlación significativa entre la presencia de *sialil Lewis a* en el cáncer de mama y el compromiso ganglionar. Así, la relación entre la expresión de *sialil Lewis a* y el comportamiento metastásico queda poco clara.

Por su parte, M. Takanori y colaboradores (2004) realizaron un estudio en 233 pacientes con cáncer de colon con metastasis principalmente hepáticas y hallaron peor pronóstico en aquellos casos que presentaron expresión positiva para *sialil Lewis a*. Todos estos pacientes habían sido tratados con quimioterapia basada en 5-Fluorouracilo.

### **Lewis x**

*Lewis x* es un trisacárido cuya estructura es Gal  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 (Fuc  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3) GlcNac-R (Gooi HC *et al*, 1981; Hakomori S *et al*, 1981). El antígeno *Lewis x* conocido también como "stage-specific embryogenic antigen-1 (SSEA-1)" (Kannagi R *et al*, 1982) fue primeramente descrito por Solter y Knowles en 1978.

*Lewis x* está expresado en glicoconjugados de granulocitos polimorfonucleares humanos (Spooncer E *et al*, 1984; Mordoh J *et al*, 1994) y en diferentes tumores incluidos el carcinoma de mama y colon (Mordoh J *et al*, 1994; Hittelet A *et al*, 2003), pulmón (Chia D *et al*, 1985; Zenita K *et al*, 1988), linfoma de

Hodgkin (Ohana-Malka O *et al*, 2003) y en la leucemia promielocítica aguda (Rizzatti EG *et al*, 2004).

Se ha sugerido que *Lewis x* estaría involucrado en el reconocimiento celular durante la fertilización, embriogénesis y el desarrollo neuronal (Johnston DS *et al*, 1998; D'Costa S *et al*, 1999; Allendoerfer KL *et al*, 1999). En un estudio en diferentes tejidos normales y análisis de la literatura, M. V. Croce y colaboradores (2007) hallaron una elevada expresión de estos antígenos empleando el anticuerpo monoclonal KM380 (Hanai N *et al*, 1986).

La función adhesiva del glicano *Lewis x* y la lectina tipo-C específica para *Lewis x* ha ganado interés debido al hallazgo de que la lectina tipo-C DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM [intercellular adhesion molecule]-3-grabbing nonintegrin) y lectinas relacionadas unen específicamente los glicanos *Lewis x* a patógenos tales como *Schistosoma mansoni* y *Helicobacter pylori* (Geijtenbeek TB *et al*, 2004). Además, se ha propuesto recientemente que las células tumorales pueden interactuar con DC-SIGN en células dendríticas a través de los glicanos *Lewis x* presentes en antígenos tumorales tales como CEA, llevando a la supresión de la función de las células dendríticas (van Gisbergen KP *et al*, 2005).

### ***Sialil Lewis x***

*Sialil Lewis x* es un tertrasacárido cuya estructura es NeuNAc $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 (Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)GlcNac-R, está presente en numerosas membranas glicoproteicas o glicolipídicas de células epiteliales y linfáticas. Se encuentra expresado en neutrófilos, monocitos y ciertos linfocitos T (Fukuda M *et al*, 1984; Mizoguchi A *et al*, 1984) y juega un rol importante en el reclutamiento de leucocitos. Las E- y P-selectinas expresadas en células endoteliales activadas, en el sitio inflamatorio, capturan este leucocito a través de su unión con *sialil Lewis x*, siguiendo luego el rolling, el cual lleva a la extravasación del leucocito (Springer T *et al*, 1994; Homeister JW *et al*, 1998). La circulación linfocítica está dirigida por la interacción entre L-selectina en el linfocito y el sulfatado de *sialil Lewis x* presente en los receptores de L-selectina que se encuentran restringidos a las vénulas endoteliales altas (Hiraoka N *et al*, 1999; Hemmerich S *et al*, 2001; Yeh JC *et al*, 2001). Dicha interacción lleva a la extravasación del linfocito desde el compartimiento intracelular al compartimiento linfático.

La cantidad de *sialil Lewis x*, el cual también se une a E-selectina como se dijo más arriba (Berg EL *et al*, 1991; Takada A *et al*, 1993), está aumentada significativamente en células tumorales de carcinomas y leucemias (Magnani JL *et al*, 1982; Fukushima K *et al*, 1984; Fukuda M *et al*, 1985; Itzkowitz SH *et al*, 1988). En pacientes con cáncer de mama y colon, la presencia de *sialil Lewis x* estaría asociada a mal pronóstico (Nakamori S *et al*, 1993; Shimodaira K *et al*, 1997; Renkonen J *et al*, 1997).

### **Lewis y**

El antígeno *Lewis y* es un disacárido difucosilado,  $\text{Fuc } \alpha 1 \rightarrow 2 \text{Gal} \beta 1 \rightarrow 4 (\text{Fuc } \alpha 1 \rightarrow 3) \text{GlcNAc } \beta -1$ , detectado y caracterizado originalmente en células epiteliales o en fluidos corporales y secreciones (Lloyd KO *et al*, 1966).

Originalmente fue detectado y caracterizado como un oligosacárido expresado en mucinas de adenomas quísticos de ovario (Lloyd KO *et al*, 1966). *Lewis y* también ha sido identificado como un antígeno carbohidrato oncofetal relacionado con la ontogenesia (Miyake M, *et al* 1988), apoptosis celular (Hiraishi K *et al*, 1993; Yamada T *et al*, 1996) y cáncer humano (Yin BW *et al*, 1996; Tanaka F *et al*, 1998).

Es menos conocido, sin embargo, su rol fisiológico. Hay evidencia que involucra a *Lewis y* en el proceso de adhesión y motilidad celular (Hakomori SI *et al*, 1970). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra *Lewis y* demostraron que inhiben la locomoción de células tumorales in vitro que lo expresan (Miyake M *et al*, 1991; Garrigues J *et al*, 1993). Asimismo, en modelos murinos, se ha observado que *Lewis y* actúa como una molécula mediadora esencial para la etapa inicial de la implantación del embrión (Zhu ZM *et al*, 1995; Wang XQ *et al*, 1998). Se ha hallado recientemente que *Lewis y* también se encontraría expresado en células del sistema hematopoyético. Muroi K. y colaboradores (1992) han demostrado la expresión de éste antígeno en células maduras de sangre periférica y en varias líneas celulares leucémicas. Usando un panel de diferentes anticuerpos contra *Lewis y*, K. Kitamura y colaboradores (1994) confirmaron la expresión de *Lewis y* en células de sangre periférica.

Asimismo, el antígeno *Lewis y* ha sido usado como un marcador clínico para el diagnóstico (Jovanovic R *et al*, 1989), pronóstico (Narita T *et al*, 1993) y

diferenciación (Wakabayashi M *et al*, 1995) de varios tumores malignos. Usando técnicas de inmunohistoquímica y bioquímica, la expresión del antígeno *Lewis* y ha sido observada en tejidos normales y de tumores malignos tales como cáncer de estómago (Murata K *et al*, 1992; Kobayashi K *et al*, 1993), pulmón (Miyake M *et al*, 1992; Matsumoto H *et al*, 1993; Pantel K *et al*, 1993; Ogawa J *et al*, 1995), colorrectal (Brown A *et al*, 1983; Abe K *et al*, 1986; Kim YS *et al*, 1986; Cooper HS *et al*, 1987), hepático (Wakabayashi M *et al*, 1995) y cáncer de mama (Narita T *et al*, 1996).

## Antígenos tumorales asociados al CCR

### Mucinas relacionadas con el CCR

#### MUC1

La sobreexpresión de MUC1, su localización intracelular aberrante y los cambios en la glicosilación de la proteína, encontrados en muchos carcinomas humanos, confieren crecimiento independiente que facilita la tumorigénesis (Byrd JC *et al*, 2004). Asimismo, la sobreexpresión de MUC1 brinda resistencia a la apoptosis inducida por el estrés oxidativo y a los agentes anticancerígenos (Yin L *et al*, 2007).

Varias líneas de evidencia sustentan el rol de las mucinas y particularmente la MUC1 en el cáncer colorrectal (CCR). Se ha hallado una correlación positiva entre la secreción de mucinas y la proliferación, invasión, metástasis y el mal pronóstico (Bresalier RS *et al*, 1991; Niv Y *et al*, 1995; Duncan TJ *et al*, 2007). En este sentido, se observó que cuando MUC1 se expresa en lo más profundo de la porción invasora de un tumor, la invasión linfática y venosa es mayor así como también la aparición de metástasis hepáticas y ganglionares.

La interacción de la cola citoplasmática de la MUC1 con  $\beta$ -*catenina* tiene un efecto significativo en el ciclo celular y la proliferación. Este proceso difícilmente ocurre en el epitelio normal polarizado debido a que MUC1 se expresa en la superficie apical mientras que  $\beta$ -*catenina* se encuentra en la superficie lateral. La

pérdida de polaridad durante la transformación neoplásica crea un ambiente facilitador para la interacción entre MUC1 y  $\beta$ -catenina (Carraway KL *et al*, 2007).

La  $\beta$ -catenina puede unirse directamente a la secuencia del aminoácido 50-SAGNGGSSL-59 del dominio citoplasmático de MUC1 (un sitio similar de unión es encontrado para E-caderina y APC). La enzima quinasa glucógeno sintetasa 3- $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) inhibe la unión de MUC1 con  $\beta$ -catenina mediante la fosforilación en el sitio S44; asimismo, esta enzima puede degradar directamente a  $\beta$ -catenina. La ruptura de la unión  $\beta$ -catenina con MUC1 suprimiría la capacidad de crecimiento celular, indicando que esta unión es un componente crítico para la actividad tumorigénica (Niv Y *et al*, 2008).

MUC1 también protege a  $\beta$ -catenina de la degradación por GSK3 $\beta$  y cuando ambas se encuentran en el núcleo co-activan la transcripción de genes “blanco” (Huang L *et al*, 2003, 2005; Baldus SE *et al*, 2004). La unión MUC1- $\beta$ -catenina suprime la capacidad de unión de  $\beta$ -catenina con E-caderina llevando a una ruptura de la unión célula-célula. La enzima GSK3 $\beta$  también media la ruptura de éste complejo restaurando así la interacción E-caderina/ $\beta$ -catenina (Li Y *et al*, 1998)

En las células malignas, las cuales se sabe que pierden su polaridad, se puede hallar expresión de MUC1 tanto en la superficie apical como en las zonas basales y laterales de la célula. La interacción competitiva entre MUC1 y E-caderina a través de la unión a  $\beta$ -catenina, rompe la interacción célula-célula mediada por E-caderina. Además, el complejo MUC1- $\beta$ -catenina puede entrar al núcleo incrementando la proliferación celular y la probabilidad de metástasis (Baldus SE *et al*, 2004). El mecanismo exacto por el cual MUC1 está asociada a la proliferación celular y a la carcinogénesis no ha sido todavía bien dilucidado.

Se cree que MUC1 es un receptor de membrana el cual mantiene la progresión del ciclo celular, pero por otra parte, también puede aumentar la apoptosis. La activación de MUC1 resultaría de la fosforilación de la tirosina en la cola citoplasmática y de la unión a  $\beta$ -catenina. Esto llevaría a prevenir la unión de  $\beta$ -catenina con E-caderina (Shin SK, *et al* 2007).

Empleando un análisis uni y multivariado de sobrevida en pacientes con cáncer colorrectal, S. E. Baldus y colaboradores (2002) revelaron que MUC1 es un marcador independiente de mal pronóstico ( $P < 0.0001$ ,  $n = 97$ ). En este trabajo la expresión de *sialil Lewis a* y *x* fue asociada con menor sobrevida, especialmente en aquellos pacientes que expresaron el antígeno en más del 35% del área tumoral.



MUC1 también se halló asociada con la progresión tumoral y el grado histológico. Por otra parte, la expresión de *sialil Lewis x* en los ganglios linfáticos se correlacionó con progresión de enfermedad y con el grado histológico; estos mismos parámetros no se pudieron asociar con la expresión de *sialil Lewis a*.

### **MUC2**

En diferentes análisis inmunohistoquímicos acerca de la expresión de mucinas en el cáncer colorrectal se encontró que la expresión de MUC1 está relacionado con un pobre pronóstico, mientras que MUC2 está relacionada con un pronóstico favorable tanto en cáncer de páncreas, vía biliar intrahepática, estómago, ampolla de Vater como también en el cáncer de mama (Osako M *et al*, 1993; Yamáshita K *et al*, 1993; Utsunomiya T *et al*, 1998; Yonezawa S *et al*, 1997; Yonezawa S *et al*, 1997, Kitamura H *et al*, 1996; Matsukita S *et al*, 2003). En los 58 casos de cáncer colorrectal analizados por A. Li y colaboradores (2001) la expresión de MUC1 se halló aumentada en carcinomas avanzados, mientras que la expresión de MUC2 se encontró disminuida.

En estudios previos realizados en cáncer colorrectal, se observó que la expresión de MUC1 está relacionada con la progresión y metástasis (Nakamori S *et al*, 1994), mientras que la disminución de la expresión de MUC2 está asociada con el comportamiento metastásico. Christoph Hanski y colaboradores (1997) compararon la expresión génica de MUC2 en el tejido normal, tumor primario y en la metástasis y hallaron una baja expresión génica en los tumores primarios y metastásicos; el gen se encontró fuertemente reprimido en las metástasis hepáticas y ganglionares de carcinomas colorrectales. En este estudio, también se pudo encontrar que la metilación aumentada de la región promotora del gen MUC2 era concomitante con la disminución de la expresión de MUC2 por las células cancerígenas. Los últimos estudios realizados por Y. Y. Li y colaboradores (2009) revelan que la infiltración tumoral por macrófagos también ejercería efectos en la expresión de mucinas. La IL-6 producida por los macrófagos periféricos del sitio tumoral favorecería la regulación positiva de MUC1 y el descenso de MUC2 en las células tumorales; esto último generaría un ambiente favorable para la propagación del cáncer.

Mizoshita T. y colaboradores (2007) sugirieron que la reducción de la expresión de MUC2 podría estar asociada con la aparición y progresión de cáncer colorrectal en ambas secuencias adenoma-carcinoma y carcinogénesis de novo.

### **MUC5AC**

En un estudio realizado por A. E. Biemer-Hüttmann y colaboradores (1999) en pólipos hiperplásicos, adenomas serrados y adenomas convencionales de tejido colorrectal, se observó expresión de MUC5AC en el 60% de los adenomas y sólo un 20% en las muestras de tejido normal. Tanto los pólipos hiperplásicos como los adenomas serrados expresaron un marcado aumento de MUC5AC. Estos resultados pudieron ser reproducidos en el estudio realizado por S. Percinel y colaboradores (2007) quienes observaron una alta expresión de MU5AC en los adenomas serrados y un incremento de su expresión en forma paralela con la progresión neoplásica.

Asimismo, se ha encontrado que la expresión de MUC5AC decrece significativamente con la progresión neoplásica acorde a la secuencia adenoma tubular/tubulovelloso-carcinoma. Los carcinomas con componentes de adenomas vellosos presentan mayor expresión de MUC5AC que su contraparte, lo cual sugiere la posibilidad de diferentes vías de transformación maligna (Mozoshita T *et al*, 2007)

Se ha visto en 22 muestras de adenomas vellosos rectosigmoideos que la expresión de MUC5AC es más intensa en los adenomas con un grado de displasia leve en comparación con aquellos casos con displasias severas (Bara J *et al*, 1991; Buisine MP *et al*, 1996; Bartman AE *et al*, 1999; Lau SK *et al*, 2004).

Menos del 30% de los cánceres colorrectales expresan MUC5AC (Bara J *et al*, 1980; Lau SK *et al*, 2004). Sin embargo, en un estudio inmunohistoquímico realizado por B Kocer y colaboradores (2002) hallaron expresión de novo de MUC5AC en 63,8% (23/36) de los cánceres colorrectales. La expresión de MUC5AC se detectó más en tumores bien y moderadamente diferenciados que en aquellos pobremente diferenciados.

Belma Kocer y colaboradores (2002) realizaron otro estudio en 41 muestras de pacientes con CCR, 21 ganglios linfáticos metastásicos por CCR y en 41 muestras de tejido normal; se halló expresión de MUC5AC en 34,1% de las

muestras tumorales, 19% en los ganglios metastásicos y en 24,4% de los tejidos normales. También pudieron observar que el 60% de los carcinomas mucinosos expresaban dicho antígeno y que la expresión era baja en los pacientes mayores de 60 años, en tumores localizados en el recto y en aquellos que presentaban recurrencia o metástasis en el período post-quirúrgico. Este estudio también demostró que los pacientes con ausencia de expresión de MUC5AC presentaron una menor sobrevida (medida en tiempo libre de enfermedad y sobrevida global) respecto de los pacientes que expresaban dicho antígeno.

Recientemente, el mismo grupo de trabajo (Kocer B *et al*, 2006) demostró niveles elevados de anticuerpos circulantes contra MUC5AC en pacientes con parámetros clínicos de mal pronóstico (tumores colónicos, estadio avanzado, presencia de metástasis al momento del diagnóstico, tumores pobremente diferenciados y mucinosos). Los pacientes con ausencia de anticuerpos anti-MUC5AC séricos presentaron un tiempo libre de enfermedad y una sobrevida global de 19,1 meses y 50 meses, respectivamente en comparación con aquellos pacientes con dicho anticuerpo (10,3 meses y 33,8 meses).

### **Antígenos carbohidratos asociados a mucinas relacionados con el CCR**

#### ***Tn***

El colon normal raramente expresa *Tn*; en contraste, 75% de los cánceres de colon lo hacen (Itzkowitz SH *et al*, 1989).

Hirohashi S. y colaboradores (1985) fueron los primeros en desarrollar dos anticuerpos que reconocen a *Tn* pero con reacción cruzada con el grupo sanguíneo A, y con reacción fuerte en cáncer de colon pero no en mucosa colónica normal.

Itzkowitz S. H. y colaboradores (1992) encontraron expresión de *Tn* en la totalidad de 24 pólipos hiperplásicos estudiados (expresión predominantemente supranuclear, más específicamente en la región del aparato de Golgi) y en 79/79 pólipos adenomatosos; en estos últimos se halló que, en la displasia moderada, la tinción fue supranuclear mientras que en la displasia severa la tinción incluyó a todo el citoplasma.

Asimismo, Y. Cao y colaboradores (1997) hallaron expresión de *Tn* en adenomas de diferentes grados de displasia. La expresión de este antígeno se correlacionaría con el potencial maligno de los mismos.

Poco se conoce acerca de los factores que controlan la expresión de *Tn* en tejido colónico o en líneas celulares. Respecto a esto último, un estudio realizado en líneas celulares de cáncer de colon halló expresión del antígeno *Tn* en todas (Dahiya R *et al*, 1992). La actividad de la enzima *sialosiltransferasa Tn* (la cual participa en la formación de *sialil-Tn*) fue mayor en líneas celulares más mucinosas; en cambio, la actividad *transferasa T* (la cual está involucrada en la formación de *Tn*) fue mayor en las líneas celulares menos mucinosas. Asimismo, la actividad enzimática de las tres glicosiltransferasas fue hallada tanto en el tejido normal como cancerígeno, lo cual sugeriría que en los tejidos normales la ausencia de *Tn* se debería al enmascaramiento antigénico (Dahiya R *et al*, 1992).

Con respecto al tipo histológico del cáncer de colon, *Tn* se encontró más expresado en tumores pobremente diferenciados y mucinosos (Springer GF *et al*, 1984; Itzkowitz SH *et al*, 1989).

Un análisis estadístico realizado en 60 casos de CCR, 15 HNPCC y 30 de mucosa colónica normal encontró que los pacientes con HNPCC tenían mayor expresión de *Tn* respecto a los pacientes con CCR esporádico sugiriendo una mayor actividad de la enzima  $\beta$ -1,3galactosiltransferasa en los pacientes con HNPCC (Giuffrè G *et al*, 1996).

### ***Sialil Lewis a***

El *sialil Lewis a* se ha hallado elevado en la circulación sanguínea tanto en individuos sanos como en pacientes con patología benigna. Únicamente un 1-4% de los sujetos sanos presenta cifras de *sialil Lewis a* superiores al límite mayor de la normalidad (37 U/ml). Un porcentaje más elevado de falsos positivos ha sido descrito en pacientes con diversas enfermedades benignas tales como hepatobiliares y pancreáticas.

Los estudios preliminares referentes a la utilidad del *sialil Lewis a* en el cáncer colorrectal destacaron una elevada sensibilidad, así como su complementariedad con el antígeno carcinoembrionario (CEA), marcador tumoral de elección en esta localización tumoral. Sears HF y colaboradores (1982)

observaron valores anormales de *sialil Lewis a* en el 80% de los pacientes con recidiva de su enfermedad. Estudios posteriores no han ratificado este resultado, sino que, por el contrario, han coincidido en señalar la escasa utilidad del *sialil Lewis a* en el seguimiento de pacientes con cáncer colorrectal. La sensibilidad del *sialil Lewis a* es menor que la del CEA (35 frente a 61%) y además, aportaría poca información adicional a la obtenida con la cuantificación aislada de CEA (Filella X *et al*, 1994).

Un estudio realizado en 21 muestras de mucosa colorrectal normal, 113 pólipos adenomatosos y 21 adenocarcinomas halló una mayor expresión tisular en los pólipos adenomatosos y en los adenocarcinomas. Esta expresión varió de acuerdo al tamaño del pólipo, el tipo histológico y el grado de displasia (se encontró mayor expresión en las displasias severas respecto a las displasias leves) (Salces I *et al*, 2004).

En la actualidad, la utilidad del *sialil Lewis a* como marcador tumoral sérico en el cáncer colorrectal se reduce a su uso pronóstico. Diversos trabajos indican que la determinación de *sialil Lewis a* en suero o en tejido tumoral permite delimitar grupos con distinto pronóstico. El *sialil Lewis a* tiene valor pronóstico independientemente del estadio de Duke, siendo de peor pronóstico en los pacientes con valores pre-operatorios elevados (Filella X *et al*, 1992).

Como se mencionó anteriormente, el *sialil Lewis a* es un marcador tumoral de baja sensibilidad y especificidad ya que no sólo puede estar ausente en lesiones preneoplásicas y en estadios tempranos del cáncer, sino también puede no ser hallado en el suero de pacientes con tumores avanzados. Esta baja sensibilidad podría deberse a que las células tumorales pueden ser tan indiferenciadas que perderían su capacidad para sintetizar o segregar la proteína tumoral (Fischbach W *et al*, 1988; Imamura Y *et al*, 1990). Su especificidad también es baja dado que puede estar elevado en otros cánceres como los de páncreas, vesícula biliar, hígado, estómago y de mama.

A pesar de lo expuesto anteriormente, se encontró una relación entre la expresión de *sialil Lewis a* y el pronóstico en pacientes con CCR. Nakayama T. y colaboradores (1997) al analizar los valores sanguíneos y la expresión de este antígeno en 121 muestras de pacientes con CCR hallaron que la expresión tumoral positiva, los niveles pre y post-quirúrgicos elevados fueron todos predictivos de mayor mortalidad por cáncer. Los pacientes con los tres parámetros negativos

tuvieron una sobrevida a los 5 años de 97,1%; en contraste, aquellos con los tres parámetros positivos la sobrevida fue del 42,8% y la recurrencia del 62,5%. De la misma manera, T. Nozoe y colaboradores (2006) observaron que la información combinada de los niveles séricos pre-quirúrgicos tanto de CEA como de *sialil Lewis a* podrían constituir un indicador pronóstico independiente, no así cuando falta la información de uno de ellos.

Un estudio realizado por G. Gebauer y colaboradores (1997), en pacientes con recidiva de cáncer colorrectal, observaron que los mismos presentaron niveles séricos pre-operatorios más elevados de *sialil Lewis a* cuando había mayor expresión tisular de éste antígeno. Por otra parte, en 63 pacientes con CCR se halló una probabilidad de recaída de 4,2 veces más cuando había una concentración de *sialil Lewis a* citoplasmática de 5000 U/mg, y se elevaba a 9,5 veces más cuando el tumor estaba localizado en el recto. Por otra parte, se observó en los pacientes con ganglios linfáticos metastásicos presentaron mayores niveles sanguíneos de dicho antígeno (Morales-Gutierrez C *et al*, 1999).

Más recientemente, un trabajo realizado por Park I. J. y colaboradores (2009) demostró que el nivel pre-quirúrgico de *sialil Lewis a* constituye un factor pronóstico de recurrencia independiente. De los 1109 pacientes con CCR analizados, el 21,4% presentó niveles elevados post-quirúrgicos de dicho antígeno y una mayor tendencia a presentar metástasis peritoneal.

### **Lewis x**

Se han hallado resultados contradictorios respecto a la expresión de *Lewis x* en el tejido normal. Algunos grupos de investigadores han encontrado una baja expresión de éste antígeno en el tejido de colon normal (Wolf BC *et al*, 1989; Salem RR *et al*, 1993); sin embargo, otros, han hallaron una expresión alta de *Lewis x* en tejido normal. Gong E. y colaboradores (1985) encontraron en la mucosa normal alejada del carcinoma expresión en la base de las criptas de Lieberkühn; así mismo, en la mucosa normal adyacente al carcinoma dicha expresión se halló tanto en la base como en la zona apical de las criptas en el 93,3% de los casos. En los adenomas esta expresión se halló en todos los casos. (Shi ZR *et al*, 1984; Gong E *et al*, 1985). Estos datos sugieren que la expresión de *Lewis x* estaría relacionada con la transformación y progresión al cáncer colorrectal.

Asimismo, T. Nakagoe y colaboradores (1994) también hallaron expresión de *Lewis x* en 40/42 (95,2%) muestras de mucosa normal colónica, en 79/87 (90,8%) de los cánceres colónicos analizados. También observaron que la tinción de *Lewis x* fue decreciendo en lesiones metastásicas comparadas con la encontrada en los carcinomas primarios, contrariamente a lo descrito con *sialil Lewis x*. Más adelante, en otro trabajo del mismo autor (2000), demostró que 66/101 (65,4%) de los pacientes con CCR, sometidos a resección quirúrgica, expresaron *Lewis x*. No hubo relación entre la expresión de *Lewis x* con la edad, sexo, localización tumoral, tamaño, tipo histológico, TNM y estadio. La sobrevida luego de la cirugía fue más corta en los pacientes que presentaron tumores que expresaron tanto *Lewis x* ( $P=0.023$ ) como *sialil Lewis x* ( $P=0.0001$ ). La regresión de Cox reveló que tanto la expresión de *Lewis x* como de *sialil Lewis x*, independientemente del estadio y grado histológico, fueron variables pronósticas para la sobrevida. El autor concluyó que la expresión tanto de *Lewis x* como de *sialil Lewis x* estaría asociada con mal pronóstico.

Por otra parte, A. K. Singhal y colaboradores (1990) demostraron, en pacientes con CCR, que los niveles de *Lewis x* plasmáticos tendrían relación con el estadio (principalmente con el estadio Duke's C), tanto luego de la cirugía como durante el seguimiento post-operatorio.

### ***Sialil Lewis x***

Patricia Grabowski y colaboradores (2000) analizaron la expresión de *sialil Lewis x* en 182 pacientes con cáncer colorrectal y hallaron, mediante análisis univariado, que la sobrevida de los pacientes se veía influenciada por dicha expresión. Sólo el estadio pT4 y la fuerte expresión de *sialil Lewis x* se asociaron con alto riesgo de muerte por cáncer. Un análisis separado para pacientes con estadio II, III y IV reveló que los pacientes con estadio II y III tenían una sobrevida significativamente menor a los 5 años si sus tumores expresaban fuertemente *sialil Lewis x*. Sin embargo, la expresión de dicho marcador no afectó el curso de la enfermedad en pacientes que habían desarrollado metástasis. Este dato estaría en concordancia con el rol sugerido de *sialil Lewis x* para el desarrollo de metástasis (Grabowski P *et al*, 2004). Este mismo trabajo concluye en que la fuerte expresión de *sialil Lewis x* en carcinomas colorrectales se correlacionaría con la progresión

de la enfermedad y que el mismo constituiría un factor pronóstico desfavorable independiente luego de la resección quirúrgica curativa del tumor primario.

### **Lewis y**

Se ha demostrado una gran expresión de *Lewis y* en el tejido colónico normal especialmente en el íleon, ciego y colon ascendente con un mínimo de tinción en el resto del colon y en el recto.

El 83% de los adenomas expresan *Lewis y*, aproximadamente un 70% más de expresión que en el tejido normal, mientras que sólo el 25% de los pólipos metaplásicos muestran una expresión aumentada de *Lewis y*. La expresión en adenomas se correlacionaría con el tamaño, el grado de displasia así como con el tipo histológico, y no así con la localización ni con la morfología del adenoma. El 83% de los adenomas con displasia severa presentan un aumento de la expresión de *Lewis y*; por el contrario, en la displasia moderada o leve la expresión estaría incrementada en el 66%. Estos hallazgos sugieren que la expresión de *Lewis y* en lesiones colorrectales preneoplásicas estaría asociada con el potencial maligno de la lesión (Kim YS *et al*, 1986; Zamcheck N *et al*, 1988; Waldok A *et al*, 1989).

Jacques Bara y colaboradores (1988) encontraron expresión de *Lewis y* en 91% (41/45) de los tumores colorrectales distales y 43% (15/35) de los tumores cecales, independientemente del fenotipo sanguíneo ABO al cual habitualmente está relacionado. Otro estudio realizado por K. Abe y colaboradores (1986) demostró una fuerte expresión de *Lewis y* en 24/25 muestras de adenocarcinomas colorrectales independientemente de su localización primaria. Asimismo, los cánceres colorrectales bien o moderadamente diferenciados expresarían niveles altos de *Lewis y* (Nakasaki H *et al*, 1989).



---

## Otros antígenos relacionados con el CCR

### Antígeno carcinoembrionario

El antígeno carcinoembrionario (CEA) fue primeramente descrito en 1965 por Gold y Freedman; ellos identificaron un antígeno que se encontraba presente tanto en el colon fetal como en adenocarcinoma colónico pero que parecía estar ausente en el colon del adulto sano. Dado que la proteína fue detectada sólo en tejido embrionario y en cáncer, recibió el nombre de antígeno carcinoembrionario (CEA). Thomson J.A. y colaboradores (1991) fueron los primeros en informar elevados niveles séricos de CEA en 35/36 (97,2%) pacientes con cáncer colorrectal. Por el contrario, no fueron encontrados valores altos en sujetos sanos, mujeres embarazadas, pacientes con tumores malignos no gastrointestinales o en diferentes enfermedades benignas gastrointestinales. Después de treinta años de su detección en sangre, el CEA sigue siendo uno de los marcadores tumorales más ampliamente usados en todo el mundo y ciertamente el más usado en CCR.

El CEA se encuentra clasificado como un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Thomas P *et al*, 1990). Esta familia de genes codifica también proteínas de adhesión tales como ICAM-1 (Thompson JA *et al*, 1991).

En los seres humanos, la familia del gen CEA se encuentra en el cromosoma 19q y compromete 29 genes. El CEA aislado de metástasis hepáticas consiste en una glicoproteína que contiene: 60% de carbohidratos y un peso molecular de 180-200kDa (Thomas P *et al*, 1990). Presenta además una gran heterogeneidad, la cual parece ser debida a su cadena de carbohidratos, la cual está compuesta por manosa, galactosa, N-acetilglucosamina, fucosa y ácido siálico (Thomas P *et al*, 1990).

Dada la similitud del CEA con ciertas proteínas relacionadas con inmunoglobulinas, tales como ICAM-1 e ICAM-2, se ha sugerido que el CEA podría actuar como una molécula de adhesión. Debido a que las alteraciones en la adhesión estarían involucradas en la invasión tumoral y la metástasis, se piensa que el CEA jugaría un rol en este proceso (Jessup JM *et al*, 1989). Hostetter R. B. y colaboradores (1990) demostraron, mediante el transplante de cáncer colorrectal a ratones atímicos, que el número de metástasis aumentó de 2% a 48% luego de la inyección de CEA.

La concentración plasmática de CEA en pacientes con cáncer colorrectal puede estar afectada de acuerdo a los siguientes factores:

- el estadio tumoral: E I 28%, E II 45%, E III, 75% y E IV, 84% (Wanebo HJ *et al*, 1978);
- el grado histológico: los tumores bien diferenciados producen más CEA que los pobremente diferenciados (Rieger A *et al*, 1975, Goslin R *et al*, 1981; Bhatnagar J *et al*, 1999);
- el estado hepático: el sitio primario de metabolismo del CEA es el hígado. Las células de Kupffer fagocitan el CEA y lo modifican removiéndole el residuo de ácido siálico. El CEA asialilado es endocitado por células del parénquima hepático donde es degradado. En enfermedades benignas donde falla la función hepática, el clearance de CEA puede estar afectado, haciendo que aumente los niveles de CEA plasmático (Begent RH *et al*, 1984; Thomas P *et al*, 1990);
- el sitio tumoral en el colon: los pacientes con tumores en colon izquierdo tienen mayores valores de CEA que aquellos con tumores en el lado derecho (Slater G *et al*, 1979; Hostetter RB *et al*, 1990);
- la presencia o ausencia de obstrucción intestinal: se ha demostrado que la obstrucción intestinal aumenta *per se* los valores de CEA plasmático en pacientes con cáncer colorrectal, cuando se produce la descompresión este valor baja (Sugarbaker PH *et al*, 1976);
- el hábito tabáquico: los fumadores tienen concentraciones sanguíneas más elevadas de CEA (Wilson APM *et al*, 1999);
- el estado de ploidía tumoral: los pacientes con aneuploidía en el cáncer colorrectal producen mayores concentraciones de CEA que los pacientes con patrón diploide (Rognum T *et al*, 1986).

Múltiples estudios han demostrado que los pacientes con altas concentraciones preoperatorias de CEA tienen un mal pronóstico respecto a aquellos con bajas concentraciones (Grem J *et al*, 1997).

El impacto pronóstico del CEA ha sido demostrado tanto en el estadio III como en el estadio IV; sin embargo, en el estadio II dicho impacto permanece poco claro. Al menos en 7 diferentes estudios han investigado CEA en pacientes con estadio II. Cinco de estos estudios, tres retrospectivos (Wanebo HJ *et al*, 1978;

Blake KE *et al*, 1982; Chu D *et al*, 1991) y dos estudios prospectivos (Harrison LE *et al*, 1997; Carriquiry LA *et al*, 1999) han predicho el valor pronóstico negativo de valores elevados de CEA plasmático. Los otros dos estudios remanentes (Moertel CG *et al*, 1986; Carpelan-Holmstrom M *et al*, 1996) no han encontrado dicha relación. El estudio de C. G. Moertel y colaboradores (1986) realizado en 319 pacientes tratados quirúrgicamente (272 de ellos con intento curativo) no encontró una relación estadísticamente significativa entre el nivel de CEA prequirúrgico y la supervivencia de los pacientes con estadio II, tampoco lo halló en el estadio I ó III con uno de tres ganglios metastásicos. Aunque este punto aun no ha sido resuelto, futuros estudios de este marcador obtenido antes de la cirugía podrían ayudar a identificar a un subgrupo de pacientes en el estadio II que se beneficiaría con una quimioterapia adyuvante.

Aunque pocos trabajos han sido llevados a cabo para investigar el valor pronóstico del CEA post-operatorio, los trabajos realizados hasta ahora sugieren que altos valores de CEA en ese momento podrían predecir una evolución adversa. Luego de una resección quirúrgica del cáncer colorrectal, los valores elevados de CEA generalmente alcanzan valores normales dentro de 4-6 semanas, si persisten elevados más allá de las 6 semanas es posible que se encuentre ante una enfermedad residual persistente o una temprana recurrencia (Filella X *et al*, 1994).

### ***β-catenina***

La alteración de la regulación de *β-catenina* es de gran importancia en el desarrollo de diversos tumores humanos. De la misma manera, MUC1 está sobreexpresada en forma aberrante en la mayoría de los carcinomas humanos y usualmente se encuentra asociada a *β-catenina*. Sin embargo, el significado funcional de esta asociación aún no ha sido bien dilucidado.

Un estudio realizado por L. Huang y colaboradores (2005) en CCR demostró que la presencia de MUC1 en las células tumorales incrementaba los niveles de *β-catenina* en el citoplasma y en el núcleo. Sus resultados postularon que MUC1 podría bloquear a la quinasa *glucógenosintetasa 3β* (GSK3β) la cual fosforila a la *β-catenina* para su posterior degradación proteosómica, estabilizando de esta manera la *β-catenina* citoplasmática. La interacción entre MUC1 y *β-catenina* citoplasmática incrementaría así los niveles de *β-catenina* desfosforilada

citoplasmática lo cual le permitiría a ésta dirigirse al núcleo e interactuar con ciertos promotores oncogénicos (Korinek V *et al*, 1997; Morin PJ *et al*, 1997) favoreciendo finalmente el fenotipo tumoral del CCR.

La intensidad de la tinción citoplasmática de este antígeno es mayor en adenomas que en mucosa normal, independientemente del tamaño del adenoma. Aunque la  $\beta$ -*catenina* citoplasmática es frecuentemente expresada en niveles altos en tumores invasores, esta característica no se correlacionó con su expresión nuclear. Asimismo, es probable que la acumulación citoplasmática de  $\beta$ -*catenina* comience en el estadio de adenoma, pero aún permanece incierto si esta acumulación es causa o efecto de la progresión de adenoma a cáncer (Kobayashi M *et al*, 2000).

Por otra parte, en un estudio realizado en ratas con cáncer de colon inducido con 1,2 dimetiltrihidrazina (DMH), se observó que luego de las 8 semanas de la inyección con DMH, el 20% de las criptas de Lieberkühn que presentaban acumulación de  $\beta$ -*catenina* habían disminuido la expresión de MUC2 en un 20%, mientras que la MUC5AC había aumentado en un 33%. Luego de 36 semanas de la inyección con DMH, el 43% de las criptas que presentaban acumulación de  $\beta$ -*catenina* habían disminuido aún más la expresión de MUC2 mientras que la de MUC5AC había aumentado a un 90%. Similares hallazgos se mostraron en lesiones colónicas pre-neoplásicas humanas (Zoghbi *et al*, 2007).

También se ha demostrado una fuerte expresión de  $\beta$ -*catenina* en el cáncer de colon izquierdo y rectal (Kapiteijn E *et al*, 2001; Zhang B *et al*, 2003). Baldus y colaboradores observaron un mayor índice expresión de  $\beta$ -*catenina* nuclear en el frente de invasión tumoral comparado con investigaciones realizadas previamente (Gunther K *et al*, 1998; Chung GG *et al*, 2001; Zhang B *et al*, 2003; Baldus SE *et al*, 2004). Cerca del 30% de los pacientes coexpresaron MUC1 y  $\beta$ -*catenina* con un pronóstico significativamente peor comparado con aquellos que no exhibieron esa expresión (Baldus SE *et al*, 2004).

La asociación entre  $\beta$ -*catenina* con el estadio y/o metástasis es contradictoria. Mientras un grupo de investigadores hallaron una correlación entre la acumulación de  $\beta$ -*catenina* nuclear con el grado tumoral y/o la metástasis (Zhang B *et al*, 2003), otros no pudieron demostrar tal relación (Gunther K *et al*, 1998; Chung GG *et al*, 2001; Cheah PY *et al*, 2002). Respecto al pronóstico, un análisis realizado en pacientes con mayor expresión de  $\beta$ -*catenina* nuclear en el frente

tumoral mostró una sobrevida significativamente menor (Balduz SE *et al*, 2004) coincidentemente con otro estudio previo (Cheah PY *et al*, 2002). Por otra parte, otros autores publicaron resultados no concluyentes respecto a este tema (Gunther K *et al*, 1998; Chung GG *et al*, 2001).

Kobayashi M. y colaboradores (2000) observaron una sobreexpresión nuclear de  $\beta$ -catenina en 7/20 (35%) de los tumores intramucosos y en 23/35 (42%) de los tumores invasores; ésto no fue observado en los adenomas tanto de los casos de enfermedad esporádica o de FAP. Un trabajo publicado previamente halló sobreexpresión nuclear sólo en 32/154 (20,7%) de los tumores invasores (Günther K *et al*, 1998). Los autores sugieren que la translocación nuclear de  $\beta$ -catenina estaría involucrada en la iniciación de tumores intramucosos más que de adenomas, independientemente de la mutación de APC. La discrepancia con los estudios previos (Valizadeh A *et al*, 1997), los cuales mostraban intensa tinción nuclear en adenomas, puede ser debida a la diferencia en la evaluación de la inmunohistoquímica y a los diferentes criterios histológicos empleados para tumores intramurales y adenomas con displasia moderada a severa (Schlemper RJ *et al*, 1998).

Un trabajo realizado por W. Zhang y colaboradores (2008) en 77 CCR halló que la expresión de MUC1 se correlacionó con una disminución en la expresión de  $\beta$ -catenina en la membrana (esta combinación se observó en el 39% de los casos analizados), mientras que no se halló correlación con la  $\beta$ -catenina nuclear. Los pacientes que presentaron la combinación antes mencionada tuvieron una menor sobrevida. En el análisis multivariado realizado, dicha combinación se comportó como un factor independiente predictor de sobrevida.

A pesar de no ser un carbohidrato asociado a mucina ni marcador tumoral actualmente utilizado en el manejo clínico de pacientes con CCR, hemos decidido incorporar este antígeno al presente estudio debido a que el mismo, en combinación con las mucinas estudiadas, podría ser útil para la identificación de un subgrupo de pacientes con mal pronóstico que se beneficiarían con un determinado tratamiento oncológico.

---

## Antígenos tumorales asociados a resistencia al tratamiento quimioterápico

Poco se sabe respecto a la relación entre la expresión de las mucinas y los antígenos carbohidratos asociados a mucinas y la resistencia al tratamiento quimioterápico en los pacientes con CCR.

Un estudio realizado en una línea celular de cáncer colon humano, HT29, adaptada a 5-FU (HT29-5-FU) se observó una expresión más elevada de MUC2 que la línea HT29 no adaptada a dicho citostático; también se demostró una mayor expresión de carbohidratos asociados a mucinas tales como los antígenos *T*, *Tn*, *sialil Tn*, *sialil Lewis a*, *sialil Lewis x* y un significativo aumento en la expresión de marcadores celulares panepiteliales así como de CEA. Asimismo, las células HT29-5-FU mostraron una mayor adhesión a proteínas de adhesión celular tal como la E-selectina. También se halló luego de que estas células se inyectaran en la vena esplénica de ratones atímicos las mismas presentaban propiedades invasoras y un aumento significativo en su capacidad de colonización hepática. Estos resultados sugerirían que la mucina MUC2 podría haber sido seleccionada e inducida en las células HT29-5-FU.

El grado de diferenciación de las células tumorales podría ser responsable de la modificación de ciertas propiedades biológicas de estas células alterando así la regulación de genes de mucinas asociados con diferente síntesis y secreción de mucinas glicoproteicas (Choi SR *et al*, 2000).

Asimismo, E. Leteurtre y colaboradores (2004) han observado que las células HT29-5-FU o aquellas células tratadas con Metotrexato (HT29-MTX) llevarían a la selección de subpoblaciones celulares resistentes a los citostáticos expuestos, manifestando así diferentes fenotipos acorde a la droga o a la concentración de la droga usada. Las células secretoras de moco serían resistentes a 10ul de MTX (HT29-MTX) (Lesuffleur T *et al*, 1990, 1991) y a 10ul de 5-FU (HT29-5-FU) (Lesuffleur T *et al*, 1991). Las células HT29-MTX resistentes, aisladas de una aparente subpoblación homogénea, pueden mostrar un fenotipo del tipo enterocítico (células HT29-5M12) así como un fenotipo secretor de mucus (células HT29-5M21) (Lesuffleur T *et al*, 1998). Es interesante destacar que el clon HT29-5M21 fue más sensible a 5-FU que HT29-5M12 (Lesuffleur T *et al*, 1998). Estos resultados sugieren una posible relación entre el fenotipo celular,

comprobado por la presencia o el tipo de mucus y la resistencia a una droga en particular.

En células HT29 se han identificado tres diferentes fenotipos celulares dependiendo de su resistencia a 5-FU y/o MTX y su expresión de mucinas:

- el clon HT29-5M21, el cual estuvo asociado a resistencia al MTX pero sensible al 5-FU, fueron ricas en MUC5AC y MUC5B (Lesuffleur T *et al*, 1998),
- el clon HT29-5F12 asociado a resistencia a 5-FU pero sensible a MTX, fueron ricas en MUC2 (Lesuffleur T *et al*, 1990, 2004) y
- los clones HT29-5M12 y HT29-5F7 resistentes tanto a MTX como a 5-FU presentaron un fenotipo no secretor de moco, ellas expresaron ARNm para mucinas secretoras y de membrana. La mucina más expresada en HT29-5F7 fue MUC1 mientras que en HT29-5M12 fue MUC5B (Lesuffleur T *et al*, 1998).

Por otra parte, J. Ren y colaboradores (2004) han observado que la mucina MUC1 expresada en líneas celulares de cáncer de pulmón, mama y colon le conferirían a estos tumores resistencia al cisplatino por disminución de la respuesta apoptótica.

Aunque estos resultados sugieren que las mucinas podrían estar involucradas en la resistencia a la quimioterapia, este rol no ha sido aún bien dilucidado.

### **La importancia de encontrar subgrupos poblacionales que se beneficien con un determinado tratamiento quimioterápico**

El pronóstico en el CCR ha mejorado en las últimas décadas debido a los procedimientos quirúrgicos oncológicos estandarizados (Kruschewski M *et al*, 1998; Petersen S *et al*, 1998; Isbister WH *et al*, 1999) y a la quimioterapia post-operatoria, especialmente en aquellos pacientes con estadio III (Moertel CG *et al*, 1995; estudio IMPACT, 1995).

La supervivencia a los 5 años para todos los estadios es del 53% para el cáncer de colon y 46% para el cáncer de recto. Uno de cuatro pacientes tiene metástasis y uno de tres presenta ganglios linfáticos positivos al momento del diagnóstico,

limitando de esta manera la supervivencia a los 5 años a 25% y 50%, respectivamente (Hermanek P *et al*, 1994).

Cerca del 30% de los pacientes tienen invasión de la capa muscular o compromiso de estructuras adyacentes (estadío pT<sub>3/4</sub>) sin metástasis (estadío II, UICC) al momento de la cirugía y son potencialmente curables a través de una resección tumoral radical. Sin embargo, aún para estos pacientes, uno de cada tres sucumbe a la enfermedad dentro de unos pocos años, muchos debido al desarrollo de metástasis (Hermanek P *et al*, 1994).

Estos datos indican que es posible que exista una subpoblación de células tumorales malignas con un alto potencial metastásico, las cuales no son detectables mediante el diagnóstico histopatológico convencional y la clasificación UICC. Constituye, por lo tanto, un objetivo esencial el hallar marcadores moleculares pronósticos útiles que puedan predecir la agresividad de estos tumores y seleccionar a los pacientes para una adecuada quimioterapia adyuvante.



---

## Objetivos

### Objetivo principal

Estudiar la utilidad de MUC1, MUC2, MUC5AC y los antígenos carbohidratos asociados como marcadores tumorales pronósticos y predictivos de respuesta al tratamiento en pacientes con cáncer colorrectal.

### Objetivos parciales

- Estudiar la expresión de mucinas y epitopes asociados en tumores colorrectales.
- Relacionar la expresión de mucinas con los procesos de invasión y metástasis.
- Relacionar la expresión de mucinas con parámetros clínicos.
- Evaluar la relación de las mucinas, antígenos carbohidratos asociados y  $\beta$ -*catenina* con la evolución de los pacientes.
- Detectar la presencia de células malignas primitivas y secundarias mediante el estudio de la expresión de mucinas y epitopes asociados en tumores colorrectales.
- Evaluar la expresión de mucinas y antígenos carbohidratos con la respuesta al tratamiento quimioterápico.
- Correlacionar la expresión de mucinas con factores epidemiológicos.



## **Materiales**

## Índice de materiales

Población estudiada.....	88
Selección de pacientes.....	89
Recolección de datos de las Historias Clínicas.....	90
Características de la población estudiada.....	91
Características epidemiológicas.....	91
Presentación clínica.....	92
Localización tumoral.....	93
Características histopatológicas.....	93
Estadificación.....	94
Pacientes con Estadío II con factores de riesgo.....	95
Tratamientos.....	95
Cirugía.....	95
Quimioterapia.....	96
Radioterapia adyuvante.....	97
Respuesta al tratamiento citostático evaluados por criterios R.E.C.I.S.T. ....	97
Sitios metastáticos.....	98
Situación del paciente al final del estudio.....	98
Sobrevida global y tiempo libre de progresión.....	98
Expresión antigénica en los controles.....	98
Tratamiento de las muestras histológicas.....	99
Procesamiento de las muestras.....	99
Preparación de los portaobjetos para las muestras histológicas.....	99
Cortes histológicos.....	99
Muestras séricas.....	100
Anticuerpos utilizados.....	100

## **Población estudiada**

Se incluyeron un total de 90 pacientes con cáncer colorrectal, de los cuales se obtuvieron muestras de tejido tumoral y ganglios linfáticos. Todos los pacientes fueron atendidos en el Servicio de Oncología Clínica del Hospital Interzonal Provincial de Agudos “Dr. José Penna” de Bahía Blanca desde Agosto de 1982 hasta Marzo de 2006.

Se estudiaron 68 muestras de mucosa colorrectal normal y 26 pólipos colorrectales como controles.

El presente trabajo de investigación se encuentra enmarcado dentro del Código de Nüremberg promulgado en 1947, la Declaración Universal de los Derechos Humanos de 1948, la Declaración de Helsinki de 1964 promulgada por la Asociación Médica Mundial, la Propuesta de Normas Éticas Internacionales para las investigaciones biomédicas con sujetos humanos de 1982, las Normas Internacionales publicadas en las Guías de Ética Internacional para Estudios Epidemiológicos publicadas por el Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1991, actualizadas en el 2000, 2002 y 2008 (CIOMS Ginebra, Suiza), y también contemplado tanto en la disposición N° 5330/97 de ANMAT de Argentina (Capítulo II), como en la Ley 11.041 de la Provincia de Buenos Aires. Para la realización del presente trabajo se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes.

La evaluación respecto al “Riesgo” (Ley 11.044. Título 2, Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos, Art. 6) que implicó la realización de esta Tesis Doctoral fue considerada por el Comité de Ética e Investigación del Hospital Interzonal General “Dr. José Penna” de Bahía Blanca, como de “Riesgo Mínimo” para el paciente. Respetando las disposiciones de dicha institución, se incluyó este aspecto en el texto de conformidad del paciente.

El presente trabajo consistió en un estudio de tipo transversal, no experimental, correlacional y retrospectivo.

Se usó para la estadificación de los pacientes los criterios del American Joint Committee on Cancer (AJCC Cancer Staging Manual 6th ed, 2002). La clasificación histopatológica se realizó siguiendo los criterios de la OMS presentado

por JR Jass en 1989, la cual divide a los tumores malignos en bien diferenciado, moderadamente diferenciado, pobremente diferenciado o carcinoma mucinoso.

La sobrevida global (SG) fue medida a partir de la fecha del diagnóstico hasta la fecha de último control o fallecimiento del paciente. El tiempo libre de progresión (TLP) de la enfermedad fue medido desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha de la primera progresión tumoral.

La evaluación de la respuesta al tratamiento se realizó según los criterios presentados en Febrero de 2000 en una publicación realizada por una colaboración internacional en la que participó la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer (EORTC), Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, y el National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group; este conjunto de normas se denominó Response Evaluation Criteria in Solid Tumor (R.E.C.I.S.T.) (Therasse P *et al*, 2000). Los criterios han sido adaptados de los originalmente propuestos por la OMS, los cuales miden el diámetro mayor sólo de la lesión *blanco*, por lo cual se considera: Respuesta Completa (RC): desaparición de todas las lesiones *blanco*; Respuesta Parcial (RP): disminución de <30 % del diámetro más largo de la lesión *blanco*; Progresión de Enfermedad (PE): aumento de > 20% del diámetro más largo de la lesión *blanco*; Enfermedad Estable (EE): ni suficiente reducción para cuantificar como RP ni suficiente incremento como para calificar de PE.

El tiempo de seguimiento de los pacientes fue en promedio de 3.4 años (IC\* 0.1-17.4).

### Selección de pacientes

Los pacientes fueron seleccionados de acuerdo a los siguientes criterios:

- *criterios de inclusión*: ser paciente mayor de 18 años, tener confirmación histológica de cáncer de colon o de recto, presentar cualquier estadio de la enfermedad.
- *criterios de exclusión*: los pacientes con evidencia de otro tumor al momento del diagnóstico de cáncer colorrectal o previos.

\*IC: Intervalo de Confianza

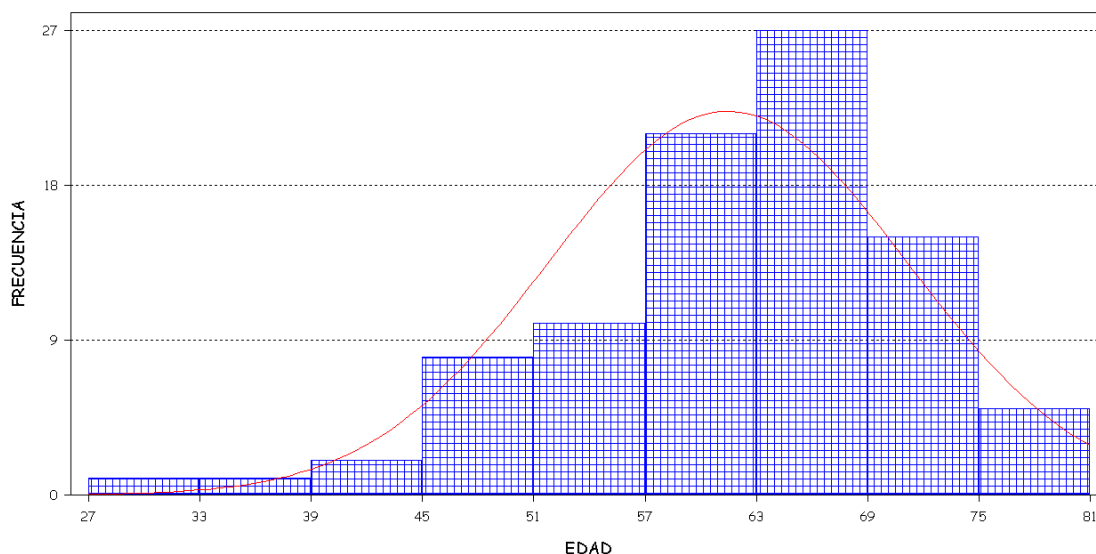
## Recolección de datos de las Historias Clínicas

Se cargaron los datos de las historias clínicas (H.C.) en el sistema Microsoft Access confeccionada para tal fin. Posteriormente se procedió a extraer la información necesaria y volcarla en sistema Microsoft Excel con el cual se realizó el análisis estadístico en el sistema Stastix v.8.

Los datos de las historia clínica incluyeron: fecha de admisión, género, edad, antecedente de cáncer familiar (padre, madre, hijo, hermanos, tíos, múltiples), comorbilidades (diabetes mellitus, hipertensión arterial, úlcera, cardiopatía, alergias, traumatismos, operaciones), hábitos (tabaquismo, alcoholismo), ocupación, fecha del primer síntoma, fecha de la primera consulta, fecha del primer diagnóstico, fecha de la primera recurrencia, tipo de recurrencia, sitio primario tumoral (colon, recto), localización (colon ascendente, colon transverso, colon descendente, colon sigmoides), diagnóstico histopatológico, subtipo, grado histológico, grado nuclear, índice mitótico, invasión linfática, vascular y perineural, necrosis, número de ganglios resecados, número de ganglios positivos, estadio TNM-UICC (primary **T**umor, regional lymph **N**ode, distant **M**etastasis), estadio Duke's, datos personales (peso habitual, peso actual, talla, superficie corporal, índice de masa corporal), deterioro funcional del pacientes (medido con la escala de Karnofsky), tipo de cirugía primaria, fecha de la primera cirugía, enfermedad residual, radioterapia adyuvante, quimioterapia (adyuvante, primera, segunda y tercera línea), fecha de último control, seguimiento (vive, perdido, fallecido), fechas de la primera, segunda o tercera progresión de la enfermedad y sitio metastásico, niveles de CEA y *sialil Lewis a* (CA19-9) pre- y post-quirúrgico.

## Características de la población estudiada

La edad promedio de la población estudiada fue de 61.4 años (DS\* 9,6; IC 28-79) (Figura 2). El 57.8% fueron hombres (n=52) y 42.2% mujeres (n=38). El promedio de tiempo desde el primer síntoma hasta el diagnóstico fue en promedio de 11,5 meses (DS 14,5; IC 0,2-88).



**Figura 2:** Histograma de frecuencia de distribución según la edad.

### Características epidemiológicas

El 14,4% (n=13) de los pacientes presentó algún grado familiar con antecedente de cáncer colorrectal. El 8,0% (n=7) y 23,3 % (n=20) presentó como comorbilidades diabetes mellitus e hipertensión, respectivamente. El 62,8% (n=54) eran fumadores y 39,3% (n=33) tenían hábito alcohólico. Previo al diagnóstico de cáncer colorrectal, al 7,8% (n=7) y 14,4% (n=13) se les habían practicado colecistectomía y apendicetomía, respectivamente.

El promedio de pérdida de peso, diferencia entre el peso del paciente dos meses antes del diagnóstico oncológico y el peso al momento del ingreso del paciente al Servicio de Oncología, fue de 8,6 kg (DS 6,9; IC 0-39). El Índice de Masa Corporal (IMC), adaptado de OMS 2004, al momento del diagnóstico fue de bajo peso (IMC 16,5-18,5) 1,% (n=1), normal (IMC 18,5-24,9) 32,5% (n=25), sobrepeso (IMC 25-29,9) 41,6% (n=32), obesidad clase I (IMC 30-34,9) 16,9%

\*DS: Desvío Standar.



(n=13), obesidad clase II (IMC 35-39,9) 5,2% (n=4) y obesidad clase III (IMC >40) 2,6% (n=2).

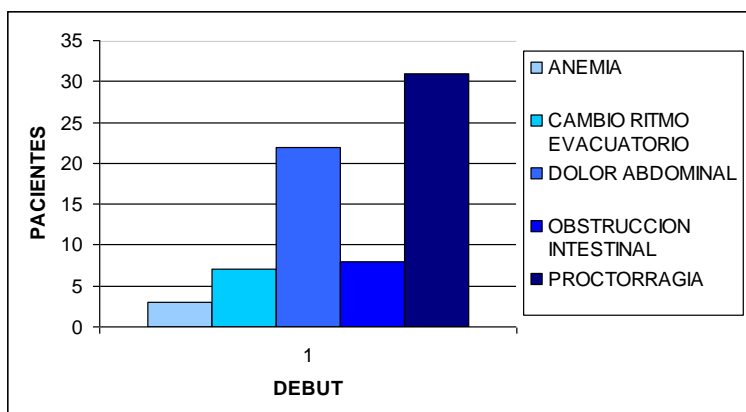
Respecto a las características de las pacientes de género femenino se observó que el 35,6% (n=32) de las pacientes eran menopáusicas, la menarca fue en promedio a los 13 años (DS 1,8; IC 10-19) y la de menopausia a los 49 años (DS 4,9; IC39-68); un promedio de tiempo expuesto a estrógenos de 35 años (DS 35,8; IC 25-51), un promedio de embarazos de 4 (DS 3; IC 1-17) y la media de edad del primer embarazo fue a los 22 años (DS 4,9; IC 14-37).

Para evaluar el deterioro funcional de los pacientes con cáncer se utilizó la puntuación Karnofsky desarrollada en la década de 1940 por David A. Karnofsky y José Burchenal como un intento de medir el aspecto más "subjetivo" de los resultados del tratamiento del cáncer. El índice de Karnofsky va de una escala de 100 al 0, donde de 100 a 80 corresponde a un paciente capaz de llevar a cabo la actividad normal sin necesidad de una atención especial, mientras que de 10 a 0 corresponde al paciente que no puede cuidarse por sí mismo, requiriendo atención institucional u hospitalaria y en el cual la enfermedad puede progresar rápidamente (paciente terminal).

En nuestra población estudiada hallamos los índices de Karnofsky de 100 en el 52,4% (n=43), 90 en el 13,4% (n=11), 80 en el 17,1% (n=14), 70 en el 2,4% (n=2) y 50 en el 7,3% (n=6).

### Presentación clínica

El 43,7% (n=31) de los pacientes debutaron con proctorragia y el 31% (n=22) con dolor abdominal, siendo tas las formas de presentación más frecuentes (Figura 3).



**Figura 3:** Histograma de frecuencias donde se muestra las formas de presentación de CCR.

### Localización y tamaño tumoral

El 68.9% (n=62) de los pacientes presentaron cáncer de colon y el 31.1% (n=28) de recto (Tabla 5).

El tamaño tumoral promedio fue de 5,08 cm (DS 2,4; IC 1-13).

**Tabla 5:** Frecuencia de distribución del sitio de cáncer colorrectal primario según el género.

Localización tumoral	Fem	Masc	n	Total (%)
C. Ascendente	8	13	21	23.3
C. Transverso	3	3	6	6.7
C. Descendente	2	3	5	5.6
C. Sigmoides	15	18	33	36.7
Recto	10	15	25	27.8

### Características histopatológicas

El 65,6%% (n=59) de los pacientes presentaron adenocarcinomas puros, el 23,3% (n=21) adenocarcinomas con componente mucinoso, 10,0% (n=9) carcinoma mucinoso y sólo un paciente presentó carcinoma en células en anillo de sello.

El 72,2% (n=65) de los tumores fueron bien diferenciados, el 18,9% (n=17) fueron moderadamente diferenciados mientras que el 8,9% (n=8) fueron pobremente diferenciados.

El 36,7% (n=33) presentó tumores con un grado nuclear I, el 52,2% (n=47) II y el 11,1% (n=10) III.

El promedio del índice mitótico en los tumores primarios (TP) y en los ganglios linfáticos metastáticos (GLM) se muestra en la Tabla 6.

Las características histopatológicas de los pacientes con cáncer colorrectal estudiados se resumen en la Tabla 7.

**Tabla 6:** Promedio de índice mitótico en relación al estadio.

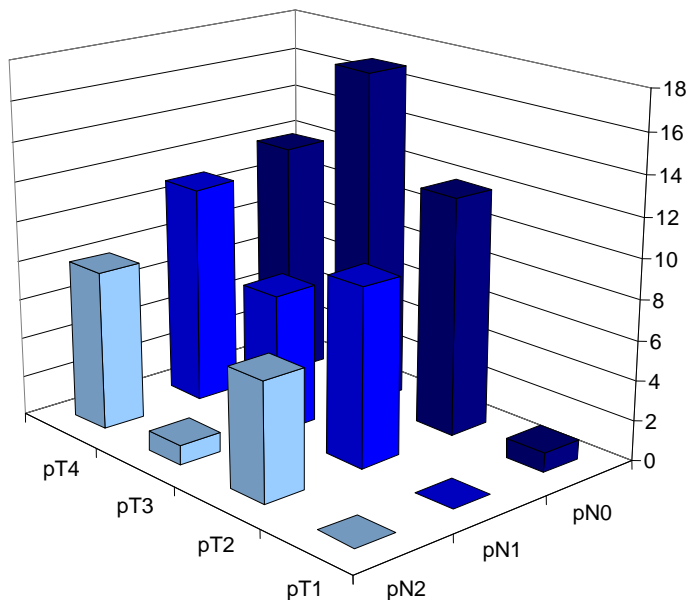
Estadio	TP	GLM
I	44,0	-
IIA	30,2	-
IIB	26,8	-
IIIA	23,2	36,3
IIIB	25,0	18,2
IIIC	32,6	29,1
IV	10,7	28,8

**Tabla 7:** Distribución de frecuencias características histológicas.

Características histopatológicas	n	%
Infiltrante	87	100
Ulcerado	54	80,6
Inv.muscular	84	96,5
Inv.subserosa	13	16,5
Inv.serosa	6	7,5
Inv.grasa	30	37,5
Inv.vascular	5	5,7
Inv.linfática	21	23,8
Inv.perineural	7	8,0
Necrosis	27	31,0

### Estadificación

De acuerdo a los criterios del American Joint Committee on Cancer (AJCC Cancer Staging Manual 6th ed, 2002), los pacientes estadificados presentaron las características presentadas en la Figura 4 y Tabla 8.

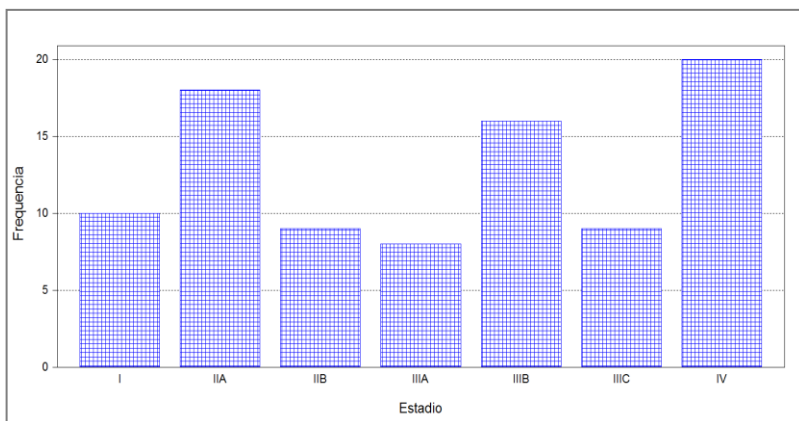


**Tabla 8:** Frecuencia de distribución según el estadio TNM.

	n	%
<b>Estadio pT</b>		
T1	1	1,1
T2	29	32,2
T3	27	30,0
T4	33	36,7
<b>Estadio pN</b>		
N0	42	49,4
N1	28	32,9
N2	15	17,6
<b>Estadio M</b>		
M0	68	77,3
M1	20	22,7

**Figura 4:** Correlación entre el tamaño tumoral y el número de ganglios positivos

El 11,1% (n=10) de los pacientes con CCR presentó estadio I (Figura 5), el 20% (n=18) estadio IIA, el 10% (n=9) estadio IIB, el 8,9% (n=8) estadio IIIA, el 17,8% (n=16) estadio IIIB, el 10% (n=9) estadio IIIC y el 22,2% (n=20) estadio IV.



**Figura 5:** Histograma de frecuencias de distribución de los pacientes por estadio.

El promedio de ganglios resecados fue de 10 (DS 8; IC 0-47), mientras que 12 pacientes presentaron metástasis hepática, 4 peritoneal, 3 ganglios supraclaviculares y un paciente metástasis en partes blandas.

El 46,8% (n=29) de los pacientes presentaron cáncer de colon derecho y 51,6% (n=32) de colon izquierdo, sólo un paciente presentó cáncer de colon bilateral. En la Tabla 8bis se muestra la distribución de la localización tumoral según el estadio tumoral.

**Tabla 8bis:** Frecuencia de distribución de la localización tumoral según el estadio TNM.

Estadio	Bilat.	Dcho.	Izq.	Total
I	0	2	4	6
IIA	0	6	7	13
IIB	0	2	5	7
IIIA	0	2	1	3
IIIB	0	6	8	14
IIIC	0	1	2	3
IV	1	10	5	16
Total	1	29	32	62

### Pacientes con estadio II con factores de riesgo

Como se mencionó anteriormente, dentro de la población de pacientes con CCR con estadio II hay un subgrupo con factores de mal pronóstico. En la Tabla 9 se muestran los porcentajes hallados de cada uno de los factores de mal pronóstico de los pacientes con estadio II.

**Tabla 9:** Frecuencia de la presentación de factores de riesgo en pacientes con estadio II.

Factores de Riesgo	n	%
pT4	9	33,3
Obstrucción y/o perforación	2	10,0
Pobremente diferenciado	1	3,7
Invasión angiolinfática	3	11,5
Invasión perineural	0	0,0
Margen positivo o <12 gl. resecados	6	23,1
Alto nivel preoperatorio de CEA	2	66,6

### Tratamiento

#### Cirugía

En el 78,7% (n=70) de los pacientes se realizó cirugía con intento curativo, mientras que en el 21,3% (n=19) se realizó cirugía paliativa. El tipo de cirugía practicada según el estadio y la localización primaria tumoral se muestra en la Tabla 10. EL 16,7% (n=15) de los pacientes presentaron enfermedad residual (R1)

luego de la cirugía con intento curativo; de éstos sólo a dos pacientes se les realizó una segunda cirugía con intento curativo.

**Tabla 10:** Tabla de frecuencia de distribución de tipos de cirugía según el estadio

Cirugía	Estadio				Total
	I	II	III	IV	
Hemicolectomía	1	11	12	7	31
Hemicolectomía + Tumorectomía*	0	0	0	1	1
Resección Segmentaria	4	13	12	8	37
Resección Segmentaria + Tumorectomía	0	0	0	2	2
Cirugía de Miles	3	6	8	2	19
Laparotomía Exploratoria	0	0	0	2	2

**Tabla 11:** Número de pacientes que recibieron distintos esquemas citostáticos adyuvantes según el estadio y la localización del tumor primario.

Esquema	Estadio			Tumor primario	
	I	II	III	Colon	Recto
5-FU/LV <sup>1</sup>	8	23	29	37	23
5-FU/LV/OXALI <sup>2</sup>	0	2	2	4	0
5-FU/LV/MTX <sup>3</sup>	0	1	0	1	0

<sup>1</sup>5-FU/LV=5-Fluorouracilo/Leucovorina, <sup>2</sup>5-FU/LV/OXALI=5-Fluorouracilo/Leucovorina/Oxaliplatino, <sup>3</sup>5-FU/LV/MTX = 5-Fluorouracilo/Leucovorina/Metotrexato,

**Quimioterapia**

• **Adyuvante:** El 64,6% (n=42) de los pacientes que recibieron quimioterapia

adyuvante (es decir el tratamiento quimioterápico administrado luego de la cirugía curativa) tenían cáncer colon y el 35,3% (n=23) de recto. Los esquemas adyuvantes recibidos en cada estadio se observan en la Tabla 11.

• **De primera línea (1L):** El 67,5% (n=25) de los pacientes que recibieron quimioterapia de 1L, es decir aquellos tratamientos con citostáticos aplicados a los pacientes con enfermedad metastática de inicio o pacientes con estadios I, II o III que presentaron progresión de la enfermedad tenían cáncer de colon y el 32,4% (n=12) de recto. En la Tabla 12 se muestran los diferentes esquemas de citostáticos recibidos.

**Tabla 12:** Número de pacientes que recibieron distintos esquemas citostáticos según la línea de tratamiento.

Esquema	Línea	
	1L	2L
5-FU/LV <sup>1</sup>	30	4
5-FU/LV/OXALI <sup>2</sup>	2	0
5-FU/LV/MTX <sup>3</sup>	5	1
Capecitabina	0	9
Otros <sup>4</sup>	0	1

<sup>1</sup>5-FU/LV=5-Fluorouracilo/Leucovorina, <sup>2</sup>5-FU/LV/OXALI=5-Fluorouracilo/Leucovorina/Oxaliplatino, <sup>3</sup>5-FU/LV/MTX = 5-Fluorouracilo/Leucovorina/Metotrexato, <sup>4</sup>Otros=Otros esquemas.

• **De segunda línea (2L):** Todos aquellos pacientes cuya enfermedad progresó luego del primer tratamiento para estadio IV y aquellos pacientes que recayeron

luego de recibir el tratamiento por recidiva de su enfermedad en estadio I, II y III recibieron tratamiento de 2L (Tabla 12). El 46,6% (n=7) de éstos pacientes tenían cáncer de colon y el 53,3% (n=8) de recto.

### Radioterapia adyuvante

Luego de la cirugía primaria, el 67,7% (n=21) de los pacientes con cáncer de recto realizaron radioterapia adyuvante estándar (5.040 cGy) en pelvis.

### Respuesta al tratamiento citostático evaluados por criterios R.E.C.I.S.T.

- **Adyuvancia:** De los 65 pacientes que recibieron adyuvancia, 36 (55,3%) no presentó evidencia de enfermedad al finalizar el tratamiento (Tabla 13); sin embargo, 29 (44,6%) progresaron.

De los pacientes con progresión de la enfermedad (PE), 17 (58,6%) tenían cáncer de colon y 12 (41,3%) de recto; 28 pacientes habían recibido el esquema 5-FU/LV y sólo uno recibió 5-FU/LV/OXALI.

**Tabla 13:** Tabla de distribución de frecuencias de respuesta al tratamiento quimioterápico asignado.

Respuesta	Quimioterapia		
	Adyuvante	1L	2L
NE <sup>1</sup>	36	0	0
EE <sup>2</sup>	0	3	6
RP <sup>3</sup>	0	1	0
RC <sup>4</sup>	0	2	0
PE <sup>5</sup>	29	27	9
Total	65	33	15

<sup>1</sup>NE = No evidencia de Enfermedad, <sup>2</sup>EE = Enfermedad Estable, <sup>3</sup>RP = Respuesta Parcial, <sup>4</sup>RC = Respuesta Completa, <sup>5</sup>PE = Progresión de Enfermedad.

- **Primera línea (1L):** Veintisiete de treinta y tres (81,8%) pacientes que recibieron tratamiento quimioterápico de 1L la enfermedad volvió a progresar (Tabla 13). De éstos el 80% tenía cáncer de colon, y el 40,7% habían recibido tratamiento con 5-FU/LV, el 33,3% 5-FU/LV/OXALI y el 25,9% 5-FU/LV/MTX.

- **Segunda línea (2L):** En nueve de quince (60,0%) pacientes que recibieron tratamiento de 2L, la enfermedad progresó nuevamente (Tabla 14). De ellos, el 77,7% tenía cáncer de colon y el 33,3% había recibido Capecitabina.

### Sitios metastáticos

- **De inicio:** Los pacientes con estadio IV de inicio presentaron metástasis hepáticas en el 60% (n=12), 20% (n=4) peritoneales, 15% (n=3) ganglios supraclaviculares y 5% (n=1) en médula ósea.
- **De progresión de enfermedad:** Los sitios de progresión de la enfermedad luego de la quimioterapia adyuvante fueron: hígado 31% (n=9), en el sitio del tumor primario 13,8% (n=4), en pulmón 13,8% (n=4), en ganglios linfáticos mediastínicos o supraclaviculares, 6,9% (n=2) y en otros sitios, 34,5% (n=10).

### Situación de los pacientes al final del estudio

Al finalizar este trabajo de Tesis, 41 (45,6%) pacientes habían fallecido, 20 (22,2%) continuaban con vida y a 29 (32,2%) se los consideró como “perdidos”, es decir aquellos en los cuales no se pudo actualizar la última fecha de control ya sea porque el paciente fue derivado a otra institución o porque cambió de domicilio.

### Sobrevida global y tiempo libre de progresión

La sobrevida global (SG) y el tiempo libre de progresión (TLP) de los pacientes fueron medidos con el método Kaplan y Meier. En la Tabla 14 se muestran la SG y el TLP de los pacientes según el estadio.

**Tabla 14:** Se muestra el tiempo medio de SG (medido en años) y TLE (medido en meses).

Estadio	SG	TLP
I	5,2	59,3
II	4,9	57,3
III	2,8	28,0
IV	1,3	12,5

### Expresión antigénica en los controles

Se estudiaron un total de 94 muestras controles de las cuales 68 correspondieron a biopsias de tejido colorrectal normal y 26 adenomas obtenidos de polipeptomías. Ningún paciente tenía enfermedad tumoral previa.

## Tratamiento de las muestras histológicas

### Procesamiento de las muestras

Los tejidos fueron fijados en formol al 10%, luego deshidratados mediante el pasaje por alcoholes en graduación creciente (70°, 80°, 96°, 100°) a temperatura ambiente. Los tejidos se aclararon impregnándolos en xilol para posteriormente embeberlos en parafina líquida y colocarlos en estufa a 60°C durante 1-3 hs, seguidamente se procedió a la inclusión definitiva y la formación del bloque histológico. Los mismos fueron rotulados y almacenados a temperatura ambiente.

### Preparación de los portaobjetos para las muestras histológicas

El montaje fue realizado empleando portaobjetos silanizados con gamma-metacriloxipropitrimetoxisilano de SIGMA<sup>R</sup> M6514 (Silane).

Para el silanizado de portaobjetos comunes se procedió de la siguiente manera: primeramente se eliminó todo contenido graso sumergiéndolos en alcohol 96°, luego se los dejó secar y posteriormente se los sumergió 2 minutos en la solución (4 ml de Silane en 196 ml Acetona). Posteriormente se los lavó en agua destilada sumergiéndolos tres veces para luego dejarlos a temperatura ambiente durante 16 hs hasta secar completamente. Este procedimiento lo realizó siempre el mismo operador.

### Cortes histológicos

Las muestras embebidas en parafina fueron cortadas por el mismo operador con un espesor de 4-5 micrones. El material cortado se depositó sobre una cubeta con agua fría, se lo levantó con el portaobjeto y se volvió a colocar sobre agua tibia de una segunda cubeta para el mejor desplegamiento del tejido. Una vez obtenido el corte histológico se lo colocó en estufa para su secado durante 1h.

Posteriormente, se realizó la técnica de inmunohistoquímica.



## Muestras séricas

Se estudiaron 120 muestras de suero para la determinación de CEA y CA 19-9. Las muestras fueron obtenidas de pacientes con 8 hs de ayuno.

Se realizaron 10 determinaciones de CEA sérico pre-quirúrgico y 65 post-quirúrgico. Asimismo, se obtuvieron 6 determinaciones de CA 19-9 sérico pre-quirúrgico y 39 post-quirúrgico. En todos los pacientes las determinaciones post-quirúrgicas fueron obtenidas a los 30 días de la cirugía.

Se utilizó como valor normal máximo un nivel de CEA sérico de 5 ng/ml en pacientes no fumadores y de 10 ng/ml en pacientes fumadores. En el caso del CA 19-9 se utilizó como valor normal máximo para todos el de  $\leq 37$  U/ml.

## Anticuerpos utilizados

Se emplearon los anticuerpos monoclonales cuyos datos se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15: Anticuerpos utilizados.

Antígenos	Anticuerpos	Diluciones	Clase Ig	Referencias
<b>MUC1</b>	HMFG-1	1:1000	IgG	Taylor Papadimitriou J y col. (1986)
<b>MUC2</b>	H-300	1:50	Anti-Rabbit	Santa Cruz
<b>MUC5AC</b>	45M1	Sobr. de cultivo*	IgG	Bara J y col. (1992)
<b>Tn</b>	HBTN	1:100	IgM	Dako (USA)
<b>sialil Lewis a</b>	1116-N5-19-9	1:50	IgG	Dako (USA)
<b>Lewis x</b>	KM380	1:1000	IgM	Hanai N y col. (1986)
<b>sialil Lewis x</b>	KM93	1:50	IgM	Hanai N y col. (1986)
<b>Lewis y</b>	C70	1:50	IgM	Santa Cruz
<b>CEA</b>	12-140-10	1:150	IgG	Novocastra
<b><math>\beta</math>-catenina</b>	H-102	1:400	Anti-Rabbit	Santa Cruz

\*Sobr. de cultivo= Sobrenadante de cultivo

---

## Métodos

---

## Índice de métodos

Inmunohistoquímica .....	103
• MUC1, MUC2 y MUC5AC, <i>Tn</i> , <i>Lewis x</i> , <i>sialil Lewis x</i> y <i>Lewis y</i> .....	104
• CEA y <i>sialil Lewis a</i> .....	105
• <i>β-catenina</i> .....	105
Evaluación histopatológica .....	106
Índice de tinción inmunohistoquímica.....	107
Muestras séricas.....	107
Análisis estadístico.....	107

---

## Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es una técnica que permite ver en forma directa la distribución celular de una molécula, utilizando anticuerpos u otros ligandos marcados. Entre los diversos tipos de marcación se encuentran la radioactiva, la fluorescente y la enzimática. Esta última es preferida sobre las anteriores debido a su sencillez y al menor riesgo que implica la no utilización de material radioactivo.

Las enzimas más frecuentemente utilizadas son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina que, al reaccionar con un sustrato no visible generan un producto insoluble y visible. Una vez establecida, esta reacción puede ser detectada por medio de la microscopía de luz convencional.

Por lo general, se emplea un sistema de detección en “sandwich” en el que un primer anticuerpo específico (generalmente un anticuerpo monoclonal) reconoce al antígeno buscado y es a su vez reconocido por un segundo anticuerpo conjugado que transporta la enzima. La ventaja de este sistema reside en la practicidad de no tener que marcar cada uno de los anticuerpos específicos y, por otra parte, existe la posibilidad de que se amplifique la señal lográndose una mayor sensibilidad.

La principal desventaja radica en que muchas células pueden presentar actividad enzimática endógena, generándose falsas reacciones positivas. Sin embargo, esta actividad puede ser inhibida y, conjuntamente, se pueden establecer controles rigurosos en los que se omite el anticuerpo específico o el conjugado a la enzima. Por otra parte, la conformación de los epitopes puede ser modificada por el procedimiento empleado en la fijación por lo que es deseable aplicar métodos de “recuperación antigénica” a fin de lograr una conformación natural de los mismos. El empleo de temperaturas extremas, variaciones de pH y soluciones capaces de secuestrar iones de calcio son ampliamente utilizadas con tal fin.

En nuestro estudio empleamos la técnica de inmunohistoquímica indirecta como método de detección antigénica; la misma fue realizada siempre por el mismo operador.

- **MUC1, MUC2 y MUC5AC, Tn, Lewis x, sialil Lewis x y Lewis y**

Los cortes incluidos en parafina, cortados y montados sobre portaobjetos, fueron hidratados en una serie de alcoholes: xileno durante 10 min, seguido de alcohol al 100%, alcohol al 75%, alcohol al 50% y alcohol al 20% durante 10 min cada uno y luego se lavaron con PBS durante otros 10 min.

Seguidamente, se descartó el PBS y se agregó 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol durante 15 min para inactivar la actividad endógena de la enzima peroxidasa. Se descartó el metanol y se realizaron 3 baños con PBS. A continuación, las muestras se incubaron con 50 ml de suero equino al 10% en PBS/1% BSA durante 15 min en cámara húmeda. Se descartó el suero y se realizaron 3 baños con PBS de 5 min cada uno. Las muestras fueron colocadas en buffer citrato 0,2 g p/v a 100 °C, durante 5 min para realizar la recuperación antigénica. Una vez concluida la recuperación las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se realizaron 3 baños con PBS de 5 min cada uno.

A continuación, las muestras se incubaron con 50 µl del anticuerpo monoclonal (AcMo) en cámara húmeda durante 60 min o durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se descartaron los AcMo y se realizaron 3 baños en PBS de 5 min cada uno. Luego se incubaron con 50 µl del segundo anticuerpo, conjugado con peroxidasa y específico para el isotipo del AcMo durante 60 min. El segundo anticuerpo fue descartado y se realizaron 3 baños en PBS de 5 min cada uno.

La reacción fue revelada mediante 50 µl de una solución de: 5 ml de PBS, 5 mg de Diaminobencidina (DAB) y 10 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Luego de 10 min, se descartó la solución de revelado, se lavó con PBS durante 5 min; se coloreó con hematoxilina durante 5 min y luego se lavó varias veces con agua corriente. A continuación, se procedió a la deshidratación en la secuencia de alcoholes: se emplearon alcohol 20%, alcohol 50%, alcohol 75%, alcohol 95%, alcohol 100% y finalmente xilol, cada uno de los pasos de 5 min de duración.

Finalmente, las muestras fueron montadas en un medio sintético y cubiertas con un cubreobjeto. En todos los experimentos se incluyeron controles negativos ya fuera omitiendo el primer o segundo anticuerpo.

- **CEA y *sialil Lewis a***

Los cortes incluidos en parafina, cortados y montados sobre portaobjetos, fueron hidratados en xileno durante 10 min, seguido de alcohol etílico 100% y alcohol 96%, estos últimos durante 2 min; seguidamente, se lavaron en agua destilada 2 min y se procedió al bloqueo de la peroxidasa endógena con 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min en cámara húmeda.

Cuando se utilizó el AcMo CEA las muestras se lavaron con buffer tris(hidroximetil)aminometano sulfato (conocido por su abreviación como TRIS) y se incubaron con proteinkinasa K (Dako<sup>®</sup>) durante 5 min. Seguidamente se lavaron con buffer TRIS, se incubaron con 50 µl del anticuerpo primario (anti-CEA o *sialil Lewis a*) durante 30 min y se lavaron con buffer TRIS.

Se realizó la incubación con el segundo anticuerpo policlonal (kit Dako<sup>®</sup>) durante 15 min y se lavó con buffer TRIS. Seguidamente, se reincubó con el tercer anticuerpo policlonal (kit Dako<sup>®</sup>) durante 15 min y se lavó con buffer TRIS.

El revelado se realizó con 50 µl de Diaminobencidina (kit Dako<sup>®</sup>) bajo microscopio óptico y se coloreó con hematoxilina. A continuación se procedió a la deshidratación en la secuencia de alcoholes: alcohol 96%, alcohol 100% y xilol.

- ***β-catenina***

Los cortes incluidos en parafina, cortados y montados sobre portaobjetos, fueron hidratados en xileno durante 10 min, alcohol etílico 100%, alcohol 95%, alcohol 75%, alcohol 50% y alcohol 20% durante 5 min cada uno y agua destilada 2 min. Seguidamente, se procedió al bloqueo de la peroxidasa endógena con 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min en cámara húmeda.

Las muestras fueron colocadas en buffer TRIS-ácido etilendiaminotetracético (EDTA) pH 9,0 en una olla a presión durante 10 min para realizar la recuperación antigénica. Una vez concluida la recuperación se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente y se realizaron 3 baños con buffer *TRIS-EDTA* de 5 min cada uno. Las muestras se incubaron con 50 µl del anticuerpo policlonal anti-*β-catenina* en cámara húmeda durante 1 hora. Luego se descartó el anticuerpo y se realizaron 3 lavados con buffer *TRIS-EDTA* de 5 min cada uno. Luego se procedió a la incubación con el segundo anticuerpo con anti-

conejo Rabbit PolyDetector HRP Label Bio SB, BSB 0223 durante 30 min; se lavaron 3 veces con *TRIS-EDTA*, 5 min cada vez.

La reacción fue revelada con 50 µl de Diaminobencidina (PolyDetector DAB<sup>®</sup>) durante 5 min. Posteriormente, se lavó con agua destilada durante 5 min, se coloreó con hematoxilina y se lavó varias veces con agua corriente. A continuación se procedió a la deshidratación en: alcohol 20%, alcohol 50%, alcohol 75%, alcohol 95%, alcohol 100% y finalmente xilol, cada uno de los pasos de 5 min de duración cada uno.

### **Evaluación histopatológica**

Los preparados fueron observados por un mismo médico patólogo sin conocimiento del paciente, del estadio tumoral ni de su evolución.

De los cortes coloreados con hematoxilina-eosina se evaluaron los siguientes parámetros: diagnóstico histopatológico, subtipo histológico, infiltración (si-no), ulceración (si-no), invasión muscular (si-no), invasión submucosa (si-no), invasión subserosa (si-no), invasión serosa (si-no), invasión grasa (si-no), necrosis (si-no), grado histológico (1 = bien diferenciado, 2 = moderadamente diferenciado, 3 = pobremente diferenciado), grado nuclear según la clasificación de S. A. Fuhrman y colaboradores (1982) (1 = núcleos de la célula uniformes en tamaño y forma, relativamente pequeños, con dispersión de los patrones de la cromatina y sin nucléolos prominentes; 2 = núcleos celulares algo pleomórficos, hay nucléolos y son de tamaño intermedio; y 3 = núcleos celulares relativamente grandes, tienen nucléolos prominentes o varios nucléolos, patrones de cromatina gruesa y varían en tamaño y forma), índice mitótico (cantidad de mitosis por campo, en 10 campos, con un aumento al microscopio óptico de 400X), invasión vascular (si-no), invasión linfática (si-no) e invasión perineural (si-no).

En los cortes de inmunohistoquímica se consideró: reacción en célula tumoral en comparación con la normal, intensidad medida en cruces + (leve), ++ (mediana), +++ (fuerte), porcentaje de la reacción (0 = sin reacción, 1 = <5%, 2 = 5-30%, 3=30-60%, 4 = >60%), área que reacciona (focal o difuso), expresión en el frente de invasión tumoral, patrón celular (citoplasmático, membrana apical, membrana basolateral o mixto), parénquima (músculo, arteriolas, glándula normal, eritrocitos, leucocitos) y expresión en las glándulas normales adyacentes al tumor.

Por motivos metodológicos, en muchos casos, no se pudo evaluar todos los antígenos al total de muestras estudiadas, por lo cual, al considerar el número de tejidos estudiados se deberá sumar siempre: A (Ausente) + D (Débil) + F (Fuerte).

### Índice de expresión inmunohistoquímica

Cada muestra fue coloreada y comparada con una de referencia positiva y otra negativa, previamente clasificada como de leve o fuerte intensidad de coloración. La inmunoreactividad fue evaluada en la superficie, frente de invasión tumoral y en la extensión completa del tumor.

Siguiendo los lineamientos de J. F. You y colaboradores (2006), P. Grabowski y colaboradores (2000) y la expresión semicuantitativa de K. Ajioka y colaboradores (1996) en CCR, se utilizó para el presente estudio un “índice de expresión antigénica”, el cual estuvo conformado de la siguiente manera:

$$\text{Índice de expresión} = \text{intensidad de la reacción} \times \text{porcentaje de la reacción}$$

La expresión fue considerada de la siguiente manera:

- Índice 0: reacción Ausente,
- Índice entre 1 a 6: reacción Débil,
- Índice entre 7 a 12: reacción Fuerte.

### Muestras séricas

Los niveles sanguíneos de CEA y CA 19-9 fueron medidos con la técnica de radioinmunoanálisis.

### Análisis estadístico

Los datos clínicos y los resultados obtenidos fueron presentados en tablas resumen. Se calcularon datos estadísticos descriptivos de tendencia central y dispersión (media aritmética y error estándar) que se muestran en gráficos e informamos en el texto.



Los datos fueron tratados con test paramétricos y no paramétricos según correspondió. Se realizó una estandarización de aquellos datos que fueron sometidos a análisis multivariado. Entre los test utilizados se incluyen: ANOVA con contrastes de t de Student, Kruskal Wallis para hallar diferencias significativas entre grupos, correlaciones múltiples con el objetivo de verificar interrelación entre variables, Análisis de Componentes Principales para hallar las variables más significativas para la distribución de los casos y análisis discriminante para verificar la correcta agrupación de los casos de acuerdo a las distintas variables.

Los gráficos y tablas que presentan datos de porcentajes fueron calculados y se exponen siempre en relación al total de pacientes estudiados.

En todos los casos se consideró un riesgo aceptado de  $p < 0,05$  (Zar JH *et al*, 1996). Se emplearon los programas estadísticos de Excel (Microsoft), Statistica (StatSoft) y Statistix v.8. El análisis utilizado en cada caso se especifica en cada sección de esta tesis junto con los resultados.

---

## Resultados

## Índice de Resultados

1. Resultados descriptivos.....	111
1.1. Expresión de los antígenos.....	111
1.1.1. En los tumores primarios (TP).....	111
1.1.2. En los ganglios linfáticos metastáticos (GLM).....	120
1.1.3. En los pólipos.....	129
1.1.4. En los especímenes normales.....	139
1.2. Expresión de los antígenos estudiados en la secuencia normal- adenoma-carcinoma y en los GLM.....	145
1.2.1. Reactividad.....	145
1.2.2. Intensidad.....	146
1.2.3. Porcentaje de expresión.....	147
1.2.4. Índice de expresión.....	149
1.2.5. Patrón de expresión.....	150
1.3. Expresión antigénica en el tejido colorrectal normal, en las glándulas normales adyacentes al tumor y en el TP.....	152
2. Resultados estadísticos.....	154
2.1. Relación de la expresión de los antígenos estudiados en los TP.....	154
2.2. Relación de la expresión antigénica en los GLM respecto a la observada en los TP.....	157
2.3. Relación entre la expresión antigénica en los TP y las variables clinicopatológicas.....	158
2.4. Relación entre la expresión antigénica en los ganglios linfáticos metastáticos (GLM) y los datos clinicopatológicos de los pacientes con CCR.....	187
2.5. Características clinicopatológicas de los pacientes con CCR y la sobrevida.....	207
2.5.1. Análisis univariado.....	207
2.5.2. Análisis multivariado.....	213
2.6. Características clinicopatológicas de los pacientes con estadio II y III de CCR y la supervivencia.....	217
2.6.1. Análisis univariado.....	217
2.6.2. Análisis multivariado.....	222

## 1. Resultados descriptivos

### 1.1 Expresión de los antígenos

#### 1.1.1. En los tumores primarios (TP)

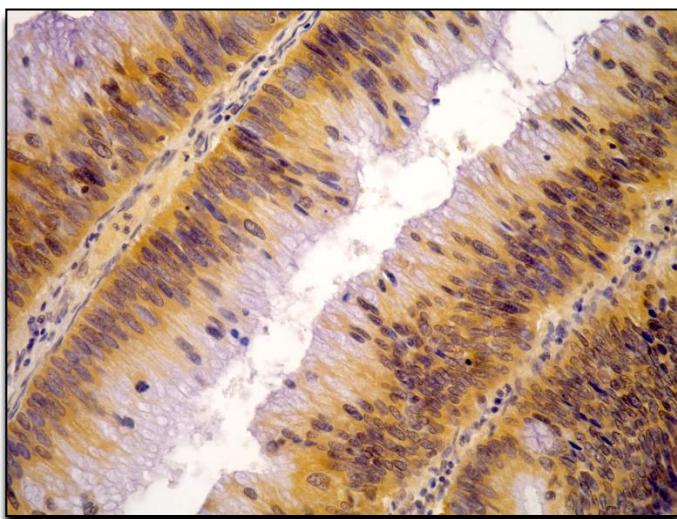
Se realizó un análisis descriptivo de la expresión antigénica en los TP. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 16.

- **Expresión de MUC1**

Los TP presentaron una reactividad de MUC1 (Tabla 16) en el 94% (n=78) con una intensidad de expresión de +/+++ en el 52,6% (n=41); el 66,7% de los especímenes expresaron esta mucina en más del 60% de la superficie tumoral. De acuerdo al índice utilizado para este estudio, el 39,8% (n=33) de los TP presentaron un índice de expresión fuerte.

En el 92,3% (n=72) de los TP se observó una reacción difusa y en sólo el 3,8% (n=3) de ellos la expresión fue una mayor en el frente de invasión tumoral que en el resto del tumor.

El 66,7% (n=52) de la expresión de MUC1 fue hallada principalmente en el



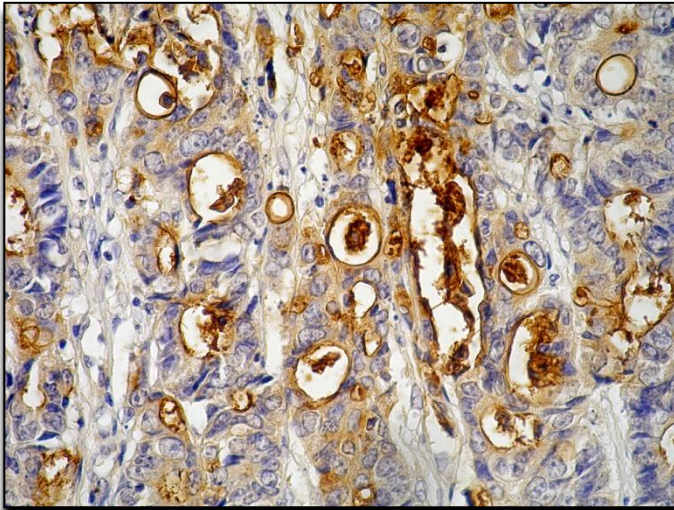
citoplasma (Figura 6) mientras que en el 15,4% (n=12) la expresión fue en la membrana apical (Figura 7) mientras que en el 17,9% (n=14) fue mixta. El 34,1% (n=28) de las glándulas normales adyacentes al tejido tumoral también expresaron dicho antígeno.

**Figura 6:** Sección de un carcinoma mucinoso de colon, bien diferenciado e infiltrante, donde se observa reacción positiva de MUC1 con un patrón citoplasmático y con una intensidad +/+++ (400X).

Tabla 16: Expresión antigénica obtenida por inmunohistoquímica en tumores primarios.

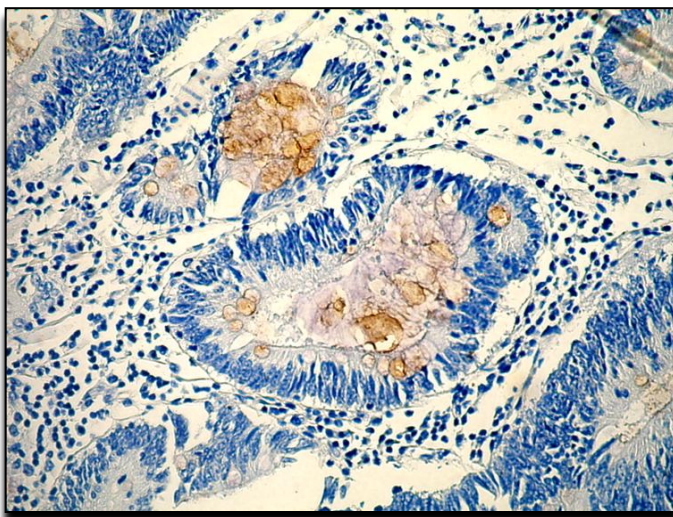
		Expresión antigénica en los tumores primarios (%)									
		MUC1 (n=83)	MUC2 (n=82)	MUC5AC (n=84)	Tn (n=83)	sLe a (n=86)	Le x (n=82)	sLe x (n=84)	Le y (n=85)	CEA (n=87)	β-cat (n=80)
<b>Reactividad</b>		78 (94,0)	43 (52,4)	12 (14,3)	34 (41,0)	78 (90,7)	61 (74,4)	56 (66,7)	78 (91,8)	81 (93,1)	79 (98,8)
<b>Intensidad</b>	+	41 (52,6)	34 (79,1)	8 (66,7)	33 (97,1)	25 (32,1)	52 (85,2)	32 (57,1)	49 (62,8)	53 (65,4)	61 (77,2)
	++	28 (35,9)	9 (20,9)	4 (33,3)	1 (2,9)	27 (34,6)	7 (11,5)	14 (25,0)	28 (35,9)	24 (29,6)	15 (19,0)
	+++	9 (11,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	26 (33,3)	2 (3,3)	10 (17,9)	1 (1,3)	4 (4,9)	3 (3,8)
<b>Porcentaje del área tumoral</b>	<5	11 (14,1)	27 (62,8)	10 (83,3)	27 (79,4)	15 (19,2)	21 (34,4)	17 (30,4)	13 (16,7)	4 (4,9)	4 (5,1)
	5a30	4 (5,1)	8 (18,6)	1 (8,3)	6 (17,6)	20 (25,6)	17 (27,9)	10 (17,9)	10 (12,8)	8 (9,9)	5 (6,3)
	30a60	11 (14,1)	3 (7,0)	1 (8,3)	0 (0,0)	16 (20,5)	2 (3,3)	11 (19,6)	17 (21,8)	14 (17,3)	8 (10,1)
	>60	52 (66,7)	5 (11,6)	0 (0,0)	1 (2,9)	27 (34,6)	21 (34,4)	18 (32,1)	38 (48,7)	55 (67,9)	62 (78,5)
<b>Índice</b>	Ausente	5 (6,0)	39 (47,6)	72 (85,7)	49 (59,0)	8 (9,3)	21 (25,6)	28 (33,3)	7 (8,2)	6 (6,9)	1(1,3)
	Débil	45 (54,2)	40 (48,8)	12 (14,3)	33 (39,8)	48 (55,8)	55 (67,1)	41 (48,8)	55 (64,7)	58 (66,7)	62 (77,5)
	Fuerte	33 (39,8)	3 (3,7)	0 (0,0)	1 (1,2)	30 (34,9)	6 (7,3)	15 (17,9)	23 (27,1)	23 (26,4)	17 (21,3)
<b>Distribución</b>	Focal	5 (7,7)	17 (39,5)	5 (41,7)	14 (41,2)	4 (5,1)	12 (19,7)	7 (12,5)	8 (10,3)	4 (4,9)	1 (1,3)
	Difuso	72 (92,3)	26 (60,5)	5 (58,3)	20 (58,8)	74 (94,9)	49 (80,3)	49 (87,5)	70 (89,7)	77 (95,1)	78 (98,7)
<b>Patrón</b>	Membrana Apical	12 (15,4)	19 (44,2)	8 (66,7)	3 (8,8)	55 (70,5)	30 (49,2)	39 (69,6)	8 (10,3)	57 (70,4)	*
	Citoplasmático	52 (66,7)	21 (48,8)	3 (25,0)	27 (79,4)	6 (7,7)	15 (24,6)	6 (10,7)	54 (69,2)	1 (1,2)	*
	Mixto	14 (17,9)	3 (7,0)	1 (8,3)	4 (11,8)	17 (21,8)	16 (26,2)	11 (19,6)	16 (20,5)	23 (28,4)	*
<b>Reactividad sólo en el frente de invasión tumoral</b>		3 (3,8)	1 (2,3)	1 (3,3)	-	5 (6,4)	2 (3,2)	4 (7,1)	2 (2,5)	4 (4,9)	-
<b>Reactividad en las glándulas normales adyacentes al tumor</b>		28 (34,1)	42 (51,9)	13 (15,9)	14 (41,1)	36 (45,6)	25 (40,9)	14 (25,0)	54 (78,3)	44 (58,7)	55 (69,6)
<b>Contenido en luz glándular tumoral</b>	-	-	-	8 (9,9)	4 (4,9)	-	-	-	-	-	--

\* Ver descripción del área de expresión de β-catenina en Tabla 17.



**Figura 7:** Corte histológico de un adenocarcinoma de colon moderadamente diferenciado e infiltrante en el cual se determinó la expresión de MUC1 luego de la incubación con el anticuerpo HMFG-1. Se observa reacción difusa predominantemente en la membrana apical de las células tumorales con una intensidad +++/+++. También se puede observar reactividad en la luz glandular (400X).

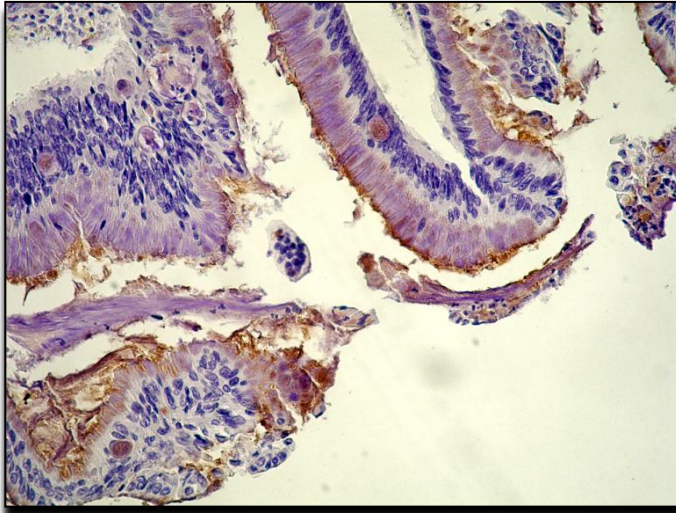
- **Expresión de MUC2**



**Figura 8:** Inmunohistoquímica de una sección de un adenocarcinoma de colon bien diferenciado e infiltrante donde se observa tinción difusa de MUC2 evidenciada mediante el uso del anticuerpo H-300. Predomina la expresión citoplasmática con una intensidad ++/+++ (400X).

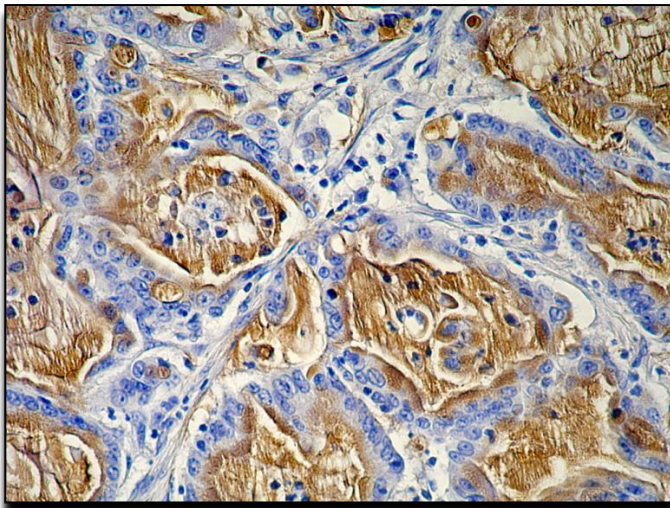
El 52,4% (n=43) de los TP estudiados expresaron MUC2; sin embargo, esta reactividad se observó predominantemente (62,8%) en menos del 5% de la superficie tumoral. La intensidad de tinción fue de +/+++ en el 79,1% (n=34) de los casos, observándose un índice de expresión predominantemente débil (Tabla 16) en el 48,8% (n=40). En el 60,5% (n=26) de las muestras, la expresión fue

difusa, en el citoplasma en el 48,8% (Figura 8) y en la membrana apical (Figura 9) en el 44,2% de los casos. Las glándulas normales adyacentes al tumor mostraron reacción positiva en 42 de los especímenes tumorales (51,9%) y sólo en una muestra la expresión fue mayor en el frente de invasión tumoral. Finalmente, en el 9,9% (n=8) de los casos se halló expresión de MUC2 en el contenido de la luz glandular tumoral.



**Figura 9:** Microscopía óptica de una sección de un adenocarcinoma de colon tipo NOS, bien diferenciado e infiltrante con expresión difusa de MUC2, predominantemente en la membrana apical con una intensidad +++/+++ (400X).

- **Expresión de MUC5AC**

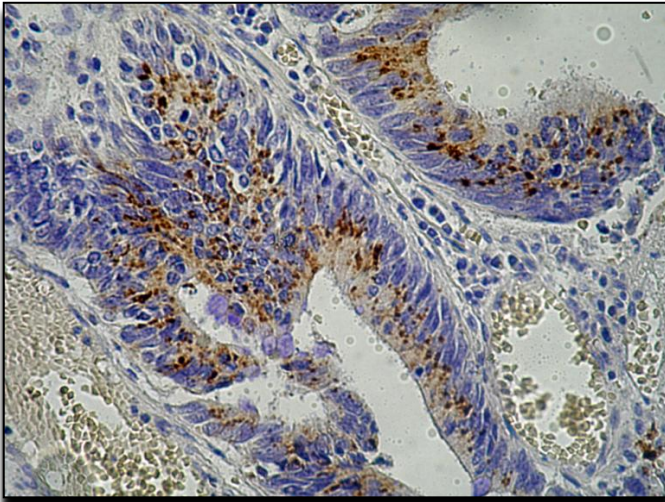


**Figura 10:** Sección de un adenocarcinoma bien diferenciado donde se observa tinción difusa de MUC5AC, mixta y en el contenido de la luz glandular tumoral, con una intensidad de ++/+++ (400X).

Sólo el 14,3% (n=12) de la muestras tumorales presentaron expresión de MUC5AC que, en general, comprendió a menos del 5% de la superficie tumoral (83,3%); asimismo, en la mayoría de los casos (66,7%) la intensidad fue baja (Tabla 16). En 5 muestras (58,3%) la reacción fue difusa, con predominio de expresión en la membrana apical en el 66,7% y

en el citoplasma (Figura 10) en el 25% de las muestras; por su parte, las glándulas normales adyacentes al tumor presentaron marcación en el 15,9% (n=13). Sólo en una muestra se observó mayor expresión en el frente de invasión tumoral mientras que en el 15,9% (n=13) se halló reacción del antígeno en el contenido de la luz glandular tumoral.

- **Expresión de *Tn***



**Figura 11.** Corte histológico de una sección de un adenocarcinoma de recto bien diferenciado en la cual se determinó la expresión de *Tn* a través de la incubación con el anticuerpo HBTN. Se observa tinción difusa con un patrón de expresión citoplasmático y con una intensidad +++/+++ (400X).

El 41,0% (n=34) de los TP analizados expresaron *Tn* predominantemente (79,4%) en menos del 5% de la superficie tumoral; en el 97,1% (n=33) la intensidad fue de +/-+++ y con un índice de expresión débil (Tabla 16). En el 58,8% (n=20) de las muestras, la reactividad fue difusa; y en el 79,4% (n=27) el patrón fue citoplasmático (Figura 11) y mixto en el 11,8% (n=4) de los casos estudiados. Las glándulas normales adyacentes al tejido tumoral

fueron positivas en el 41,4% (n=14) de las muestras.

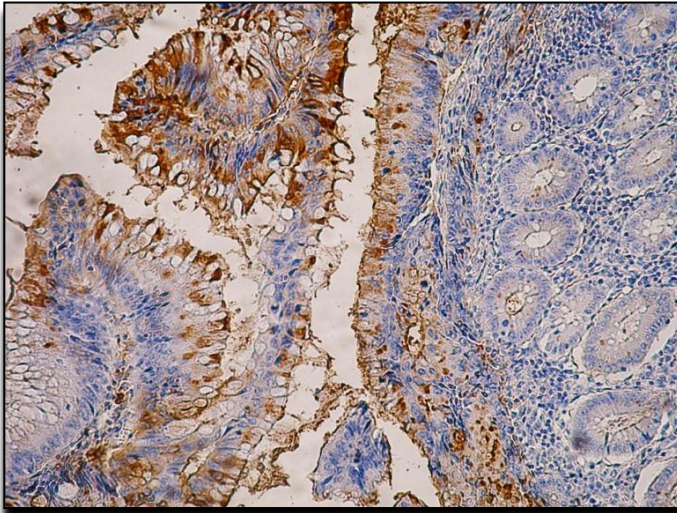
- **Expresión de *sialil Lewis a***

Este antígeno se observó en el 90,7% (n=78) de las muestras con una intensidad de ++/+++ en el 34,6% y +++/+++ en el 33,3% de los casos, encontrándose un índice de expresión fuerte en el 34,9% (n=39) de los TP.

En el 94,9% (n=74) de las muestras la expresión fue difusa, con predominio en la membrana apical (Figura 12) en el 70,5% (n=55) y mixto en el 21,8% (n=17) de los casos. Solamente el 6,4% de los TP expresaron *sialil Lewis a* en el frente de invasión tumoral.

Las glándulas normales adyacentes al TP fueron reactivas en el 45,6% (n=36) de los casos (Tabla 16).

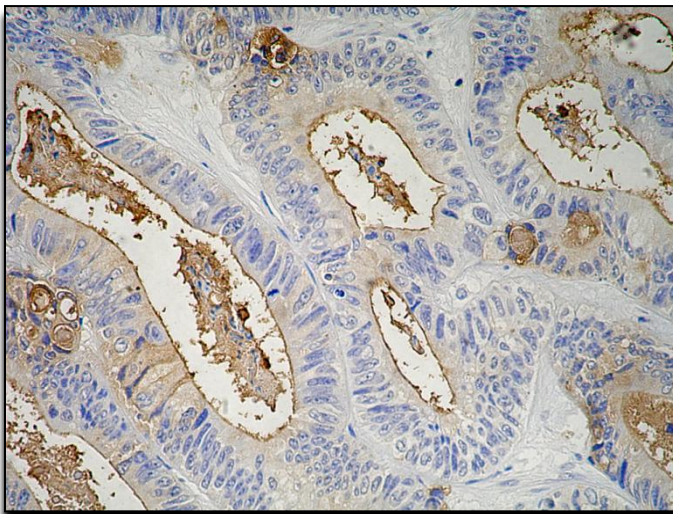




**Figura 12:** Microfotografía de un adenocarcinoma mucinoso de colon, bien diferenciado e infiltrante, donde se observa tinción difusa de *sialil Lewis a* predominantemente en la membrana apical, con una intensidad +++/+++. Se pueden observar glándulas normales con una reacción muy débil a nivel de la membrana apical (400X).

- **Expresión de *Lewis x***

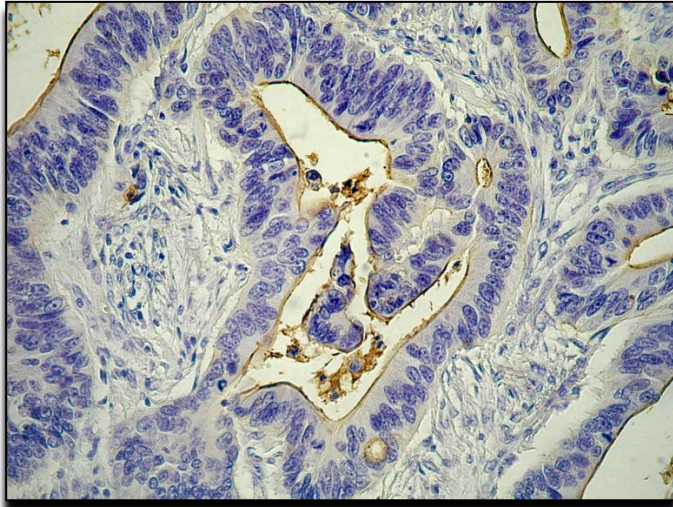
Se halló expresión de *Lewis x* en el 74,4% (n=61) de los TP con una intensidad de +/+++ en el 85,2% (n=52) de los TP. El índice de expresión (Tabla 16) fue principalmente débil (67,1%).



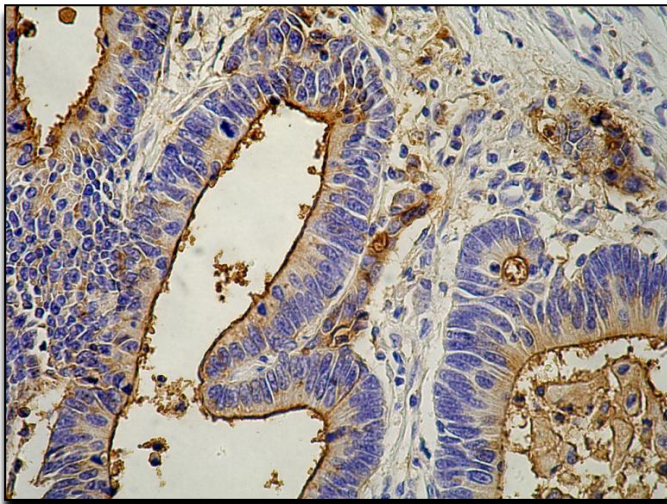
**Figura 13:** Sección de un adenocarcinoma de colon tipo NOS, bien diferenciado e infiltrante, donde se observa tinción difusa de *Lewis x*, predominantemente en la membrana apical y con una intensidad +/+++. Se observa reacción en la luz glandular (400X).

En el 80,3% (n=49) de las muestras la reacción fue difusa con un patrón de expresión predominantemente en la membrana apical (Figura 13) en el 49,2% (n=30) de los TP. El 40,9% (n=25) presentó reacción en las glándulas normales adyacentes al tumor y sólo el 3,2% (n=2) de los tejidos tumorales presentaron mayor tinción en el frente de invasión tumoral.

- **Expresión de *sialil Lewis x***



**Figura 14:** Corte histológico que muestra una sección de un adenocarcinoma de colon bien diferenciado en el cual se determinó la expresión de *sialil Lewis x* a través de la incubación con el anticuerpo KM93. Se observa una tinción difusa, con un patrón de expresión principalmente en la membrana apical y con una intensidad ++/+++ (400X).



**Figura 15:** Microscopía óptica de una sección de un adenocarcinoma de colon tipo NOS, bien diferenciado e infiltrante donde se observa tinción difusa de *sialil Lewis x* con un patrón mixto (citoplasmático y membrana apical) y una intensidad de +++/+++ (400X).

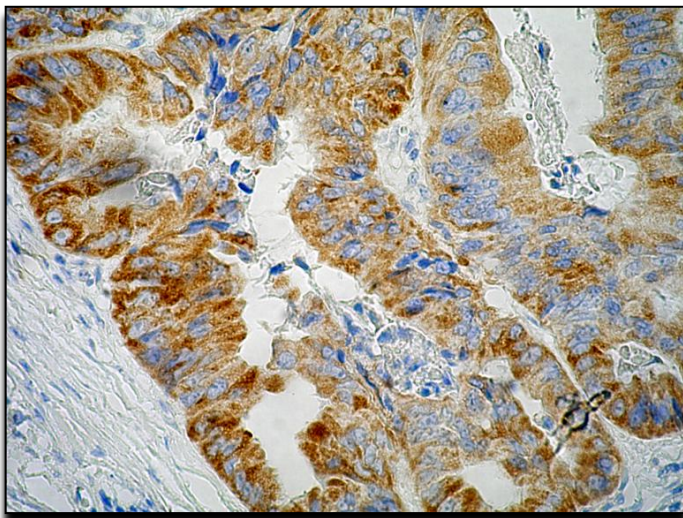
*Sialil Lewis x* se halló en el 66,7% (n=56) de los TP, siendo el 32,1% (n=18) de las muestras positivas en más del 60% de la superficie tumoral, con una intensidad de ++/+++ en el 57,1% (n=32) de los especímenes mientras que en el 25,0% fue de ++/+++.

El 17,9% (n=15) de los TP presentaron un índice de expresión fuerte (Tabla 16).

En el 87,5% (n=49) de los casos la distribución fue difusa con expresión en la membrana apical en el 69,6% (Figura 14) y mixta en el 19,6% (Figura 15). El 25% (n=14) de las muestras presentaron reacción positiva en las glándulas normales adyacentes al tumor y sólo el 7,1% de los TP presentaron mayor tinción en el frente de invasión tumoral.

- **Expresión de Lewis y**

Se observó una expresión positiva de *Lewis y* en el 91,8% (n=78) de los TP con un índice de expresión fuerte en el 27,1% (n=23). El 48,7% de los tumores expresaron este antígeno en más del 60% del espécimen estudiado.



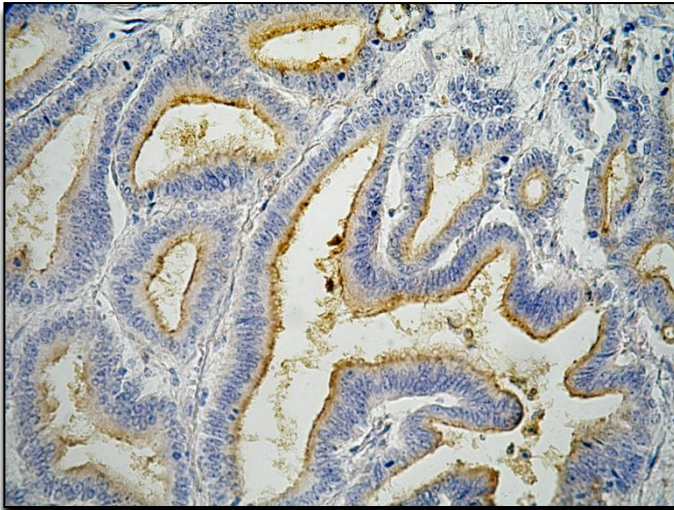
**Figura 16:** Inmunohistoquímica de una sección de un adenocarcinoma de colon bien diferenciado en la cual se utilizó el anticuerpo KM380. Se observa reacción difusa de *Lewis y* con un patrón predominantemente citoplasmático y con una intensidad de +++/+++ (400X).

La reacción fue difusa en el 89,7% (n=70) de los casos; siendo ésta, predominantemente citoplasmática (Figura 16) y mixta en el 69,2% y 20,5%, respectivamente. El 78,3% (n=54) de los TP presentaron expresión en las glándulas normales adyacentes al tumor; en el 2,5% de los mismos se halló mayor reacción en el frente de invasión tumoral (Tabla 16).

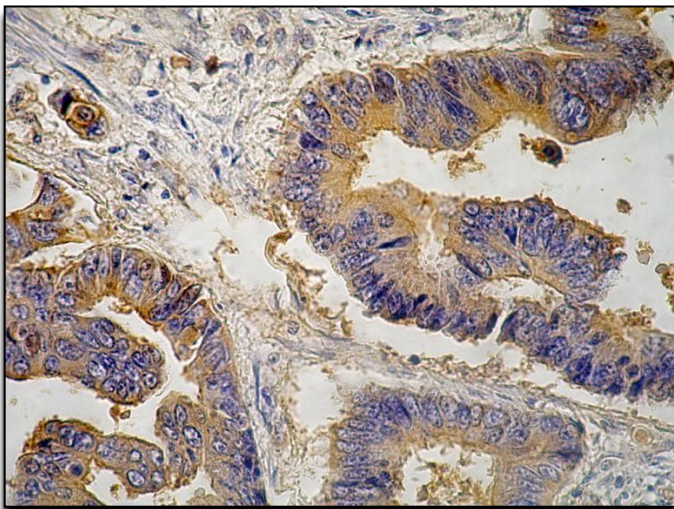
- **Expresión de CEA**

El 93,1% (n=81) de los TP analizados expresaron este antígeno mientras que en el 67,9% (n=55) se observó una reacción positiva en más del 60% del TP. El 65,4% (n=53) de las muestras presentaron una intensidad de +/+++ y un índice de expresión fuerte en el 26,4% (n=23).

El 95,1% (n=77) de los tumores presentaron reacción difusa predominantemente en la membrana apical (70,4%) (Figura 19) y mixto (28,3%) (Figura 20). En el 58,7% (n=44) de los TP se observó reacción positiva en las glándulas normales adyacentes al tumor y en el 4,9% (n=4) de los TP se halló una mayor expresión en el frente de invasión tumoral (Tabla 17).



**Figura 17:** Microfotografía de una sección de un adenocarcinoma de colon, bien diferenciado e infiltrante donde se observa reacción difusa de CEA, predominantemente en la membrana apical y con una intensidad de +++/+++ (400X).



**Figura 18:** Sección de un adenocarcinoma de colon tipo NOS, bien diferenciado e infiltrante donde se observa tinción difusa de CEA, con un patrón mixto y con una intensidad +++/+++ (400X).

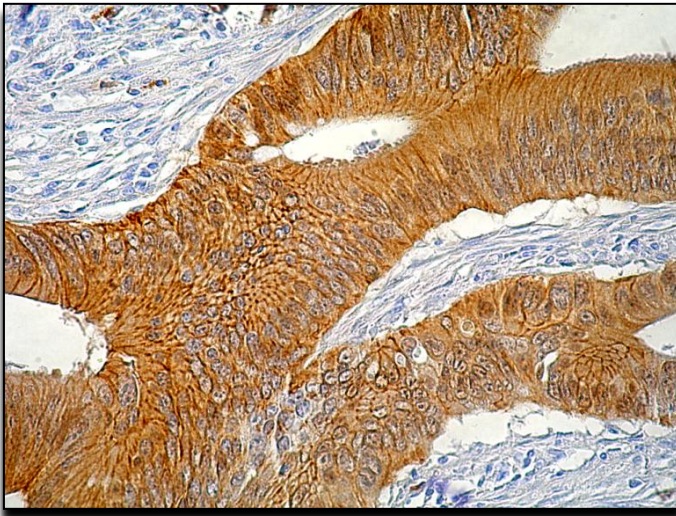
- **Expresión de  $\beta$ -catenina**

La expresión de  $\beta$ -catenina fue observada en el 98,8% (n=79) de los TP siendo la intensidad de +/+++ en el 77,2% (n=61) de los casos. Se observó un índice de expresión fuerte en el 21,3% (n=17) de las muestras (Tabla 17).

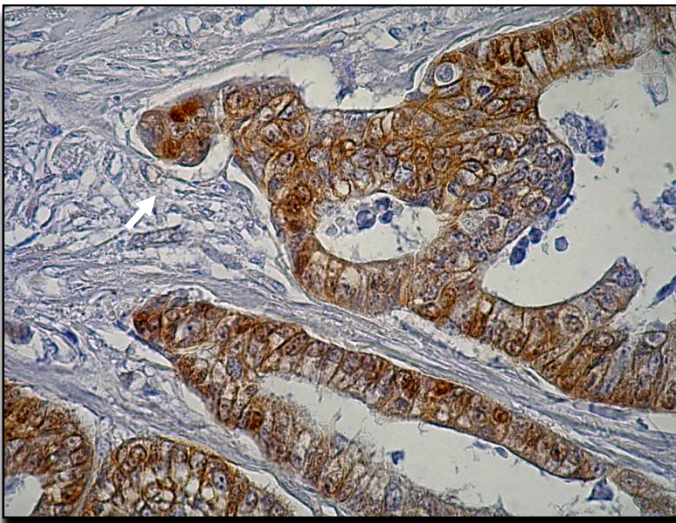
**Tabla 17:** Expresión de  $\beta$ -catenina en los TP según el área celular (%).

Porcentaje	Membrana	Citoplasma	Núcleo
0	7 (8,8)	2 (2,5)	29 (36,3)
<5	16 (20,0)	1 (1,3)	28 (35,0)
5a30	16 (20,0)	2 (2,5)	11 (13,8)
30a60	18 (22,5)	5 (6,3)	7 (8,8)
>60	23 (28,8)	70 (87,5)	5 (6,3)

Siguiendo los lineamientos del trabajo de Y. Yamada y colaboradores



**Figura 19:** Corte histológico que muestra la sección de un adenocarcinoma de colon bien diferenciado donde se observa expresión difusa de  $\beta$ -catenina principalmente en el citoplasma y en las membranas basolaterales, con una intensidad +++/+++ (400X).



(2001), para el análisis del patrón de expresión se consideró la reacción positiva cuando  $\beta$ -catenina se halló expresada en más del 30% de la superficie tumoral.

Se encontró reactividad en el 51,3% (n=41), 93,8% (n=75) y 15% (n=12) en la membrana, citoplasmática y núcleo, respectivamente (Figura 19 y 20). El 69,6% (n=55) de los TP presentaron reacción en las glándulas normales adyacentes en el tumor; ésta expresión fue hallada tanto en el citoplasma como en la membrana.

**Figura 20:** Microscopía óptica de una sección de un adenocarcinoma de colon bien diferenciado donde se observa expresión  $\beta$ -catenina en los núcleos de las células tumorales (flecha blanca); con una intensidad ++/+++ (400X).

### 1.1.2. En los ganglios linfáticos metastáticos (GLM )

Los resultados obtenidos de la expresión de antígenos estudiados en los GLM se resumen en la Tabla 18.

**Tabla 18:** Expresión antigénica obtenida por inmunohistoquímica en ganglios linfáticos metastáticos.

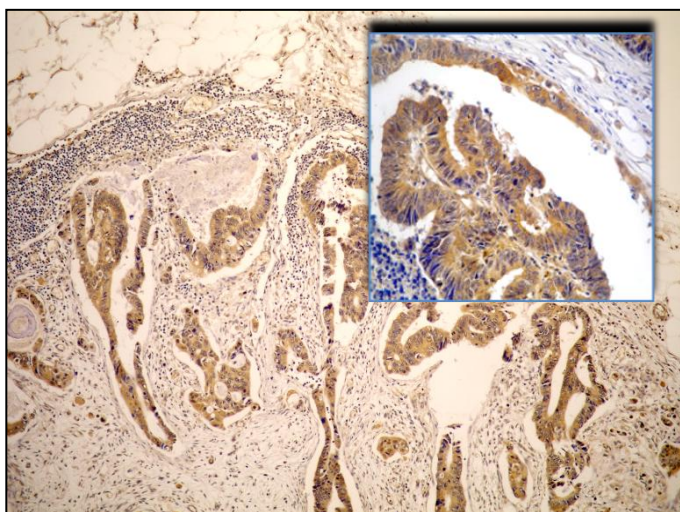
		Expresión antigénica en los ganglios linfáticos metastáticos (%)									
		MUC1 (n=28)	MUC2 (n=26)	MUC5AC (n=26)	Tn (n=29)	sLe a (n=29)	Le x (n=29)	sLe x (n=29)	Le y (n=29)	CEA (n=30)	$\beta$ -cat (n=12)
<b>Reactividad</b>		25 (89,3)	8 (30,8)	5 (19,2)	13 (44,8)	25 (86,2)	20 (69,0)	21 (72,4)	22 (75,9)	24 (80,0)	10 (83,3)
<b>Intensidad</b>	+	18 (72,0)	7 (87,5)	3 (60,0)	11 (84,6)	7 (28,0)	16 (80,0)	11 (52,4)	18 (81,8)	19 (79,2)	6 (60,0)
	++	7 (28,0)	1 (12,5)	2 (40,0)	2 (15,4)	14 (56,0)	4 (20,0)	3 (14,3)	4 (18,2)	4 (16,7)	2 (20,0)
	+++	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (16,0)	0 (0,0)	7 (33,3)	0 (0,0)	1 (4,2)	2 (20,0)
<b>Porcentaje del área metastática</b>	<5	6 (24,0)	5 (62,5)	1 (20,0)	10 (76,9)	4 (16,0)	9 (45,0)	5 (23,8)	6 (27,3)	2 (8,3)	1 (10,0)
	5a30	2 (8,0)	1 (12,5)	3 (60,0)	2 (15,4)	2 (8,0)	1 (5,0)	1 (4,8)	5 (22,7)	1 (4,2)	2 (20,0)
	30a60	1 (4,0)	1 (12,5)	0 (0,0)	1 (7,7)	6 (24,0)	5 (25,0)	4 (19,0)	2 (9,1)	2 (8,3)	0 (0,0)
	>60	16 (64,0)	1 (12,5)	1 (20,0)	0 (0,0)	13 (52,0)	5 (25,0)	11 (52,4)	9 (40,9)	19 (79,2)	7 (70,0)
<b>Índice</b>	Ausente	3 (10,7)	18 (69,2)	21 (80,8)	16 (55,2)	4 (13,8)	9 (31,0)	8 (27,6)	7(24,1)	6 (20,0)	2 (16,7)
	Débil	18 (64,3)	8 (30,8)	4 (15,4)	13 (44,8)	11 (37,9)	17 (58,6)	12 (41,4)	18 (62,1)	21 (70,0)	6 (50,0)
	Fuerte	7 (25,0)	0 (0,0)	1 (3,8)	0 (0,0)	14 (48,3)	3 (10,3)	9 (31,0)	4 (13,8)	3 (10,0)	4 (33,3)
<b>Área</b>	Focal	3 (12,0)	1 (12,5)	1 (20,0)	2 (15,4)	0 (0,0)	4 (20,0)	1 (5,0)	2 (9,1)	1 (4,2)	0 (0,0)
	Difuso	22 (88,0)	7 (87,5)	4 (80,0)	11 (84,6)	25 (100,0)	16 (80,0)	19 (95,0)	20 (90,9)	23 (95,8)	10 (100,0)
<b>Patrón</b>	Mem. apical	4 (16,0)	5 (62,5)	3 (60,0)	0 (0,0)	15 (60,0)	14 (70,0)	10 (47,6)	4 (18,2)	15 (65,2)	*
	Citopl.	17 (68,0)	3 (37,5)	1 (20,0)	12 (92,3)	2 (8,0)	2 (10,0)	4 (19,0)	16 (72,7)	2 (8,7)	*
	Mixto	4 (16,0)	0 (0,0)	1 (20,0)	1 (7,7)	8 (32,0)	4 (20,0)	7 (33,3)	2 (9,1)	6 (26,1)	*

\* \*\*Ver descripción de área de expresión de  $\beta$ -catenina en la Tabla 19.

- **Expresión de MUC1**

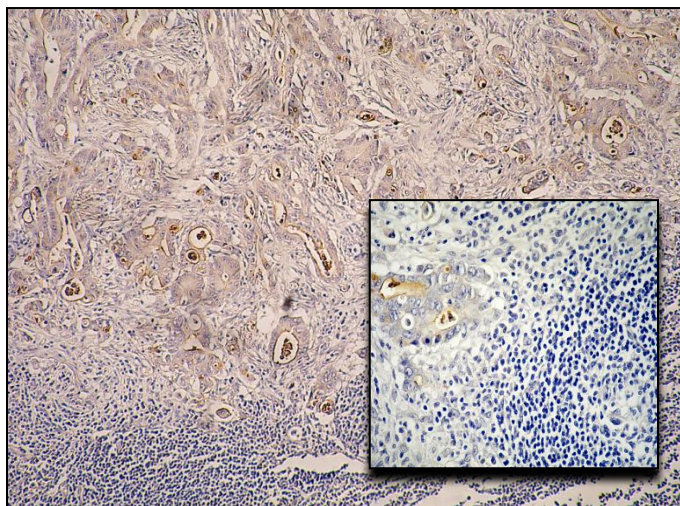
El 89,3% (n=25) de los GLM presentaron expresión de MUC1. El 72,0% (n=18) presentó una intensidad de +/+++ siendo el índice de expresión fuerte en 25% (n=7) de los casos (Tabla 18). El 64% de los GLM presentaron expresión de ésta mucina en más del 60% del área metastática.

En el 88% (n=22) el patrón de expresión fue difuso; siendo positivo el 68% (n=17) de los citoplasmas (Figura 21) mientras que la reacción tanto en la



membrana apical (Figura 22) como mixta fue del 16% (n=4).

**Figura 21:** Microfotografía de una sección a 100X y a 400X (cuadro pequeño) de un ganglio linfático con metástasis de un adenocarcinoma bien diferenciado donde se observa una reacción difusa de MUC1, con una intensidad de +++/+++ y un patrón de expresión principalmente citoplasmático.



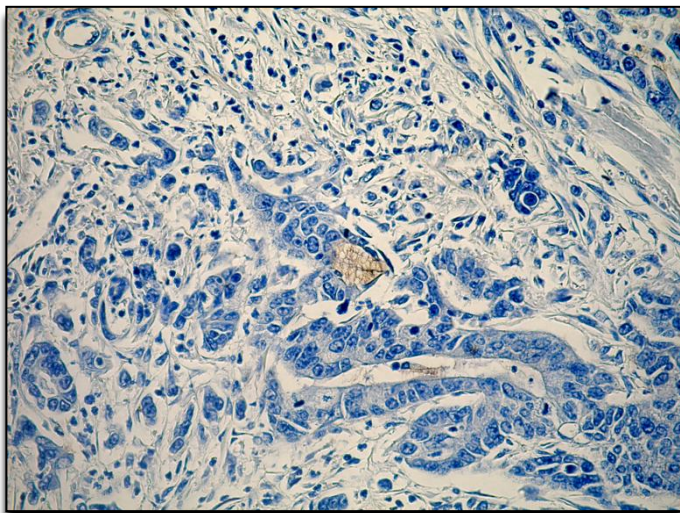
**Figura 22:** Inmunohistoquímica de una metástasis de un adenocarcinoma moderadamente diferenciado en un ganglio linfático; sección a 100X y a 400X (cuadro pequeño). Se observa expresión de MUC1 con un patrón predominantemente en la membrana apical y con una intensidad de ++/+++.

- **Expresión de MUC2**

Sólo el 30,8% (n=8) de los casos expresaron MUC2 en los GLM. El 87,5% (n=7) presentó una intensidad de +/+++ y solamente se observó un sólo caso con índice de expresión débil del antígeno (Tabla 18). Al igual que lo observado

en los TP, el 62,5% de los GLM expresaron MUC2 en menos del 5% de la superficie metastática.

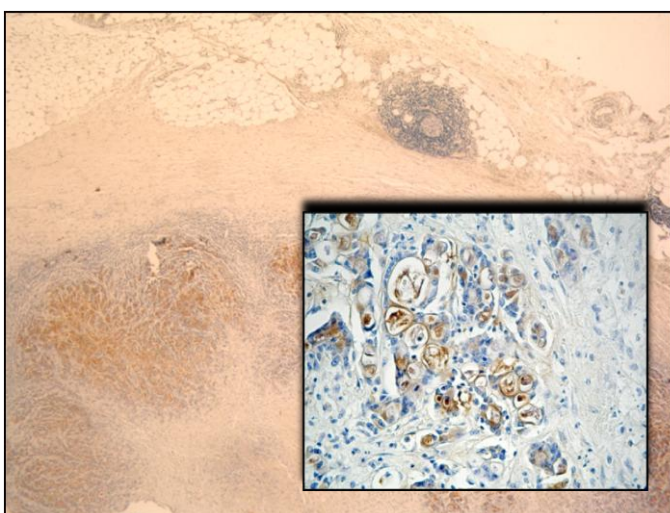
El 87,5% (n=7) presentó marcación difusa (Figura 23) y predominantemente en la membrana apical en el 62,5% (n=5) de los casos.



**Figura 23:** Sección a 400X de un ganglio linfático con metástasis de un adenocarcinoma bien diferenciado, donde se observa una reacción positiva de MUC2 en luz de la glándula tumoral con una intensidad de +/+++.

- **Expresión de MUC5AC**

Se halló expresión de MUC5AC solamente en el 19,2% (n=5) de los GLM con una intensidad de reacción de +/+++ en el 60% (n=3) de los casos y sólo en uno GLM se observó un índice de expresión fuerte (Tabla 18).

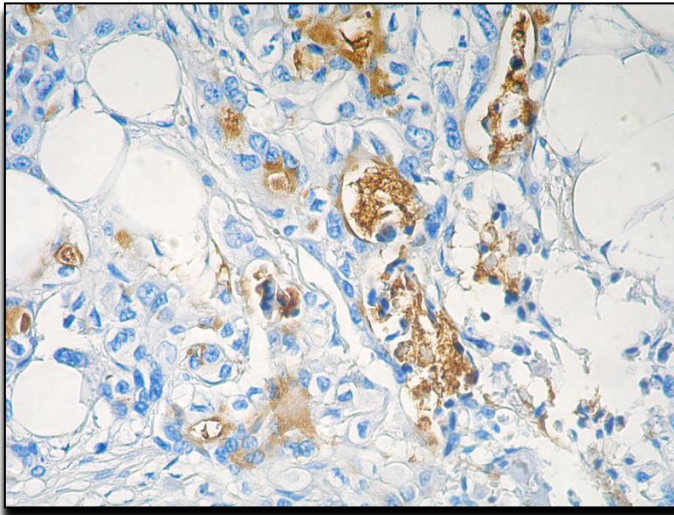


**Figura 24:** Microscopía óptica de una sección a 100X y a 400X (cuadro pequeño) de un ganglio linfático con metástasis de un adenocarcinoma moderadamente diferenciado. Se observa una tinción difusa de MUC5AC con un patrón principalmente en la membrana apical y una intensidad de +++/+++.

A diferencia de lo hallado en los TP, MUC5AC se encontró expresada predominantemente (60%) entre el 5 a 30% del área metastática ganglionar.

En el 80% (n=4) de los GLM la expresión fue difusa, predominantemente en la membrana apical (Figura 24) en el 60% (n=3) y citoplasmático y mixto en el 20% (Figura 25).

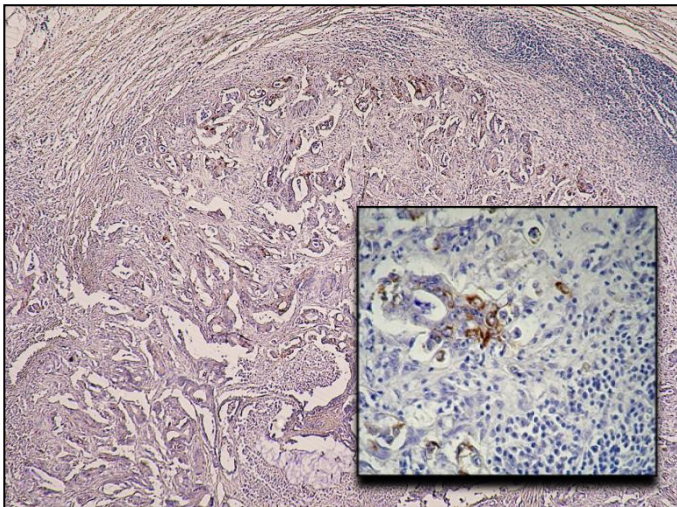




**Figura 25:** Corte histológico a 400X donde se observa la sección de un ganglio linfático con metástasis de un adenocarcinoma pobremente diferenciado. La inmunohistoquímica realizada en este ganglio muestra un patrón de reacción de MUC5AC mixta y una intensidad de ++/+++.

- **Expresión de *Tn***

Se encontró expresión de *Tn* en el 44,8% (n=13) de los GLM pero principalmente (76,9%) en menos del 5% del área metastática, con una intensidad de +/-+++ en el 84,6% (n=11) y con un índice de expresión débil en todos los casos (Tabla 18).



En el 84,6% (n=11) la reacción fue difusa, con un patrón de expresión predominantemente citoplasmático (92,3%, n=12) (Figura 26).

**Figura 26:** Sección a 100X y a 400X de un GLM de un adenocarcinoma moderadamente diferenciado donde observa expresión difusa de *Tn* con un patrón de expresión principalmente citoplasmático y una intensidad de ++/+++.

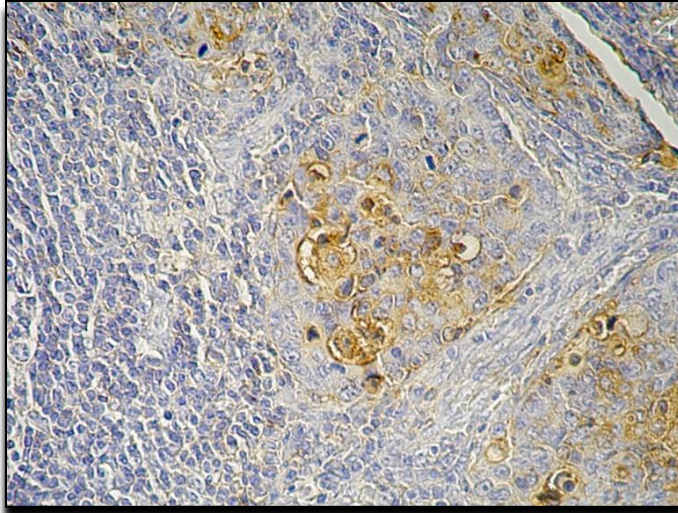
- **Expresión de *sialil Lewis a***

El 86,2% (n=25) de los GLM presentaron expresión de *sialil Lewis a* con una intensidad de ++/+++ en el 56% (n=14). El índice expresión hallado fue fuerte en el 48,3% (n=14). En los GLM se observó, más claramente que en los

TP, un predominio (52%) de expresión de este antígeno en más del 60% de la superficie metastática.

Todos los GLM presentaron una reacción difusa y con un patrón de

expresión en la membrana apical (Figura 27) en el 60% de los especímenes (Tabla 18).

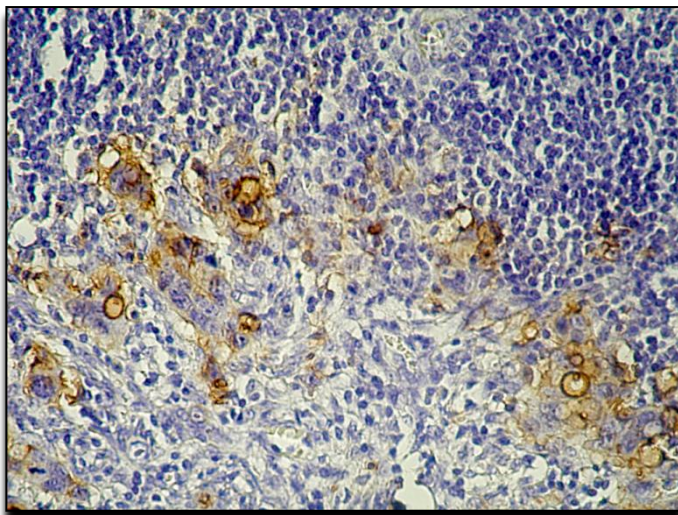


**Figura 27:** Microfotografía de una sección de un GLM de un adenocarcinoma pobremente diferenciado, donde se observa una reacción difusa de *sialil Lewis a* con un patrón de expresión mixto y una intensidad de ++/+++ (400X).

- **Expresión de *Lewis x***

*Lewis x* se expresó en el 69% (n=20) de los GLM (Figura 28) con una intensidad de +/+++ en el 80% (n=16). Se observó un predominio del índice de

expresión débil en el 58,6% (n=17) de los GLM (Tabla 18).

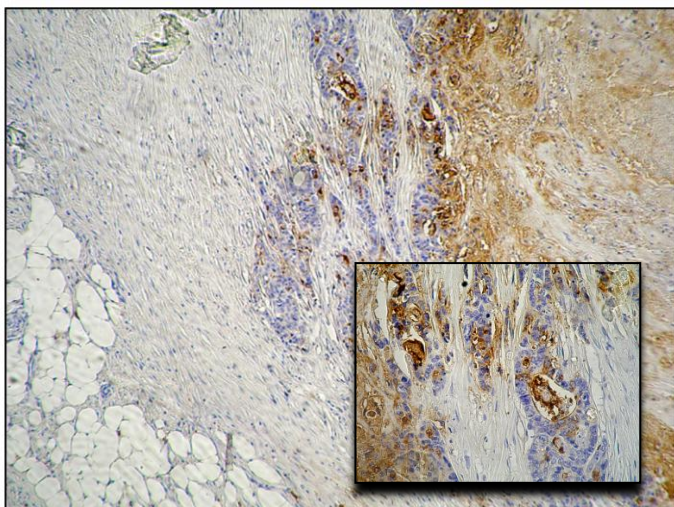


En el 80% (n=16) la reacción fue difusa con un patrón de expresión principalmente en la membrana apical en el 70% (n=14) de los ganglios.

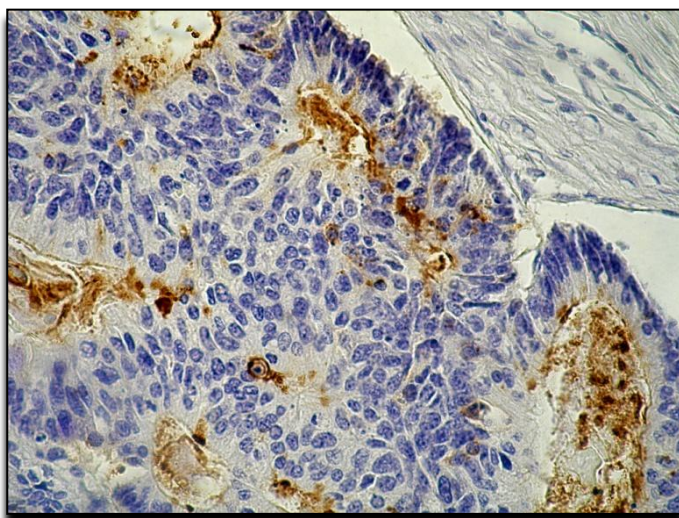
**Figura 28:** Inmunohistoquímica realizada a una sección de un ganglio con una metástasis de un adenocarcinoma bien diferenciado, donde se observa una reacción positiva difusa de *Lewis x* obtenida luego de la incubación con KM380. Se observa un patrón de expresión mixto y una intensidad de +++/+++ (400X).

- **Expresión de *sialil Lewis x***

El 72,4% (n=21) de los GLM presentaron expresión de *sialil Lewis x*



**Figura 29:** Microscopía óptica de una sección a 100X y a 400X (cuadro pequeño) de un GLM de un adenocarcinoma moderadamente diferenciado con infiltración de la cápsula. Se observa una tinción difusa de *sialil Lewis x*, luego de la incubación con el anticuerpo KM93, con un patrón mixto y una intensidad de +++/+++.



(Tabla 18); siendo la intensidad de ++/+++ y +++/+++ en el 47,6% (n=10) y de +/+++ en el 52,4% (n=11) de los ganglios. El índice de expresión fue fuerte en el 31,0% (n=9) de los casos. A diferencia de lo hallado en los TP, el 52,4% de los GLM presentaron reactividad en más del 60% del área metastática.

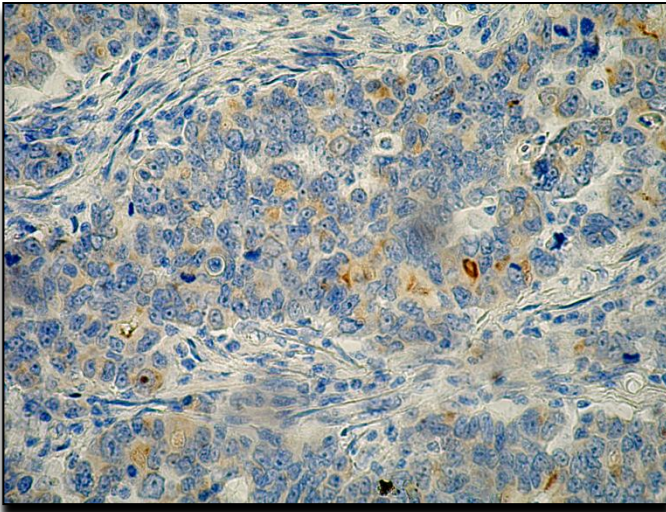
El 95% (n=19) presentó reacción difusa con un patrón de expresión en la membrana apical en el 47,6% y mixta (Figura 29 y 30) en el 33,3% de los casos.

**Figura 30:** Sección de un GLM de un adenocarcinoma bien diferenciado donde se observa un patrón de expresión mixto de *sialil Lewis x* y con una intensidad de +++/+++ (400X).

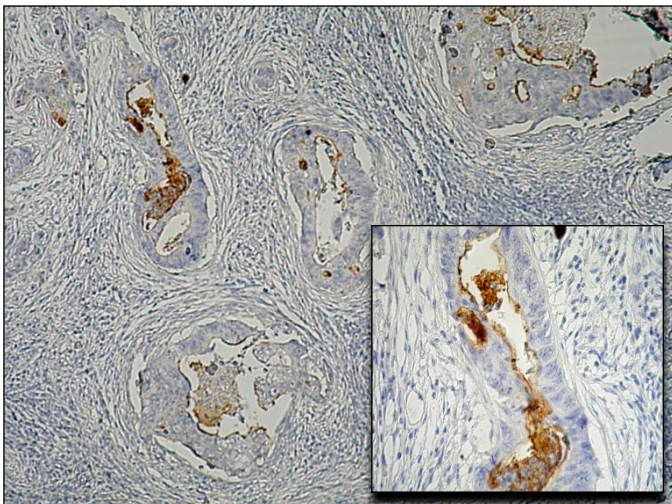
- **Expresión de *Lewis y***

Se observó que el 75,9% (n=22) de los GLM expresaron *Lewis y* (Tabla 18) con una intensidad de +/+++ en el 81,8% (n=18) de los casos, observándose un índice débil en el 62,1% (n=18).

En el 90,9% (n=20) se observó una reacción difusa, predominantemente citoplasmática (Figura 31) en el 72,7% (n=16) mientras que en la membrana apical (Figura 32) se halló expresión en el 18,2% de los casos.



**Figura 31:** Microfotografía de una sección a 400X de un ganglio linfático con metástasis de un adenocarcinoma pobremente diferenciado. La reacción difusa de *Lewis* y fue obtenida luego de la incubación con el anticuerpo C14. Se observa una reacción difusa, principalmente citoplasmática y con una intensidad de ++/+++.

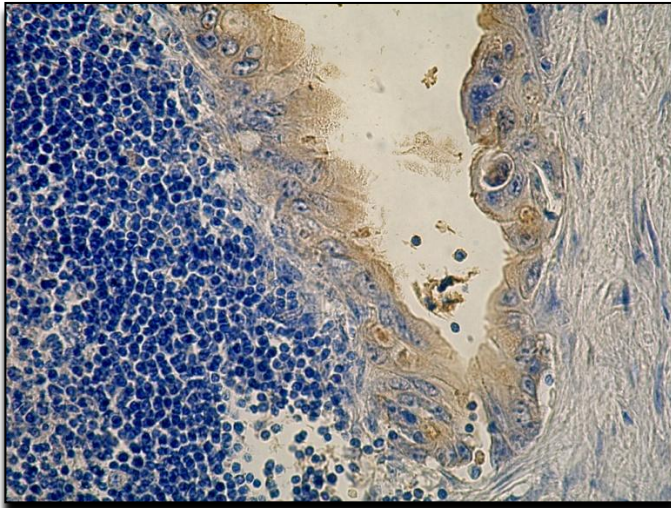


**Figura 32:** Microscopía óptica, a 100X y en el recuadro a 400X, de una sección de un GLM de un adenocarcinoma moderadamente diferenciado donde se observa una reacción difusa de *Lewis* y principalmente en membrana apical y con una intensidad de ++/+++.

- **Expresión de CEA**

En el 80% (n=24) de los GLM expresaron CEA; el 79,2% (n=19) presentó una intensidad de reacción de +/+++ mientras que el índice de expresión fue débil en el 70% (n=21) (Tabla 18).

En el 95,8% (n=23) la marcación fue difusa con predominio en la membrana apical (Figura 33) en el 65,2% (n=15) de los casos y mixta en el 26,1%.



**Figura 33:** Corte histológico de un ganglio linfático con metástasis de un adenocarcinoma bien diferenciado. Luego de realizar la técnica de inmunohistoquímica se observa un patrón de expresión mixto de CEA con una intensidad de +/+++ (400X).

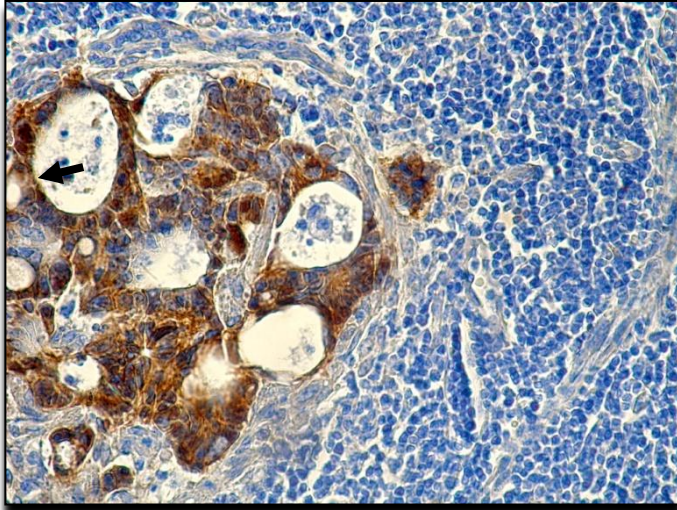
- **Expresión de  $\beta$ -catenina**

De los ganglios metastáticos analizados, el 83,3% (n=10) expresaron  $\beta$ -catenina (Tabla 18). En el 60,0% (n=6) de los casos la intensidad fue +/+++ y el 33,3% (n=4) el índice de expresión fue fuerte. El porcentaje de área con reactividad positiva de  $\beta$ -catenina se muestra en la Tabla 19.

Como se describió en los tumores primarios (pag. 119) respecto al patrón de expresión, se observó en el 83,3% reacción positiva en el citoplasma, 25% en las membranas basolaterales y 18,2% en los núcleos (Figura 34) de las células tumorales metastáticas.

**Tabla 19:** Expresión de  $\beta$ -catenina en los GLM según el área celular (%).

Porcentaje	Membrana	Citoplasma	Núcleo
0	2 (18,2)	2 (16,7)	2 (18,2)
<5	4 (36,4)	0 (0,0)	4 (36,4)
5a30	2 (18,2)	0 (0,0)	3 (27,3)
30a60	2 (18,2)	1 (8,3)	2 (18,2)
>60	1 (9,1)	9 (75,0)	0 (0,0)



**Figura 34:** Inmunohistoquímica de una sección de un ganglio linfático con metástasis de un adenocarcinoma moderadamente diferenciado (400X). Se observa reacción de  $\beta$ -*catenina* tanto en el citoplasma como en el núcleo (flecha negra).

### 1.1.3. En los pólipos

De los veintiséis pólipos estudiados catorce correspondieron a displasias leves, nueve a displasias moderadas y tres a displasias severas. Diecinueve correspondieron a adenomas tubulares y siete a adenomas tubulovelloso.

Como se describe en la Tabla 20 todos los adenomas, independientemente de su grado de displasia, presentaron reactividad de CEA y  $\beta$ -*catenina*, el 70% de los mismos expresaron los antígenos carbohidratos *Lewis x/y* y *sialil Lewis a*; menos de la mitad de las muestras expresó las mucinas MUC1 y MUC2. Se encontró intensidad de +++/+++ solamente con el antígeno CEA; asimismo, todos los antígenos presentaron un predominio de tinción difusa. Los antígenos MUC1, *Tn* y *Lewis y* se expresaron principalmente en el citoplasma mientras que MUC2, MUC5AC, *Lewis x*, *sialil Lewis x/a* y CEA se distribuyeron en forma mixta.

Los antígenos *Lewis x* y *sialil Lewis x/a* se encontraron más expresados en el tejido superficial que en el profundo; asimismo, la intensidad también fue mayor en la parte superficial.

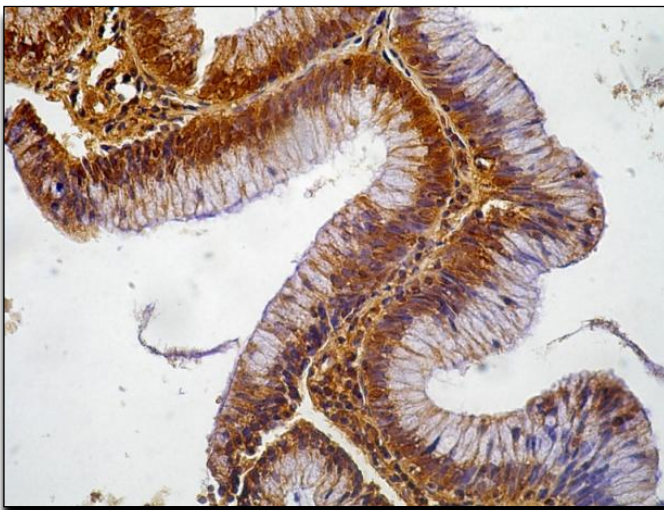
**Tabla 20:** Expresión antigénica obtenida por inmunohistoquímica en los adenomas.

		Expresión de los antígenos estudiados en los adenomas (%)									
		MUC1 (n=23)	MUC2 (n=25)	MUC5AC (n=26)	Tn (n=24)	sLe a (n=25)	Le x (n=24)	sLe x (n=25)	Le y (n=25)	CEA (n=23)	$\beta$ -cat (n=28)
<b>Reactividad</b>		10 (43,5)	11 (44,0)	13 (50,0)	12 (50,0)	18 (72,0)	18 (75,0)	14 (56,0)	17 (68,0)	23 (100)	28 (100,0)
<b>Intensidad</b>	+	3 (30,0)	11 (100,0)	12 (92,3)	11 (91,7)	11 (61,1)	17 (94,4)	13 (92,9)	17 (100,0)	11 (47,8)	22 (78,6)
	++	7 (70,0)	-	1 (7,7)	1(8,3)	7 (38,9)	1 (5,6)	1 (7,1)	-	10 (43,5)	6 (21,4)
	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	2 (8,7)	-
<b>Porcentaje del área adenoma</b>	<5	-	4 (36,4)	5 (38,5)	5 (41,7)	9 (50,0)	5 (27,8)	7 (50,0)	2 (11,8)	-	-
	5a30	-	2 (18,2)	5 (38,5)	4 (33,3)	7 (38,9)	8 (44,4)	6 (42,9)	10 (58,8)	-	7 (25,0)
	30a60	2 (20,0)	4 (36,4)	1 (7,7)	1 (8,3)	1 (5,6)	3 (16,7)	1 (7,1)	3 (17,6)	4 (17,4)	13 (46,4)
	>60	8 (80,0)	1 (9,1)	2 (15,4)	2 (16,7)	1 (5,6)	2 (11,1)	-	2 (11,8)	19 (82,6)	8 (28,6)
<b>Índice</b>	Ausente	13 (56,5)	14 (56,0)	13 (50,0)	12 (50,0)	7 (28,00)	6 (25,0)	11 (44,0)	8 (32,0)	-	-
	Débil	4 (17,4)	11 (44,0)	12 (46,2)	11 (45,8)	17 (68,0)	18 (75,0)	14 (56,0)	17 (68,0)	11 (47,8)	23 (82,1)
	Fuerte	6 (26,1)	-	1 (3,8)	1 (4,2)	1 (4,0)	-	-	-	12 (52,2)	5 (17,9)
<b>Área</b>	Focal	-	1(9,1)	1 (7,7)	-	1 (5,6)	1 (5,6)	2 (14,3)	1 (5,9)	-	-
	Difuso	10 (100)	10 (90,9)	12 (92,3)	24 (100,0)	17 (94,4)	17 (94,4)	12 (85,7)	16 (94,1)	23 (100,0)	28 (100,0)
<b>Patrón</b>	Membrana apical	-	2 (18,2)	2 (15,4)	-	-	1 (5,6)	2 (14,3)	1 (5,9)	7 (30,4)	*
	Citoplasmático	8 (80,0)	-	4 (30,8)	12 (100,0)	1 (5,6)	1 (5,6)	1 (7,1)	16 (94,1)	-	*
	Mixto	2 (20,0)	9 (81,8)	7 (53,8)	-	17 (94,4)	16 (88,9)	11(78,6)	-	16 (69,6)	*
<b>RGS<sup>#</sup></b>		-	-	1 (7,7)	2 (16,7)	9 (50,0)	10 (55,6)	9 (64,3)	-	2 (8,7)	2 (7,1)

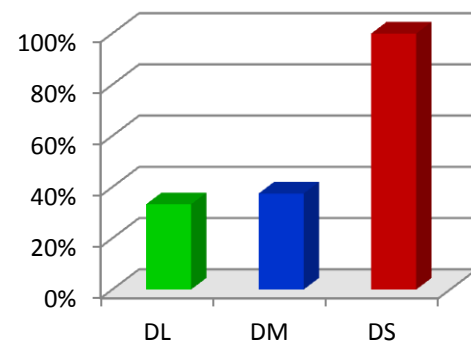
<sup>#</sup>RSGN=Reactividad en las Glándulas Superficiales, \* Ver descripción de área de expresión de  $\beta$ -catenina en la Tabla 21.

• **Expresión de MUC1**

Se halló 43,5% de reactividad de MUC1 en los adenomas (Tabla 20), el 70% presentó una intensidad de ++/+++ , el 80% se expresó en más del 60% de la superficie displásica (Figura 35). Sólo el 26,1% de las muestras expresaron fuertemente MUC1 y en todos los casos se encontró tinción difusa de la mucina. El 80% de la reacción fue en el citoplasma y sólo el 20% mixta. Se observó además, una mayor expresión de MUC1 (66,7%) en los adenomas con displasia severa respecto a aquellos con displasia leve (Figura 36). De los adenomas con expresión positiva de MUC1, el 70% correspondió a adenomas tubulares y el resto a tubulovelloso.



**Figura 35:** Microfotografía de una sección a 400X de un adenoma tubulovelloso con displasia moderada donde se observa tinción difusa de MUC1 luego de la incubación con el anticuerpo HMFG-1. La reacción observada fue predominantemente citoplasmática y con una intensidad ++/+++ (400X).



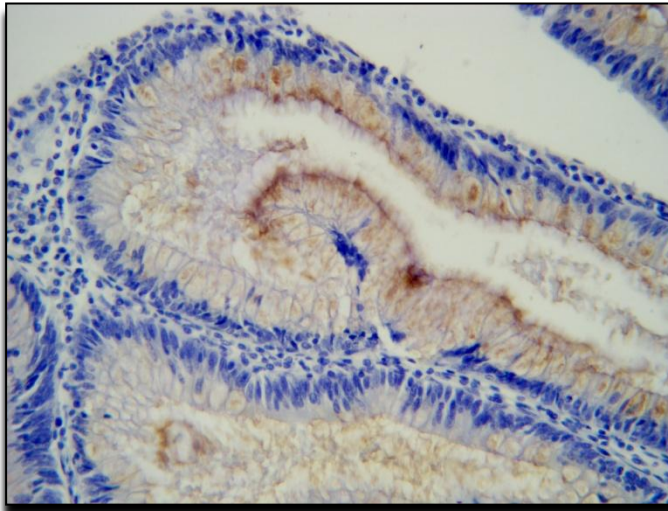
**Figura 36:** Porcentaje de expresión de MUC1 en los pólipos según los grados de displasia. DL=displasia leve, DM=displasia moderada y DS=displasia severa.

• **Expresión de MUC2**

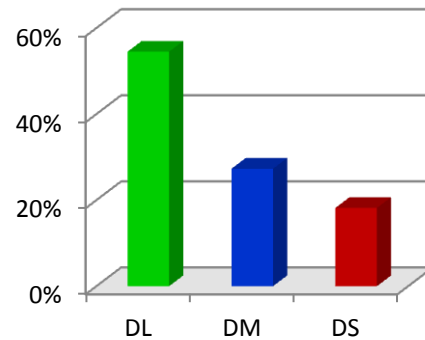
La mucina MUC2 se encontró expresada en el 44% de los adenomas (Tabla 20) con una intensidad de expresión de +/+++ (Figura 37) y un índice de expresión débil. En el 81,8% de los adenomas el patrón de expresión fue mixto.



Observamos una disminución de expresión de MUC2 conforme el grado de displasia (Figura 38) siendo la reactividad del 54,5% en los adenomas con displasia leve, 27,3% en las displasias moderadas y el 18,2% en las displasias severas. El 81,8% de los adenomas MUC2-positivos fueron tubulares y el resto tubulovellosos.



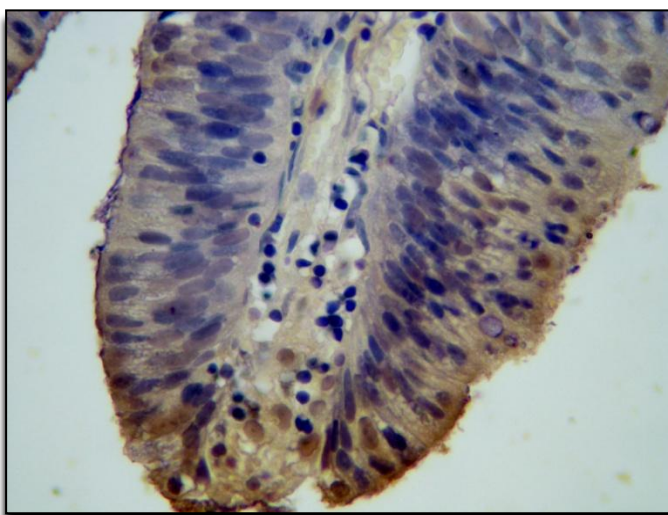
**Figura 37:** Sección de un adenoma tubular con displasia leve donde se observa tinción difusa de MUC2, mixta y con una intensidad +/+++ (400X).



**Figura 38:** Porcentajes de expresión MUC2 en los pólipos. Observamos una disminución de expresión de MUC2 conforme el grado de displasia DL=displasia leve, DM=displasia moderada y DS=displasia severa.

• **Expresión de MUC5AC**

La mitad de los adenomas presentaron reactividad positiva de MUC5AC



**Figura 39:** Corte histológico correspondiente a una sección a 400X de un adenoma tubular con displasia leve donde se observa tinción difusa y mixta de MUC5AC con una intensidad +/+++.

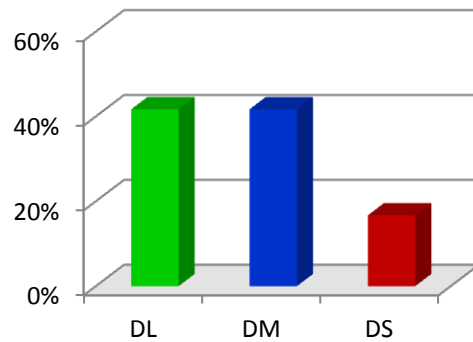
(Tabla 20); asimismo, el 92,3% de los casos la intensidad fue +/+++.

El índice de expresión observado fue principalmente débil con un patrón mixto en el 53,8% de los casos (Figura 39).

MUC5AC se encontró expresado 33% menos en los

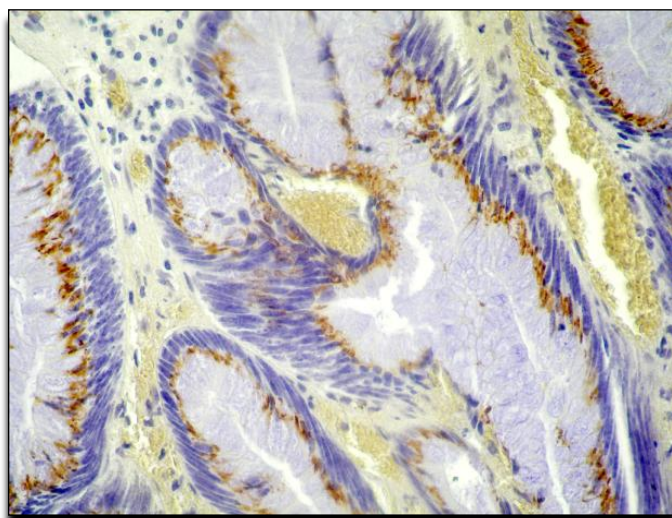
adenomas tubulovelloso respecto a los tubulares. También se observó un cambio de expresión según el grado de displasia (Figura 40).

**Figura 40:** Expresión de MUC5AC. En la figura se muestran los porcentajes de reactividad de la mucina según los grados de displasia. Los adenomas con displasia severa (DS) presentaron 40% menos reactividad que aquellos con displasia leve (DL) o displasia moderada (DM).

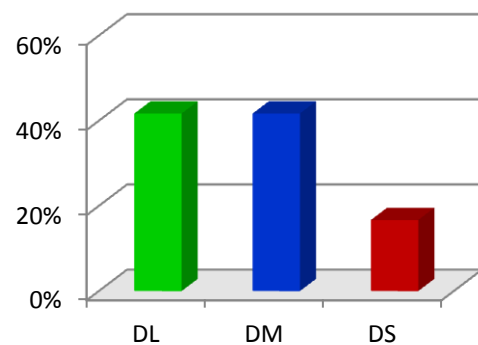


• **Expresión de Tn**

*Tn* se encontró expresado en la mitad de los adenomas con una intensidad de +/+++ en el 91,7% de los especímenes (Tabla 20) y un índice de expresión débil en el 45,8%. El patrón fue citoplasmático (supranuclear) en todos los casos (Figura 41). El 16,7% de los adenomas presentaron mayor expresión e intensidad en la superficie del tejido. El 75% de los adenomas que expresaron *Tn* fueron tubulares y el resto tubulovelloso. En la Figura 42 se muestra la expresión de este antígeno en los distintos grados de displasia.



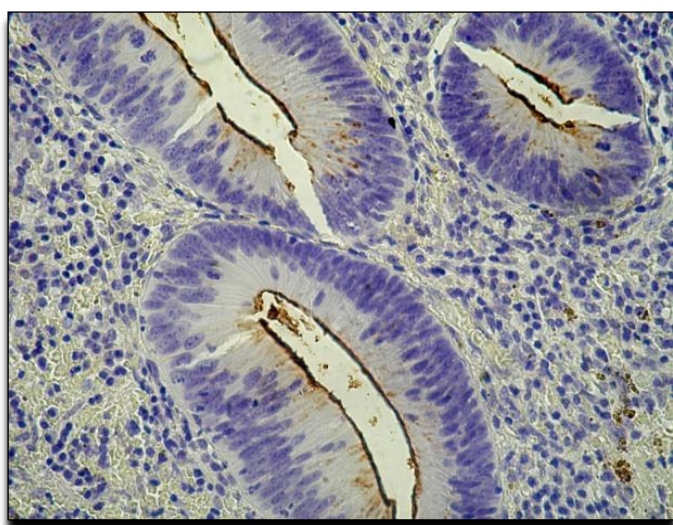
**Figura 41:** Inmunohistoquímica realizada en una sección de un adenoma tubular con displasia leve donde se observa en la zona supranuclear reactividad positiva de *Tn* y con una intensidad +/+++ (400X).



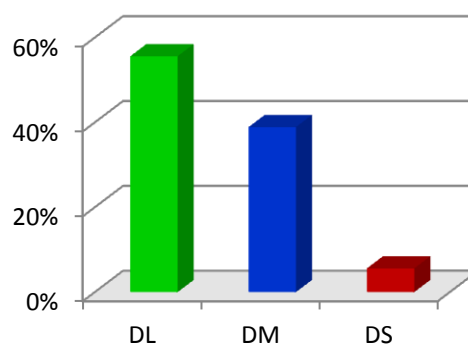
**Figura 42:** Expresión de *Tn* según los grados de displasia de los pólipos. Los adenomas con displasia severa (DS) expresaron 25% menos expresión de *Tn* que los adenomas con displasia leve (DL) o moderada (DM).

- **Expresión de *sialil Lewis a***

El 72% de los adenomas expresaron *sialil Lewis a* con una intensidad de +/+++ en el 61,1% de los especímenes (Tabla 20). El índice de expresión fue débil en el 45,8% y en el 94,4% el patrón hallado fue mixto (Figura 43). Se observó en la mitad de los adenomas mayor expresión e intensidad en la parte superficial del tejido analizado. De los ocho adenomas con reactividad positiva de *sialil Lewis a*, seis fueron adenomas tubulares y dos tubulovelloso. En la Figura 44 se muestra la expresión de éste antígeno según el grado de displasia del pólipo.



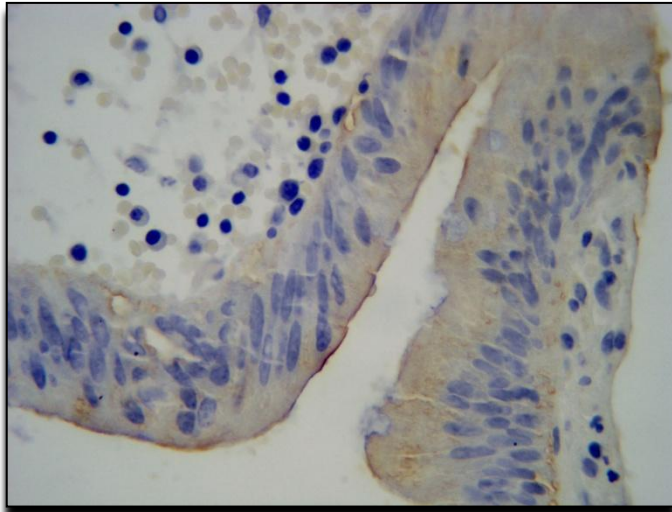
**Figura 43:** Sección de un adenoma tubular con displasia leve donde se observa un patrón de expresión mixto de *sialil Lewis a* con predominio en la membrana apical y con una intensidad +/+++ (400X).



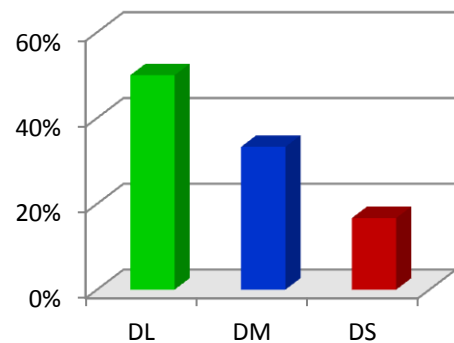
**Figura 44:** La expresión de *sialil Lewis a* disminuyó conforme aumentó el grado de displasia encontrándose reactividad en el 55,6% de los adenomas con displasia leve (DL), 38,9% con displasia moderada (DM) y sólo en el 5,6% con displasia severa (DS).

- **Expresión de *Lewis x***

El carbohidrato *Lewis x* se expresó en el 75% de los adenomas (Tabla 20) con una intensidad +/+++ en el 94,4% de los casos. Todos presentaron un índice de expresión débil y en el 88,9% el patrón fue mixto (Figura 45); asimismo, en más de la mitad de los adenomas la expresión fue mayor en la parte superficial del adenoma. Por otra parte, se observó una disminución de la expresión en los adenomas con displasia severa respecto de aquellos con displasia leve o moderada (Figura 46). El 77,8% de los adenomas tubulares expresó *Lewis x*.



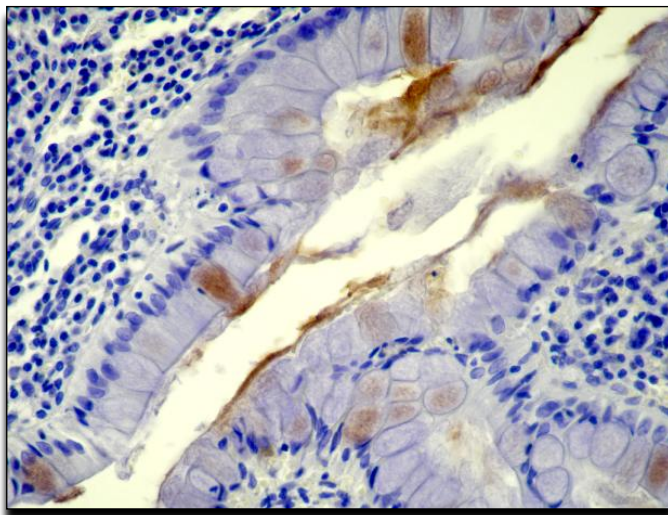
**Figura 45:** Microfotografía de una sección de un adenoma tubular con displasia leve. Luego de la incubación con el anticuerpo KM380 se observa expresión mixta de *Lewis x* con una intensidad +/+++ (400X).



**Figura 46:** De los adenomas con reactividad positiva de *Lewis x* el 50% fueron adenomas con displasia leve (DL), 33,3% con displasia moderada (DM) y 16,7% con displasia severa (DS).

- **Expresión de *sialil Lewis x***

Más de la mitad de los adenomas expresaron *sialil Lewis x* con una intensidad +/+++ en el 92,9% de los mismos (Tabla 20). Todos presentaron un

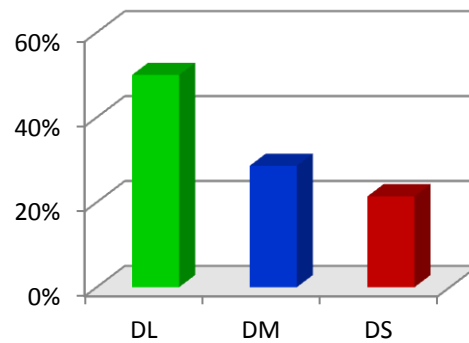


**Figura 47:** Corte histológico a 400X correspondiente a una sección de un adenoma tubular con displasia severa. Se observa expresión mixta de *sialil Lewis x* con una intensidad ++/+++.

índice de expresión débil. El 78,6% presentó un patrón mixto (Figura 47) y en el 64,3% la reactividad fue principalmente en la superficie del pólipo.

En el 75% de los adenomas tubulares se observó reacción positiva de *sialil Lewis x*; por otra parte, dicha expresión disminuyó según el grado de displasia (Figura 48).

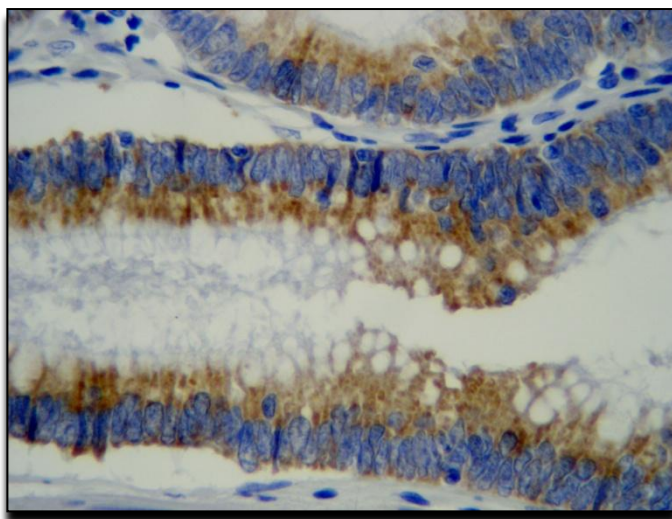
**Figura 48:** Sialil Lewis x se expresó 60% menos en los adenomas con displasia severa (DS) que en aquellos con displasia leve (DL). DM=Displasia Moderada.



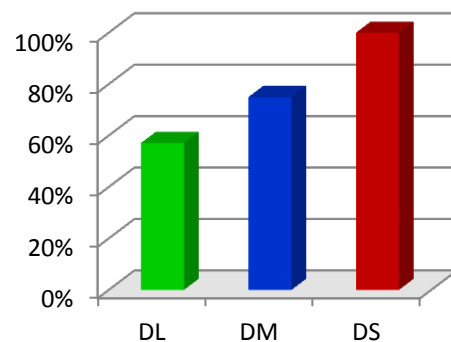
• **Expresión de Lewis y**

El 68% de los pólipos expresaron *Lewis y* con una intensidad de +/+++ y un índice de expresión débil en todos los casos (Tabla 20). El patrón de expresión fue citoplasmático en el 94,1% (Figura 49).

El 77,8% de los adenomas tubulares expresaron *Lewis y*. En la Figura 50 se muestra la expresión de éste antígeno según el grado de displasia del pólipo.



**Figura 49:** Inmunohistoquímica realizada a una sección de un adenoma tubular con displasia severa. Luego de la incubación con el anticuerpo C14 se observa expresión citoplasmática de *Lewis y* con una intensidad ++/+++ (400X).

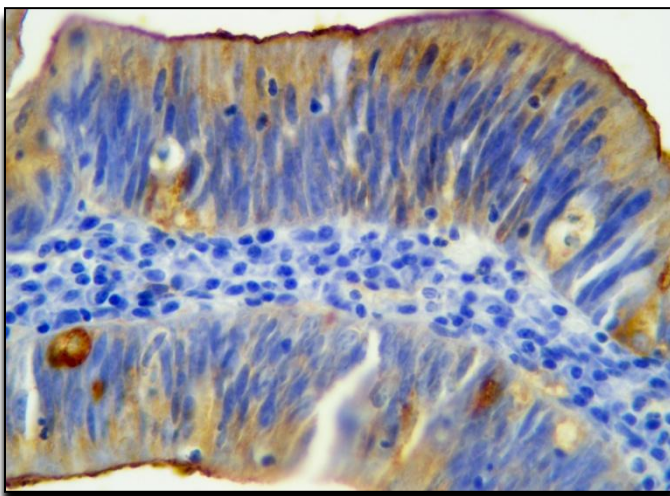


**Figura 50:** La expresión de *Lewis y* aumentó conforme el grado de displasia siendo positivo en el 57,1% de los adenomas con displasia leve (DL), en el 75% con displasia moderada (DM) y en todos con displasia severa (DS).

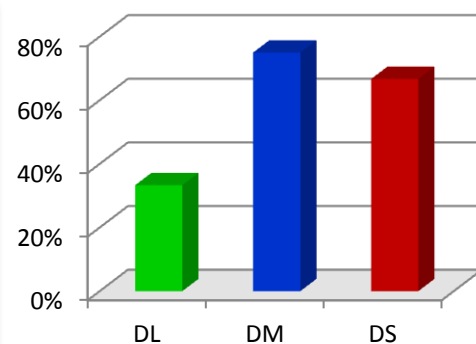
- **Expresión de CEA**

Todos los adenomas expresaron CEA con una intensidad de +/+++ y ++/+++ en el 47,8% y 43,5% de los casos, respectivamente. El índice de expresión fuerte en el 52,2% (Tabla 20). El 69,6% de los pólipos presentaron un patrón de expresión mixto (Figura 51).

Todos los pólipos tubulovillosos y con displasia severa expresaron CEA en más del 60% del adenoma. Se observó una tendencia al aumento de expresión conforme progresó el grado de displasia (Figura 52).



**Figura 51:** Microscopía óptica a 400X de una sección de un adenoma tubular con displasia moderada. Se observa expresión mixta de CEA y con una intensidad ++/+++ .



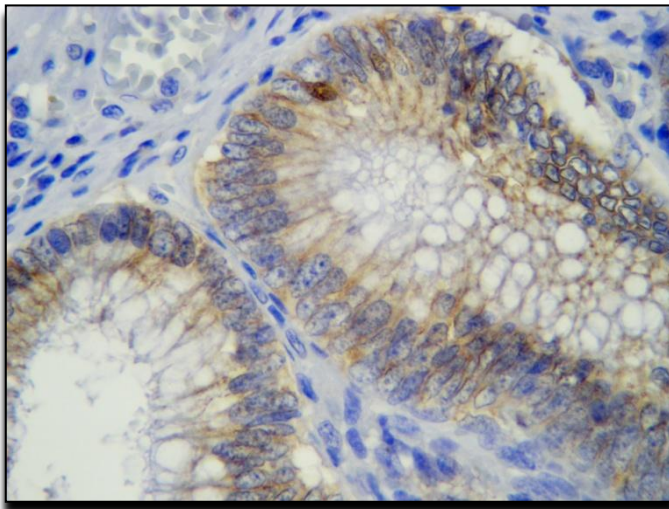
**Figura 52:** La reactividad de CEA aumentó según el grado de displasia encontrándose expresión en el 33,3% de los adenomas con displasia leve (DL), 75% con displasia moderada (DM) y 66,7% en aquellas con displasia severa (DS).

- **Expresión de  $\beta$ -catenina**

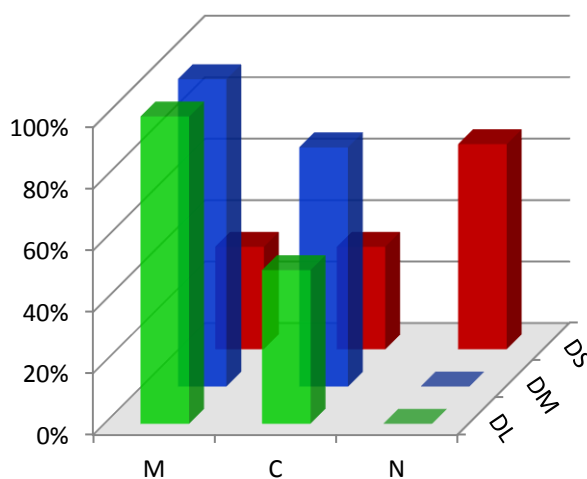
$\beta$ -catenina se detectó en todos los pólipos con una intensidad +/+++ en el 78,6% (Tabla 20); asimismo, la expresión fue principalmente en las membranas basolaterales (el 82,1% de los adenomas presentaron este patrón en más del 60% de la superficie del pólipo), y en menor porcentaje en el citoplasma y en el núcleo (Tabla 21, Figura 53). Al igual como se consideró para los TP y los GLM, en las Figuras 54 y 55 se muestra la expresión de éste antígeno según el tipo de adenoma y su grado de displasia.

**Tabla 21:** Expresión de  $\beta$ -catenina en los adenomas según el área celular (%).

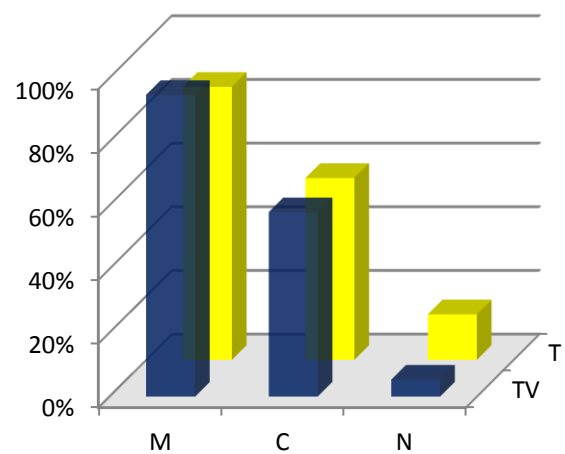
Porcentaje	Membrana	Citoplasma	Núcleo
0	0	0	11 (39,3)
<5	1 (3,6)	2 (7,1)	11 (39,3)
5a30	1 (3,6)	11 (39,3)	4 (14,3)
30a60	3 (10,7)	7 (25,0)	2 (7,1)
>60	23 (82,1)	8 (28,6)	0



**Figura 53:** Sección de un adenoma tubular con displasia leve donde se observa expresión de  $\beta$ -catenina en las membranas basolaterales, citoplasmas y algunos núcleos. La intensidad en este corte es de +/+++ (400X).



**Figura 54:** Mientras que todos los adenomas con displasia leve (DL) y moderada (DM) expresaron  $\beta$ -catenina en la membrana, el 50% y 77,8% presentaron reactividad positiva en el citoplasma (C), respectivamente. En ninguno de estos adenomas se halló expresión en el núcleo (N). Inversamente, en los adenomas con displasia severa (DS) se halló un aumento de expresión nuclear (66,7%) y una menor reactividad tanto en la membrana (33,3%) como en el citoplasma (33,3%).



**Figura 55:** Los adenomas tubulares (T) y tubulovillosos (TV) presentaron similar expresión tanto en las membranas (M) basolaterales (85,7% y 94,7% %) como en el citoplasma (C) (57,1% y 57,9%) mientras que en los tubulares la expresión fue mayor en el núcleo (N) (14,3% versus 5,3%).

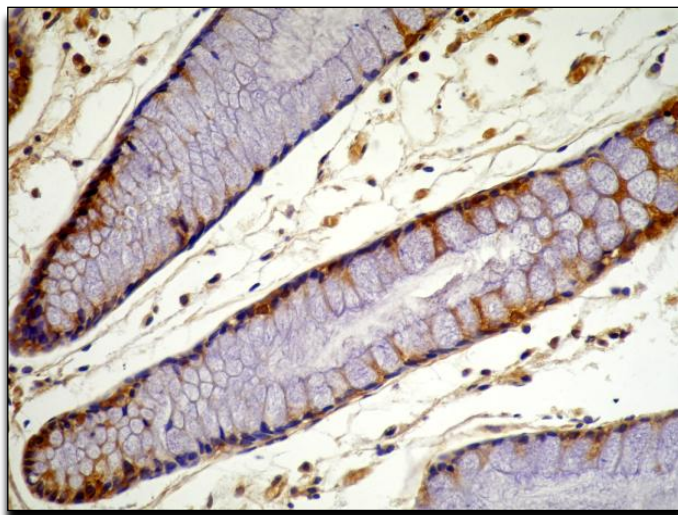
#### 1.1.4. En los especímenes normales

En más de la mitad de los 68 especímenes normales analizados se halló expresión positiva de las mucinas MUC2 y MUC5AC así como los antígenos carbohidratos *Tn*, *Lewis x/y* y *sialil Lewis x/a* (Tabla 22).

Excepto CEA, todos los antígenos estudiados se expresaron con una intensidad de +/+++ y con un índice de expresión débil. Todos los antígenos se expresaron en forma difusa. Sólo MUC1, CEA y  $\beta$ -*catenina* presentaron tinción en más del 60% de la superficie del espécimen normal.

El patrón de expresión de las mucinas MUC1 y MUC2 fue predominantemente citoplasmática y mixta, respectivamente, mientras que la mucina MUC5AC se expresó estos dos patrones en igual proporción. *Tn*, *Lewis x* y *sialil Lewis x* se expresaron principalmente en el citoplasma mientras que los antígenos carbohidratos *Lewis x* y *sialil Lewis a* lo hicieron en forma mixta. La expresión de CEA fue, en la mayoría de las muestras, mixta. En todos los casos se observó expresión  $\beta$ -*catenina* en las membranas basolaterales y en menor porcentaje en el citoplasma; éste antígeno nunca se expresó en el núcleo de las células colorrectales normales.

- **Expresión de MUC1**



Se halló reactividad de MUC1 sólo en el 27,9% de los tejidos normales (Tabla 22) con intensidad +/+++ en el 73,7% de los casos. El índice de expresión fue débil en el 22,1% y con un patrón citoplasmático en el 63,2% de los casos (Figura 56).

**Figura 56:** Corte histológico de un espécimen normal luego de la incubación con el anticuerpo HMFG-1. Se observa expresión de MUC1 predominantemente en el citoplasma con una intensidad ++/+++ (400X).



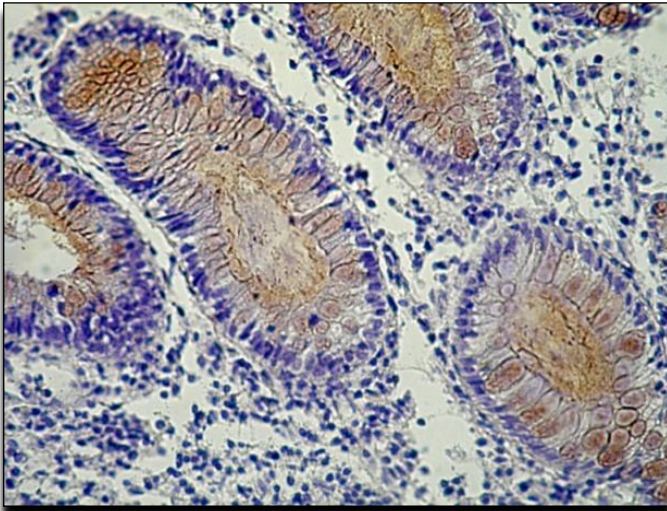
**Tabla 22:** Expresión antigénica obtenida por inmunohistoquímica en muestras colorrectales normales.

		Expresión de los antígenos estudiados en las muestras colorrectales normales (%)									
		MUC1 (n=68)	MUC2 (n=65)	MUC5AC (n=68)	Tn (n=68)	sLe a (n=66)	Le x (n=64)	sLe x (n=67)	Le y (n=67)	CEA (n=66)	$\beta$ -cat (n=66)
<b>Reactividad</b>		19 (27,9)	34 (52,3)	35 (51,5)	36 (52,9)	41 (62,1)	39 (60,9)	16 (23,9)	46 (68,7)	66 (100)	66 (100,0)
<b>Intensidad</b>	+	14 (73,7)	31 (91,2)	31 (88,6)	34 (94,4)	36 (87,8)	37 (94,9)	16 (100,0)	46 (100,0)	28 (42,4)	54 (81,8)
	++	5 (26,3)	3 (8,8)	3 (8,6)	2 (5,6)	5 (12,2)	2 (5,1)	-	-	31 (47,0)	12 (18,2)
	+++	-	-	1 (2,9)	-	-	-	-	-	7 (10,6)	-
<b>Porcentaje del tejido normal</b>	<5	4 (21,1)	4 (11,8)	16 (45,7)	10 (27,8)	20 (48,8)	6 (15,4)	11 (68,8)	15 (32,6)	2 (3,0)	-
	5a30	4 (21,1)	12 (35,3)	12 (34,3)	14 (38,9)	12 (29,3)	23 (59,0)	4 (25,0)	14 (30,4)	7 (10,6)	11 (16,7)
	30a60	4 (21,1)	7 (20,6)	4 (11,4)	7 (19,4)	8 (19,5)	7 (17,9)	1 (6,3)	10 (21,7)	8 (12,1)	24 (36,4)
	>60	7 (36,8)	11 (32,4)	3 (8,6)	5 (13,9)	1 (2,4)	3 (7,7)	-	7 (15,2)	49 (74,2)	31 (47,0)
<b>Índice</b>	Ausente	49 (72,1)	31 (47,7)	33 (48,5)	32 (47,1)	25 (37,9)	25 (39,1)	51 (76,1)	21 (31,3)	-	-
	Débil	15 (22,1)	31 (47,7)	32 (47,1)	34 (50,0)	38 (57,6)	37 (57,8)	16 (23,9)	46 (68,7)	29 (43,9)	55 (83,3)
	Fuerte	4 (5,9)	3 (4,6)	3 (4,4)	2 (2,9)	3 (4,5)	2 (3,1)	-	-	37 (56,1)	11 (16,7)
<b>Área</b>	Focal	2 (10,5)	5 (14,7)	4 (11,4)	7 (19,4)	2 (4,9)	3 (7,7)	5 (31,3)	8 (17,4)	1 (1,5)	-
	Difuso	17 (89,5)	29 (85,3)	31 (88,6)	29 (80,6)	39 (95,1)	36 (92,3)	11 (68,8)	38 (82,6)	65 (98,5)	66 (100,0)
<b>Patrón</b>	Membrana apical	2 (10,5)	2 (5,9)	5 (14,3)	-	1 (2,4)	7 (17,9)	6 (37,5)	1 (2,2)	9 (13,6)	*
	Citoplasmático	12 (63,2)	5 (14,7)	15 (42,9)	35 (97,2)	3 (7,3)	4 (10,3)	7 (43,8)	45 (97,8)	-	*
	Mixto	5 (26,3)	27 (79,4)	15 (42,9)	1 (2,8)	37 (90,2)	28 (71,8)	3 (18,8)	-	57 (86,4)	*
<b>RGS<sup>#</sup></b>		-	1 (2,9)	7 (20,0)	11 (30,6)	7 (17,1)	18 (46,2)	6 (37,5)	-	22 (33,3)	16 (24,2)

<sup>#</sup>RSGN=Reactividad en las Glándulas Superficiales, \* Ver descripción de área de expresión de  $\beta$ -catenina en la Tabla 23.

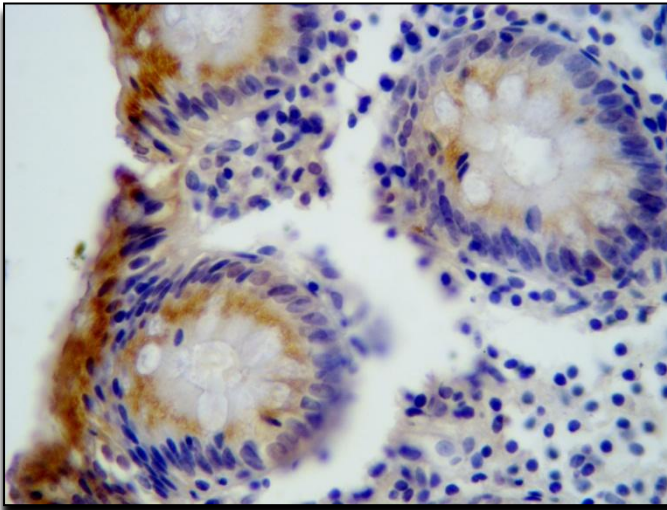
- **Expresión de MUC2**

MUC2 se halló expresada en el 52,3% de las muestras normales con una intensidad de +/+++ en el 91,2% de los casos (Tabla 22) con un índice de expresión débil en el 47,7% y con un patrón de tinción mixto en el 79,4% (Figura 57).



**Figura 57:** Microscopía óptica de una sección de un espécimen normal donde se observa expresión mixta de MUC2 con una intensidad +/+++ (400X).

- **Expresión de MUC5AC**

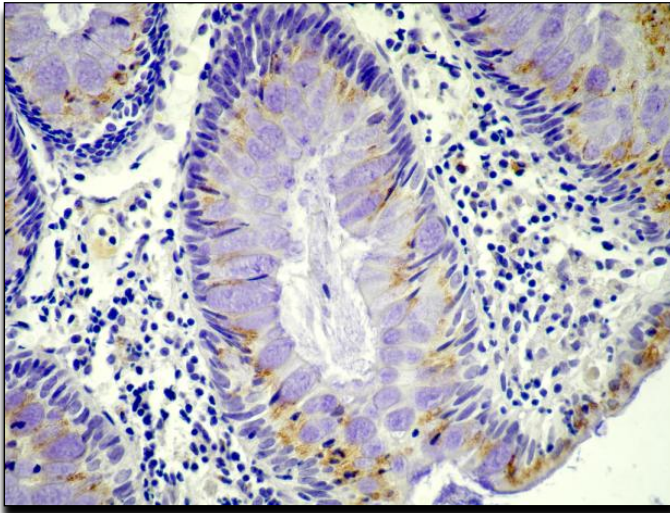


La expresión de la mucina MUC5AC se observó en el 51,5% de los tejidos normales con una intensidad de +/+++ en el 88,6% (Tabla 22). El 47,1% presentó un índice de expresión débil y en el 42,9% el patrón fue citoplasmático y mixto (Figura 58).

**Figura 58:** Inmunohistoquímica realizada a una sección de un espécimen normal en donde se observa una expresión citoplasmática de MUC5AC con una intensidad +/+++ (400X).

- **Expresión de *Tn***

El 52,9% de las muestras control expresó *Tn* con una intensidad de +/+++

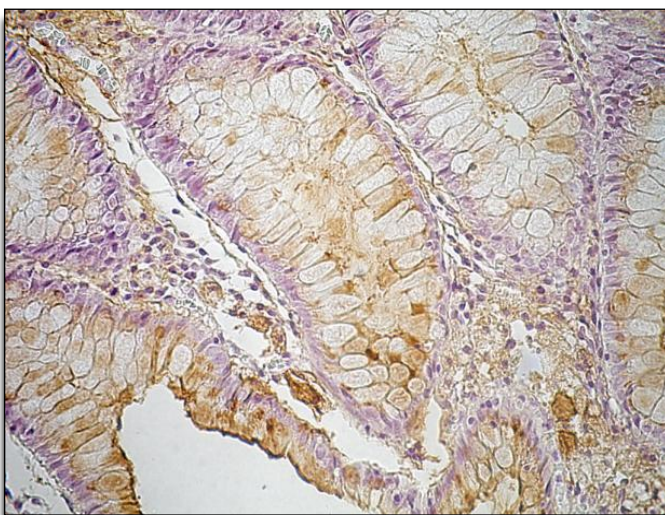


en el 94,4% y un índice de expresión débil en la mitad de los casos (Tabla 22). La expresión de *Tn* fue en el 97,2% citoplasmática, principalmente en el zona supranuclear (Figura 59).

**Figura 59:** Microfotografía (400X) de una sección de un espécimen normal donde se observa expresión del antígeno *Tn* en la zona supranuclear con una intensidad +/+++.

- **Expresión de *sialil Lewis a***

*Sialil Lewis a* se halló expresado en el 62,1% de los tejidos normales con una intensidad de +/+++ en el 87,8% de los casos (Tabla 22). Se halló un



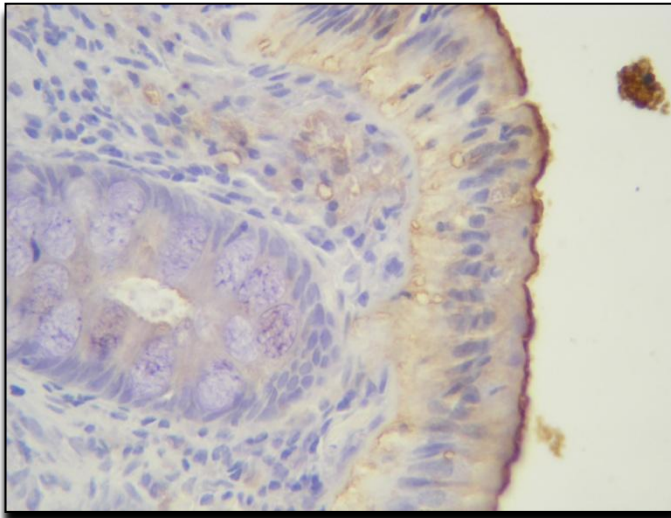
predominio del índice de expresión débil con un patrón celular mixto en el 90,2% de los especímenes (Figura 60).

**Figura 60:** Sección de un espécimen normal donde se observa expresión mixta de *sialil Lewis a* con una intensidad +/+++ (400X).

- **Expresión de *Lewis x***

El carbohidrato *Lewis x* se encontró expresado en el 60,9% de las muestras normales (Tabla 22) con una intensidad de +/+++ en el 94,9% de los

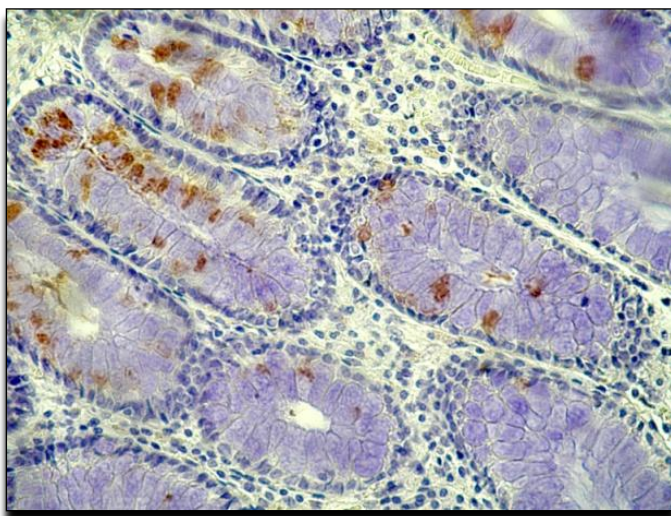
casos. El índice de expresión fue débil en el 57,8% con un patrón de tinción mixto (Figura 61) en el 71,8% de los casos.



**Figura 61:** Corte histológico de una muestra normal que muestra, luego de ser incubado con el anticuerpo KM380, una expresión mixta de *Lewis x* con una intensidad ++/+++ (400X). En el 46,2% de la muestras la expresión fue mayor en el borde superficial.

- **Expresión de *sialil Lewis x***

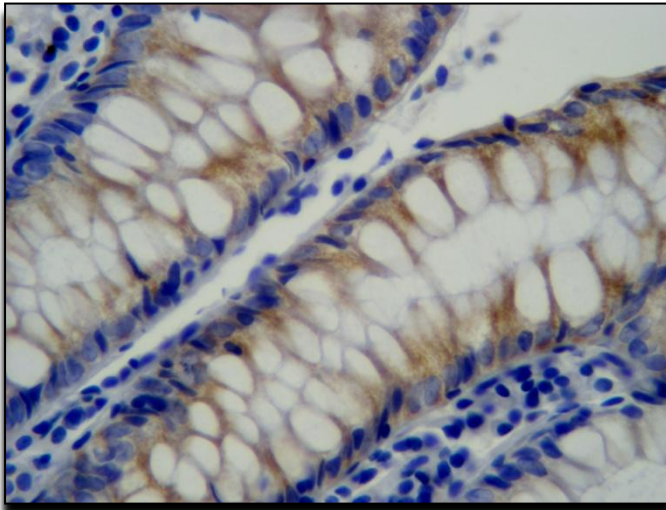
Sólo el 23,9% de las muestras de mucosa colorrectal normal expresaron *sialil Lewis x* y en todos los casos la intensidad fue +/+++ (Tabla 22). Ninguna muestra presentó expresión de este antígeno en más del 60% del área normal analizada. Todos presentaron un índice de expresión débil y el patrón fue citoplasmáticos en 97,8% de las muestras (Figura 62).



**Figura 62:** Microscopía óptica a 400X de una sección de un espécimen normal. Se observa expresión citoplasmática de *sialil Lewis x* con una intensidad +/+++.

- **Expresión de Lewis y**

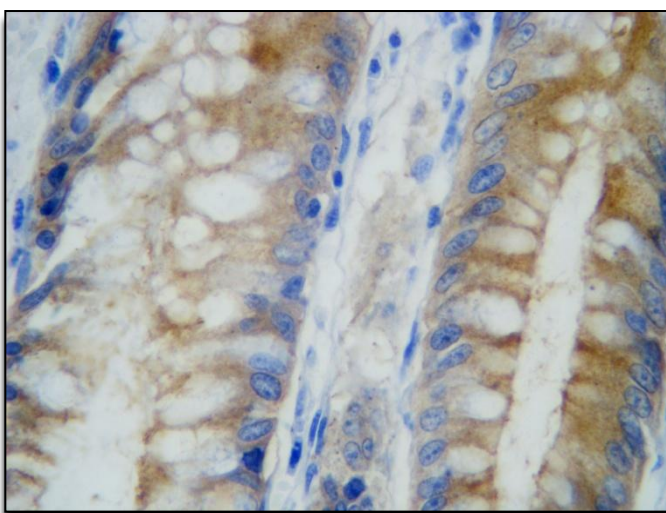
*Lewis y* se halló expresado en el 68,7% de los tejidos normales (Tabla 22) con una intensidad de +/+++ en todos los casos. En todos los casos el índice de expresión fue débil y con un patrón de expresión citoplasmático (Figura 63).



**Figura 63:** Microfotografía a 400x obtenida de un espécimen normal luego de la incubación con el anticuerpo C14. En la sección se observa expresión citoplasmática de *Lewis y* con una intensidad +/+++.

- **Expresión de CEA**

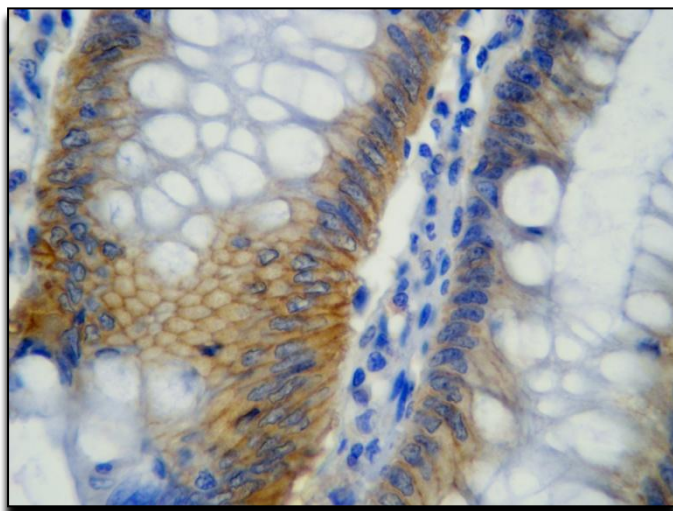
Todos los especímenes normales analizados expresaron CEA con una intensidad +/+++ (Tabla 22) y ++/+++ en el 42,4% y 47,0%, respectivamente. El 56,1% de los casos presentó un índice de expresión fuerte mientras que en el 86,4% el patrón de expresión fue mixta (Figura 64).



**Figura 64:** Inmunohistoquímica realizada a una sección mucosa colónica normal donde se observa expresión mixta de CEA con una intensidad +/+++ (400X).

- **Expresión de  $\beta$ -catenina**

Todas las muestras de mucosa colónica normal expresaron  $\beta$ -catenina; el



81,8% con una intensidad de +/+++ (Tabla 23), siendo el índice de expresión débil en el 83,3% de los tejidos. Se observó un predominio de expresión en las membranas basolaterales y en el citoplasma (Figura 65); en ningún caso se halló expresión nuclear (Tabla.

**Figura 65:** Sección de un espécimen normal donde se observa expresión de  $\beta$ -catenina en las membranas basolaterales y en los citoplasmas; además, se evidencia la ausencia de expresión nuclear. La intensidad en este caso fue de +/+++ (400X).

**Tabla 23:** Patrón de expresión de  $\beta$ -catenina en los tejidos normales según el área celular (%).

Porcentaje	Membrana	Citoplasma	Núcleo
0	0	0	66 (100,0)
<5	0	4 (6,1)	0
5a30	0	22 (33,3)	0
30a60	1 (1,5)	29 (43,9)	0
>60	65 (98,5)	11 (16,7)	0

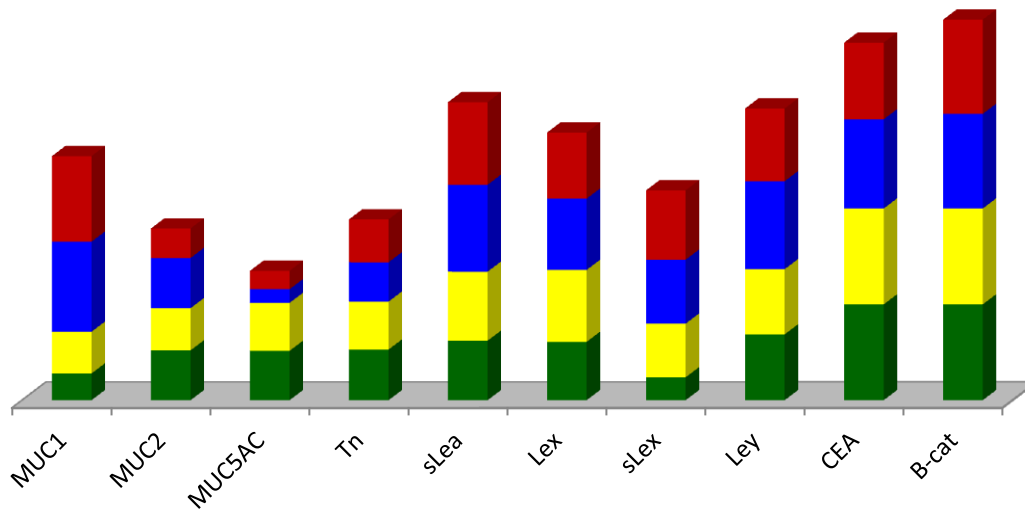
## 1.2. Expresión de los antígenos estudiados en la secuencia normal-adenoma-carcinoma y en los GLM.

### 1.2.1. Reactividad

Se observó un aumento de reactividad de MUC1 conforme progresó la secuencia normal-adenoma-carcinoma siendo positivos 27,9%, 43,5% y 94%, respectivamente (Figura 66); los antígeno *sialil Lewis x/a* siguieron el mismo patrón (23,9%, 56%, 66,7% y 62,1%, 72%, 90,7%, respectivamente). De forma

similar a lo hallado en los carcinomas, la expresión de MUC1 y *sialil Lewis x/a* en los GLM también fue elevada.

Por otra parte, la mucina MUC5AC presentó una reactividad inversa, es decir, disminuyó conforme progresó la secuencia arriba mencionada (51,5%, 50% y 14,3%, respectivamente); la expresión en los GLM fue similar a la encontrada en los TP.



**Figura 66:** Comparación de la reactividad de cada antígeno en los diferentes tejidos estudiados. Los colores corresponden a: verde=tejido colorrectal normal, amarillo=adenoma, azul=tumores primarios, rojo=ganglios linfáticos metastáticos.

### 1.2.2. Intensidad

La intensidad ++/+++ de las mucinas MUC2 y MUC5AC y de los antígenos carbohidratos *Lewis x/y* aumentó según progresó la secuencia normal-adenoma-carcinoma (Tabla 24). La intensidad de estos antígenos en los GLM fue similar a la encontrada en los carcinomas.

**Tabla 24:** Diferencias de la intensidad de expresión de los antígenos estudiados en los tejidos normales, adenomas, tumores primarios y ganglios linfáticos metastáticos.

Intensidad		NORMAL (n=68)	ADENOMA (n=29)	TP (n=90)	GLM (n=26)
<b>MUC1</b>	<b>+</b>	73,7	30,0	52,6	72,0
	<b>++</b>	26,3	70,0	35,9	28,0
	<b>+++</b>	0,0	0,0	11,5	0,0
<b>MUC2</b>	<b>+</b>	91,2	100,0	79,1	87,5

	++	8,8	0,0	20,9	12,5
	+++	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>MUC5AC</b>	+	88,6	92,3	66,7	60,0
	++	8,6	7,7	33,3	40,0
	+++	2,9	0,0	0,0	0,0
<b>Tn</b>	+	94,4	91,7	97,1	84,6
	++	5,6	8,3	2,9	15,4
	+++	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>sLea</b>	+	87,8	61,1	32,1	28,0
	++	12,2	38,9	34,6	56,0
	+++	0,0	0,0	33,3	16,0
<b>Lex</b>	+	94,9	94,4	85,2	80,0
	++	5,1	5,6	11,5	20,0
	+++	0,0	0,0	3,3	0,0
<b>sLex</b>	+	100,0	92,9	57,1	52,4
	++	0,0	7,1	25,0	14,3
	+++	0,0	0,0	17,9	33,3
<b>Ley</b>	+	100,0	100,0	62,8	81,8
	++	0,0	0,0	35,9	18,2
	+++	0,0	0,0	1,3	0,0
<b>CEA</b>	+	42,4	47,8	65,4	79,2
	++	47,0	43,5	29,6	16,7
	+++	10,6	8,7	4,9	4,2
<b>β-cat</b>	+	81,8	78,6	77,2	60,0
	++	18,2	21,4	19,0	20,0
	+++	0,0	0,0	3,8	20,0

### 1.2.3. Porcentaje de expresión

El porcentaje de expresión de los antígenos MUC1, CEA y B-catenina en la superficie del espécimen estudiado fue aumentando según avanzó la secuencia (Tabla 25); los GLM presentaron similar porcentaje de expresión que los carcinomas.

Contrariamente a lo mencionado, el porcentaje de expresión de la mucina MUC2 y de *Tn* siguió el camino inverso, es decir, fue alto en los tejidos normales y bajo en los carcinomas. La expresión de MUC5AC se encontró predominantemente disminuida en toda la secuencia analizada así como en los GLM.

En las muestras normales y adenomas, los carbohidratos *sialil Lewis x/a*, y *Lewis* y se encontraron preferentemente en menos del 30% del espécimen



estudiado; sin embargo, en los TP éstos antígenos se expresaron principalmente en más del 60 %. Esta última característica también fue observada en los GLM.

**Tabla 25:** Porcentaje de expresión de los antígenos en la superficie de los especímenes normales, adenomas, tumores primarios y ganglios linfáticos metastáticos.

Porcentaje de expresión		NORMAL (n=68)	ADENOMA (n=29)	TP (n=90)	GLM (n=26)
<b>MUC1</b>	<5	21,1	0,0	14,1	24,0
	5a30	21,1	0,0	5,1	8,0
	30a60	21,1	20,0	14,1	4,0
	>60	36,8	80,0	66,7	64,0
<b>MUC2</b>	<5	11,8	36,4	62,8	62,5
	5a30	35,3	18,2	18,6	12,5
	30a60	20,6	36,4	7,0	12,5
	>60	32,4	9,1	11,6	12,5
<b>MUC5AC</b>	<5	45,7	38,5	83,3	20,0
	5a30	34,3	38,5	8,3	60,0
	30a60	11,4	7,7	8,3	0,0
	>60	8,6	15,4	0,0	20,0
<b>Tn</b>	<5	27,8	41,7	79,4	76,9
	5a30	38,9	33,3	17,6	15,4
	30a60	19,4	8,3	0,0	7,7
	>60	13,9	16,7	2,9	0,0
<b>sLea</b>	<5	48,8	50,0	19,2	16,0
	5a30	29,3	38,9	25,6	8,0
	30a60	19,5	5,6	20,5	24,0
	>60	2,4	5,6	34,6	52,0
<b>Lex</b>	<5	15,4	27,8	34,4	45,0
	5a30	59,0	44,4	27,9	5,0
	30a60	17,9	16,7	3,3	25,0
	>60	7,7	11,1	34,4	25,0
<b>sLex</b>	<5	68,8	50,0	30,4	23,8
	5a30	25,0	42,9	17,9	4,8
	30a60	6,3	7,1	19,6	19,0
	>60	0,0	0,0	32,1	52,4
<b>Ley</b>	<5	32,6	11,8	16,7	27,3
	5a30	30,4	58,8	12,8	22,7
	30a60	21,7	17,6	21,8	9,1
	>60	15,2	11,8	48,7	40,9
<b>CEA</b>	<5	3,0	0,0	4,9	8,3
	5a30	10,6	0,0	9,9	4,2
	30a60	12,1	17,4	17,3	8,3

	>60	74,2	82,6	67,9	79,2
<b>β-cat</b>	<5	0,0	0,0	5,1	10,0
	5a30	16,7	25,0	6,3	20,0
	30a60	36,4	46,7	10,1	0,0
	>60	47,0	28,6	78,5	70,0

#### 1.2.4. Índice de expresión

Se observó un aumento del índice de expresión fuerte los antígenos MUC1, *sialil Lewis x/a*, *Lewis x/y* y de *β-catenina* en la secuencia normal-adenoma-carcinoma (Tabla 26). Por otra parte, en dicha secuencia se encontró un aumento de ausencia de expresión de MUC5AC.

Los índices de expresión en los GLM fueron similares a los observados en los carcinomas excepto en el caso de *sialil Lewis x* en donde el porcentaje del índice de expresión fuerte fue mayor en los GLM que en los carcinomas.

**Tabla 26:** Muestra las diferencias en el índice de expresión de cada antígeno en los especímenes normales, adenomas, tumores primarios y ganglios linfáticos metastáticos.

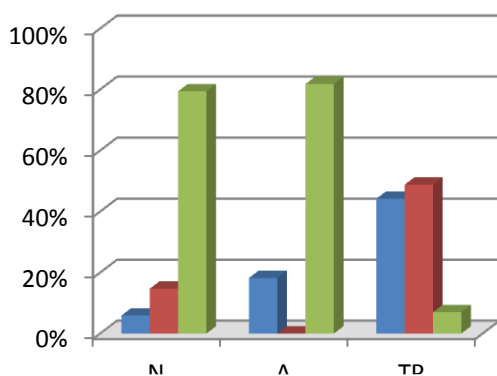
Índice de expresión		NORMAL	ADENOMA	TP	GLM
<b>MUC1</b>	Ausente	72,1	56,5	6,0	10,7
	Débil	22,1	17,4	54,2	64,3
	Fuerte	5,9	26,1	39,8	25,0
<b>MUC2</b>	Ausente	47,7	56,0	47,6	69,2
	Débil	47,7	44,0	48,8	30,8
	Fuerte	4,6	0,0	3,7	0,0
<b>MUC5AC</b>	Ausente	48,5	50,0	85,7	80,8
	Débil	47,1	46,2	14,3	15,4
	Fuerte	4,4	3,8	0,0	3,8
<b>Tn</b>	Ausente	47,1	50,0	59,0	55,2
	Débil	50,0	45,8	39,8	44,8
	Fuerte	2,9	4,2	1,2	0,0
<b>sLea</b>	Ausente	37,9	28,0	9,3	13,8
	Débil	57,6	68,0	55,8	37,9
	Fuerte	4,5	4,0	34,9	48,3
<b>Lex</b>	Ausente	39,1	25,0	33,3	31,0
	Débil	57,8	75,0	48,8	58,6
	Fuerte	3,1	0,0	17,9	10,3
<b>sLex</b>	Ausente	76,1	44,0	33,3	27,6
	Débil	23,9	56,0	48,8	41,4
	Fuerte	0,0	0,0	17,9	31,0
<b>Ley</b>	Ausente	31,3	32,0	8,2	24,1

	Débil	68,7	68,0	64,7	62,1
	Fuerte	0,0	0,0	27,1	13,8
<b>CEA</b>	Ausente	0,0	0,0	6,9	20,0
	Débil	43,9	47,8	66,7	70,0
	Fuerte	56,1	52,2	26,4	10,0
<b><math>\beta</math>-cat</b>	Ausente	0,0	0,0	1,3	16,7
	Débil	83,3	82,1	77,5	50,0
	Fuerte	16,7	17,9	21,3	33,3

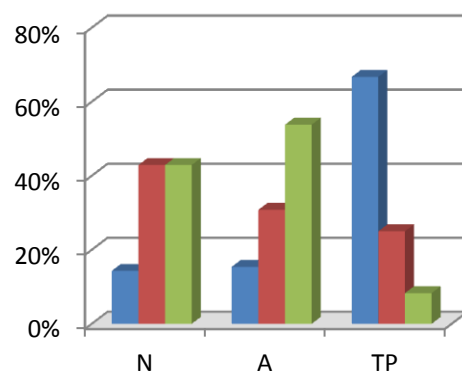
### 1.2.5. Patrón de expresión

El patrón de expresión de las mucinas y antígenos carbohidratos asociados a mucinas, así como del CEA y  $\beta$ -catenina fueron diferentes conforme progresó la secuencia normal-adenoma-carcinoma. La expresión en la membrana apical de las mucinas MUC2 (Figura 67A) y MUC5AC (Figura 67B), de los antígenos *sialil Lewis a* (Figura 67C), *Lewis x* (Figura 67D), *sialil Lewis x*, *Lewis y* (Figura 67E) y CEA aumentaron con la secuencia mencionada. Si bien, la expresión de  $\beta$ -catenina en las membranas fue inversa a la descrita (Figura 67F) se halló un aumento de la expresión nuclear con el avance de la secuencia.

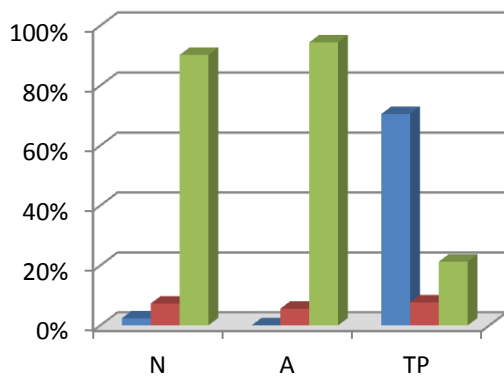
La expresión citoplasmática MUC2, CEA y  $\beta$ -catenina también aumentó con la secuencia mientras que la expresión mixta MUC1, MUC2, MUC5AC, *sialil Lewis a*, *Lewis x* y CEA disminuyó.



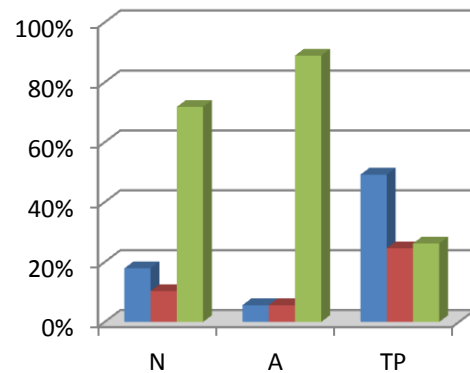
**Figura 67 A:** La expresión en la membrana apical (azul) y en el citoplasma (rojo) de MUC2 aumentó conforme la secuencia (5,9%, 18,2%, 44,2% y 14,7%, 0%, 48,8%, respectivamente); por otra parte, la expresión mixta (verde) fue alta en las muestras normales (N) y adenomas (A) (79,4% y 81,9%) y baja en los tumores primarios (TP) (7%).



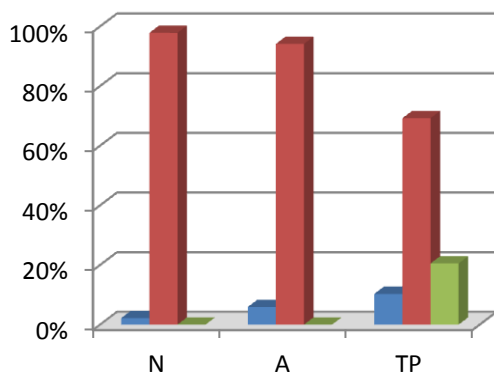
**Figura 67 B:** La expresión de MUC5AC en la membrana apical (azul) aumentó con la secuencia (14,3%, 15,4% y 66,7%); por otra parte, la expresión en el citoplasma (rojo) disminuyó (42,9%, 30,8% y 25%). Verde=citoplasma, N=normal, A=adenoma, TP=tumor primario



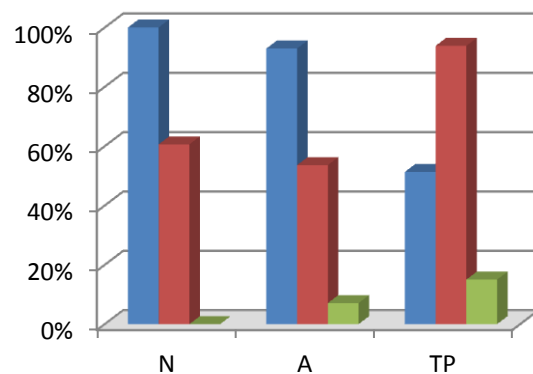
**Figura 67 C:** Se halló un aumento de la expresión de *sialil Lewis x* en la membrana apical (azul) en los TP respecto de las muestras de mucosa colorrectal normal (70,5% versus 2,4%); por otra parte se observó una disminución de la expresión mixta (verde) (90,2% versus 21,3%). Rojo=citoplasma, N=normal, A=adenoma, TP=tumor primario



**Figura 67 D:** La expresión en la membrana apical (azul) y en el citoplasma (rojo) de *Lewis x* aumentó en los TP respecto a las muestras normales (de 17,9% a 49,2% y de 10,3% a 24,6%, respectivamente); contrariamente, la expresión mixta (verde) disminuyó (de 71,8% a 26,3%). N=normal, A=adenoma, TP=tumor primario



**Figura 66 E:** La expresión de *Lewis y* en la membrana apical (azul) aumentó con la secuencia (2,2%, 5,9% y 10,3%); sin embargo, sólo los tumores primarios (TP) presentaron expresión mixta (verde). Se observó además una tendencia a la disminución de la expresión de éste antígeno en el citoplasma (rojo) (97,8%, 94,1% y 69,2%). N=normal, A=adenoma, TP=tumor primario.



**Figura 66 F:**  $\beta$ -catenina aumentó su expresión citoplasmática (roja) y nuclear (verde) conforme progresó la secuencia (66,6%, 53,6%, 93,8% y 0%, 7,1%, 15%, respectivamente); contrariamente, la expresión en las membranas basolaterales (azul) disminuyó con la misma (100%, 92,9% y 51,3%). N=normal, A=adenoma, TP=tumor primario.

### 1.3. Expresión antigénica en el tejido colorrectal normal, en las glándulas normales adyacentes al tumor y en el TP.

Con el objetivo de analizar la relación entre la expresión de los antígenos estudiados en las muestras de tejido colorrectal normal, en las glándulas normales adyacentes al TP y la observada en el mismo, se realizó una prueba de independencia  $\chi^2$ ,  $p < 0,05$  (Tabla 27).

Se halló una correlación entre la ausencia de la mucina MUC1 en los TP y la ausencia de su expresión en las glándulas normales adyacentes al mismo. Por otra parte, sólo el 36,4% de las glándulas normales adyacentes a tumores positivos para MUC1 fueron positivas para este antígeno. Asimismo, la glándula normal adyacente al tumor presentó un 22,2% más de expresión de MUC1 que las muestra normales (Tabla 27 bis).

Con respecto a MUC2 (Tabla 27), en la mayoría de los casos en que los TP no la expresaron tampoco lo hicieron glándulas normales adyacentes (57,9%).

Asimismo, en el 81,7% de los casos analizados MUC5AC estuvo ausente tanto en los TP como en sus glándulas normales adyacentes. Se observó una disminución del 72,2% de la expresión en los TP respecto a la hallada en los tejidos normales.

Cuando los TP no expresaron *Tn* la mayoría de las glándulas normales adyacentes a TP tampoco lo hicieron (93,7%); en los casos en los cuales los TP fueron positivos sólo el

32,3% de sus glándulas normales adyacentes no lo expresaron, no pudiéndose descartar de esta manera la independencia de ambas variables.

Las glándulas normales adyacentes a tumores positivos para *sialil Lewis a* presentaron una reactividad positiva en la mitad de los casos.

**Tabla 27:** Expresión de los antígenos estudiados en las glándulas normales adyacentes al tumor primario (GNA) y en el tumor primario (TP).

GNA (n=90)		TP (n=90)		p <sup>%</sup>
		No	Si	
MUC1 (n=82)	No (n=54)	5	49	NA <sup>1</sup>
	Si (n=28)	0	28	
MUC2 (n=81)	No (n=31)	22	9	S <sup>**</sup>
	Si (n=50)	16	34	
MUC5AC (n=82)	No (n=65)	58	7	NS <sup>^</sup>
	Si (n=17)	13	4	
Tn (n=83)	No (n=69)	46	23	NS
	Si (n=14)	3	11	
sLe a (n=79)	No (n=43)	8	35	NA
	Si (n=36)	0	36	
Le x (n=82)	No (n=57)	20	37	NA
	Si (n=25)	1	24	
sLe x (n=83)	No (n=69)	28	41	NA
	Si (n=14)	0	14	
Le y (n=69)	No (n=15)	5	10	S
	Si (n=54)	2	52	
CEA (n=75)	No (n=31)	6	25	S
	Si (n=44)	0	44	
β-cat (n=80)	No (n=25)	1	24	NA
	Si (n=55)	0	55	

<sup>%</sup>p=test  $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ ; <sup>\*\*</sup>S=Significativo, <sup>^</sup>NS, No Significativo, <sup>1</sup>NA=No Aplicable el test estadístico.

La ausencia de expresión de *Lewis x* en los TP se correspondió con una ausencia de dicho antígeno en las glándulas normales adyacentes en el 95,2% de los casos; asimismo, se observó que el 60,7% de los TP que expresaban *Lewis x*, las glándulas normales adyacentes a los mismos eran negativas.

Se observó que la ausencia de expresión de *sialil Lewis x* en los TP se correlacionó con la ausencia de expresión en las glándulas normales adyacentes al mismo, mientras que sólo el 25,5% de las glándulas normales adyacentes a tumores positivos para *sialil Lewis x* fueron positivas. Tanto *sialil Lewis x* como *Lewis y* presentaron un aumento gradual de su expresión en la secuencia normal, glándula normal adyacente y TP. La expresión en los TP de *sialil Lewis x* aumentó 179% y la de *Lewis y* un 33,6% respecto la observada en los tejidos normales. El 83,9% de las glándulas normales adyacentes a TP positivos para *Lewis y* también expresaron este antígeno mientras que sólo el 28,6% de las glándulas normales adyacentes a tumores negativos para *Lewis y* fueron positivas.

Se observó una correspondencia entre la ausencia de expresión de CEA en los TP y las glándulas normales adyacentes al tumor; también se halló una correspondencia entre la presencia de CEA en las glándulas normales adyacentes y la reactividad positiva en sus TP en el 63,8% de los casos.

El 69,6% de las glándulas normales adyacentes a tumores positivos para *β-catenina* fueron también positivas.

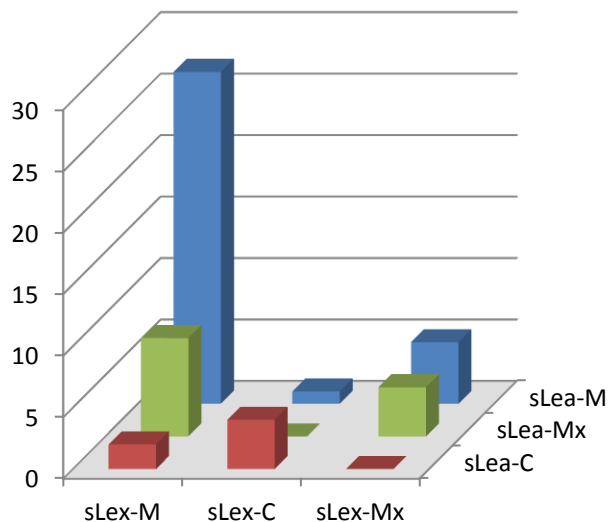
**Tabla 27 bis:** Expresión antigénica en el tejido colorrectal normal, la glándula normal adyacente (GNA) al tumor primario (TP) y en el TP.

Reactividad	Normal (%)	GNA (%)	TP (%)
<b>MUC1</b>	27,9	34,1	94,0
<b>MUC2</b>	52,0	61,7	52,4
<b>MUC5AC</b>	51,5	20,7	14,3
<b>Tn</b>	52,9	16,9	41,0
<b>sLea</b>	62,1	45,6	90,7
<b>Lex</b>	60,9	30,5	74,4
<b>sLex</b>	23,9	16,9	66,7
<b>Ley</b>	68,7	78,3	91,8
<b>CEA</b>	100,0	61,7	93,1
<b>β-cat</b>	100,0	68,8	98,8

## 2.Resultados estadísticos

### 2.1. Relación de la expresión de los antígenos estudiados en los TP.

Se realizó un análisis de correspondencia para analizar la relación de los patrones de expresión celular entre los diferentes antígenos estudiados en los



**Figura 68:** Veintisiete de treinta y tres muestras tumorales co-expresaron *sialil Lewis a* (sLea) y *sialil Lewis x* (sLex) en la membrana apical. M=membrana, C=citoplasma, Mx=mixto.

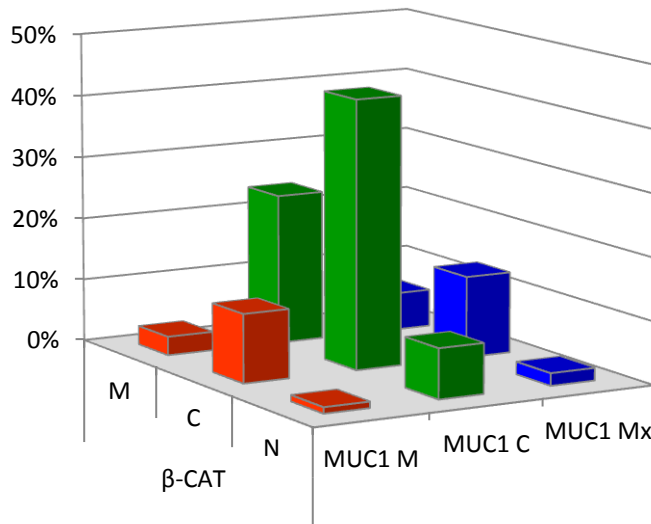
*Lewis y*. Respecto a la asociación entre el patrón de expresión y los demás antígenos estudiados no se encontró ninguna correlación significativa.

También en el citoplasma, cuarenta y tres TP presentaron concomitantemente expresión de MUC1 y  $\beta$ -*catenina* mientras que sólo tres los expresaron únicamente en la membrana. Se halló mayor expresión de  $\beta$ -*catenina* nuclear cuando MUC1 predominó en el citoplasma (Figura 69). Los GLM presentaron similares relaciones a las observadas en los TP.

Por otra parte, se estudió la relación entre la distribución y el área de expresión de  $\beta$ -*catenina* respecto a la expresión de los antígenos y no se verificaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

TP.

En la membrana apical de las células tumorales (Figura 68) se observó una correlación positiva significativa entre la expresión de *sialil Lewis a* y *sialil Lewis x* ( $p < 0,01$ ). Asimismo, se halló una correspondencia significativa entre la expresión de CEA y *Lewis x* con el mismo patrón celular mencionado ( $p < 0,01$ ). En el citoplasma de las células tumorales se encontró una co-expresión de MUC1 y



**Figura 69:** Correlación entre el patrón de expresión de MUC1 y  $\beta$ -catenina. En el 47,7% (43/90) de los TP ambos antígenos presentaron un patrón de reactividad citoplasmática (C) mientras que en el 26,6% (24/90) predominó la tinción de la membrana (M) cuando MUC1 se halló expresada en el citoplasma. N=Nuclear, Mx=Mixto

### 2.1.1. Relación entre la expresión MUC1- $\beta$ -catenina y las variables clinicopatológicas.

Cuando se estudió la relación entre MUC1 y  $\beta$ -catenina se observaron diferentes co-expresiones según la ubicación de los tumores colónicos: los ubicados en el colon ascendente presentaron en el núcleo MUC1<sup>+</sup>/ $\beta$ -cat<sup>+</sup> y en la membrana MUC1<sup>+</sup>/ $\beta$ -cat<sup>-</sup>, los del colon transversal se caracterizaron por ausencia nuclear de ambos antígenos (MUC1<sup>-</sup>/ $\beta$ -cat<sup>-</sup>) y sólo reactividad de  $\beta$ -catenina en la membrana (MUC1<sup>-</sup>/ $\beta$ -cat<sup>+</sup>), los tumores sigmoideos exhibieron ausencia de  $\beta$ -catenina nuclear (MUC1<sup>+</sup>/ $\beta$ -cat<sup>-</sup> nuclear) y expresión en la membrana (MUC1<sup>+</sup>/ $\beta$ -cat<sup>+</sup>) mientras que los cánceres de recto tuvieron la particularidad de expresar ambos antígenos tanto en el núcleo como en la membrana (MUC1<sup>+</sup>/ $\beta$ -cat<sup>+</sup> nuclear y MUC1<sup>+</sup>/ $\beta$ -cat<sup>+</sup> en la membrana).

Todos los TP mayores o iguales de 5 cm expresaron ambos antígenos en el núcleo (MUC1<sup>+</sup>/ $\beta$ -cat<sup>+</sup> nuclear) mientras que los menores a 5 cm se caracterizaron por la ausencia de ambos marcadores tanto en el núcleo como en la membrana (MUC1<sup>-</sup>/ $\beta$ -cat<sup>-</sup> nuclear y MUC1<sup>-</sup>/ $\beta$ -cat<sup>-</sup> en la membrana).

Más del 70% de los adenocarcinomas colorrectales presentaron expresión de MUC1 en la membrana (MUC1<sup>+</sup>/ $\beta$ -cat<sup>-</sup>) y ausencia en el núcleo (MUC1<sup>-</sup>/ $\beta$ -cat<sup>+</sup>).

En los TP bien diferenciados predominó el patrón MUC1<sup>+</sup>/ $\beta$ -cat<sup>-</sup> nuclear y MUC1<sup>+</sup>/ $\beta$ -cat<sup>+</sup> en la membrana.



**Tabla 28:** Relación de la expresión en el TP de MUC1 y  $\beta$ -catenina en el núcleo y en la membrana con las características clinicopatológicas. Los valores presentados en la tabla se expresan en porcentajes.

	MUC1/ $\beta$ -catenina nuclear				MUC1/ $\beta$ -catenina membrana			
	MUC1 <sup>+</sup> / $\beta$ -cat <sup>+</sup> (n=3)	MUC1 <sup>+</sup> / $\beta$ -cat <sup>-</sup> (n=29)	MUC1 <sup>-</sup> / $\beta$ -cat <sup>+</sup> (n=8)	MUC1 <sup>-</sup> / $\beta$ -cat <sup>-</sup> (n=32)	MUC1 <sup>+</sup> / $\beta$ -cat <sup>+</sup> (n=17)	MUC1 <sup>+</sup> / $\beta$ -cat <sup>-</sup> (n=15)	MUC1 <sup>-</sup> / $\beta$ -cat <sup>+</sup> (n=16)	MUC1 <sup>-</sup> / $\beta$ -cat <sup>-</sup> (n=23)
<b>Localización tumoral</b>								
C. asc.	33,3	27,6	12,5	18,8	23,5	33,3	18,8	13,0
C. transv.	0,0	6,9	0,0	9,4	5,9	6,7	12,5	4,3
C. desc.	0,0	3,4	12,5	3,1	5,9	0,0	0,0	8,7
C. sigm.	33,3	41,4	37,5	37,5	41,2	40,0	37,5	39,1
Recto	33,3	20,7	37,5	31,3	23,5	20,0	31,3	34,8
<b>Tamaño</b>								
<5 cm	0,0	47,8	14,3	53,6	38,5	46,2	33,3	57,9
≥5 cm	100	52,2	85,7	46,4	61,5	53,8	66,7	42,1
<b>Histología</b>								
AP <sup>1</sup>	66,7	65,5	71,4	65,6	58,8	73,3	62,5	68,2
ACM <sup>2</sup>	0,0	20,7	28,6	25	35,3	0,0	18,8	31,8
AM <sup>3</sup>	33,3	13,8	0,0	9,4	5,9	26,7	18,8	0,0
<b>Ulceración</b>								
No	0,0	26,1	14,3	15,0	33,3	14,3	15,4	15,4
Si	100	73,9	85,7	85,0	66,7	85,7	84,6	84,6
<b>Inv.muscular</b>								
No	0,0	3,6	12,5	0,0	6,3	0,0	0,0	4,5
Si	100	96,4	87,5	100	93,8	100	100	95,5
<b>Inv. subserosa</b>								
No	66,7	84,0	87,5	85,7	78,6	85,7	85,7	90,5
Si	33,3	16,0	12,5	14,3	21,4	14,3	14,3	9,5
<b>Inv. serosa</b>								
No	100	84,6	100	96,6	80,0	92,3	100	95,2
Si	0,0	15,4	0,0	3,4	20,0	7,7	0,0	4,8
<b>Inv. grasa</b>								
No	50,0	62,5	50,0	66,7	57,1	66,7	46,7	72,7
Si	50,0	37,5	50,0	33,3	42,9	33,3	53,3	27,3
<b>Inv. vascular</b>								
No	66,7	93,1	100	93,5	94,1	86,7	93,8	95,5
Si	33,3	6,9	0,0	6,5	5,9	13,3	6,3	4,5
<b>Inv. linfática</b>								
No	66,7	72,4	87,5	65,6	82,4	60,0	75,0	65,2
Si	33,3	27,6	12,5	34,4	17,6	40,0	25,0	34,8
<b>Inv. perineural</b>								
No	100	93,1	87,5	90,3	100	86,7	93,8	86,4
Si	0,0	6,9	12,5	9,7	0,0	13,3	6,3	13,6
<b>Grado Histológico</b>								
1	33,3	86,2	62,5	53,1	88,2	73,3	62,5	47,8
2	33,3	6,9	12,5	37,5	5,9	13,3	31,3	34,8
3	33,3	6,9	25	9,4	5,9	13,3	6,3	17,4
<b>Estadio pT</b>								
T <sub>1</sub>	0,0	3,4	0,0	0,0	5,9	0,0	0,0	0,0
T <sub>2</sub>	33,3	17,2	0,0	53,1	11,8	26,7	31,3	52,2
T <sub>3</sub>	33,3	41,4	50	15,6	41,2	40,0	18,8	21,7
T <sub>4</sub>	33,3	37,9	50	31,3	41,2	33,3	50,0	26,1
<b>Estadio pN</b>								
N <sub>0</sub>	33,3	57,1	37,5	41,4	70,6	35,7	62,5	25,0
N <sub>1</sub>	66,7	32,1	50	34,5	17,6	57,1	18,8	50,0
N <sub>2</sub>	0,0	10,7	12,5	24,1	11,8	7,1	18,8	25,0
<b>Estadio M</b>								
M <sub>0</sub>	100	72,4	100	77,4	76,5	71,4	81,3	81,8
M <sub>1</sub>	0,0	27,6	0,0	22,6	23,5	28,6	18,8	18,2
<b>Estadio TNM</b>								
I	33,3	6,9	0,0	21,9	11,8	6,7	25,0	13,0
II	0,0	41,4	37,5	15,6	52,9	20,0	31,3	13,0
III	66,7	24,1	62,5	40,6	11,8	46,7	25,0	56,5
IV	0,0	27,6	0,0	21,9	23,5	26,7	18,8	17,4
<b>Sitio metastático</b>								
Hepático	100	36,4	0,0	45,5	42,9	50,0	57,1	14,3
Otros	0,0	63,6	100	54,5	57,1	50,0	42,9	85,7

<sup>1</sup>AP=Adenocarcinoma puro, <sup>2</sup>ACM=Adenocarcinoma con componente mucinoso, <sup>3</sup>MP=carcinoma mucinoso puro

Los TP de los pacientes con estadio III presentaron expresión positiva de  $\beta$ -catenina nuclear independientemente de la expresión positiva de MUC1 en el núcleo (MUC1<sup>+</sup>/ $\beta$ -cat<sup>+</sup> nuclear y MUC1<sup>-</sup>/ $\beta$ -cat<sup>+</sup> nuclear). Asimismo, más de la mitad de las muestras mostraron ausencia de ambos antígenos en la membrana de las células tumorales.

Todos los TP de los pacientes con metástasis hepáticas expresaron MUC1<sup>+</sup>/ $\beta$ -cat<sup>+</sup> nuclear mientras que en aquellos con otras localizaciones metastásicas, el patrón fue MUC1<sup>-</sup>/ $\beta$ -cat<sup>+</sup> nuclear y MUC1<sup>-</sup>/ $\beta$ -cat<sup>-</sup> en la membrana.

Si bien no encontramos una correlación estadísticamente significativa (Tabla 29), los pacientes cuyos TP expresaron MUC1<sup>+</sup>/ $\beta$ -cat<sup>-</sup> nuclear y MUC1<sup>+</sup>/ $\beta$ -cat<sup>+</sup> en la membrana, es decir cuando  $\beta$ -catenina no se expresó en el núcleo y sí en la membrana junto a MUC1, tuvieron un mayor TLP y SG que aquellos pacientes con otros patrones de expresión.

**Tabla 29:** Relación entre el patrón de expresión de MUC1/ $\beta$ -catenina y la sobrevida de los pacientes con CCR.

		SG <sup>†</sup> (±ES)	p <sup>‡</sup>	TLP <sup>†</sup> (±ES)	p
<b>MUC1/<math>\beta</math>-catenina nuclear</b>			NS		NS
	MUC1 <sup>+</sup> / $\beta$ -cat <sup>+</sup> (n=3)	2,1±1,9		12,7±23,2	
	MUC1 <sup>+</sup> / $\beta$ -cat <sup>-</sup> (n=29)	4,3±0,6		48,9±7,4	
	MUC1 <sup>-</sup> / $\beta$ -cat <sup>+</sup> (n=8)	2,9±1,1		31,0±14,2	
	MUC1 <sup>-</sup> / $\beta$ -cat <sup>-</sup> (n=32)	3,3±0,5		35,4±7,1	
<b>MUC1/<math>\beta</math>-catenina membrana</b>			NS		NS
	MUC1 <sup>+</sup> / $\beta$ -cat <sup>+</sup> (n=17)	4,5±0,8		53,3±9,8	
	MUC1 <sup>+</sup> / $\beta$ -cat <sup>-</sup> (n=15)	3,5±0,8		36,7±10,5	
	MUC1 <sup>-</sup> / $\beta$ -cat <sup>+</sup> (n=16)	3,4±0,8		37,7±10,1	
	MUC1 <sup>-</sup> / $\beta$ -cat <sup>-</sup> (n=23)	3,1±0,7		32,4±8,4	

<sup>†</sup>SG=Sobrevida Global, <sup>†</sup>TLP=Tiempo Libre de Progresión, <sup>‡</sup>p=test utilizado: ANOVA de una vía, p <0,05.

## 2.2. Relación de la expresión antigénica en los GLM respecto a la observada en los TP.

Con el objetivo de analizar la relación entre la expresión de los antígenos estudiados en los TP y los hallados en sus GLM, se realizó una prueba de independencia Chi<sup>2</sup>, p<0,05 (Tabla 30).

Se halló una correspondencia entre la expresión de MUC1 en los GLM y sus respectivos TP en el 91,7% de los casos; asimismo, se observó una correlación significativa entre la expresión encontrada en los GLM y la hallada en sus TP con los antígenos *sialil Lewis a* (95,5%), *Lewis x* (78,9%), *Lewis y* (87,5%), CEA (80,8%) y  $\beta$ -*catenina* (90,0%). Esta misma tendencia se observó para el carbohidrato *sialil Lewis x* (78,9%) aunque esta correspondencia no fue estadísticamente significativa.

Respecto a la expresión de MUC2, se encontró una tendencia a la pérdida de este antígeno en las células tumorales de los GLM, siendo la misma del 58,3% menor que en sus TP.

La ausencia de MUC5AC en los GLM se correspondió con la ausencia de dicho antígeno en los TP en el 88,2% de los casos.

Cuando se consideró el índice de expresión antigénica se observó una correlación estadísticamente significativa entre el índice de expresión fuerte de *sialil Lewis a* en los TP y el hallado en los GLM en el 77,7% de los casos ( $p < 0,05$ ).

### 2.3. Relación entre la expresión antigénica en los TP y las variables clinicopatológicas.

Con el propósito de analizar la relación entre la expresión antigénica estudiada en los TP y las variables clinicopatológicas de los pacientes con CCR se utilizaron: la prueba de independencia  $\chi^2$ , el test de proporcionalidad de Fisher y el análisis univariado de ANOVA de una vía,  $p < 0,05$ .

**Tabla 30:** Expresión de los antígenos estudiados en los TP y GLM

TP	GLM		p <sup>%</sup>
	No	Si	
<b>MUC1</b>			NA <sup>1</sup>
No	1	1	
Si	2	22	
<b>MUC2</b>			NA
No	9	1	
Si	7	5	
<b>MUC5AC</b>			NA
No	15	2	
Si	2	3	
<b>Tn</b>			NS <sup>^</sup>
No	10	9	
Si	4	3	
<b>sLe a</b>			NA
No	3	2	
Si	1	21	
<b>Le x</b>			NA
No	4	1	
Si	5	14	
<b>sLe x</b>			NS
No	3	4	
Si	4	15	
<b>Le y</b>			NA
No	1	0	
Si	6	21	
<b>CEA</b>			NA
No	1	1	
Si	5	21	
<b><math>\beta</math>-cat</b>			NA
No	1	0	
Si	1	9	

<sup>%</sup>p= test  $\chi^2$ , p < 0,05, <sup>^</sup>NS=No Significativo, <sup>1</sup>NA=No Aplicable el test estadístico.

### 2.3.1. Relación de los antígenos estudiados en los TP con la edad de presentación del CCR

El promedio de edad de diagnóstico del CCR, independientemente del estadio, fue de 61,4 años. En general, el índice de expresión de los antígenos no varió significativamente con el promedio de edad de presentación del CCR (Tabla 31); sin embargo, los pacientes con un índice de expresión fuerte de *sialil Lewis a* en sus TP fueron diagnosticados más tardíamente que aquellos con ausencia del antígeno ( $p < 0,05$ ).

Considerando a la edad como un factor pronóstico en el CCR, se dividió a los pacientes en tres categorías: menores de 40 años, de 40 a 60 años y mayores de 60 años. Se observó en todos los TP de los pacientes menores de 40 años expresión positiva de los antígenos *Lewis y*, CEA y  $\beta$ -*catenina*.

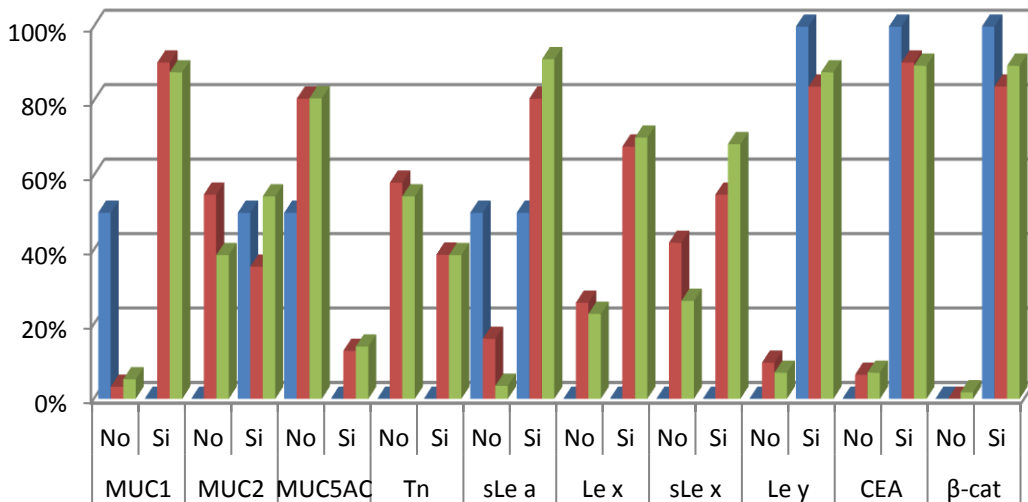
La frecuencia de expresión de *sialil Lewis a* se halló un 41,2% más elevado en los TP de los pacientes mayores de 60 años que en los de menores de 40 años.

Asimismo, los pacientes mayores a 60 años presentaron en sus TP una expresión positiva de MUC2 y de *sialil Lewis*

x 18,9% y 13,6%, respectivamente más elevada que la encontrada en los TP de pacientes con edades comprendidas entre los 40 y 60 años (Figura 70).

**Tabla 31:** Comparación entre expresión antigénica en los tumores primarios y la edad de presentación del CCR.

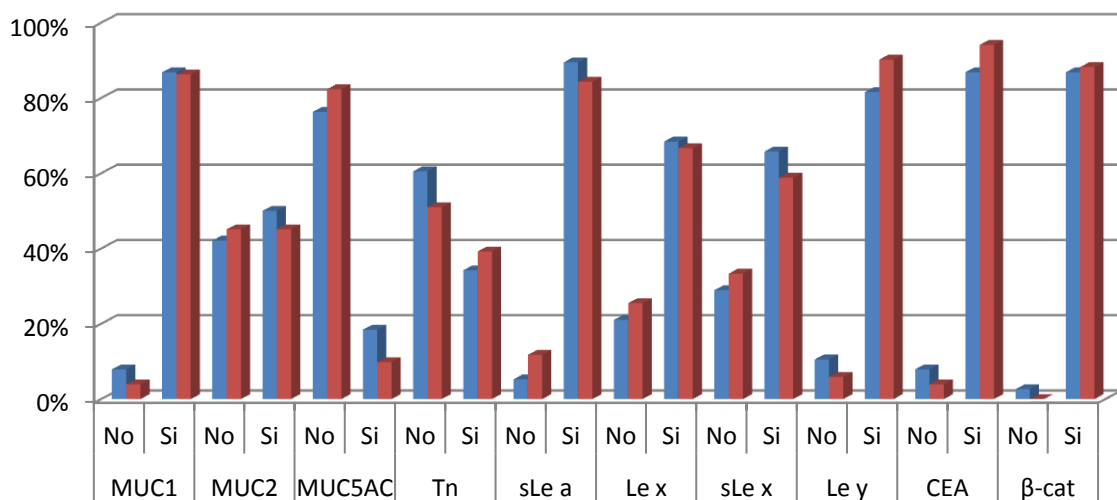
		Edad ( $\pm$ ES) p <sup>%</sup>	
<b>MUC1</b>			NS <sup>^</sup>
	Ausente (n=5)	57,6 (4,1)	
	Débil (n=45)	62,0 (1,3)	
	Fuerte (n=33)	62,3 (1,6)	
<b>MUC2</b>			NS
	Ausente (n=39)	60,8 (1,4)	
	Débil (n=40)	63,0 (1,4)	
	Fuerte (n=3)	63,3 (5,2)	
<b>MUC5AC</b>			NS
	Ausente (n=72)	61,9 (1,0)	
	Débil (n=12)	61,6 (2,6)	
	Fuerte (n=0)	0 (0,0)	
<b>Tn</b>			NS
	Ausente (n=49)	61,6 (1,2)	
	Débil (n=33)	63,1 (1,5)	
	Fuerte (n=1)	61,0 (8,6)	
<b>sLe a</b>			S*
	Ausente (n=8)	50,3 (3,1)	
	Débil (n=48)	61,6 (1,3)	
	Fuerte (n=30)	63,9 (1,6)	
<b>Le x</b>			NS
	Ausente (n=21)	62,3 (1,8)	
	Débil (n=55)	62,1 (1,1)	
	Fuerte (n=6)	64,1 (3,4)	
<b>sLe x</b>			NS
	Ausente (n=28)	61,0 (1,6)	
	Débil (n=41)	63,1 (1,3)	



**Figura 70:** Distribución porcentual de la expresión antigénica de acuerdo al grupo etáreo estudiado (en azul se encuentran expresados los pacientes menores de 40 años, en rojo los pacientes con edades comprendidas entre 40 y 60 años; y en verde los pacientes mayores a 60 años).

### 2.3.2. Relación de los antígenos estudiados en los TP con el género.

No se hallaron diferencias significativas entre los géneros respecto a la reactividad antigénica en los TP; asimismo, tampoco se encontró diferencias respecto al índice de expresión antigénica (Figura 71).



**Figura 71:** Distribución porcentual de la expresión antigénica de acuerdo al género (en azul se encuentran expresados los pacientes de género femenino y en rojo los pacientes de género masculino).

### **2.3.3. Relación de los antígenos estudiados en los TP con los antecedentes de cáncer en la familia**

Los TP de los pacientes con antecedentes familiares de cáncer diferentes al colorrectal expresaron predominantemente MUC1 (95,9%), *sialil Lewis a* (94,2%), *Lewis y* (92,4%) y CEA (92%) (Tabla 32). En el 48,9% de los TP se observó un índice de expresión fuerte de MUC1.

MUC1, *sialil Lewis a* y *Lewis y* también fueron encontrados en todos los TP de los pacientes con antecedentes familiares de CCR. El 61,5% de los TP presentaron un índice de expresión fuerte de *sialil Lewis a* mientras que el 69,9% de los TP de los pacientes que no presentaron dicho antecedente en la familia el antígeno estuvo ausente o la reactividad fue débil. Asimismo, el 42,7% de estos TP presentaron un índice de expresión fuerte de *Lewis y* mientras que la expresión estuvo ausente o fue débil en el 75% de los TP de aquellos sin este antecedente.

### **2.3.4. Relación de los antígenos estudiados en los TP con las comorbilidades de los pacientes con CCR**

La expresión de las mucinas MUC1 y MUC2 se halló elevada (Tabla 32) en los TP de los pacientes con antecedentes de hipertensión arterial (94,1% y 66,6%, respectivamente). En la mitad de los TP se observó un índice de expresión fuerte de MUC1.

Todos los TP de los pacientes con antecedentes de diabetes mellitus expresaron el antígeno CEA; el 85,7% expresó tanto MUC1 como *sialil Lewis a*.

No se pudo refutar la hipótesis de independencia entre el índice de expresión antigénica y los antecedentes personales de hipertensión arterial y/o diabetes mellitus.

**Tabla 32:** Relación entre las frecuencias de índice de expresión de los antígenos estudiados en los TP y los antecedentes clinicopatológicos de los pacientes con CCR.

	MUC1				MUC2				MUC5AC				Tn				sLe a				Le x				sLe x				Le y				CEA				β-cat											
	A <sup>&amp;</sup>	D <sup>*</sup>	F <sup>#</sup>	p <sup>%</sup>	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p												
<b>A.Ca. Fliar<sup>1</sup></b>	NS <sup>^</sup>				NS				NS				NS				NS				S <sup>**</sup>				NS				NS				NS				NS											
No	3	20	10		17	14	1		29	4	0		19	14	0		5	19	9		12	19	0		14	13	6		3	25	6		3	23	8		1	22	6		0	39	11					
Si	2	24	23		21	26	2		42	8	0		29	19	1		3	29	20		8	36	6		14	28	8		4	30	16		3	35	14		0	39	11									
<b>A.CCR.Fliar<sup>2</sup></b>	NS				S				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS											
No	5	36	29		30	38	3		63	9	0		42	28	1		8	43	22		19	46	4		25	34	12		7	48	18		5	50	19		1	52	15									
Si	0	9	4		9	2	0		9	3	0		7	5	0		0	5	8		2	9	2		3	7	3		0	7	5		1	8	4		0	10	2									
<b>HTA<sup>3</sup></b>	NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS											
No	4	35	23		31	27	3		54	9	0		40	20	1		6	33	25		14	44	4		18	32	12		3	43	17		3	45	17		1	46	15									
Si	1	8	8		6	12	0		15	3	0		7	11	0		2	13	4		6	9	1		9	7	2		3	11	4		3	10	5		0	13	2									
<b>DBT<sup>4</sup></b>	NA <sup>1</sup>				NS				NA				NS				NA				NS				NS				NS				NS				NA											
No	4	38	31		36	34	2		63	11	0		45	27	1		7	41	28		18	49	5		24	38	12		5	50	20		6	51	20		0	53	17									
Si	1	5	1		1	2	1		6	1	0		3	4	0		1	5	1		2	5	0		4	1	2		2	4	1		0	5	2		1	6	0									
<b>Cirugía previa</b>	NS				NA				NA				NS				NA				NA				S				NS				NS				NS											
Ap. <sup>7</sup>	1	7	4		7	5	1		11	2	0		10	3	0		0	5	8		3	10	0		3	7	3		1	8	4		0	8	5		0	8	4									
Col. <sup>8</sup>	0	4	3		5	1	0		5	1	0		4	3	1		1	5	1		1	5	0		1	2	4		1	5	1		0	5	2		0	5	1									
Ning. <sup>9</sup>	4	34	26		27	34	2		56	9	0		35	27	1		7	38	21		17	40	6		24	32	8		5	42	18		6	45	16		1	49	12									
<b>Cons. tabaco</b>	S				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS											
No	3	20	8		13	13	2		26	3	0		19	11	0		4	16	11		8	21	1		12	13	6		2	23	6		1	21	9		1	23	7									
Si	2	23	24		25	25	1		44	8	0		29	20	1		3	31	19		12	34	4		15	27	8		5	30	16		5	34	14		0	36	10									
<b>Cons. alcohol</b>	NS				NS				NS				NS				S				NS				NS				NS				NS				NS											
No	4	26	19		25	18	3		39	8	0		33	15	0		5	22	22		9	35	3		20	21	8		4	35	10		2	34	13		1	39	9									
Si	1	16	11		13	17	0		28	3	0		14	14	1		2	24	5		9	18	2		7	16	6		2	17	11		3	20	9		0	20	7									
<b>IMC<sup>5</sup></b>	S				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS											
≤24,9	1	21	7		12	15	2		26	3	0		18	8	0		2	18	11		3	22	2		7	14	6		4	17	10		5	20	7		0	21	8									
25-29,9	1	8	14		14	9	1		22	3	0		13	13	0		2	14	8		6	17	2		9	12	5		1	13	9		1	15	8		0	19	3									
≥30	3	7	8		7	10	0		12	5	0		12	5	1		2	10	6		5	11	1		5	11	2		1	14	3		0	15	3		0	13	4									
<b>PP<sup>6</sup></b>	NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS											
<10	3	22	11		14	17	3		32	3	0		21	14	0		1	23	12		5	27	3		9	18	9		3	19	14		3	26	8		0	27	6									
≥10	2	11	16		16	14	0		25	5	0		20	9	1		4	17	10		10	17	2		10	15	5		3	21	7		2	21	8		0	22	7									

<sup>&</sup>A=Reactividad Ausente, <sup>\*</sup>D=Índice de expresión Débil, <sup>#</sup>F=Índice de expresión Fuerte, <sup>%</sup>p= test Chi<sup>2</sup>, p <0,05;<sup>\*\*</sup>S=Significativo, <sup>^</sup>NS=No Significativo, <sup>1</sup>NA=No Aplicable el test estadístico, <sup>1</sup>A.Ca.Fliar=Antecedente de Cáncer Familiar (diferente a CCR), <sup>2</sup>A.CCR. Fliar=Antecedente de CCR Familiar, <sup>3</sup>HTA=Hipertensión Arterial, <sup>4</sup>DBT=Diabetes Mellitus, <sup>5</sup>IMC=Índice de Masa Corporal, <sup>6</sup>PP=Pérdida de Peso en los últimos dos meses, <sup>7</sup>Ap.=Apendicectomía, <sup>8</sup>Col.=Colecistectomía, <sup>9</sup>Ning.= Ninguna cirugía previa.

### **2.3.5. Relación de los antígenos estudiados en los TP con el tipo de cirugía previa**

Los antígenos *sialil Lewis a*, CEA y  $\beta$ -*catenina* fueron hallados en todos los TP de los pacientes a los cuales se les realizó apendicectomía previa a su diagnóstico de CCR; el 92,3% de estos TP también expresaron *Lewis y* (Tabla 32).

El antecedente de colecistectomía se correlacionó con expresión de MUC1, CEA y  $\beta$ -*catenina* en todos los TP así como *sialil Lewis x* y *Lewis y* en el 85,7% de los casos. En el 66,6% de estos tumores se observó un índice de expresión fuerte de *sialil Lewis x*.

Respecto a los TP de los pacientes colecistectomizados, aquellos con antecedentes de apendicectomía tuvieron una reactividad de MUC2 proporcionalmente más elevada (46,2% versus 16,7%).

En 87,5% de los TP de los pacientes sin antecedentes de cirugías previas predominó un índice de expresión débil o ausencia de *sialil Lewis x*.

### **2.3.6. Relación de los antígenos estudiados en los TP con el consumo de tabaco y alcohol**

El consumo de tabaco se correlacionó estadísticamente con un mayor índice de expresión fuerte de MUC1 en los TP (Tabla 30) que el hallado en los TP de los pacientes que no lo consumían ( $p < 0,05$ ).

Se observó una disminución significativa del índice de expresión fuerte de *sialil Lewis a* en los TP de los pacientes con antecedentes de consumo de alcohol respecto de aquellos que no lo consumían ( $p < 0,01$ ); los restantes antígenos no presentaron dependencia con este hábito.

### **2.3.7. Relación de los antígenos estudiados en los TP con el Índice de Masa Corporal (IMC) al momento del diagnóstico de CCR**

La presencia de obesidad, es decir un IMC  $\geq 30$ , se correlacionó con una tendencia a la disminución en la frecuencia de expresión de los antígenos *sialil Lewis x/a* y *Lewis y* en los TP. Todos los TP de los pacientes con un IMC entre



25 y 29,9 (sobrepeso) expresaron CEA. A diferencia de estos últimos (Tabla 32), los pacientes con un IMC  $\leq 25$  (peso normal) presentaron significativamente una disminución a la mitad de la presencia de MUC1 en sus TP ( $p < 0,01$ ). Asimismo, se observó una disminución del 20,6% y 13,6% de la expresión de *Lewis x* y MUC1 en los TP de los pacientes con sobrepeso respecto de aquellos con peso normal.

### **2.3.8. Relación de los antígenos estudiados en los TP con otros factores de riesgo**

La pérdida de peso mayor a 10 kg dos meses antes del diagnóstico de CCR se asoció con una modificación de la expresión antigénica. Si bien la diferencia no fue estadísticamente significativa, la expresión de *sialil Lewis x* fue 11,2% más baja en los pacientes que perdieron más peso (Tabla 32). Al aplicar el test de proporcionalidad de Fisher se observó en los TP de estos pacientes una frecuencia del índice de expresión fuerte de MUC1 mayor (59%) que los que perdieron menos de 10 kg. En el 66,6% de estos TP predominó un índice de expresión débil de esta mucina ( $p < 0,05$ ).

### **2.3.9. Relación de los antígenos estudiados en los TP con las manifestaciones clínicas al momento del diagnóstico**

*Lewis y* se halló en todos los TP de los pacientes con antecedentes de dolor abdominal como morbilidad previa al diagnóstico de CCR (Tabla 33); asimismo, expresaron significativamente mayor *sialil Lewis x* (85%) que los TP de aquellos sin este antecedente ( $p < 0,05$ ). El cambio del ritmo evacuatorio, uno de los síntomas relacionados con el CCR, se asoció con expresión de *sialil Lewis a* y *Lewis y* en todos los TP. Por otra parte, todos los TP de los pacientes cuya enfermedad se diagnosticó al momento de una obstrucción y/o perforación intestinal expresaron MUC1, *sialil Lewis a* y CEA así como *Tn* y *Lewis y* en el 75% de los casos; el 62,5% presentó un índice de expresión fuerte de MUC1. La presencia de sangre en la materia fecal se correlacionó con expresión de MUC1, *sialil Lewis a* y *Lewis y* en más del 90% de los TP estudiados. Todos los TP de los pacientes con anemia crónica expresaron *Tn*, *sialil Lewis a* y *Lewis x*.

**Tabla 33:** Relación entre la frecuencia del índice de expresión de los antígenos estudiados en los TP y la manifestación clínica del CCR.

Debut	MUC1				MUC2				MUC5AC				Tn				Le a				Le x				sLe x				Le y				CEA				β-cat											
	A <sup>&amp;</sup>	D <sup>*</sup>	F <sup>#</sup>	p <sup>%</sup>	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p												
	NS <sup>^</sup>				NS				NS				S				NS				NS				S				NS				NS				NS											
<b>Dolor abd.<sup>0</sup></b>	2	11	7		14	7	1		20	2	0		16	3	1		5	11	5		4	12	3		3	10	7		0	16	4		1	13	8		0	16	4									
<b>CRE<sup>1</sup></b>	1	4	2		2	5	0		6	1	0		3	4	0		0	5	2		2	5	0		3	3	1		0	4	3		1	4	2		0	6	1									
<b>Obstruc./perfor.<sup>2</sup></b>	0	3	5		5	2	0		7	1	0		2	6	0		0	4	4		4	4	0		6	2	0		2	5	1		0	6	2		0	7	1									
<b>ESTGI<sup>3</sup></b>	1	18	9		13	14	0		26	2	0		16	14	0		2	19	8		8	18	3		7	19	4		1	18	10		1	22	5		0	19	6									
<b>Anemia crónica</b>	0	1	2		0	2	1		2	1	0		0	3	0		0	3	0		0	3	0		2	1	0		1	1	1		0	1	2		0	2	1									

<sup>&</sup>A=Reactividad Ausente, <sup>\*</sup>D =Índice de expresión Débil, <sup>#</sup>F=Índice de expresión Fuerte, <sup>%</sup>p= test Chi<sup>2</sup>, p <0,05; <sup>\*\*</sup>S=Significativo, <sup>^</sup>NS=No Significativo, <sup>0</sup>Dolor abd.=Dolor abdominal, <sup>1</sup>CRE=Cambio del Ritmo Evacuatorio, <sup>2</sup>Obstruc./perfor.=Ostrucción/ perforación <sup>3</sup>ESTGI=Eliminación de Sangre por el Tracto Gastro-Intestinal.

Se observó además, una disminución significativa de la expresión de *Tn* en los TP de los pacientes con dolor abdominal respecto a los pacientes con sangrado por el tracto gastrointestinal ( $p < 0,05$ ).

### **2.3.10. Relación de los antígenos estudiados en los TP con la localización del cáncer primario (Tabla 34)**

Los tumores colorrectales expresaron en su mayoría *Lewis y* siendo el porcentaje de reactividad del 89,6% para los tumores de colon y de 96,2% para los de recto. Se observó que el porcentaje de tumores de recto con índice de expresión fuerte (48%) fue similar al del débil (52%) mientras que en el cáncer de colon el porcentaje con índice de expresión débil (70,6%) fue mayor que el fuerte (19%)( $p < 0,05$ ).

En general, en estos últimos se observó una tendencia a presentar mayor frecuencia del índice de expresión fuerte de la mayoría de los antígenos estudiados respecto a lo hallado en los TP de recto. Sólo los cánceres de colon presentaron un índice de expresión fuerte de MUC2; asimismo, la expresión de MUC5AC fue el doble en estos pacientes.

Las muestras obtenidas de los cánceres del colon ascendente expresaron predominantemente *sialil Lewis a* (94,7%), MUC1 (90%), CEA (85%), *Lewis y* (80,9%) y *sialil Lewis x* (60%). El 55,5% de estos tumores presentaron un índice de expresión fuerte de MUC1.

Todos los cánceres del colon transversal expresaron *sialil Lewis a*, *Lewis x/y* y CEA. Los TP de los pacientes con tumores en esta localización expresaron significativamente un índice de expresión débil de *sialil Lewis a* más bajo que los cánceres del colon ascendente ( $p < 0,05$ ).

MUC1, *Lewis x/y* y *sialil Lewis x* se encontraron expresados en todos los pacientes con cáncer de colon descendente.

Los cánceres del colon sigmoideos expresaron CEA, MUC1, *sialil Lewis a*, *Lewis y* y *sialil Lewis x* en el 96,8%, 96,6%, 90,6%, 90% y 68% de los casos, respectivamente.

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en el índice de expresión de los antígenos estudiados entre los especímenes tumorales del colon ascendente y los del colon sigmoideo.

**Tabla 34:** Relación entre la frecuencia del índice de expresión de los antígenos estudiados en el TP y la localización tumoral.

	MUC1			MUC2			MUC5AC			Tn			sLe a			Le x			sLe x			Le y			CEA			β-cat												
	A <sup>&amp;</sup>	D <sup>*</sup>	F <sup>#</sup>	p <sup>%</sup>	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p								
<b>Sitio primario</b>																																								
Colon	3	29	25	NS <sup>^</sup>	27	26	3	NS	48	10	0	NS	34	23	0	NS	5	33	21	NS	13	39	5	NS	20	28	10	NS	6	41	11	S <sup>**</sup>	4	37	19	NS	1	43	12	NS
Recto	2	16	8		12	14	0		24	2	0		15	10	1		3	15	9		8	16	1		8	13	5		1	14	12		2	21	4		0	19	5	
<b>Localización colónica</b>																																								
C.Asc. <sup>1</sup>	2	8	10	NS	7	9	2	NS	13	5	0	NS	11	9	0	NS	1	13	5	NS	5	13	1	NS	8	8	4	NS	4	14	3	NS	3	11	6	NS	0	13	4	NS
C.Transv. <sup>2</sup>	1	3	2		1	3	0		4	1	0		3	2	0		0	3	3		0	5	1		2	3	1		0	5	1		0	5	1		1	3	2	
C.Desc. <sup>3</sup>	0	2	1		2	2	0		3	1	0		1	2	0		1	2	1		0	3	0		0	2	1		0	2	2		1	2	1		0	3	1	
C.Sigm. <sup>4</sup>	1	16	13		16	15	1		29	4	0		21	10	1		3	16	13		10	19	3		10	17	5		3	21	6		1	20	11		0	25	6	

<sup>&</sup>A=Reactividad Ausente, <sup>\*</sup>D =Índice de expresión Débil, <sup>#</sup>F= Índice de expresión Fuerte, <sup>%</sup>p= test Chi<sup>2</sup>, p <0,05; <sup>\*\*</sup>S=Significativo, <sup>^</sup>NS=No Significativo, <sup>1</sup>C.Asc=Colon Ascendente, <sup>2</sup>C.Transv.=Colon Transverso, <sup>3</sup>C.Desc=Colon Descendente, <sup>4</sup>C.Sigm=Colon Sigmoides.

### 2.3.11. Relación de los antígenos estudiados y el tamaño del TP

Para evaluar la influencia del tamaño tumoral en la expresión antigénica se siguió los lineamientos Y. B. Cho y colaboradores (2009) quienes discriminaron el tamaño tumoral en menor o mayor de 5 cm.

Se observó una elevada frecuencia del índice de expresión fuerte de  $\beta$ -*catenina* en los tumores mayores a 5 cm que en aquellos menores a 5 cm ( $p < 0,05$ ). La expresión de los antígenos *sialil Lewis x* y *sialil Lewis a* fueron 17% y 10,8% más elevados, respectivamente, en los tumores mayores de 5 cm que en los menores de 5 cm; asimismo, en estos últimos se observó una disminución de la expresión de CEA del 12,2% (Tabla 35).

### 2.3.12. Relación de los antígenos estudiados en los TP con el estadio tumoral

Los cánceres que invadieron la capa submucosa (estadio  $pT_1$ ) y aquellos cuyo tumor infiltró la capa muscular (estadio  $pT_2$ ) presentaron en su mayoría expresión de los antígenos CEA (93,1%), MUC1 (89,2%) y *Lewis x* (80%) (Tabla 36).

Todos los TP que invadieron la capa muscular o que infiltraron el tejido pericólico no peritonizado o perirrectal (estadio  $pT_3$ ) presentaron expresión de *sialil Lewis a*. El 96%, 92% y 91,6% de los TP de estos pacientes expresaron de *Lewis y*, CEA y MUC1, respectivamente. Utilizando el test de proporcionalidad de Fisher se halló significativamente un mayor índice de expresión fuerte de MUC1 en los cánceres con estadio  $pT_3$  que aquellos con estadio  $pT_{1/2}$  ( $p < 0,05$ ). La expresión de MUC5AC en los TP aumentó de 10,7% en los cánceres con estadios  $pT_{1/2}$  a 18,7% con estadios  $pT_4$ . Los cánceres que invadieron directamente otros órganos o estructuras y/o provocaron la perforación del peritoneo visceral (estadio  $pT_4$ ) expresaron en todos los casos MUC1 mientras que el 93,9% y el 93,3% expresaron CEA y *Lewis y*, respectivamente. El índice de expresión fuerte de CEA fue significativamente más elevado en los TP de estos pacientes que en aquellos con estadio  $pT_{1/2}$  ( $p < 0,05$ ). La expresión de MUC2 disminuyó significativamente conforme progresó el grado de infiltración tumoral, es decir, con el estadio  $pT$  ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 35:** Relación entre la frecuencia del índice de expresión de los antígenos estudiados en los TP y el tamaño tumoral.

Tamaño	MUC1				MUC2				MUC5AC				Tn				sLe a				Le x				sLe x				Le y				CEA				β-cat			
	A <sup>&amp;</sup>	D <sup>*</sup>	F <sup>#</sup>	p <sup>%</sup>	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p				
	NS <sup>^</sup>				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS				S <sup>**</sup>							
<5 cm	2	17	11		16	14	1		28	4	0		16	15	1		5	16	11		8	20	2		13	14	5		3	22	7		0	21	10		1	26	3	
≥ 5 cm	2	22	15		17	20	1		34	4	0		23	13	0		2	25	14		9	27	1		8	21	8		1	26	13		5	26	10		0	24	13	

<sup>&</sup>A=Reactividad Ausente, <sup>\*</sup>D =Índice de expresión Débil, <sup>#</sup>F=Índice de expresión Fuerte, <sup>%</sup>p= test Chi<sup>2</sup>, p <0,05; <sup>\*\*</sup>S=Significativo, <sup>^</sup>NS=No Significativo.

**Tabla 36:** Relación entre la frecuencia del índice de expresión de los antígenos estudiados en los TP y el estadio TNM.

Estadio	MUC1				MUC2				MUC5AC				Tn				sLe a				Le x				sLe x				Le y				CEA				β-cat			
	A <sup>&amp;</sup>	D <sup>*</sup>	F <sup>#</sup>	p <sup>%</sup>	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p				
<b>Estadio pT<sup>1</sup></b>	NS <sup>^</sup>				S <sup>**</sup>				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS							
T <sub>1/2</sub>	3	18	7		8	12	3		25	3	0		15	11	1		4	17	8		5	18	2		10	13	4		4	18	8		2	23	4		0	24	4	
T <sub>3</sub>	2	9	13		13	11	0		21	3	0		16	9	0		0	17	9		6	19	1		7	15	4		1	17	7		2	18	5		0	16	8	
T <sub>4</sub>	0	18	13		18	12	0		26	6	0		18	13	0		4	14	13		10	18	3		11	13	7		2	20	8		2	17	14		1	22	5	
<b>Estadio pN<sup>2</sup></b>	NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS											
N <sub>0</sub>	2	18	18		18	21	1		35	5	0		21	17	0		2	26	13		12	25	2		13	20	6		3	25	12		1	29	11		0	27	10	
N <sub>1</sub>	2	15	11		11	11	2		24	2	0		16	11	1		2	15	10		5	20	2		11	13	4		3	17	8		3	17	7		1	20	4	
N <sub>2</sub>	1	9	3		6	7	0		11	2	0		9	3	0		4	7	3		3	8	0		2	6	4		1	10	3		2	9	3		0	11	2	
<b>Estadio M<sup>3</sup></b>	NS				NS				NS				NS				NS				S				S				NS											
M <sub>0</sub>	5	36	23		28	31	2		56	7	0		35	27	1		6	40	20		14	44	4		18	35	11		3	42	20		4	44	17		0	47	13	
M <sub>1</sub>	0	8	5		9	9	1		15	4	0		14	4	0		2	8	8		7	9	2		10	4	4		4	12	3		2	13	5		1	14	3	
<b>Estadio TNM<sup>4</sup></b>	NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS											
I	0	7	3		3	6	1		9	1	0		6	4	0		1	6	3		2	8	0		2	7	1		1	7	2		0	8	2		0	8	2	
II	2	11	12		14	12	0		21	5	0		12	13	0		1	16	10		7	17	2		7	14	5		0	15	9		0	18	8		0	16	7	
III	3	19	9		13	13	1		27	2	0		17	12	1		4	18	9		5	21	2		9	16	5		2	21	9		4	19	8		0	24	5	
IV	0	8	9		9	9	1		15	4	0		14	4	0		2	8	8		7	9	2		10	4	4		4	12	3		2	13	5		1	14	3	

<sup>&</sup>A=Reactividad Ausente, <sup>\*</sup>D =Índice de expresión Débil, <sup>#</sup>F=Índice de expresión Fuerte, <sup>%</sup>p= test Chi<sup>2</sup>, p <0,05; <sup>\*\*</sup>S=Significativo, <sup>^</sup>NS=No Significativo, <sup>1</sup>T= Tumor primario, <sup>2</sup>N=Metástasis ganglionar, <sup>3</sup>M=Metástasis a distancia, <sup>4</sup>TNM=sistema de clasificación TNM para cáncer colorrectal establecido por la AJCC (American Joint Committee on Cancer), Sexta edición (2002).

La mitad de los TP de los pacientes sin GLM, es decir con estadio pN<sub>0</sub>, presentaron un índice de expresión fuerte de MUC1 mientras que en el 73,3% de los mismos se halló una reacción positiva de MUC2.

Los pacientes que presentaron metástasis en menos de tres ganglios linfáticos (estadío pN<sub>1</sub>) expresaron predominantemente los antígenos MUC1 (92,8%), *sialil Lewis a* (92,5%), *Lewis y* (89,2%), CEA (88,8%) y *Lewis x* (81,4%).

La presencia de metástasis en más de cuatro ganglios linfáticos (estadío pN<sub>2</sub>) se asoció con expresión de *Lewis y*, MUC1, CEA y *sialil Lewis a* en sus TP en el 92,8%, 92,3%, 85,7% y 83,3% de los casos analizados, respectivamente.

A diferencia de los pacientes con estadio pN<sub>2</sub>, la expresión de *sialil Lewis x* en los TP de los pacientes con estadio pN<sub>0</sub> fue menor (16,6%).

Todos los TP de los pacientes con metástasis (estadío M<sub>1</sub>) expresaron MUC1 mientras que en la mitad de ellos el índice de expresión *sialil Lewis x/a* fue fuerte.

De acuerdo a la estadificación pTNM de la UICC, todos los cánceres de los pacientes agrupados en el **estadío I** (T<sub>1/2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>) expresaron MUC1 y CEA. Asimismo, todos los TP de los pacientes con **estadío II** (T<sub>3/4</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>) también expresaron CEA pero a diferencia de aquellos pertenecientes al estadío I en estos se halló además un predominio de reacción positiva de *Lewis y*.

Por otra parte, no se observó ninguna prevalencia de expresión de los antígenos estudiados en los cánceres de los pacientes agrupados en el **estadío III** (T<sub>1/2</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub>, T<sub>3/4</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub> ó cualquier TN<sub>2</sub>M<sub>0</sub>).

Finalmente, y al igual a lo observado en el estadío I, todos TP de los pacientes pertenecientes al **estadío IV** (cualquier T cualquier NM<sub>1</sub>) expresaron MUC1 pero a diferencia del estadío I, en el estadío IV se halló un incremento del 74,5% del índice de expresión fuerte. Asimismo, la mitad de éstos cánceres presentaron un índice de expresión fuerte de *sialil Lewis a*.

En general, se observó una disminución de la expresión de *sialil Lewis x*, *Lewis y* y *Tn* en los TP de los pacientes con estadío IV respecto a los estadíos II-III.

### 2.3.13. Relación de los antígenos estudiados en los TP y los marcadores tumorales evaluados en sangre periférica

Para analizar la relación entre la expresión antigénica de CEA y CA 19-9 (*sialil Lewis a*) en el TP y su concentración sanguínea, se realizó un análisis estadístico con los datos transformados con ANOVA de una vía,  $p < 0,05$ .

Se realizaron 10 determinaciones de CEA sérico pre-quirúrgico y 65 post-quirúrgico. Asimismo, se obtuvieron 6 determinaciones de CA 19-9 sérico pre-quirúrgico y 39 post-quirúrgico. En la Tabla 37 se muestran los valores promedio de CEA y CA 19-9 sanguíneos de acuerdo al estadio tumoral de los pacientes.

**Tabla 37:** Promedio de valores CEA y CA 19-9, en el pre- y post-operatorio de acuerdo al estadio.

Estadio	CEA (ng/ml)		CA 19-9 (U/ml)	
	Pre-OP.*	Post-OP.#	Pre-OP.	Post-OP.
I	7,0 (n=1)	2,8 (n=8)	7,0 (n=1)	12,0 (n=4)
II	5,6 (n=3)	3,3 (n=24)	9,0 (n=1)	23,7 (n=12)
III	13,7 (n=4)	22,1 (n=23)	9,0 (n=2)	32,1 (n=15)
IV	124,0 (n=2)	78,9 (n=10)	79,5 (n=2)	106,7 (n=8)

\*Pre-OP=Pre-operatorio, #Post-OP=Post-operatorio.

Independientemente del estadio, se observó un aumento de los niveles sanguíneos post-operatorios de CEA y CA 19-9 cuando estos antígenos se encontraron expresados en sus TP (Tabla 38).

Cuando estos antígenos presentaron un índice de expresión fuerte en los TP los niveles sanguíneos post-operatorios de CEA y CA 19-9 fueron más elevados que cuando estos antígenos estaban ausentes o con un índice de expresión débil. Asimismo, se observó en los TP con un índice fuerte de CA 19-9 niveles sanguíneos post-operatorios 12 veces significativamente más altos que aquellos con ausencia de este antígeno ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 38:** Relación entre el índice de expresión en el TP y el promedio de concentración sanguínea de CEA y CA 19-9 en el post-operatorio.

Índice de expresión	Post-OP# U/ml ( $\pm$ SD)		p <sup>%</sup>
	n		
<b>CEA</b>			NS <sup>^</sup>
Ausente	4	1,7	
Débil	42	20,6 (13,2)	
Fuerte	17	30,9 (20,8)	
<b>CA 19-9</b>			S**
Ausente	3	5,3	
Débil	21	20,7 (10,8)	
Fuerte	13	67,7 (13,8)	

%p=test ANOVA de una vía,  $p < 0,05$ ;  
#Post-OP= concentración sanguínea post-operatoria, \*\*S=Significativo, ^NS=No Significativo.

Los pacientes con estadio II y III con un índice de expresión fuerte de CA 19-9 en sus TP presentaron niveles post-operatorios de este antígeno superiores



a los valores normales ( $\leq 37$  U/ml). El 20% (1/5) y 75% (3/4) de los pacientes con estadios II y III, respectivamente, presentaron progresión de su enfermedad.

Los altos niveles sanguíneos post-operatorios de CEA y CA 19-9 en los pacientes con estadio IV se correlacionaron con un índice de expresión fuerte de estos antígenos en los TP.

### 2.3.14. Relación de los antígenos estudiados en los TP con el tipo histológico tumoral

Se realizó un análisis de independencia con el test  $\chi^2$ ,  $p < 0,05$  para evaluar la relación entre la expresión antigénica y el tipo histológico tumoral. A pesar de no haberse podido refutar la hipótesis de independencia entre estas dos variables, se observó una diferencia del 20,2% de expresión de *Lewis x* entre los tumores mucinosos puros respecto a los adenocarcinomas puros (77,8% versus 57,6% respectivamente); también se halló una diferencia del 15,3% y 11,5% en la expresión de  $\beta$ -catenina y MUC2, respectivamente (Figura 72 A).

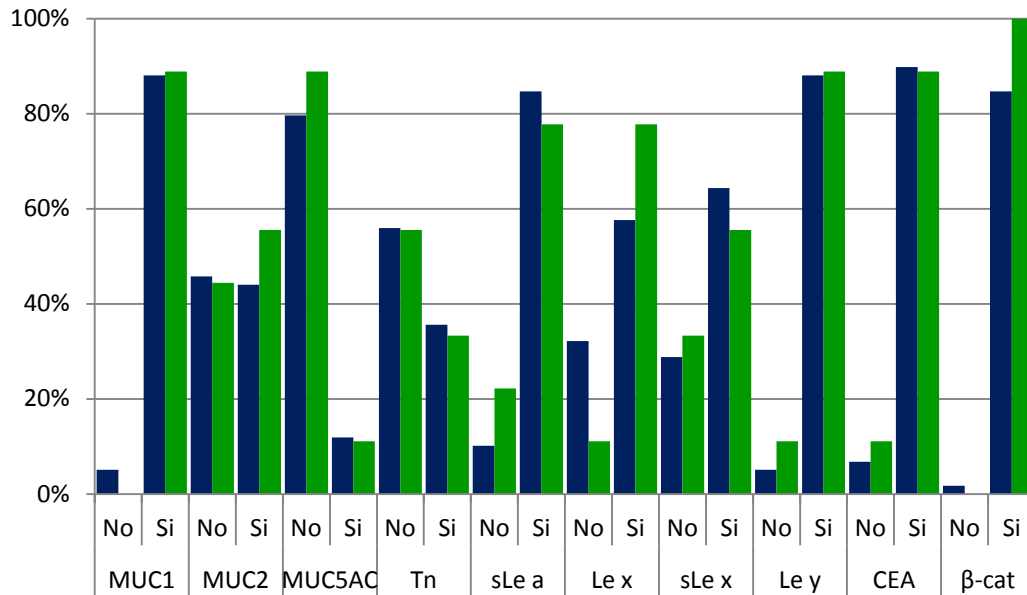
Las frecuencias de expresión de *Lewis x* y *sialil Lewis a* en los adenocarcinomas con componente mucinoso fueron 32,8% y 10,5% más elevada, respectivamente, que en los adenocarcinomas puros (Figura 72 B).

**Tabla 39:** Distribución de frecuencias porcentuales de los antígenos estudiados según el tipo histológico del TP.

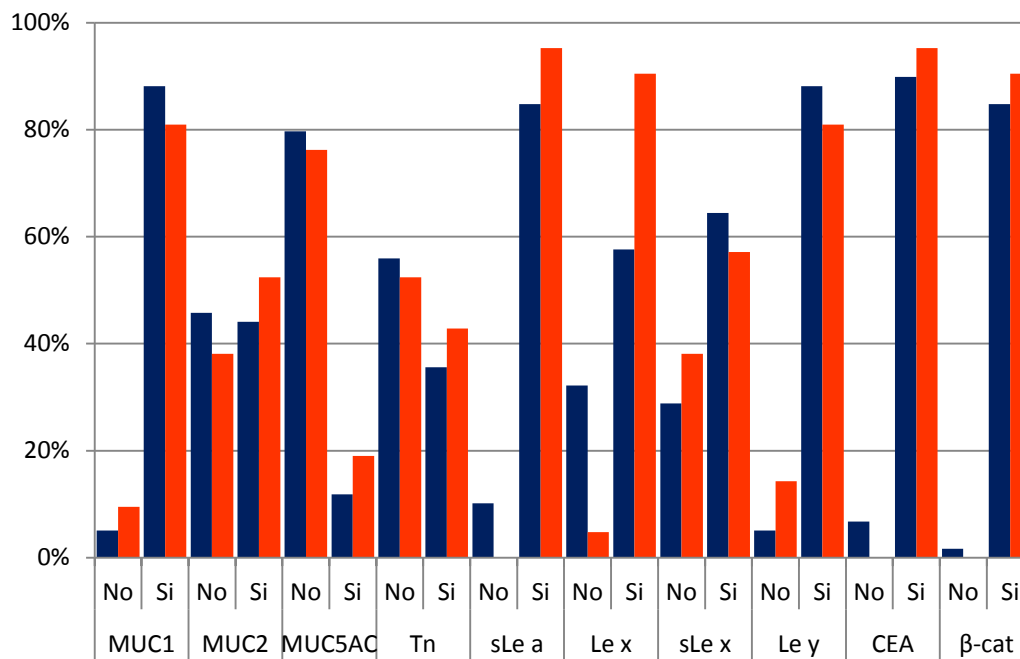
		AP <sup>1</sup> (n=59)	ACM <sup>2</sup> (n=21)	AM <sup>3</sup> (n=9)
<b>MUC1</b>	Ausente	5,1	4,8	0,0
	Débil	52,5	47,6	33,3
	Fuerte	35,6	33,3	55,6
<b>MUC2</b>	Ausente	45,8	38,1	44,4
	Débil	42,4	47,6	44,4
	Fuerte	1,7	4,8	11,1
<b>MUC5AC</b>	Ausente	79,7	76,2	88,9
	Débil	11,9	19,0	11,1
	Fuerte	0,0	0,0	0,0
<b>Tn</b>	Ausente	55,9	52,4	55,6
	Débil	33,9	42,9	33,3
	Fuerte	1,7	0,0	0,0
<b>sLe a</b>	Ausente	10,2	0,0	22,2
	Débil	50,8	57,1	55,6
	Fuerte	33,9	38,1	22,2
<b>Le x</b>	Ausente	32,2	4,8	11,1
	Débil	50,8	81,0	77,8
	Fuerte	6,8	9,5	0,0
<b>sLe x</b>	Ausente	28,8	38,1	33,3
	Débil	47,5	42,9	33,3
	Fuerte	16,9	14,3	22,2
<b>Le y</b>	Ausente	5,1	14,3	11,1
	Débil	64,4	47,6	66,7
	Fuerte	23,7	33,3	22,2
<b>CEA</b>	Ausente	6,8	0,0	11,1
	Débil	59,3	81,0	66,7
	Fuerte	30,5	14,3	22,2
<b><math>\beta</math>-cat</b>	Ausente	1,7	0,0	0,0
	Débil	66,1	71,4	77,8
	Fuerte	18,6	19,0	22,2

<sup>1</sup>AP=Adenocarcinoma puro, <sup>2</sup>ACM = Adenocarcinoma con Componente Mucinoso, <sup>3</sup>AM= Adenocarcinoma mucinoso puro

Los tumores mucinosos presentaron una frecuencia de índice de expresión fuerte de MUC1 20% más elevada que la hallada en los adenocarcinomas puros (Tabla 39).



**Figura 72 A:** Porcentaje de distribución de los adenocarcinomas puros (barras azules) y los carcinomas mucinosos puros (barra verde), de acuerdo a la expresión de los antígenos estudiados



**Figura 72 B:** Porcentaje de distribución de los adenocarcinomas puros (barras azules) y los adenocarcinomas con componente mucinosos (barra naranja), de acuerdo a la expresión de los antígenos estudiados.

### 2.3.15. Relación de los antígenos estudiados en los TP y las características anatomopatológicas

*Sialil Lewis a* se encontró 21,1% más elevada en los carcinomas con presencia de ulceración tumoral que en los no ulcerados; asimismo, en estos tumores la expresión de *Tn* también se halló incrementada en un 50,2%.

La expresión de *Lewis x* fue significativamente más elevada cuando los tumores invadieron la capa subserosa que en aquellos sin invasión (Tabla 40), predominando en estos últimos un índice de expresión débil ( $p < 0,01$ ). MUC1 y CEA se expresaron en todos los tumores que invadieron esta capa mientras que los antígenos *sialil Lewis a* y *Lewis y* se expresaron en el 91,6% de los casos.

En general, la expresión de los antígenos estudiados fue elevada tanto en los carcinomas que invadieron la capa serosa como en aquellos con la capa indemne; sin embargo, MUC1, *sialil Lewis a/x*, *Lewis y* y CEA se expresaron en todos los tumores con invasión.

La presencia de invasión vascular en el TP se asoció a expresión de MUC1 y *sialil Lewis a* en todos los casos analizados mientras que el 60% se expresó *sialil Lewis x*. Por otra parte, ningún tumor con esta característica presentó un índice de expresión fuerte *Tn*, *Lewis x/y* y *sialil Lewis x*.

Todos los TP con presencia de invasión tumoral linfática expresaron MUC1. En estos tumores, aplicando el test de proporcionalidad de Fisher se observó un descenso estadísticamente significativo del índice de expresión fuerte de *Lewis y* respecto de aquellos sin invasión linfática ( $p < 0,05$ ).

MUC1 y *Lewis y* se hallaron presentes en todos los TP con invasión perineural. El 57,1% expresó MUC1 tanto en la membrana como en el citoplasma. En ninguno de estos tumores se hallaron los antígenos MUC5AC y *Tn* así como tampoco se encontró MUC2 con un índice de expresión fuerte. Sin embargo, en estos tumores se observó un incremento del índice de expresión fuerte de *sialil Lewis a* y CEA respecto a aquellos con ausencia de dicha invasión ( $p < 0,01$ ) (Tabla 40).

El 84,6% de los tumores con presencia de necrosis expresó *Lewis y*, un 10,5% menos que aquellos sin necrosis.

**Tabla 40:** Relación entre el índice de expresión de los antígenos estudiados en los TP y las características anatomopatológicas tumorales.

	MUC1				MUC2				MUC5AC				Tn				sLe a				Le x				sLe x				Le y				CEA				β-cat			
	A <sup>&amp;</sup>	D <sup>*</sup>	F <sup>#</sup>	p <sup>%</sup>	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p				
<b>Ulcerado</b>	NA				NA				NA <sup>1</sup>				NA				NS <sup>^</sup>				NA				NA				NA				NA				NA			
No	1	6	6		4	8	0		13	0	0		9	4	0		3	6	4		4	6	3		5	7	1		1	7	5		1	9	3		0	8	3	
Si	4	24	20		19	28	2		42	8	0		26	22	1		4	28	20		11	35	1		13	25	11		3	34	14		3	37	11		1	37	11	
<b>Inv. muscular</b>	NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA			
No	0	2	1		2	1	0		3	0	0		2	1	0		0	1	2		1	1	1		0	2	1		1	2	0		1	2	0		0	1	1	
Si	5	41	31		34	39	3		37	11	0		45	31	1		7	45	28		17	54	5		25	39	14		6	51	22		4	54	23		1	59	16	
<b>Inv. subserosa</b>	NA				NA				NA				NA				S <sup>**</sup>				NS				NA				NA				NA							
No	5	33	24		24	34	3		55	8	0		36	26	1		6	35	23		13	46	2		20	32	11		6	41	17		5	44	15		1	48	12	
Si	0	6	5		9	3	0		11	1	0		8	4	0		1	7	4		5	4	3		3	6	3		1	8	3		0	8	5		0	8	3	
<b>Inv. serosa</b>	NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA			
No	5	39	25		28	37	3		61	9	0		42	27	1		7	39	26		17	48	3		24	34	12		7	46	19		5	49	18		1	52	14	
Si	0	1	4		4	7	0		5	1	0		3	3	0		0	4	1		0	3	3		1	3	2		0	2	3		0	4	2		0	6	0	
<b>Inv. vascular</b>	NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA				NS				NA							
No	5	40	30		35	37	2		65	11	0		45	30	1		7	42	29		18	51	6		24	38	15		6	50	22		4	55	20		1	57	16	
Si	0	2	3		1	3	1		4	1	0		3	2	0		0	4	1		1	4	0		2	3	0		1	4	0		1	2	2		0	4	1	
<b>Inv. linfática</b>	NA				NA				NA				NA				NA				NS				NS				NA				NA				NA			
No	5	31	24		25	32	2		53	8	0		36	24	1		7	35	21		13	44	3		21	28	13		6	38	20		4	45	15		1	43	15	
Si	0	12	9		12	8	1		17	4	0		13	8	0		1	11	9		7	11	3		16	13	2		1	17	2		1	13	7		0	19	2	
<b>Inv. perineural</b>	NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA			
No	5	38	31		31	38	3		62	12	0		42	32	1		6	43	27		16	52	6		24	38	14		7	48	21		4	56	17		1	56	15	
Si	0	4	2		5	2	0		7	0	0		6	0	0		1	3	3		3	3	0		2	3	1		0	6	1		1	1	5		0	5	2	
<b>Necrosis</b>	NA				NA				NA				NA				NS				NS				NS				NA				NS				NA			
No	4	25	24		24	29	1		47	9	0		33	20	1		5	31	21		14	36	4		16	28	11		3	39	15		4	39	15		1	43	11	
Si	1	17	9		12	11	2		22	3	0		15	12	0		2	15	9		5	19	2		10	13	4		4	15	7		1	18	7		0	18	6	

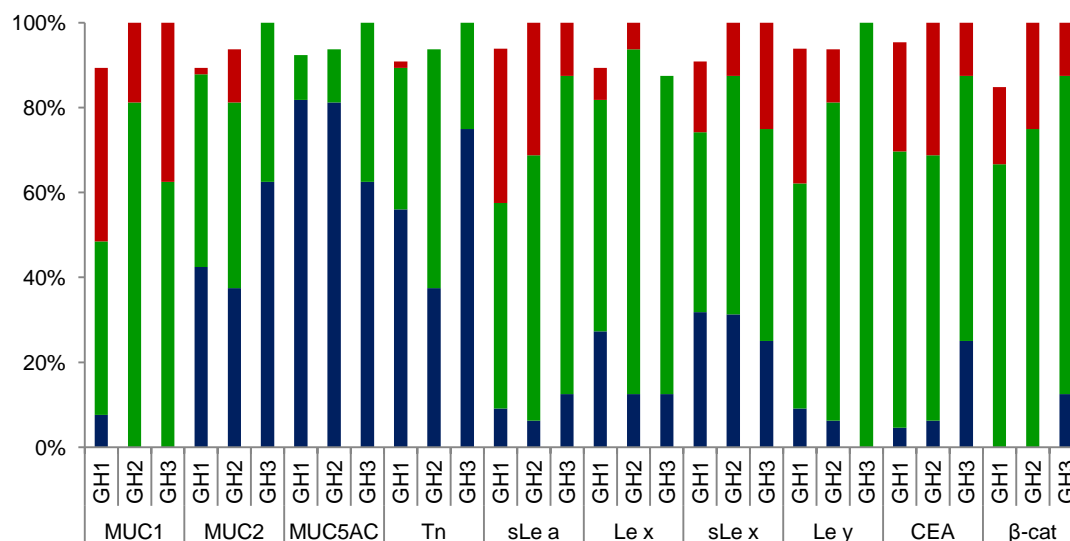
<sup>&</sup>A=Reactividad Ausente, <sup>\*</sup>D=Índice de expresión Débil, <sup>#</sup>F=Índice de expresión Fuerte, <sup>%</sup>p= test Chi<sup>2</sup>, p <0,05, <sup>\*\*</sup>S=Significativo, <sup>^</sup>NS=No Significativo, <sup>1</sup>NA=No Aplicable el test estadístico.

### 2.3.16. Relación entre los antígenos estudiados en los TP con el grado de diferenciación tumoral, grado nuclear e índice mitótico

Aplicando el test de independencia de Chi<sup>2</sup> ( $p < 0,05$ ) se evaluó la relación de los antígenos estudiados con el grado de diferenciación tumoral y el grado nuclear.

Todos los carcinomas moderados (GH2) y pobremente diferenciados expresaron MUC1.

La ausencia de expresión de MUC2 fue un 47,4% más elevada en los tumores GH3 que en los GH1 mientras que la ausencia de expresión de MUC5AC fue más baja en los tumores con GH3 que en los GH1 (25% versus 58%).



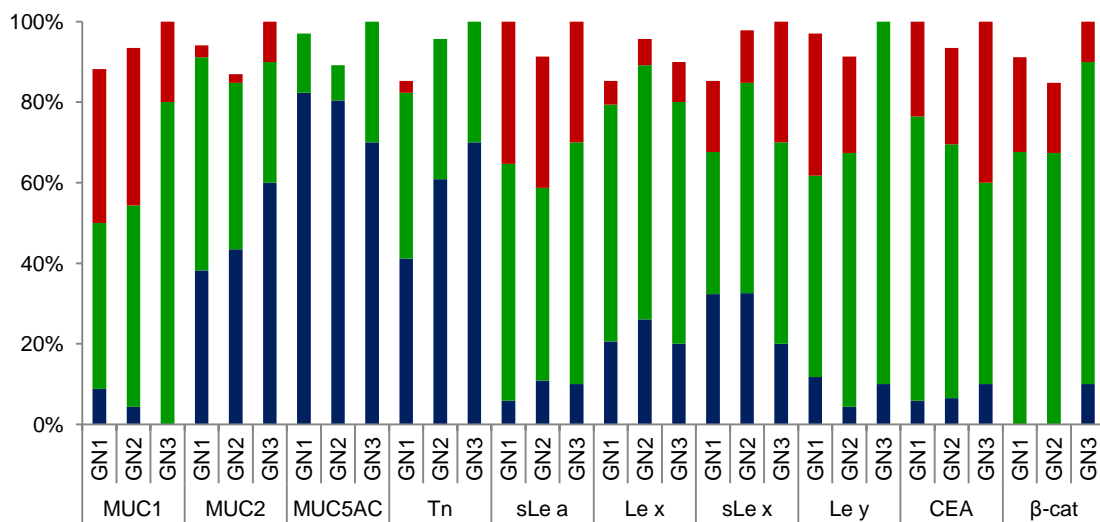
**Figura 73:** Distribución porcentual de la expresión antigénica según el grado histológico tumoral (en azul se encuentran expresados los tumores con ausencia de reactividad antigénica, en verde los tumores con índice de expresión débil del antígeno y en rojo los tumores con índice de expresión fuerte del antígeno).

De los carcinomas con reactividad positiva para *Tn*, el 67,6% correspondieron a tumores GH1, 26,5% a GH2 y sólo el 5,9% a GH3 mientras que aquellos positivos para *Lewis x* el 67,2% fueron tumores GH1, el 23% GH2 y el 9,8% GH3. Similares hallazgos se encontraron con la expresión positiva de *Lewis y*, es decir, 71,8% en los tumores GH1, 17,9% en los GH2 y 10,7% en los GH3.

Respecto a los tumores bien diferenciados (GH1), los pobremente diferenciados (GH3) redujeron un 65,6% y 51,5% la frecuencia del índice de expresión fuerte de *sialil Lewis a* y CEA, respectivamente (Figura 73).

En el 25% de los carcinomas GH2  $\beta$ -*catenina* se halló con un índice de expresión fuerte mientras que en los GH1 y GH3 se observó en el 21,4% y el 12,5%, respectivamente. Su expresión en las membranas basolaterales (25%) y en el citoplasma (58,8%) de los TP GH3 fue más baja que en los TP GH1 (62,5% versus 96,4%); en estos últimos, la expresión nuclear fue más baja que en los GH3 (12,5% versus 37,5%).

Todos los carcinomas con presencia de células con núcleos grandes, nucléolos prominentes o varios nucléolos, con cromatina gruesa y de diferente tamaño y forma (GN3) expresaron MUC1 (Figura 74). Comparados con aquellos con células con núcleos prominentes, uniformes en forma y tamaño, con cromatina dispersa y sin nucléolos prominentes (GN1), en los tumores con GN3 se observó una disminución del 47,7% del índice de expresión fuerte de MUC1, del 15% de *sialil Lewis a* y del 57,5% de  $\beta$ -*catenina*. MUC2 mostró una tendencia a disminuir su expresión en los tumores con GN3 respecto de aquellos con GN1.

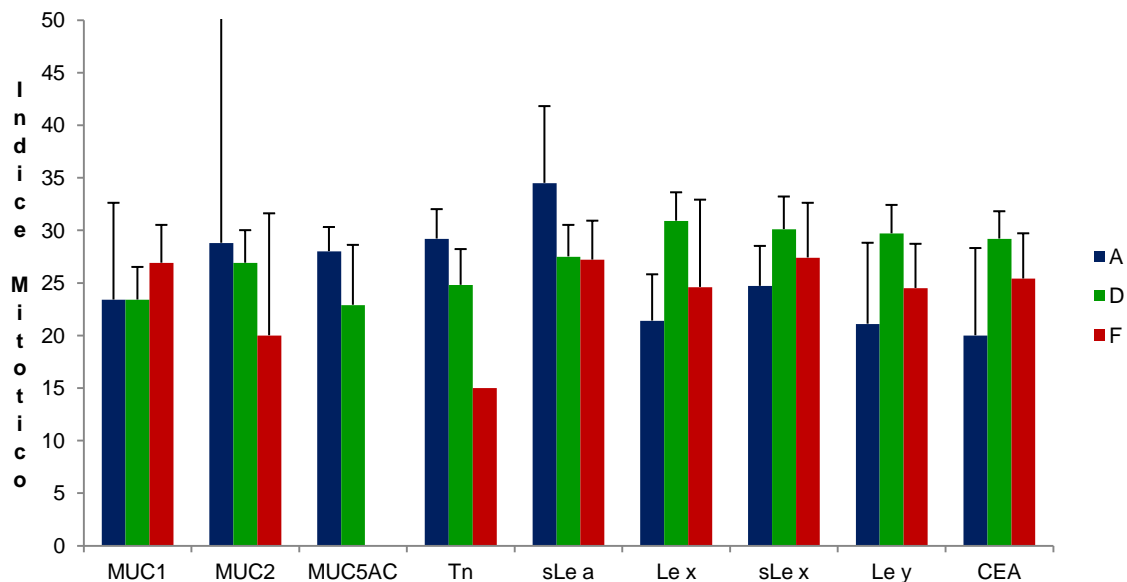


**Figura 74:** Distribución porcentual de la expresión antigénica según el grado nuclear tumoral (en azul se encuentran expresados los tumores con ausencia de reactividad antigénica, en verde los tumores con Índice de expresión débil del antígeno y en rojo los tumores con índice de expresión fuerte del antígeno).

Respecto a los tumores con GN1, en aquellos con GN3 la expresión de MUC5AC disminuyó del 41,7% al 25% mientras que *Tn* disminuyó su expresión. Sin embargo, en los tumores con GN3 *Lewis x*, *sialil Lewis x* y CEA aumentaron el índice de expresión fuerte en un 70%.

Se empleó el test estadístico ANOVA de una vía ( $p < 0,05$ ) con el propósito de evaluar la relación entre el índice mitótico (IM) de los TP y el índice de expresión antigénica. Si bien no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estas dos variables, se observaron algunas tendencias claras. El IM tumoral fue más elevado en los tumores con reactividad positiva de *Lewis x/y*, *sialil Lewis x* y CEA que en aquellos con ausencia de los mismos. Del mismo modo, el IM fue más elevado en los TP con un índice de expresión fuerte de MUC1 que en aquellos con ausencia de reactividad o con un índice de expresión débil.

Los tumores con ausencia de expresión tanto de MUC2 como de *Tn* presentaban un IM más elevado que aquellos con un índice de expresión débil o fuerte (Figura 75).



**Figura 75:** Índice mitótico (IM) promedio agrupado según el índice de expresión antigénica. El promedio de IM observado en los TP con ausencia (A) de expresión de MUC2 fue  $28,8 \pm 3,2$ , con índice de expresión débil (D)  $26,9 \pm 3,1$  y fuerte (F)  $20,0 \pm 11,6$ ; asimismo, el IM de los TP con ausencia de expresión de *Tn* fue  $29,2 \pm 2,8$ , débil  $22,9 \pm 5,7$  y fuerte  $15 \pm 9,8$ . Los antígenos *Lewis x/y*, *sialil Lewis x* y CEA presentaron similar comportamiento.

### 2.3.17. Relación de los antígenos estudiados en los TP con la respuesta al primer tratamiento quimioterápico instaurado

Los pacientes con estadio I ( $T_{1/2}N_0M_0$ ) estudiados fueron 10, 6 de ellos presentaron cáncer de colon y 4 de recto. Sólo un paciente presentó estadio  $pT_1$  mientras que 9 fueron clasificados en estadio  $pT_2$ . La muestra ganglionar fue suficiente (más de 13 ganglios resecados) sólo en tres casos. Ocho de diez pacientes realizaron tratamiento quimioterápico basada en 5-Fluorouracilo + Leucovorina, 5 de estos tenían cáncer de colon y 3 de recto. Todos los pacientes con cánceres de recto recibieron radioterapia post-operatoria. Luego del tratamiento 5/8 pacientes continuaron sin evidencia de enfermedad mientras que en 3/8 su enfermedad progresó.

Si bien no se hallaron diferencias significativas entre la expresión de los antígenos estudiados y la evolución de los pacientes con estadio I se observó que todos los TP de los pacientes que presentaron progresión de su CCR tuvieron mayor expresión de *sialil Lewis x* (Tabla 41) que aquellos pacientes cuya enfermedad nunca progresó.

Veintisiete pacientes tenían estadio II ( $T_{3/4}N_0M_0$ ), 20 de ellos tenían cáncer de colon y 7 de recto. Dieciocho pacientes presentaron estadio  $pT_3$  y 9 estadio  $pT_4$ . La muestra ganglionar fue suficiente sólo en cinco casos. Veintiséis de veintisiete (96,2%) pacientes realizaron tratamiento quimioterápico adyuvante basada en 5-Fluorouracilo + Leucovorina, 19 de ellos tenían cáncer de colon y 7 de recto, mientras que sólo a dos pacientes se les agregó a este esquema un segundo citostático, a uno Oxaliplatino y al otro Metotrexato. Todos los pacientes con cáncer de recto recibieron radioterapia post-operatoria. Luego del tratamiento, 18/27 (66,6%) pacientes continuaron sin evidencia de enfermedad mientras que en 8/27 (29,6%) la enfermedad progresó (4 de ellos tenían cáncer de colon y 4 de recto).



**Tabla 41:** Relación entre la distribución porcentual del índice de expresión de los antígenos estudiados y la respuesta al tratamiento adyuvante según los estadios.

Estadios <sup>1</sup>	MUC1			MUC2			MUC5AC			Tn			sLe a			Le x			sLe x			Le y			CEA			β-cat		
	A*	D <sup>#</sup>	F <sup>§</sup>	A	D	F	A	D	F	A	D	F	A	D	F	A	D	F	A	D	F	A	D	F	A	D	F	A	D	F
<b>Estadio I</b>																														
NE <sup>1</sup>	0	80	20	20	60	20	100	0	0	60	40	0	20	60	20	0	100	0	40	40	20	20	60	20	0	80	20	0	80	20
PE <sup>2</sup>	0	67	33	33	67	0	100	0	0	67	33	0	0	100	0	67	33	0	0	100	0	0	67	33	0	100	0	0	100	0
<b>Estadio II</b>																														
NE	11	42	47	0	37	58	68	26	0	47	42	0	0	53	47	16	68	11	21	63	11	0	53	37	5	53	42	0	58	37
PE	0	43	57	0	100	14	100	14	0	43	71	0	14	71	29	57	57	0	43	29	43	0	86	29	0	114	0	0	86	0
<b>Estadio III</b>																														
NE	8	75	17	42	50	0	92	0	0	58	33	0	17	67	17	17	67	8	50	42	0	0	58	42	25	67	8	0	83	8
PE	6	56	38	44	38	6	94	6	0	50	44	6	13	56	38	19	69	6	19	50	31	13	75	19	0	69	38	0	75	25
<b>Estadio IV</b>																														
RC <sup>3</sup>	0	33	67	33	67	0	100	0	0	33	67	0	33	67	0	33	67	0	67	33	0	33	67	0	0	33	67	0	100	0
RP <sup>4</sup>	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	0
PE	0	38	38	46	46	8	69	31	0	77	8	0	0	46	46	31	38	15	31	23	31	15	54	23	15	69	15	8	69	15

\*A=Reactividad Ausente, #D=Débil, §F=Fuerte, Estadificación para el cáncer colorrectal establecido por la AJCC (American Joint Committee on Cancer) sexta edición (2002), <sup>1</sup>NE=No evidencia de Enfermedad, <sup>2</sup>PE= Progresión de Enfermedad, <sup>3</sup>RC=Respuesta Completa, <sup>4</sup>RP= Respuesta Parcial.

**Tabla 42:** Relación entre la expresión antigénica estudiada y la respuesta a tratamiento adyuvante según los estadios.

Estadios <sup>1</sup>	MUC1			MUC2			MUC5AC			Tn			sLe a			Le x			sLe x			Le y			CEA			β-cat			---
	No	Si	p <sup>%</sup>	No	Si	p	No	Si	p	No	Si	p	No	Si	p	No	Si	p	No	Si	p	No	Si	p	No	Si	p	No	Si	p	
<b>Estadio I</b>																															
NE <sup>1</sup>	NA <sup>5</sup>			NA			NA			NA			NA			NA			NA			NA			NA			NA			
PE <sup>2</sup>	0	5		1	4		5	0		3	2		1	4		0	5		2	3		1	4		5	0		0	5		
<b>Estadio II</b>																															
NE	NA			NA			NA			NS <sup>6</sup>			NA			NS			NS			NA			NA			NA			
PE	2	17		7	11		13	5		9	8		0	19		3	15		4	14		0	19		1	18		0	19		
<b>Estadio III</b>																															
NE	NA			NS			NA			NS			NS			NS			NS			NA			NA			NA			
PE	1	11		5	6		11	0		7	4		2	10		2	9		6	5		0	12		3	9		0	12		
<b>Estadio IV</b>																															
RC <sup>3</sup>	NA			NA			NA			NA			NA			NA			NA			NA			NA			NA			
RP <sup>4</sup>	0	3		1	2		3	0		1	2		1	2		1	2		2	1		1	2		0	3		0	3		
PE	0	1		0	0		0	0		1	0		0	0		0	1		1	0		1	0		0	1		0	0		
PE	0	10		6	7		9	4		10	1		0	12		4	7		4	7		2	10		2	11		1	11		

<sup>%</sup>p=Chi<sup>2</sup> p<0,05, <sup>1</sup>Estadificación para el cáncer colorrectal establecido por la AJCC (American Joint Committee on Cancer) sexta edición (2002), <sup>1</sup>NE=No evidencia de Enfermedad, <sup>2</sup>PE= Progresión de Enfermedad, <sup>3</sup>RC=Respuesta Completa, <sup>4</sup>RP= Respuesta Parcial, <sup>5</sup>NA= No Aplicable el test estadístico, <sup>6</sup>NS=No Significativo, <sup>7</sup>S=Significativo.

Independientemente del tratamiento instaurado en este estadio se encontró una correlación significativa entre la expresión de MUC2 y la ausencia de progresión de la enfermedad ( $p < 0,05$ ). Todos los pacientes que expresaron MUC1, *Lewis x* y CEA en sus TP su enfermedad progresó. Más de la mitad de los pacientes que tuvieron un índice de expresión fuerte de MUC1 en sus TP presentaron progresión de la enfermedad (Tabla 41). Los TP de los pacientes que no presentaron progresión de su enfermedad presentaron un predominio de expresión débil de *Lewis x* y *sialil Lewis x*.

Treinta y tres pacientes tenían estadio III ( $T_{1/2}N_1M_0$ ,  $T_{3/4}N_1M_0$  ó cualquier  $TN_2M_0$ ), 20 de ellos presentaron cáncer de colon y 13 de recto. Trece fueron clasificados en estadio  $pT_2$ , ocho estadio  $pT_3$  y doce estadio  $pT_4$ . Veinticuatro pacientes con estadio  $pN_1$  y nueve con estadio  $pN_2$  (metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales). La muestra ganglionar fue suficiente sólo en ocho casos. Treinta y uno de los treinta y tres pacientes realizaron tratamiento quimioterápico adyuvante (93,9%) basada en 5-Fluorouracilo + Leucovorina, 18 de ellos tenían cáncer de colon y 13 de recto; sólo a dos pacientes se les agregó a este esquema Oxaliplatino. Todos los cánceres de recto recibieron radioterapia post-operatoria. Luego del tratamiento, 13/33 (39,4%) pacientes continuaron sin evidencia de enfermedad mientras que en 18/33 (54,5%) su enfermedad progresó (12 de ellos tenían cáncer de colon y 6 de recto).

Todos los pacientes con este estadio con progresión de su enfermedad expresaron CEA en su TP. Asimismo, en estos tejidos se encontró una elevada expresión de MUC1, *sialil Lewis a/x* y *Lewis x/y* (Tabla 42). Asimismo, los TP de estos pacientes presentaron una mayor incidencia del índice de expresión fuerte de los antígenos MUC1, *sialil Lewis a/x*, CEA y  $\beta$ -catenina.

Veinte pacientes tenían estadio IV (cualquier  $T$  cualquier  $NM_1$ ), 16 de ellos presentaron cáncer de colon y 4 de recto. Siete TP de ellos correspondieron a estadio  $pT_2$ , uno estadio  $pT_3$  y doce estadio  $pT_4$ . EL estadio  $pN_0$  se halló presente en 6 pacientes, el estadio  $pN_1$  en 8 y el estadio  $pN_2$  en 6. El sitio metastásico (estadio  $M_1$ ) más frecuente fue el hígado. La muestra ganglionar fue suficiente sólo en siete casos. Todos realizaron tratamiento quimioterápico y sólo dos pacientes con cáncer de recto recibieron radioterapia. La quimioterapia estuvo basada en 5-Fluorouracilo + Leucovorina y sólo a dos pacientes se les

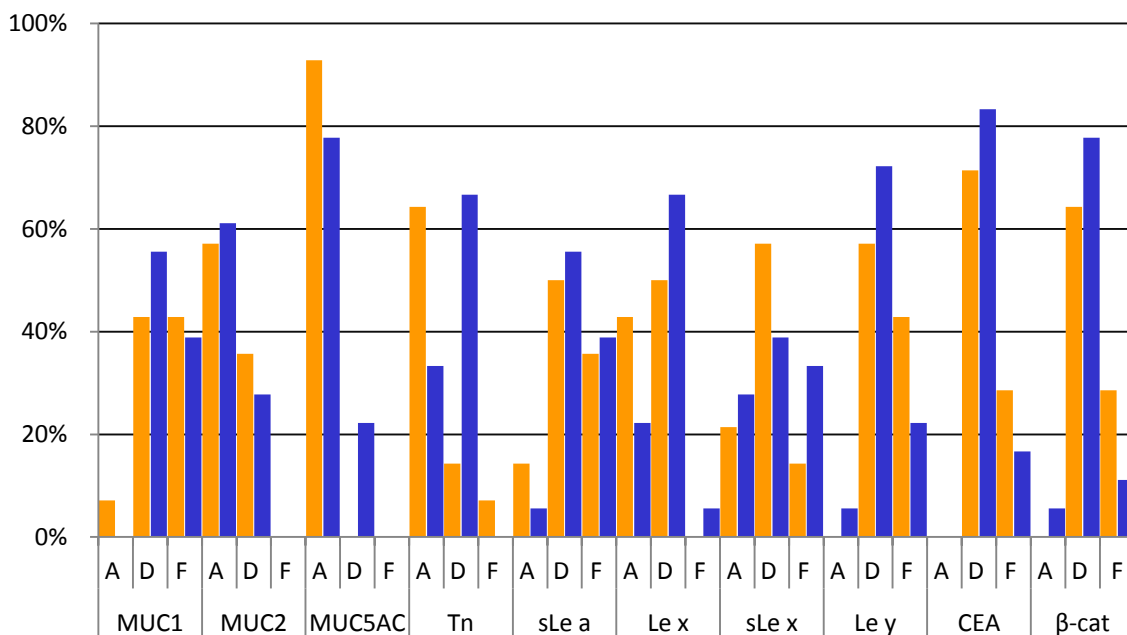
agregó a este esquema Oxaliplatino y a otros dos Metotrexato. Luego del tratamiento, 3/17 pacientes presentaron respuesta completa (todos con cáncer de colon), 1/17 respondió parcialmente y 13/17 progresaron a la enfermedad (10 tenían cáncer de colon y 3 de recto).

Los TP de los pacientes con progresión de su enfermedad presentaron una alta expresión de *Lewis y* y CEA. En estos pacientes predominó un índice de expresión débil de MUC2, *Lewis y* y CEA y. Todos estos TP expresaron MUC1 y *sialil Lewis a*; en la mitad de casos se halló un índice de expresión fuerte de ambos antígenos (Tabla 42).

### **2.3.18. Relación de los antígenos estudiados en los TP con el sitio de progresión metastática**

Con el propósito de evaluar la asociación entre la expresión antigénica en los TP y la localización de la metástasis del CCR, a los pacientes con estadíos tempranos (estadíos I, II y III) que presentaron progresión de su enfermedad y aquellos con estadío IV desde su diagnóstico, se los agrupó en: TP de pacientes con metástasis hepáticas únicamente y TP de pacientes cuya enfermedad progresó en “otros” diferentes al hígado (ej. pulmonar, pleural, peritoneal, ganglios linfáticos mediastínicos o supraclaviculares y local). Para su análisis se utilizó  $\chi^2$  y el test de Fisher,  $p < 0,05$ .

Ninguno de los TP de los pacientes con metástasis hepáticas únicamente expresaron MUC5AC (Figura 76); asimismo, en estos se halló significativamente menor expresión de *Tn* que en aquellos con metástasis en “otros” sitios diferentes al hepático ( $p < 0,05$ ).



**Figura 76:** Los TP de los pacientes con metástasis hepáticas únicamente (color naranja) presentaron un mayor porcentaje del índice de expresión fuerte (F) de los antígenos *Lewis y* (42,9%), CEA (28,6%) y *β-catenina* (28,6%) respecto de aquellos con metástasis en “otros” sitios (color azul) distintos al hígado (22,2%, 16,7% y 11,1%, respectivamente). En éstos últimos, MUC5AC se encontró menos ausente (A) que en aquellos con metástasis hepáticas (77,8% versus 92,9%); similar hallazgo se observó con *Tn*. *Sialil Lewis x* se encontró en los TP de los pacientes con metástasis hepáticas mayoritariamente (57,1%) con un índice de expresión débil (D) respecto a aquellos con “otros” sitios (38,9%).

### 2.3.19. Relación de los antígenos estudiados en los TP con la sobrevida global (SG) y el tiempo libre de progresión (TLP)

Para evaluar la asociación entre la expresión antigénica estudiada en los TP y su relación con la SG y el TLP (ambos como factores pronósticos y predictivos, respectivamente) se utilizó el método de Kaplan-Meier y ANOVA de una vía,  $p < 0,05$ .

A pesar no haberse hallado diferencias estadísticamente significativas respecto a estas variables se observó una clara tendencia (Tabla 43). Se encontró una menor SG y TLP en los pacientes que expresaron MUC1 en su TP respecto a los que fueron negativos para este antígeno (3,4 versus 4,7 años y 56,6 versus 37,7 meses, respectivamente). La misma tendencia se observó con la expresión de *sialil Lewis x*, cuando éste estaba presente la SG (Figura 77) y el TLP fue más reducido (3,2 versus 4,2 años y 46,3 versus 34 meses,

respectivamente); asimismo, los pacientes con un índice de expresión fuerte en sus TP tuvieron un TLP más reducido que aquellos con un índice de expresión débil (Figura 78).

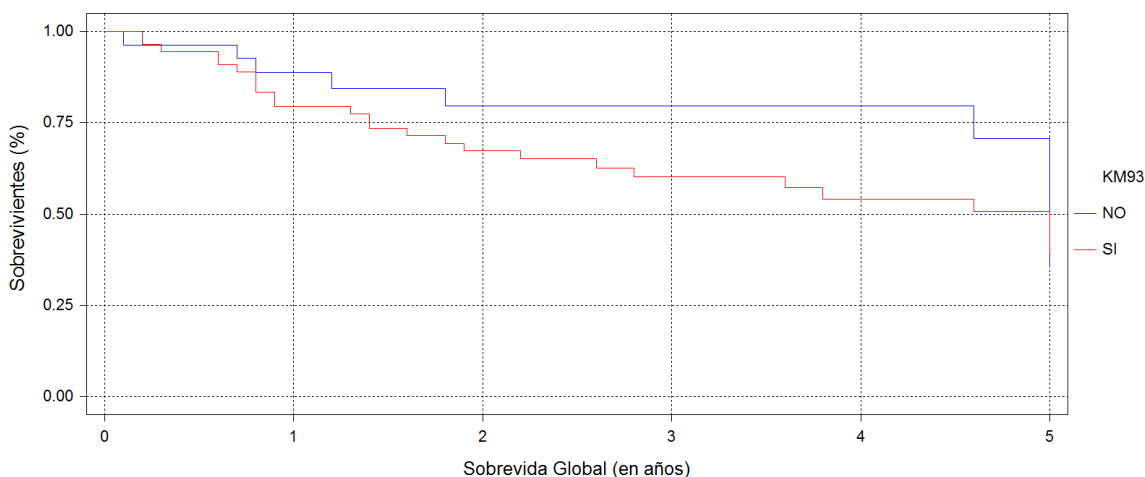
La presencia de expresión de *sialil Lewis a* en los TP se correlacionó con un TLP más corto (36,7 versus 47,2 meses) que cuando este antígeno estaba ausente.

Por otra parte, la expresión positiva de los antígenos MUC2 y MUC5AC en los TP se asoció con un mayor TLP (43,1 y 43,9 meses, respectivamente) que aquellos con ausencia de los mismos (31,9 meses y 36,6 meses, respectivamente).

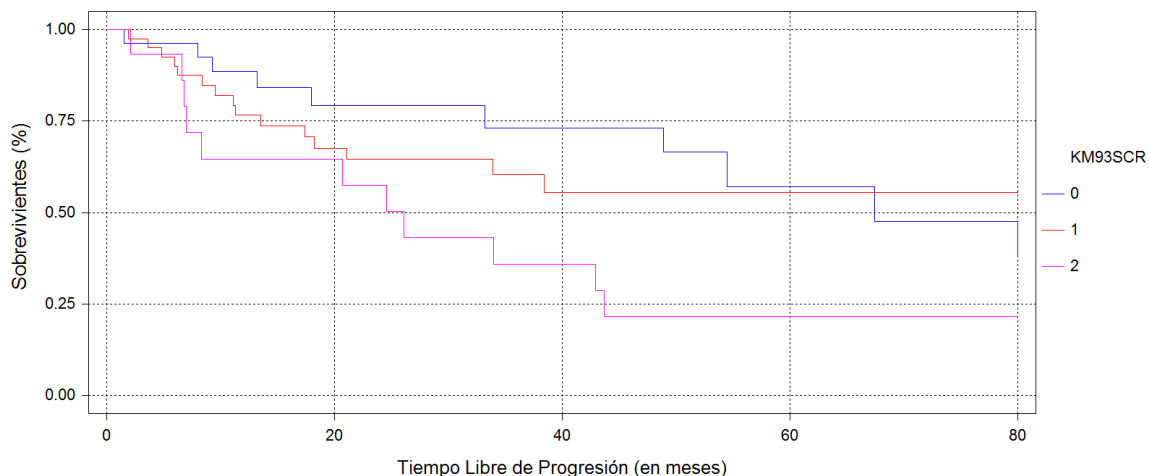
**Tabla 43:** Relación entre el índice de expresión de los antígenos estudiados en los TP, la sobrevida global (SG) y el tiempo libre de progresión (TLP).

		SG (±ES) (años)	p%	TLP (±ES) (meses)	p
<b>MUC1</b>	No (n=5)	4,7 (1,4)	NS^	56,6 (18,0)	NS
	Si (n=78)	3,4 (0,3)		37,7 (4,5)	
<b>MUC2</b>	No (n=39)	3,0 (0,5)	NS	31,9 (6,5)	NS
	Si (n=43)	3,8 (0,5)		43,1 (6,2)	
<b>MUC5AC</b>	No (n=72)	3,4 (0,4)	NS	36,3 (4,8)	NS
	Si (n=12)	3,8 (0,9)		43,9 (11,8)	
<b>Tn</b>	No (n=49)	3,4 (0,4)	NS	38,5 (5,8)	NS
	Si (n=34)	3,6 (0,5)		37,5 (7,0)	
<b>sLea</b>	No (n=8)	3,9 (1,1)	NS	47,2 (14,2)	NS
	Si (n=78)	3,4 (0,3)		36,7 (4,5)	
<b>Lex</b>	No (n=21)	2,3 (0,7)	NS	29,2 (8,8)	NS
	Si (n=61)	3,8 (0,4)		41,6 (5,2)	
<b>sLex</b>	No (n=28)	4,2 (0,6)	NS	46,3 (7,6)	NS
	Si (n=56)	3,2 (0,4)		34,0 (5,3)	
<b>Ley</b>	No (n=7)	3,2 (1,2)	NS	25,3 (14,9)	NS
	Si (n=78)	3,4 (0,3)		37,9 (4,4)	
<b>CEA</b>	No (n=6)	3,0 (1,3)	NS	36,7 (16,4)	NS
	Si (n=81)	3,5 (0,3)		37,4 (4,4)	
<b>β-cat</b>	No (n=1)	0,8	NA*	6,8	NA
	Si (n=79)	3,5 (0,3)		39,3 (4,6)	

% p=test utilizado: ANOVA de una vía, p <0,05; ^NS=No Significativo, \*NA=No aplicable el test estadístico.



**Figura 77:** La sobrevida global fue un año menor en los pacientes con TP con expresión positiva (Si) de *sialil Lewis x* (KM93) (4,2±0,6 años) que en aquellos con expresión negativa (No) (3,2±0,4 años). En la figura se muestra el análisis univariado de sobrevida acorde al método de Kaplan-Meier.



**Figura 78:** El tiempo libre de progresión fue más reducido ( $28,3 \pm 10,4$  meses) en los pacientes que presentaron tumores con un índice de expresión fuerte (2) de *sialil Lewis x* (KM93) que aquellos con un índice de expresión débil (1) ( $36 \pm 6,3$  meses) o cuyo antígeno se encontraba ausente (0) ( $46,3 \pm 7,6$  meses). La figura muestra el análisis univariado de sobrevida acorde al método de Kaplan-Meier.

### 2.3.20. Relación de los antígenos estudiados en los TP con la SG y el TLP según los estadios del CCR.

Con el propósito de evaluar la influencia de la expresión antigénica en los TP de los diferentes estadios tumorales y la sobrevida de los pacientes, independientemente de la localización tumoral primaria (cáncer de colon o de recto) y del esquema terapéutico utilizado, se empleó el método ANOVA de una vía,  $p < 0,05$ .

Los pacientes con estadio I que presentaron expresión de *Tn* en sus TP tuvieron una menor SG (4,4 versus 5,7 años) y TLP (54,3 versus 62,7 meses) que aquellos pacientes con ausencia de este antígeno (Tabla 44).

La expresión positiva de MUC5AC en los TP de los pacientes con estadio II se asoció a una SG (6,9 versus 4,6 años) y TLP (79,8 versus 53 meses) más prolongada (6,9 años y 79,8 meses, respectivamente) que aquellos con ausencia de este antígeno (4,6 años y 53 meses, respectivamente). En este estadio la presencia de *Tn* en los TP también se asoció con menor SG y TLP

**Tabla 44:** Relación entre el índice de expresión de los antígenos estudiados en los TP con la SG y el TLP, según los estadios del CCR.

		Estadio I (n=10)				Estadio II (n=27)				Estadio III (n=33)				Estadio IV (n=20)							
		n	SG (±ES)	p <sup>%</sup>	TLP (±ES)	p	n	SG (±ES)	p	TLP (±ES)	p	n	SG (±ES)	p	TLP (±ES)	p					
<b>MUC1</b>	A <sup>1</sup>	0	0,0	NA <sup>&amp;</sup>	0,0	NA	2	6,9	NA	84,3	NA	3	3,3 (1,5)	NS <sup>^</sup>	38,0 (15,0)	NS	0	0,0	NS	0,0	NS
	D <sup>2</sup>	7	3,2 (1,3)		38,3 (19,6)		11	4,4 (1,1)		54,2 (13,9)		19	2,9 (0,6)		26,3 (5,9)		8	1,6 (0,5)		14,1 (6,1)	
	F <sup>3</sup>	3	9,8 (2,1)		108,4 (30,0)		12	5,3 (1,0)		61,1 (13,3)		9	2,9 (0,8)		31,3 (8,6)		9	1,4 (0,4)		14,0 (5,7)	
<b>MUC2</b>	A	3	5,0 (3,0)	NA	58,4 (39,0)	NA	14	5,0 (1,0)	NS	54,9 (12,2)	NS	13	1,9 (0,6)	NA	17,9 (7,2)	NA	9	0,8 (0,4)	NA	7,6 (5,4)	NA
	D	6	6,3 (2,1)		59,3 (27,5)		12	5,1 (1,0)		62,0 (13,2)		13	3,1 (0,6)		35,7 (7,2)		9	1,9 (0,4)		18,3 (5,4)	
	F	1	5,1		62,5		0	0,0		0,0		1	10,2		54,5		1	0,7		8,0	
<b>MUC5AC</b>	A	9	5,5 (1,6)	NA	62,9 (20,6)	NA	21	4,6 (0,7)	NS	53,0 (9,7)	NS	27	2,7 (0,5)	NA	26,2 (5,1)	NA	15	1,6 (0,3)	NS	15,3 (4,1)	NS
	D	1	2,3		27,6		5	6,9 (1,6)		79,8 (20,0)		2	3,6		44,0		4	0,3 (0,6)		3,0 (7,9)	
	F	0	0,0		0,0		0	0,0		0,0		0	0,0		0,0		0	0,0		0,0	
<b>Tn</b>	A	6	5,7 (2,0)	NS	62,7 (25,7)	NS	12	6,1 (1,0)	NS	73,6 (12,8)	NS	17	2,7 (0,6)	NA	27,7 (6,4)	NA	14	1,2 (0,3)	NS	11,3 (4,4)	NS
	D	4	4,4 (2,4)		54,3 (31,5)		13	4,2 (1,0)		45,4 (12,3)		12	3,2 (0,7)		29,0 (7,7)		4	2,2 (0,7)		20,7 (8,2)	
	F	0	0,0		0,0		0	0,0		0,0		1	3,8		38,4		0	0,0		0,0	
<b>sLe a</b>	A	1	17,4	NA	212,0	NA	1	1,6	NA	18,2	NA	4	1,4 (1,3)	NS	16,0 (13,0)	NS	2	3,4	NA	41,6	NA
	D	6	3,7 (0,9)		38,2 (11,7)		16	3,9 (0,8)		44,2 (10,3)		18	3,0 (0,6)		29,0 (6,1)		8	1,3 (0,4)		13,7 (4,6)	
	F	3	4,2 (1,2)		50,7 (16,5)		10	7,0 (1,0)		82,2 (13,1)		9	3,1 (0,8)		30,9 (8,7)		8	1,0 (0,4)		5,7 (4,6)	
<b>Le x</b>	A	2	2,7	NA	16,1	NA	7	4,3 (1,4)	NA	46,5 (17,6)	NA	5	3,3 (1,2)	NA	36,3 (12,0)	NA	7	1,1 (0,5)	NA	10,7 (6,2)	NA
	D	8	5,8 (1,6)		70,2 (20,6)		17	5,3 (0,8)		62,4 (11,3)		21	2,9 (0,5)		28,6 (5,8)		9	1,9 (0,4)		18,0 (5,5)	
	F	0	0,0		0,0		2	4,9		59,8		2	2,7		15,1		2	0,2		2,0	
<b>sLe x</b>	A	2	10,8	NA	131,8	NA	7	6,2 (1,4)	NS	74,8 (17,3)	NS	9	4,3 (0,8)	NS	40,5 (8,4)	NS	10	1,3 (0,4)	NS	14,4 (5,3)	NS
	D	7	3,6 (1,5)		38,2 (19,3)		14	4,4 (1,0)		53,0 (12,2)		16	2,3 (0,6)		24,4 (6,3)		4	1,8 (0,7)		18,7 (8,4)	
	F	1	5,1		62,5		5	5,0 (1,6)		48,2 (20,5)		5	2,2 (1,1)		19,9 (11,3)		4	1,3 (0,7)		5,4 (8,4)	
<b>Le y</b>	A	1	4,2	NA	51,7	NA	0	0,0	NS	0,0	NS	2	6,9	NA	43,3	NA	4	1,1 (0,7)	NS	9,8 (8,1)	NS
	D	7	5,8 (1,9)		69,8 (24,3)		15	5,4 (0,9)		62,3 (11,6)		21	2,8 (0,5)		28,5 (5,6)		12	1,4 (0,4)		16,4 (4,7)	
	F	2	3,6		26,7		9	4,4 (1,2)		50,3 (15,0)		9	1,9 (0,7)		24,3 (8,6)		3	1,4 (0,8)		4,0 (9,4)	
<b>CEA</b>	A	0	0,0	NA	0,0	NA	0	0,0	NS	0,0	NS	4	4,3 (1,2)	NS	53,1 (12,1)	NS	2	0,4	NA	3,9	NA
	D	8	4,0 (1,5)		44,2 (18,8)		18	5,3 (0,8)		60,3 (10,6)		19	2,3 (0,5)		22,1 (5,5)		13	1,1 (0,3)		12,4 (4,5)	
	F	2	9,8		119,8		8	4,6 (1,2)		57,0 (15,9)		8	3,4 (0,8)		29,5 (8,6)		5	2,1 (0,6)		16,3 (7,3)	
<b>β-cat</b>	A	0	0,0	NA	0,0	NA	0	0,0	NS	0,0	NS	0	0,0	NS	0,0	NS	1	0,8	NA	6,8	NA
	D	8	4,0 (1,5)		44,2 (18,8)		16	5,7 (0,9)		64,1 (11,5)		24	3,2 (0,5)		32,6 (5,1)		14	1,4 (0,4)		15,2 (4,5)	
	F	2	9,8		119,8 (37,7)		7	5,1 (1,4)		62,4 (17,4)		5	1,4 (1,1)		7,9 (11,2)		3	1,4 (0,8)		4,9 (9,9)	

<sup>%</sup>p=test utilizado: ANOVA de una vía, p <0,05; \*S=Significativo, ^NS=No Significativo, &NA=No Aplicable el test estadístico, <sup>1</sup>A=Reactividad ausente, <sup>2</sup>D=Índice de expresión antigénica débil, <sup>3</sup>F= Índice de expresión antigénica fuerte.

(4,2 años y 45,4 meses, respectivamente) que aquellos con ausencia del antígeno (6,1 años y 73,6 meses, respectivamente). Asimismo, la expresión de *Lewis* y en los TP se asoció con menor SG y TLP que los pacientes con ausencia de dicho antígeno (4,4 versus 5,4 años y 50,3 versus 62,3 meses, respectivamente). La ausencia de *sialil Lewis x* en los TP se asoció con mayor TLP que cuando el antígeno tenía un índice de expresión débil o fuerte (74,8 versus 53 versus 48,2 meses, respectivamente).

La presencia de MUC2 en los TP de los pacientes con **estadio III** se asoció con una mayor SG y TLP (3,1 años y 35,7 meses, respectivamente) que aquellos con ausencia de esta mucina (1,9 años y 17,9 meses, respectivamente). Por otra parte, los pacientes con ausencia de los antígenos *sialil Lewis x*, *Lewis y* y CEA se asociaron con una mayor SG y TLP que aquellos pacientes con un índice de expresión débil o fuerte de estos antígenos (Tabla 44). Los pacientes con un índice de expresión fuerte de *β-catenina* en sus TP presentaron una SG y TLP más reducido que aquellos pacientes con un índice de expresión débil del antígeno.

Finalmente, los pacientes diagnosticados con un **estadio IV** desde el inicio de su enfermedad tuvieron una SG y un TLP más prolongada cuando en sus TP se expresaron MUC2 (1,9 versus y 18,3 meses, respectivamente) que aquellos con ausencia de esta mucina (0,8 años y 7,6 meses, respectivamente). Contrariamente, el índice de expresión fuerte de *sialil Lewis x/a*, *Lewis y* y *β-catenina* en los TP de estos pacientes se asoció con un menor TLP que el de aquellos con un índice de expresión débil de estos antígenos (Tabla 44).

#### **2.4. Relación entre la expresión antigénica en los ganglios linfáticos metastáticos (GLM) y los datos clinicopatológicos de los pacientes con CCR.**

Con el objetivo de analizar la relación entre la expresión de los antígenos estudiados en los GLM y los datos clinicopatológicos de los pacientes se realizó una prueba de independencia  $\chi^2$ , test de proporcionalidad de Fisher y ANOVA de una vía,  $p < 0,05$ .



### 2.4.1. Relación entre la expresión de los antígenos estudiados en los GLM con la edad del CCR

El promedio de edad de los pacientes con GLM al momento del diagnóstico fue 60,1 años.

Los pacientes con expresión positiva de MUC2 en sus TP fueron diagnosticados, en promedio, cuatro años antes que aquellos con ausencia de dicha mucina.

El índice de expresión fuerte de *Lewis x* en los GLM se asoció con un diagnóstico precoz del CCR. Estos tumores fueron hallados, en promedio, 11 años antes respecto de aquellos con índice de expresión débil de *Lewis x* (Tabla 45).

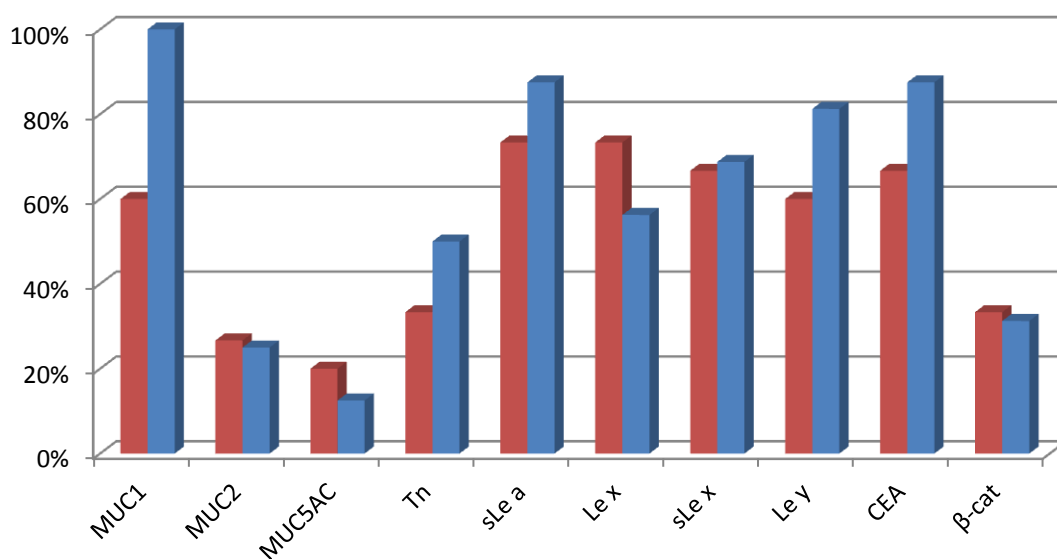
### 2.4.2. Relación entre la expresión de los antígenos estudiados en los GLM con el género

Si bien no se halló ninguna asociación entre el género y la expresión antigénica en los TP (pág. 163), en los pacientes con GLM se observó estadísticamente ( $p < 0,01$ ) una mayor proporción de pacientes masculinos con expresión positiva de MUC1 en sus ganglios linfáticos metastásicos que en las pacientes femeninas (Figura 79).

**Tabla 45:** Promedio de edad al momento del diagnóstico de CCR según el índice de expresión antigénica.

		n	Edad (±ES)	p <sup>%</sup>
<b>MUC1</b>	Ausente	4	57,2 (6,3)	NS*
	Débil	11	59,0 (3,8)	
	Fuerte	14	61,5 (3,4)	
<b>MUC2</b>	Ausente	18	60,0 (2,8)	NS
	Débil	8	56,0 (4,2)	
	Fuerte	0	0,0	
<b>MUC5AC</b>	Ausente	21	57,1 (2,7)	NS
	Débil	4	61,7 (6,2)	
	Fuerte	1	61,0	
<b>Tn</b>	Ausente	16	57,7 (3,0)	NS
	Débil	13	60,3 (3,3)	
	Fuerte	0	0,0	
<b>sLe a</b>	Ausente	4	57,2 (6,3)	NS
	Débil	11	59,0 (3,8)	
	Fuerte	14	61,5 (3,4)	
<b>Le x</b>	Ausente	9	61,3 (3,9)	NS
	Débil	17	59,5 (2,8)	
	Fuerte	3	48,3 (6,7)	
<b>sLe x</b>	Ausente	8	58,9 (4,2)	NS
	Débil	12	61,4 (3,4)	
	Fuerte	9	56,0 (4,0)	
<b>Le y</b>	Ausente	7	59,7 (4,6)	NS
	Débil	18	57,8 (2,9)	
	Fuerte	4	64,7 (6,1)	
<b>CEA</b>	Ausente	6	65,6 (4,9)	NS
	Débil	21	57,0 (2,6)	
	Fuerte	3	65,0 (6,9)	
<b>β-cat</b>	Ausente	2	49,0	NS
	Débil	6	64,8 (6,9)	
	Fuerte	4	59,7 (8,5)	

<sup>%</sup>p=test utilizado: ANOVA de una vía,  $p < 0,05$ ;  
\*NS=No Significativo.



**Figura 79:** MUC1 se encontró expresado en todos los GLM de los pacientes de género masculino (color azul) y sólo en 9/15 (60%) femeninos (color rojo). La figura muestra la distribución porcentual de la expresión antigénica en los GLM según el género.

#### 2.4.3. Relación de los antígenos estudiados en los GLM con los antecedentes de cáncer en la familia

La presencia de cáncer en la familia diferente al CCR no fue un determinante para la expresión antigénica en los GLM. Por otra parte, todos aquellos con antecedentes familiares de CCR tuvieron expresión positiva de MUC1 en sus GLM (Tabla 46). Estos últimos, presentaron además un índice de expresión fuerte de *sialil Lewis a* en el 75% de los casos.

#### 2.4.4. Relación de los antígenos estudiados en los GLM con las comorbilidades de los pacientes con CCR

En los GLM de los pacientes con antecedente de hipertensión arterial se observó un predominio del índice de expresión débil de *sialil Lewis x* (Tabla 46).

Por otra parte, *sialil Lewis x* fue el único antígeno expresado en los GLM de los pacientes con antecedente DBT.

**Tabla 46:** Relación entre el índice de expresión de los antígenos estudiados en los GLM y los antecedentes clinicopatológicos de los pacientes con CCR.

	MUC 1			MUC2			MUC5AC			Tn			sLe a			Le x			sLe x			Le y			CEA			β-cat					
	A*	D <sup>#</sup>	F <sup>%</sup> p <sup>%</sup>	A	D	Fp	A	D	Fp	A	D	Fp	A	D	Fp	A	D	Fp	A	D	Fp	A	D	Fp	A	D	Fp	A	D	Fp			
<b>A.Ca.Fiar<sup>1</sup></b>	NS <sup>^</sup>			NS			NS			NS			NS			NS			NS			NS			NS			NS			NA <sup>!</sup>		
No	2	4	4	6	3	0	8	2	0	4	6	0	2	4	5	3	6	1	1	5	4	3	5	2	3	6	1	1	2	1			
Si	1	14	3	12	5	0	13	2	1	12	7	0	2	7	9	6	11	2	7	7	5	4	13	2	3	15	2	1	4	3			
<b>A.CCR.Fliar<sup>2</sup></b>	NA			NA			NS			NS			NS			NS			NS			NS			NS			NA					
No	3	13	7	15	7	0	17	3	0	13	10	0	3	10	11	9	12	2	5	10	8	5	15	3	3	18	3	2	5	4			
Si	0	5	0	3	1	0	4	1	1	3	3	0	1	1	3	0	5	1	3	2	1	2	3	1	3	3	0	0	1	0			
<b>HTA<sup>3</sup></b>	NS			NS			NA			NS			NS			NS			NS			NS			NS			NA					
No	2	15	5	16	6	0	16	3	1	12	11	0	3	8	11	6	14	3	6	9	8	4	16	3	4	16	3	2	5	4			
Si	1	3	2	2	2	0	5	1	0	4	2	0	1	2	3	3	3	0	2	3	1	3	2	1	2	4	0	0	0	0			
<b>DBT<sup>4</sup></b>	NA			NA			NA			NS			NA			NA			NA			NA			NA			NA					
No	2	16	7	16	7	0	20	3	1	13	13	0	3	9	13	8	15	3	8	10	8	6	18	3	4	19	3	1	5	4			
Si	1	2	0	2	1	0	1	1	0	3	0	0	1	1	1	1	2	0	0	2	1	1	0	1	12	0	1	0	0				
<b>Cirugías Previas</b>	NA			NA			NA			NS			NA			NS			NS			NS			NA			NA					
Apend.	1	1	0	2	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	2	1	1	0	1	0	1	0	2	0	0	0	2	0	0	1			
Colecis.	0	3	1	3	1	0	3	0	0	3	1	0	0	4	1	2	2	0	0	2	2	1	2	2	0	4	0	0	1	0			
Ninguna	2	14	6	13	7	0	17	4	1	12	11	0	4	7	11	6	14	3	7	10	6	6	14	2	6	17	1	2	5	3			
<b>Consumo tabaco</b>	NS			NS			NS			NS			NS			NS			NS			NS			NS			NA					
No	3	7	2	8	3	0	8	2	0	8	4	0	3	4	5	2	9	1	4	5	3	3	7	2	3	7	2	2	3	1			
Si	0	11	4	9	5	0	12	2	1	8	8	0	1	5	9	7	7	2	4	7	5	4	10	2	3	12	1	0	2	3			
<b>Consumo alcohol</b>	NS			NS			NA			NS			NS			NS			NS			NS			NS			NS					
No	3	10	5	12	5	0	13	4	1	10	9	0	3	7	8	4	12	3	4	9	6	5	12	2	5	12	2	2	3	2			
Si	0	7	2	5	3	0	7	0	0	5	4	0	1	3	5	4	5	0	4	3	2	2	5	2	1	8	0	0	2	2			
<b>IMC<sup>5</sup></b>	NS			NS			NA			NS			NS			NS			NS			NS			NS			NA					
≤24,9	1	6	2	5	4	0	7	1	0	5	5	0	2	4	5	1	7	2	4	3	3	2	8	1	1	9	1	1	3	3			
25-29,9	1	6	2	5	2	0	6	2	0	5	4	0	0	2	6	3	6	0	3	3	3	3	3	3	2	6	1	0	0	1			
≥30	0	4	3	5	2	0	5	1	1	3	4	0	1	4	2	3	3	1	0	5	2	2	5	0	2	5	0	0	1	0			
<b>PP<sup>6</sup></b>	NS			NS			NS			NS			NS			NA			NS			NS			NS			NA					
<10 kg	2	7	2	5	4	0	7	2	0	7	5	0	0	4	7	1	9	2	3	5	4	3	7	2	2	9	2	1	1	3			
≥10 kg	0	7	4	8	3	0	8	2	1	4	7	0	1	5	6	6	4	1	2	5	4	4	6	2	2	9	0	0	3	0			

\*A=Reactividad Ausente, <sup>#</sup>D=Índice de expresión Débil, <sup>%</sup>F=Índice de expresión Fuerte, <sup>%</sup>p= test Chi<sup>2</sup>, p <0,05, <sup>^</sup>NS=No Significativo, <sup>!</sup>NA=No Aplicable el test estadístico, <sup>1</sup>A.Ca.Fliar=Antecedente de Cáncer Familiar (diferente a CCR), <sup>2</sup>A.CCR. Fliar=Antecedente de CCR Familiar, <sup>3</sup>HTA=Hipertensión Arterial, <sup>4</sup>DBT=Diabetes Mellitus, <sup>5</sup>IMC=Índice de Masa Corporal, <sup>6</sup>PP=Pérdida de Peso en los últimos 2 meses, Apend.=Apendicectomía, Colecis.=Colecistectomía.

#### **2.4.5. Relación de los antígenos estudiados en los GLM con el tipo de cirugía previa**

De forma similar a lo hallado en los TP (pág. 166), todos los pacientes a los cuales se les realizó colecistectomía antes del diagnóstico de CCR tuvieron expresión de MUC1, *sialil Lewis x* y CEA en sus GLM (Tabla 46).

#### **2.4.6. Relación de los antígenos estudiados en los GLM con el consumo de tabaco y alcohol**

Todos los GLM de pacientes con antecedentes de consumo de tabaco expresaron MUC1 y  $\beta$ -*catenina* (Tabla 46). Por otra parte, todos aquellos con antecedentes de consumo de alcohol también expresaron MUC1 en sus GLM.

#### **2.4.7. Relación de los antígenos estudiados en los GLM con el Índice de Masa Corporal (IMC) al momento del diagnóstico de CCR**

La expresión de *Lewis x* fue más elevada en los GLM de los pacientes con peso normal al momento del diagnóstico que en aquellos obesos o con sobrepeso. En estos últimos se halló expresión de *sialil Lewis a/x* y MUC1 en todos los GLM (Tabla 46).

#### **2.4.8. Relación de los antígenos estudiados en los GLM con otros factores de riesgo**

La pérdida de peso de más de 10 kg en los últimos dos meses al momento del diagnóstico de CCR se asoció con mayor expresión de MUC1 en sus GLM (Tabla 46) que aquellos con una pérdida menor.

#### **2.4.9. Relación de los antígenos estudiados en los GLM con las manifestaciones clínicas al momento del diagnóstico**

Excepto los pacientes en los cuales su enfermedad se manifestó por primera vez con sangrado gastrointestinal (2/11), todos los demás pacientes expresaron MUC1 en sus GLM independientemente de la forma de presentación de la enfermedad (Tabla 47).

**Tabla 47:** Relación entre el índice de expresión de los antígenos estudiados en los GLM y la forma de presentación del CCR.

Presentación del CCR	MUC 1				MUC2				MUC5AC				Tn				sLe a				Le x				sLe x				Le y				CEA				β-cat			
	A <sup>&amp;</sup>	D <sup>*</sup>	F <sup>#</sup>	p <sup>%</sup>	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p				
	NA <sup>1</sup>				NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA							
Dolor abd. <sup>0</sup>	0	4	3		5	2	0		7	1	0		5	3	0		3	4	2		3	4	1		2	3	3		4	4	1		3	4	1		0	2	1	
CRE <sup>1</sup>	0	1	1		2	0	0		2	0	0		2	0	0		0	0	2		2	0	0		2	0	0		1	1	0		0	2	0		0	1	0	
Obstr./perf. <sup>2</sup>	0	2	0		1	1	0		0	2	0		1	1	0		0	0	1		1	1	0		1	1	0		1	0	1		0	2	0		0	0	0	
ESTGI <sup>3</sup>	2	6	3		7	3	0		7	0	1		3	8	0		0	5	7		2	8	1		1	7	3		1	9	1		1	10	1		0	3	2	
Anemia	0	1	0		0	0	0		1	0	0		0	1	0		0	0	1		0	1	0		1	0	0		0	0	1		1	0	0		0	0	0	

<sup>&</sup>A=Reactividad Ausente, <sup>\*</sup>D =Índice de expresión Débil, <sup>#</sup>F=Índice de expresión Fuerte, <sup>%</sup>p= test Chi<sup>2</sup>, p <0,05, <sup>1</sup>NA=No Aplicable el test estadístico, <sup>0</sup>Dolor abd.=Dolor abdominal, <sup>1</sup>CRE=Cambio del Ritmo Evacuatorio, <sup>2</sup>Obstr./perf.=Obstrucción/ perforación <sup>3</sup>ESTGI=Eliminación de Sangre por el Tracto Gastrointestinal.

**Tabla 48:** Relación entre el índice de expresión de los antígenos estudiados en los GLM y la localización del TP.

Sitio Primario	MUC 1				MUC2				MUC5AC				Tn				sLe a				Le x				sLe x				Le y				CEA				β-cat			
	A <sup>&amp;</sup>	D <sup>*</sup>	F <sup>#</sup>	p <sup>%</sup>	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p				
	NS <sup>^</sup>				NA <sup>1</sup>				NA				NS				NS				NS				NS				NA				NA				NS			
Colon	2	14	4		10	8	0		16	4	1		12	9	0		4	6	10		7	12	2		6	9	6		7	11	3		6	14	1		1	3	2	
Recto (n=9)	1	4	3		8	0	0		5	0	0		4	4	0		0	5	4		2	5	1		2	3	3		0	7	1		0	7	2		1	3	2	
Localización colónica	NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA							
C. Ascen	1	9	0		4	4	0		6	3	1		6	4	0		2	2	5		5	5	0		2	6	2		2	6	2		4	6	0		0	1	0	
C. Transv	1	1	0		1	1	0		1	1	0		2	0	0		0	1	0		0	2	0		1	0	1		1	0	0		1	1	0		1	0	0	
C. Descen	0	1	0		0	1	0		1	0	0		1	0	0		1	0	0		0	1	0		1	0	0		0	1	0		0	1	0		0	0	1	
C. Sigm	0	3	3		4	2	0		7	0	0		3	4	0		1	3	4		2	4	1		2	2	3		4	3	1		1	5	1		0	2	1	

<sup>&</sup>A=Reactividad Ausente, <sup>\*</sup>D =Índice de expresión Débil, <sup>#</sup>F=Índice de expresión Fuerte, <sup>%</sup>p= test Chi<sup>2</sup>, p <0,05, <sup>^</sup>NS=No Significativo, <sup>1</sup>NA=No Aplicable el test estadístico.

**Tabla 49:** Relación entre el índice de expresión de los antígenos estudiados en los ganglios linfáticos metastáticos y el tamaño del tumor primario.

Tamaño del TP	MUC 1				MUC2				MUC5AC				aTn				sLe a				Le x				sLe x				Le y				CEA				β-cat			
	A <sup>&amp;</sup>	D <sup>*</sup>	F <sup>#</sup>	p <sup>%</sup>	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p				
	NS <sup>^</sup>				NS				NA <sup>1</sup>				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NA			
<5cm	2	7	5		9	3	0		14	1	0		9	6	0		2	5	8		4	9	2		6	5	4		4	9	2		2	12	1		1	4	1	
≥5cm	1	8	2		6	5	0		6	2	0		6	6	0		2	5	3		3	7	1		2	5	4		3	7	1		3	7	1		1	0	3	

<sup>&</sup>A=Reactividad Ausente, <sup>\*</sup>D =Índice de expresión Débil, <sup>#</sup>F=Índice de expresión Fuerte, <sup>%</sup>p= test Chi<sup>2</sup>, p <0,05, <sup>^</sup>NS=No Significativo, <sup>1</sup>NA=No Aplicable el test estadístico.

Todos los GLM de los pacientes que se diagnosticaron al momento de una obstrucción/perforación intestinal expresaron CEA.

#### **2.4.10. Relación de los antígenos estudiados en los GLM con la localización del cáncer primario**

*Sialil Lewis a*, *Lewis y* y CEA se hallaron presentes en todos los GLM de los pacientes con cáncer de recto mientras que en ninguno de ellos se observó expresión positiva de MUC2 ni de MUC5AC (Tabla 48).

Ningún GLM proveniente de paciente con cáncer de colon ascendente o sigmoideo expresó MUC5AC; por otra parte, los dos únicos pacientes con cáncer de colon transversal expresaron *Lewis x* en sus GLM.

#### **2.4.11. Relación de los antígenos estudiados en los GLM y el tamaño del tumor primario**

El tamaño del tumor primario no influyó en la expresión antigénica evaluada en los GLM correspondientes (Tabla 49).

#### **2.4.12. Relación de los antígenos estudiados en los GLM con el estadio tumoral**

Todos los GLM de los pacientes con estadio pT<sub>3</sub> expresaron MUC1 y *sialil Lewis x/a* (Tabla 48). Por otra parte, los GLM de pacientes con estadio pT<sub>4</sub> los antígenos MUC2 y MUC5AC fueron que menos se expresaron. Los demás antígenos no mostraron ninguna tendencia definida respecto a su expresión en los GLM y el estadio pT. *Sialil Lewis a* se expresó en todos los GLM de los pacientes con estadio pN<sub>1</sub> mientras que ninguno de ellos presentó un índice de expresión fuerte de CEA. Por otra parte, *sialil Lewis x* presentó un menor índice de expresión fuerte en los GLM de los pacientes con estadio pN<sub>2</sub> que en aquellos con estadio pN<sub>1</sub>. La mucina MUC2 se halló en menor proporción en los GLM de los pacientes con metástasis a distancia (estadio M<sub>1</sub>) que aquellos con estadio M<sub>0</sub> (12,5% versus 38,8%); contrariamente, en los pacientes con estadio M<sub>1</sub> la expresión de *Tn* en los GLM se halló aumentada.

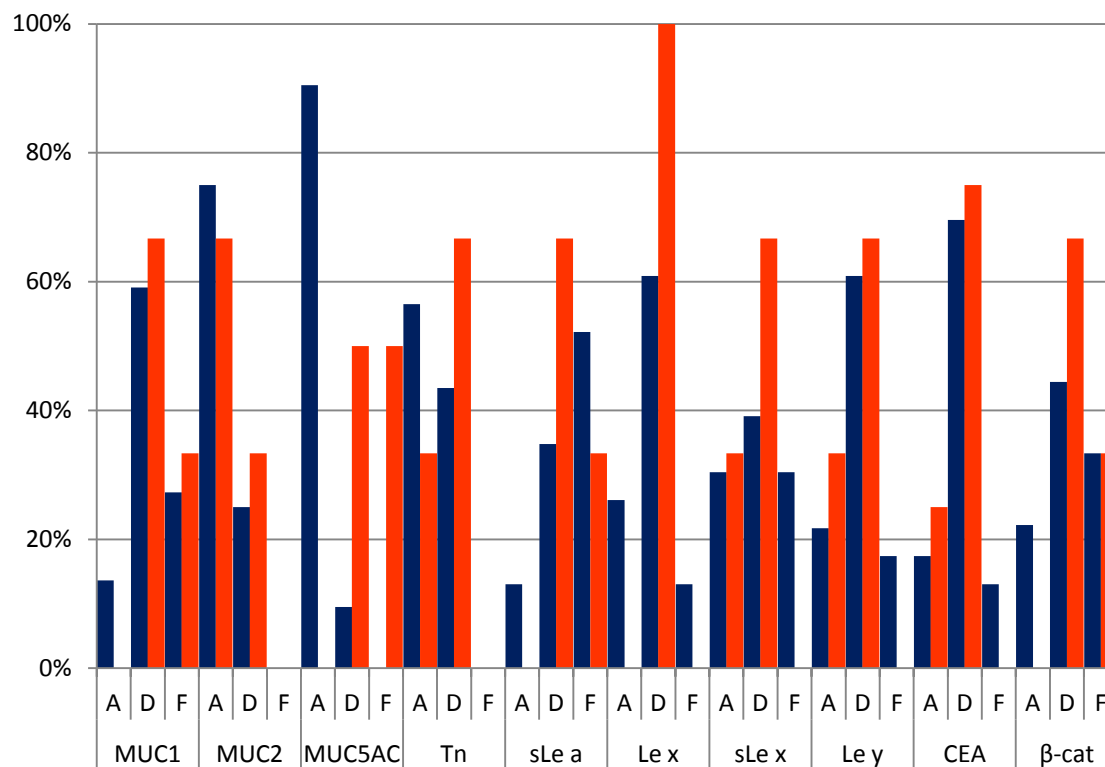
**Tabla 50:** Relación entre el índice de expresión de los antígenos estudiados en los GLM y el estadio tumoral (TNM).

TNM <sup>4</sup>	MUC 1				MUC2				MUC5AC				Tn				sLe a				Le x				sLe x				Le y				CEA				β-cat															
	A <sup>&amp;</sup>	D <sup>*</sup>	F <sup>#</sup>	p <sup>%</sup>	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p																
<b>Estadio pT<sup>1</sup></b>	NS <sup>^</sup>				NS				NA				NS				NA <sup>1</sup>				NA				NS				NS				NA				NA															
T <sub>1/2</sub>	1	6	1		6	1	0		6	0	1		5	3	0		0	3	6		2	5	1		1	3	4		0	7	1		1	7	1		1	3	0		1	3	0									
T <sub>3</sub>	0	3	2		2	3	0		5	1	0		3	3	0		0	4	1		1	4	1		0	4	2		3	3	0		1	5	0		0	1	1		0	1	1									
T <sub>4</sub>	2	9	4		10	4	0		10	3	0		8	7	0		4	4	7		6	8	1		7	5	3		4	8	3		4	9	2		1	2	3		1	2	3									
<b>Estadio pN<sup>2</sup></b>	NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NS															
N <sub>1</sub>	2	8	4		6	6	0		12	2	0		8	7	0		0	7	7		4	10	1		4	5	6		6	7	1		3	13	0		1	2	2		1	2	2		1	2	2					
N <sub>2</sub>	1	9	3		11	2	0		9	2	0		8	5	0		4	4	6		5	6	2		4	6	3		1	10	3		2	8	3		1	3	2		1	3	2		1	3	2					
<b>Estadio M<sup>3</sup></b>	NA				NA				NS				NS				NS				NS				NS				NS				S				NA															
M <sub>0</sub>	1	12	6		11	7	0		16	2	0		13	7	0		2	9	9		6	12	2		6	7	7		6	13	2		2	18	1		1	5	3		1	5	3		1	5	3		1	5	3	
M <sub>1</sub>	2	6	1		7	1	0		5	2	1		3	6	0		2	2	5		3	5	1		2	5	2		1	5	2		4	3	2		1	1	1		1	1	1		1	1	1		1	1	1	

<sup>&</sup>A=Reactividad Ausente, <sup>\*</sup>D =Débil, <sup>#</sup>F=Fuerte, <sup>%</sup>p= test Chi<sup>2</sup>, p <0,05, <sup>^</sup>NS=No Significativo, <sup>1</sup>NA=No Aplicable el test estadístico, <sup>1</sup>T= tumor primario, <sup>2</sup>N=metástasis ganglionar, <sup>3</sup>M=metástasis a distancia, <sup>4</sup>TNM=sistema de clasificación TNM para cáncer colorrectal establecido por la AJCC (American Joint Committee on Cancer), sexta edición (2002).

### 2.4.13. Relación de los antígenos estudiados en los GLM con el tipo histológico tumoral

MUC1 se halló presente en todos los ganglios con metástasis de adenocarcinomas mucinosos (AM) y en aquellos con metástasis de adenocarcinomas con componente mucinoso (ACM), dicha reactividad fue predominantemente con un índice de expresión débil (Figura 809 A y B).



**Figura 80 A:** En la figura se muestra el porcentaje de distribución de la expresión antigénica en los GLM según el tipo histológico de la metástasis. Mientras que la mucina MUC5AC se halló ausente en el 90,5% de las metástasis de AP (color azul); todas aquellas de ACM (color naranja) la expresaron, la mitad lo hicieron con un índice de expresión fuerte. Tn se encontró expresado más débilmente en los AP que en aquellos con componente mucinoso (66,7% versus 43,5%). Sólo los antígenos *sialil Lewis x*, *Lewis y* y *CEA* se encontraron expresados fuertemente en los GLM con metástasis de AP mientras que dicha expresión no se encontró en ninguno de los ACM, predominando en éstos un índice de expresión débil. Asimismo, el carbohidrato *sialil Lewis a* se halló expresado débilmente en el 52,2% de las metástasis ganglionares de AP mientras que en aquellas producidas por AM fue del 33,3%. En estas últimas, todas expresaron *Lewis x* débilmente. Por otro lado, *β-catenina* presentó un 22,3% más de índice de expresión débil en los ACM (66,7%) que en aquellos con AP (44,4%).

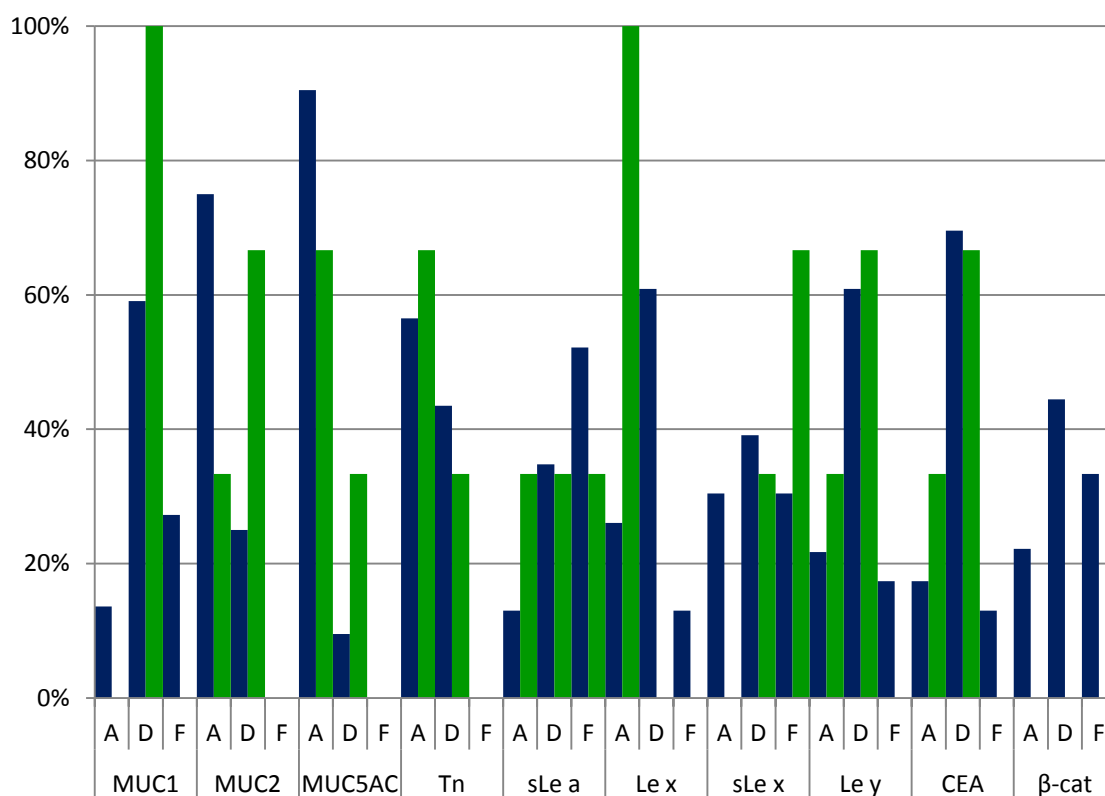
MUC2 se expresó débilmente en el 66,7% de los GLM con metástasis de ACM mientras que aquellos con metástasis de AP fueron sólo del 25%. La



expresión de MUC5AC fue escasa tanto en las metástasis ganglionares de AP como de los AM (9,5% y 33,3%, respectivamente).

El *antígeno Tn* se halló expresado débilmente en el 43,5%, 33,3% y 66,7% de los GLM con metástasis de AP, ACM y AM, respectivamente.

El 52,2% de los GLM con metástasis de AP presentaron un índice de expresión fuerte de *sialil Lewis a* mientras que sólo lo presentaron el 33,3% de los GLM con metástasis de ACM y de AM (Figura 80 B).



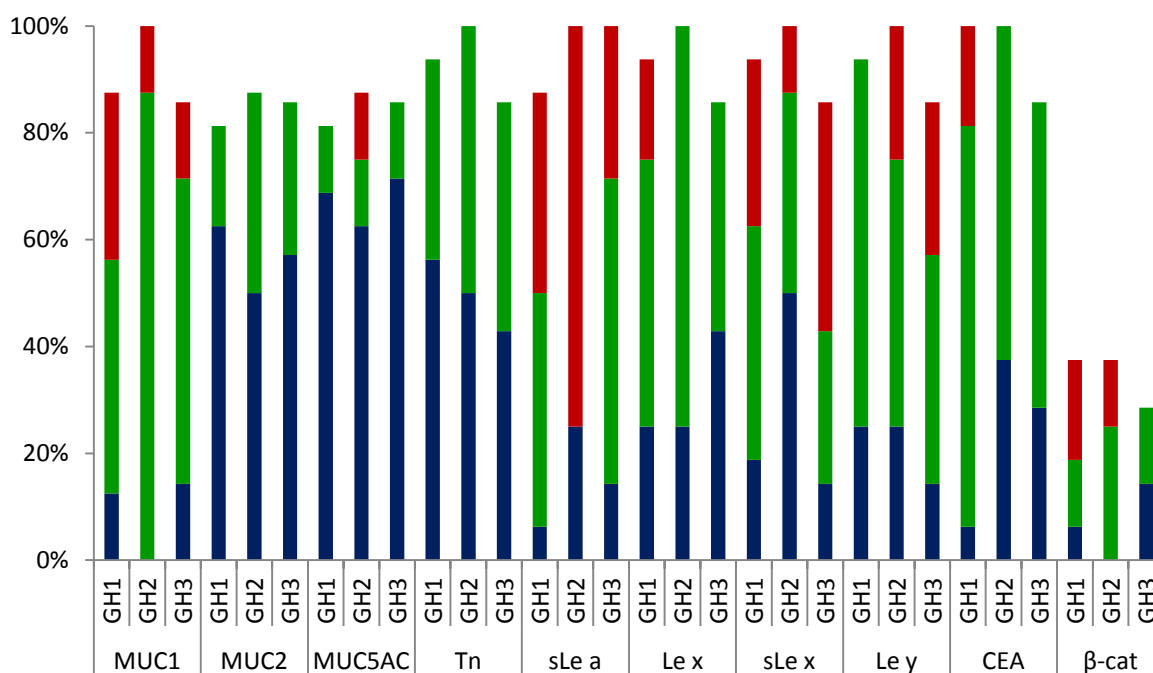
**Figura 80 B:** Todos los GLM con metástasis de AM (color verde) presentaron un índice de expresión débil de MUC1 mientras que aquellas de AP (color azul) predominó un índice de expresión fuerte (27,3%). Ningún GLM con metástasis de AM expresó *Lewis x*. A diferencia de los ACM, los AM presentaron un índice de expresión fuerte de *sialil Lewis x* en el 66,7% de las muestras. En la figura se muestra el porcentaje de distribución de la expresión antigénica en los GLM según el tipo histológico de la metástasis.

La expresión de CEA en los GLM fue predominantemente débil en todos los casos, sólo en el 13% los GLM con metástasis de AP presentó un índice de expresión fuerte del antígeno.

No se hallaron diferencias en el índice de expresión de *β-catenina* en los GLM con metástasis de AP y aquellos de ACM.

#### 2.4.14. Relación de los antígenos estudiados en los GLM y las características anatomopatológicas

CEA se encontró en todos los ganglios con metástasis moderada (GH2) y pobremente diferenciadas (GH3) con un índice de expresión débil. La expresión de MUC1 fue más baja en las metástasis bien diferenciadas (GH1) que en las GH2 y GH3 (Tabla 51 y Figura 81 A).



**Figura 81 A:** Distribución porcentual de la expresión antigénica según el grado histológico tumoral de los GLM. El 46,2% de los GLM *Tn*-positivos tenían metástasis GH1, 30,8% GH2 y 23,1% GH3. También se observó una disminución de la expresión de los antígenos *Lewis x* y *Lewis y* según fue avanzando el grado histológico de la metástasis: en las GH1 fue 55% y 50%, en las GH2 30% y 27,3% mientras que en las GH3 fue 15% y 22,7%, respectivamente. En azul se muestran los GLM con ausencia de reactividad, en verde aquellos con un índice de expresión débil y en rojo los presentaron un índice de expresión antigénica fuerte.

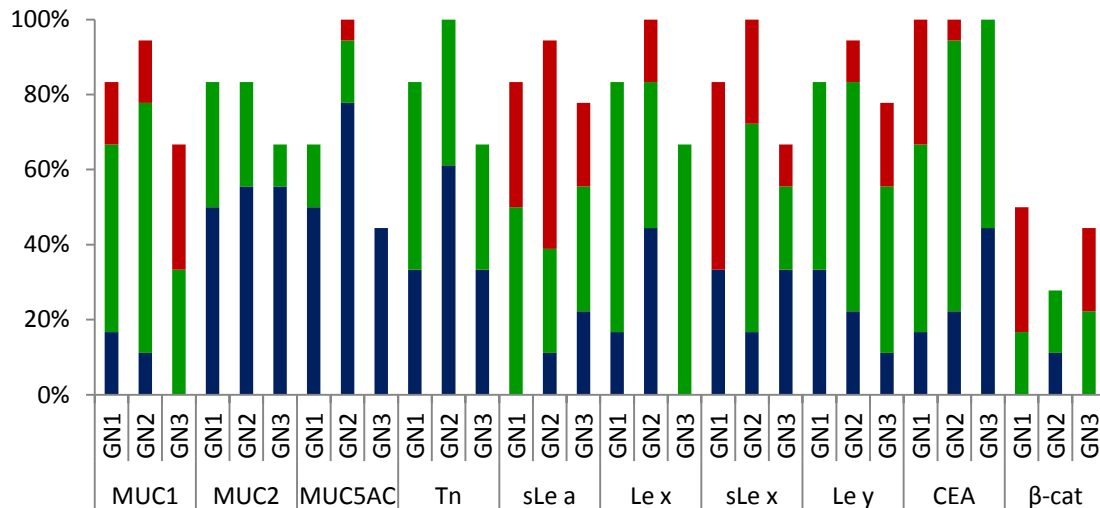
Todos los GLM con GN3 expresaron *Lewis x* y MUC1 (Tabla 51 y Figura 81 B) y la mitad de ellos los hicieron con un índice de expresión fuerte.

El 48% de los GLM con invasión tumoral de su cápsula presentaron un índice de expresión fuerte de *sialil Lewis a* (Tabla 51). Asimismo, en estos ganglios se observó expresión de los carbohidratos *Lewis x*, *sialil Lewis x* y *Lewis y* en el 64%, 60% y 44% de los casos, respectivamente.

**Tabla 51:** Relación entre el índice de expresión de los antígenos estudiados en los GLM y las características anatomopatológicas tumorales.

	MUC 1				MUC2				MUC5AC				Tn				sLe a				Le x				sLe x				Le y				CEA				β-cat			
	A <sup>&amp;</sup>	D <sup>*</sup>	F <sup>#</sup>	p <sup>%</sup>	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p	A	D	F	p				
<b>GH<sup>1</sup></b>	NA <sup>1</sup>				NS <sup>^</sup>				NA				NS				NA				NS				NS				NS				NS				NA			
1	2	7	5		10	3	0		11	2	0		9	6	0		1	7	6		4	8	3		3	7	5		4	11	0		1	12	3		1	2	3	
2	0	7	1		4	3	0		5	1	1		4	4	0		2	0	6		2	6	0		4	3	1		2	4	2		3	5	0		0	2	1	
3	1	4	1		4	2	0		5	1	0		3	3	0		1	4	2		3	3	0		1	2	3		1	3	2		2	4	0		1	1	0	
<b>GN<sup>2</sup></b>	NS				NS				NA				NS				NS				NA				NS				NS				NS				NA			
1	1	3	1		3	2	0		3	1	0		2	3	0		0	3	2		1	4	0		2	0	3		2	3	0		1	3	2		0	1	2	
2	2	12	3		10	5	0		14	3	1		11	7	0		2	5	10		8	7	3		3	10	5		4	11	2		4	13	1		2	3	0	
3	0	3	3		5	1	0		4	0	0		3	3	0		2	3	2		0	6	0		3	2	1		1	4	2		4	5	0		0	2	2	
<b>Inv. capsular</b>	NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA			
No	0	2	0		1	1	0		3	0	0		2	1	0		0	1	2		2	0	1		0	1	2		1	2	0		0	3	0		0	0	0	
Si	3	15	7		16	7	0		17	4	1		14	11	0		4	9	12		7	16	2		8	11	6		6	15	4		6	17	3		2	6	4	
<b>Necrosis</b>	NS				NS				NA				NS				NS				NS				NS				NS				NS				NA			
No	1	6	2		5	3	0		9	1	0		6	4	0		1	6	5		4	4	2		3	3	4		4	4	2		3	8	0		2	4	0	
Si	2	11	5		13	4	0		13	2	1		9	9	0		3	5	9		5	12	1		4	9	5		2	14	2		3	12	3		0	2	4	

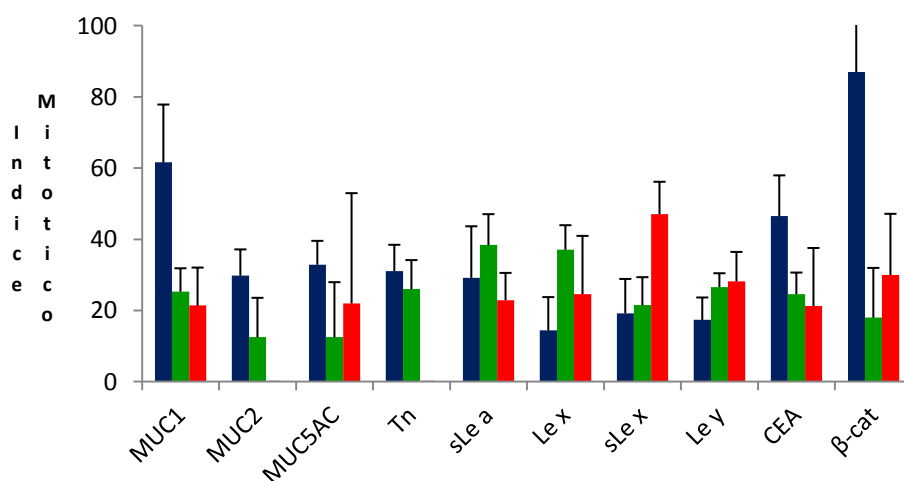
<sup>&</sup>A=Reactividad Ausente, <sup>\*</sup>D=Índice de expresión Débil, <sup>#</sup>F=Índice de expresión Fuerte, <sup>%</sup>p= test Chi<sup>2</sup>, p <0,05, <sup>1</sup>GH=Grado Histológico, <sup>2</sup>GN=Grado Nuclear, <sup>^</sup>NS=No Significativo, <sup>1</sup>NA=No Aplicable el test estadístico.



**Figura 81 B:** Distribución porcentual de la expresión antigénica según el grado nuclear de las metástasis ganglionares. En azul se muestran los GLM con ausencia de reactividad, en verde aquellos con un índice de expresión débil y en rojo los GLM con un índice de expresión antigénica fuerte.

La presencia de necrosis en la metástasis ganglionar se asoció con mayor expresión de *Lewis y* y CEA que aquellos con ausencia de la misma (Tabla 49). Asimismo, estos ganglios presentaron un elevado índice de expresión débil de los carbohidratos *Lewis x* (66,6%) y *Lewis y* (77,7%).

Los GLM con ausencia de expresión de la mucina MUC5AC tuvieron un índice mitótico promedio mayor que aquellos con reactividad positiva (Figura 82).



**Figura 82:** Índice mitótico promedio agrupado según el índice de expresión antigénica (en azul se encuentran expresados los GLM con ausencia de reactividad, en

verde aquellos con un índice de expresión débil y en rojo los GLM con un índice de expresión antigénica fuerte). El índice mitótico de las metástasis ganglionares fue más elevado cuando se hallaron expresados fuertemente los antígenos *sialil Lewis x*, *Lewis y* y *β-catenina* que cuando éstos fueron hallados con un índice de expresión débil o ausentes.

#### **2.4.15. Relación de los antígenos estudiados en los GLM con la respuesta al primer tratamiento quimioterápico instaurado**

Se observó un predominio de ausencia de expresión de la mucina MUC5AC en los GLM de los pacientes con estadio III que progresaron a pesar de haber recibido su tratamiento adyuvante; asimismo, en estos GLM se halló una mayor expresión de MUC1, *sialil Lewis x/a* y CEA que en los GLM de los pacientes que permanecieron libres de recurrencia tumoral (Tabla 52).

Todos GLM de los pacientes con estadio IV con un tiempo libre de progresión tumoral reducido expresaron *sialil Lewis a* y *Lewis y* mientras que en ninguno de ellos se observó reactividad de MUC2.

#### **2.4.16. Relación de los antígenos estudiados en los GLM con el sitio de progresión metastática**

El antígeno *Tn* se encontró más ausente en los GLM de los pacientes con metástasis hepáticas que en los GLM de aquellos con “otros” sitios metastáticos. Por otra parte, los GLM de los pacientes con metástasis hepática fueron los únicos que presentaron un índice de expresión fuerte de *Lewis x*.

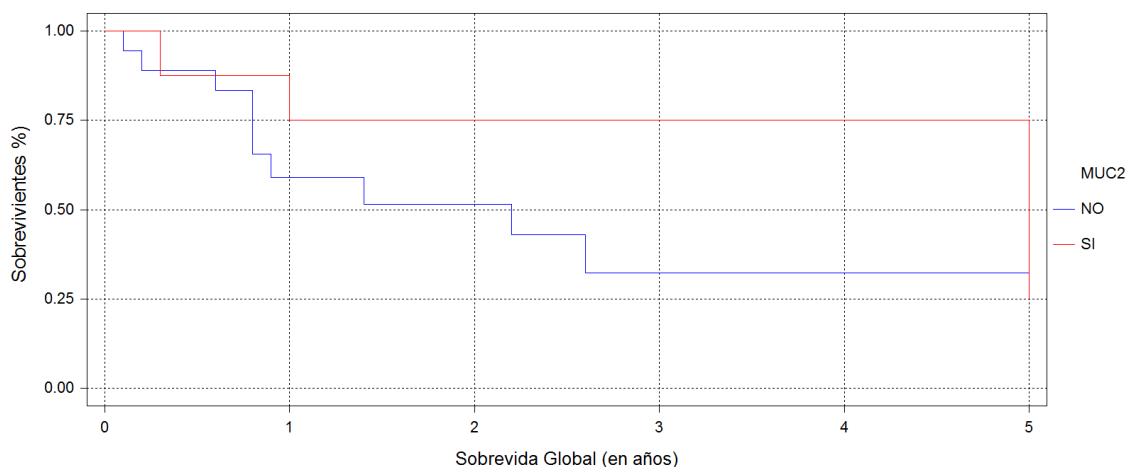
#### **2.4.17. Relación de los antígenos estudiados en los GLM con la sobrevida global y el tiempo libre de progresión**

Independientemente del estadio del CCR y del tratamiento instaurado, la expresión positiva de las mucinas MUC2 (Figura 83) y MUC5AC en los GLM se asociaron con una mayor SG y TLP respecto a aquellos con ausencia de estos antígenos.

**Tabla 52:** Relación entre la expresión antigénica estudiada en los GLM y la respuesta al primer tratamiento quimioterápico según los estadios.

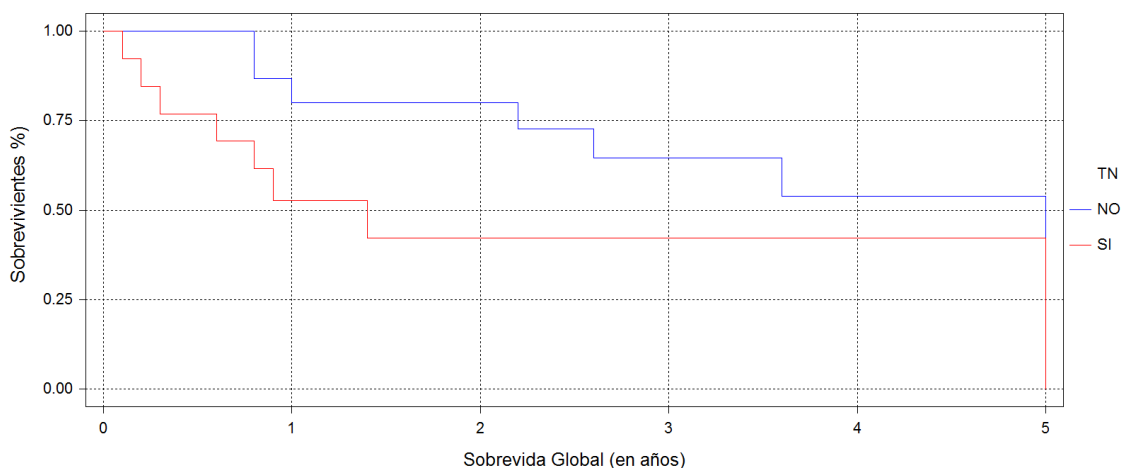
Estadio <sup>1</sup>	MUC 1		MUC2		MUC5AC Tn		sLe a		Le x		sLe x		Le y		CEA		β-cat			
	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si		
<b>Estadio III</b>	NA <sup>4</sup>		NS <sup>5</sup>		NA		NS		NA		NA		NS		NS		NA			
NE <sup>1</sup>	0	6	4	2	4	1	4	2	1	5	1	5	2	4	1	5	1	6	1	2
PE <sup>2</sup>	0	12	7	5	11	1	8	5	1	11	5	8	4	9	5	8	1	12	0	5
<b>Estadio IV</b>	NA		NA		NA		NA		NA		NA		NA		NS		NA		NA	
RC <sup>3</sup>	0	2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0
PE	2	4	6	0	3	2	1	5	0	6	1	5	1	5	0	5	2	4	1	2

<sup>1</sup>p=Chi<sup>2</sup> p <0,05, <sup>1</sup>Estadificación para el cáncer colorrectal establecido por la AJCC (American Joint Committee on Cancer) sexta edición (2002), <sup>1</sup>NE=No evidencia de Enfermedad, <sup>2</sup>PE= Progresión de Enfermedad, <sup>3</sup>RC=Respuesta Completa, <sup>4</sup>NA= No Aplicable el test estadístico, <sup>5</sup>NS=No Significativo.

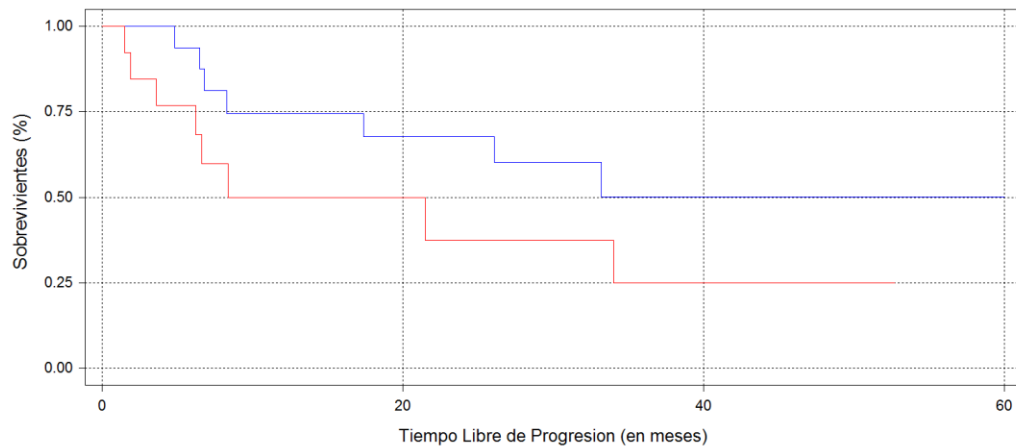


**Figura 83:** A un año del diagnóstico de CCR el 58,9% (IC95 28,9-73,5) de los pacientes con ausencia de expresión de MUC2 en sus GLM estaban vivos mientras que los pacientes con GLM positivos para esta mucina el 87,5% (IC95 55,2-97,5) sobrevivían independientemente de su estadio. En la figura se muestra el análisis univariado de la SG según la expresión de MUC2 acorde al método de Kaplan-Meier.

La ausencia de *Tn* en los GLM se correlacionó con una tendencia estadística a una mayor SG y TLP ( $p$  0,066 y  $p$  0,061, respectivamente) que aquellos con presencia de dicho antígeno (Tabla 53, Figuras 84 A y B).



**Figura 84 A:** Análisis univariado de la SG según la expresión de *Tn* acorde al método de Kaplan-Meier. Se observa una supervivencia a un año de seguimiento del 80% (IC95 55,8-92,6) en los pacientes con ausencia de *Tn* en sus GLM y del 52,7% (IC95 28,4-68,6) en aquellos con expresión positiva del antígeno.

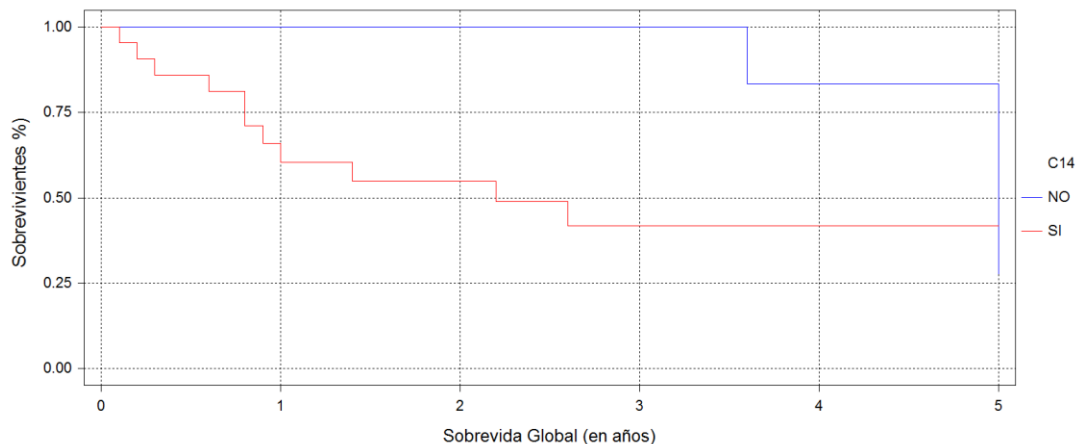


**Figura 84 B:**  
Análisis univariado TLP según la expresión de *Tn* acorde al método de Kaplan-Meier en donde se puede observar

que un año de seguimiento el 74,4% (IC95 50-89,4) de los pacientes con ausencia de *Tn* en sus GLM aun no habían presentado recurrencia de su enfermedad mientras que aquellos con expresión positiva sólo el 49,8% (IC95 25,3-74,4) de los pacientes estaban libres de recurrencia.

De la misma manera, la ausencia de expresión de los antígenos *sialil Lewis x* y *Lewis y* en los GLM se asoció con el doble de SG y TLP que aquellos con un índice de expresión fuerte ambos antígenos.

La presencia de *Lewis y* en los GLM se correlacionó estadísticamente con una SG (Figura 85) y TLP más reducida ( $p < 0,05$ ) que aquellos con ausencia de expresión (4,5 versus 1,8 años y 37,6 versus 19,6 meses, respectivamente).



**Figura 85:** Al completar un año de seguimiento el 83,3% (IC95 46,8-96,5) de los pacientes con ausencia de *Lewis y* en sus GLM estaban vivos mientras que sólo sobrevivían el 60,4% (IC95 38,9-78,5) de aquellos con un expresión positiva. La figura muestra el análisis univariado de sobrevida según la expresión del antígeno *Lewis y* (C14) acorde al método de Kaplan-Meier



Asimismo, los pacientes con GLM con un índice de expresión fuerte de *Lewis x* tuvieron un menor TLP que aquellos con expresión débil o ausente. Similar observación fue encontrada respecto a la SG y TLP de los pacientes con un índice de expresión fuerte de CEA en sus GLM.

Los pacientes cuyos GLM presentaron expresión nuclear de  $\beta$ -*catenina* tuvieron una SG y TLP más corta que aquellos con ausencia de expresión nuclear (0,9 versus 2,1 años y 8,9 versus 17,4 meses, respectivamente). Contrariamente, los pacientes que presentaron GLM con un predominio de expresión de  $\beta$ -*catenina* en la membrana citoplasmática tuvieron mayor SG y TLP que aquellos con expresión negativa (2,9 versus 1,3 años y 21,9 versus 12,3 meses, respectivamente).

#### 2.4.18. Relación de los antígenos estudiados en los GLM con el pronóstico según los estadios del CCR.

**Tabla 53:** Relación entre el índice de expresión de los antígenos estudiados en los GLM y la sobrevida global (SG) y el tiempo libre de progresión de la enfermedad (TLP).

	n	SG ( $\pm$ ES) (en años)	p <sup>%</sup>	TLP ( $\pm$ ES) (en meses)	p <sup>%</sup>
<b>MUC1</b>			NS		NS <sup>^</sup>
Ausente	3	2,4 (1,2)		16,7 (14,0)	
Débil	18	2,4 (0,5)		25,7 (5,7)	
Fuerte	7	2,5 (0,8)		26,1 (9,2)	
<b>MUC2</b>			NS		NS
Ausente	18	1,7 (0,4)		17,8 (5,3)	
Débil	8	3,8 (0,6)		35,6 (8,0)	
Fuerte	0	0,0		0,0	
<b>MUC5AC</b>			NS		NS
Ausente	21	2,3 (0,4)		22,9 (5,1)	
Débil	4	4,2 (1,0)		43,6 (11,8)	
Fuerte	1	0,2		1,9	
<b>Tn</b>			NS		NS
Ausente	16	3,1 (0,4)		31,5 (5,6)	
Débil	13	1,7 (0,5)		15,1 (6,2)	
Fuerte	0	0,0		0,0	
<b>sLe a</b>			NS		NS
Ausente	4	2,5 (0,9)		29,1 (10,7)	
Débil	11	1,7 (0,5)		17,3 (6,4)	
Fuerte	14	2,3 (0,5)		21,7 (5,7)	
<b>Le x</b>			NS		NS
Ausente	9	2,4 (0,7)		27,5 (8,0)	
Débil	17	2,4 (0,5)		23,6 (5,8)	
Fuerte	3	2,7 (1,2)		17,0 (13,9)	
<b>sLe x</b>			NS		NS
Ausente	8	3,3 (0,7)		30,4 (8,3)	
Débil	12	2,5 (0,5)		25,8 (6,8)	
Fuerte	9	1,7 (0,6)		16,3 (7,9)	
<b>Le y</b>			S*		NS
Ausente	7	4,5 (0,6)		37,6 (8,7)	
Débil	18	1,8 (0,4)		19,4 (5,4)	
Fuerte	4	1,7 (0,9)		20,3 (11,6)	
<b>CEA</b>			NS		NS
Ausente	6	3,0 (0,8)		30,1 (9,5)	
Débil	21	2,4 (0,4)		24,1 (5,1)	
Fuerte	3	2,0 (1,2)		12,9 (13,5)	
<b><math>\beta</math>-cat</b>			NS		NS
Ausente	2	1,9		22,4	
Débil	6	1,0 (0,6)		12,4 (5,3)	
Fuerte	4	2,8 (0,8)		14,3 (6,5)	

<sup>%</sup>p=test utilizado: ANOVA de una vía, p <0,05; <sup>^</sup>NS=No Significativo, \*S=Significativo.

La ausencia de MUC2 en los GLM de los pacientes con estadio III se correlacionó con una SG y TLP más reducida (Tabla 54) que la de aquellos con presencia de dicha mucina (2 versus 3,6 años y 32,3 versus 24,1 meses, respectivamente). Contrariamente, la ausencia de *Tn* (Figuras 86) y de *Lewis y* (Figuras

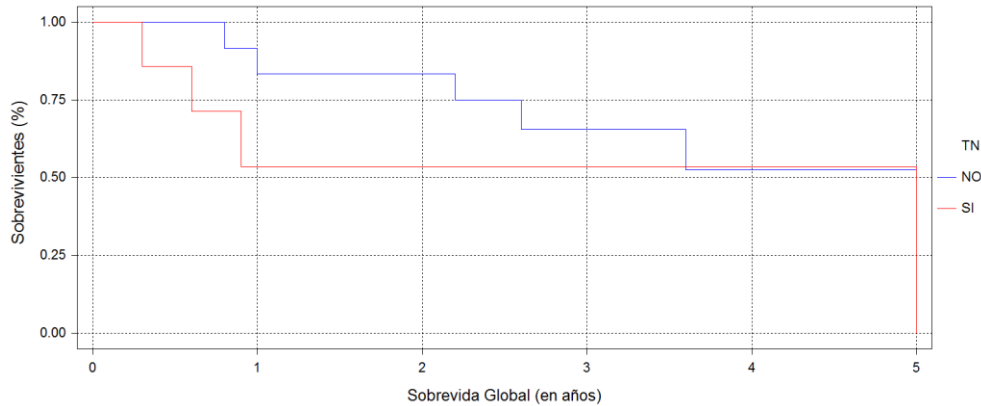
87) en los GLM se asociaron con una SG y TLP más prolongada que la de aquellos con presencia de ambos antígenos.

Similar a lo mencionado para el estadio III, los pacientes con estadio IV con GLM de negativos para *Tn* tuvieron una mayor SG y TLP que la observada en aquellos con presencia este antígeno (Tabla 54). Asimismo, en este estadio la ausencia de *Lewis x* en los GLM también se asoció con mayor TLP que la de aquellos con expresión positiva.

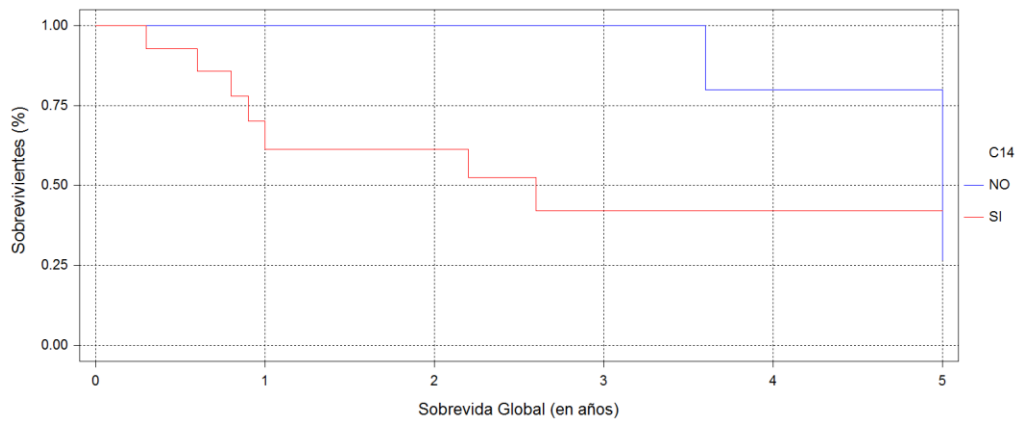
**Tabla 54:** Relación entre el índice de expresión de los antígenos estudiados en los GLM con la sobrevida global (SG) y el tiempo libre de progresión (TLP), según los estadios de CCR.

		Estadio III (n=22)				Estadio IV (n=9)					
		n	SG (±ES)	p <sup>%</sup>	TLP (±ES)	p	n	SG (±ES)	p	TLP (±ES)	p
<b>MUC1</b>	Ausente	1	3,1	NA <sup>&amp;</sup>	37,8	NA	2	2,1	NA	6,2	NA
	Débil	12	2,6 (0,6)		26,4 (7,4)		6	2,0 (0,8)		24,2 (9,5)	
	Fuerte	6	2,7 (0,9)		29,1 (10,4)		1	1,4		8,4	
<b>MUC2</b>	Ausente	11	2,0 (0,6)	NS <sup>^</sup>	24,1 (7,6)	NS	7	1,2 (0,4)	NA	7,9 (3,0)	NA
	Débil	7	3,6 (0,8)		32,3 (9,5)		1	4,8		58,3	
	Fuerte	0	0,0		0,0		0	0,0		0,0	
<b>MUC5AC</b>	Ausente	16	2,4(0,5)	NA	23,9 (5,9)	NA	5	1,8 (0,8)	NA	19,8 (11,3)	NA
	Débil	2	6,0		57,3		2	2,4		29,9	
	Fuerte	0	0,0		0,0		1	0,2		1,9	
<b>Tn</b>	Ausente	13	3,2 (0,5)	NS	31,8 (6,6)	NS	3	2,5 (1,0)	NS	30,0 (12,5)	NS
	Débil	7	1,7 (0,7)		17,2 (8,9)		6	1,7 (0,7)		12,7 (8,8)	
	Fuerte	0	0,0		0,0		0	0,0		0,0	
<b>sLe a</b>	Ausente	2	1,6	NA	16,7	NA	2	3,4	NA	41,6 (14,3)	NA
	Débil	9	2,0 (0,6)		19,8 (7,3)		2	0,8		6,25 (14,3)	
	Fuerte	9	2,6 (0,6)		26,0 (7,3)		5	1,9 (0,7)		14,0 (9,0)	
<b>Le x</b>	Ausente	6	2,5 (0,9)	NA	27,1 (10,4)	NA	3	2,3 (1,1)	NA	28,2 (13,3)	NA
	Débil	12	2,7 (0,6)		27,4 (7,3)		5	1,9 (0,9)		14,5 (10,7)	
	Fuerte	2	3,3		21,4		1	1,4		8,4	
<b>sLe x</b>	Ausente	6	3,2 (0,9)	NS	30,8 (10,1)	NS	2	3,9	NA	29,2	NA
	Débil	7	3,0 (0,8)		30,7 (9,4)		5	1,7 (0,7)		19,0 (10,6)	
	Fuerte	7	2,0 (0,8)		19,1 (9,4)		2	0,8		6,5	
<b>Le y</b>	Ausente	6	4,4 (0,7)	NA	34,2 (10,0)	NA	1	4,8	NA	58,3	NA
	Débil	13	1,9 (0,5)		23,3 (6,8)		5	1,6 (0,7)		9,4 (8,0)	
	Fuerte	2	1,3		13,5		2	2,2		27,1	
<b>CEA</b>	Ausente	2	4,0 (1,5)	NA	30,4	NA	4	2,5 (0,8)	NA	29,9 (10,9)	NA
	Débil	18	2,6 (0,5)		27,2 (5,7)		3	0,7 (1,0)		5,3 (12,2)	
	Fuerte	1	0,6		8,0		2	2,8		15,3	
<b>β-cat</b>	Ausente	1	3,1	NA	38,0	NA	1	1,0	NA	6,0	NA
	Débil	5	1,2 (0,7)		14,5 (5,2)		1	1,0		1,0	
	Fuerte	3	2,5 (1,0)		17,2 (6,8)		1	3,0		5,0	

<sup>%</sup>p=test utilizado: ANOVA de una vía, p <0,05; <sup>S</sup>=Significativo, <sup>NS</sup>=No Significativo, <sup>&</sup>NA=No Aplicable el test estadístico.



**Figura 86:** El 83,3% (IC95 56,6-95) de los pacientes con estadio III con GLM negativos para *Tn* estaban vivos a un año de seguimiento mientras que sólo el 53,5% (IC95 23,2-81,4) de los mismos, con reactividad positiva, sobrevivieron en el mismo período de tiempo. La Figura muestra la SG según la expresión de *Tn* de acuerdo al método Kaplan-Meier.



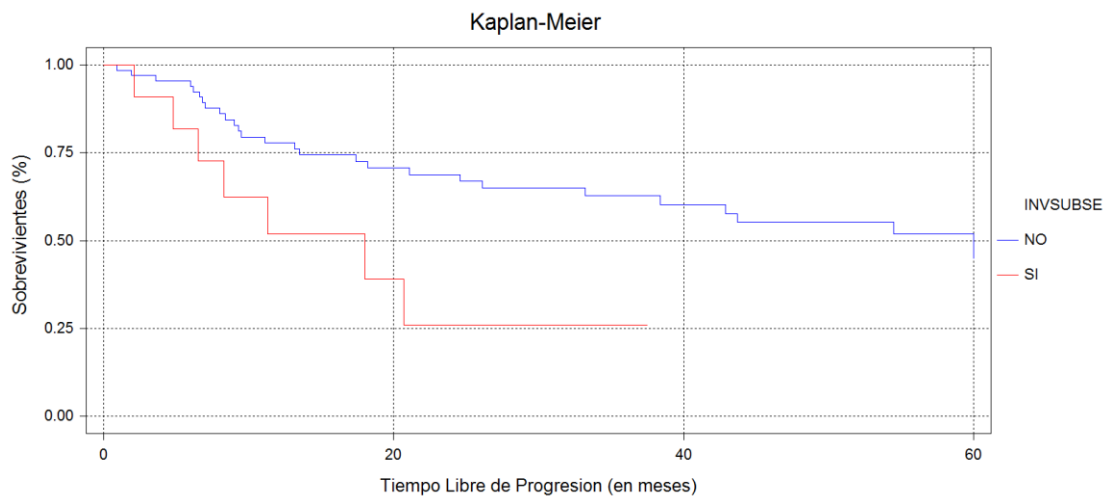
**Figura 87:** Al finalizar un año de seguimiento, el 80% (IC 95 41,3-95,7) de los pacientes con estadio III con ausencia de *Lewis* y en sus GLM estaban vivos mientras que sólo sobrevivieron el 61,3% (IC 35,4-82,1) de aquellos con expresión positiva. En la figura se muestran las curvas de SG según la expresión de *Lewis* y (C14) obtenidas con el método de Kaplan-Meier.

## 2.5. Características clinicopatológicas de los pacientes con CCR y la sobrevida

### 2.5.1. Análisis univariado.

Con la finalidad de evaluar la influencia de las variables clinicopatológicas en la sobrevida, se utilizó el método de ANOVA de una vía,  $p < 0,05$  (Tabla 55).

La presencia de invasión tumoral de la capa subserosa del epitelio colorrectal se correlacionó estadísticamente con una menor SG y TLP (Figura 88) que el observado en aquellos sin dicha invasión ( $p < 0,05$ ).



**Figura 88:** Análisis univariado de sobrevida acorde al método de Kaplan-Meier donde se observa que el 77,8% (IC95 65,9-86,3) de los pacientes con ausencia (NO) de invasión tumoral de la capa subserosa (INVSUSE) aun no habían presentado recurrencia de su enfermedad al año del diagnóstico de CCR mientras que sólo el 51,9% (IC95 26,5-76,4) de los pacientes con invasión (SI) de dicha capa estaban libres de enfermedad.

Los pacientes con estadio  $pN_2$  (Figura 89) sobrevivieron en promedio 2,6 años menos que los pacientes con estadio  $pN_0$  (1,7 versus 4,3 años, respectivamente,  $p < 0,05$ ). Similar correlación negativa se encontró con el TLP (17,1 versus 49,5 meses, respectivamente,  $p < 0,05$ ).

**Tabla 55:** Relación entre las variables clinicopatológicas y la sobrevida de los pacientes estudiados.

	n	SG <sup>#</sup> (±ES) (en años)	p	TLP* (±ES) (en meses)	p
<b>Edad</b>			NA <sup>§</sup>		NA
≤40	2	2,0		22,5	
40-60	31	4,0 (0,5)		43,0 (7,1)	
≥60	57	3,1 (0,4)		34,0 (5,2)	
<b>Género</b>			NS <sup>^</sup>		NS
Masculino	38	3,6 (0,5)		38,7 (6,4)	
Femenino	52	3,2 (0,4)		35,4 (5,5)	
<b>Ant. CCR fliar<sup>1</sup></b>			NS		NS
No	77	3,4 (0,3)		37,9 (4,5)	
Si	13	3,0 (0,9)		30,2 (11,0)	
<b>DBT<sup>2</sup></b>			NS		NS
No	80	3,4 (0,3)		37,5 (4,4)	
Si	7	3,3 (1,2)		28,1 (15,1)	
<b>HTA<sup>3</sup></b>			NS		NS
No	66	3,2 (0,4)		34,0 (4,8)	
Si	20	4,1 (0,7)		47,3 (8,8)	
<b>Cirugía previa</b>			NS		NS
Apendicectomía	13	3,7 (0,9)		39,5 (11,0)	
Colecistectomía	7	1,9 (1,2)		20,7 (15,0)	
Ninguna cirugía previa	70	3,4 (0,3)		38,0 (4,7)	
<b>Consumo tabaco</b>			NS		NS
No	33	3,6 (0,5)		40,5 (6,9)	
Si	54	3,3 (0,4)		35,0 (5,4)	
<b>Consumo alcohol</b>			S <sup>**</sup>		NS
No	51	4,0 (0,4)		43,8 (5,5)	
Si	33	2,5 (0,5)		27,1 (6,9)	
<b>IMC<sup>4</sup></b>			NS		NS
≤25	32	2,8 (0,6)		31,5 (7,2)	
25-30	29	4,0 (0,6)		40,9 (8,0)	
≥30	19	3,8 (0,7)		42,7 (9,4)	
<b>PP<sup>5</sup></b>			NS		NS
<10	39	3,3 (0,50)		32,9 (6,3)	
≥10	31	3,3 (0,6)		36,9 (7,0)	
<b>Forma presentación de enf,</b>			NS		NS
Dolor abdominal	22	3,5 (0,7)		39,3 (8,3)	
CRE <sup>6</sup>	7	4,3 (1,2)		47,9 (14,8)	
Obst. y/o perf.	8	2,4 (1,1)		22,5 (13,8)	
Hematoquezia	31	3,0 (0,5)		31,6 (7,0)	
Anemia	3	5,8 (1,9)		47,6 (22,6)	
<b>Localización tumoral</b>			NS		NS
Cáncer de colon	62	3,6 (0,4)		40,5 (5,0)	
Cáncer de recto	28	2,8 (0,6)		28,8 (7,4)	
<b>Sitio de afección colónica</b>			NS		NS
C. ascendente	21	2,6 (0,7)		27,4 (9,4)	
C. transverso	6	6,3 (1,4)		71,6 (17,7)	
C. descendente	4	3,8 (1,8)		39,2 (21,7)	
C. sigmoides	33	4,0 (0,6)		45,8 (7,5)	
<b>Tamaño tumoral</b>			NS		NS
<5 cm	34	3,4 (0,5)		35,2 (6,0)	
≥5 cm	41	3,5 (0,4)		38,4 (5,5)	
<b>Tratamiento quirúrgico</b>			NS		NS
Hemicolectomía	31	3,1 (0,5)		34,6 (7,0)	
Resec, segmentaria	37	4,1 (0,5)		45,2 (6,4)	
Operación de Miles	19	2,8 (0,7)		29,2 (9,0)	
Laparotomía exploratoria	2	0,5		5,7	
<b>Nº gl. resecaos</b>			NS		NS
<12	55	3,9 (0,4)		42,7 (5,2)	
≥12	29	2,7 (0,6)		28,4 (7,2)	

<sup>#</sup>SG= Sobrevida global (en años), \*TLP = Tiempo libre de progresión (en meses), <sup>§</sup>NA=No aplicable el test, <sup>^</sup>NS=No significativo, <sup>\*\*</sup>S=Significativo, <sup>1</sup>Ant. CCR fliar=Antecedente de cáncer CCR familiar, <sup>2</sup>DBT= Antecedentes de diabetes mellitus, <sup>3</sup>HTA= Antecedentes de hipertensión arterial, <sup>4</sup>IMC= Índice de masa corporal, <sup>5</sup>PP=pérdida de peso en los últimos 2 meses, <sup>6</sup>CRE= Cambio en el ritmo evacuatorio.

**Tabla 55:** Relación entre las variables clinicopatológicas y la supervivencia de los pacientes estudiados.

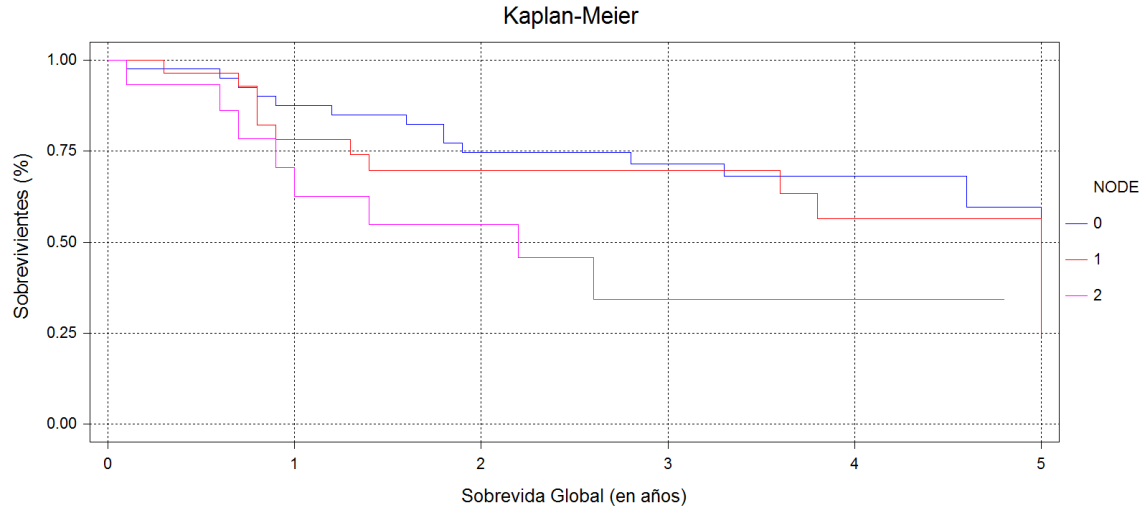
	n	SG <sup>#</sup> (±ES) (en años) p	TLP* (±ES) (en meses) p
<b>Estadio pT<sup>8</sup></b>			NA <sup>&amp;</sup> NA
T <sub>1</sub>	1	7,6	92,2
T <sub>2</sub>	29	3,0 (0,6)	32,2 (7,2)
T <sub>3</sub>	27	4,3 (0,6)	46,7 (7,2)
T <sub>4</sub>	33	2,8 (0,5)	31,0 (6,8)
<b>Estadio pN<sup>9</sup></b>			S** S
N <sub>0</sub>	43	4,3 (0,4)	49,5 (5,7)
N <sub>1</sub>	27	3,0 (0,5)	30,2 (7,0)
N <sub>2</sub>	15	1,7 (0,8)	17,1 (9,6)
<b>Estadio M<sup>10</sup></b>			S S
M <sub>0</sub>	68	3,9 (0,3)	43,2 (4,4)
M <sub>1</sub>	20	1,3 (0,6)	12,5 (8,2)
<b>Estadio<sup>11</sup></b>			S S
I	10	5,2 (0,9)	59,2 (11,2)
II	27	4,9 (0,5)	57,3 (6,8)
III	33	2,8 (0,5)	28,0 (6,1)
IV	20	1,3 (0,6)	12,5 (7,9)
<b>Tratamiento quimioterápico</b>			NS <sup>^</sup> NS
5-FU-LV <sup>12</sup>	73	3,5 (0,3)	37,5 (4,7)
5-FU-LV + Oxaliplatino	6	2,5 (1,3)	30,8 (16,5)
5-FU-LV + Metotrexato	5	3,6 (1,5)	43,4 (18,0)
<b>Sitio de progresión tumoral</b>			NS NS
Metástasis hepática	14	2,4 (0,5)	19,1 (4,2)
Otros sitios metastáticos	18	2,5 (0,4)	21,0 (3,7)

<sup>#</sup>SG= Supervivencia global (en años), \*TLP = Tiempo libre de progresión (en meses), <sup>&</sup>NA=No aplicable el test, <sup>^</sup>NS=No significativo, \*\*S=Significativo, <sup>8</sup>T=estadio T, <sup>9</sup>N=estadio N, <sup>10</sup>M=estadio M, <sup>11</sup>Estadio=Estadificación para cáncer colorrectal establecido por la AJCC (American Joint Committee on Cancer), Sixth Edition (2002), <sup>12</sup>5-FU-LV= 5-Fluorouracilo-Leucovorina.

**Tabla 55:** Relación entre variables clinicopatológicas y la sobrevida de los pacientes estudiados.

	n	SG <sup>#</sup> (±ES) (en años)	p	TLP* (±ES) (en meses)	p
<b>Histología tumoral</b>			NA <sup>&amp;</sup>		NA
Adenocarcinoma	59	3,3 (0,4)		35,7 (5,1)	
ACM <sup>7</sup>	21	3,3 (0,7)		34,2 (8,6)	
Carcinoma mucinoso	9	3,7 (1,1)		43,9 (13,2)	
Carc. anillo de sello	1	7,7		94,1	
<b>Ulceración tumoral</b>			NS <sup>^</sup>		NS
No	13	3,9 (0,9)		41,9 (12,1)	
Si	54	3,6 (0,4)		40,7 (5,9)	
<b>Inv. muscular</b>			NS		NS
No	3	3,9 (1,9)		34,6 (23,1)	
Si	84	3,4 (0,3)		37,8 (4,3)	
<b>Inv. subserosa</b>			S <sup>**</sup>		S
No	66	3,7 (0,4)		40,9 (4,7)	
Si	13	1,5 (0,9)		12,5 (10,7)	
<b>Inv. serosa</b>			NS		NS
No	74	3,6 (0,4)		39,5 (4,7)	
Si	6	2,9 (1,4)		26,5 (16,8)	
<b>Inv. grasa</b>			NS		NS
No	50	3,7 (0,4)		40,8 (5,8)	
Si	30	2,9 (0,6)		32,2 (7,5)	
<b>Inv. vascular</b>			NS		NS
No	82	3,4 (0,3)		37,6 (4,4)	
Si	5	3,8 (1,5)		31,7 (18,0)	
<b>Inv. linfática</b>			NS		NS
No	67	3,7 (0,4)		40,0 (4,8)	
Si	21	2,5 (0,7)		27,9 (8,6)	
<b>Inv. perineural</b>			NS		NS
No	80	3,5 (0,3)		38,6 (4,4)	
Si	7	1,9 (1,2)		21,7 (15,1)	
<b>Grado histológico</b>			NS		NS
1	66	3,1 (0,4)		34,0 (4,8)	
2	16	4,4 (0,8)		48,0 (9,9)	
3	8	3,1 (1,1)		37,9 (14,0)	
<b>Grado nuclear</b>			NS		NS
1	34	3,2 (0,5)		33,4 (6,7)	
2	46	3,7 (0,4)		42,2 (5,8)	
3	10	2,6 (1,0)		23,7 (12,4)	

<sup>#</sup>SG= Sobrevida global (en años), \*TLP = Tiempo libre de progresión (en meses), <sup>&</sup>NA=No aplicable el test, <sup>^</sup>NS=No significativo, <sup>\*\*</sup>S=Significativo <sup>7</sup>ACM=Adenocarcinoma con componente mucinoso.

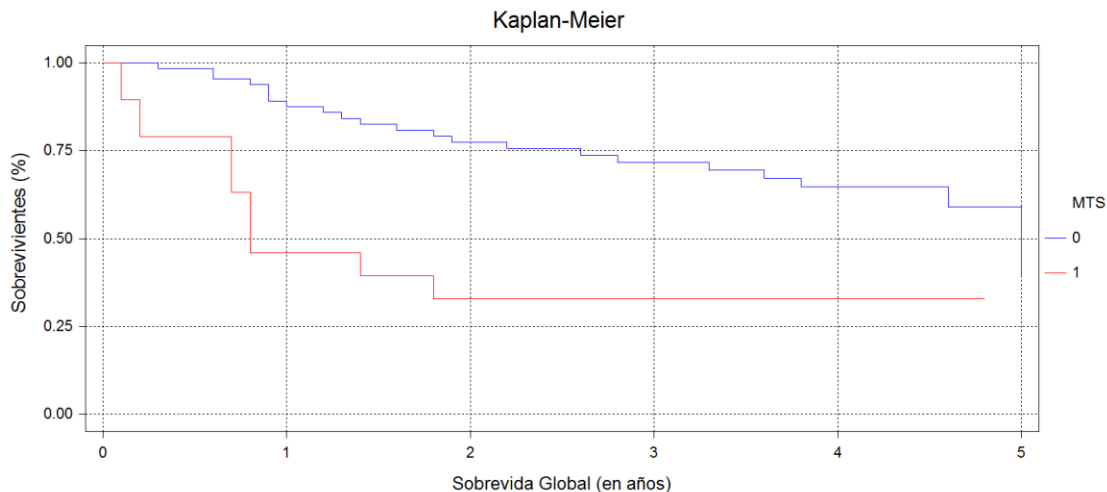


**Figura 89:** A los dos años de seguimiento el 74,6% (59,5-85,5) de los pacientes con estadio pN<sub>0</sub> (0), el 69,7% (IC95 49,9-84,2) con estadio pN<sub>1</sub> (1) y el 45,6% (IC95 22,9-70,3) de los pacientes con estadio pN<sub>2</sub> (2) estaban vivos. Análisis univariado de SG según el grado de compromiso ganglionar (NODE) acorde al método de Kaplan-Meier.

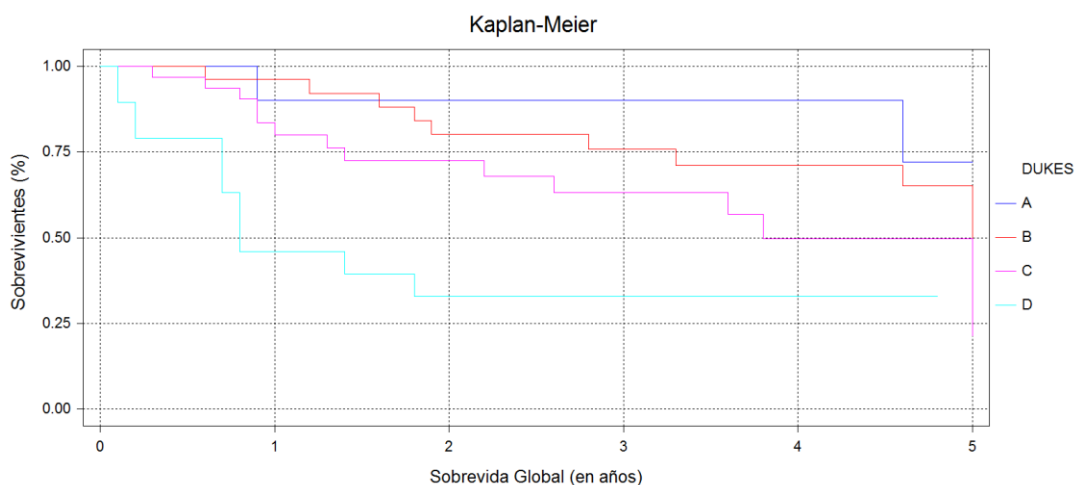
La presencia de metástasis al momento del diagnóstico se correlacionó estadísticamente con una SG (1,3 versus 3,9 años,  $p < 0,05$ ) más reducida que aquellos pacientes sin metástasis (Figura 90); asimismo, se halló una asociación estadísticamente significativa entre M<sub>1</sub> y el TLP (12,5 meses versus 43,2 meses,  $p < 0,05$ ).

Finalmente, el estadio según la clasificación de la AJCC se correlacionó negativamente tanto con la SG (Figura 91) como con el TLP. Los pacientes con estadios III y IV presentaron una menor SG (2,8 y 1,3 años) que aquellos con estadios I y II (5,2 versus 4,9 años),  $p < 0,05$ . Asimismo, se observó similar correlación respecto al TLP (28 versus 12,5 meses y 59,2 versus 57,3 meses, respectivamente).





**Figura 90:** El 87,5% (IC95 77,1-93,5) de los pacientes con CCR sin metástasis (MTS 0) al momento del diagnóstico estaban vivos al año de su seguimiento mientras que sólo el 39,3% (IC95 20-61,9) de los pacientes con enfermedad metastásica (MTS 1) sobrevivieron en ese período. Método analítico utilizado: Kaplan-Meier.

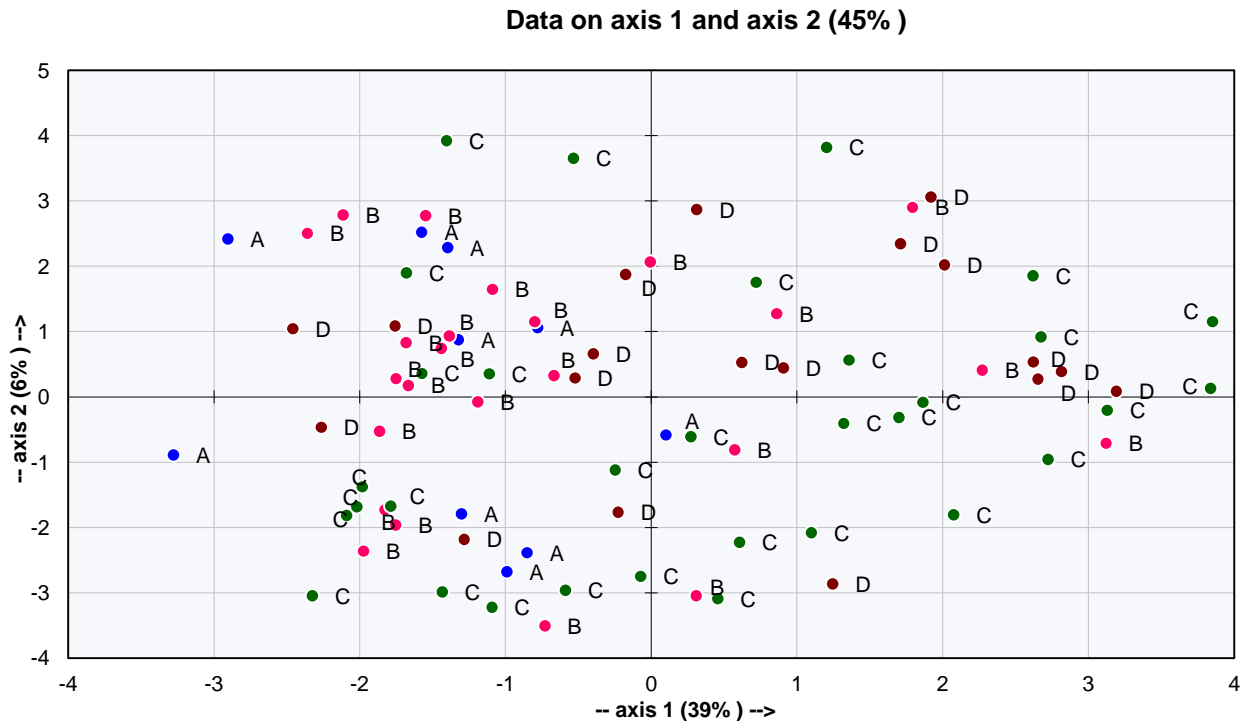


**Figura 91:** El 90% (IC95 61,3-98) de los pacientes con estadio I (Dukes A), el 80,1% (IC95 61,5-91) con estadio II (Dukes B), el 67,9% (ic95 53,8-85,5) con estadio III (Dukes C) y el 32,8% (IC95 16-55,5) de aquellos con estadio IV (Dukes D) estaban vivos a los dos años de seguimiento. Esta Figura muestra, mediante el análisis de Kaplan-Meier, una disminución gradual de la SG según el estadio del CCR.

Respecto a las demás variables estudiadas como por ejemplo edad, género, pérdida de peso, forma de presentación de la enfermedad, localización tumoral, tamaño tumoral, número de ganglios resecaos, histología, GH, no se asociaron significativamente con la sobrevida.

### 2.5.2. Análisis multivariado.

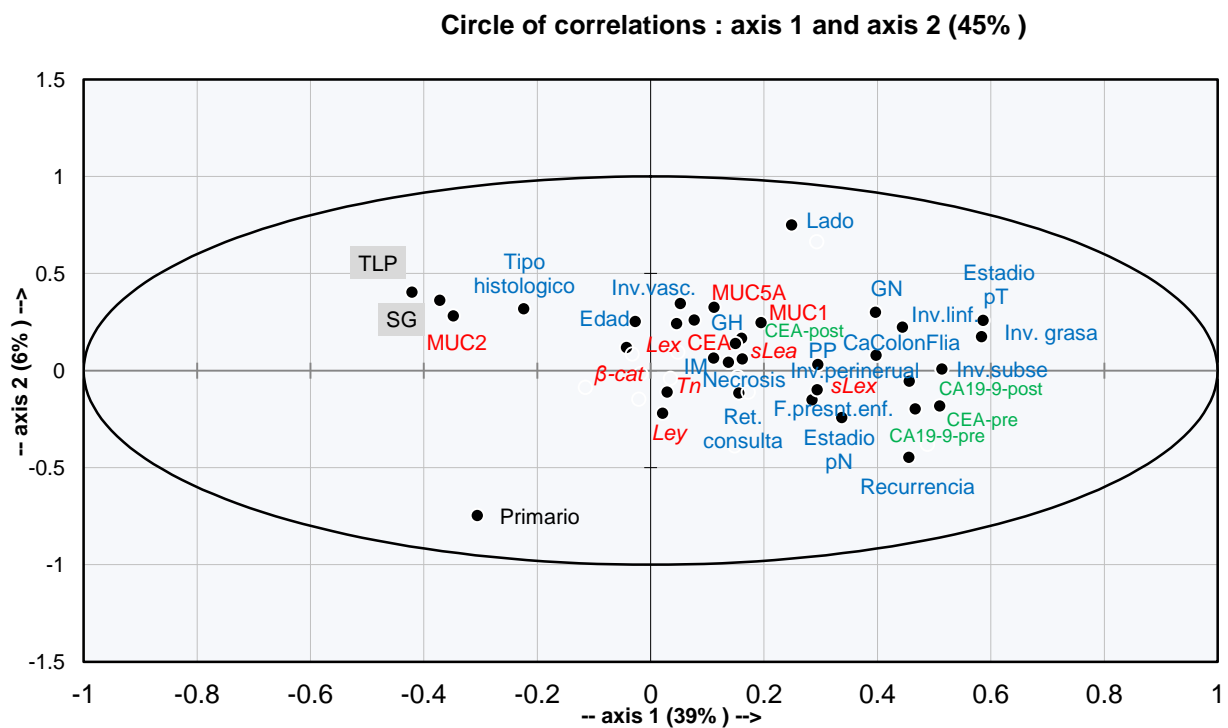
Se utilizó el análisis de Componentes Principales (CP) con el fin de hallar las variables más significativas para la distribución de los casos y un análisis discriminante con la intención de verificar la correcta agrupación de los casos según las distintas variables (Figura 92).



**Figura 92:** Observamos una distribución uniforme del estadio Dukes A (puntos azules) en el área CP1-, Dukes B (puntos rosas) en el cuadrante CP1-/CP2+, Dukes C (puntos verdes) en CP2- y Dukes D (puntos marrones) en el cuadrante CP1+/CP2+. La Figura muestra la distribución de los estadios luego de la aplicación del test de Componentes Principales.

Si luego de realizar el test de Componentes Principales, superponemos aquella de la distribución de los estadios (Figura 92) y la de las variables (Figura 93) podemos observar como las variables estudiadas se distribuyen según los estadios de CCR. Los pacientes con estadio Dukes A (localizados preferentemente en el área CP1-) se correlacionaron positivamente con una mayor SG, TLP, tumores localizados en el colon y presencia de MUC2 en sus TP y negativamente, con estadio pT<sub>2</sub> y elevados niveles sanguíneos de CEA pre-operatorios. De forma similar, los pacientes con estadio Dukes

B (la mayoría ubicados en el cuadrante CP1-/CP2+) se correlacionaron positivamente con mayor SG, TLP, adenocarcinomas puros y presencia de MUC2 en sus TP. Por otra parte, los factores de mal pronóstico para estos pacientes fueron los niveles elevados de CEA y CA 19-9 antes de la cirugía y la presencia de *Lewis* y en sus TP. Los pacientes con estadio Dukes C (hallados principalmente en CP2-) se correlacionaron positivamente con tumores localizados en el colon izquierdo, el estadio pN<sub>1</sub> y negativamente con tumores que invadieron la capa grasa, invasión de los vasos linfáticos y con tumores con alto grado nuclear.



**Figura 93:** Distribución de las variables luego de la aplicación del test de Componentes Principales

Los pacientes con estadio Dukes D (representados preferentemente en el cuadrante CP1+/CP2+) se correlacionaron positivamente con tumores GN1 y localizados en el colon izquierdo y negativamente con la presencia de *Lewis* y *Tn* en sus TP.

El diagnóstico de CCR a una edad más temprana (Figura 93) se relacionó con tumores localizados en el colon derecho, mayor índice mitótico, estadio pN<sub>2</sub> e índices

de expresión fuerte de los antígenos MUC1, MUC2, *Tn*, *Lewis x*, *sialil Lewis x/a*, CEA y *β-catenina*. En estos pacientes se encontró una alta frecuencia de recurrencia de la enfermedad.

En los pacientes con antecedentes familiares de CCR se observó una elevada prevalencia de obstrucción o perforación al momento del diagnóstico así como también un predominio de tumores localizados en el colon derecho, invasión tumoral de la grasa periférica, presencia de necrosis en el tumor, estadíos pT<sub>3/4</sub>, niveles sanguíneos de CEA post-operatorio elevados. Los TP de estos pacientes expresaron fuertemente los antígenos *Lewis x/y* y *sialil Lewis x/a*; asimismo, se halló ausencia o expresión débil de la mucina MUC2. Estos pacientes también presentaron un reducido tiempo libre de progresión.

Por otra parte, aquellos pacientes que se diagnosticaron luego de la obstrucción y/o perforación intestinal o por hematoquexia, sus TP se correlacionaron con un alto grado nuclear, invasión linfática tumoral, estadíos pT<sub>3/4</sub>, niveles sanguíneos de CEA pre-operatorio elevado. MUC2, MUC5AC, *sialil Lewis a* se encontraron preferentemente ausentes o con un índice de expresión débil mientras que *Tn* se halló expresado fuertemente; estos pacientes tuvieron TP altamente recurrentes.

Los cánceres ubicados en el colon derecho se caracterizaron por ser de alto grado nuclear, invadir los vasos sanguíneos, por contener áreas de necrosis tumoral, diagnosticarse en estadíos avanzados (pT<sub>3/4</sub>) y presentar en sus TP preferentemente un índice de expresión fuerte de MUC1 y débil de *Lewis y*.

Los adenocarcinomas mucinosos puros, aquellos con componente mucinoso y los de anillo de sello fueron encontrados preferentemente en el colon derecho, luego de una pérdida de peso de más de 10kg en los últimos dos meses, en su mayoría sin necrosis tumoral y con bajo grado nuclear e índice mitótico. Estos tumores presentaron un predominio de expresión fuerte de MUC2, *Lewis x* y *β-catenina* mientras que en los adenocarcinomas puros prevaleció la expresión fuerte de CEA conjuntamente con niveles sanguíneos pre-operatorio de CEA y post-operatorio de CEA y CA 19-9 elevados.

La invasión de la capa serosa del intestino grueso se correlacionó con niveles sanguíneos de CA 19-9 post-operatorio elevados y una expresión fuerte de los

antígenos *Lewis x* y *sialil Lewis x* en sus TP. El compromiso tumoral de la grasa periférica colorrectal fue observada preferentemente en los tumores localizados en el colon derecho, asociados a niveles sanguíneos de CEA pre-operatorio elevado, niveles sanguíneos de CA 19-9 pre- y post-operatorio elevado y a la expresión fuerte de *sialil Lewis x*/CEA y ausencia o expresión débil de la mucina MUC2 en sus TP. La invasión tumoral del tejido perineural fue observada más frecuentemente en los tumores indiferenciados, con alto grado nuclear y expresión fuerte de CEA en sus TP.

Se observó una correlación positiva entre los tumores pobremente diferenciados y el alto grado nuclear e índice mitótico tumoral y la presencia de invasión vascular; estos pacientes además, se diagnosticaron en un estadio pN3 y con ausencia o expresión débil de CEA en sus TP.

Los tumores con alto grado nuclear fueron hallados frecuentemente en el colon derecho y más aun cuando éstos invadían la grasa periférica, el perineuro, los vasos angiolinfáticos y/o existía necrosis tumoral. Los pacientes con este tipo de tumores se presentaron en estadios pT<sub>3/4</sub>, estadio pN<sub>3</sub> y con ausencia de *Tn* y *Lewis* en sus TP, además de un índice de expresión fuerte *sialil Lewis x*.

La presencia de invasión vascular tumoral se asoció con tumores ubicados del colon derecho, indiferenciados y con alto grado nuclear. Cuando dicha invasión se encontró presente, los pacientes tuvieron niveles sanguíneos de CEA post-operatorio elevados y un índice de expresión fuerte de la mucina MUC1 en sus TP. Por otra parte, se observó que los tumores con invasión linfática también presentaron invasión vascular y perineural, grado nuclear e índice mitótico tumoral alto, niveles sanguíneos de CEA y CA 19-9 pre- y CEA post-operatorios elevados y un índice de expresión fuerte de MUC1 y *sialil Lewis a* en sus TP. La presencia de necrosis en estos tumores se correlacionó con niveles sanguíneos de CEA y CA 19-9 pre-operatorios elevados, grado nuclear e índice mitótico elevados y un índice de expresión fuerte de *Lewis x* en su TP.

Los estadios pT<sub>3/4</sub> del CCR se correlacionaron con niveles sanguíneos pre- y post-operatorios de CEA y CA 19-9 elevados y con presencia en sus TP de invasión perineural, invasión linfática, alto grado nuclear y expresión fuerte tanto de MUC1 como de CEA así como también ausencia, o expresión débil, de la mucina MUC2.

Los pacientes con estadio pN<sub>2</sub> también presentaron niveles pre-operatorios de CEA y CA 19-9 elevados e invasión de la grasa pericolónica con presencia de invasión perineural; estos tumores eran más indiferenciados y con alto grado nuclear. La frecuencia de recurrencia en este tipo de tumores fue elevada.

Los niveles sanguíneos elevados de CEA pre-operatorio se asociaron con expresión fuerte de la MUC1 y *Tn* y ausencia de MUC2 en los TP. Por otra parte, el nivel sanguíneo de CA 19-9 pre-operatorio elevado se correlacionó con expresión fuerte de *Tn* y *sialil Lewis a* en los TP.

Finalmente, los pacientes cuya enfermedad progresó rápidamente fueron diagnosticados a edades tempranas cuyos tumores fueron más indiferenciados y con invasión perineural. Estos pacientes presentaron compromiso ganglionar (estadío pN<sub>2</sub>) y con niveles sanguíneos de CEA y CA 19-9 pre-operatorio elevados y expresión fuerte de *sialil Lewis x* y *Tn* en sus TP y ausencia, o expresión débil, de los antígenos MUC2 y *Lewis x*. La sobrevida global de estos pacientes fue reducida. Contrariamente, la presencia de un índice de expresión fuerte de la mucina MUC2 en los TP se correlacionó con una mayor sobrevida global y tiempo libre de progresión

## **2.6. Características clinicopatológicas de los pacientes estadio II y III con CCR y la sobrevida**

### **2.6.1. Análisis Univariado.**

No se encontró ninguna correlación estadísticamente significativa entre las variables clinicopatológicas de los pacientes con estadio II y la sobrevida (Tabla 56).

En los pacientes con estadio III (Tabla 57) se observó una correlación estadísticamente significativa entre el grado de compromiso ganglionar y la SG; los pacientes con estadio pN<sub>1</sub> presentaron una SG mayor que los pacientes con estadio pN<sub>2</sub> ( $p < 0,05$ ). Asimismo, aquellos con invasión tumoral de la capa subserosa tuvieron un menor TLE ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 56:** Relación entre las variables clinicopatológicas con estadio II y la sobrevida.

		n	SG <sup>#</sup> (±ES) (en años)	p	TLE* (±ES) (en meses)	p
<b>Edad</b>				NS <sup>^</sup>		NS
	≤40	0	0,0		0,0	
	40-60	11	5,1 (1,1)		54,0 (13,6)	
	≥60	16	4,9 (0,9)		59,5 (11,3)	
<b>Género</b>				NS		NS
	Masculino	16	3,9 (0,8)		45,0 (10,6)	
	Femenino	11	6,5 (1,0)		75,2 (12,9)	
<b>Ant. CCR fliar<sup>1</sup></b>				NS		NS
	No	23	5,0 (0,7)		58,1 (9,4)	
	Si	4	4,8 (1,8)		52,5 (22,7)	
<b>DBT<sup>2</sup></b>				NA <sup>&amp;</sup>		NA
	No	24	5,2 (0,7)		60,1 (9,2)	
	Si	1	1,1		13,4	
<b>HTA<sup>3</sup></b>				NS		NS
	No	18	5,0 (0,8)		58,9 (10,8)	
	Si	7	5,1 (1,4)		56,3 (17,4)	
<b>Cirugía previa</b>				NS		NS
	Apendicectomía	5	5,9 (1,6)		63,1 (20,7)	
	Colecistectomía	1	4,4		53,2	
	Ninguna	21	4,7 (0,8)		56,1 (10,1)	
<b>Consumo tabaco</b>				NS		NS
	No	8	5,1 (1,3)		57,2 (16,4)	
	Si	18	4,9 (0,8)		57,5 (10,9)	
<b>Consumo alcohol</b>				NS		NS
	No	13	6,0 (1,0)		69,7 (12,7)	
	Si	11	3,9 (1,1)		45,1 (13,8)	
<b>IMC<sup>4</sup></b>				NS		NS
	≤25	6	4,6 (1,5)		52,2 (19,0)	
	25-30	10	4,2 (1,2)		45,2 (14,7)	
	≥30	5	7,2 (1,7)		87,8 (20,9)	
<b>PP<sup>5</sup></b>				NS		NS
	<10	12	3,4 (0,9)		39,4 (12,4)	
	≥10	7	6,5 (1,2)		70,7 (16,2)	
<b>Presentación de la enf.</b>				NA		NA
	Dolor abdominal	6	4,5 (1,5)		55,0 (18,7)	
	CRE <sup>6</sup>	3	2,3 (2,1)		20,9 (26,4)	
	Obst. y/o perf.	2	3,1		32,4	
	Hematoquezia	8	5,9 (1,3)		66,7 (16,2)	
	Anemia	1	2,9		35,8	
<b>Localización tumoral</b>				NS		NS
	Cáncer de colon	20	5,2 (0,8)		62,5 (9,9)	
	Cáncer de recto	7	4,1 (1,3)		42,5 (16,8)	
<b>Sitio de afección colónica</b>				NA		NA
	C. ascendente	3	1,9 (2,0)		23,3 (25,7)	
	C. transverso	4	8,0 (1,7)		97,4 (22,2)	
	C. descendente	1	5,4		42,9	
	C. sigmoides	13	5,6 (0,9)		67,2 (12,3)	
<b>Tamaño tumoral</b>				NS		NS
	<5 cm	7	5,7 (1,4)		62,9 (17,3)	
	≥5 cm	16	4,8 (0,9)		57,2 (11,4)	
<b>Tratamiento quirúrgico</b>				NS		NS
	Hemicolectomía	8	3,7 (1,2)		44,8 (14,8)	
	Resec. segmentaria	13	6,4 (0,9)		75,9 (11,6)	
	Operación de Miles	6	3,4 (1,4)		33,7 (17,2)	
<b>Nº gl. resecaados</b>				NS		NS
	<12	20	5,2 (0,8)		59,1 (9,9)	
	≥12	6	3,5 (1,4)		42,1 (18,1)	

<sup>#</sup>SG= Sobrevida global (en años), <sup>\*</sup>TLP = Tiempo libre de progresión (en meses), <sup>&</sup>NA=No aplicable el test, <sup>^</sup>NS=No significativo, <sup>1</sup>Ant.CCR fliar=Antecedente de cáncer CCR familiar, <sup>2</sup>DBT= diabetes mellitus, <sup>3</sup>HTA= hipertensión arterial, <sup>4</sup>IMC= Índice de masa corporal, <sup>5</sup>PP=pérdida de peso en los últimos 2 meses, <sup>6</sup>CRE= Cambio en el ritmo evacuatorio.

**Tabla 56:** Relación entre las variables clinicopatológicas con estadio II y la sobrevida.

	n	SG <sup>#</sup> (±ES) (en años)	p	TLE* (±ES) (en meses)	p
<b>Histología tumoral</b>			NA <sup>&amp;</sup>		NA
Adenocarcinoma	16	5,0 (0,8)		58,5 (10,5)	
ACM <sup>7</sup>	9	3,8 (1,1)		42,2 (14,0)	
Carcinoma mucinoso	2	9,5		116,0	
<b>Ulceración tumoral</b>			NS <sup>^</sup>		NS
No	6	3,3 (1,5)		39,9 (18,8)	
Si	17	5,9 (0,9)		67,6 (11,2)	
<b>Inv. subserosa</b>			NS		NS
No	19	5,2 (0,8)		60,3 (10,3)	
Si	3	2,2 (2,1)		23,1 (26,0)	
<b>Inv. Serosa</b>			NS		NS
No	21	5,3 (0,8)		62,1 (10,2)	
Si	3	3,1 (2,2)		32,5 (27,0)	
<b>Inv. Grasa</b>			NS		NS
No	15	4,7 (1,0)		53,7 (12,5)	
Si	8	5,8 (1,3)		68,2 (17,1)	
<b>Inv. linfática</b>			NS		NS
No	23	5,0 (0,7)		57,9 (9,6)	
Si	3	4,8 (2,1)		58,1 (26,7)	
<b>Grado histológico</b>			NA		NA
1	23	4,4 (0,6)		50,2 (8,3)	
2	3	6,2 (1,9)		76,2 (23,0)	
3	1	13,4		163,1	
<b>Grado nuclear</b>			NA		NA
1	15	4,1 (0,9)		46,4 (11,4)	
2	10	6,3 (1,1)		74,5 (13,9)	
3	2	4,3		53,1	
<b>Estadio pT<sup>8</sup></b>			NS		NS
T1	0	0,0		0,0	
T2	0	0,0		0,0	
T3	18	4,6 (0,8)		53,4 (10,6)	
T4	9	5,6 (1,2)		65,1 (15,0)	
<b>Tratamiento quimioterápico</b>			NA		NA
5-FU-LV <sup>9</sup>	23	4,9 (0,6)		56,9 (8,5)	
5-FU-LV + Oxaliplatino	2	3,2		155,2	
5-FU-LV + Metotrexato	1	12,8		29,0	
<b>Sitio de progresión</b>			NS		NS
Metástasis hepática	3	3,0 (1,2)		33,6 (8,5)	
Otros sitios metastáticos	6	3,3 (0,8)		27,9 (6,0)	

<sup>#</sup>SG= Sobrevida global (en años), \*TLP = Tiempo libre de progresión (en meses),  
<sup>&</sup>NA=No aplicable el test, <sup>^</sup>NS=No significativo, <sup>7</sup>ACM=Adenocarcinoma con componente mucinoso, <sup>8</sup>Estadio pT=Estadificación para cáncer colorrectal establecido por la AJCC (American Joint Committee on Cancer), Sexta edición (2002), <sup>9</sup>5-FU-LV= 5-Fluorouracilo-Leucovorina.



**Tabla 57:** Relación entre las variables clinicopatológicas con estadio III y sobrevida.

	n	SG <sup>#</sup> (±ES) (en años)	p	TLE* (±ES) (en meses)	p
<b>Edad</b>			NA <sup>&amp;</sup>		NA
≤40	2	2,0		22,2	
40-60	11	2,6 (0,7)		25,3 (7,7)	
≥60	20	2,9 (0,5)		30,0 (5,7)	
<b>Género</b>			NS <sup>^</sup>		NS
Masculino	19	3,0 (0,5)		31,2 (5,7)	
Femenino	14	2,5 (0,6)		23,6 (6,7)	
<b>Ant. CCR fliar<sup>1</sup></b>			NS		NS
No	29	2,7 (0,4)		28,8 (4,6)	
Si	4	3,1 (1,2)		22,3 (12,6)	
<b>DBT<sup>2</sup></b>			NS		NS
No	29	2,6 (0,4)		27,4 (4,7)	
Si	3	4,9 (1,4)		34,5 (14,8)	
<b>HTA<sup>3</sup></b>			NS		NS
No	12	2,4 (0,7)		27,6 (7,4)	
Si	19	3,1 (0,5)		29,5 (5,9)	
<b>Cirugía previa</b>			NS		NS
Apendicectomía	3	2,4 (1,4)		29,6 (14,3)	
Colecistectomía	6	1,5 (1,0)		14,6 (10,1)	
Ninguna cirugía previa	24	3,1 (0,5)		31,1 (5,0)	
<b>Consumo tabaco</b>			NS		NS
No	12	2,4 (0,7)		27,6 (7,4)	
Si	19	3,1 (0,5)		29,5 (5,9)	
<b>Consumo alcohol</b>			NS		NS
No	17	3,6 (0,5)		35,1 (6,0)	
Si	14	2,0 (0,6)		20,9 (6,6)	
<b>IMC<sup>4</sup></b>			NS		NS
≤25	15	2,6 (0,6)		29,4 (6,7)	
25-30	10	3,8 (0,8)		32,6 (8,2)	
≥30	6	1,9 (1,0)		21,6 (10,6)	
<b>PP<sup>5</sup></b>			NS		NS
<10	16	3,6 (0,6)		33,2 (6,4)	
≥10	11	2,0 (0,7)		22,2 (7,7)	
<b>Presentación de la enf.</b>			NA		NA
Dolor abdominal	10	2,0 (0,5)		16,7 (5,4)	
CRE <sup>6</sup>	4	5,7 (0,8)		68,1 (8,5)	
Obstrucción y/o perforación	2	3,4		23,3	
Hematoquezia	12	1,7 (0,4)		20,8 (4,9)	
Anemia	1	10,2		54,5	
<b>Localización tumoral</b>			NS		NS
Cáncer de colon	20	3,3 (0,5)		30,8 (5,6)	
Cáncer de recto	13	2,0 (0,6)		23,7 (6,9)	
<b>Sitio de afección colónica</b>			NA		NA
Colon ascendente	8	3,5 (1,0)		33,6 (10,80)	
Colon transverso	1	5,3		33,2	
Colon descendente	3	3,3 (1,7)		38,0 (17,6)	
Colon sigmoides	9	3,0 (1,0)		26,4 (10,1)	
<b>Tamaño tumoral</b>			NS		NS
<5 cm	16	2,8 (0,6)		25,9 (6,3)	
≥5 cm	13	2,9 (0,7)		30,7 (7,0)	
<b>Tratamiento quirúrgico</b>			NS		NS
Hemicolectomía	12	3,6 (0,7)		33,6 (7,3)	
Resección segmentaria	12	2,0 (0,8)		24,8 (8,9)	
Operación de Miles	8	2,8 (0,7)		26,7 (7,3)	
<b>Nº gl. resecaados</b>			NS		NS
<12	20	3,1 (0,5)		29,2 (5,6)	
≥12	13	2,4 (0,7)		26,1 (7,0)	

<sup>#</sup>SG= Sobrevida global (en años), \*TLP = Tiempo libre de progresión (en meses), <sup>&</sup>NA=No aplicable el test, <sup>^</sup>NS=No significativo, <sup>1</sup>Ant.CCR fliar=Antecedente de cáncer CCR familiar, <sup>2</sup>DBT= diabetes mellitus, <sup>3</sup>HTA= hipertensión arterial, <sup>4</sup>IMC= Índice de masa corporal, <sup>5</sup>PP=pérdida de peso en los últimos 2 meses, <sup>6</sup>CRE= Cambio en el ritmo evacuatorio.

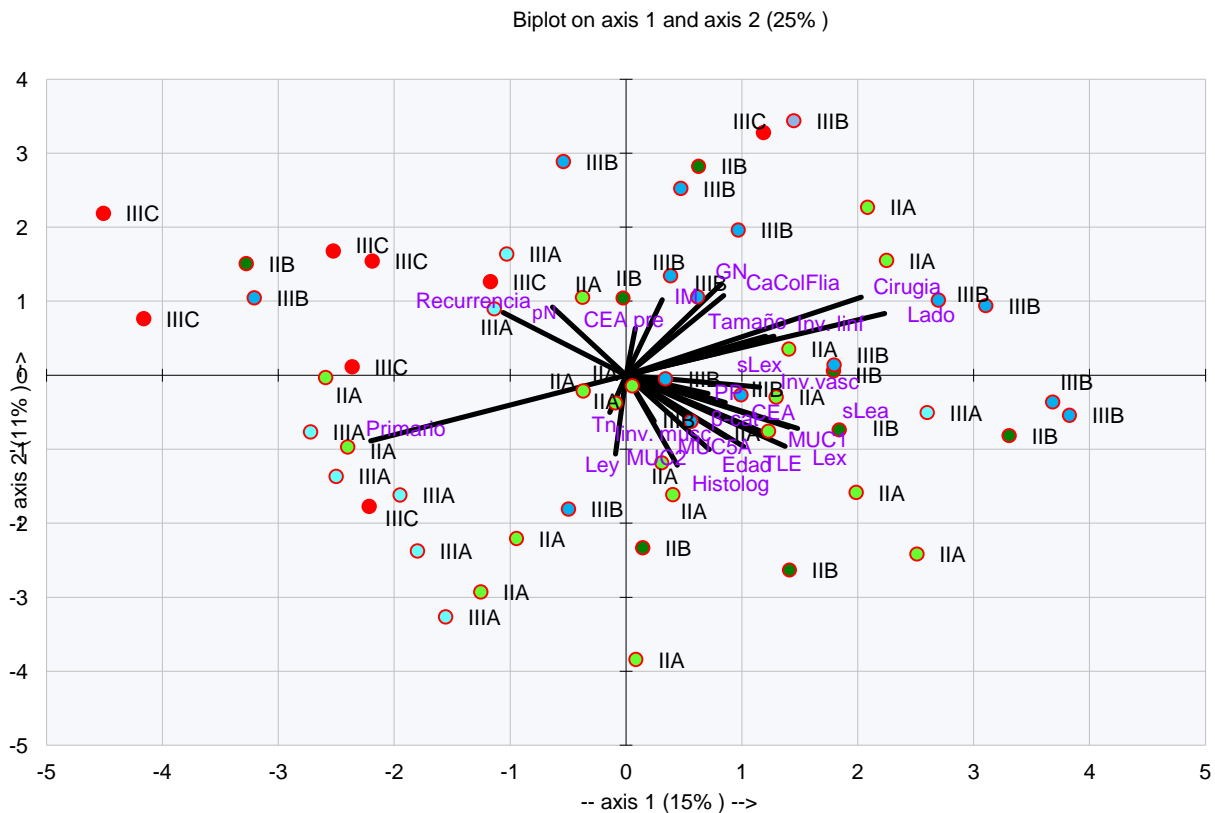
**Tabla 57:** Relación entre las variables clinicopatológicas con estadio III y sobrevida.

	n	SG <sup>#</sup> (±ES) (en años)	p	TLE* (±ES) (en meses)	p
<b>Histología tumoral</b>			NA <sup>&amp;</sup>		NA
Adenocarcinoma	23	2,6 (0,4)		27,4 (4,6)	
ACM <sup>7</sup>	6	3,6 (0,9)		28,6 (9,1)	
Carcinoma mucinoso	3	0,8 (1,3)		9,0 (12,9)	
Carc. anillo de sello	1	7,7		94,1	
<b>Ulceración tumoral</b>			NS <sup>^</sup>		NS
No	5	2,5 (1,0)		17,3 (12,1)	
Si	19	2,9 (0,5)		33,8 (6,2)	
<b>Inv. subserosa</b>			NS		S <sup>**</sup>
No	22	3,2 (0,5)		34,5 (5,2)	
Si	7	1,6 (0,9)		10,5 (9,3)	
<b>Inv. serosa</b>			NA		NA
No	26	3,1 (0,5)		30,9 (5,1)	
Si	2	3,9		29,7	
<b>Inv. grasa</b>			NS		NS
No	17	3,5 (0,6)		34,9 (6,2)	
Si	12	1,8 (0,7)		19,6 (7,4)	
<b>Inv. vascular</b>			NS		NS
No	28	2,6 (0,4)		27,6 (4,8)	
Si	4	4,3 (1,2)		35,1 (12,7)	
<b>Inv. enfática</b>			NS		NS
No	23	3,0 (0,5)		29,7 (5,3)	
Si	9	2,6 (0,8)		25,7 (8,5)	
<b>Inv. perineural</b>			NS		NS
No	26	3,0 (0,4)		29,6 (4,9)	
Si	6	2,1 (1,0)		24,0 (10,4)	
<b>Grado histológico</b>			NS		NS
1	20	2,5 (0,5)		25,0 (5,6)	
2	8	3,9 (0,8)		36,3 (8,9)	
3	5	2,1 (1,1)		26,4 (11,3)	
<b>Grado nuclear</b>			NS		NS
1	9	2,7 (0,8)		34,6 (8,4)	
2	18	2,8 (0,6)		32,2 (5,9)	
3	6	2,7 (1,0)		20,4 (10,3)	
<b>Estadio pT<sup>8</sup></b>			NS		NS
T1	0	0,0		0,0	
T2	13	3,0 (0,6)		30,2 (6,8)	
T3	8	3,9 (0,8)		36,8 (8,7)	
T4	12	1,8 (0,7)		19,6 (7,1)	
<b>Estadio pN<sup>8</sup></b>			S		NS
0	0	0,0		0,0	
1	24	3,3 (0,4)		32,2 (4,9)	
2	9	1,4 (0,8)		16,8 (8,1)	
<b>Tratamiento quimioterápico</b>			NA		NA
5-FU-LV <sup>9</sup>	29	2,9 (0,4)		29,2 (4,7)	
5-FU-LV + Oxaliplatino	2	1,6		19,7	
<b>Sitio de progresión</b>			NS		NS
Metástasis hepática	5	2,5 (0,9)		20,0 (8,7)	
Otros sitios metastáticos	7	2,7 (0,7)		23,3 (7,3)	

<sup>#</sup>SG= Sobrevida global (en años), \*TLP = Tiempo libre de progresión (en meses), <sup>&</sup>NA=No aplicable el test, <sup>^</sup>NS=No significativo, <sup>\*\*</sup>S=Significativo, <sup>7</sup>ACM=Adenocarcinoma con componente mucinoso, <sup>8</sup>Estadio pT y Estadio pN= Estadificación para cáncer colorrectal establecido por la AJCC (American Joint Committee on Cancer), Sexta edición (2002), <sup>9</sup>5-FU-LV= 5-Fluorouracilo-Leucovorina.

## 2.6.2. Análisis multivariado.

Se realizó un análisis multivariado de Componentes Principales (Figura 94) con el fin de evaluar el comportamiento clinicopatológico de los pacientes con estadios II (A y B) y III (A, B y C).



**Figura 94:** Distribución de las variables clinicopatológicas según el análisis de Componentes Principales. Se identifica un predominio del estadio IIA en el área CP2-, IIB en el cuadrante CP1+/CP2-, IIIA en el cuadrante CP1-/CP2-, IIIB en CP1+/CP2+ y finalmente el estadio IIIC en el cuadrante CP1-/CP2+.

Los pacientes con estadio IIA compartieron el área con aquellos con estadios IIB, IIIA y IIIB. En estos pacientes predominó el cáncer de colon con un índice de expresión fuerte tanto de la mucina MUC1 como del carbohidrato *Lewis x*.

El cuadrante donde prevaleció el estadio IIB fue ocupado también por algunos pacientes con estadios IIA y IIIB. En ellos se observó una correlación entre la expresión positiva de MUC2 en sus TP y un mayor TLP.

Los pacientes con estadio IIIA compartieron su área con algunos con estadios IIA, IIIB y IIIC. El cáncer de colon también predominó en estos pacientes pero, a diferencia de los estadios IIA mencionados, sus TP presentaron un índice de expresión fuerte de *Lewis y*.

En el área donde se agruparon los pacientes con estadio IIIB también fueron hallados otros con estadios IIA y IIB. Los tumores de colon de estos pacientes se ubicaron preferentemente en el lado derecho y con un alto grado nuclear e invasión linfática; asimismo, en estos TP fue encontrado una prevalencia del índice de expresión fuerte de *sialil Lewis x*. En su mayoría, estos pacientes presentaron antecedentes familiares de cáncer colorrectal.

Finalmente, los pacientes con una elevada recurrencia de su enfermedad fueron encontrados preferentemente en del área donde se agrupó el estadio IIIC; también fueron hallados en dicho área algunos pacientes con estadios IIA, IIB, IIIA y IIIB.

---

## Discusión

## Índice de discusión

A. Expresión de las mucinas y antígenos carbohidratos asociados a mucinas en el CCR.....	226
1) La secuencia normal-adenoma-carcinoma.....	226
2) Mucosa normal adyacente.....	231
3) Histología tumoral.....	233
4) La invasión tumoral.....	237
5) Presencia de necrosis en los TP y GLM.....	241
6) Epidemiología y riesgo de padecer CCR.....	241
7) Manifestaciones clínicas en el CCR.....	250
8) Localización del CCR.....	252
9) Tamaño tumoral.....	253
B. Estadificación.....	256
1) Estadío pT.....	255
2) Estadío pN.....	255
3) Estadío M.....	256
4) Estadíos I y II.....	257
5) Estadío III.....	259
6) Estadío IV.....	261
C. Determinaciones séricas y tisulares de CEA y CA 19-9.....	263
D. Pronóstico.....	264
E. Análisis multivariado de las variables clinicopatológicas en los pacientes con CCR.....	266

A pesar de los avances en el desarrollo de distintas estrategias terapéuticas en el CCR, la diseminación tumoral a órganos distantes ya sea vía hematológica o linfática, sigue siendo la mayor causa de muerte. Los indicadores pronósticos más comúnmente utilizados en la actualidad tales como el estadio tumoral y el grado histológico no logran predecir adecuadamente el curso clínico de la mayoría de los tumores malignos ni el comportamiento biológico de los mismos. Los pacientes con estadios precoces pueden tener un comportamiento similar a aquellos con estadios avanzados y dentro de estos últimos, hay quienes sucumben a su enfermedad más rápidamente que otros. Por tanto, es necesario caracterizar nuevos marcadores que pronostiquen la agresividad tumoral y que puedan predecir los pacientes que responderán a un determinado tratamiento. Asimismo, el estudio de nuevos antígenos asociados a tumor y su evaluación como blancos terapéuticos posiblemente resultará en una mayor supervivencia de los pacientes con CCR.

### **A. Expresión de las mucinas y antígenos carbohidratos asociados a mucinas en el CCR**

#### **1) La secuencia normal-adenoma-carcinoma**

La secuencia normal-adenoma-carcinoma propuesta por Jackman y Mayo en 1951 aun constituye un elemento esencial en la etiología del CCR. La presencia de un pólipo adenomatoso, o adenoma, como punto intermedio entre la presencia de una mucosa normal y el cáncer ha sido sustentada por tres observaciones: primero, estudios longitudinales han observado que la no escisión de los pólipos aumenta el riesgo de desarrollar CCR y su extirpación lo disminuye (Winawer SJ *et al*,1993); segundo, se han observado focos de carcinomas en los pólipos adenomatosos así como zonas adenomatosas en especímenes tumorales (Muto T *et al*,1975); por último, los pacientes que presentan síndromes que predisponen al desarrollo de adenomas, como la PAF, desarrollan CCR en la tercera o cuarta década de la vida si no se les realiza una colectomía preventiva (Rustgi AK *et al*, 1994). Si bien los pólipos mayores a 1 cm, con displasia severa y componente vellosa tienen mayor probabilidad de

transformación maligna (Winawer SJ *et al*, 1993), no todos los adenomas progresan a cáncer. Hasta el momento el grado de displasia es el marcador más sensible para determinar si un pólipo evolucionará a cáncer; sin embargo, la evaluación de la displasia es subjetiva e imprecisa ya que depende de quién realice la observación. Por lo cual, la determinación de marcadores moleculares que ayuden a identificar los cambios precoces en una transformación maligna son de crucial importancia.

Según Fearon y Vogelstein (1990) se necesitan al menos siete alteraciones genéticas para que se desarrolle un CCR a través de la secuencia mencionada tales como la alteración del cromosoma 5, la pérdida de la metilación del ADN, una mutación en el gen Ras, la pérdida del gen DDC en el cromosoma 18, la pérdida del gen p53 en el cromosoma 17 y la pérdida de otros cromosomas. Estas alteraciones genéticas podrían facilitar la expresión de determinadas moléculas que le conferirán a estas células un fenotipo biológico particular. En este sentido, hemos observado en la secuencia normal-adenoma-carcinoma un aumento de la expresión de MUC1 y de antígenos carbohidratos asociados (*Tn*, *Lewis y/x* y *sialil Lewis a/x*). Estos antígenos presentaron un cambio en el patrón de expresión a medida que la secuencia fue progresando; cuando su reactividad fue positiva en los tejidos normales la expresión fue predominantemente en el citoplasma mientras que en los adenomas fue mixta y en los carcinomas en la membrana apical. Asimismo, la mayoría de estos antígenos presentaron un aumento progresivo de su intensidad de expresión, del porcentaje de reactividad en la superficie del tejido y un mayor porcentaje del índice de expresión fuerte a medida que avanzó la secuencia.

En general, se ha observado que la expresión de MUC1 en el tejido colorrectal normal es escasa y principalmente intracitoplásmica (Cao Y *et al*, 1997). Contrariamente, en los adenomas no hay aun datos concluyentes: por su parte se ha ausencia de expresión en todos los adenomas estudiados (Ishizu H *et al*, 2004), por su parte X. W. Yu y colaboradores (2007) encontraron expresión de MUC1 en el 12,7% (19/150) de los adenomas colorrectales. En nuestro trabajo observamos expresión en el 43,5% de los adenomas (26,1% de ellos con un índice de expresión fuerte); la reactividad aumentó gradualmente a medida que avanzaba el grado de displasia. Asimismo, y en coincidencia con Y. Ajioka y colaboradores (1997), encontramos un



70% de expresión de MUC1 en los adenomas tubulares y sólo un 30% en los tubulovelloso.

La síntesis y secreción de las mucinas son una característica común de los epitelios glandulares incluido el epitelio intestinal (Ho SB *et al*, 1993). En las células caliciformes del epitelio colónico normal, la mucina más expresada es la MUC2 (Chang SK *et al*, 1994) mientras que las mucinas MUC1 y MUC5AC se encuentran raramente (Andrews CW J *et al*, 1993; Ho SM *et al*, 1996; Croce MV *et al*, 2007). La expresión de MUC2 se encontraría relacionada con la transformación maligna colorrectal especialmente en la secuencia normal-adenoma-carcinoma. Observamos una disminución de la expresión de MUC2 y MUC5AC a medida avanzaba la secuencia. Asimismo, el patrón de expresión fue cambiando; se halló un predominio de tinción mixta en los especímenes normales y adenomas y preferentemente en la membrana apical en los carcinomas (al igual que los GLM). La intensidad de la reacción de ambas mucinas fue aumentando con la progresión de la secuencia, siendo la intensidad de ++/+++ más frecuente en los carcinomas que en las muestras control. Respecto al grado de displasia de los adenomas, nuestro trabajo coincide con otros (Aihua L *et al*, 2001; Mizoshita T *et al*, 2007) que hallaron también disminución de la expresión de MUC2 y MUC5AC en los adenomas con displasia severa respecto a los pólipos con displasia leve y a los adenomas tubulovelloso respecto a los tubulares. Sin embargo, algunos autores han observado que el número de células reactivas y la intensidad de tinción de MUC5AC son mayores en los adenomas vellosos con displasia moderada que en aquellos con displasia severa (Buisine MP *et al*, 1996; Bartman AE *et al*, 1999; Biemer-Hüttman *et al*, 1999; Longman RJ *et al*, 2000; Yu XW *et al*, 2007).

Los antígenos carbohidratos asociados a las mucinas también tienen un rol importante en la carcinogénesis colónica. Se ha observado un cambio en el patrón y la intensidad de expresión de *Tn* tanto en los pólipos hiperplásicos como en los adenomas displásicos. En las lesiones con displasia severa la intensidad es mayor y el patrón citoplasmático más difuso que en las lesiones displásicas leves o moderadas (Itzkowitz SH *et al*, 1992; Berriel E *et al*, 2005). Todos los especímenes normales y adenomas colorrectales analizados en esta Tesis presentaron expresión de *Tn* en el citoplasma específicamente en la región supranuclear, zona donde habitualmente se

encuentra el aparato de Golgi, a diferencia de los carcinomas en donde la reactividad citoplasmática fue menor. En las displasias severas este antígeno se expresó un 25% menos que en las leves o moderadas. Estas observaciones coinciden con las halladas en otros cánceres como por ejemplo de mama (Wang BL *et al*, 1997), vías biliares e hígado (Sasaki M *et al*, 1999), estómago (David L *et al*, 1992), ovario (Ghazizadeh M *et al*, 1997) y cuello uterino (Hirao T *et al*, 1993, Carrilho C *et al*, 2000).

Respecto a la reactividad de *sialil Lewis a* en la secuencia mencionada, varios trabajos han encontrado resultados similares a los nuestros (Itzkowitz SH *et al*, 1988; Takabayashi T *et al*, 1993; Nakagoe T *et al*, 1994; Tucci GF *et al*, 1999; Matsui T *et al*, 2004), es decir, el área de tinción en más del 60% de la superficie del espécimen estudiado aumentó con la secuencia normal-adenoma-carcinoma; de la misma manera lo hicieron el índice de expresión fuerte y la reactividad en la membrana apical. Los niveles citoplasmáticos de este antígeno pueden variar de acuerdo al tamaño, el tipo histológico y el grado de displasia de los pólipos. Se ha observado en los pólipos con mayor riesgo de transformación maligna mayores valores intracitoplasmáticos (>214U/mg) que aquellos con bajo riesgo de transformación (Salces I *et al*, 2004).

No hay coincidencias en la bibliografía respecto a la expresión de *Lewis x* en el tejido colorrectal normal; algunos grupos de investigadores han encontrado una baja expresión de este antígeno (Wolf BC *et al*, 1989; Salem RR *et al*, 1993) mientras que otros han hallado una alta expresión (Gong E *et al*, 1985; Nakagoe T *et al*, 1994; Baldus SE *et al*, 1995; Croce MV *et al*, 2007). Las razones de estas diferencias podrían estar dadas por los diferentes anticuerpos empleados o bien por las distintas poblaciones investigadas. Si bien nosotros encontramos una elevada expresión de *Lewis x* en los tejidos normales y adenomas, su intensidad fue principalmente débil. Por otra parte, en los carcinomas se observó con mayor frecuencia un índice de expresión fuerte a pesar de que la reactividad fue levemente mayor. Este hallazgo coincide con lo publicado hasta el presente (Shi ZR *et al*, 1984; Gong E *et al*, 1985; Ho SB *et al*, 1988; Hakomori S *et al*, 1989; Marcial MA *et al*, 1993; Nakagoe T *et al*, 1994, 2000).

A pesar de que los porcentajes de reactividad de *sialil Lewis x* en los adenomas y carcinomas fueron elevados, el índice de expresión en los adenoma fue débil y en los

carcinomas fuerte; estos hallazgos fueron observados previamente por otros autores (Itzkowitz SH *et al*, 1986; Haniski C *et al*, 1993; Nakagoe T *et al*, 1994).

Hay datos contradictorios respecto del rol de *sialil Lewis x* en la carcinogénesis. Por un lado, se lo ha correlacionado positivamente con el avance de la secuencia, siendo mayor su expresión en los adenomas con displasia severa (Hanski C *et al*, 1990; Hanisch FG *et al*, 1992) mientras que por otro hay trabajos como el de S. E. Baldus y colaboradores (2002) que observaron reactividad en el 40% de los adenomas de bajo grado y sólo un 25% en los de alto grado. Coincidentemente con los resultados de S. E. Baldus observamos en los adenomas con displasia severa, un 60% menos *sialil Lewis x* que en los adenomas con displasia leve o moderada.

Por su parte, *Lewis y* se encuentra altamente expresado en el tejido colónico normal especialmente en el íleon, ciego y colon ascendente y en mínima cantidad en el resto del colon y recto (Kim YS *et al*, 1986). También observamos una alta expresión en los especímenes normales; no obstante, esta reacción fue predominantemente débil y limitada a un sector muy reducido de la superficie colorrectal, la mayoría se halló en menos del 30% de la muestra (a diferencia de los carcinomas en los cuales se expresó fuertemente y en más del 60%). En los adenomas, la expresión de éste antígeno fue asociada con el potencial maligno (Kim YS *et al*, 1986; Waldok A *et al*, 1989; Zamcheck N *et al*, 1988; Baldus SE *et al*, 2002); coincidentemente, hemos observado mayor expresión de *Lewis y* en los adenomas con displasia severa que en aquellos con displasia leve-moderada.

De forma similar a lo observado por otros autores (Fischbach W *et al*, 1988; Imamura Y *et al*, 1990; Guadagni F *et al*, 1997), hallamos un aumento de la expresión de CEA en los adenomas con displasias moderadas y severas respecto a aquellos con displasia leve; asimismo, todos aquellos con displasia severa y del tipo tubulovelloso expresaron el antígeno en más del 60% del área del espécimen.

A pesar de que puede hallarse una alta expresión del antígeno carcinoembrionario en el tejido colorrectal normal, adenomas y carcinomas (Kuroki M *et al*, 1988; Croce MV *et al*, 2007), el patrón de expresión es diferente en las tres situaciones. Nosotros encontramos una disminución del patrón mixto y un aumento de la expresión en la membrana apical a medida que avanzó la secuencia normal-

adenoma-carcinoma. Varios trabajos han demostrado que este patrón se correlacionaría con el comportamiento biológico; los tumores que presentan un patrón mixto tendrían valores sanguíneos más elevados de CEA que aquellos con un patrón de membrana apical; asimismo, estos últimos tendrían menos probabilidad de metastatizar a los ganglios linfáticos (Teixeira CR *et al*, 1994; Tokunaga N *et al*, 1995; Nazato DM *et al*, 2009). Coincidentemente, hallamos que el 58,5% de los GLM no expresaron CEA cuando sus TP presentaron dicho antígeno en la membrana apical.

Todos los tejidos analizados en esta Tesis presentaron una alta reactividad de  $\beta$ -*catenina*; sin embargo, el patrón de expresión fue diferente en cada uno de los componentes de la secuencia normal-adenoma-carcinoma. En el tejido normal  $\beta$ -*catenina* se encontró predominantemente en las membranas basolaterales, con una intensidad de +/+++ y un índice de expresión débil; en los adenomas, la reactividad fue mayor en el citoplasma y en el núcleo mientras que en los carcinomas fue principalmente en el núcleo, con una intensidad de +++/+++ y un índice de expresión fuerte. La expresión en la membrana plasmática en los adenomas fue disminuyendo y la nuclear aumentando en relación con la progresión del grado de displasia. Asimismo se hallaron diferentes patrones de expresión de acuerdo al tipo de displasia; en los tubulovelloso fue principalmente membranoso y citoplásmica mientras que en los tubulares predominó el patrón nuclear. Estos hallazgos coinciden con la hipótesis de que  $\beta$ -*catenina* actuaría en la carcinogénesis colorrectal interactuando con genes nucleares potenciando así la transformación maligna y la progresión tumoral (Günther K *et al*, 1998; Kobayashi M *et al*, 2000; Han SA *et al*, 2006; Suzuki H *et al*, 2008; Pancione M *et al*, 2010).

## 2) Mucosa normal adyacente

Se ha sugerido que la mucosa normal adyacente al carcinoma ó “mucosa de transición” sería una especie de área pre-neoplásica debido al aumento de la expresión de algunos antígenos que no son encontrados en los tejidos normales y que usualmente los expresan los carcinomas (Shi ZR *et al*, 1984). Riddell R. H. y colaboradores (1977) refieren que esta mucosa, a diferencia del tejido normal, podría

ser una zona en donde se reflejan las alteraciones histoquímicas y morfológicas que están ocurriendo en el carcinoma.

Se han descrito alteraciones genéticas en la mucosa normal adyacente que podrían explicar la diferencia. Han X. Y. y colaboradores (2009) observaron que los carcinomas tienen 769 genes diferentes a los hallados en los tejidos normales (363 de ellos sobre- y 406 sub-expresados); por otra parte, la mucosa normal ubicada a 3 cm del carcinoma tienen 155 genes diferentes a la mucosa normal (52 sobre- y 103 sub-expresados) mientras que la mucosa localizada a 5 cm del carcinoma presentaron 250 genes diferentes (46 sobre- y 184 sub-expresados). Este trabajo concluye en que si bien las diferencias entre la mucosa normal y la adyacente al TP son pequeñas comparada con las observadas entre la mucosa normal y el carcinoma, habría que considerar a esta zona como diferente al tejido normal. Recientemente, E. Rampazzo y colaboradores (2010) observaron que las células ubicadas en esta zona también tienen diferentes longitudes de telómeros comparados con los hallados en la mucosa normal.

Coincidentemente con lo descrito por otros autores (Atkinson BF *et al*, 1982; Arends JW *et al*, 1983; Shi ZR *et al*, 1984; Gong E *et al*, 1985; Yuan M *et al*, 1986; Iitzkowitz SH *et al*, 1988, 1989; Cao Y *et al*, 1995; Gebauer G *et al*, 1997; Kocer B *et al*, 2002; Nakagoe T *et al*, 2000), en nuestro trabajo observamos mayor expresión de la mucina MUC1 y *Lewis x* en la mucosa normal adyacente al carcinoma que en los especímenes normales estudiados. Al igual que *sialil Lewis x*, los antígenos mencionados presentaron una menor expresión en la mucosa normal adyacente que la encontrada en los carcinomas. MUC5AC presentó una disminución de expresión de forma gradual al comparar la hallada en los tejidos normales, glándulas normales adyacentes al carcinoma y la encontrada en los carcinomas.

Estos hallazgos reforzarían el concepto de que la mucosa normal adyacente al carcinoma tendría características histológicas compartidas, es decir, por un lado expresaría moléculas halladas habitualmente en la mucosa normal (ej. MUC5AC) pero por otro antígenos encontrados frecuentemente en los carcinomas (ej. *sialil Lewis x*).

### 3) Histología tumoral

Los carcinomas mucinosos comprenden el 10-15% de los carcinomas colorrectales y han sido asociados con peor pronóstico que los adenocarcinomas puros (Chiang JM *et al*, 2003). Los factores que influyen tal agresividad son motivo de estudio. Se ha sugerido que la presencia de una excesiva cantidad de mucina extracelular podría facilitar el crecimiento tumoral por disección a través de los planos del tejido normal y que la expresión de determinadas mucinas podría tener un rol en el comportamiento clinicopatológico en estos tumores, posiblemente a través del escape al reconocimiento inmunológico (Byrd JC *et al*, 2004; Legrier ME *et al*, 2004; Molavi D *et al*, 2008). Siguiendo esta línea de investigación encontramos una mayor expresión de las mucinas MUC1 y MUC2 en los TP y en los ganglios con metástasis de carcinomas mucinosos que en los TP y ganglios con metástasis de adenocarcinomas puros; estos hallazgos coinciden con lo descrito previamente por otros autores (Manne U *et al*, 2000; Baldus SE *et al*, 2004; Ishizu H *et al*, 2004; Onodera M *et al*, 2009). En una línea celular de CCR mucinoso humana (C1a) Cho M. y colaboradores (1997) observaron mayor expresión de ARNm y glicoconjugados de MUC2 que en una línea celular humana de adenocarcinoma moderadamente diferenciado; esta observación fue luego comprobada mediante el análisis de 25 tejidos mucinosos y 35 adenocarcinomas humanos en donde además se halló un aumento de la expresión de los carbohidratos de cadena corta *T*, *Tn*, *sTn* y una disminución de los de cadena larga como es el caso de *sialil Lewis x*. Cuando se examinó el comportamiento biológico de C1a en ratones se encontró que estas células tenían una baja colonización hepática sugiriendo de esta manera que el comportamiento agresivo de los tumores mucinosos estaría más relacionado con la invasión local que con la metástasis a distancia como habitualmente ocurre en los adenocarcinomas. En este sentido, A. Konno y colaboradores (2002) encontraron que la expresión de *Lewis x* en los adenocarcinomas puros se correlacionó más con la metástasis hepática que con la invasión linfática, ganglionar o peritoneal. En coincidencia con otros autores, nosotros observamos mayor expresión de este carbohidrato de cadena larga en los adenocarcinomas puros respecto de los mucinosos; además, hallamos mayor expresión de *sialil Lewis a* (otro

carbohidrato de cadena larga) en los tumores con componente mucinoso que en los adenocarcinomas puros. Si bien los adenocarcinomas con componente mucinoso constituyen un tipo intermedio de carcinoma ubicado entre los mucinosos puros y adenocarcinomas puros, la expresión antigénica podría estar compartida. Algunos trabajos han descrito elevados niveles sanguíneos pre-operatorios de *sialil Lewis a* (CA 19-9) en los tumores con componente mucinoso de CCR (Nakagoe T *et al*, 2001), estómago (Nomura H *et al*, 1997), apéndice (Carmignani CP *et al*, 2004), ovario (Ayhan A *et al*, 2007) y páncreas (Maire F *et al*, 2002) confiriéndoles a estos pacientes un mal pronóstico.

El grado histológico tumoral también constituye un factor pronóstico en CCR. El mismo ha sido estudiado desde fines del siglo XIX por el patólogo Von Hansemann (1893) quién clasificó a los tumores en anaplásicos y no anaplásicos según hayan perdido o no la diferenciación del tejido que dio origen al carcinoma; pero recién en 1925 A. C. Broders dividió a los carcinomas en 4 grados de acuerdo con la proporción de células diferenciadas del tumor. Para evaluar el valor pronóstico de estos grados histológicos en el CCR, tres años más tarde F. W. Stewart y colaboradores (1928) realizaron un estudio en 598 pacientes operados de CCR y observaron que los pacientes con tumores de grado histológico I vivían en promedio 70 meses, con grado II 30 meses, con grado III 21 meses y grado IV 10 meses; llamativamente, ninguno de los pacientes con tumores bien diferenciados había presentado metástasis mientras que sí lo habían hecho el 10%, 25% y 60% de los pacientes con tumores con GH2, GH3 y GH4, respectivamente. Muchos años más tarde se observó que el grado histológico también estaría relacionado con la expresión de ciertas mucinas y los antígenos carbohidratos (Manne U *et al*, 2000; Baldus SE *et al*, 2002, 2004, Yu XW *et al*, 2007, Onoreda M *et al*, 2009). En coincidencia con estos últimos autores, hemos encontrado un aumento de la expresión de la mucina MUC5AC y una disminución de MUC2 en los tumores con GH3 respecto de aquellos con GH1; asimismo, los ganglios linfáticos con metástasis GH1 tuvieron una menor expresión de MUC1 comparado con las GH2/3. Este último hallazgo coincide con el trabajo de S. E. Baldus y colaboradores (2002) en el cual observaron que la expresión de MUC1, en 243 pacientes con CCR, se asociaba con la progresión tumoral, es decir, con tumores pobremente diferenciados y

estadios más avanzados. Asimismo, la expresión de los antígenos del grupo sanguíneo *Lewis* también estaría involucrada en la diferenciación celular (Shi ZR *et al*, 1984; Itzkowitz SH *et al*, 1986; Nakasaki H *et al*, 1989). Coincidentemente, nosotros observamos mayor expresión de los antígenos *sialil Lewis a/x* y *Lewis x/y* tanto en los TP como en los ganglios linfáticos con metástasis bien diferenciadas respecto de aquellas GH2/3. Por otro lado, los TP con GH3 presentaron 51,5% menos expresión tisular de CEA que aquellos GH1/2; este hallazgo se correlacionaría con los bajos niveles citosólicos de CEA observados por A. Quentmeier y colaboradores (1987) en las células de tumores pobremente diferenciadas respecto a aquellas bien o moderadamente diferenciadas.

La evaluación del grado nuclear (GN), es decir, del tamaño y la forma de los núcleos y del porcentaje de las células tumorales que están en proceso de multiplicarse ofrece la posibilidad de evaluar el nivel de diseminación tumoral. Los tumores con un GN bajo crecen y se diseminan más lentamente que los cánceres con un GN alto. El GN ha sido ampliamente estudiado en varias localizaciones tumorales tales como mama, vejiga y riñón pero en el caso del CCR la bibliografía es escasa, esto mismo ocurre con su relación con la expresión de mucinas y antígenos asociados. Leroy X. y colaboradores (2002) encontraron una mayor expresión de MUC1 en los tumores renales con un GN3 que en aquellos con GN1/2. Además de MUC1, nosotros también hallamos mayor expresión de MUC5AC en los TP con un GN3; estos tumores también presentaron mayor expresión de los antígenos *Tn*, *Lewis x* y CEA. Hiraga Y. y colaboradores (1998) utilizando el antígeno de proliferación celular (PCNA, por sus siglas en inglés), como marcador de proliferación y síntesis de ADN, observaron en 100 pacientes sometidos a resección quirúrgica del CCR avanzado, un alto índice de PCNA conjuntamente con expresión positiva de MUC1; este hallazgo se correlacionó con una supervivencia a los 5 años del 33% a diferencia del 89% cuando la expresión de MUC1 se hallaba ausente y el índice PCNA era bajo.

Otro antígeno utilizado para medir la proliferación celular es el Ki67 el cual reconoce las células en fase G1, S, G2 y M. Un estudio realizado por R. Aoki y colaboradores (1998) en 184 pacientes con CCR mostró una correlación positiva entre la expresión de MUC1, el alto índice ki67 y la presencia de GLM; los autores no



observaron metástasis ganglionares cuando ambas expresiones fueron negativas o débiles. Sin embargo, esta asociación todavía sigue siendo investigada, A. Li y colaboradores (2001) no pudieron hallar en 58 CCR una relación con MUC1 pero sí hallaron que los TP con expresión positiva de MUC2 tenían un menor índice de proliferación (Ki67  $32,5 \pm 19,9$ ) que con ausencia de esta mucina (Ki67  $48,4 \pm 27,6$ ). El índice mitótico también puede ser una medida de proliferación celular el cual evidencia el momento en que las células tumorales se encuentran en fase S. Se ha demostrado en varios tumores sólidos que el índice mitótico es un factor pronóstico independiente (Lipponen PK *et al*, 1992; Vesalainen S *et al*, 1995; Yamasaki F *et al*, 1997). Sinicrope F. A. y colaboradores (1999) observaron una correlación estadísticamente significativa entre el índice mitótico alto y un TLE y SG reducido en los pacientes con CCR con estadio II, esta diferencia fue más pronunciada en los tumores del colon distal que en los proximales. Los TP y GLM con alto índice mitótico analizados en esta Tesis presentaron una baja expresión no sólo de MUC2 sino también de MUC5AC; y coincidentemente como se mencionó más arriba, los TP con índice mitótico alto mostraron mayor de expresión de MUC1.

Los cambios ocurridos en la glicosilación de la célula tumoral están relacionados tanto con el desarrollo como con la diferenciación tumoral y es probable que también estén asociados con el proceso de apoptosis. Sin embargo, aún no se conoce el rol preciso de los antígenos del grupo sanguíneo Lewis en el proceso de apoptosis. Algunos trabajos han observado una correlación positiva entre el proceso apoptótico, la expresión de *Lewis y* (Hiraishi K *et al*, 1993; Akamatsu S *et al*, 1996) y una mayor actividad de la enzima  $\alpha$ -1,2fucosiltransferasa la cual, como mencionamos en otro apartado de esta Tesis, interviene en la síntesis de éste antígeno (Orntoft TF *et al*, 1991; Itzkowitz SH *et al*, 1992; Yazawa S *et al*, 1993; Sun J *et al*, 1995; Goupille C *et al*, 2000). Estos hallazgos sugieren que *Lewis y* estaría más asociado a la resistencia que a la inducción de la apoptosis y a la evasión del control inmunológico. En nuestro estudio encontramos no sólo mayor expresión de *Lewis y* en los TP y GLM cuando se hallaba presente un alto índice mitótico respecto de los que presentaban bajo índice mitótico sino también observamos mayor expresión de los antígenos *Lewis x* y *sialil Lewis x*. Recientemente, S. A. Mehdi y colaboradores (2009) realizaron un estudio en

---

cáncer de pulmón de células no pequeñas en el cual encontraron que la única variable pronóstica que se asoció de forma estadísticamente significativa fueron la expresión positiva de *Lewis* y y el alto índice mitótico.

Por otra parte, coincidentemente con otros estudios, encontramos mayor índice mitótico en los TP con expresión positiva de CEA que en aquellos con expresión negativa (Bauer KD *et al*, 1987; Schutte B *et al*, 1987; Witzig TE *et al*, 1991).

#### 4) La invasión tumoral

En una masa tumoral no todas las células se comportan de la misma manera. Las células ubicadas en la zona más profunda tendrían mayor habilidad para invadir y metastatizar que aquellas localizadas en otras áreas (Teixeira CR *et al*, 1993; Tanaka S *et al*, 1995; Kimura T *et al*, 2000). Hiraga Y. y colaboradores (1998) observaron que la sobrevida de los pacientes con CCR a los 5 años era más corta cuando las células que invadían la capa muscular propia expresaban MUC1 que cuando esta mucina estaba ausente. Una relación similar ha sido descrita cuando MUC1 se expresa más en el frente de invasión tumoral de la capa tanto serosa como subserosa (Manne U *et al*, 2000). Nuestros hallazgos coinciden con esto último; asimismo, encontramos una alta expresión de los antígenos *Lewis x/y*, *sialil Lewis a/x* y CEA en los tumores con invasión de las capas mencionadas; este hallazgo sugeriría que la células que expresan dichos antígenos tendrían una característica más agresiva que las de otras áreas del carcinoma. En este sentido, varios trabajos coinciden en que la expresión de los antígenos *Lewis* se correlaciona tanto con la profundidad de invasión tumoral como con la presencia de metástasis, especialmente la hepática (Matsushita Y *et al*, 1991; Lorenzi M *et al*, 1997; Sato T *et al*, 1999; Huang WB *et al*, 2002).

El impacto en la sobrevida y en el valor pronóstico negativo de la presencia de invasión vascular, linfática y neuronal en los TP ha sido estudiada ampliamente. En un estudio realizado recientemente con 2.417 pacientes se demostró que la invasión angiolinfática está asociada con tumores más agresivos y con peor pronóstico (Lim SB *et al*, 2010). Sin embargo, aun permanecen si dilucidar cuales son las características biológicas de la célula invasora. Un estudio realizado con la técnica tisular de

microarray, en el cual se analizaron 1.420 especímenes de CCR, demostró que aquellos pacientes con expresión positiva de la proteína reparadora del ADN (MMR, por sus siglas en inglés) y MUC1 tenían TP más indiferenciados y se presentaban en estadios más avanzados que aquellos con expresión negativa de ambas moléculas. Asimismo, en los estadios avanzados se observó que la ausencia de MUC2 estaba asociada de forma significativa con la presencia de invasión vascular, mayor estadio pN y una SG más corta (Lugli A *et al*, 2007). En coincidencia con Hiraga Y y colaboradores (1998) y Guo Q y colaboradores (2006), nosotros también hallamos expresión de MUC1 en todos los TP con invasión vascular. Posiblemente también haya otros factores que estén involucrados tanto en la propiedad invasora de estas células como en la facilitación de un microambiente favorable para la invasión tumoral.

Varios trabajos han vinculado la expresión de los antígenos *Lewis* con su capacidad para la formación de neoangiogénesis; proceso vasculoproliferativo crítico para el crecimiento tumoral. El glicoconjugado *Lewis y-H* es un complejo que se expresa normalmente en situaciones de inflamación y en tumores malignos. Un estudio realizado por M. M. Halloran y colaboradores (2000) sugiere que este glicoconjugado tiene un rol en el proceso de angiogénesis debido a que el mismo puede ser expresado bajo la estimulación de inmunomoduladores tales como el factor vWF, histamina, trombina, IL-4, IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ . *Lewis y-H* estaría almacenado en las células endoteliales y bajo el estímulo de inmunomoduladores se liberaría e induciría la formación de nuevos vasos sanguíneos. Un mecanismo similar podría ocurrir en los tumores malignos, es decir, la expresión positiva de *Lewis y*, tanto la expresada en las células tumorales como la presente en las células endoteliales, podría influir en la neoangiogénesis tumoral creando un microambiente favorable para que las células cancerígenas puedan invadir el torrente circulatorio. En este sentido, nosotros encontramos expresión de *Lewis y* y *sialil Lewis a* en todos los TP con invasión vascular.

Otro factor involucrado en este proceso sería el antígeno carcinoembrionario. Algunos autores han observado que las células que expresan la molécula de adhesión celular tipo 1 relacionada con CEA (CEACAM1, por sus siglas en inglés) tienen la propiedad de estimular la proliferación, la quimiotaxis y la formación de tubos similares

a los capilares de la microvasculatura humana; el aumento de la expresión de esta molécula podría estar dada por VEGF (Kim JC *et al*, 1999; Ergün S *et al*, 2000; Chen WJ *et al*, 2005). La unión de este antígeno a su receptor (CEA-R), presente en las células de Kupffer del hígado, llevaría a la producción de citoquinas y al aumento de la expresión de moléculas de adhesión endotelial, tales como el FNT- $\alpha$ , lo que finalmente facilitarían la supervivencia de la metástasis. Esto podría explicar la causa de que altos niveles sanguíneos de CEA se relacionan con una mayor invasión vascular en sus TP y un aumento del riesgo de metástasis hepáticas (Tabuchi Y *et al*, 1987,1991; Ivankovics IG *et al*, 2008; Cardoso ML *et al*, 2009; Siriwardana RC *et al*, 2010; Chuang SC *et al*, 2011). Nosotros encontramos valores post-operatorios más elevados de CEA cuando los TP tenían presencia de invasión vascular que cuando ésta estaba ausente.

Mediante análisis univariado Y. Hiraga y colaboradores (1998) hallaron una correlación negativa entre la presencia de invasión vascular y/o linfática en los TP y la sobrevida. Sus resultados demostraron que a los 50 meses sólo estaban vivos el 36% de los pacientes con presencia de invasión vascular y 48% con linfática mientras que aun sobrevivían el 76% y 89% de los pacientes cuando no había invasión vascular ni linfática. Sin embargo, al aplicar la regresión logística sólo se halló correlación entre el grado histológico, la presencia de ganglios linfáticos, la expresión positiva de MUC1 y la sobrevida. Guo Q. y colaboradores (2006) demostraron que el patrón de expresión de MUC1 se asoció con la presencia de invasión angiolinfática y de GLM. En este sentido, nuestros hallazgos demostraron un 57,1% de expresión de MUC1 tanto en la membrana como en el citoplasma de las células de los TP con invasión linfática.

El patrón de expresión de CEA también fue asociado con la probabilidad de invasión linfática; aquellos con expresión luminal y en la zona apical del citoplasma tendrían mayor probabilidad de invasión linfática que aquellos con patrón difuso citoplasmático (Texeira CR *et al*, 1994; Tokunaga N *et al*, 1995). Además, se han observado valores sanguíneos de CEA más elevados en pacientes con invasión linfática tumoral (Tabuchi Y *et al*, 1987; Kim JC *et al*, 2005; Cardoso ML *et al*, 2009). Independientemente del momento en que fue tomada la muestra sanguínea (pre- o post-quirúrgica) nosotros encontramos valores sanguíneos de CEA elevados cuando los TP tenían invasión tumoral linfática.

La invasión perineural se ha relacionado con la expresión de ciertas mucinas. La glicoproteína asociada a mielina (MAG, por sus siglas en inglés) se encuentra expresada en la membrana de las células de Schwann que envuelve los axones de las células del sistema nervioso periférico. Esta glicoproteína tiene una alta afinidad por los derivados mono- o di-sialilados del antígeno T presentes en el dominio extracelular de la MUC1 (Blixt O *et al*, 2003). Se ha observado que los carcinomas que expresan MAG, como por ejemplo el cáncer de páncreas (Swanson BJ *et al*, 2007), vías biliares (Tamada S *et al*, 2002) y estómago (Uen YH *et al*, 2006), presentan mayor invasión perineural. En este trabajo de Tesis, observamos en todos los TP con invasión perineural expresión de MUC1 y ausencia de MUC5AC. Algunas investigaciones coinciden en que la presencia de MUC5AC estaría asociada con buen pronóstico y su ausencia con tumores altamente agresivos. Varios autores han observado que en CCR habría una mayor presencia de invasión perineural en los TP cuando no se expresa MUC5AC (Kocer B *et al*, 2002, Habr-Gama A *et al*, 2009; Aloysius MM *et al*, 2010). Sin embargo, en los pacientes con colangiocarcinoma esta relación ha sido inversa, es decir, se hallaron estadios tumorales más avanzados cuando la invasión perineural estaba acompañada de expresión positiva de MUC5AC (Boonla C *et al*, 2005).

La invasión perineural podría estar más relacionada con los antígenos carbohidratos asociados que con las mucinas. En coincidencia con estudios previos, observamos una correlación positiva estadísticamente significativa entre el índice de expresión fuerte de *sialil Lewis a* y la presencia de invasión perineural ( $p < 0,05$ ). En este sentido, T. Nakagoe y colaboradores (2001) encontraron niveles sanguíneos tanto pre- como post-operatorios de CA 19-9 más elevados en los pacientes con presencia de invasión perineural en sus TP. También se ha encontrado una asociación entre altos niveles sanguíneos de CA 19-9 y presencia de metástasis hepática, diferenciación tumoral, invasión de la pared colorrectal, invasión venosa y un avanzado estadio del CCR (Tabuchi Y *et al*, 1988).

Nosotros encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la expresión fuerte de CEA y la presencia de invasión perineural en los TP ( $p < 0,05$ ). Coincidentemente, un estudio realizado recientemente en 229 pacientes mostró, entre otros factores analizados, que la presencia de invasión perineural y los altos niveles

pre-operatorios de CEA se asoció con mal pronóstico para los pacientes con estadios II y III de CCR (Kang H *et al*, 2010). En otros trabajos previos se halló también resultados similares (Bentzen SM *et al*, 1988; Uen YH *et al*, 2007; Tsai HL *et al*, 2009). Esta asociación podría estar relacionada con el aumento de la quimiotaxis celular facilitada por la expresión de CEA en las células tumorales como se mencionó más arriba; sin embargo, el verdadero mecanismo por el cual hay mayor expresión de CEA en los TP con invasión perineural aun no ha sido totalmente dilucidado.

### 5) Presencia de necrosis en los TP y GLM

La presencia de necrosis en el tejido tumoral podría constituir un estímulo para la expresión de ciertos antígenos. La hipoxia y la alcalinización intracelular encontradas habitualmente en los tumores sólidos podrían inducir un aumento de la expresión de CEA. Analizando la secuencia promotora de CEA se observó que la misma tiene un sitio de unión para el factor de transcripción HIF-1 (factor de hipoxia inducible tipo 1) el cual, en condiciones de hipoxia, se uniría al promotor de CEA aumentando la expresión del mismo (Spruessel A *et al*, 2004; Kokkonen N *et al*, 2007; Lee SJ *et al*, 2010). La sobreexpresión de CEA *in vivo* también coincidiría con el aumento de la expresión de anhidrasa carbónica IX, enzima comúnmente encontrada en los tejidos hipóxicos. Nosotros observamos mayor expresión tisular y elevados niveles sanguíneos pre-operatorios de CEA en los pacientes con TP y GLM con necrosis.

### 6) Epidemiología y riesgo de padecer CCR

En nuestro análisis no hallamos ninguna relación estadística entre la expresión de las mucinas y los antígenos carbohidratos asociados con la edad al momento del diagnóstico ni con el género del paciente. A pesar de ello y en coincidencia con otros autores (Nakagoe T *et al*, 1994; Manne U *et al*, 2000; Yu XW *et al*, 2007) encontramos más pacientes mayores de 60 años con expresión positiva de *sialil Lewis a/x* en sus TP que en los pacientes menores de 40 años. Al igual que nosotros, T. Nakagoe y colaboradores (2001) también observaron niveles sanguíneos más elevados de CA 19-

---

9 en los pacientes cuya enfermedad se diagnosticó luego de los 60 años que en los menores de 40 años. Su trabajo también demostró que los CCR tipo polipósico con expresión positiva de *sialil Lewis x* se diagnosticaron a una edad promedio de 67,3 años (DE±9,8) y los no-polipósicos a los 59,4 años (DE±12,8). A pesar de que estos hallazgos sugerirían que la edad podría ser un factor para que ciertos antígenos se expresen más que otros, esta relación todavía no ha sido determinada.

Se ha estudiado profundamente la relación entre los antecedentes de cáncer familiar y el riesgo a padecer ciertos tipos de tumores malignos. Se han hallado expresiones alteradas de al menos 10 genes de mucinas (MUC1 a MUC9) en diferentes localizaciones tumorales (mama, pulmón, páncreas, estomago, etc.) lo cual sugeriría una predisposición genética a la expresión de dichas mucinas alteradas (Giuntoli RL *et al*, 1998; Inagaki Y *et al*, 2009). Independientemente del tipo de antecedente de cáncer familiar, en nuestro trabajo, observamos una mayor reactividad de MUC1 y CEA en los TP de los pacientes con este antecedente respecto a aquellos que no lo presentaron; el 48,9% de estos TP presentaron una expresión fuerte de MUC1. Por otra parte, todos los pacientes con antecedentes familiares de CCR expresaron MUC1 tanto en los TP como en sus GLM. Estos también presentaron una elevada intensidad de expresión fuerte de los carbohidratos *sialil Lewis a* y *Lewis y*. Como se mencionó anteriormente, el cáncer no-polipósico hereditario (HNPCC, por sus siglas en inglés) es la forma más frecuente de CCR hereditario; estos pacientes tienen una mejor sobrevida respecto de aquellos con la forma esporádica de la enfermedad, por esta razón, se ha sugerido que el genotipo en el cáncer hereditario determinaría tanto la susceptibilidad como la historia natural del CCR (incluido el aumento en la sobrevida). You J. F. y colaboradores (2006) encontraron expresión fuerte de MUC1 en 26,2% y 46% de los pacientes con HNPCC y CCR esporádico, respectivamente. La expresión fuerte de este antígeno se asoció estadísticamente con una menor sobrevida, especialmente en los pacientes con tumores mucinosos. Respecto al CEA, un trabajo realizado en 56 pacientes con cáncer de recto a los cuales se les realizó resección radical reveló, entre otras variables, que el riesgo de recurrencia de la enfermedad era mayor cuando los pacientes presentaron niveles sanguíneos preoperatorios de CEA elevados y antecedentes familiares de CCR (Wu ZY *et al*, 2008),

---

por lo cual podría existir, al igual que para las mucinas, una predisposición genética para la formación de este antígeno.

La asociación entre diabetes y cáncer ha sido ampliamente estudiada a través de varias décadas con resultados hasta la fecha poco claros. Algunos trabajos recientes han observado que los pacientes con diabetes tipo 2 que requieren insulina podrían tener mayor riesgo de cáncer (Everhart J *et al*, 1995; Nilsen TI *et al*, 2001; Yamagishi S *et al*, 2005; Larsson SC *et al*, 2005, 2007; Huxley R *et al*, 2005; Mayer D *et al*, 2008). Con el objetivo de estimar el riesgo de padecer CCR entre las personas diabéticas S. C. Larsson y colaboradores (2005) realizaron un meta-análisis en el cual se incluyó un total de 2.593.935 personas; demostraron una mayor frecuencia (30%) de CCR entre las personas diabéticas respecto de las no-diabéticas (RR 1.30, 95% CI 1.20-1.40). Una posible explicación para esta relación podría ser la presencia de un estado de hiperinsulinemia. Como sabemos, la insulina es un factor de crecimiento importante tanto para las células colónicas normales como para las tumorales (Watkins LF *et al*, 1990; Giovannucci E *et al*, 1995). Se ha postulado que la insulina tendría la habilidad de unirse y activar al receptor del factor de crecimiento similar insulina tipo 1 (IGF-1, por sus siglas en inglés) el cual puede promover el crecimiento de un tumor maligno en sus etapas de desarrollo o provocar la aparición de uno nuevo (Weinstein D *et al*, 2009). El factor IGF-1 tendría además funciones biológicas de proliferación celular, diferenciación y anti-apoptosis (Le Roith D *et al*, 1997). En este sentido, un estudio en 14.960 hombres en seguimiento prospectivo se halló que la concentración sanguínea IGF-1 y el IGF unida a la proteína-3 (IGFBP-3, por sus siglas en inglés) elevadas influyó positivamente en el riesgo de CCR (Ma J *et al*, 1999). Asimismo, el factor IGF-1 también se lo ha asociado con la quimio-resistencia y mal pronóstico cuando además se lo encuentra co-expresado con EGFR-1 (Cunningham MP *et al*, 2008). Si bien hasta el presente no hay trabajos en investigación clínica, se ha observado en cultivos celulares una estrecha relación entre la expresión de EGFR y MUC1 postulando que esta asociación llevaría a la estimulación de factores de transcripción nucleares favoreciendo así la quimio-resistencia, la proliferación celular y la progresión de la enfermedad (Maher PA *et al*, 1996; Feng Y *et al*, 1999; Lin SY *et al*, 2001; Bitler BG *et al*, 2010). En nuestro trabajo, además de encontrar una mayor



expresión de MUC1 en los TP de los pacientes diabéticos respecto a aquellos sin esta enfermedad observamos una mayor expresión de *sialil Lewis a/x* y CEA. Respecto a este último, M. Levy y colaboradores (2008) observaron una correlación positiva entre la expresión sanguínea de IFG-1 y CEA en los TP de los pacientes en estadios avanzados de CCR. Por su parte, Z. L. Shen y colaboradores (2008) también observaron una frecuencia más alta de metástasis hepáticas en los pacientes que tenían antecedentes de síndrome metabólico (el cual está compuesto entre otros factores por hiperinsulinemia) respecto a aquellos con ausencia del síndrome. Uygur-Bayramiçli O. y colaboradores (2007) demostraron que los pacientes diabéticos insulino dependientes tenían dos veces más altos los niveles sanguíneos de *sialil Lewis a* que los pacientes sin esta patología. Estos trabajos sugerirían que la diabetes, o más precisamente la hiperinsulinemia, jugaría un rol importante en la expresión tanto de las mucinas como de los antígenos carbohidratos asociados y del antígeno carcinoembrionario confiriéndoles a estos pacientes un mayor riesgo y morbimortalidad por CCR.

El antecedente de colecistectomía también podría estar relacionado con un incremento en el riesgo de CCR, particularmente en el colon proximal. Un estudio realizado en 278.460 individuos vigilados por más de 33 años mostró que aquellos a los cuales se les habían realizado una colecistectomía tenían mayor riesgo de cáncer de colon proximal (HR 1.16) que distal (Lagergren J *et al*, 2001); previamente, se había demostrado tal asociación (Mercer PM *et al*, 1995; Todoroki I *et al*, 1999). Una posible explicación a esta relación podría ser el aumento de ácidos biliares volcados al intestino lo cual incrementaría la carcinogénesis (Reddy BS *et al*, 1977). Trabajos relacionados a esta teoría han hallado que el aumento de ácidos biliares, usualmente visto en las heces de pacientes con una alta ingesta de grasas, estaría relacionado con una alta incidencia de CCR (Jenkins DJ *et al*, 1986, Reddy BS *et al*, 1992, Powell AA *et al*, 2001). Los ácidos biliares producidos por el hígado, almacenados en la vesícula biliar y volcados posteriormente al intestino, cuando llegan al colon son metabolizados por las bacterias colónicas produciendo ácidos biliares secundarios. De estos, especialmente el ácido desoxicólico es citotóxico para las células colónicas convirtiéndose, en algunos casos, en un potencial promotor tumoral (Reddy BS *et al*,

1977; Mahmoud NN *et al*, 1999). Por otra parte, los ácidos biliares también han sido involucrados, por activación de múltiples vías, en la invasión y la metástasis de células de cáncer colorrectal (Halvorsen B *et al*, 2000; Debruyne PR *et al*, 2002) y esto podría deberse a que los ácidos biliares pueden modular la secreción de ciertas mucinas tanto en el cáncer colorrectal (Shekels LL *et al*, 1996; Klinkspoor JH *et al*, 1999) como en el de esófago y el colangiocarcinoma (Kodama H *et al*, 2001; Sirica AE *et al*, 2005; Wu J *et al*, 2008). Mariette C. y colaboradores (2008) hallaron altos niveles de ARNm de MUC1 tanto en una línea celular de cáncer de esófago (OE33) como en un modelo de explantes *in vivo* expuestos a ácidos biliares; en este caso además del ácido biliar desoxicólico mencionado también estaría implicado el ácido taurocólico, los que a través de PI3K aumentarían la expresión de MUC1 activando su promotor en la región -1472/-234. Asimismo, S. Song y colaboradores (2004) demostraron que la exposición a diferentes concentraciones de ácidos biliares de una línea celular de cáncer de colon altamente metastático (LS174T) puede aumentar la expresión de mucina MUC2 en forma dosis dependiente. En este sentido nuestros hallazgos comprendieron no sólo la expresión de MUC1 sino también de *sialil Lewis x*, *Lewis y* y CEA todos los TP y GLM de pacientes con colecistectomía previa. Sin embargo, no podemos aseverar que este hallazgo sea causado por dicho antecedente dado que no hallamos ninguna correlación con la localización tumoral primaria.

La apendicectomía también ha sido asociada con mayor predisposición a padecer CCR (Fan YK *et al*, 1986; Grobost O *et al*, 1991), especialmente del colon proximal, y esto se debería por la ausencia de tejido linfoide que habitualmente existe en el apéndice. El tejido linfoide asociado al intestino (GALT, por sus siglas en inglés) es la defensa más importante contra los patógenos intestinales los cuales pueden proliferar si el ambiente se torna adecuado. Las células M son parte del tejido epitelial GALT, éstas seleccionan y transportan los patógenos a través del epitelio asociado al folículo linfoide (FAE, por sus siglas en inglés) en donde se produce la respuesta inmune. Se ha observado que ciertos patógenos (ej. E. Coli) tienen más facilidad que otros para unirse a estas células y esto posiblemente esté dado por la presencia de MUC2 en la superficie de las células M (Lebouard H *et al*, 2001). Ante la ausencia de tejido linfoide, la proliferación bacteriana podría metabolizar mayor cantidad de ácidos

biliares con el consecuente riesgo de CCR, y como se mencionó, el aumento de estos ácidos se asociaría con mayor potencial metastático. En nuestro trabajo observamos que los pacientes con antecedentes de apendicectomía presentaron mayor expresión de MUC2 en sus TP que aquellos sin este antecedente.

Otro factor epidemiológico de riesgo de CCR estudiado ampliamente ha sido el hábito alcohólico (Longnecker MP *et al*, 1990; Gapstur SM *et al*, 1994; Thun MJ *et al*, 1997; Pedersen A *et al*, 2003; Shimizu N *et al*, 2003; Ye W *et al*, 2003). Ocho estudios de cohorte han estimado que el riesgo de CCR está incrementado sólo moderadamente, particularmente en aquellos bebedores que exceden los 45 g/día (Calle EE *et al*, 2003). Una posible explicación de esta asociación sería la interferencia, causada por el alcohol, de la absorción de los folatos o simplemente una disminución de la ingesta de los mismos (Giovannucci E *et al*, 1995; Harnack L *et al*, 2002); sin embargo, la verdadera causa aún permanece bajo investigación. Un estudio realizado por M. Verma y colaboradores (1999) halló un aumento de la expresión de ARNm de MUC1 cuando los cultivos celulares de cáncer de mama (MCF-7) estaban expuestos a etanol; este aumento de expresión fue dependiente tanto de la dosis como del tiempo de exposición al etanol. Si bien recientemente se ha encontrado una asociación significativa entre el consumo de alcohol, el aumento de expresión de MUC1 y el cáncer de estómago (Benjamin JB *et al*, 2010), en el cáncer colorrectal dicha relación no ha sido bien estudiada. En nuestro trabajo observamos expresión fuerte de MUC1 en todos los GLM de los pacientes con este antecedente. De acuerdo a lo expuesto, el consumo elevado de alcohol podría ser tanto un factor de riesgo como de selección de células con mayor capacidad de invasión cuando el CCR ya está presente.

Varios estudios epidemiológicos han observado que la obesidad no sólo incrementa el riesgo de varios tipos de cánceres sino también aumenta, en el caso del CCR, el riesgo a morir por esta enfermedad (Giovannucci E *et al*, 1995; Martínez ME *et al*, 1996; Pietinen P *et al*, 1999; Woutersen RA *et al*, 1999; Calle EE *et al*, 2003; Dignam JJ *et al*, 2006; Sinicrope FA *et al*, 2010); sin embargo, aun no se ha explicado la relación entre la obesidad, las alteraciones metabólicas y el riesgo de desarrollar CCR. Estudios realizados en ratones sometidos a una dieta rica en grasa y altas en calorías han mostrado un aumento de la proliferación celular en el epitelio colónico

(Newmark HL *et al*, 1990, 2001). Otros trabajos han confirmado que la restricción en la ingesta calórica está asociada con una inhibición de la carcinogénesis y con un crecimiento tumoral más lento (Dirx MJ *et al*, 1999, 2003; Rose DP *et al*, 2004; van Noord PA *et al*, 2004). La restricción calórica disminuiría significativamente los niveles sanguíneos de insulina y del IGF-I los cuales, como mencionamos, han sido involucrados en la carcinogénesis. Un ejemplo de ello es que cuando se inyecta IGF-I a ratones p53-deficientes sometidos a una restricción calórica el efecto anti-carcinogénico de la restricción se ve abolido (Dunn SE *et al*, 1997). Se ha demostrado, por otra parte, que los adipocitos producen una gran variedad de citoquinas biológicamente activas como por ejemplo el inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1), el factor de necrosis tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ) y el IGF-I; estas citoquinas han sido implicadas tanto en el crecimiento celular, la proliferación y la diferenciación como en el control del ciclo celular y la angiogénesis. El TNF- $\alpha$  puede tener un rol importante en la expresión de determinadas mucinas y antígenos carbohidratos asociados a las mismas. Se ha observado un aumento de la actividad de las enzimas glicosil- y sulfotransferasas en la mucosa bronquial humana cuando estas son expuestas a altas concentraciones del TNF- $\alpha$  produciendo un aumento de la mucina MUC5AC (Ishibashi Y *et al*, 2005) y de las formas sialiladas del grupo *Lewis*, especialmente de *sialil Lewis x* (Delmotte P *et al*, 2002). Todos pacientes de nuestro estudio que eran obesos al momento del diagnóstico de CCR presentaron en sus GLM una alta frecuencia de expresión de las mucinas MUC1 y MUC5AC y de los antígenos carbohidratos *sialil Lewis x/a*. Recientemente M. Grimm y colaboradores (2010) encontraron una mayor frecuencia de metástasis ganglionares cuando los pacientes tenían altos niveles de TNF- $\alpha$ ; por lo cual, este hallazgo podría explicar el aumento de las mucinas y antígenos carbohidratos asociados observado en los pacientes obesos con metástasis ganglionares. Pero los adipocitos no sólo son capaces de inducir PAI-1 a través de la producción de radicales de oxígeno sino también pueden estimular la producción de la IL-6, el angiotensinógeno y de la proteína-1 monocito-quimotáctico (MCP-1, por sus siglas en inglés) (Canello R *et al*, 2004; Chen JJ *et al*, 2005; Dehqanzada ZA *et al*, 2006). La elevación de esta última proteína podría incrementar la infiltración de macrófagos dentro del tejido adiposo el cual, bajo condiciones de hipoxia, podría

promover el crecimiento tumoral a través de la secreción de factores de crecimiento tales como el VGFR o el EGFR (Kobayashi I *et al*, 2006). En el CCR la expresión de MUC1 se encuentra asociada con la expresión de ambos factores, por lo cual, cabría la posibilidad de que esta mucina tenga un rol en el crecimiento y progresión del cáncer en los pacientes obesos a través de estos factores.

El antecedente de hipertensión arterial ha sido asociado con el riesgo a padecer cáncer colorrectal (Kune GA *et al*, 1988; Chan AO *et al*, 2007). Un estudio realizado por Y. Watanabe y colaboradores (2005) en 110.792 japoneses reveló que el antecedente de hipertensión arterial se correlacionó con mayor riesgo de cáncer rectal en mujeres (HR=1.85, IC95: 1.03-3,33). Si bien aún no hay una clara explicación para tal asociación, se ha propuesto al estrés oxidativo, presente en los pacientes hipertensos, como principal responsable (Tian N *et al*, 2007). En condiciones normales, el metabolismo celular está asociado con la producción de especies oxígeno reactivos (ROS, por sus siglas en inglés); sus formas más comunes incluyen el superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), los radicales hidroxilos y el ácido nítrico. Bajo condiciones no fisiológicas un aumento de los niveles de ROS puede causar daño en el ADN, las proteínas y lípidos; para prevenir este daño, las células desarrollan mecanismos enzimáticos (por ejemplo el superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y no-enzimáticos (por ejemplo el glutatión y el tioredoxin). En este sentido, un estudio realizado por A. M. Cantin y colaboradores (2006), en cultivos de adenocarcinoma de colon, reveló que la exposición de las células al estrés oxidativo produce un aumento de las concentraciones de mucinas como intento de proteger las células contra dicho estrés. En ausencia de una adecuada defensa, las células responderían con la inducción de apoptosis. Yin L. y colaboradores (2003) demostraron que la exposición celular al estrés oxidativo aumenta la expresión de la mucina MUC1 en los cultivos de cáncer de mama, colon y cérvix. En nuestro estudio, observamos una alta reactividad de las mucinas MUC1 y MUC2 en los TP de los pacientes con antecedentes de HTA, en la mitad de los casos se halló un índice de expresión fuerte de MUC1.

El hábito tabáquico también ha sido asociado con mayor incidencia y mortalidad por CCR (Stürmer T *et al*, 2000; Chao A *et al*, 2000; Colangelo LA *et al*, 2004). Un

meta-análisis realizado con 106 estudios observacionales estimó que el riesgo de desarrollar CCR es más alto en los pacientes fumadores que en los que nunca fumaron (RR 1,18; IC95% 1,11-1,25); asimismo, estos pacientes presentaron mayor riesgo de morir por cáncer (Botteri E *et al*, 2008). En otro trabajo realizado por el mismo autor mostró un aumento del riesgo de pólipos adenomatosos en los pacientes fumadores, particularmente aquellos de gran tamaño y con características displásicas (Botteri E *et al*, 2008). A pesar de estos hallazgos, aún no está claro cuál es el mecanismo por el cual el tabaco ejercería su efecto carcinogénico en el CCR. Una posible explicación se ha encontrado en el trabajo realizado por Y. T. Chen y colaboradores (2010) en el cual, luego de exponer al humo del tabaco a un cultivo de células de epitelio bronquial humano, observaron un cambio histopatológico, es decir, se modificó el espacio intercelular y desaparecieron las cilias. Estos cambios fueron acompañados por inhibición del tráfico de EGFR a la membrana basolateral, la fosforilación de EGFR y de la cola citoplasmática de MUC1; asimismo, hubo una pérdida del complejo E-caderina- $\beta$ -catenina en la membrana lateral, formación intracelular del complejo  $\beta$ -catenina-MUC1 con la consecuente incorporación al núcleo y un aumento de la cantidad y localización nuclear del efector nuclear Wnt, Lef-1. Si bien, en nuestro trabajo observamos una correlación estadísticamente positiva entre la expresión fuerte de MUC1 en los TP-GLM y el antecedente de consumo de tabaco aun no hay trabajos en CCR que relacionen este antecedente con los cambios histopatológicos similares a los observados en el tejido bronquial de los pacientes fumadores.

Muchos pacientes con cáncer presentan una pérdida de masa muscular y tejido adiposo al momento del diagnóstico. La pérdida de peso de más de 10kg en los últimos dos meses es un factor de mal pronóstico para los pacientes con CCR (Dewys WD *et al*, 1980; Cunningham D *et al*, 1998; Wils J *et al*, 2003; Mitry E *et al*, 2004; Jellema P *et al*, 2010). Aunque los mecanismos de disminución de la masa muscular han sido estudiados intensamente poco se conoce respecto a los factores que promueven la pérdida de tejido adiposo en los pacientes con cáncer (Tijerina AJ *et al*, 2004; Esper DH *et al*, 2005). Se ha postulado que la pérdida de peso sería independiente de una mala nutrición; en vez de ello, varios estudios han demostrado *in vivo* que el punto clave para comprender la pérdida de peso es el aumento de la lipólisis (Legaspi A *et al*,

1987; Shaw JH *et al*, 1987; Klein S *et al*, 1990; Hyltander A *et al*, 2000, Murphy RA *et al*, 2010). Han sido implicados varios factores lipolíticos como por ejemplo la IL-6, TNF- $\alpha$ , la glicoproteína zinc- $\alpha_2$ , etc. (Kalra PR *et al*, 2002; Tisdale MJ *et al*, 2005). Un estudio realizado en 96 pacientes con cáncer gastroesofágico (Krzystek-Korpicka M. *et al*, 2007) demostró que la pérdida de peso se asoció más con altos niveles sanguíneos de IL-6 e IL-8 que con el TNF- $\alpha$  y que la elevación de estas interleuquinas se asoció además con la extensión tumoral y una elevada expresión de los factores de crecimiento del endotelio vascular tipo A y C (VEGF-A y VEGF-C, por sus siglas en inglés). Recientemente, dos trabajos realizados por Y. Y. Li y colaboradores (2009; 2010), en cultivos celulares de cáncer de colon (HT-29) encontraron que la IL-6, derivada de los macrófagos activados, puede también aumentar la expresión de MUC1 y disminuir la de MUC2. Coincidentemente con estos hallazgos, encontramos una correlación estadísticamente significativa entre la pérdida de peso y la expresión fuerte de MUC1 tanto en los TP como en los GLM.

## 7) Manifestaciones clínicas en el CCR

Las manifestaciones clínicas al momento del diagnóstico constituyen en sí mismas un factor pronóstico para los pacientes con CCR. Varios estudios han descrito una relación entre la obstrucción y/o perforación intestinal y el mal pronóstico (Lagautrière F *et al*, 1998; Park YJ *et al*, 1999; Ye YJ *et al*, 2008, Cho YB *et al*, 2008). Este hallazgo no es patognomónico de un estadio tumoral en particular, es decir, no solamente se presenta en estadios avanzados sino también puede ser encontrado en estadios tempranos. En un estudio clínico realizado por la NSABP (Wolmark N *et al*, 1983) se halló que en 1.021 pacientes con estadio II y III de CCR la sobrevida se vio afectada cuando la enfermedad se presentó con obstrucción y/o perforación intestinal, especialmente si era en el colon derecho. Una revisión realizada por el Hospital General de Massachusetts describió que sólo el 31% de los pacientes estaban vivos a los 5 años cuando su enfermedad se diagnosticó luego de un episodio de obstrucción y/o perforación mientras que los que no se habían presentado con estas manifestaciones fue del 59%. Los tumores ubicados en el ciego y recto son más

propensos a la obstrucción intestinal que los localizados en el colon transverso, descendente o sigmoides; sin embargo, en estos últimos también puede ocurrir. Pocos trabajos han tratado de explicar esta relación. Datos obtenidos de estudios realizados en pacientes con Fibrosis Quística y en modelos animales con igual patología sugieren que el incremento de la expresión de MUC1 en todas las células de las criptas epiteliales sería la causa de obstrucción intestinal que habitualmente presentan estos pacientes (Chambers JA *et al*, 1994). Nosotros encontramos en todos los pacientes con obstrucción y/o perforación al momento del diagnóstico de CCR expresión de MUC1 en los TP, en el 62,5% de los tejidos fue con un índice de expresión fuerte.

La presencia de sangre en la materia fecal, el dolor abdominal crónico y el cambio en el ritmo evacuatorio podría ser producto de repetidos episodios trombóticos en la microvasculatura intestinal (Burns B *et al*, 2003). Se ha observado en los estadios avanzados que la infiltración tumoral como y la metástasis podría estar asociada a un estado pro-coagulante; en este aspecto el antígeno carbohidrato *Lewis y* tendría una función crucial. El glicolípido *Lewis y* actuaría como un co-factor de la proteína pro-coagulante activa tipo 1 producida por la célula cancerígena (CCA-1, por sus siglas en inglés) (Suzuki M *et al*, 1997, 1999). Inufusa H. y colaboradores (2001) observaron en una línea celular humana de adenocarcinoma de pulmón (HAL8), la cual presenta una alta expresión de *Lewis y*, una inhibición de la actividad de CCA-1 cuando agregaron al cultivo el anticuerpo FS01 (anti-*Lewis y*); dicha inhibición no se produjo cuando se agregó este anticuerpo a una línea celular humana de cáncer de colon (RPMI4788) que no expresa *Lewis y*; la inhibición fue dosis dependiente. Este hallazgo hace suponer que *Lewis y* juega un rol en el mecanismo de metástasis vía la actividad pro-coagulante de CCA-1. Esto podría explicar por qué encontramos mayor expresión de *Lewis y* en los TP de los pacientes con presencia de sangre en la materia fecal, dolor abdominal crónico y cambio en el ritmo evacuatorio al momento del diagnóstico de CCR que en aquellos sin estas manifestaciones. Asimismo, podría brindar una explicación acerca de la causa por la cual la mayoría de los TP (84,6%) y GLM de nuestro estudio presentaron necrosis cuando *Lewis y* se hallaba presente.

La anemia crónica también es un signo frecuentemente encontrado en los pacientes con CCR; sin embargo, su origen preciso aún no ha sido bien comprendido.



Los antígenos carbohidratos asociados a mucinas podrían contribuir a su desarrollo y/o mantenimiento. En este sentido, observamos expresión de los antígenos *Tn* y *Lewis x* en todos los TP de los pacientes con antecedentes de anemia crónica. Una posible explicación a este hallazgo podría estar dada por la presencia de un estado hemolítico crónico. Tal es el caso de los pacientes que padecen la enfermedad denominada “Síndrome *Tn*”, en la cual los eritrocitos han perdido la enzima  $\beta$ 1,3Gal-transferasa (Berger EG *et al*, 1999) y debido a la alta expresión de *Tn* poseen un gran aumento de anticuerpos circulantes anti-*Tn*, los cuales causarían hemólisis y anemia crónica.

## 8) Localización del CCR

Como se mencionó, la localización del carcinoma colorrectal tiene un significado pronóstico. Se ha observado diferencias histológicas entre los tumores localizados en el colon ascendente y descendente, un ejemplo de ello es que la inestabilidad microsatélite es más frecuentemente encontrada en el colon derecho que en el izquierdo. Las mucinas y antígenos carbohidratos asociados también son expresados con más frecuencia en determinados sitios del intestino grueso. Coincidentemente con otros autores (Kocer B *et al*, 2002; Jang KT *et al*, 2002; Pérez RO *et al*, 2008) encontramos expresión fuerte de MUC2 y el doble de expresión de MUC5AC solamente en los tumores localizados en el colon respecto a los encontrados en el recto; asimismo, no se hallaron estas mucinas en los GLM de cáncer de recto. Dentro de los carcinomas desarrollados en el colon, los ubicados proximalmente presentaron mayor índice de expresión fuerte de MUC1 que los hallados distalmente. Este hallazgo coincide con el trabajo de S. E. Baldus y colaboradores (2004) en donde encontraron un 63,2% de expresión de MUC1 en el colon ascendente y un 48,4% en el descendente.

Los carcinomas del colon proximal expresan menos antígenos del grupo Lewis que los del colon distal y esto se debe a que estos antígenos son normalmente expresados en la mucosa del colon ascendente y no en el colon descendente (Wiley EL *et al*, 1981; Nakagoe T *et al*, 1994). Jaques Bara y colaboradores (1988) encontraron un 43% de expresión de *Lewis* y en los tumores proximales y un 91% en los distales.

Coincidentemente, nosotros no sólo hallamos un predominio de este antígeno en los carcinomas del colon descendente sino que también observamos mayor expresión de los antígenos *Lewis x* y *sialil Lewis a* respecto a los encontrados en el colon ascendente. Con referencia a *Lewis x* y también hallamos una correlación positiva entre su expresión en los TP y GLM de los cánceres de recto y el hallado en los cánceres de colon.

Si bien los hallazgos descriptos hasta acá podrían deberse a factores genéticos o epigenéticos que medien la expresión de las mucinas y antígenos carbohidratos asociados en determinadas zonas del colon, se debe tener en cuenta que en los últimos 50 años ha habido un gradual cambio en la localización del CCR (Stewart RJ *et al*, 1983; Jessup JM *et al*, 1996; Thorn M *et al*, 1998; Howe HL *et al*, 2001). Los datos obtenidos del National Cancer Data Base muestran un aumento en la incidencia de los cánceres proximales, especialmente los ubicados en la región cecal (Mamazza J *et al*, 1982; Vukasin AP *et al*, 1990). Este cambio podría estar relacionado con la modificación del estilo de vida, es decir, mayor consumo de alcohol, tabaco, aumento de la obesidad y diabetes, por lo cual, estos factores también podrían influir la expresión de las mucinas y antígenos relacionados en las distintas zonas del colon.

### 9) Tamaño tumoral

El diámetro tumoral depende de las características biológicas del carcinoma así como de la respuesta inmunológica del huésped.

Nakagoe T. y colaboradores (2001) encontraron que los niveles plasmáticos de *sialil Lewis x* fueron aumentando, tanto en sangre periférica como en la extraída de las cercanías del tumor, en los TP de gran tamaño comparados con los de pequeño tamaño. Coincidentemente, hallamos mayor frecuencia de expresión de este antígeno en los TP mayores a 5 cm respecto de aquellos menores a 5 cm. Por su parte, M. L. Cardoso y colaboradores (2009) encontraron una correlación significativa entre elevados niveles sanguíneos de CEA (extraídos tanto de sangre periférica como de sangre venosa mesentérica) y el tamaño tumoral; coincidentemente, nosotros

observamos una disminución del 12,2% de expresión de CEA en los TP menores de 5 cm respecto de aquellos mayores a este tamaño.

Por lo expuesto, la expresión de estos antígenos podría reflejar la existencia de una sub-población celular con mayor capacidad proliferativa e invasora dentro de una masa tumoral en crecimiento.

## **B. Estadificación**

Un elevado porcentaje de pacientes con estadíos precoces, sometidos a resección quirúrgica curativa y quimioterapia o radioterapia adyuvante, recaen en poco tiempo (Eisenberg B *et al*, 1982; Gastrointestinal Tumor Study Group, 1985; Galandiuk S *et al*, 1992). El pronóstico del CCR está directamente relacionado con la presencia o ausencia de metástasis a órganos distantes (Dukes CE, 1958; Sugarbaker PH *et al*, 1985). Hasta el presente la herramienta más ampliamente utilizada para predecir el pronóstico ha sido el TNM; sin embargo, a pesar de ser la más reproducible hasta el momento, se ha observado que pacientes con un mismo estadio y con la misma localización tumoral pueden comportarse de manera diferente, es decir, algunos evolucionan favorablemente y otros progresan rápidamente a estadíos avanzados. Una forma de mejorar la identificación de esos pacientes sería agregar parámetros moleculares al TNM con el objeto de identificar los pacientes que, luego de la cirugía curativa, sucumbirán rápidamente a su enfermedad. Tal es el caso de la inestabilidad microsatélite que actualmente es considerado como factor pronóstico en pacientes con estadio II y III de CCR (Tejpar S *et al*, 2009).

En la progresión tumoral están involucrados cambios cuantitativos y cualitativos en las glicoproteínas expresadas en las membranas de las células carcinomatosas; estos cambios favorecerían las metástasis (Nicolson GL *et al*, 1982; Irimura T *et al*, 1987, 1991; Matsushita Y *et al*, 1991). Varios estudios han relacionado la expresión de las mucinas y antígenos carbohidratos asociados con el estadio TNM del CCR (Huang WB *et al*, 2002; Baldus SE *et al*, 2002; Yu XW *et al*, 2007; Duncan TJ *et al*, 2007; Lugli A *et al*, 2007).

## 1) Estadío pT

En los pacientes que se sometieron a tratamiento quirúrgico con intento curativo, se observó que aquellos que tenían estadío pT<sub>3/4</sub> presentaban una expresión estadísticamente más fuerte de MUC1 en los TP y GLM que los estadíos pT<sub>1/2</sub>; la misma observación fue hecha con la mucina MUC5AC pero en este caso la correlación no fue significativa. Se halló una menor expresión de MUC2 en los TP y GLM de los pacientes con estadíos pT avanzados respecto a los precoces. Es posible que las células neoplásicas que se encuentran invadiendo la zona más profunda de la pared colorrectal tengan un fenotipo más agresivo (Jang KT *et al*, 2002; Suzuki H *et al*, 2004; Yu XW *et al*, 2007).

Como se dijo anteriormente, las células neoplásicas de tumores de estadíos avanzados presentan diferencias en la expresión de glicoproteínas (Irimura T *et al*, 1987; Hoff SD *et al*, 1989; Matsushita Y *et al*, 1990). En nuestro estudio, los antígenos carbohidratos *sialil Lewis a/x* y *Lewis y* se expresaron más en los TP y GLM de los pacientes con estadío pT<sub>3/4</sub> que en aquellos con estadío pT<sub>1/2</sub>; estos pacientes también presentaron niveles sanguíneos pre- y post-operatorios de CA 19-9 más elevados. En coincidencia con lo publicado por otros autores (Iarūmov N *et al*, 1998; Grabowski P *et al*, 2000; Nakagoe T *et al*, 2001; Zheng CX *et al*, 2001), observamos una correlación estadísticamente positiva entre la expresión fuerte CEA en los TP y niveles sanguíneos pre- y post-operatorios de CEA más elevados en los pacientes con estadíos pT<sub>4</sub> que en aquellos con estadíos pT<sub>1/2</sub>.

## 2) Estadío pN

En los pacientes con estadío pN<sub>2</sub> observamos mayor expresión de *sialil Lewis a* en los TP y niveles sanguíneos más elevados pre-operatorios de CA-19-9 que en aquellos con estadío pN<sub>0</sub>. En 1999, C. Morales-Gutiérrez y colaboradores demostraron la elevación de *sialil Lewis a* en el citosol de las células pertenecientes a tumores con estadío pN<sub>2</sub>; por lo cual este hallazgo reflejaría la existencia de un fenotipo celular más agresivo permitiéndole a la célula tumoral invadir no sólo la pared colorrectal en

---

profundidad sino también poder llegar a la circulación sanguínea y linfática y facilitar la metástasis a sitios distantes (Morales-Gutiérrez C *et al*, 1999; Nakagoe T *et al*, 2001). En este sentido, el antígeno carbohidrato *sialil Lewis x* también ha sido relacionado con estadíos pN avanzados. Se lo ha asociado con mayor incidencia de metástasis ganglionares en el cáncer gástrico (Futamura N *et al*, 2000), mama (Pierce A *et al*, 2010; Wei J *et al*, 2010), pulmón (Wang QY *et al*, 2003) y cáncer colorrectal (Baldus SE *et al*, 2002; Konno A *et al*, 2002). Al igual que ocurre con el antígeno *sialil Lewis a*, este antígeno también puede encontrarse en mayores concentraciones sanguíneas cuando en pacientes tienen pN<sub>1/2</sub> que pN<sub>0</sub> (Nakagoe T *et al*, 2001). En el presente trabajo de Tesis obtuvimos resultados similares ya que hallamos una mayor expresión de *sialil Lewis x* en los pacientes con estadíos pN avanzados respecto de aquellos con estadío pN<sub>0</sub>; asimismo, también encontramos que los ganglios que presentaron invasión tumoral de su cápsula tuvieron mayor expresión de *sialil Lewis x* que aquellos sin dicha invasión.

### 3) Estadío M

En CCR la presencia de metástasis distantes (M<sub>1</sub>) al momento del diagnóstico marca indudablemente el pronóstico de los pacientes. Como hemos mencionado, son las características fenotípicas de las células tumorales las que marcan la posibilidad de que esta situación ocurra. Mediante el estudio de los marcadores tumorales es posible que se pueda predecir el comportamiento metastático de un tumor. En este trabajo de Tesis observamos una mayor expresión de MUC1 en los TP de los pacientes con M<sub>1</sub> que en aquellos con M<sub>0</sub>. Es sabido que MUC1 está involucrada no sólo con la profundidad de la invasión tumoral sino también en la invasión angiolímfática, por lo cual, las células que la expresan tendrían mayor capacidad de viajar a órganos distantes (Nakamori S *et al*, 1994; Hiraga Y *et al*, 1998; Manne U *et al*, 2000; Baldus SE *et al*, 2002). Por su parte, Y. Higara y colaboradores (1998) observaron que estas células tienen preferencia por el hígado; en su trabajo, el 92% de los pacientes con metástasis hepáticas expresaron MUC1 en sus TP mientras que sólo el 59% de los pacientes con otras localizaciones metastáticas expresaron esta mucina. Pero quizás

no sea MUC1 la única estructura implicada; los antígenos carbohidratos asociados a mucinas pueden también tener un rol protagónico en esta situación. Se ha hallado que *Lewis x* y *sialil Lewis a/x* están involucrados en el proceso de reconocimiento de la célula tumoral por parte de los receptores ubicados en el endotelio vascular hepático, tal es el caso de la P-selectina que reconoce al *sialil Lewis x* (Kiryama K *et al*, 1991; Konno A *et al*, 2002). En nuestro trabajo hallamos en más de la mitad de los carcinomas que presentaron metástasis a distancia una expresión fuerte de los antígenos *sialil Lewis a/x* y valores sanguíneos pre- y post-operatorios de CA 19-9 elevados (79,5 UI/ml y 106,7 UI/ml, respectivamente).

#### 4) Estadíos I y II

Más del 30% de los pacientes con CCR en estadíos precoces sometidos a cirugía curativa presentan recurrencia de su enfermedad (Cianchi F *et al*, 2002; Madbouly KM *et al*, 2007). Hasta el presente no se ha hallado un marcador molecular que pueda predecir esta situación.

En nuestro estudio, los pacientes con estadío II con ausencia de la mucina MUC5AC en sus TP tuvieron una SG y un TLE más acortado que aquellos con expresión positiva (4,6 versus 6,9 años y 53 versus 79,8 meses, respectivamente). Este hallazgo coincide con lo publicado por B. Kocer y colaboradores (2002) quién concluye que la expresión positiva de MUC5AC en el CCR estaría asociada con buen pronóstico y la ausencia de dicha mucina con mal pronóstico, sugiriendo que dicha ausencia se correlacionaría con tumores más agresivos. Recientemente, la misma autora observó altos títulos de IgG circulantes anti-MUC5AC en los TP de los pacientes con CCR que expresan poca MUC5AC indicando una respuesta T CD4+ (a diferencia de los altos títulos de IgM circulantes encontrados en los pacientes con pólipos colorrectales) lo cual podría constituir en sí mismo un factor pronóstico desfavorable para estos pacientes (Kocer B *et al*, 2006).

El antígeno *Tn* se lo ha denominado por mucho tiempo como el marcador “pan-carcinoma” dado que se lo puede encontrar expresado en tumores de distinta localización. Springer G. F. y colaboradores (1985) observaron expresión de este

antígeno en el 88,8% y 87,5% de los pacientes con estadios iniciales de cáncer de pulmón y de mama, respectivamente. En nuestro trabajo de Tesis la expresión de *Tn* en los TP de los pacientes con estadio I ( $pT_{1/2}pN_0M_0$ ) se asoció con una menor SG y TLE (4,4 versus 5,7 años y 54,3 versus 62,7 meses, respectivamente) que aquellos con ausencia del antígeno, aunque estas diferencias fueron importantes no se vió reflejada estadísticamente. Los pacientes con CCR en estadio II ( $pT_{3/4}pN_0M_0$ ) presentaron un 57,6% más de expresión de *Tn* que los pacientes con estadio IV. Esta disminución de expresión de *Tn* en los tumores avanzados también fue observada en otras localizaciones tumores como por ejemplo en el cáncer de mama; este hecho sugiere que la progresión tumoral seleccionaría el tipo de carbohidrato expresado en la superficie de la célula tumoral (Kurtenkov O *et al*, 2005; Kanska G *et al*, 2006). De la misma manera en nuestro trabajo, los TP de los pacientes con estadio II con expresión positiva de *Tn* tuvieron una menor SG y TLE que aquellos con ausencia de expresión (4,2 versus 6,1 años y 45,4 versus 73,6 meses, respectivamente).

El antígeno *Lewis* y también se halló expresado en mayor proporción en los TP de los pacientes con estadio II que aquellos con estadios avanzados; estos pacientes presentaron una menor SG y TLE que los que tuvieron ausencia de expresión del antígeno (4,4 versus 5,4 años y 50,3 versus 62,3 meses, respectivamente).

Por otra parte, en los TP de los pacientes con estadio I y II cuya enfermedad progresó luego del tratamiento quirúrgico, observamos que el antígeno *sialil Lewis x* se expresó con una intensidad mayor con respecto de los tumores de pacientes sin evidencia de progresión de enfermedad al finalizar este estudio. Este hallazgo fue descrito previamente en el trabajo realizado por F. S. Doekhie y colaboradores (2008) en el cual hallaron una correlación positiva entre la expresión de este antígeno y la recurrencia de la enfermedad; el 91% de los pacientes cuya enfermedad reapareció antes de los 3 años tenía expresión de *sialil Lewis x* en sus TP a diferencia del 67% de los pacientes que luego de los 5 años del diagnóstico estaban libres de enfermedad. Como dijimos en otros apartados de esta Tesis, *sialil Lewis x* es un carbohidrato expresado normalmente en los leucocitos de sangre periférica por lo cual su presencia en las células tumorales le permite a éstas viajar en sangre y unirse a los mismos receptores del endotelio vascular y consecuentemente metastatizar (Phillips ML *et al*,

1990; Walz G *et al*, 1990; Lowe JB *et al*, 1990; Takada A *et al*, 1993). *Sialil Lewis x* no sólo tiene un papel en la producción de la metástasis sino también está implicado en etapas más tempranas. Se ha descrito una mayor densidad de la microvasculatura, tanto linfática como sanguínea, cuando las células tumorales expresan este carbohidrato en sus membranas, lo cual le conferiría al tumor mayor capacidad de progresión de la enfermedad dentro de los próximos 3 años del diagnóstico de CCR (Doekhie FS *et al*, 2008). Coincidentemente con esta observación, nosotros encontramos expresión de *sialil Lewis x* en el 60% de los TP con invasión vascular; en el 25% de estos pacientes su enfermedad progresó en los primeros 5 años.

### 5) Estadío III

Los pacientes con ausencia de expresión de las mucinas MUC2 en sus TP (y en sus GLM) presentaron una menor SG y TLE que aquellos con expresión positiva (1,9 versus 3,1 años y 17,9 versus 35,7 meses, respectivamente). Estos hallazgos son coincidentes con los descritos recientemente por H. Kang y colaboradores (2011) en los cuales observaron, en 229 pacientes con estadíos II y III, que la ausencia de MUC2 constituye un factor de mal pronóstico. Recordemos que MUC2 es una mucina altamente expresada en el tejido colorrectal normal y en los tumores con más diferenciados (GH1) por lo cual su ausencia podría reflejar la presencia de tumores más indiferenciados y por lo tanto más agresivos.

La SG y TLE de los pacientes con estadío III con expresión positiva de *Tn* en sus GLM fue más corta que la de aquellos sin esta expresión (1,7 versus 3,2 años y 17,2 versus 31,8 meses, respectivamente). Si bien en nuestro trabajo no observamos diferencias significativas respecto a la expresión de este antígeno en los TP, hay trabajos realizados en cáncer de mama (Kawaguchi T *et al*, 2005; 2006), cuello del útero (Hamada S *et al*, 1993) y colorrectal (Danussi C *et al*, 2009) que correlacionan la expresión de *Tn* con mayor compromiso ganglionar y consecuentemente con un mal pronóstico. Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual este antígeno facilita la invasión linfática por parte de las células tumorales aún permanece incierto.



---

Recientemente, se ha sugerido que la galectina-8, presente en los vasos linfáticos, podría ser el receptor para la unión de *Tn* (Cueni LN *et al*, 2009).

Todos los antígenos carbohidratos asociados a mucinas estudiados en el presente trabajo de Tesis presentaron una relación con el pronóstico de los pacientes con estadio III. Se estudiaron los pacientes con recurrencia de su enfermedad luego del tratamiento combinado, es decir, cirugía más quimioterapia adyuvante para los pacientes con cáncer de colon y radioterapia-quimioterapia adyuvante para aquellos con cáncer de recto. Estos pacientes no sólo expresaron mayor *sialil Lewis a* en sus TP y GLM sino también que tuvieron niveles sanguíneos pre- y post-operatorios de CA 19-9 elevados así como una mayor expresión de *sialil Lewis x* y *Lewis x/y* respecto a aquellos sin recurrencia de su enfermedad. Estos hallazgos son consistentes con los resultados obtenidos por otros investigadores (Filella X *et al*, 1992; Ueda T *et al*, 1994; Nakayama T *et al*, 1997; Imada T *et al*, 1999; Nakagoe T *et al*, 2000; Matsui T *et al*, 2004; Park IJ *et al*, 2009). Recientemente, un estudio realizado por T. Yakabe y colaboradores (2010) demostró que los valores pre-operatorios elevados de CA19-9 constituyen un factor de alta sensibilidad (0.833) para predecir recurrencia de la enfermedad en los pacientes con estadios I-II-III. Por este motivo se ha sugerido que la determinación sanguínea de CA 19-9 debería ser incorporada junto a la tomografía axial computada y al CEA a las guías de vigilancia de los pacientes con CCR (Kawamura YJ *et al*, 2010). Por otra parte, nosotros observamos recurrencia de la enfermedad en el 81,2% y 69,2% de los pacientes con expresión positiva de *sialil Lewis x* en los TP y GLM, respectivamente. A pesar de que este antígeno ha sido relacionado más con la invasión vascular que con la linfática, T. Nakagoe y colaboradores (2001) observaron niveles sanguíneos más elevados de *sialil Lewis x* en los pacientes con presencia de invasión linfática en el TP que en aquellos sin dicha invasión (15% versus 5,4%).

Nakagoe T. y colaboradores (2000) mostraron que sólo el 26,2% de los pacientes con expresión positiva de *Lewis x* estaban vivos a los 5 años mientras que el 58,2% con ausencia de dicha expresión habían sobrevivido a ese período. Coincidentemente, en nuestro estudio los pacientes con expresión fuerte de *Lewis x* en sus TP presentaron un menor TLE (15,1 meses) respecto a aquellos con expresión

débil (28,6 meses) o ausencia del antígeno (36,3 meses). Por otra parte, también encontramos que el índice de expresión fuerte de *Lewis y* en los TP se asoció con una SG y TLE más reducida que aquellos con ausencia de este antígeno (1,9 versus 6,9 años y 24,3 versus 43,3 meses, respectivamente). *Lewis y* se halla asociado positivamente con la presencia de invasión linfática por lo cual su valoración histopatológica podría ser útil para identificar un subgrupo de pacientes con estadio III de CCR con mal pronóstico.

H. Ishida y colaboradores (2004) hallaron que los pacientes estadios III con una elevada expresión de CEA y Ki67 en los GLM presentaban una sobrevida más corta. En coincidencia, nosotros observamos un menor tiempo libre de progresión y sobrevida global en los pacientes analizados cuando el TP expresó el antígeno carcinoembrionario.

## 6) Estadío IV

Los pacientes con estadio IV de CCR desde el inicio de su enfermedad analizados en ese trabajo tuvieron una menor SG y TLP cuando sus TP no expresaron MUC2 respecto a cuando esta se hallaba presente (0,8 versus 1,9 años y 7,6 versus 18,3 meses, respectivamente). Aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, conciden con lo observado por otros autores (Ajioka Y *et al*, 1996; Perez RO *et al*, 2008; Bu XD *et al*, 2010). Lugli A. y colaboradores (2007) analizaron 1420 pacientes con CCR y observaron que la pérdida de la expresión de MUC2 se asoció no sólo con estadios pT y pN avanzados sino también con mayor invasión vascular y mal pronóstico. Tal disminución de expresión podría estar relacionada con la metilación del promotor de MUC2. En los adenocarcinomas la metilación del promotor sería mayor que en los carcinomas mucinosos (Gratchev A *et al*, 2001). Asimismo, el promotor de MUC2 también tiene dos sitios de unión de p53 por lo cual la interacción con esta proteína podría facilitar su metilación (Manne U *et al*, 2000).

Springer G.F. (1984) relacionó por primera vez el antígeno *Tn* con la evolución de los pacientes con cáncer. La presencia de este antígeno en el esqueleto de la MUC2 le conferiría a la célula tumoral una alta afinidad a las lectinas expresadas en la

superficie de los macrófagos histiocíticos otorgándole una función biológica en la interacción del carcinoma con el huésped y con otras células (Inoue M *et al*, 1998; Irimura T *et al*, 1999). Los pacientes con estadio IV con GLM con expresión positiva tuvieron una menor SG y TLP que aquellos con ausencia de *Tn* (1,7 versus 2,5 años y 12,7 versus 30,0 meses, respectivamente). Esta observación sustenta el concepto de que las metástasis linfáticas estarían más relacionadas con la expresión del antígeno *Tn* y las hematógenas con los antígenos del grupo sanguíneo *Lewis* (Bresalier RS *et al*, 1996; Kawaguchi T *et al*, 1996).

Las estructuras sialiladas de las mucinas podrían tener un rol importante en la adhesión tanto con la membrana basal como con los ligandos endoteliales de los órganos receptores de las metástasis. En este sentido, nosotros observamos en los pacientes con estadio IV con expresión de *sialil Lewis a/x* y *Lewis* y positiva en los TP y GLM una SG y TLP más corta que aquellos con ausencia de estos antígenos; asimismo, los que presentaron una expresión fuerte la sobrevida fue aún más reducida. Ono M. y colaboradores (1996) no sólo observaron progresión hepática en los pacientes con estadios tempranos que expresaron *sialil Lewis x* en más del 35% de la superficie tumoral sino también una mayor expresión en los pacientes con estadio IV que los estadios III (50% versus 13%). Este aumento de expresión con la progresión del estadio estaría acompañado por un aumento en los niveles sanguíneos de *sialil Lewis x* (Grabowski P *et al*, 2000; Nakagoe T *et al*, 2001). Coincidentemente, en más de la mitad de nuestros pacientes en estadio IV con expresión positiva de *sialil Lewis x* tanto en los TP como en los GLM progresaron rápidamente.

Varios estudios también han demostrado un aumento progresivo de los niveles sanguíneos de CA 19-9 con la progresión del estadio tumoral. T. Nakagoe y colaboradores (2001) encontraron sólo un 8,3% de valores sanguíneos pre-operatorios elevados de CA 19-9 en los pacientes con estadio I y un 57,8% en aquellos con estadio IV; este hallazgo fue reproducible en otros trabajos (Zheng CX *et al*, 2001; Herzényi L *et al*, 2008). Asimismo, H. Kato y colaboradores (2008) encontraron que el mantenimiento de elevados niveles de CA 19-9 luego de realizar una metastasectomía, ya fuera hepática o peritoneal, constituiría en sí mismo un factor de mal pronóstico. W. S. Wang y colaboradores (2002) demostraron además que los valores elevados de CA

---

19-9 antes de comenzar el tratamiento quimioterápico de primera línea y el índice de Karnofsky constituyen también dos factores de mal pronósticos para los pacientes con CCR. En nuestro estudio, los pacientes con estadio IV presentaron una recurrencia de la enfermedad más temprana cuando en sus TP y GLM se hallaba expresado el antígeno *sialil Lewis a*. Asimismo, en estos pacientes, la expresión fuerte del antígeno se asoció con menor TLP que el observado en pacientes con expresión débil del antígeno.

### C. Determinaciones séricas y tisulares de CEA y CA 19-9

El rol del antígeno carcinoembrionario en la vigilancia post-operatoria del CCR ha sido ampliamente investigado; su sensibilidad para detectar una recaída de la enfermedad en los pacientes sometidos a una resección completa del tumor varía entre 58% a 89% (Arnaud JP *et al*, 1980; Castells A *et al*, 1998; Meyerhardt JA *et al*, 2003; Goldstein MJ *et al*, 2005; Hara M *et al*, 2008; Tsikitis VL *et al*, 2009; Chao M *et al*, 2009). Algunos estudios han observado que la elevación sanguínea del CEA puede ocurrir de 1,5 a 6 meses antes de que la recurrencia se haga evidente (Martin EW *et al*, 1980; Wolmark N *et al*, 1983; Minton JP *et al*, 1985; McCall JL *et al*, 1994; Hine KR *et al*, 1984; Kievit J *et al*, 1990; Iarǔmov N *et al*, 1998; Ren JQ *et al*, 2006; Kang H *et al*, 2011). En nuestro estudio, los pacientes con estadio II y III cuya enfermedad recurrió tuvieron niveles sanguíneos pre-operatorios de CEA más elevados que aquellos sin evidencia de enfermedad al completar el seguimiento. Recientemente, P. G. Gobbi y colaboradores (2008) concluyeron que los valores sanguíneos pre-quimioterápicos de CEA elevados constituyen un factor de mal pronóstico independientemente del estadio del CCR. Asimismo, L. A. Dawson y colaboradores (1999) observaron que los valores post-operatorios o post-quimioterapia elevados de CEA también constituyen un factor de mal pronóstico ya sea que éste fuera encontrado en los TP, GLM o en la circulación sanguínea.

Varios trabajos han demostrado que la expresión de *sialil Lewis a* en los pacientes con CCR es un factor de mal pronóstico (Matsui T *et al*, 2004; Herszényi L *et al*, 2008). Independientemente del estadio, C. X. Zheng y colaboradores (2001)

observaron que la supervivencia a los 3 años se reducía al 48% cuando los pacientes tenían valores sanguíneos pre-operatorios de CA 19-9 elevados, mientras que el 73,6% de los pacientes con valores sanguíneos normales permanecía vivo a los 3 años. En nuestro estudio, los pacientes con expresión positiva de *sialil Lewis a* en los TP y con niveles sanguíneos de CA 19-9 elevados tanto en el pre- como post-operatorio presentaron recurrencia de su enfermedad más tempranamente respecto a aquellos pacientes con niveles de CA 19-9 normales o cuyos TP no expresaban este antígeno (36,7 versus 47,2 meses, respectivamente).

#### D. Pronóstico

Independientemente del estadio TNM, el comportamiento metastático del CCR ha sido asociado con una disminución de la expresión de la mucina MUC2 y un aumento de la MUC1. Baldus S. E. y colaboradores (2002) hallaron que los pacientes cuyos tumores expresaban MUC1 en más del 35% de su superficie sobrevivían en promedio 2,9 años mientras que aquellos con más del 65% el promedio era de 0,9 años; por lo cual, el aumento de expresión de esta mucina en la superficie tumoral se correlacionaría con su evolución. Los resultados de este trabajo coinciden con los nuestros y con los de otros autores (Higara Y *et al*, 1998; Manne U *et al*, 2000). En el análisis univariado observamos que los pacientes con expresión positiva de MUC1 tuvieron una SG y TLP más corta que aquellos con ausencia de expresión (3,4 versus 4,7 años y 37,7 versus 56,6 meses, respectivamente).

El *antígeno Tn* expuesto en el esqueleto de las mucinas estudiadas ha constituido un factor de mal pronóstico en varias localizaciones tumorales como por ejemplo el cáncer de mama (Wang BL *et al*, 1997; Tsuchiya A *et al*, 1999; Imai J *et al*, 2001;), piel (Kanitakis J *et al*, 1999), ovario (Ogawa H *et al*, 1996; Kishikawa T *et al*, 1999), estómago (Pinho S *et al*, 2007), cuello uterino (Hirao T *et al*, 1993; Terasawa K *et al*, 1996; Li Q *et al*, 2010) y cáncer colorrectal (Konno A *et al*, 2002). Nosotros observamos una menor SG y TLP en los pacientes con expresión positiva de *Tn* en sus GLM que en aquellos con ausencia de este antígeno (1,7 versus 3,1 años y 15,1 versus 31,5 meses, respectivamente).

Los pacientes con un índice de expresión fuerte de *Lewis x* en los GLM analizados en nuestro trabajo tuvieron un menor TLP que aquellos con ausencia de este antígeno (17 versus 27,5 meses). Este hallazgo coincide con lo descrito previamente por T. Nakagoe y colaboradores (2000) quienes demostraron que sólo el 41,1% los pacientes con TP *Lewis x*-positivos estaban vivos a los 5 años mientras que el 61,4% de los pacientes con TP *Lewis x*-negativos sobrevivían a los 5 años.

La expresión de *sialil Lewis x* también ha sido asociada con mal pronóstico en varias localizaciones tumorales como por ejemplo el cáncer de mama (Nakagoe T *et al*, 2002), pulmón (Ogawa J *et al*, 1996), estómago (Futamura N *et al*, 2000), vejiga (Numahata K *et al*, 2002), próstata (Jorgensen T *et al*, 1995), páncreas (Nakamori S *et al*, 1999) y cáncer colorrectal (Matsushita Y, 1990; Nakamori S, 1993; Nakagoe T, 2001; Konno A *et al*, 2002, Akamine S *et al*, 2004). Coincidentemente, en nuestro estudio los pacientes cuyos TP y GLM con expresión positiva de *sialil Lewis x* tuvieron una menor SG y TLP que en aquellos que no se expresó el antígeno. Asimismo, el TLP fue 7,7 meses más corto que cuando éste antígeno reaccionó fuertemente.

Similar a lo descrito en el trabajo de H. Naitoh y colaboradores (1994), en los pacientes con CCR hallamos una correlación entre mayor expresión de *Lewis y* en los GLM y menor SG y TLP (1,8 versus 4,5 años y 19,6 versus 37,6 meses, respectivamente). Asimismo, la expresión de CEA en los GLM se asoció con una menor SG y TLP que la observada en los pacientes cuyos GLM no expresaron el antígeno (2 versus 3 años y 12,9 versus 30,1 meses, respectivamente).

Recientemente, un estudio realizado por M. G. Norwood y colaboradores (2010) observó, en 329 pacientes con CCR, una correlación positiva entre la expresión de  $\beta$ -*catenina* citoplasmática y un buen pronóstico; sin embargo, halló lo contrario cuando  $\beta$ -*catenina* se encontró expresada en el núcleo. Consecuentemente con esta observación, nosotros observamos una menor SG y TLP en aquellos pacientes cuyos TP expresaron  $\beta$ -*catenina* y MUC1 en el núcleo respecto a aquellos en los cuales se hallaban ausentes (2,1 versus 3,3 años y 12,7 versus 35,4 meses, respectivamente). Contrariamente, observamos una mayor SG y TLP cuando  $\beta$ -*catenina* y MUC1 se expresaron en la membrana que cuando estaban ausentes (4,5 versus 3,1 años y 53,3 versus 32,4 meses, respectivamente). Coincidentemente con M. Ikeguchi y

colaboradores (2001) quienes mostraron una disminución de la sobrevida en los pacientes con baja expresión  $\beta$ -catenina en los GLM, nosotros hallamos una menor SG (en promedio un año) en aquellos pacientes cuyos GLM expresaron débilmente  $\beta$ -catenina respecto a aquellos cuyos GLM presentaron una expresión fuertemente de  $\beta$ -catenina (en promedio 2,8 años). Sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa y esto podría deberse probablemente al número de GLM evaluados con éste antígeno. Por otra parte, algunos trabajos han demostrado una correlación positiva entre la expresión nuclear de  $\beta$ -catenina en los GLM y mal pronóstico (Herter P *et al*, 1999; Wanitsuwan W *et al*, 2008); en este sentido, en este trabajo de Tesis los pacientes cuyos GLM presentaron expresión nuclear de  $\beta$ -catenina tuvieron una SG y TLP más corta que aquellos con ausencia de expresión nuclear (0,9 versus 2,1 años y 8,9 versus 17,4 meses, respectivamente). Contrariamente, los pacientes que presentaron GLM con un predominio de expresión de  $\beta$ -catenina en la membrana citoplasmática tuvieron mayor SG y TLP que aquellos con expresión negativa (2,9 versus 1,3 años y 21,9 versus 12,3 meses, respectivamente).

### **E. Análisis multivariado de las variables clinicopatológicas en los pacientes con CCR**

Desde su recomendación original por parte del investigador P. F. Denoix (1954), la estadificación clinicopatológica TNM ha sido la más ampliamente utilizada para clasificar los tumores malignos. Sin embargo, la correlación entre el estadio tumoral y la sobrevida de los pacientes con CCR fue reconocida recién en 1977 en un trabajo desarrollado por la AJCC (American Joint Committee on Cancer) en colaboración con la UICC (Unión Internacional Contra el Cáncer) el cual se ha ido modificado según la incorporación de nuevos factores pronósticos en cada estadio. Nuestras observaciones coinciden con la última edición realizada en el 2010, es decir, al efectuar el análisis univariado demostramos que la invasión subserosa, el estadio pN<sub>2</sub>, estadio M<sub>1</sub> y la clasificación TNM del CCR se correlacionaron negativamente con la sobrevida. Recientemente, M. J. Pollheimer y colaboradores (2010) estudiaron 381 pacientes con CCR y demostraron que el estadio pT<sub>3</sub> se asoció con el GH, la invasión angiolinfática,

el estadio pN y la supervivencia de los pacientes. Este autor propone además una subclasificación del estadio pT<sub>3</sub> según la distancia de invasión desde la capa muscular propia en: pT<sub>3a</sub> (≤1mm), pT<sub>3b</sub> (>1-5mm), pT<sub>3c</sub> (>5-15mm) y pT<sub>3d</sub> (>15mm). En la última edición (séptima) del TNM se propone una subclasificación del estadio N<sub>1</sub> en N<sub>1a</sub> y N<sub>1b</sub> (según haya uno o de uno a tres GLM), al estadio N<sub>2</sub> en N<sub>2a</sub> y N<sub>2b</sub> (de acuerdo al compromiso de 4-6 o más de 7 GLM); y finalmente, subdivide al estadio M<sub>1</sub> en M<sub>1a</sub> y M<sub>1b</sub> (ya sea estén presentes uno o más sitios metastáticos).

Independientemente del valor pronóstico del estadio TNM otras variables histopatológicas han sido relacionadas con el pronóstico de los pacientes con CCR. Estas variables incluyen el tipo histológico tumoral, el grado de diferenciación tumoral, el estado del margen circunferencial no peritonealizado y las invasiones linfática y vascular (Jass JR *et al*, 2007; Royal College of Pathologists, 2007, 2010). Aun no hay coincidencia respecto al verdadero significado pronóstico de la invasión perineural, la presencia de células aisladas o en grupos localizadas en el estroma de tejido normal adyacente al tumor primario y los focos tumorales discontinuos extramurales no asociados con ganglios linfáticos (Campton CC *et al*, 2003).

Durante los últimos 20 años de investigación se ha avanzado ampliamente en el entendimiento de los factores genéticos en la carcinogénesis del CCR pero el verdadero impacto con valor pronóstico de estos hallazgos es limitado en la práctica clínica. La inestabilidad cromosómica, descubierta por B. Vogelstein en 1988, fue la primera vía genética en demostrar que la acumulación de defectos en el ADN puede resultar en la pérdida de genes supresores de tumores y en la activación de oncogenes. Esta vía es la responsable de la secuencia adenoma-carcinoma vista generalmente en la PAF y en la mayoría de los CCR esporádicos. Una segunda vía propuesta, descubierta en la década del '90, es la de la inestabilidad microsatélite (MSI, por sus siglas en inglés) la cual involucra la pérdida de la función de la proteína reparadora de los errores del ADN microsatélite (MMR, por sus siglas en inglés) con los consecuentes defectos en el ADN (Liu B *et al*, 1995). Esta deficiencia ocurre en el Síndrome de Lynch y en el 15% de los CCR esporádicos y es más frecuente en el colon derecho, con gran infiltración linfocitaria, carcinomas mucinosos o bien pobremente diferenciados (Jass JR *et al*, 1998). Estos tumores generalmente tienen



buen pronóstico (Gryfe R *et al*, 2000) pero están asociados con alto riesgo de tumores sincrónicos o metacrónicos (Cawkwell L *et al*, 1999). Actualmente se está llevando a cabo en forma rutinaria la determinación de esta proteína para la detección del Síndrome de Lynch en pacientes mayores de 50 años, aquellos con historia familiar de CCR y en tumores sincrónicos o metacrónicos (Umar A *et al*, 2004).

La determinación de ciertas proteínas en CCR avanzado permitió identificar a los pacientes cuyos carcinomas presentan más sensibilidad a determinados agentes terapéuticos; los pacientes con una alta frecuencia de inestabilidad microsatélite (MSI-H, por sus siglas en inglés) son más resistentes al tratamiento con 5-Fluorouracilo (Ribic CM *et al*, 2003); los pacientes con mutación de K-ras son resistentes al tratamiento con Cetuximab (Karapetis CS *et al*, 2008), etc. Un estudio realizado por C. M. Ribic y colaboradores (2003) en 570 pacientes con estadio III y II con alto riesgo de recaída mostraron que los pacientes con carcinomas MSI-H tuvieron mejor pronóstico a los 5 años y que la quimioterapia adyuvante no agregaba ninguna ventaja en la sobrevida comparado con los pacientes que no recibieron tratamiento quimioterápico; por otra parte, los pacientes con carcinomas con baja inestabilidad microsatélite (MSI-L, por sus siglas en inglés) se beneficiaron claramente con el tratamiento adyuvante.

Por lo tanto, la comprensión de los cambios moleculares que llevan al desarrollo, diseminación y metástasis del CCR hace posible la identificación no sólo potenciales factores pronósticos, y sus posibles blancos terapéuticos, sino también detectar factores predictivos de respuesta a los actuales tratamientos.

En este trabajo de Tesis demostramos que los pacientes con estadio I tuvieron una menor sobrevida cuando presentaron un estadio pT<sub>2</sub> y niveles sanguíneos de CEA pre-quirúrgico elevados; por otra parte, los tumores colónicos y la expresión positiva de MUC2 en los TP de estos pacientes se asociaron con buen pronóstico. Si bien el 74% de los pacientes con este estadio están vivos a los 5 años del diagnóstico (SEER 1973-2005), una importante cantidad los mismos sucumbe a su enfermedad a pesar de ser diagnosticada en etapas tempranas. Tanto la invasión tumoral en profundidad como la localización tumoral y los niveles sanguíneos de CEA elevados constituyen factores de mal pronóstico que han sido estudiados en varios trabajos (Wiggers T *et al*, 1988; Chapuis PH *et al*, 1985; Tominaga T *et al*, 1996); sin embargo, aun no han sido

identificados factores moleculares de buen pronóstico en este estadio que indiquen una mejor supervivencia.

De acuerdo a la última clasificación del estadio TNM mencionado los pacientes con estadio IIA de cáncer de colon tienen una supervivencia a los 5 años del 66,5%, estadio IIB del 58,6% y estadio IIC del 37,3% (SEER 1973-2005). Los cánceres de recto presentan similares porcentajes. Recientemente un estudio realizado por H. Sato y colaboradores (2011) en 1476 pacientes con estadio II halló que los tumores con invasión vascular, con menos de 13 ganglios linfáticos resecados, valores sanguíneos pre-operatorio de CA 19-9 elevados, presencia de obstrucción y/o perforación al momento del diagnóstico, hombres y mayores a los 50 años se beneficiaron con el tratamiento quimioterápico adyuvante luego de la cirugía curativa de cáncer de colon. Coincidentemente, en nuestro análisis multivariado encontramos que los niveles sanguíneos pre-operatorios de CA 19-9 elevados se correlacionaron con mal pronóstico en los pacientes con estadio II. Asimismo, encontramos que los tumores mucinosos, altos niveles sanguíneos pre-operatorios de CEA y la expresión de *Lewis y* en los TP fueron factores de mal pronóstico. Por otra parte, la escasa supervivencia a los 5 años de los pacientes con tumores mucinosos así como elevados valores sanguíneos de CEA pre-operatorio ya han sido observados previamente (Minsky BD *et al*, 1987, 1990; Green JB *et al*, 1993; Secco GB *et al*, 1994; Consorti F *et al*, 2000). Los tumores mucinosos y los elevados niveles de CEA pre-operatorios han sido considerados como factores de mal pronóstico independientemente del estadio tumoral (Wolmark N *et al*, 1984; Wiggers T *et al*, 1988; Meling GI *et al*, 1992; Lindmark G *et al*, 1995; Harrison LE *et al*, 1997; Park YJ *et al*, 1999). Al igual que lo descrito en el estadio I, la expresión positiva de la mucina MUC2 en los TP de los pacientes con estadio II se correlacionó con buen pronóstico.

En nuestro estudio los pacientes con estadio III con tumores invasión de la grasa periférica y/o linfática y alto grado nuclear presentaron mal pronóstico. Varios trabajos coinciden en que los pacientes con estadios pT<sub>2-4</sub> con invasión angiolinfática tienen un mal pronóstico independientemente del estadio TNM (Chapuis PH *et al*, 1985; Minsky BD *et al*, 1988; 1989; Michelassi F *et al*, 1991; Newland RC *et al*, 1994; Harrison JC *et al*, 1994; Mulcahy HE *et al*, 1996; Takebayashi Y *et al*, 1996).

En pacientes con estadio III nosotros observamos diferentes características según el carcinoma se encontraba en el colon derecho o el izquierdo. En el primer caso, los TP eran en su mayoría indiferenciados, con alto grado nuclear, presencia de invasión linfática y perineural y compromiso tumoral de la grasa pericolónica. Estos pacientes tuvieron menor sobrevida que aquellos con tumores localizados en el colon izquierdo, los cuales, en su mayoría fueron diagnosticados con estadio pN<sub>1</sub>. Un estudio alemán reveló, en 6.105 pacientes con CCR, que la localización del cáncer en el colon derecho es más agresiva que el izquierdo, más aun si el paciente tiene una edad menor de 50 años (Hemminki K *et al*, 2010). Tanto para el cáncer de colon como para el de recto, la incidencia de metástasis ganglionar esta íntimamente relacionado con la profundidad de invasión tumoral y con el grado histológico; asimismo, el número de ganglios comprometidos también constituye un fuerte predictor de sobrevida para los pacientes con CCR (Wolmark N *et al*, 1986; Greene FL *et al*, 2002; Swanson RS *et al*, 2003; Chen SL *et al*, 2006). Un estudio realizado recientemente por F. Benedix y colaboradores (2010, 2011) en 17.641 pacientes con cáncer de colon a los cuales se les realizó cirugía curativa demostró mediante el análisis multivariado que aquellos con tumores localizados en el colon derecho tuvieron mal pronóstico debido al predominio de tumores pobremente diferenciados y localmente avanzados.

Al aplicar el análisis estadístico de *Componentes Principales* a los estadios II y III encontramos que algunos pacientes con estadios IIA, IIB, IIIA y IIIB tienen la misma probabilidad de recurrencia que los pacientes con estadio IIIC. Este hallazgo es coincidente con los resultados del SEER 1973-2005 y reafirma la hipótesis de que el estadio TNM no es suficiente para predecir la evolución del cáncer colorrectal.

Sólo el 5,7% de los pacientes con estadio IV de CCR están vivos a los 5 años. Algunos pacientes con estadios avanzados pueden progresar más rápidamente que otros; la razón por la cual esto ocurre aun se desconoce. Un meta-análisis demostró, en 1.062 pacientes con CCR avanzado, que el único factor de buen pronóstico en este estadio fue la posibilidad de resear el tumor primario, esto se debería principalmente a la reducción en la incidencia de complicaciones derivadas de la localización tumoral (Stillwell AP *et al*, 2010, 2011). También se ha involucrado a la diferenciación tumoral, al estadio pN, al nivel sanguíneo pre-operatorio de CEA y la realización de

quimioterapia (Zhang S *et al*, 2010), el performance status, localización, tamaño y número de metástasis hepáticas (Vallejos CT, 2007). Un estudio realizado por B. Leone y colaboradores (2007) en 300 pacientes con CCR avanzado reveló que la presencia de metástasis hepáticas exclusivamente tiene mejor pronóstico que otros sitios metastáticos. También se ha implicado a la expresión de K-ras mutado como factor de mal pronóstico (Qiu LX, 2010) y a la cantidad de células tumorales circulantes antes y durante el tratamiento quimioterápico (Cohen SJ *et al*, 2009; Tol J *et al*, 2010). En este estadio nosotros observamos una recurrencia más temprana cuando los TP presentaron expresión de *Tn* y *Lewis y*, y más tardíamente cuando el tumor estaba localizado en colon izquierdo y presentaban bajo grado nuclear.

A pesar de la gran cantidad de estudios que han explorado el significado pronóstico de las características clínicas, histológicas y moleculares, el estadio patológico sigue siendo el mejor indicador de sobrevida tanto para el cáncer de colon como para el de recto. Las características más importantes del estadio son la presencia de metástasis a distancia, la extensión local del tumor, el compromiso ganglionar (particularmente el número de ganglios metastásicos) y la presencia de enfermedad residual luego de la cirugía curativa. Para una mayor estratificación del pronóstico puede agregarse a estos factores la presencia de invasión angiolinfática y los niveles sanguíneos pre-operatorios de CEA.

Varios estudios han sugerido que las características moleculares, independientemente del estadio al momento del diagnóstico, pueden influir en la evolución de los pacientes con CCR. Sin embargo, hasta que no haya un estudio prospectivo con un valor estadístico lo suficientemente importante y que sea completado con un análisis multivariado que evalúe cuál es el factor pronóstico más relevante, ningún marcador molecular o genético debería ser usado en la práctica clínica para decidir el tratamiento o estimar el pronóstico de los pacientes que han sido sometidos a resección de CCR.

---

## Conclusión

En primer lugar, realizamos la caracterización de los pacientes incluidos en esta Tesis. Teniendo en cuenta la distribución de las variables anatomoclínicas las mismas se correspondieron a lo esperado para esta patología.

Seguidamente, realizamos un análisis exhaustivo de la expresión antigénica en las muestras de la secuencia normal-adenoma-carcinoma mediante la técnica de inmunohistoquímica. En la secuencia mencionada hallamos una importante expresión de la mucina MUC1 y de los antígenos carbohidratos asociados *Tn*, *Lewis y/x* y *sialil Lewis a/x*. Estos antígenos presentaron un cambio en el patrón de expresión a medida que la secuencia fue progresando: en los tejidos normales la expresión predominó en el citoplasma; en los adenomas, la reactividad fue tanto en el citoplasma como en la membrana apical (mixta) y en los carcinomas principalmente en la membrana apical. A medida que avanzó la secuencia los antígenos presentaron un aumento en la intensidad de expresión, el porcentaje de tinción en la superficie de la muestra estudiada y del índice de expresión fuerte. Las mucinas MUC2 y MUC5AC, a pesar de disminuir su reactividad con el avance de la secuencia, presentaron el mismo cambio de patrón de expresión al arriba mencionado; ambas mucinas además disminuyeron su expresión con el aumento del grado de displasia de los pólipos. Estos hallazgos revelan los cambios ocurridos en la evolución carcinogénica, es decir, una gradual pérdida de las mucinas naturales del epitelio colorrectal normal por el reemplazo de mucinas y antígenos involucradas tanto con el desarrollo y mantenimiento del carcinoma como con el proceso metastático. Estos cambios ponen en evidencia una gradual pérdida de la polaridad celular y de la actividad enzimática necesaria para la elongación de las cadenas de carbohidratos.

A pesar de realizar cirugías oncológicas con amplios márgenes de tejido normal, un sitio frecuente de recidiva tumoral es la mucosa próxima al lecho anastomosado. Este evento podría estar influenciado por el microambiente donde se encuentra el carcinoma. Un tejido que puede dar información al respecto es la mucosa normal adyacente al carcinoma. Para analizar esta situación evaluamos la expresión antigénica en la mucosa normal adyacente al carcinoma colorrectal y la comparamos con la hallada en los tejidos normales y en los propios carcinomas. En la mucosa normal adyacente al carcinoma observamos mayor expresión de la mucina MUC1 y de

los antígenos *sialil Lewis x* y *Lewis y* así como una disminución de la expresión de la mucina MUC5AC respecto a lo hallado en los tejidos normales. En los carcinomas, las reactividades de MUC1 y de los antígenos mencionados fueron mayores y la de MUC5AC menor que la observada en la mucosa normal adyacente al carcinoma. Estos hallazgos sustentan la hipótesis de que la mucosa normal adyacente al carcinoma sería un punto intermedio, o una zona de “transición”, entre los tejidos normales y los carcinomas. Dicha mucosa sufriría los mismos cambios que los encontrados en la carcinogénesis colorrectal, es decir, mientras todavía se expresan mucinas normales comenzarían a evidenciarse otras mucinas y antígenos carbohidratos asociados que habitualmente son expresados en los carcinomas.

De acuerdo a los resultados obtenidos al analizar los tumores primarios y los ganglios linfáticos metastáticos, MUC1 fue la mucina más expresada en las células de los carcinomas colorrectales muy proliferativos. Su relación con elevado índice mitótico y grado nuclear, la invasión de la pared intestinal, la invasión perineural y de los tejidos angiolinfáticos sugiere la existencia de un fenotipo tumoral agresivo tanto a nivel local como a distancia. Observamos mayor expresión de MUC1 en los carcinomas de los pacientes con metástasis que en aquellos con estadíos tempranos. La presencia de MUC1 en estas células podría estar condicionada por factores genéticos y epigenéticos. Hemos hallado una correlación positiva entre la expresión de esta mucina y el antecedente de cáncer en la familia, ya fueran estos colorrectal o no, así como también con el antecedente previo al diagnóstico de diabetes mellitus, consumo de tabaco, obesidad, etc.

El aumento de la expresión de MUC1 en los carcinomas de los pacientes con una pérdida de peso mayor a los 10 kg en los meses previos al diagnóstico de CCR sugiere que esta mucina podría estar implicada también en el aumento de la lipólisis observada frecuentemente en los pacientes con cáncer.

La presencia en los carcinomas colorrectales de las mucinas formadoras de geles, habitualmente halladas en la mucosa normal, denotaría la existencia de una estirpe celular muy similar al tejido que le dio origen. En nuestro estudio, las mucinas MUC2 y MUC5AC se encontraron principalmente en los tumores del colon proximal y en aquellos de lento crecimiento. Los tumores más diferenciados expresaron

predominantemente MUC2 mientras que los menos diferenciados MUC5AC. La ausencia de ambas mucinas, ya sea en los TP de los pacientes con estadíos tempranos (como en el caso de la mucina MUC5AC) o en aquellos con estadíos avanzados (mucina MUC2) se asoció con mal pronóstico.

Probablemente parte de los efectos biológicos de las mucinas observados aquí esté vinculado a la presencia, en su estructura, de los antígenos expuestos. Un claro ejemplo de ello es *Tn*, antígeno que queda al descubierto por la falta de elongación de las cadenas de carbohidratos. Dicha exposición podría llevar a una reacción inmunológica del huésped provocando un rechazo de aquellas células que expresan normalmente este antígeno como por ejemplo los glóbulos rojos. En este sentido nosotros observamos una correlación positiva entre la expresión de *Tn* en los TP y la presencia de anemia crónica al momento del diagnóstico. La expresión de *Tn* en los carcinomas colorrectales analizados en esta Tesis se correlacionaron con mal pronóstico independientemente del estadio tumoral del paciente.

Los tumores con rápido crecimiento y bien diferenciados fueron los que más expresaron los antígenos del grupo Lewis y sus formas sialiladas. Si bien parecería haber una preferencia a expresar estos antígenos en determinadas partes del tejido colorrectal, debido a que hemos hallado mayor expresión de *Lewis x/y* y *sialil Lewis a* en el colon distal, su expresión podría también estar determinada por otros factores. Ambas formas, sialiladas y no sialiladas, fueron encontradas en mayor proporción en pacientes con antecedentes de obesidad, diabéticos, colecistectomizados, etc. Estos hallazgos hacen suponer que estos antígenos y MUC1 comparten los mismos estímulos para su expresión. Hemos encontrado similitudes en la expresión de la mucina MUC1 y *sialil Lewis a/x* y sus correlaciones con las características anatomoclínicas. Cuando ambas formas sialiladas se encontraron presentes en los TP éstos presentaron mayor estadio pT, pN, invasión perineural y vascular. Esta última propiedad le permitiría a la célula tumoral moverse en la circulación sanguínea y colonizar nuevos tejidos. Independientemente del estadio del cáncer colorrectal, la expresión de las formas sialiladas del antígeno Lewis tanto en los TP como su nivel sanguíneo elevado se asociaron con una rápida progresión tumoral y a una menor sobrevida.



Comprobamos que la presencia del antígeno carcinoembrionario en las células tumorales y su nivel sanguíneo se encuentra estrechamente relacionada con el fenotipo de cáncer colorrectal. La expresión elevada tanto en el carcinoma como en la sangre periférica asoció a tumores con gran potencial metastásico. Hallamos un índice de expresión fuerte en los carcinomas con invasión perineural y en aquellos con presencia de necrosis tumoral. Los niveles sanguíneos fueron más elevados cuando los carcinomas presentaron invasión angiolinfática, estadio pT<sub>3/4</sub>, estadio pN<sub>2</sub> y con invasión de la cápsula ganglionar. La elevada expresión del antígeno carcinoembrionario tanto en el TP como en sangre periférica se correlacionó con mal pronóstico independientemente del estadio TNM.

A través de estos hallazgos podemos concluir que las mucinas MUC1, MUC2, MUC5AC y los antígenos carbohidratos asociados tales como *Tn*, *Lewis x/y* y *sialil Lewis a/x* constituyen parte de los cambios ocurridos en la carcinogénesis colorrectal así como de las propiedades invasoras de las células tumorales. Asimismo, son un elemento importante para comprender las recaídas locales.

Actualmente se están ensayando diversas vacunas contra algunas de las mucinas y antígenos estudiados en esta Tesis como por ejemplo el anti-MUC1 L-BLP25 en cáncer de pulmón (Butts C *et al*, 2010), TG4010 en cáncer de riñón (Oudard S *et al*, 2011), rBCG en cáncer de mama (Yuan S *et al*, 2010) y en cáncer colorrectal (Sugiura D *et al*, 2008; Mukherjee P *et al*, 2008; Beatty PL *et al*, 2010); el anti-*Lewis* y hu3S193 en cáncer de ovario (Smaletz O *et al*, 2011).

Por lo tanto, el análisis que tiene en cuenta el comportamiento biológico del carcinoma, del proceso carcinogénico, del microambiente tumoral así como de las metástasis permitirá desarrollar nuevas herramientas para la detección precoz y poder brindar a los pacientes con cáncer colorrectal, ya fueran estos diagnosticados en etapas tempranas o avanzadas, un tratamiento oportuno.

---

## Resumen

Según la Organización Mundial de la Salud, en el 2008 murieron en el mundo 610.000 pacientes con cáncer colorrectal (CCR). En Argentina el CCR constituye la segunda causa de muerte por cáncer luego del cáncer de pulmón y representa el 3% de todas las muertes. En los últimos 30 años la mortalidad por CCR ha disminuido, es posible que esta disminución se deba tanto a un diagnóstico más temprano de la enfermedad como a los nuevos tratamientos.

Varios estudios muestran el rol crucial de las mucinas en el CCR, particularmente la mucina MUC1 y sus antígenos carbohidratos asociados, debido a su relación con la proliferación, invasión, metástasis y mal pronóstico.

El objetivo del presente trabajo de Tesis fue determinar la utilidad de MUC1, MUC2, MUC5AC y antígenos carbohidratos asociados a mucinas tales como *Tn*, *Lewis y/x* y *sialil Lewis a/x* como marcadores tumorales en pacientes con CCR.

Para ello se estudió su expresión histológica en los tumores primarios (TP) y en los ganglios linfáticos metastásicos (GLM) y se los correlacionó con los parámetros epidemiológicos y anatomoclínicos de los pacientes. Se analizó su asociación con el tiempo libre de progresión y la sobrevida global de los pacientes. Asimismo, se comparó la expresión antigénica en las glándulas normales adyacentes al TP con el hallado en los TP, los tejidos normales y en los tumores benignos. Se estudió también la correlación de los niveles sanguíneos del antígeno carcinoembrionario (CEA) y *sialil Lewis a* (CA 19-9) con su expresión en los TP y GLM. Finalmente, se examinó la expresión de *β-catenina* y su relación con MUC1.

Se incluyeron 248 muestras histológicas: 90 cánceres colorrectales y 64 ganglios linfáticos pertenecientes a dichos pacientes, 68 muestras de mucosa colorrectal normal y 26 adenomas provenientes de pacientes sin enfermedad oncológica. De los pacientes estudiados se obtuvieron 120 muestras sanguíneas, 16 de ellas en el pre-operatorio y 104 en el post-operatorio. Las muestras sanguíneas fueron analizadas mediante radioinmunoanálisis y los tejidos por medio de la técnica de inmunohistoquímica utilizándose un “índice de expresión antigénica”, el cual se obtuvo por la multiplicación de la *intensidad* por el *porcentaje* de la reacción.

Los resultados originales del presente trabajo de Tesis se pueden resumir en:

1. Independientemente del estadio y del tratamiento instaurado, los pacientes tuvieron una menor SG y TLP cuando sus TP o GLM expresaron MUC1, *Tn*, *Lewis x/y*, *sialil Lewis x* y cuando en el núcleo de las células tumorales se halló presente  $\beta$ -*catenina*.
2. Se demostró una relación entre la expresión antigénica y el estadio tumoral:
  - a. Los pT avanzados se asociaron con mayor expresión de MUC1 y MUC5AC. Estos tumores presentaron mayor expresión de *sialil Lewis a/x* y *Lewis y* en sus GLM.
  - b. El estadio pN<sub>2</sub> se asoció con mayor expresión de *sialil Lewis a/x*. La presencia de *sialil Lewis x* se asoció con invasión tumoral de la cápsula del GLM.
  - c. Se observó una mayor expresión de MUC1 y *sialil Lewis a/x* en los TP de los pacientes con M<sub>1</sub>.
  - d. Los pacientes con estadio I tuvieron una menor SG y TLE cuando sus TP no expresaron MUC5AC.
  - e. Los pacientes con estadio II cuyos tumores expresaron *Lewis y* tuvieron una SG y TLE menor.
  - f. Los pacientes con estadios I y II cuyos TP expresaron *sialil Lewis x* tuvieron mayor recurrencia de la enfermedad.
  - g. Los pacientes con estadio III y IV cuyos TP no expresaron MUC2 tuvieron una menor SG y TLP.
  - h. En los pacientes con estadios III y IV cuyos TP o GLM expresaron antígenos del grupo Lewis presentaron una mayor recurrencia.
  - i. En todos los estadios TNM la falta de expresión de *Tn* en los TP se asoció con menor SG y TLP.
3. Se demostró una variación en la expresión de las mucinas y antígenos carbohidratos estudiados siguiendo la secuencia: mucosa normal, mucosa normal adyacente al TP y TP, pudiendo comprobarse que la mucosa normal adyacente al tumor es una zona de transición entre mucosa normal y TP.
4. Se demostraron las siguientes relaciones entre expresión antigénica y factores epidemiológicos:

- a. El aumento de la expresión de MUC1 se relacionó con cáncer familiar, diabetes mellitus, hábito alcohólico y tabáquico, hipertensión arterial, colecistectomía previa y una pérdida de peso mayor a 10 kg en los dos meses previos al diagnóstico. En muchos casos este aumento de expresión se halló tanto en el TP como en los GLM.
  - b. Con respecto al aumento de expresión de *sialil Lewis a/x*, ésta se halló relacionada con cáncer familiar, colecistectomía previa, diabetes mellitus y obesidad.
  - c. La obesidad se relacionó con elevada de expresión de antígenos tales como MUC1, MUC5AC, *sialil Lewis a/x* en los GLM.
  - d. La expresión de MUC2 se halló elevada en relación a antecedentes personales tales como una apendicectomía previa e hipertensión.
5. Se demostraron las siguientes relaciones entre la expresión antigénica y algunas manifestaciones clínicas del CCR:
- a. todos los TP de los pacientes que se diagnosticaron luego de una obstrucción y/o perforación expresaron MUC1,
  - b. en los pacientes con anemia crónica se demostró elevada expresión de *Tn* en el TP.
  - c. Se observó elevada expresión de *Lewis y* en los tumores de pacientes con antecedentes de sangre oculta en materia fecal, dolor abdominal crónico y cambio del ritmo evacuatorio.
6. Se demostraron las siguientes relaciones entre la expresión antigénica y las características histopatológicas:
- a. Los TP indiferenciados presentaron una elevada expresión de MUC1 y MUC5AC y una disminución de MUC2, los antígenos del grupo Lewis sialil y CEA.
  - b. Los TP GN3 tuvieron mayor expresión de MUC5AC, *Tn*, *Lewis x* y CEA.
  - c. Un elevado índice mitótico en los TP se correlacionó con una alta expresión de MUC1 y CEA y una baja expresión de MUC2 y MUC5AC. Los GLM con alto índice mitótico expresaron en su mayoría *Lewis x/y* y *sialil Lewis x*.

- d. MUC1 se halló asociada a la invasión linfática y perineural tumoral. En esta última también se encontró elevada MUC5AC, *sialil Lewis a* y CEA.
- e. Los tumores mayores de 5 cm presentaron una elevada expresión de *sialil Lewis x* y CEA.

A través de estos hallazgos podemos concluir que las mucinas MUC1, MUC2, MUC5AC y los antígenos carbohidratos asociados tales como *Tn*, *Lewis x/y* y *sialil Lewis a/x* constituyen parte de los cambios ocurridos tanto durante la carcinogénesis como en los procesos de invasión del CCR. Asimismo, podrían constituir un elemento a considerar para comprender las recaídas locales.

---

## **Referencias bibliográficas**

- Abe K, Hakomori S, Ohshiba S. Differential expression of difucosyl type 2 chain (LeY) defined by monoclonal antibody AH6 in different locations of colonic epithelia, various histological types of colonic polyps, and adenocarcinomas. *Cancer Res.* 1986 May; 46 (5): 2639-44.
- Adluri S, Gilewski T, Zhang S, Ramnath V, Ragupathi G, Livingston P. Specificity analysis of sera from breast cancer patients vaccinated with MUC1-KLH plus QS-21. *Br J Cancer.* 1999 Apr; 79 (11-12): 1806-12.
- Agrawal B, Krantz MJ, Parker J, Longenecker BM. Expression of MUC1 mucin on activated human T cells: implications for a role of MUC1 in normal immune regulation. *Cancer Res.* 1998 Sep; 58 (18): 4079-81.
- Agrawal B, Krantz MJ, Reddish MA, Longenecker BM. Cancer-associated MUC1 mucin inhibits human T-cell proliferation, which is reversible by IL-2. *Nat Med.* 1998 Jan; 4(1): 43-9.
- Agrawal B, Reddish MA, Longenecker BM. In vitro induction of MUC-1 peptide-specific type 1 T lymphocyte and cytotoxic T lymphocyte responses from healthy multiparous donors. *J Immunol.* 1996 Sep; 157(5): 2089-95.
- Aihua Li<sup>1</sup>, Masamichi Goto<sup>1</sup>, Michiko Horinouchi<sup>1</sup>, Sadao Tanaka<sup>2</sup>, Kohzoh Imai<sup>3</sup>, Young S. Kim<sup>4</sup>, Eiichi Sato<sup>1</sup>, Suguru Yonezawa<sup>1</sup>. Expression of MUC1 and MUC2 mucins and relationship with cell proliferative activity in human colorectal neoplasia. *Pathology International.* Volume 51, Issue 11, pages 853–860, November 2001
- Ajioka Y, Allison LJ, and Jass JR. Significance of MUC1 and MUC2 mucin expression in colorectal cancer. *J Clin Pathol.* 1996 July; 49 (7): 560–564.
- Ajioka Y, Watanabe H, Jass JRMUC1 and MUC2 mucins in flat and polypoid colorectal adenomas. *J Clin Pathol.* 1997 May;50(5):417-21.
- Akamatsu S, Yazawa S, Zenita K, Matsumoto H, Tachikawa T, Kannagi R. Elevation of an alpha(1,3)fucosyltransferase activity correlated with apoptosis in the human colon adenocarcinoma cell line, HT-29. *Glycoconj J.* 1996 Dec;13(6):1021-9.
- Akamine S, Nakagoe T, Sawai T, Tsuji T, Tanaka K, Hidaka S, Shibasaki S, Nanashima A, Yamaguchi H, Nagayasu T, Yasutake T. Differences in prognosis of colorectal cancer patients based on the expression of sialyl Lewisx, sialyl Lewisx and



- sialyl Tn antigens in serum and tumor tissue. *Anticancer Res.* 2004 Jul-Aug;24(4):2541-6.
- Allen A, Hutton DA, Pearson JP, Sellers LA. Mucus glycoprotein structure, gel formation and gastrointestinal mucus function. *Ciba Found Symp.* 1984; 109: 137-56. Review.
  - Allen A, Hutton DA, Pearson JP. The MUC2 gene product: a human intestinal mucin. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998 Jul; 30 (7): 797-801. Review.
  - Allen A, Pearson JP. Mucus glycoproteins of the normal gastrointestinal tract, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 5 (1993) 193-199.
  - Allen A. Gastrointestinal mucus, in: J.G. Forte (Ed.), *Handbook of Physiology: The Gastrointestinal System, III*, Am. Physiol. Soc. (1989) 359-382.
  - Allendoerfer KL, Durairaj A, Matthews GA, Patterson PH. Morphological domains of Lewis-X/FORSE-1 immunolabeling in the embryonic neural tube are due to developmental regulation of cell surface carbohydrate expression. *Dev Biol.* 1999 Jul 15; 211 (2): 208-19.
  - Alon R, Fuhlbrigge RC, Finger EB, Springer TA. Interactions through L-selectin between leukocytes and adherent leukocytes nucleate rolling adhesions on selectins and VCAM-1 in shear flow. *J Cell Biol.* 1996 Nov; 135 (3): 849-65.
  - Aloysius MM, Zaitoun AM, Awad S, Ilyas M, Rowlands BJ, Lobo DN. Mucins and CD56 as markers of tumour invasion and prognosis in periampullary cancer. *Mucins and CD56 as markers of tumour invasion and prognosis in periampullary cancer.*
  - André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A; Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med.* 2004 Jun; 350 (23): 2343-51.
  - André T, Quinaux E, Louvet C, Colin P, Gamelin E, Bouche O, Achille E, Piedbois P, Tubiana-Mathieu N, Boutan-Laroze A, Flesch M, Lledo G, Raoul Y, Debrix I, Buyse M, de Gramont A. Phase III study comparing a semimonthly with a monthly regimen of fluorouracil and leucovorin as adjuvant treatment for stage II and III colon cancer patients: final results of GERCOR C96.1 *J Clin Oncol.* 2007 Aug; 25 (24): 3732-8

- Andrews C.W. Jr, Jessup J.M., Goldman H., Hayes D.F., Kufe D.W., O'Hara C.J. and Steele G.D. Jr (1993). Localization of tumor-associated glycoprotein DF3 in normal, inflammatory, and neoplastic lesions of the colon. *Cancer (Philadelphia)* 72, 3185-3190.
- Aoki R, Tanaka S, Haruma K, Yoshihara M, Sumii K, Kajiyama G, Shimamoto F, Kohno N. MUC-1 expression as a predictor of the curative endoscopic treatment of submucosally invasive colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 1998 Oct;41(10):1262-72.
- Apostolopoulos V, Chelvanayagam G, Xing PX, McKenzie IF. Anti-MUC1 antibodies react directly with MUC1 peptides presented by class I H2 and HLA molecules. *J Immunol*. 1998 Jul; 161 (2): 767-75.
- Apostolopoulos V, Pietersz GA, Loveland BE, Sandrin MS, McKenzie IF. Oxidative/reductive conjugation of mannan to antigen selects for T1 or T2 immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Oct; 92 (22): 10128-32.
- Arends JW, Wiggers T, Schutte B, Thijs CT, Verstijnen C, Hilgers J, Blijham GH, Bosman FT. Monoclonal antibody (1116 NS 19-9) defined monosialoganglioside (GICA) in colorectal carcinoma in relation to stage, histopathology and DNA flow cytometry. *Int J Cancer*. 1983 Sep; 32 (3): 289-93.
- Arends JW, Wiggers T, Thijs CT, Verstijnen C, Swaen GJ, Bosman FT. The value of secretory component (SC) immunoreactivity in diagnosis and prognosis of colorectal carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 1984 Sep; 82 (3): 267-74.
- Arnaud JP, Koehl C, Adloff M. Carcinoembryonic antigen (CEA) in diagnosis and prognosis of colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 1980 Apr;23(3):141-4.
- Asai S, Watanabe T, Sakamoto J, Kiriya K, Ito K, Akiyama S, Takagi H. Expression and prognostic indicators of type 1 and type 2 Lewis blood group antigens in colorectal cancers *Nippon Geka Gakkai Zasshi*. 1994 Oct; 95 (10): 753-62.
- Asker N, Bäckström D, Axelsson MA, Carlstedt I, Hansson GC. The human MUC2 mucin apoprotein appears to dimerize before O-glycosylation and shares epitopes with the 'insoluble' mucin of rat small intestine. *Biochem J*. 1995 Jun; 308 (3): 873-80.

- Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N Engl J Med*. 1992 Mar; 326 (10): 658-62.
- Atkinson BF, Ernst CS, Herlyn M, Steplewski Z, Sears HF, Koprowski H. Gastrointestinal cancer-associated antigen in immunoperoxidase assay. *Cancer Res*. 1982 Nov; 42 (11): 4820-3.
- Audie JP, Janin A, Porchet N, Copin MC, Gosselin B, Aubert JP. Expression of human mucin genes in respiratory, digestive, and reproductive tracts ascertained by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem*. 1993 Oct; 41 (10): 1479-85.
- Audie JP, Tetaert D, Pigny P, Buisine MP, Janin A, Aubert JP, Porchet N, Boersma A. Mucin gene expression in the human endocervix. *Hum Reprod*. 1995 Jan; 10 (1): 98-102.
- Ayhan A, Gultekin M, Celik NY, Dursun P, Taskiran C, Aksan G, Yuce K. Occult metastasis in early ovarian cancers: risk factors and associated prognosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2007 Jan;196(1):81.e1-6
- B. A. Leone, J. A. Lacava, A. O. Zwenger, J. Iturbe, J. E. Perez, M. R. Machiavelli, A. O. Romero, C. T. Vallejo, M. E. Dominguez, R. Rodriguez The impact of metastatic sites in metastatic colorectal cancer at initial diagnosis (MCCID). *J Clinical Oncology*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 14536
- Babino A, Oppezzo P, Bianco S, Barrios E, Berois N, Navarrete H, Osinaga E. Tn antigen is a pre-cancerous biomarker in breast tissue and serum in n-nitrosomethylurea-induced rat mammary carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2000 Jun; 86 (6): 753-9.
- Baldus SE, Engelmann K, Hanisch FG. MUC1 and the MUCs: a family of human mucins with impact in cancer biology. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2004;41(2):189-231. Review
- Baldus SE, Hanisch FG Mucin-associated antigens as markers of gastrointestinal differentiation and carcinogenesis. *Pathologe*. 1995 Mar;16(2):94-105.
- Baldus SE, Mönig SP, Hanisch FG, Zirbes TK, Flucke U, Oelert S, Zilkens G, Madejczik B, Thiele J, Schneider PM, Hölscher AH, Dienes HP. Comparative evaluation of the prognostic value of MUC1, MUC2, sialyl-Lewis(a) and sialyl-

- Lewis(x) antigens in colorectal adenocarcinoma. *Histopathology*. 2002 May; 40 (5): 440-9.
- Baldus SE, Mönig SP, Huxel S, Landsberg S, Hanisch FG, Engelmann K, Schneider PM, Thiele J, Hölscher AH, Dienes HP. MUC1 and nuclear beta-catenin are coexpressed at the invasion front of colorectal carcinomas and are both correlated with tumor prognosis. *Clin Cancer Res*. 2004 Apr; 10 (8): 2790-6.
  - Bara J, Burtin P. Mucus-associated gastrointestinal antigens in transitional mucosa adjacent to human colonic adenocarcinomas: their 'fetal-type' association. *Eur J Cancer*. 1980 Oct; 16 (10): 1303-10.
  - Bara J, Chastre E, Mahiou J, Singh RL, Forgue-Lafitte ME, Hollande E, Godeau. Gastric M1 mucin, an early oncofetal marker of colon carcinogenesis, is encoded by the MUC5AC gene. *Int J Cancer*. 1998 Mar; 75 (5): 767-73.
  - Bara J, Gautier R, Daher N, Zaghouani H, Decaens C. Monoclonal antibodies against oncofetal mucin M1 antigens associated with precancerous colonic mucosae. *Cancer Res*. 1986 Aug; 46 (8): 3983-9.
  - Bara J, Gautier R, Mouradian P, Decaens C, Daher N. Oncofetal mucin M1 epitope family: Characterization and expression during colonic carcinogenesis. *Int J Cancer* 1991...; 47: 304-310.
  - Bara J, Loisillier F, Burtin P. Antigens of gastric and intestinal mucous cells in human colonic tumors. *Br J Cancer* 1980, 41:209-221.
  - Bara J, Mollicone R, Herrero-Zabaleta E, Gautier R, Daher N, Oriol R. Ectopic expression of the Y (Ley) antigen defined by monoclonal antibody 12-4LE in distal colonic adenocarcinomas. *Int J Cancer*. 1988 May; 41 (5): 683-9.
  - Bara J, Nardelli J, Gadenne C, Prade M, Burtin P. Differences in the expression of mucus-associated antigens between proximal and distal human colon adenocarcinomas. *Br J Cancer*. 1984 Apr; 49 (4): 495-501.
  - Bara J. Organ-specific mucin antigens and gastrointestinal carcinogenesis. *Ital J Gastroenterol*. 1991 Jan; 23 (1): 29-35. Review.
  - Bargatze RF, Kurk S, Watts G, Kishimoto TK, Speer CA, Jutila MA. In vivo and in vitro functional examination of a conserved epitope of L- and E-selectin crucial for leukocyte-endothelial cell interactions. *J Immunol*. 1994 Jun; 152 (12): 5814-25.

- Barnd DL, Lan MS, Metzgar RS, Finn OJ. Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Sep; 86 (18): 7159-63.
- Barratt PL, Seymour MT, Stenning SP, Georgiades I, Walker C, Birbeck K, Quirke P; UKCCCR AXIS trial collaborators. Adjuvant X-ray and Fluorouracil Infusion Study. DNA markers predicting benefit from adjuvant fluorouracil in patients with colon cancer: a molecular study. *Lancet*. 2002 Nov; 360 (9343): 1381-91.
- Barrier A, Lemoine A, Boelle PY, Tse C, Brault D, Chiappini F, Breittschneider J, Lacaine F, Houry S, Huguier M, Van der Laan MJ, Speed T, Debuire B, Flahault A, Dudoit S. Colon cancer prognosis prediction by gene expression profiling. *Oncogene*. 2005 Sep 8; 24 (40): 6155-64.
- Bartman AE, Sanderson SJ, Ewing SL, Niehans GA, Wiehr CL, Evans MK, Ho SB. Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucin genes in colorectal polyps. *Int J Cancer* 1999, 8:210-218.
- Bauer KD, Lincoln ST, Vera-Roman JM, Wallemark CB, Chmiel JS, Madurski ML, Murad T, Scarpelli DG. Prognostic implications of proliferative activity and DNA aneuploidy in colonic adenocarcinomas. *Lab Invest*. 1987 Sep; 57(3):329-35.
- Beahrs OH, Sanfelippo PM. Factors in prognosis of colon and rectal cancer. *Cancer*. 1971 Jul; 28 (1): 213-8.
- Beatty PL, Narayanan S, Gariépy J, Ranganathan S, Finn OJ. Vaccine against MUC1 antigen expressed in inflammatory bowel disease and cancer lessens colonic inflammation and prevents progression to colitis-associated colon cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010 Apr; 3(4):438-46. Epub 2010 Mar 23.
- Begent RH. The value of carcinoembryonic antigen measurement in clinical practice. *Ann Clin Biochem*. 1984 Jul; 21 (4): 231-8. Review.
- Behrens J, Mareel MM, Van Roy FM, Birchmeier W. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol*. 1989 Jun; 108 (6): 2435-47.
- Benedix F, Kube R, Meyer F, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H; Colon/Rectum Carcinomas (Primary Tumor) Study Group. Comparison of 17,641 patients with right-

- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Dis Colon Rectum*. 2010 Jan;53(1):57-64.
- Benedix F, Schmidt U, Mroczkowski P, Gastinger I, Lippert H, Kube R; Study Group "Colon/Rectum Carcinoma (Primary Tumor)". Colon carcinoma--classification into right and left sided cancer or according to colonic subsite?--Analysis of 29,568 patients. *Eur J Surg Oncol*. 2011 Feb;37(2):134-9. Epub 2010 Dec 28.
  - Benjamin JB, Jayanthi V, Devaraj H. MUC1 expression and its association with other aetiological factors and localization to mitochondria in preneoplastic and neoplastic gastric tissues. *Clin Chim Acta*. 2010 Dec 14;411(23-24):2067-72. Epub 2010 Sep 8
  - Benson AB 3rd, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ, Krzyzanowska MK, Maroun J, McAllister P, Van Cutsem E, Brouwers M, Charette M, Haller DG. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol*. 2004 Aug; 22 (16): 3408-19. Review.
  - Bentzen SM, Balslev I, Pedersen M, Teglbjaerg PS, Hanberg-Soerensen F, Bone J, Jacobsen NO, Overgaard J, Sell A, Bertelsen K, et al. A regression analysis of prognostic factors after resection of Dukes' B and C carcinoma of the rectum and rectosigmoid. Does post-operative radiotherapy change the prognosis? *Br J Cancer*. 1988 Aug;58(2):195-201.
  - Berg EL, Robinson MK, Mansson O, Butcher EC, Magnani JL. A carbohydrate domain common to both sialyl Le(a) and sialyl Le(X) is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *J Biol Chem*. 1991 Aug; 266 (23): 14869-72.
  - Berger EG. Tn-syndrome. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Oct 8;1455(2-3):255-68. Review.
  - Bergeron A, Champetier S, LaRue H, Fradet Y. MAUB is a new mucin antigen associated with bladder cancer. *J Biol Chem*. 1996 Mar; 271 (12): 6933-40.
  - Berois N, Varangot M, Sónora C, Zarantonelli L, Pressa C, Laviña R, Rodríguez JL, Delgado F, Porchet N, Aubert JP, Osinaga E. Detection of bone marrow-disseminated breast cancer cells using an RT-PCR assay of MUC5B mRNA. *Int J Cancer*. 2003 Feb; 103 (4): 550-5.

- Berriel E, Hill M, Barcia JJ, Ubillos L, Gonzalez M, Detjen G, Rondan M, Navarrete H, Osinaga E. Simple mucin-type cancer associated antigens are pre-cancerous biomarkers during 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Oncol Rep.* 2005 Jul;14(1):219-27
- Bhat RV, Baraban JM, Johnson RC, Eipper BA, Mains RE. High levels of expression of the tumor suppressor gene APC during development of the rat central nervous system. *J Neurosci.* 1994 May; 14 (5): 3059-71.
- Bhatnagar J, Tewari HB, Bhatnagar M, Austin GE. Comparison of carcinoembryonic antigen in tissue and serum with grade and stage of colon cancer. *Anticancer Res.* 1999 May; 19 (3): 2181-7.
- Biemer-Hüttmann AE, Walsh MD, McGuckin MA, Ajioka Y, Watanabe H, Leggett BA, Jass JR. Immunohistochemical staining patterns of MUC1, MUC2, MUC4, and MUC5AC mucins in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and traditional adenomas of the colorectum. *J Histochem Cytochem.* 1999 Aug; 47 (8): 1039-48.
- Bierhuizen MF, Fukuda M. Expression cloning of a cDNA encoding UDP-GlcNAc:Gal beta 1-3-GalNAc-R (GlcNAc to GalNAc) beta 1-6GlcNAc transferase by gene transfer into CHO cells expressing polyoma large tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Oct; 89 (19): 9326-330.
- Bierhuizen MF, Maemura K, Fukuda M. Expression of a differentiation antigen and poly-N-acetyllactosaminyl O-glycans directed by a cloned core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem.* 1994 Feb; 269 (6): 4473-9.
- Bistrup A, Bhakta S, Lee JK, Belov YY, Gunn MD, Zuo FR, Huang CC, Kannagi R, Rosen SD, Hemmerich S. Sulfotransferases of two specificities function in the reconstitution of high endothelial cell ligands for L-selectin. *J Cell Biol.* 1999 May; 145 (4): 899-910.
- Bitler BG, Goverdhan A, Schroeder JA. MUC1 regulates nuclear localization and function of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Sci.* 2010 May 15;123(Pt 10):1716-23. Epub 2010 Apr 20
- Blake KE, Dalbow MH, Concannon JP, Hodgson SE, Brodmerkel GJ Jr, Panahandeh AH, Zimmerman K, Headings JJ. Clinical significance of the preoperative plasma

- carcinoembryonic antigen (CEA) level in pacientes with carcinoma of the large bowel. *Dis Colon Rectum*. 1982 Jan; 25 (1):24-32.
- Blixt O, Collins BE, van den Nieuwenhof IM, Crocker PR, Paulson JC. Sialoside specificity of the siglec family assessed using novel multivalent probes: identification of potent inhibitors of myelin-associated glycoprotein. *J Biol Chem*. 2003 Aug 15;278(33):31007-19. Epub 2003 May 28.
  - Böhm CM, Mulder MC, Zennadi R, Notter M, Schmitt-Gräff A, Finn OJ, Taylor-Papadimitriou J, Stein H, Clausen H, Riecken EO, Hanski C. Carbohydrate recognition on MUC1-expressing targets enhances cytotoxicity of a T cell subpopulation. *Scand J Immunol*. 1997 Jul; 46 (1): 27-34.
  - Boonla C, Sripan B, Thuwajit P, Cha-On U, Puapairoj A, Miwa M, Wongkham S. MUC1 and MUC5AC mucin expression in liver fluke-associated intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2005 Aug 28;11(32):4939-46.
  - Borowitz MJ, Tuck FL, Sindelar WF, Fernsten PD, Metzgar RS. Monoclonal antibodies against human pancreatic adenocarcinoma: distribution of DU-PAN-2 antigen on glándular epithelia and adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst*. 1984 May; 72 (5): 999-1005.
  - Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA*. 2008 Dec; 300 (23): 2765-78.
  - Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis *Gastroenterology*. 2008 Feb;134(2):388-95. Epub 2007 Nov 4.
  - Brentnall TA, Haggitt RC, Rabinovitch PS, Kimmey MB, Bronner MP, Levine DS, Kowdley KV, Stevens AC, Crispin DA, Emond M, Rubin CE. Risk and natural history of colonic neoplasia in pacientes with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1996 Feb; 110 (2): 331-8.
  - Bresalier RS, Ho SB, Schoepner HL, Kim YS, Sleisenger MH, Brodt P, Byrd JC. Enhanced sialylation of mucin-associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis. *Gastroenterology*. 1996 May;110(5):1354-67.
  - Bresalier RS, Niv Y, Byrd JC, Duh QY, Toribara NW, Rockwell RW, Dahiya R, Kim YS. Mucin production by human colonic carcinoma cells correlates with their



- metastatic potential in animal models of colon cancer metastasis. *J Clin Invest.* 1991 Mar; 87 (3): 1037-45.
- Britannica Oline. Encyclopedia Britannica. Accessed 13-17 June. 2005
  - Brockhausen I, Yang J, Lehotay M, Ogata S, Itzkowitz S. Pathways of mucin O-glycosylation in normal and malignant rat colonic epithelial cells reveal a mechanism for cancer-associated Sialyl-Tn antigen expression. *Biol Chem.* 2001 Feb; 382 (2): 219-32.
  - Brockhausen I, Yang JM, Burchell J, Whitehouse C, Taylor-Papadimitriou J. Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. *Eur J Biochem.* 1995 Oct; 233 (2): 607-17.
  - Brockhausen I. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Dec; 1473 (1): 67-95. Review.
  - Brodt P, Fallavollita L, Bresalier RS, Meterissian S, Norton CR, Wolitzky BA. Liver endothelial E-selectin mediates carcinoma cell adhesion and promotes liver metastasis. *Int J Cancer.* 1997 May; 71 (4): 612-9.
  - Brose MS, Rebbeck TR, Calzone KA, Stopfer JE, Nathanson KL, Weber BL. Cancer risk estimates for BRCA1 mutation carriers identified in a risk evaluation program. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Sep; 94 (18): 1365-72.
  - Brossart P, Heinrich KS, Stuhler G, Behnke L, Reichardt VL, Stevanovic S, Muhm A, Rammensee HG, Kanz L, Brugger W. Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood.* 1999 Jun 15;93(12):4309-17.
  - Brown A, Feizi T, Gooi HC, Embleton MJ, Picard JK, Baldwin RW. A monoclonal antibody against human colonic adenoma recognizes difucosylated Type-2-blood-group chains. *Biosci Rep.* 1983 Feb;3(2):163-70.
  - Bu XD, Li N, Tian XQ, Li L, Wang JS, Yu XJ, Huang PL. Altered expression of MUC2 and MUC5AC in progression of colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2010 Aug 28;16(32):4089-94.
  - Buisine MP, Janin A, Maunoury V, Audie JP, Delescaut MP, Copin MC, Colombel JF, Degand P, Aubert JP, Porchet N. Aberrant expression of a human mucin gene (MUC5AC) in rectosigmoid villous adenoma. *Gastroenterology* 1996, 110:84-91.

- Buisine MP, Janin A, Maunoury V, Audié JP, Delescaut MP, Copin MC, Colombel JF, Degand P, Aubert JP, Porchet N. Aberrant expression of a human mucin gene (MUC5AC) in rectosigmoid villous adenoma. *Gastroenterology*. 1996 Jan;110(1):84-91.
- Burchell J, Durbin H, Taylor-Papadimitriou J. Complexity of expression of antigenic determinants, recognized by monoclonal antibodies HMFG-1 and HMFG-2, in normal and malignant human mammary epithelial cells. *J Immunol*. 1983 Jul;131(1):508-13.
- Burnet FM. Immunological surveillance in neoplasia. *Transplant Rev* 1971; 7: 3-25.
- Burns BJ, Brandt LJ. Intestinal ischemia. *Gastroenterol Clin North Am*. 2003 Dec;32(4):1127-43. Review.
- Burt RW, DiSario JA, Cannon-Albright L. Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. *Annu Rev Med*. 1995;46:371-9. Review.
- Butts C, Murray RN, Smith CJ, Ellis PM, Jasas K, Maksymiuk A, Goss G, Ely G, Beier F, Soulières D. A multicenter open-label study to assess the safety of a new formulation of BLP25 liposome vaccine in patients with unresectable stage III non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2010 Nov 1;11(6):391-5.
- Buyse M, Zeleniuch-Jacquotte A, Chalmers TC. Adjuvant therapy of colorectal cancer. Why we still don't know. *JAMA*. 1988 Jun 24;259(24):3571-8. Review.
- Byrd JC, Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2004 Jan-Jun;23(1-2):77-99. Review.
- C. T. Vallejo, A. O. Zwenger, J. A. Lacava, J. Iturbe, J. E. Perez, M. Machiavelli, A. Romero, M. E. Dominguez, R. Rodriguez, B. Leone. Prognostic factors in metastatic colorectal carcinoma at initial diagnosis, MCCID. *J Clinical Oncology*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 14548
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 2003 Apr 24;348(17):1625-38.
- Canello R, Tounian A, Poitou Ch, Clément K. Adiposity signals, genetic and body weight regulation in humans. *Diabetes Metab*. 2004 Jun;30(3):215-27.

- Cantin AM, Bilodeau G, Ouellet C, Liao J, Hanrahan JW. Oxidant stress suppresses CFTR expression. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006 Jan;290(1):C262-70. Epub 2005 Sep 14.
- Cao Y, Karsten UR, Liebrich W, Haensch W, Springer GF, Schlag PM. Expression of Thomsen-Friedenreich-related antigens in primary and metastatic colorectal carcinomas. A reevaluation. *Cancer*. 1995 Nov 15;76(10):1700-8.
- Cao Y, Schlag PM, Karsten U. Immunodetection of epithelial mucin (MUC1, MUC3) and mucin-associated glycotopes (TF, Tn, and sialosyl-Tn) in benign and malignant lesions of colonic epithelium: apolar localization corresponds to malignant transformation. *Virchows Arch*. 1997 Sep;431(3):159-66
- Cardoso ML, Fernandes LC, Kim SB, Matos D Relationship between peripheral and mesenteric serum levels of CEA and CA 242 with staging and histopathological variables in colorectal adenocarcinoma. *Acta Cir Bras*. 2009 Sep-Oct;24(5):405-10.
- Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, Nguyen L, Tajima A, Doctolero RT, Cabrera BL, Goel A, Arnold CA, Miyai K, Boland CR. Use of 5-fluorouracil and survival in pacientes with microsatellite-unstable colorrectal cancer. *Gastroenterology*. 2004 Feb;126(2):394-401.
- Carmignani CP, Hampton R, Sugarbaker CE, Chang D, Sugarbaker PH. Utility of CEA and CA 19-9 tumor markers in diagnosis and prognostic assessment of mucinous epithelial cancers of the appendix. *J Surg Oncol*. 2004 Sep 15;87(4):162-6.
- Carpelan-Holmström M, Haglund C, Lundin J, Järvinen H, Roberts P. Pre-operative serum levels of CA 242 and CEA predict outcome in colorrectal cancer. *Eur J Cancer*. 1996 Jun;32A(7):1156-61.
- Carrato C, Balague C, de Bolos C, Gonzalez E, Gambus G, Planas J, Perini JM, Andreu D, Real FX. Differential apomucin expression in normal and neoplastic human gastrointestinal tissues. *Gastroenterology*. 1994 Jul;107(1):160-72.
- Carraway KL 3rd, Funes M, Workman HC, Sweeney C. Contribution of membrane mucins to tumor progression through modulation of cellular growth signaling pathways. *Curr Top Dev Biol*. 2007;78:1-22. Review.
- Carrilho C, Cantel M, Gouveia P, David L. imple mucin-type carbohydrate antigens (Tn, sialosyl-Tn, T and sialosyl-T) and gp 230 mucin-like glycoprotein are candidate

- markers for neoplastic transformation of the human cervix. *Virchows Arch.* 2000 Aug;437(2):173-9
- Carriquiry LA, Piñeyro A. Should carcinoembryonic antigen be used in the management of pacientes with colorectal cancer? *Dis Colon Rectum.* 1999 Jul;42(7):921-9.
  - Castells A, Bessa X, Daniels M, Ascaso C, Lacy AM, García-Valdecasas JC, Gargallo L, Novell F, Astudillo E, Filella X, Piqué JM. Value of postoperative surveillance after radical surgery for colorectal cancer: results of a cohort study. *Dis Colon Rectum.* 1998 Jun;41(6):714-23; discussion 723-4.
  - Castiglioni, Arturo. *A History of Medicine.* New York: Alfred A. Knope, 1941.
  - Cawkwell L, Gray S, Murgatroyd H, Sutherland F, Haine L, Longfellow M, O'Loughlin S, Cross D, Kronborg O, Fenger C, Mapstone N, Dixon M, Quirke P. Choice of management strategy for colorectal cancer based on a diagnostic immunohistochemical test for defective mismatch repair. *Gut.* 1999 Sep;45(3):409-15.
  - Chambers JA, Hollingsworth MA, Trezise AE, Harris A. Developmental expression of mucin genes MUC1 and MUC2. *J Cell Sci.* 1994 Feb;107 ( Pt 2):413-24.
  - Chan AK, Lockhart DC, von Bernstorff W, Spanjaard RA, Joo HG, Eberlein TJ, Goedegebuure PS. Soluble MUC1 secreted by human epithelial cancer cells mediates immune suppression by blocking T-cell activation. *Int J Cancer.* 1999 Aug 27;82(5):721-6.
  - Chan AO, Jim MH, Lam KF, Morris JS, Siu DC, Tong T, Ng FH, Wong SY, Hui WM, Chan CK, Lai KC, Cheung TK, Chan P, Wong G, Yuen MF, Lau YK, Lee S, Szeto ML, Wong BC, Lam SK. Prevalence of colorectal neoplasm among pacientes with newly diagnosed coronary artery disease. *JAMA.* 2007 Sep 26;298(12):1412-9.
  - Chang GJ, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, Moyer VA. Lymph node evaluation and survival after curative resection of colon cancer: systematic review. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Mar 21;99(6):433-41. Review.
  - Chang SK, Dohrman AF, Basbaum CB, Ho SB, Tsuda T, Toribara NW, Gum JR, Kim YS. Localization of mucin (MUC2 and MUC3) messenger RNA and peptide

- expression in human normal intestine and colon cancer. *Gastroenterology*. 1994 Jul;107(1):28-36.
- Chao A, Thun MJ, Jacobs EJ, Henley SJ, Rodriguez C, Calle EE. Cigarette smoking and colorectal cancer mortality in the cancer prevention study II. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Dec 6;92(23):1888-96.
  - Chao M, Gibbs P. Caution is required before recommending routine carcinoembryonic antigen and imaging follow-up for patients with early-stage colon cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 20;27(36):e279-80; author reply e281. Epub 2009 Nov 9
  - Chapuis PH, Dent OF, Fisher R, Newland RC, Pheils MT, Smyth E, Colquhoun K. A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer. *Br J Surg*. 1985 Sep;72(9):698-702.
  - Chapuis PH, Goulston KJ, Dent OF, Tait AD. Predictive value of rectal bleeding in screening for rectal and sigmoid polyps. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1985 May 25;290(6481):1546-8.
  - Cheah PY, Choo PH, Yao J, Eu KW, Seow-Choen F. A survival-stratification model of human colorectal carcinomas with beta-catenin and p27kip1 *Cancer*. 2002 Dec 15;95(12):2479-86.
  - Chen HS, Sheen-Chen SM. Obstruction and perforation in colorectal adenocarcinoma: an analysis of prognosis and current trends. *Surgery*. 2000 Apr;127(4):370-6.
  - Chen L, Sadek M, Stone BA, Brownlee RT, Fincher GB, Høj PB. Stereochemical course of glucan hydrolysis by barley (1-->3)- and (1-->3, 1-->4)-beta-glucanases. *Biochim Biophys Acta*. 1995 Nov 15;1253(1):112-6.
  - Chen SL, Bilchik AJ. More extensive nodal dissection improves survival for stages I to III of colon cancer: a population-based study. *Ann Surg*. 2006 Oct;244(4):602-10.
  - Chen WJ, Chen HW, Yu SL, Huang CH, Wang TD, Chen JJ, Chien CT, Chen HY, Yang PC, Lee YT. Gene expression profiles in hypoxic preconditioning using cDNA microarray analysis: altered expression of an angiogenic factor, carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1. *Shock*. 2005 Aug;24(2):124-31.

- Chen YT, Gallup M, Nikulina K, Lazarev S, Zlock L, Finkbeiner W, McNamara N. Cigarette smoke induces epidermal growth factor receptor-dependent redistribution of apical MUC1 and junctional beta-catenin in polarized human airway epithelial cells. *Am J Pathol.* 2010 Sep;177(3):1255-64. Epub 2010 Jul 22.
- Chia D, Terasaki PI, Suyama N, Galton J, Hirota M, Katz D. Use of monoclonal antibodies to sialylated Lewisx and sialylated Lewisa for serological tests of cancer. *Cancer Res.* 1985 Jan;45(1):435-7.
- Chiang JM, Chen MC, Changchien CR, Chen JS, Tang R, Wang JY, Yeh CY, Fan CW, Tsai WS. Favorable influence of age on tumor characteristics of sporadic colorectal adenocarcinoma: patients 30 years of age or younger may be a distinct patient group. *Dis Colon Rectum.* 2003 Jul;46(7):904-10
- Cho M, Dahiya R, Choi SR, Siddiki B, Yeh MM, Sleisenger MH, Kim YS. Mucins secreted by cell lines derived from colorectal mucinous carcinoma and adenocarcinoma. *Eur J Cancer.* 1997 May;33(6):931-41.
- Cho SH, Sahin A, Hortobagyi GN, Hittelman WN, Dhingra K. Sialyl-Tn antigen expression occurs early during human mammary carcinogenesis and is associated with high nuclear grade and aneuploidy. *Cancer Res.* 1994 Dec 15;54(24):6302-5.
- Cho YB, Chun HK, Yun HR, Kim HC, Yun SH, Lee WY Histological grade predicts survival time associated with recurrence after resection for colorectal cancer. *Hepatogastroenterology.* 2009 Sep-Oct;56(94-95):1335-40
- Cho YB, Yun SH, Hong JS, Yun HR, Lee WS, Lee WY, Chun HK. Carcinoma obstruction of the left colon and long-term prognosis. *Hepatogastroenterology.* 2008 Jul-Aug;55(85):1288-92
- Choi SR, Cho M, Kim HR, Ahn DH, Sleisenger MH, Kim YS. Biological properties and expression of mucins in 5-fluorouracil resistant HT29 human colon cancer cells. *Int J Oncol.* 2000 Jul;17(1):141-7.
- Chu DZ, Erickson CA, Russell MP, Thompson C, Lang NP, Broadwater RJ, Westbrook KC. Prognostic significance of carcinoembryonic antigen in colorectal carcinoma. Serum levels before and after resection and before recurrence. *Arch Surg.* 1991 Mar;126(3):314-6.

- Chuang SC, Su YC, Lu CY, Hsu HT, Sun LC, Shih YL, Ker CG, Hsieh JS, Lee KT, Wang JY. Risk factors for the development of metachronous liver metastasis in colorectal cancer patients after curative resection. *World J Surg.* 2011 Feb;35(2):424-9.
- Chung GG, Provost E, Kielhorn EP, Charette LA, Smith BL, Rimm DL. Tissue microarray analysis of beta-catenin in colorectal cancer shows nuclear phospho-beta-catenin is associated with a better prognosis. *Clin Cancer Res.* 2001 Dec;7(12):4013-20.
- Cianchi F, Palomba A, Boddi V, Messerini L, Pucciani F, Perigli G, Bechi P, Cortesini C. Lymph node recovery from colorectal tumor specimens: recommendation for a minimum number of lymph nodes to be examined. *World J Surg.* 2002 Mar;26(3):384-9. Epub 2002 Jan 15.
- Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse MA, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW, Meropol NJ. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2009 Jul;20(7):1223-9. Epub 2009 Mar 12.
- Colangelo LA, Gapstur SM, Gann PH, Dyer AR. Cigarette smoking and colorectal carcinoma mortality in a cohort with long-term follow-up. *Cancer.* 2004 Jan 15;100(2):288-93.
- Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, Hammond ME, Henson DE, Hutter RV, Nagle RB, Nielsen ML, Sargent DJ, Taylor CR, Welton M, Willett C. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000 Jul;124(7):979-94. Review.
- Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol.* 2003 Apr;16(4):376-88. Review.
- Compton CC. Pathologic prognostic factors in the recurrence of rectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2002 Nov;2(3):149-60. Review.
- Consorti F, Lorenzotti A, Midiri G, Di Paola M. Prognostic significance of mucinous carcinoma of colon and rectum: a prospective case-control study. *J Surg Oncol.* 2000 Feb;73(2):70-4.

- Cooper HS, Marshall C, Ruggerio F, Steplewski Z. Hyperplastic polyps of the colon and rectum. An immunohistochemical study with monoclonal antibodies against blood groups antigens (sialosyl-Lea, Leb, Lex, Ley, A, B, H). *Lab Invest.* 1987 Oct;57(4):421-8.
- Copeland EM, Miller LD, Jones RS. Prognostic factors in carcinoma of the colon and rectum. *Am J Surg.* 1968 Dec;116(6):875-81.
- Corfield AP, Carroll D, Myerscough N, Probert CS. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Front Biosci.* 2001 Oct 1;6:D1321-57.
- Corfield AP, Myerscough N, Gough M, Brockhausen I, Schauer R, Paraskeva C. Glycosylation patterns of mucins in colonic disease. *Biochem Soc Trans.* 1995 Nov;23(4):840-5. Review.
- Croce MV, Colussi AG, Price MR, Segal-Eiras A Expression of tumour associated antigens in normal, benign and malignant human mammary epithelial tissue: a comparative immunohistochemical study. *Anticancer Res.* 1997 Nov-Dec;17(6D):4287-92
- Croce MV, Isla-Larrain M, Rabassa ME, Demichelis S, Colussi AG, Crespo M, Lacunza E, Segal-Eiras A. Lewis x is highly expressed in normal tissues: a comparative immunohistochemical study and literature revision. *Pathol Oncol Res.* 2007;13(2):130-8. Epub 2007 Jul 3.
- Croce MV, Isla-Larrain M, Remes-Lenicov F, Colussi AG, Lacunza E, Kim KC, Gendler SJ, Segal-Eiras A. MUC1 cytoplasmic tail detection using CT33 polyclonal and CT2 monoclonal antibodies in breast and colorectal tissue. *stol Histopathol.* 2006 Aug;21(8):849-55
- Croce MV, Isla-Larrain MT, Rua CE, Rabassa ME, Gendler SJ, Segal-Eiras A. Patterns of MUC1 tissue expression defined by an anti-MUC1 cytoplasmic tail monoclonal antibody in breast cancer. *J Histochem Cytochem.* 2003 Jun;51(6):781-8
- Croce MV, Pasqualini RS, Segal-Eiras A. Circulating immune complexes in breast cancer patients. *Medicina (B Aires).* 1987;47(4):371-6
- Croce MV, Price MR, Segal-Eiras A. Expression of monoclonal-antibody-defined antigens in fractions isolated from human breast carcinomas and patients' serum. *Cancer Immunol Immunother.* 1995 Feb;40(2):132-7



- Crucitti F, Sofo L, Doglietto GB, Bellantone R, Ratto C, Bossola M, Crucitti A. Prognostic factors in colorectal cancer: current status and new trends. *J Surg Oncol Suppl.* 1991;2:76-82.
- Cueni LN, Detmar M. Galectin-8 interacts with podoplanin and modulates lymphatic endothelial cell functions. *Exp Cell Res.* 2009 Jun 10;315(10):1715-23. Epub 2009 Mar 4.
- Cunningham D, Pyrhönen S, James RD, Punt CJ, Hickish TF, Heikkila R, Johannesen TB, Starkhammar H, Topham CA, Awad L, Jacques C, Herait P. Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet.* 1998 Oct 31;352(9138):1413-8.
- Cunningham MP, Thomas H, Marks C, Green M, Fan Z, Modjtahedi H. Co-targeting the EGFR and IGF-IR with anti-EGFR monoclonal antibody ICR62 and the IGF-IR tyrosine kinase inhibitor NVP-AEW541 in colorectal cancer cells. *Int J Oncol.* 2008 Nov;33(5):1107-13.
- Dahiya R, Itzkowitz SH, Byrd JC, Kim YS. Mucin oligosaccharide biosynthesis in human colonic cancerous tissues and cell lines. *Cancer.* 1992 Sep 15;70(6):1467-76.
- Danishefsky SJ, Allen JR. From the Laboratory to the Clinic: A Retrospective on Fully Synthetic Carbohydrate-Based Anticancer Vaccines Frequently used abbreviations are listed in the appendix. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2000 Mar;39(5):836-863.
- Danussi C, Coslovi A, Campa C, Mucignat MT, Spessotto P, Uggeri F, Paoletti S, Colombatti A. A newly generated functional antibody identifies Tn antigen as a novel determinant in the cancer cell-lymphatic endothelium interaction. *Glycobiology.* 2009 Oct;19(10):1056-67. Epub 2009 Jun 15.
- Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol.* 2004 Nov 15;22(22):4632-42.
- David L, Nesland JM, Clausen H, Carneiro F, Sobrinho-Simões M. Simple mucin-type carbohydrate antigens (Tn, sialosyl-Tn and T) in gastric mucosa, carcinomas and metastases. *APMIS Suppl.* 1992;27:162-72.

- Dawson LA, Franssen E, Davey P. Postoperative borderline elevated CEA predicts for earlier relapse in patients with rectal cancer receiving adjuvant postoperative therapy. *Cancer J Sci Am*. 1999 Nov-Dec;5(6):374-9.
- D'Costa S, Petite JN. Characterization of stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1) expression during early development of the turkey embryo. *Int J Dev Biol*. 1999 Jul;43(4):349-56.
- de Gramont A, Tournigand C, André T, Larsen AK, Louvet C. Adjuvant therapy for stage II and III colorectal cancer. *Semin Oncol*. 2007 Apr;34(2 Suppl 1):S37-40.
- Debruyne PR, Bruyneel EA, Karaguni IM, Li X, Flatau G, Müller O, Zimber A, Gespach C, Mareel MM. Bile acids stimulate invasion and haptotaxis in human colorectal cancer cells through activation of multiple oncogenic signaling pathways. *Oncogene*. 2002 Oct 3;21(44):6740-50.
- Dehqanzada ZA, Storrer CE, Hueman MT, Foley RJ, Harris KA, Jama YH, Kao TC, Shriver CD, Ponniah S, Peoples GE. Correlations between serum monocyte chemotactic protein-1 levels, clinical prognostic factors, and HER-2/neu vaccine-related immunity in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2006 Jan 15;12(2):478-86.
- Delhougne B, Deneux C, Abs R, Chanson P, Fierens H, Laurent-Puig P, Duysburgh I, Stevenaert A, Tabarin A, Delwaide J. The prevalence of colonic polyps in acromegaly: a colonoscopic and pathological study in 103 patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Nov;80(11):3223-6.
- Delmotte P, Degroote S, Lafitte JJ, Lamblin G, Perini JM, Roussel P. Tumor necrosis factor alpha increases the expression of glycosyltransferases and sulfotransferases responsible for the biosynthesis of sialylated and/or sulfated Lewis x epitopes in the human bronchial mucosa. *J Biol Chem*. 2002 Jan 4;277(1):424-31. Epub 2001 Oct 25.
- Denoix PF. Importance of a classification common to the various forms of cancer. *Acta Radiol Suppl*. 1954;116:122-9.
- Dewys WD, Begg C, Lavin PT, Band PR, Bennett JM, Bertino JR, Cohen MH, Douglass HO Jr, Engstrom PF, Ezdinli EZ, Horton J, Johnson GJ, Moertel CG, Oken MM, Perlia C, Rosenbaum C, Silverstein MN, Skeel RT, Sponzo RW, Tormey DC.

- Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Med.* 1980 Oct;69(4):491-7.
- D'Haens GR, Lashner BA, Hanauer SB. Pericholangitis and sclerosing cholangitis are risk factors for dysplasia and cancer in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 1993 Aug;88(8):1174-8.
  - Dignam JJ, Polite BN, Yothers G, Raich P, Colangelo L, O'Connell MJ, Wolmark N. Body mass index and outcomes in patients who receive adjuvant chemotherapy for colon cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Nov 15;98(22):1647-54.
  - Dirx MJ, van den Brandt PA, Goldbohm RA, Lumey LH. Diet in adolescence and the risk of breast cancer: results of the Netherlands Cohort Study. *Cancer Causes Control.* 1999 Jun;10(3):189-99.
  - Dirx MJ, van den Brandt PA, Goldbohm RA, Lumey LH. Energy restriction early in life and colon carcinoma risk: results of The Netherlands Cohort Study after 7.3 years of follow-up. *Cancer.* 2003 Jan 1;97(1):46-55.
  - Doekhie FS, Morreau H, de Bock GH, Speetjens FM, Dekker-Ensink NG, Putter H, van de Velde CJ, Tollenaar RA, Kuppen PJ. Sialyl Lewis X expression and lymphatic microvessel density in primary tumors of node-negative colorectal cancer patients predict disease recurrence. *Cancer Microenviron.* 2008 Dec;1(1):141-51. Epub 2008 Aug 6.
  - Doménech N, Henderson RA, Finn OJ. Identification of an HLA-A11-restricted epitope from the tandem repeat domain of the epithelial tumor antigen mucin. *J Immunol.* 1995 Nov 15;155(10):4766-74.
  - Domingo E, Niessen RC, Oliveira C, Alhopuro P, Moutinho C, Espín E, Armengol M, Sijmons RH, Kleibeuker JH, Seruca R, Aaltonen LA, Imai K, Yamamoto H, Schwartz S Jr, Hofstra RM. BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene.* 2005 Jun 2;24(24):3995-8.
  - Dotor E, Cuatrecasas M, Martínez-Iniesta M, Navarro M, Vilardell F, Guinó E, Pareja L, Figueras A, Molleví DG, Serrano T, de Oca J, Peinado MA, Moreno V, Germà JR, Capellá G, Villanueva. A Tumor thymidylate synthase 1494del6 genotype as a

- prognostic factor in colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based adjuvant treatment. *J Clin Oncol*. 2006 Apr 1;24(10):1603-11.
- Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, Nilsson O, Sturgeon C, Topolcan O. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer*. 2003 Apr;39(6):718-27. Review.
  - Dukes CE, Bussey HJ. The spread of rectal cancer and its effect on prognosis. *Br J Cancer*. 1958 Sep;12(3):309-20
  - Duncan TJ, Watson NF, Al-Attar AH, Scholefield JH, Durrant LG. The role of MUC1 and MUC3 in the biology and prognosis of colorectal cancer. *World J Surg Oncol*. 2007 Mar 9;5:31.
  - Duncan TJ, Watson NF, Al-Attar AH, Scholefield JH, Durrant LG. The role of MUC1 and MUC3 in the biology and prognosis of colorectal cancer. *World J Surg Oncol*. 2007 Mar 9;5:31.
  - Dunn G, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immune surveillance to tumor escape. *Nature Immunol* 2002; 3: 991-8.
  - Dunn SE, Kari FW, French J, Leininger JR, Travlos G, Wilson R, Barrett JC. Dietary restriction reduces insulin-like growth factor I levels, which modulates apoptosis, cell proliferation, and tumor progression in p53-deficient mice. *Cancer Res*. 1997 Nov 1;57(21):4667-72.
  - Eddy DM. Screening for colorectal cancer. *Ann Intern Med*. 1990 Sep 1;113(5):373-84. Review.
  - Eisenberg B, Decosse JJ, Harford F, Michalek J. Carcinoma of the colon and rectum: the natural history reviewed in 1704 patients.
  - Ekbohm A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med*. 1990 Nov 1;323(18):1228-33.
  - Ellies LG, Tsuboi S, Petryniak B, Lowe JB, Fukuda M, Marth JD. Core 2 oligosaccharide biosynthesis distinguishes between selectin ligands essential for leukocyte homing and inflammation. *Immunity*. 1998 Dec;9(6):881-90.
  - Ergün S, Kilik N, Ziegeler G, Hansen A, Nollau P, Götze J, Wurmbach JH, Horst A, Weil J, Fernando M, Wagener C. CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent

- angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell*. 2000 Feb;5(2):311-20.
- Erlinger TP, Platz EA, Rifai N, Helzlsouer KJ. C-reactive protein and the risk of incident colorectal cancer. *JAMA*. 2004 Feb 4;291(5):585-90.
  - Eschrich S, Yeatman TJ. DNA microarrays and data analysis: an overview. *Surgery*. 2004 Sep;136(3):500-3.
  - Esper DH, Harb WA. The cancer cachexia syndrome: a review of metabolic and clinical manifestations. *Nutr Clin Pract*. 2005 Aug;20(4):369-76.
  - Everhart J, Wright D. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *JAMA*. 1995 May 24-31;273(20):1605-9.
  - Faivre-Finn C, Bouvier-Benhamiche AM, Phelip JM, Manfredi S, Dancourt V, Faivre J. Colon cancer in France: evidence for improvement in management and survival. *Gut*. 2002 Jul;51(1):60-4.
  - Falk KE, Karlsson KA, Larson G, Thurin J, Blaszczyk M, Steplewski Z, Koprowski H. Mass spectrometry of a human tumor glycolipid antigen being defined by mouse monoclonal antibody NS-19-9. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983 Jan 27;110(2):383-91.
  - Fan YK, Zhang CC. Appendectomy and cancer. An epidemiological evaluation. *Chin Med J (Engl)*. 1986 Jun;99(6):523-6.
  - Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomás G, Kinzler KW. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*. 1990 Jan 5;247(4938):49-56.
  - Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67.
  - Feng Y, Duan Z, Hu H. The relation-ship between apoptosis, apoptosis related-gene expression and proliferative activity in smooth muscle cell after autogenous vein grafting]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 1999 Jan;79(1):15-8.
  - Fidler IJ, Yano S, Zhang RD, Fujimaki T, Bucana CD. The Seed and Soil Hypothesis: Vascularization and Brain Metastasis." *Lancet Oncol*. 2002 Jan;3(1):53-7. Review.
  - Figueredo A, Charette ML, Maroun J, Brouwers MC, Zuraw L. Adjuvant therapy for stage II colon cancer: a systematic review from the Cancer Care Ontario Program in

- evidence-based care's gastrointestinal cancer disease site group. *J Clin Oncol*. 2004 Aug 15;22(16):3395-407. Epub 2004 Jun 15. Review.
- Filella X, Fuster J, Molina R, Grau JJ, García-Valdecasas JC, Grande L, Estapé J, Ballesta AM. TAG-72, CA 19.9 and CEA as tumor markers in gastric cancer. *Acta Oncol*. 1994;33(7):747-51.
  - Filella X, Molina R, Grau JJ, Piqué JM, Garcia-Valdecasas JC, Astudillo E, Biete A, Bordas JM, Novell A, Campo E. Prognostic value of CA 19.9 levels in colorectal cancer. *Ann Surg*. 1992 Jul;216(1):55-9.
  - Filella X, Molina R, Piqué JM, Grau JJ, Garcia-Valdecasas JC, Biete A, Novell F, Astudillo E, Bordas JM, Campo E. CEA as a prognostic factor in colorectal cancer. *Anticancer Res*. 1994 Mar-Apr;14(2B):705-8.
  - Filippa DA, Pasqualini CD. Morphological study of allogeneic tumor growth in mice bearing a glass cylinder. *Medicina (Buenos Aires)* 1975; 35: 29-36.
  - Finn OJ, Jerome KR, Henderson RA, Pecher G, Domenech N, Magarian-Blander J, Barratt-Boyes SM. MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol Rev*. 1995 Jun;145:61-89. Review.
  - Finn OJ. Antigen-specific, MHC-unrestricted T cells. *Biotherapy*. 1992;4(4):239-49. Review.
  - Fischbach W, Mössner J. Tissue concentrations of CEA and CA 19-9 in the carcinogenesis of colorectal carcinoma exemplified by the adenoma-carcinoma sequence. *Res Exp Med (Berl)*. 1988;188(2):101-14.
  - Fontenot JD, Tjandra N, Bu D, Ho C, Montelaro RC, Finn OJ. Biophysical characterization of one-, two-, and three-tándem repeats of human mucin (muc-1) protein core. *Cancer Res*. 1993 Nov 15;53(22):5386-94.
  - Forstner JF, Forstner GG. Gastrointestinal mucus. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (3rd ed.), edited by Johnson LR. New York: Raven, 1994, p. 1255–1284.
  - Forstner JF. Intestinal mucins in health and disease. *Digestion*. 1978;17(3):234-63. Review.

- Francini G, Petrioli R, Lorenzini L, Mancini S, Armenio S, Tanzini G, Marsili S, Aquino A, Marzocca G, Civitelli S. Folinic acid and 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy in colon cancer. *Gastroenterology*. 1994 Apr;106(4):899-906.
- Freire T, Medeiros A, Reis CA, Real FX, Osinaga E. Biochemical characterization of soluble Tn glycoproteins from malignant effusions of pacientes with carcinomas. *Oncol Rep*. 2003 Sep-Oct;10(5):1577-85.
- Friend, Stephen H. A Human DNA segment with Properties of the Gene that Predisposes to Retinoblastoma and Osteosarcoma. *Nature*. 323 (1986): 643-646.
- Fukuda I, Hizuka N, Murakami Y, Itoh E, Yasumoto K, Sata A, Takano K. Clinical features and therapeutic outcomes of 65 pacientes with acromegaly at Tokyo Women's Medical University. *Intern Med*. 2001 Oct;40(10):987-92.
- Fukuda M, Carlsson SR, Klock JC, Dell A. Structures of O-linked oligosaccharides isolated from normal granulocytes, chronic myelogenous leukemia cells, and acute myelogenous leukemia cells. *J Biol Chem*. 1986 Sep 25;261(27):12796-806.
- Fukuda M, Fukuda M. Cell surface glycoproteins and carbohydrate antigens in the differentiation of human erythroid and myeloid cells] Tanpakushitsu Kakusan Koso. 1985 Jun;30(7 Suppl):544-56. Review.
- Fukuda M, Spooncer E, Oates JE, Dell A, Klock JC. Structure of sialylated fucosyl lactosaminoglycan isolated from human granulocytes. *J Biol Chem*. 1984 Sep 10;259(17):10925-35.
- Fukushima K, Hirota M, Terasaki PI, Wakisaka A, Togashi H, Chia D, Suyama N, Fukushi Y, Nudelman E, Hakomori S .Characterization of sialosylated Lewisx as a new tumor-associated antigen. *Cancer Res*. 1984 Nov;44(11):5279-85.
- Futamura N, Nakamura S, Tatematsu M, Yamamura Y, Kannagi R, Hirose H. Clinicopathologic significance of sialyl Le(x) expression in advanced gastric carcinoma. *Br J Cancer*. 2000 Dec;83(12):1681-7.
- Gal R, Sadikov E, Sulkes J, Klein B, Koren R. Deleted in colorrectal cancer protein expression as a possible predictor of response to adjuvant chemotherapy in colorrectal cancer pacientes. *Dis Colon Rectum*. 2004 Jul;47(7):1216-24. Epub 2004 May 19.

- Galandiuk S, Wieand HS, Moertel CG, Cha SS, Fitzgibbons RJ Jr, Pemberton JH, Wolff BG. Patterns of recurrence after curative resection of carcinoma of the colon and rectum. *Surg Gynecol Obstet.* 1992 Jan;174(1):27-32.
- Galli-Stampino L, Meinjohanns E, Frische K, Meldal M, Jensen T, Werdelin O, Mouritsen S. T-cell recognition of tumor-associated carbohydrates: the nature of the glycan moiety plays a decisive role in determining glycopeptide immunogenicity. *Cancer Res.* 1997 Aug 1;57(15):3214-22.
- Gapstur SM, Potter JD, Folsom AR. Alcohol consumption and colon and rectal cancer in postmenopausal women. *Int J Epidemiol.* 1994 Feb;23(1):50-7.
- Garrigues J, Garrigues U, Hellström I, Hellström KE. Ley specific antibody with potent anti-tumor activity is internalized and degraded in lysosomes. *Am J Pathol.* 1993 Feb;142(2):607-22.
- Gastrointestinal Tumor Study Group. Prolongation of the disease-free interval in surgically treated rectal carcinoma. *N Engl J Med* 1985; 312:1465-72.
- Gebauer G, Müller-Ruchholtz W. Tumor marker concentrations in normal and malignant tissues of colorectal cancer patients and their prognostic relevance. *Anticancer Res.* 1997 Jul-Aug;17(4A):2731-4
- Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Engering A, 't Hart BA, van Kooyk Y. Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:33-54. Review.
- Gendler S, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Rothbard J, Burchell J. A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats. *J Biol Chem.* 1988 Sep 15;263(26):12820-ñ.
- Gendler SJ, Cohen EP, Craston A, Duhig T, Johnstone G, Barnes D. The locus of the polymorphic epithelial mucin (PEM) tumour antigen on chromosome 1q21 shows a high frequency of alteration in primary human breast tumours. *Int J Cancer.* 1990 Mar 15;45(3):431-5.
- Gendler SJ, Spicer AP, Lalani EN, Duhig T, Peat N, Burchell J, Pemberton L, Boshell M, Taylor-Papadimitriou J. Structure and biology of a carcinoma-associated mucin, MUC1. *Am Rev Respir Dis.* 1991 Sep;144(3 Pt 2):S42-7



- Gendler SJ, Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:607-34. Review.
- Genovesi D, Cèfaro GA, Vinciguerra A, Augurio A, D'Alessandro M, Borzillo V, Marchese R, Di Nicola M. Retrospective long-term results and prognostic factors of postoperative treatment for UICC stages II and III rectal cancer. *Tumori.* 2009 Nov-Dec;95(6):675-82
- Ghazizadeh M, Ogawa H, Sasaki Y, Araki T, Aihara K. Mucin carbohydrate antigens (T, Tn, and sialyl-Tn) in human ovarian carcinomas: relationship with histopathology and prognosis. *Hum Pathol.* 1997 Aug;28(8):960-6.
- Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, Thomé SD, Alberts SR, Haller DG, Benedetti J, Francini G, Shepherd LE, Francois Seitz J, Labianca R, Chen W, Cha SS, Heldebrant MP, Goldberg RM. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin Oncol.* 2004 May 15;22(10):1797-806. Epub 2004 Apr 5.
- Gillen CD, Walmsley RS, Prior P, Andrews HA, Allan RN. Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut.* 1994 Nov;35(11):1590-2.
- Giovannucci E Insulin and colon cancer. *Cancer Causes Control.* 1995 Mar;6(2):164-79. Review.
- Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Ann Intern Med.* 1995 Mar 1;122(5):327-34.
- Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Alcohol, low-methionine--low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *J Natl Cancer Inst.* 1995 Feb 15;87(4):265-73.
- Giovannucci E, Willett WC. Dietary factors and risk of colon cancer *Ann Med.* 1994 Dec;26(6):443-52. Review.
- Gipson IK, Ho SB, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Zhan Q, Torlakovic E, Pudney J, Anderson DJ, Toribara NW, Hill JA 3<sup>rd</sup>. Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia. *Biol Reprod.* 1997 Apr;56(4):999-1011.

- Giuffrè G, Vitarelli E, Tuccari G, Ponz de Leon M, Barresi G. Detection of Tn, sialosyl-Tn and T antigens in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Virchows Arch.* 1996 Dec;429(6):345-52.
- Giuntoli RL 2nd, Rodriguez GC, Whitaker RS, Dodge R, Voynow JA. Mucin gene expression in ovarian cancers. *Cancer Res.* 1998 Dec 1;58(23):5546-50.
- Gobbi PG, Valentino F, Berardi E, Tronconi C, Brugnattelli S, Luinetti O, Moratti R, Corazza GR. New insights into the role of age and carcinoembryonic antigen in the prognosis of colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2008 Jan 29;98(2):328-34. Epub 2007 Nov 20.
- Goel A, Nagasaka T, Arnold CN, Inoue T, Hamilton C, Niedzwiecki D, Compton C, Mayer RJ, Goldberg R, Bertagnolli MM, Boland CR. The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2007 Jan;132(1):127-38. Epub 2006 Sep 20.
- Goldstein MJ, Mitchell EP. Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest.* 2005;23(4):338-51. Review.
- Gong E, Hirohashi S, Shimosato Y, Watanabe M, Ino Y, Teshima S, Kodaira S: Expression of carbohydrate antigen 19-9 and stage specific embryonic antigen 1 in nontumorous and tumorous epithelia of the human colon and rectum. *J Natl Cancer Inst.* 1985 Sep;75(3):447-54
- Goodman, Luis S. Landmark Perspective: Nitrogen Mustard Therapy. *JAMA.* 251 (1984); 2255-2261.
- Gooi HC, Feizi T, Kapadia A, Knowles BB, Solter D, Evans MJ. Stage-specific embryonic antigen involves alpha 1 goes to 3 fucosylated type 2 blood group chains. *Nature.* 1981 Jul 9;292(5819):156-8.
- Goslin R, O'Brien MJ, Steele G, Mayer R, Wilson R, Corson JM, Zamcheck N. Correlation of Plasma CEA and CEA tissue staining in poorly differentiated colorectal cancer. *Am J Med.* 1981 Aug;71(2):246-53.
- Goupille C, Marionneau S, Bureau V, Hallouin F, Meichenin M, Rocher J, Le Pendu J. alpha1,2Fucosyltransferase increases resistance to apoptosis of rat colon carcinoma cells. *Glycobiology.* 2000 Apr;10(4):375-82.

- Gourevitch MM, von Mensdorff-Pouilly S, Litvinov SV, Kenemans P, van Kamp GJ, Verstraeten AA, Hilgers J. Polymorphic epithelial mucin (MUC-1)-containing circulating immune complexes in carcinoma patients. *Br J Cancer*. 1995 Oct;72(4):934-8.
- Grabowski P, Mann B, Mansmann U, Lövin N, Foss HD, Berger G, Scherübl H, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C. Expression of SIALYL-Le(x) antigen defined by MAb AM-3 is an independent prognostic marker in colorectal carcinoma patients *Int J Cancer*. 2000 Oct 15;88(2):281-6.
- Grabowski P, Schönfelder J, Ahnert-Hilger G, Foss HD, Stein H, Berger G, Zeitz M, Scherübl H. Heterogeneous expression of neuroendocrine marker proteins in human undifferentiated carcinoma of the colon and rectum. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Apr;1014:270-4.
- Granovsky M, Bielfeldt T, Peters S, Paulsen H, Meldal M, Brockhausen J, Brockhausen I. UDPgalactose:glycoprotein-N-acetyl-D-galactosamine 3-beta-D-galactosyltransferase activity synthesizing O-glycan core 1 is controlled by the amino acid sequence and glycosylation of glycopeptide substrates. *Eur J Biochem*. 1994 May 1;221(3):1039-46.
- Gratchev A, Siedow A, Bumke-Vogt C, Hummel M, Foss HD, Hanski ML, Kobalz U, Mann B, Lammert H, Mansmann U, Stein H, Riecken EO, Hanski C. Regulation of the intestinal mucin MUC2 gene expression in vivo: evidence for the role of promoter methylation. *Cancer Lett*. 2001 Jul 10;168(1):71-80. Erratum in: *Cancer Lett* 2002 Jan 10;175(1):107.
- Green JB, Timmcke AE, Mitchell WT, Hicks TC, Gathright JB Jr, Ray JE. Mucinous carcinoma--just another colon cancer? *Dis Colon Rectum*. 1993 Jan;36(1):49-54. Review.
- Greene FL, Stewart AK, Norton HJ. New tumor-node-metastasis staging strategy for node-positive (stage III) rectal cancer: an analysis. *J Clin Oncol*. 2004 May 15;22(10):1778-84. Epub 2004 Feb 9.
- Greene FL, Stewart AK, Norton HJ. A new TNM staging strategy for node-positive (stage III) colon cancer: an analysis of 50,042 patients. *Ann Surg*. 2002 Oct;236(4):416-21; discussion 421.

- Greene FL. The American Joint Committee on Cancer: updating the strategies in cancer staging. *Bull Am Coll Surg*. 2002 Jul;87(7):13-5.
- Grem J. The prognostic importance of tumor markers in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Curr Opin Oncol*. 1997 Jul;9(4):380-7. Review.
- Grem JL, Fischer PH Enhancement of 5-fluorouracil's anticancer activity by dipyridamole. *Pharmacol Ther*. 1989;40(3):349-71. Review.
- Griffin MR, Bergstralh EJ, Coffey RJ, Beart RW Jr, Melton LJ 3<sup>rd</sup>. Predictors of survival after curative resection of carcinoma of the colon and rectum. *Cancer*. 1987 Nov 1;60(9):2318-24.
- Grimm M, Lazariotou M, Kircher S, Höfelmayr A, Germer CT, von Rahden BH, Waaga-Gasser AM, Gasser M. Tumor necrosis factor- $\alpha$  is associated with positive lymph node status in patients with recurrence of colorectal cancer - indications for anti-TNF- $\alpha$  agents in cancer treatment. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2010 Jan 1;33(3):151-63.
- Grobost O, Boutron MC, Arveux P, Bedenne L, Chatrenet P, Faivre J. Appendectomy, cholecystectomy, cholelithiasis and colorectal cancer. A retrospective case control study at the Côte-d'Or. *Gastroenterol Clin Biol*. 1991;15(8-9):594-9.
- Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2000 Jan 13;342(2):69-77.
- Gu J, Nishikawa A, Tsuruoka N, Ohno M, Yamaguchi N, Kangawa K, Taniguchi N Gu J, Nishikawa A, Tsuruoka N, Ohno M, Yamaguchi N, Kangawa K, Taniguchi N. Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine: alpha-6-D-mannoside beta 1-6N-acetylglucosaminyltransferase (N-acetylglucosaminyltransferase V) from a human lung cancer cell line. *J Biochem*. 1993 May;113(5):614-9.
- Guadagni F, Roselli M, Cosimelli M, Spila A, Cavaliere F, Arcuri R, D'Alessandro R, Fracasso PL, Casale V, Vecchione A, Casciani CU, Greiner JW, Schlom J. Quantitative analysis of CEA expression in colorectal adenocarcinoma and serum: lack of correlation. *Int J Cancer*. 1997 Sep 17;72(6):949-54.

- Gum JR Jr, Hicks JW, Toribara NW, Rothe EM, Lagace RE, Kim YS. The human MUC2 intestinal mucin has cysteine-rich subdomains located both upstream and downstream of its central repetitive region. *J Biol Chem.* 1992 Oct 25;267(30):21375-83.
- Gum JR Jr, Hicks JW, Toribara NW, Siddiki B, Kim YS. Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. Identification of the amino terminus and overall sequence similarity to prepro-von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 1994 Jan 28;269(4):2440-6.
- Gum JR Jr. Mucin genes and the proteins they encode: structure, diversity, and regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992 Dec;7(6):557-64. Review.
- Gum JR, Byrd JC, Hicks JW, Toribara NW, Lamport DT, Kim YS. Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism. *J Biol Chem.* 1989 Apr 15;264(11):6480-7.
- Gunderson LL, Sargent DJ, Tepper JE, Wolmark N, O'Connell MJ, Begovic M, Allmer C, Colangelo L, Smalley SR, Haller DG, Martenson JA, Mayer RJ, Rich TA, Ajani JA, MacDonald JS, Willett CG, Goldberg RM. Impact of T and N stage and treatment on survival and relapse in adjuvant rectal cancer: a pooled analysis. *J Clin Oncol.* 2004 May 15;22(10):1785-96. Epub 2004 Apr 5.
- Günther K, Brabletz T, Dworak O, Reymond MA, Köckerling F, Ballhausen W, Hohenberger W. Beta-catenin expression and its significance for metastasis in curatively operated rectum carcinoma] *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd.* 1998;115:1380-2.
- Guo Q, Tang W, Inagaki Y, Midorikawa Y, Kokudo N, Sugawara Y, Nakata M, Konishi T, Nagawa H, Makuuchi M. Clinical significance of subcellular localization of KL-6 mucin in primary colorectal adenocarcinoma and metastatic tissues. *World J Gastroenterol.* 2006 Jan 7;12(1):54-9.
- Gurunluoglu, R, Gurunluglu, A. Paul of Aegina: Landmark in Surgical Progress. *World Journal of Surgery.* 27 (2003):18-25.
- Habr-Gama A, Oliva Perez R. The strategy "wait and watch" in patients with a cancer of bottom stocking rectum with a complete clinical answer after neoadjuvant radiochemotherapy. *J Chir (Paris).* 2009 Jun;146(3):237-9. Epub 2009 Aug 13.

- Hahn WC. Creation of Tumor Cells With Defined Genetic Elements. *Nature*. 400 (1999): 464-468.
- Hakomori S. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res*. 1989;52:257-331. Review.
- Hakomori S. Blood group ABH and Ii antigens of human erythrocytes: chemistry, polymorphism, and their developmental change. *Semin Hematol*. 1981 Jan;18(1):39-62. Review.
- Hakomori SI. Glycosphingolipids having blood-group ABH and Lewis specificities. *Chem Phys Lipids*. 1970 Oct;5(1):96-115.
- Haller DG, Catalano PJ, Macdonald JS, O'Rourke MA, Frontiera MS, Jackson DV, Mayer RJ. Phase III study of fluorouracil, leucovorin, and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: final report of Intergroup 0089. *J Clin Oncol*. 2005 Dec 1;23(34):8671-8
- Halloran MM, Carley WW, Polverini PJ, Haskell CJ, Phan S, Anderson BJ, Woods JM, Campbell PL, Volin MV, Bäcker AE, Koch AE. Ley/H: an endothelial-selective, cytokine-inducible, angiogenic mediator. *J Immunol*. 2000 May 1;164(9):4868-77.
- Halvorsen B, Staff AC, Ligaarden S, Prydz K, Kolset SO. Lithocholic acid and sulphated lithocholic acid differ in the ability to promote matrix metalloproteinase secretion in the human colon cancer cell line CaCo-2. *Biochem J*. 2000 Jul 1;349(Pt 1):189-93.
- Halvorsen TB, Johannesen E. DNA ploidy, tumour site, and prognosis in colorectal cancer. A flow cytometric study of paraffin-embedded tissue *Scand J Gastroenterol*. 1990 Feb;25(2):141-8.
- Hamada S, Furumoto H, Kamada M, Hirao T, Aono T. High expression rate of Tn antigen in metastatic lesions of uterine cervical cancers. *Cancer Lett*. 1993 Nov 1;74(3):167-73.
- Han SA, Chun H, Park CM, Kang SJ, Kim SH, Sohn D, Yun SH, Lee WY. Prognostic significance of beta-catenin in colorectal cancer with liver metastasis. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2006 Dec;18(10):761-7. Erratum in: *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2007 May;19(4):270-1

- Han XY, Wei HB, Zheng ZH, Huang JL, Wei B, Hu BG. Gene expression profile difference between colorectal cancer tissue and pericancerous mucosa by DNA microarray. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*. 2009 Jan;12(1):77-81.
- Hanai N; Shitara K and Yoshida H. Generation of monoclonal antibodies against human lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma using mice rendered tolerant to normal human lung. *Cancer Res*. 1986; 46: 4438-43.
- Hanisch FG, Hanski C, Hasegawa A. Sialyl Lewis(x) antigen as defined by monoclonal antibody AM-3 is a marker of dysplasia in the colonic adenoma-carcinoma sequence. *Cancer Res*. 1992 Jun 1;52(11):3138-44.
- Hanisch FG, Müller S, Hassan H, Clausen H, Zachara N, Gooley AA, Paulsen H, Alving K, Peter-Katalinic J. Dynamic epigenetic regulation of initial O-glycosylation by UDP-N-Acetylgalactosamine:Peptide N-acetylgalactosaminyltransferases. site-specific glycosylation of MUC1 repeat peptide influences the substrate qualities at adjacent or distant Ser/Thr positions. *J Biol Chem*. 1999 Apr 9;274(15):9946-54.
- Hanisch FG, Peter-Katalinic J, Egge H, Dabrowski U, Uhlenbruck G. Structures of acidic O-linked polylactosaminoglycans on human skim milk mucins. *Glycoconj J*. 1990;7(6):525-43.
- Hanisch FG, Uhlenbruck G, Peter-Katalinic J, Egge H, Dabrowski U, Dabrowski J. Unbranched polylactosamino-O-glycans on human skim milk mucins exhibit Gal beta(1-4)GlcNAc beta(1-6) repeating units. *Symp Soc Exp Biol*. 1989;43:155-62. Review.
- Hanisch FG. O-glycosylation of the mucin type. *Biol Chem*. 2001 Feb;382(2):143-9. Review.
- Hanski C, Bornhoeft G, Topf N, Hermann U, Stein H, Riecken EO. Detection of a mucin marker for the adenoma-carcinoma sequence in human colonic mucosa by monoclonal antibody AM-3. *J Clin Pathol*. 1990 May;43(5):379-84.
- Hanski C, Drechsler K, Hanisch FG, Sheehan J, Manske M, Ogorek D, Klussmann E, Hanski ML, Blank M, Xing PX, et al. Altered glycosylation of the MUC-1 protein core contributes to the colon carcinoma-associated increase of mucin-bound sialyl-Lewis(x) expression. *Cancer Res*. 1993 Sep 1;53(17):4082-8.

- Hanski C, Riede E, Gratchev A, Foss HD, Böhm C, Klussmann E, Hummel M, Mann B, Buhr HJ, Stein H, Kim YS, Gum J, Riecken EO. MUC2 gene suppression in human colorectal carcinomas and their metastases: in vitro evidence of the modulatory role of DNA methylation. *Lab Invest.* 1997 Dec;77(6):685-95.
- Hanski C. Is mucinous carcinoma of the colorectum a distinct genetic entity? *Br J Cancer.* 1995 Dec;72(6):1350-6. Review.
- Hara M, Kanemitsu Y, Hirai T, Komori K, Kato T. Negative serum carcinoembryonic antigen has insufficient accuracy for excluding recurrence from patients with Dukes C colorectal cancer: analysis with likelihood ratio and posttest probability in a follow-up study. *Dis Colon Rectum.* 2008 Nov;51(11):1675-80.
- Harnack L, Jacobs DR Jr, Nicodemus K, Lazovich D, Anderson K, Folsom AR. Relationship of folate, vitamin B-6, vitamin B-12, and methionine intake to incidence of colorectal cancers. *Nutr Cancer.* 2002;43(2):152-8.
- Harrison JC, Dean PJ, el-Zeky F, Vander Zwaag R. From Dukes through Jass: pathological prognostic indicators in rectal cancer. *Hum Pathol.* 1994 May;25(5):498-505.
- Harrison LE, Guillem JG, Paty P, Cohen AM. Preoperative carcinoembryonic antigen predicts outcomes in node-negative colon cancer patients: a multivariate analysis of 572 patients. *J Am Coll Surg.* 1997 Jul;185(1):55-9.
- Hayes DF, Sekine H, Ohno T, Abe M, Keefe K, Kufe DW. Use of a murine monoclonal antibody for detection of circulating plasma DF3 antigen levels in breast cancer patients. *J Clin Invest.* 1985 May;75(5):1671-8.
- Hemmerich S, Bistrup A, Singer MS, van Zante A, Lee JK, Tsay D, Peters M, Carminati JL, Brennan TJ, Carver-Moore K, Leviten M, Fuentes ME, Ruddle NH, Rosen SD. Sulfation of L-selectin ligands by an HEV-restricted sulfotransferase regulates lymphocyte homing to lymph nodes. *Immunity.* 2001 Aug;15(2):237-47.
- Hemmerich S. Carbohydrate sulfotransferases: novel therapeutic targets for inflammation, viral infection and cancer. *Drug Discov Today.* 2001 Jan 1;6(1):27-35.
- Hemminki K, Santi I, Weires M, Thomsen H, Sundquist J, Bermejo JL. Tumor location and patient characteristics of colon and rectal adenocarcinomas in relation to survival and TNM classes. *BMC Cancer.* 2010 Dec 21;10:688.



- Henderikx P, Kandilogiannaki M, Petrarca C, von Mensdorff-Pouilly S, Hilgers JH, Krambovitis E, Arends JW, Hoogenboom HR. Human single-chain Fv antibodies to MUC1 core peptide selected from phage display libraries recognize unique epitopes and predominantly bind adenocarcinoma. *Cancer Res.* 1998 Oct 1;58(19):4324-32.
- Hermanek P Jr, Wiebelt H, Riedl S, Staimmer D, Hermanek P. Long-term results of surgical therapy of colon cancer. Results of the Colorrectal Cancer Study Group] *Chirurg.* 1994 Apr;65(4):287-97.
- Herszényi L, Farinati F, Cardin R, István G, Molnár LD, Hritz I, De Paoli M, Plebani M, Tulassay Z. Tumor marker utility and prognostic relevance of cathepsin B, cathepsin L, urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type-1, CEA and CA 19-9 in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2008 Jul 10;8:194.
- Herter P, Kuhnen C, Müller KM, Wittinghofer A, Müller O. Intracellular distribution of beta-catenin in colorectal adenomas, carcinomas and Peutz-Jeghers polyps. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1999;125(5):297-304.
- Hilkens J, Buijs F, Hilgers J, Hageman P, Calafat J, Sonnenberg A, van der Valk M. Monoclonal antibodies against human milk-fat globule membranes detecting differentiation antigens of the mammary gland and its tumors. *Int J Cancer.* 1984 Aug 15;34(2):197-206.
- Hilkens J, Kroezen V, Bonfrer JM, De Jong-Bakker M, Bruning PF. MAM-6 antigen, a new serum marker for breast cancer monitoring. *Cancer Res.* 1986 May;46(5):2582-7.
- Hilkens J, Wesseling J, Vos HL, Storm J, Boer B, van der Valk SW, Maas MC. Involvement of the cell surface-bound mucin, episialin/MUC1, in progression of human carcinomas. *Biochem Soc Trans.* 1995 Nov;23(4):822-6.
- Hill, John. *Cautions against the immoderate use of snuff.* London: R. Baldwin and J. Jackson, 1791.
- Hiltbold EM, Alter MD, Ciborowski P, Finn OJ. Presentation of MUC1 tumor antigen by class I MHC and CTL function correlate with the glycosylation state of the protein taken Up by dendritic cells. *Cell Immunol.* 1999 Jun 15;194(2):143-9.

- Hinck L, Näthke IS, Papkoff J, Nelson WJ. Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol.* 1994 Jun;125(6):1327-40.
- Hine KR, Dykes PW. Serum CEA testing in the post-operative surveillance of colorectal carcinoma. *Br J Cancer.* 1984 Jun;49(6):689-93.
- Hinoda Y, Nakagawa N, Nakamura H, Makiguchi Y, Itoh F, Adachi M, Yabana T, Imai K, Yachi A. Detection of a circulating antibody against a peptide epitope on a mucin core protein, MUC1, in ulcerative colitis. *Immunol Lett.* 1993 Feb;35(2):163-8.
- Hiraga Y, Tanaka S, Haruma K, Yoshihara M, Sumii K, Kajiyama G, Shimamoto F, Kohno N. Immunoreactive MUC1 expression at the deepest invasive portion correlates with prognosis of colorectal cancer. *Oncology.* 1998 Jul-Aug;55(4):307-19.
- Hiraishi K, Suzuki K, Hakomori S, Adachi M. Le(y) antigen expression is correlated with apoptosis (programmed cell death). *Glycobiology.* 1993 Aug;3(4):381-90.
- Hirao T, Sakamoto Y, Kamada M, Hamada S, Aono T. Tn antigen, a marker of potential for metastasis of uterine cervix cancer cells. *Cancer.* 1993 Jul 1;72(1):154-9.
- Hiraoka N, Petryniak B, Nakayama J, Tsuboi S, Suzuki M, Yeh JC, Izawa D, Tanaka T, Miyasaka M, Lowe JB, Fukuda M. A novel, high endothelial venule-specific sulfotransferase expresses 6-sulfo sialyl Lewis(x), an L-selectin ligand displayed by CD34. *Immunity.* 1999 Jul;11(1):79-89.
- Hirohashi, S, Clausen, H, Yamada, T, Shimosato, Y, and Hakomori, S. Blood group A-cross-reacting epitope defined by monoclonal antibodies NCC-LU-35 and -81 expressed in cancer of blood group O or B individuals: its identification as Tn antigen. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*1985, 82:7039-7043.
- Hittlet A, Camby I, Nagy N, Legendre H, Bronckart Y, Decaestecker C, Kaltner H, Nifant'ev NE, Bovin NV, Pector JC, Salmon I, Gabius HJ, Kiss R, Yeaton P. Binding sites for Lewis antigens are expressed by human colon cancer cells and negatively affect their migration. *Lab Invest.* 2003 Jun;83(6):777-87.
- Ho S.B., Ewing S.L., Montgomery C.K. and Kim Y.S. (1996). Altered mucin core peptide immunoreactivity in the colon polyp-carcinoma sequence. *Oncol. Res.* 8, 53-61.

- Ho SB, Niehans GA, Lyftogt C, Yan PS, Cherwitz DL, Gum ET, Dahiya R, Kim YS. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.* 1993 Feb 1;53(3):641-51.
- Ho SB, Robertson AM, Shekels LL, Lyftogt CT, Niehans GA, Toribara NW. Expression cloning of gastric mucin complementary DNA and localization of mucin gene expression. *Gastroenterology.* 1995 Sep;109(3):735-47.
- Ho SB, Toribara NW, Bresalier RS, Kim YS. Biochemical and other markers of colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 1988 Dec;17(4):811-36. Review.
- Hoff SD, Matsushita Y, Ota DM, Cleary KR, Yamori T, Hakomori S, Irimura T. Increased expression of sialyl-dimeric LeX antigen in liver metastases of human colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 1989 Dec 15;49(24 Pt 1):6883-8.
- Homeister JW, Zhang M, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD, Lowe JB, Marks RM. Overlapping functions of E- and P-selectin in neutrophil recruitment during acute inflammation. *Blood.* 1998 Oct 1;92(7):2345-52.
- Hostetter RB, Campbell DE, Chi KF, Kerckhoff S, Cleary KR, Ullrich S, Thomás P, Jessup JM. Carcinoembryonic antigen enhances metastatic potential of human colorectal carcinoma. *Arch Surg.* 1990 Mar;125(3):300-4.
- Howe HL, Wingo PA, Thun MJ, Ries LA, Rosenberg HM, Feigal EG, Edwards BK. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Jun 6;93(11):824-42.
- Howe HL, Wu X, Ries LA, Cokkinides V, Ahmed F, Jemal A, Miller B, Williams M, Ward E, Wingo PA, Ramirez A, Edwards BK. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2003, featuring cancer among U.S. Hispanic/Latino populations. *Cancer.* 2006 Oct 15;107(8):1711-42.
- Huang L, Chen D, Liu D, Yin L, Kharbanda S, Kufe D. MUC1 oncoprotein blocks glycogen synthase kinase 3 $\beta$ -mediated phosphorylation and degradation of  $\beta$ -catenin. *Cancer Res.* 2005 Nov 15;65(22):10413-22.
- Huang L, Ren J, Chen D, Li Y, Kharbanda S, Kufe D. MUC1 cytoplasmic domain coactivates Wnt target gene transcription and confers transformation. *Cancer Biol Ther.* 2003 Nov-Dec;2(6):702-6.

- Huang WB, Shi LH, Zhu XQ, Xu GX, Qi Q. Expression of mucin MUC1 and MUC2 in colorectal carcinoma and their clinical significance. *Ai Zheng*. 2002 Nov;21(11):1231-4.
- Hülsken J, Birchmeier W, Behrens J. E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol*. 1994 Dec;127(6 Pt 2):2061-9.
- Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de González A, Barzi F, Woodward M. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer*. 2005 Jun 6;92(11):2076-83.
- Hyltander A, Daneryd P, Sandström R, Körner U, Lundholm K. Beta-adrenoceptor activity and resting energy metabolism in weight losing cancer patients. *Eur J Cancer*. 2000 Feb;36(3):330-4.
- Iacopetta B, Grieu F, Joseph D, Elsaleh H. A polymorphism in the enhancer region of the thymidylate synthase promoter influences the survival of colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil. *Br J Cancer*. 2001 Sep 14;85(6):827-30.
- Iarumov N, Ignatov A, Viiachki I. The pre- and postoperative monitoring of the immunological indices and tumor markers in colorectal carcinoma. *Khirurgiia (Sofia)*. 1998;51(3):42-8.
- Ikeda Y, Mori M, Kajiyama K, Haraguchi Y, Sasaki O, Sugimachi K. Immunohistochemical expression of sialyl Tn, sialyl Lewis a, sialyl Lewis a-b-, and sialyl Lewis x in primary tumor and metastatic lymph nodes in human gastric cancer. *J Surg Oncol*. 1996 Jul;62(3):171-6.
- Ikeguchi M, Makino M, Kaibara N. Clinical significance of E-cadherin-catenin complex expression in metastatic foci of colorectal carcinoma. *J Surg Oncol*. 2001 Jul;77(3):201-7.
- Imada T, Rino Y, Hatori S, Takahashi M, Amano T, Kondo J, Suda T. Sialyl Tn antigen expression is associated with the prognosis of patients with advanced colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 1999 Jan-Feb;46(25):208-14.
- Imai J, Ghazizadeh M, Naito Z, Asano G. Immunohistochemical expression of T, Tn and sialyl-Tn antigens and clinical outcome in human breast carcinoma. *Anticancer Res*. 2001 Mar-Apr;21(2B):1327-34.

- Imamura Y, Yasutake K, Yoshimura Y, Oya M, Matsushita K, Tokisue M, Sashikata T. Contents of tissue CEA and CA19-9 in colonic polyp and colorectal cancer, and their clinical significance. *Gastroenterol Jpn.* 1990 Apr;25(2):186-92.
- Inagaki Y, Xu H, Nakata M, Seyama Y, Hasegawa K, Sugawara Y, Tang W, Kokudo N. Clinicopathology of sialomucin: MUC1, particularly KL-6 mucin, in gastrointestinal, hepatic and pancreatic cancers. *Biosci Trends.* 2009 Dec;3(6):220-32. Review
- Inoue M, Takahashi S, Yamashina I, Kaibori M, Okumura T, Kamiyama Y, Vichier-Guerre S, Cantacuzène D, Nakada H. High density O-glycosylation of the MUC2 tandem repeat unit by N-acetylgalactosaminyltransferase-3 in colonic adenocarcinoma extracts. *Cancer Res.* 2001 Feb 1;61(3):950-6.
- Inoue M, Yamashina I, Nakada H. Glycosylation of the tandem repeat unit of the MUC2 polypeptide leading to the synthesis of the Tn antigen. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Apr 7;245(1):23-7.
- International Multicentre Pooled Analysis of B2 Colon Cancer Trials (IMPACT B2) Investigators. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in B2 colon cancer. *International. J Clin Oncol.* 1999 May;17(5):1356-63.
- International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT). Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. investigators. *Lancet.* 1995 Apr 15;345(8955):939-44.
- Inufusa H, Adachi T, Kiyokawa T, Nakatani Y, Wakano T, Nakamura M, Okuno K, Shiozaki H, Yamamoto S, Suzuki M, Ando O, Kurimoto M, Miyake M, Yasutomi M. Ley glycolipid-recognizing monoclonal antibody inhibits procoagulant activity and metastasis of human adenocarcinoma. *Int J Oncol.* 2001 Nov;19(5):941-6.
- Ioannides CG, Fisk B, Jerome KR, Irimura T, Wharton JT, Finn OJ. Cytotoxic T cells from ovarian malignant tumors can recognize polymorphic epithelial mucin core peptides. *J Immunol.* 1993 Oct 1;151(7):3693-703.
- Irimura T, Denda K, Iida S, Takeuchi H, Kato K. Diverse glycosylation of MUC1 and MUC2: potential significance in tumor immunity. *J Biochem.* 1999 Dec;126(6):975-85. Review.

- Irimura T, Matsushita Y, Hoff SD, Yamori T, Nakamori S, Frazier ML, Giacco GG, Cleary KR, Ota DM. Ectopic expression of mucins in colorectal cancer metastasis. *Semin Cancer Biol.* 1991 Apr;2(2):129-39. Review.
- Irimura T. Biochemistry of glycoconjugates in the studies of cancer metastasis. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 1987 Mar;32(3):189-202. Review.
- Isbister WH. Colorrectal operative experience in general surgical training at King Faisal Specialist Hospital and Research Centre. *Ann Saudi Med.* 1999 Jul-Aug;19(4):341-4.
- Ishibashi Y, Inouye Y, Okano T, Taniguchi A. Regulation of sialyl-Lewis x epitope expression by TNF-alpha and EGF in an airway carcinoma cell line. *Glycoconj J.* 2005 Feb;22(1-2):53-62.
- Ishida H, Miwa H, Tatsuta M, Masutani S, Imamura H, Shimizu J, Ezumi K, Kato H, Kawasaki T, Furukawa H, Kawakami H. Ki-67 and CEA expression as prognostic markers in Dukes' C colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2004 Apr 15;207(1):109-15.
- Ishizu H, Kumagai J, Eishi Y, Takizawa T, Koike M. Mucin core protein expression by colorectal mucinous carcinomas with or without mucus hyperplasia. *J Gastroenterol.* 2004;39(2):125-32.
- Isturiz MA, Beigier-Bompadre M, Barrionuevo P, Alves-Rosa F, Palermo MS, Vulcano M. Hypothesis: an alternative pathway for the regulation of inflammation. *Medicina (Buenos Aires)* 2004; 64: 235-239.
- Itzkowitz SH, Bloom EJ, Lau TS, Kim YS. Mucin associated Tn and sialosyl-Tn antigen expression in colorectal polyps. *Gut.* 1992 Apr;33(4):518-23.
- Itzkowitz SH, Yuan M, Fukushi Y, Lee H, Shi ZR, Zurawski V Jr, Hakomori S, Kim YS. Immunohistochemical comparison of Lea, monosialosyl Lea (CA 19-9), and disialosyl Lea antigens in human colorectal and pancreatic tissues. *Cancer Res.* 1988 Jul 1;48(13):3834-42.
- Itzkowitz SH, Yuan M, Fukushi Y, Palekar A, Phelps PC, Shamsuddin AM, Trump BF, Hakomori S, Kim YS. Lewisx- and sialylated Lewisx-related antigen expression in human malignant and nonmalignant colonic tissues. *Cancer Res.* 1986 May;46(5):2627-32.

- Itzkowitz SH, Yuan M, Montgomery CK, Kjeldsen T, Takahashi HK, Bigbee WL, Kim YS. Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer. *Cancer Res.* 1989 Jan 1;49(1):197-204.
- Itzkowitz SH. Blood group-related carbohydrate antigen expression in malignant and premalignant colonic neoplasms. *J Cell Biochem Suppl.* 1992;16G:97-101. Review
- Ivankovics IG, Fernandes LC, Saad SS, Matos D. Peripheral and mesenteric serum levels of CEA and cytokeratins, staging and histopathological variables in colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2008 Nov 21;14(43):6699-703.
- Jackman RJ, Mayo CW. The adenoma-carcinoma sequence in cancer of the colon. *Surg Gynecol Obstet.* 1951 Sep;93(3):327-30
- Jang KT, Chae SW, Sohn JH, Park HR, Shin HS. Coexpression of MUC1 with p53 or MUC2 correlates with lymph node metastasis in colorectal carcinomas. *J Korean Med Sci.* 2002 Feb;17(1):29-33.
- Jass JR. Colorectal cancer: a multipathway disease. *Crit Rev Oncog.* 2006 Dec;12(3-4):273-87. Review
- Jass JR. Diagnosis of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Histopathology.* 1998 Jun;32(6):491-7. Review.
- Jass JR. Pathological staging new methods and practical applications. *Cancer Surv.* 1989;8(1):7-26. Review.
- Jellema P, van der Windt DA, Bruinvels DJ, Mallen CD, van Weyenberg SJ, Mulder CJ, de Vet HC. Value of symptoms and additional diagnostic tests for colorectal cancer in primary care: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2010 Mar 31;340:c1269. doi: 10.1136/bmj.c1269. Review
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008 Mar-Apr;58(2):71-96. Epub 2008 Feb 20.
- Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu ZF, Levitt RC, Sistonen P, Kinzler KW, Vogelstein B, Hamilton SR. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorrectal cancer. *N Engl J Med.* 1994 Jul 28;331(4):213-21.
- Jenkins DJ, Jenkins AL, Rao AV, Thompson LU. Cancer risk: possible protective role of high carbohydrate high fiber diets. *Am J Gastroenterol.* 1986 Oct;81(10):931-5. Review.

- Jensen T, Hansen P, Galli-Stampino L, Mouritsen S, Frische K, Meinjohanns E, Meldal M, Werdelin O. Carbohydrate and peptide specificity of MHC class II-restricted T cell hybridomas raised against an O-glycosylated self peptide. *J Immunol.* 1997 Apr 15;158(8):3769-78.
- Jentoft N. Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci.* 1990 Aug;15(8):291-4. Review.
- Jerome KR, Barnd DL, Bendt KM, Boyer CM, Taylor-Papadimitriou J, McKenzie IF, Bast RC Jr, Finn OJ. Cytotoxic T-lymphocytes derived from patients with breast adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of a mucin molecule preferentially expressed by malignant cells. *Cancer Res.* 1991 Jun 1;51(11):2908-16.
- Jerome KR, Domenech N, Finn OJ. Tumor-specific cytotoxic T cell clones from patients with breast and pancreatic adenocarcinoma recognize EBV-immortalized B cells transfected with polymorphic epithelial mucin complementary DNA. *J Immunol.* 1993 Aug 1;151(3):1654-62.
- Jessup JM, McGinnis LS, Steele GD Jr, Menck HR, Winchester DP. The National Cancer Data Base. Report on colon cancer. *Cancer.* 1996 Aug 15;78(4):918-26.
- Jessup JM, Thomás P. Carcinoembryonic antigen: function in metastasis by human colorectal carcinoma. *Cancer Metastasis Rev.* 1989 Dec;8(3):263-80. Review.
- Jessup JM. Tumor markers--prognostic and therapeutic implications for colorectal carcinoma. *Surg Oncol.* 1998 Nov-Dec;7(3-4):139-51. Review.
- Johnston DS, Wright WW, Shaper JH, Hokke CH, Van den Eijnden DH, Joziase DH. Murine sperm-zona binding, a fucosyl residue is required for a high affinity sperm-binding ligand. A second site on sperm binds a nonfucosylated, beta-galactosyl-capped oligosaccharide. *J Biol Chem.* 1998 Jan 23;273(4):1888-95.
- Jørgensen T, Berner A, Kaalhus O, Tveter KJ, Danielsen HE, Bryne M. Up-regulation of the oligosaccharide sialyl LewisX: a new prognostic parameter in metastatic prostate cancer. *Cancer Res.* 1995 May 1;55(9):1817-9.
- Jovanovic R, Jagirdar J, Thung SN, Paronetto F. Blood-group-related antigen Lewis(x) and Lewis(y) in the differential diagnosis of cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 1989 Feb;113(2):139-42.



- Ju T, Cummings RD. A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 beta 3-galactosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 24;99(26):16613-8. Epub 2002 Dec 3.
- Kaliss N. Immunological enhancement of tumor homografts in mice: a review. *Cancer Res* 1958; 18: 992-1003.
- Kalra PR, Tigas S. Regulation of lipolysis: natriuretic peptides and the development of cachexia. *Int J Cardiol*. 2002 Sep;85(1):125-32. Review.
- Kam JL, Regimbald LH, Hilgers JH, Hoffman P, Krantz MJ, Longenecker BM, Hugh JC. MUC1 synthetic peptide inhibition of intercellular adhesion molecule-1 and MUC1 binding requires six tandem repeats *Cancer Res*. 1998 Dec 1;58(23):5577-81.
- Kang H, Min BS, Lee KY, Kim NK, Kim SN, Choi J, Kim H. Loss of E-cadherin and MUC2 expressions correlated with poor survival in patients with stages II and III colorectal carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2011 Mar;18(3):711-9. Epub 2010 Sep 24.
- Kanitakis J, al-Rifai I, Euvrard S, Faure M, Claudy A. Differential expression of the cancer-associated antigens T (Thomsen-Friedenreich) and Tn in primary and recurring squamous cell carcinomas of the skin. *Anticancer Res*. 1999 Jan-Feb;19(1A):619-20.
- Kannagi R, Nudelman E, Levery SB, Hakomori S. A series of human erythrocyte glycosphingolipids reacting to the monoclonal antibody directed to a developmentally regulated antigen SSEA-1. *J Biol Chem*. 1982 Dec 25;257(24):14865-74.
- Kapiteijn E, Liefers GJ, Los LC, Kranenbarg EK, Hermans J, Tollenaar RA, Moriya Y, van de Velde CJ, van Krieken JH. Mechanisms of oncogenesis in colon versus rectal cancer. *J Pathol*. 2001 Sep;195(2):171-8.
- Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zalcborg JR. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008 Oct 23;359(17):1757-65.
- Karlsson S, Swallow DM, Griffiths B, Corney G, Hopkinson DA, Dawnay A, Cartron JP. A genetic polymorphism of a human urinary mucin. *Ann Hum Genet*. 1983 Oct;47 (Pt 4):263-9.

- Karpozilos A, Pavlidis N. The Treatment of Cancer in Greek Antiquity. *European Journal of Cancer*. 40 (2004): 2033-2040.
- Kato H, Yamashita K, Kokuba Y, Satoh T, Ozawa H, Hatate K, Ihara A, Nakamura T, Onosato W, Watanabe M. Surgical resection of stage IV colorectal cancer and prognosis. *World J Surg*. 2008 Jun;32(6):1130-7
- Kawaguchi T, Takazawa H, Imai S, Morimoto J, Watanabe T, Kanno M, Igarashi S. Expression of Vicia villosa agglutinin (VVA)-binding glycoprotein in primary breast cancer cells in relation to lymphatic metastasis: is atypical MUC1 bearing Tn antigen a receptor of VVA? *Breast Cancer Res Treat*. 2006 Jul;98(1):31-43. Epub 2006 Jun 5.
- Kawaguchi T, Takazawa H, Imai S, Morimoto J, Watanabe T. Lack of polymorphism in MUC1 tandem repeats in cancer cells is related to breast cancer progression in Japanese women. *Breast Cancer Res Treat*. 2005 Aug;92(3):223-30.
- Kawaguchi T. Adhesion molecules and carbohydrates in cancer metastasis. *Rinsho Byori*. 1996 Dec;44(12):1138-46.
- Kawamura YJ, Tokumitsu A, Mizokami K, Sasaki J, Tsujinaka S, Konishi F. First alert for recurrence during follow-up after potentially curative resection for colorectal carcinoma: CA 19-9 should be included in surveillance programs. *Clin Colorectal Cancer*. 2010 Jan;9(1):48-51.
- Kawazuma Y, Tanaka H, Tsukuma H, Ajiki W, Oshima A. Improvement of survival over time for colon cancer patients by anatomical sub-sites. *Jpn J Cancer Res*. 1999 Jul;90(7):705-10.
- Kievit J, van de Velde CJ. Utility and cost of carcinoembryonic antigen monitoring in colon cancer follow-up evaluation. A Markov analysis. *Cancer*. 1990 Jun 1;65(11):2580-7.
- Kim JC, Koo KH, Kim BS, Park KC, Bicknell DC, Bodmer WF. Carcino-embryonic antigen may function as a chemo-attractant in colorectal-carcinoma cell lines. *Int J Cancer*. 1999 Sep 9;82(6):880-5
- Kim JC, Roh SA, Lee KH, Namgung H, Kim JR, Kim JS. Genetic and pathologic changes associated with lymphovascular invasion of colorectal adenocarcinoma. *Clin Exp Metastasis*. 2005;22(5):421-8.

- Kim YJ, Varki. A Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj J*. 1997 Aug;14(5):569-76. Review.
- Kim YS, Gum J Jr, Brockhausen I. Mucin glycoproteins in neoplasia. *Glycoconj J*. 1996 Oct;13(5):693-707. Review.
- Kim YS, Yuan M, Itzkowitz SH, Sun QB, Kaizu T, Palekar A, Trump BF, Hakomori S. Expression of LeY and extended LeY blood group-related antigens in human malignant, premalignant, and nonmalignant colonic tissues. *Cancer Res*. 1986 Nov;46(11):5985-92.
- Kimura T, Tanaka S, Haruma K, Sumii K, Kajiyama G, Shimamoto F, Kohno N. Clinical significance of MUC1 and E-cadherin expression, cellular proliferation, and angiogenesis at the deepest invasive portion of colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2000 Jan;16(1):55-64.
- Kirchhoff T, Satagopan JM, Kauff ND, Huang H, Kolachana P, Palmer C, Rapaport H, Nafa K, Ellis NA, Offit K. Frequency of BRCA1 and BRCA2 mutations in unselected Ashkenazi Jewish patients with colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Jan 7;96(1):68-70.
- Kiriya K, Watanabe T, Sakamoto J, Ito K, Akiyama S, Yamauchi M, Takagi H. Expression and clinical significance of type-1 blood group antigens (Lea, Leb, CA19-9) in colorectal cancer--comparison with CEA. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*. 1991 Mar;92(3):320-30
- Kishikawa T, Ghazizadeh M, Sasaki Y, Springer GF. Specific role of T and Tn tumor-associated antigens in adhesion between a human breast carcinoma cell line and a normal human breast epithelial cell line. *Jpn J Cancer Res*. 1999 Mar;90(3):326-32
- Kitamura H, Yonezawa S, Tanaka S, Kim YS, Sato E. Expression of mucin carbohydrates and core proteins in carcinomas of the ampulla of Vater: their relationship to prognosis. *Jpn J Cancer Res*. 1996 Jun;87(6):631-40.
- Kitamura K, Stockert E, Garin-Chesa P, Welt S, Lloyd KO, Armour KL, Wallace TP, Harris WJ, Carr FJ, Old LJ. Specificity analysis of blood group Lewis-y (Le(y)) antibodies generated against synthetic and natural Le(y) determinants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Dec 20;91(26):12957-61.

- Klein S, Wolfe RR. Whole-body lipolysis and triglyceride-fatty acid cycling in cachectic patients with esophageal cancer. *J Clin Invest*. 1990 Nov;86(5):1403-8.
- Klinkspoor JH, Mok KS, Van Klinken BJ, Tytgat GN, Lee SP, Groen AK. Mucin secretion by the human colon cell line LS174T is regulated by bile salts. *Glycobiology*. 1999 Jan;9(1):13-9.
- Knudson, Alfred G. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proceeding of the National Academy of Science of United States of America*. 68 (1971): 820-823.
- Kobayashi I, Semba S, Matsuda Y, Kuroda Y, Yokozaki H. Significance of Akt phosphorylation on tumor growth and vascular endothelial growth factor expression in human gastric carcinoma. *Pathobiology*. 2006;73(1):8-17.
- Kobayashi K, Sakamoto J, Kito T, Yamamura Y, Koshikawa T, Fujita M, Watanabe T, Nakazato H. Lewis blood group-related antigen expression in normal gastric epithelium, intestinal metaplasia, gastric adenoma, and gastric carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 1993 Jun;88(6):919-24.
- Kobayashi M, Honma T, Matsuda Y, Suzuki Y, Narisawa R, Ajioka Y, Asakura H. Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2000 May;82(10):1689-93.
- Koblyka D, Carraway KL. Proteins and glycoproteins of the milk fat globule membrane. *Biochim Biophys Acta*. 1972; 288: 282.
- Kocer B, McKolanis J, Soran A. Humoral immune response to MUC5AC in patients with colorectal polyps and colorectal carcinoma. *BMC Gastroenterol*. 2006 Jan 12;6:4.
- Kocer B, Soran A, Erdogan S, Karabeyoglu M, Yildirim O, Eroglu A, Bozkurt B, Cengiz O. Expression of MUC5AC in colorectal carcinoma and relationship with prognosis. *Pathol Int*. 2002 Jul;52(7):470-7.
- Kocer B, Soran A, Kiyak G, Erdogan S, Eroglu A, Bozkurt B, Solak C, Cengiz O. Prognostic significance of mucin expression in gastric carcinoma. *Dig Dis Sci*. 2004 Jun;49(6):954-64
- Koch M, Kienle P, Kastrati D, Antolovic D, Schmidt J, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M, Weitz J. Prognostic impact of hematogenous tumor cell dissemination in

- pacientes with stage II colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2006 Jun 15;118(12):3072-7. Erratum in: *Int J Cancer*. 2006 Nov 1;119(9):2245.
- Kodama H, Suzuki M, Katayose Y, Shinoda M, Sakurai N, Takemura S, Yoshida H, Saeki H, Ichiyama M, Tsumoto K, Asano R, Kumagai I, Imai K, Hinoda Y, Matsuno S, Kudo T. Mutated SEA-D227A-conjugated antibodies greatly enhance antitumor activity against MUC1-expressing bile duct carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2001 Dec;50(10):539-48.
  - Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256(5517):495-7.
  - Kokkonen N, Ulibarri IF, Kauppila A, Luosujärvi H, Rivinoja A, Pospiech H, Kellokumpu I, Kellokumpu S. Hypoxia upregulates carcinoembryonic antigen expression in cancer cells. *Int J Cancer*. 2007 Dec 1;121(11):2443-50.
  - Kondo K, Kohno N, Yokoyama A, Hiwada K. Decreased MUC1 expression induces E-cadherin-mediated cell adhesion of breast cancer cell lines. *Decreased MUC1 expression induces E-cadherin-mediated cell adhesion of breast cancer cell lines. Cancer Res*. 1998 May 1;58(9):2014-9.
  - Konno A, Hoshino Y, Terashima S, Motoki R, Kawaguchi T. Carbohydrate expression profile of colorectal cancer cells is relevant to metastatic pattern and prognosis. *Clin Exp Metastasis*. 2002;19(1):61-70
  - Konska G, Guerry M, Caldefie-Chezet F, De Latour M, Guillot J. Study of the expression of Tn antigen in different types of human breast cancer cells using VVA-B4 lectin. *Oncol Rep*. 2006 Feb;15(2):305-10.
  - Koprowski H, Brockhaus M, Blaszczyk M, Magnani J, Steplewski Z, Ginsburg V. Lewis blood-type may affect the incidence of gastrointestinal cancer. *Lancet*. 1982 Jun 12;1(8285):1332-3.
  - Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D, Fuhrer P. Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet*. 1979 Nov;5(6):957-71.
  - Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC<sup>-/-</sup> colon carcinoma. *Science*. 1997 Mar 21;275(5307):1784-7.

- Kotera Y, Fontenot JD, Pecher G, Metzgar RS, Finn OJ. Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic, and colon cancer patients. *Cancer Res.* 1994 Jun 1;54(11):2856-60.
- Kruschewski M, Runkel N, Buhr HJ. Radical resection in obstructing colorectal carcinomas. *Int J Colorectal Dis.* 1998;13(5-6):247-50.
- Krzystek-Korpaczka M, Matusiewicz M, Diakowska D, Grabowski K, Blachut K, Kustrzeba-Wojcicka I, Banas T. Impact of weight loss on circulating IL-1, IL-6, IL-8, TNF-alpha, VEGF-A, VEGF-C and midkine in gastroesophageal cancer patients. *Clin Biochem.* 2007 Dec;40(18):1353-60. Epub 2007 Aug 10.
- Kune GA, Kune S, Watson LF. Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations, and medications: case control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study. *Cancer Res.* 1988 Aug 1;48(15):4399-404.
- Kuroki M, Arakawa F, Yamamoto H, Shimura H, Ikehara Y, Matsuoka Y. Active production and membrane anchoring of carcinoembryonic antigen observed in normal colon mucosa. *Cancer Lett.* 1988 Dec 1;43(1-2):151-7.
- Kurtenkov O, Klaamas K, Rittenhouse-Olson K, Vahter L, Sergejev B, Miljukhina L, Shljapnikova L. IgG immune response to tumor-associated carbohydrate antigens (TF, Tn, alphaGal) in patients with breast cancer: impact of neoadjuvant chemotherapy and relation to the survival. *Exp Oncol.* 2005 Jun;27(2):136-40.
- Lagautrière F, Valvano L, Chaazi M, Benchimol D, Bernard JL, Bourgeon A, Richelme H. Prognostic factors in colorectal adenocarcinoma. *Ann Ital Chir.* 1998 Jul-Aug;69(4):491-6; discussion 496-7.
- Lagergren J, Ye W, Ekblom A. Intestinal cancer after cholecystectomy: is bile involved in carcinogenesis? *Gastroenterology.* 2001 Sep;121(3):542-7.
- Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, Oddoux C, Ostrer H, Giardiello FM, Hamilton SR, Hampel H, Markowitz A, Klimstra D, Jhanwar S, Winawer S, Offit K, Luce MC, Kinzler KW, Vogelstein B. Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nat Genet.* 1997 Sep;17(1):79-83.
- Lan MS, Batra SK, Qi WN, Metzgar RS, Hollingsworth MA. Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA. *Cancer Res.* 1990 May 15;50(10):2997-3001.

- Lan MS, Khorrami A, Kaufman B, Metzgar RS. Molecular characterization of a mucin-type antigen associated with human pancreatic cancer. The DU-PAN-2 antigen. *J Biol Chem*. 1987 Sep 15;262(26):12863-70.
- Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. Dietary carbohydrate, glycemic index, and glycemic load in relation to risk of colorectal cancer in women. *Am J Epidemiol*. 2007 Feb 1;165(3):256-61. Epub 2006 Nov 21.
- Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Nov 16;97(22):1679-87.
- Lau SK, Weiss LM, Chu PG. Differential expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in carcinomas of various sites: an immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol*. 2004 Jul;122(1):61-9.
- Laurie JA, Moertel CG, Fleming TR, Wieand HS, Leigh JE, Rubin J, McCormack GW, Gerstner JB, Krook JE, Malliard J. Surgical adjuvant therapy of large-bowel carcinoma: an evaluation of levamisole and the combination of levamisole and fluorouracil. The North Central Cancer Treatment Group and the Mayo Clinic. *J Clin Oncol*. 1989 Oct;7(10):1447-56.
- Le Roith D, Parrizas M, Blakesley VA. The insulin-like growth factor-I receptor and apoptosis. Implications for the aging process. *Endocrine*. 1997 Aug;7(1):103-5
- Le Voyer T, Sigurdson E, Hanlon A, et al. Colon cancer survival is associated with increasing number of lymphnodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089. *J Clin Oncol* 2003;21:2912–9.
- Lee SJ, Kim JG, Sohn SK, Chae YS, Moon JH, Kang BW, Park JS, Park JY, Choi GS. No association of the hypoxia-inducible factor-1alpha gene polymorphisms with survival in patients with colorectal cancer. *Med Oncol*. 2010 Jul 16.
- Legaspi A, Jeevanandam M, Starnes HF Jr, Brennan MF. Whole body lipid and energy metabolism in the cancer patient. *Metabolism*. 1987 Oct;36(10):958-63.
- Legrier ME, de Pinieux G, Boyé K, Arvelo F, Judde JG, Fontaine JJ, Bara J, Poupon MF. Mucinous differentiation features associated with hormonal escape in a human prostate cancer xenograft. *Br J Cancer*. 2004 Feb 9;90(3):720-7.

- Lelouard H, Reggio H, Roy C, Sahuquet A, Mangeat P, Montcourrier P. Glycocalyx on rabbit intestinal M cells displays carbohydrate epitopes from Muc2. *Infect Immun*. 2001 Feb;69(2):1061-71.
- Leroy X, Zini L, Leteurtre E, Zerimech F, Porchet N, Aubert JP, Gosselin B, Copin MC. Morphologic subtyping of papillary renal cell carcinoma: correlation with prognosis and differential expression of MUC1 between the two subtypes. *Mod Pathol*. 2002 Nov;15(11):1126-30.
- Lesuffleur T, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A. Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res*. 1990 Oct 1;50(19):6334-43.
- Lesuffleur T, Barbat A, Luccioni C, Beaumatin J, Clair M, Kornowski A, Dussaulx E, Dutrillaux B, Zweibaum A. Dihydrofolate reductase gene amplification-associated shift of differentiation in methotrexate-adapted HT-29 cells. *J Cell Biol*. 1991 Dec;115(5):1409-18.
- Lesuffleur T, Kornowski A, Augeron C, Dussaulx E, Barbat A, Laboisie C, Zweibaum A. Increased growth adaptability to 5-fluorouracil and methotrexate of HT-29 subpopulations selected for their commitment to differentiation. *Int J Cancer*. 1991 Nov 11;49(5):731-7.
- Lesuffleur T, Porchet N, Aubert JP, Swallow D, Gum JR, Kim YS, Real FX, Zweibaum A. Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. *J Cell Sci*. 1993 Nov;106 ( Pt 3):771-83.
- Lesuffleur T, Violette S, Vasile-Pandrea I, Dussaulx E, Barbat A, Muleris M, Zweibaum A. Resistance to high concentrations of methotrexate and 5-fluorouracil of differentiated HT-29 colon-cancer cells is restricted to cells of enterocytic phenotype. *Int J Cancer*. 1998 May 4;76(3):383-92.
- Leteurtre E, Gouyer V, Rousseau K, Moreau O, Barbat A, Swallow D, Huet G, Lesuffleur T. Differential mucin expression in colon carcinoma HT-29 clones with variable resistance to 5-fluorouracil and methotrexate. *Biol Cell*. 2004 Mar;96(2):145-51.



- Levy M, Visokai V, Lipska L, Topolcan O. Tumor markers in staging and prognosis of colorectal carcinoma. *Neoplasma*. 2008;55(2):138-42.
- Li A, Goto M, Horinouchi M, Tanaka S, Imai K, Kim YS, Sato E, Yonezawa S. Expression of MUC1 and MUC2 mucins and relationship with cell proliferative activity in human colorectal neoplasia. *Pathol Int*. 2001 Nov;51(11):853-60.
- Li Q, Anver MR, Li Z, Butcher DO, Gildersleeve JC. GalNAc $\alpha$ 1-3Gal, a new prognostic marker for cervical cancer. *Int J Cancer*. 2010 Jan 15;126(2):459-68.
- Li Y, Bharti A, Chen D, Gong J, Kufe D. Interaction of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  with the DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen and beta-catenin. *Mol Cell Biol*. 1998 Dec;18(12):7216-24.
- Li Y, Kuwahara H, Ren J, Wen G, Kufe D. The c-Src tyrosine kinase regulates signaling of the human DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen with GSK3 $\beta$  and beta-catenin. *J Biol Chem*. 2001 Mar 2;276(9):6061-4. Epub 2001 Jan 10.
- Li YY, Chang JW, Hsieh LL, Yeh KY. Neutralization of interleukin (IL)-10 released by monocytes/macrophages enhances the up-regulatory effect of monocyte/macrophage-derived IL-6 on expressions of IL-6 and MUC1, and migration in HT-29 colon cancer cells. *Cell Immunol*. 2010;265(2):164-71. Epub 2010 Sep 18.
- Li YY, Hsieh LL, Tang RP, Liao SK, Yeh KY. Macrophage-derived interleukin-6 up-regulates MUC1, but down-regulates MUC2 expression in the human colon cancer HT-29 cell line. *Cell Immunol*. 2009;256(1-2):19-26. Epub 2009 Feb 7
- Ligtenberg MJ, Buijs F, Vos HL, Hilkens J. Suppression of cellular aggregation by high levels of episialin. *Cancer Res*. 1992 Apr 15;52(8):2318-24.
- Ligtenberg MJ, Vos HL, Gennissen AM, Hilkens J. Episialin, a carcinoma-associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini. *J Biol Chem*. 1990 Apr 5;265(10):5573-8.
- Lim SB, Yu CS, Jang SJ, Kim TW, Kim JH, Kim JC. Prognostic significance of lymphovascular invasion in sporadic colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2010 Apr;53(4):377-84.
- Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol*. 2001 Sep;3(9):802-8.

- Lindmark G, Bergström R, Pålman L, Glimelius B. The association of preoperative serum tumour markers with Dukes' stage and survival in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 1995 May;71(5):1090-4.
- Lipponen P, Papinaho S, Eskelinen M, Klemi PJ, Aaltomaa S, Kosma VM, Marin S, Syrjänen K. DNA ploidy, S-phase fraction and mitotic indices as prognostic predictors of female breast cancer. *Anticancer Res*. 1992 Sep-Oct;12(5):1533-8.
- Liu B, Nicolaidis NC, Markowitz S, Willson JK, Parsons RE, Jen J, Papadopolous N, Peltomäki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet*. 1995 Jan;9(1):48-55.
- Lloyd KO, Kabat EA, Layug EJ, Gruezo F. Immunochemical studies on blood groups. XXXIV. Structures of some oligosaccharides produced by alkaline degradation of blood group A, B, and H substances. *Biochemistry*. 1966 May;5(5):1489-501.
- Lloyd KO, Kabat EA, Rosenfield RE. Immunochemical studies on blood groups. XXXV. The activity of fucose-containing oligosaccharides isolated from blood group A, B, and H substances by alkaline degradation. *Biochemistry*. 1966 May;5(5):1502-7.
- Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr. ASCO ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Nov 20;24(33):5313-27. Epub 2006 Oct 23.
- Lo-Man R, Bay S, Vichier-Guerre S, Dériaud E, Cantacuzène D, Leclerc C. A fully synthetic immunogen carrying a carcinoma-associated carbohydrate for active specific immunotherapy. *Cancer Res*. 1999 Apr 1;59(7):1520-4.
- Lo-Man R, Vichier-Guerre S, Bay S, Dériaud E, Cantacuzène D, Leclerc C. Anti-tumor immunity provided by a synthetic multiple antigenic glycopeptide displaying a tri-Tn glycotope. *J Immunol*. 2001 Feb 15;166(4):2849-54.
- Longman RJ, Douthwaite J, Sylvester PA, O'Leary D, Warren BF, Corfield AP, Thomas MG. Lack of mucin MUC5AC field change expression associated with tubulovillous and villous colorectal adenomas. *J Clin Pathol*. 2000 Feb;53(2):100-4.

- Longnecker MP, Orza MJ, Adams ME, Vioque J, Chalmers TC. A meta-analysis of alcoholic beverage consumption in relation to risk of colorectal cancer. *Cancer Causes Control*. 1990 Jul;1(1):59-68.
- Lorenzi M, Vindigni C, Minacci C, Tripodi SA, Iroatulam A, Petrioli R, Francini G. Histopathological and prognostic evaluation of immunohistochemical findings in colorectal cancer. *Int J Biol Markers*. 1997 Apr-Jun;12(2):68-74.
- Lowe JB, Stoolman LM, Nair RP, Larsen RD, Berhend TL, Marks RM. ELAM-1--dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA. *Cell*. 1990 Nov 2;63(3):475-84.
- Lugli A, Zlobec I, Baker K, Minoo P, Tornillo L, Terracciano L, Jass JR. Prognostic significance of mucins in colorectal cancer with different DNA mismatch-repair status. *J Clin Pathol*. 2007 May;60(5):534-9. Epub 2006 Jun 30.
- Ma J, Giovannucci E, Pollak M, Stampfer M. RESPONSE: Re: Prospective Study of Colorectal Cancer Risk in Men and Plasma Levels of Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I and IGF-Binding Protein-3. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Dec 1;91(23):2052.
- Ma J, Pollak MN, Giovannucci E, Chan JM, Tao Y, Hennekens CH, Stampfer MJ. Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Apr 7;91(7):620-5.
- Macdonald JS. Carcinoembryonic antigen screening: pros and cons. *Semin Oncol*. 1999 Oct;26(5):556-60. Review.
- Machtens S. The History of Endocrine Therapy of Benign and Malignant Diseases of the Prostate. *World Journal of Urology*. 18 (2000): 222-226.
- Madbouly KM, Senagore AJ, Mukerjee A, Delaney CP, Connor J, Fazio VW. Does immunostaining effectively upstage colorectal cancer by identifying micrometastatic nodal disease? *Int J Colorectal Dis*. 2007 Jan;22(1):39-48. Epub 2006 Mar 10.
- Magnani JL, Brockhaus M, Smith DF, Ginsburg V. Detection of glycolipid ligands by direct binding of carbohydrate-binding proteins to thin-layer chromatograms. *Methods Enzymol*. 1982;83:235-41.
- Maher PA. Identification and characterization of a novel, intracellular isoform of fibroblast growth factor receptor-1(FGFR-1). *J Cell Physiol*. 1996 Nov;169(2):380-90.

- Mahmoud NN, Dannenberg AJ, Bilinski RT, Mestre JR, Chadburn A, Churchill M, Martucci C, Bertagnolli MM. Administration of an unconjugated bile acid increases duodenal tumors in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis*. 1999 Feb;20(2):299-303
- Maire F, Hammel P, Terris B, Olschwang S, O'Toole D, Sauvanet A, Palazzo L, Ponsot P, Laplane B, Lévy P, Ruzsniwski P. Intraductal papillary and mucinous pancreatic tumour: a new extracolonic tumour in familial adenomatous polyposis. *Gut*. 2002 Sep;51(3):446-9.
- Majuri ML, Mattila P, Renkonen R. Recombinant E-selectin-protein mediates tumor cell adhesion via sialyl-Le(a) and sialyl-Le(x). *Biochem Biophys Res Commun*. 1992 Feb 14;182(3):1376-82.
- Malý P, Thall A, Petryniak B, Rogers CE, Smith PL, Marks RM, Kelly RJ, Gersten KM, Cheng G, Saunders TL, Camper SA, Camphausen RT, Sullivan FX, Isogai Y, Hindsgaul O, von Andrian UH, Lowe JB. The alpha(1,3)fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell*. 1996 Aug 23;86(4):643-53.
- Mamazza J, Gordon PH. The changing distribution of large intestinal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1982 Sep;25(6):558-62.
- Manne U, Weiss HL, Grizzle WE. Racial differences in the prognostic usefulness of MUC1 and MUC2 in colorectal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*. 2000 Oct;6(10):4017-25.
- Marcial MA, González A, Ramos Ruiz E. Colorectal carcinoma: a pathologic and immunopathologic study. *P R Health Sci J*. 1993 Sep;12(3):183-7.
- Mariette C, Piessen G, Leteurtre E, Hémon B, Triboulet JP, Van Seuningen I. Activation of MUC1 mucin expression by bile acids in human esophageal adenocarcinomatous cells and tissues is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase. *Surgery*. 2008 Jan;143(1):58-71.
- Martin EW Jr, Cooperman M, Carey LC, Minton JP. Sixty second-look procedures indicated primarily by rise in serial carcinoembryonic antigen. *J Surg Res*. 1980 May;28(5):389-94.

- Martínez ME, McPherson RS, Annegers JF, Levin B. Association of diet and colorectal adenomatous polyps: dietary fiber, calcium, and total fat. *Epidemiology*. 1996 May;7(3):264-8.
- Marx JL. Cancer Gene Research Wins Medicine Nobel. *Science*. 246 (1989): 326-327.
- Másaki Y, Oka M, Ogura Y, Ueno T, Nishihara K, Tangoku A, Takahashi M, Yamamoto M, Irimura T. Sialylated MUC1 mucin expression in normal pancreas, benign pancreatic lesions, and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Hepatology*. 1999 Jul-Aug;46(28):2240-5.
- Matsui T, Kojima H, Suzuki H, Hamajima H, Nakazato H, Ito K, Nakao A, Sakamoto J. Sialyl Lewis x expression as a predictor of the prognosis of colon carcinoma patients in a prospective randomized clinical trial. *Jpn J Clin Oncol*. 2004 Oct;34(10):588-93.
- Matsukita S, Nomoto M, Kitajima S, Tanaka S, Goto M, Irimura T, Kim YS, Sato E, Yonezawa S. Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6) in mucinous carcinoma of the breast: comparison with invasive ductal carcinoma. *Histopathology*. 2003 Jan;42(1):26-36.
- Matsumoto H, Muramatsu H, Shimotakahara T, Yanagi M, Nishijima H, Mitani N, Baba K, Muramatsu T, Shimazu H. Correlation of expression of ABH blood group carbohydrate antigens with metastatic potential in human lung carcinomas. *Cancer*. 1993 Jul 1;72(1):75-81.
- Matsushita Y, Cleary KR, Ota DM, Hoff SD, Irimura T. Sialyl-dimeric Lewis-X antigen expressed on mucin-like glycoproteins in colorectal cancer metastases. *Lab Invest*. 1990 Dec;63(6):780-91.
- Matsushita Y, Hoff SD, Nudelman ED, Otake M, Hakomori S, Ota DM, Cleary KR, Irimura T. Metastatic behavior and cell surface properties of HT-29 human colon carcinoma variant cells selected for their differential expression of sialyl-dimeric Le(x)-antigen. *Clin Exp Metastasis*. 1991 May-Jun;9(3):283-99.
- Matsushita Y, Nakamori S, Seftor EA, Hendrix MJ, Irimura T. Human colon carcinoma cells with increased invasive capacity obtained by selection for sialyl-dimeric LeX antigen. *Exp Cell Res*. 1991 Sep;196(1):20-5.

- Mayer D, Shukla A, Enzmann H. Proliferative effects of insulin analogues on mammary epithelial cells. *Arch Physiol Biochem*. 2008 Feb;114(1):38-44.
- McAuley JL, Linden SK, Png CW, King RM, Pennington HL, Gendler SJ, Florin TH, Hill GR, Korolik V, McGuckin MA. MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection. *J Clin Invest*. 2007 Aug;117(8):2313-24.
- McCall JL, Black RB, Rich CA, Harvey JR, Baker RA, Watts JM, Toouli J. The value of serum carcinoembryonic antigen in predicting recurrent disease following curative resection of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1994 Sep;37(9):875-81
- McCool DJ, Forstner JF, Forstner GG. Regulated and unregulated pathways for MUC2 mucin secretion in human colonic LS180 adenocarcinoma cells are distinct. *Biochem J*. 1995 Nov 15;312 ( Pt 1):125-33.
- McCool DJ, Forstner JF, Forstner GG. Synthesis and secretion of mucin by the human colonic tumour cell line LS180. *Biochem J*. 1994 Aug 15;302 ( Pt 1):111-8.
- Medina M, Vélez D, Asenjo JA, Egea G, Real FX, Gil J, Subiza JL. Human colon adenocarcinomas express a MUC1-associated novel carbohydrate epitope on core mucin glycans defined by a monoclonal antibody (A10) raised against murine Ehrlich tumor cells. *Cancer Res*. 1999 Mar 1;59(5):1061-70.
- Mehdi SA, Tatum AH, Newman NB, Gamble GP, Ezzell JE, Weidner N, Kern JA, Sorscher SM, Kohman LJ, Graziano SL. Prognostic markers in resected stage I and II non small-cell lung cancer: an analysis of 260 patients with 5 year follow-up. *Clin Lung Cancer*. 1999 Aug;1(1):59-67; discussion 68-9
- Meichenin M, Rocher J, Galanina O, Bovin N, Nifantev N, Sherman A, Cassagnau E, Heymann MF, Bara J, Fraser RH, Le Pendu J. Tk, a new colon tumor-associated antigen resulting from altered O-glycosylation. *Cancer Res*. 2000 Oct 1;60(19):5499-507.
- Meling GI, Rognum TO, Clausen OP, Børmer O, Lunde OC, Schlichting E, Grüner OP, Hognestad J, Trondsen E, Havig O, et al. Serum carcinoembryonic antigen in relation to survival, DNA ploidy pattern, and recurrent disease in 406 colorectal carcinoma patients. *Scand J Gastroenterol*. 1992 Dec;27(12):1061-8.

- Mercer PM, Reid FD, Harrison M, Bates T. The relationship between cholecystectomy, unoperated gallstone disease, and colorectal cancer. A necropsy study. *Scand J Gastroenterol.* 1995 Oct;30(10):1017-20.
- Merlo GR, Siddiqui J, Cropp CS, Liscia DS, Lidereau R, Callahan R, Kufe DW. Frequent alteration of the DF3 tumor-associated antigen gene in primary human breast carcinomas. *Cancer Res.* 1989 Dec 15;49(24 Pt 1):6966-71
- Metzgar RS, Gaillard MT, Levine SJ, Tuck FL, Bossen EH, Borowitz MJ. Antigens of human pancreatic adenocarcinoma cells defined by murine monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 1982 Feb;42(2):601-8.
- Meyerhardt JA, Mayer RJ. Follow-up strategies after curative resection of colorectal cancer. *Semin Oncol.* 2003 Jun;30(3):349-60. Review.
- Michelassi F, Ayala JJ, Balestracci T, Goldberg R, Chappell R, Block GE. Verification of a new clinicopathologic staging system for colorectal adenocarcinoma. *Ann Surg.* 1991 Jul;214(1):11-8.
- Michelassi F, Ayala JJ, Balestracci T, Goldberg R, Chappell R, Block GE. Verification of a new clinicopathologic staging system for colorectal adenocarcinoma. *Ann Surg.* 1991 Jul;214(1):11-8.
- Milstein C. From the structure of antibodies to diversification of the immune system. *EMBO J* 1985; 4: 1083-92.
- Minsky BD, Mies C, Recht A, Rich TA, Chaffey JT. Resectable adenocarcinoma of the rectosigmoid and rectum. II. The influence of blood vessel invasion. *Cancer.* 1988 Apr 1;61(7):1417-24.
- Minsky BD, Mies C, Rich TA, Recht A, Chaffey JT. Colloid carcinoma of the colon and rectum. *Cancer.* 1987 Dec 15;60(12):3103-12.
- Minsky BD, Mies C, Rich TA, Recht A. Lymphatic vessel invasion is an independent prognostic factor for survival in colorectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1989 Aug;17(2):311-8.
- Minsky BD. Clinicopathologic impact of colloid in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum.* 1990 Aug;33(8):714-9. Review.
- Mitry E, Douillard JY, Van Cutsem E, Cunningham D, Magherini E, Mery-Mignard D, Awad L, Rougier P. Predictive factors of survival in patients with advanced colorectal

- cancer: an individual data analysis of 602 patients included in irinotecan phase III trials. *Ann Oncol*. 2004 Jul;15(7):1013-7.
- Miyake M, Hakomori SI. A specific cell surface glycoconjugate controlling cell motility: evidence by functional monoclonal antibodies that inhibit cell motility and tumor cell metastasis. *Biochemistry*. 1991 Apr 2;30(13):3328-34.
  - Miyake M, Taki T, Hitomi S, Hakomori S. Correlation of expression of H/Le(y)/Le(b) antigens with survival in patients with carcinoma of the lung. *N Engl J Med*. 1992 Jul 2;327(1):14-8.
  - Miyake M, Zenita K, Tanaka O, Okada Y, Kannagi R. Stage-specific expression of SSEA-1-related antigens in the developing lung of human embryos and its relation to the distribution of these antigens in lung cancers. *Cancer Res*. 1988 Dec 15;48(24 Pt 1):7150-8.
  - Mizoguchi A, Takasaki S, Maeda S, Kobata A. Changes in asparagine-linked sugar chains of human promyelocytic leukemic cells (HL-60) during monocytoid differentiation and myeloid differentiation. Decrease of high-molecular-weight oligosaccharides in acidic fraction *J Biol Chem*. 1984 Oct 10;259(19):11949-57.
  - Mizoshita T, Tsukamoto T, Inada KI, Hirano N, Tajika M, Nakamura T, Ban H, Tatematsu M. Loss of MUC2 expression correlates with progression along the adenoma-carcinoma sequence pathway as well as de novo carcinogenesis in the colon. *Histol Histopathol*. 2007 Mar;22(3):251-60.
  - Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen CM, Ungerleider JS, Emerson WA, Tormey DC, Glick JH, Veeder MH, Mailliard JA. Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: a final report. *Ann Intern Med*. 1995 Mar 1;122(5):321-6.
  - Moertel CG, O'Fallon JR, Go VL, O'Connell MJ, Thynne GS. The preoperative carcinoembryonic antigen test in the diagnosis, staging, and prognosis of colorectal cancer. *Cancer*. 1986 Aug 1;58(3):603-10.
  - Molavi D, Argani P. Distinguishing benign dissecting mucin (stromal mucin pools) from invasive mucinous carcinoma. *Adv Anat Pathol*. 2008 Jan;15(1):1-17. Review.



- Moniaux N, Escande F, Porchet N, Aubert JP, Batra SK. Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci.* 2001 Oct 1;6:D1192-206. Review.
- Moore HC, Haller DG. Adjuvant therapy of colon cancer. *Semin Oncol.* 1999 Oct;26(5):545-55. Review.
- Morales-Gutiérrez C, Vegh I, Colina F, Gómez-Cámara A, Ignacio Landa J, Ballesteros D, Carreira PE, Enríquez-De-Salamanca R. Survival of patients with colorectal carcinoma: possible prognostic value of tissular carbohydrate antigen 19.9 determination. *Cancer.* 1999 Nov 1;86(9):1675-81
- Morales-Gutiérrez C, Vegh I, Colina F, Gómez-Cámara A, Ignacio Landa J, Ballesteros D, Carreira PE, Enríquez-De-Salamanca R. Survival of patients with colorectal carcinoma: possible prognostic value of tissular carbohydrate antigen 19.9 determination. *Cancer.* 1999 Nov 1;86(9):1675-81.
- Mordoh J, Leis S, Bravo AI, Podhajcer OL, Ballare C, Capurro M, Kairiyama C, Bover L. Description of a new monoclonal antibody, FC-2.15, reactive with human breast cancer and other human neoplasias. *Int J Biol Markers.* 1994 Jul-Sep;9(3):125-34.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science.* 1997 Mar 21;275(5307):1787-90.
- Morton, Leslie T., and Moore, Robert J. A. *Chronology of Medicine and Related Sciences.* Aldershot, England: Scholar Press, 1997.
- Mossmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells. Different patterns of lymphokine secretion leads to different functional properties. *Ann Rev Immunol* 1989; 7: 145-73.
- Mukherjee P, Pathangey LB, Bradley JB, Tinder TL, Basu GD, Akporiaye ET, Gendler SJ. MUC1-specific immune therapy generates a strong anti-tumor response in a MUC1-tolerant colon cancer model. *Vaccine.* 2007 Feb 19;25(9):1607-18. Epub 2006 Nov 16.
- Mulcahy HE, Skelly MM, Husain A, O'Donoghue DP. Long-term outcome following curative surgery for malignant large bowel obstruction. *Br J Surg.* 1996 Jan;83(1):46-50

- Müller S, Goletz S, Packer N, Gooley A, Lawson AM, Hanisch FG. Localization of O-glycosylation sites on glycopeptide fragments from lactation-associated MUC1. All putative sites within the tandem repeat are glycosylation targets in vivo. *J Biol Chem.* 1997 Oct 3;272(40):24780-93.
- Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P. Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Mar 28;92(7):3046-50.
- Murata K, Egami H, Shibata Y, Sakamoto K, Misumi A, Ogawa M. Expression of blood group-related antigens, ABH, Lewis(a), Lewis(b), Lewis(x), Lewis(y), CA19-9, and CSLEX1 in early cancer, intestinal metaplasia, and uninvolved mucosa of the stomach. *Am J Clin Pathol.* 1992 Jul;98(1):67-75.
- Muroi K, Suda T, Nojiri H, Ema H, Amemiya Y, Miura Y, Nakauchi H, Singhal A, Hakomori S. Reactivity profiles of leukemic myeloblasts with monoclonal antibodies directed to sialosyl-Le(x) and other lacto-series type 2 chain antigens: absence of reactivity with normal hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 1992 Feb 1;79(3):713-9.
- Murphy RA, Wilke MS, Perrine M, Pawlowicz M, Mourtzakis M, Lieffers JR, Maneshgar M, Bruera E, Clandinin MT, Baracos VE, Mazurak VC. Loss of adipose tissue and plasma phospholipids: relationship to survival in advanced cancer patients. *Clin Nutr.* 2010 Aug;29(4):482-7. Epub 2009 Dec 2.
- Muto T, Bussey HJ, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer.* 1975 Dec;36(6):2251-70.
- Naitoh H, Yazawa S, Asao T, Nakajima T, Nakamura J, Takenoshita S, Nagamachi Y. The recognition of cancer-associated fucosylated antigens in colorectal cancer by a novel monoclonal antibody, YB-2. *Surg Today.* 1994;24(4):382-4.
- Nakagoe T, Fukushima K, Hirota M, Kusano H, Ayabe H, Tomita M, Kamihira S. An immunohistochemical employer monoclonal antibodies against Le(a), sialyl Le(a), Le(x), and sialyl Le(x) antigens in primary colorectal, carcinomas and lymph node and hepatic lesions. *J Gastroenterol.* 1994 Apr;29(2):129-38.
- Nakagoe T, Fukushima K, Hirota M, Kusano H, Ayabe H, Tomita M, Kamihira S. An immunohistochemical study of the distribution of blood group substances and related antigens in primary colorectal carcinomas and metastatic lymph node and liver

- lesions, using monoclonal antibodies against A, B, H type 2, Le(a), and Le(x) antigens. *J Gastroenterol.* 1994 Jun;29(3):265-75.
- Nakagoe T, Fukushima K, Itoyanagi N, Ikuta Y, Oka T, Nagayasu T, Ayabe H, Hara S, Ishikawa H, Minami H. Expression of ABH/Lewis-related antigens as prognostic factors in patients with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2002 May;128(5):257-64. Epub 2002 Mar 9.
  - Nakagoe T, Fukushima K, Nanashima A, Sawai T, Tsuji T, Jibiki M, Yamaguchi H, Yasutake T, Ayabe H, Matuo T, Tagawa Y, Arisawa K. Expression of Lewis(a), sialyl Lewis(a), Lewis(x) and sialyl Lewis(x) antigens as prognostic factors in patients with colorectal cancer. *Can J Gastroenterol.* 2000 Oct;14(9):753-60.
  - Nakagoe T, Sawai T, Tsuji T, Jibiki M, Ohbatake M, Nanashima A, Yamaguchi H, Yasutake T, Ayabe H, Tagawa Y. Differences in release mechanisms and distributions for sialyl Le(a) and sialyl Le(x) antigens in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2000 May;7(4):289-95.
  - Nakagoe T, Sawai T, Tsuji T, Jibiki M, Ohbatake M, Nanashima A, Yamaguchi H, Yasutake T, Ayabe H, Arisawa K. Prognostic value of serum sialyl Lewis(a), sialyl Lewis(x) and sialyl Tn antigens in blood from the tumor drainage vein of colorectal cancer patients. *Tumour Biol.* 2001 Mar-Apr;22(2):115-22.
  - Nakagoe T, Sawai T, Tsuji T, Jibiki MA, Nanashima A, Yamaguchi H, Yasutake T, Kurosaki N, Ayabe H, Arisawa K. Preoperative serum levels of sialyl Lewis(a), sialyl Lewis(x), and sialyl Tn antigens as prognostic markers after curative resection for colorectal cancer. *Cancer Detect Prev.* 2001;25(3):299-308.
  - Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, Furukawa H, Ishikawa O, Sasaki Y, Kabuto T, Iwanaga T, Matsushita Y, Irimura T. Increased expression of sialyl Lewisx antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer Res.* 1993 Aug 1;53(15):3632-7.
  - Nakamori S, Nishihara S, Ikehara Y, Nagano H, Dono K, Sakon M, Narimatsu H, Monden M. Molecular mechanism involved in increased expression of sialyl Lewis antigens in ductal carcinoma of the pancreas. *J Exp Clin Cancer Res.* 1999 Sep;18(3):425-32.

- Nakamori S, Ota DM, Cleary KR, Shirotani K, Irimura T. MUC1 mucin expression as a marker of progression and metastasis of human colorectal carcinoma. *Gastroenterology*. 1994 Feb;106(2):353-61.
- Nakamura H, Hinoda Y, Nakagawa N, Makiguchi Y, Itoh F, Endo T, Imai K. Detection of circulating anti-MUC1 mucin core protein antibodies in patients with colorectal cancer. *J Gastroenterol*. 1998 Jun;33(3):354-61.
- Nakasaki H, Mitomi T, Noto T, Ogoshi K, Hanaue H, Tanaka Y, Makuuchi H, Clausen H, Hakomori S. Mosaicism in the expression of tumor-associated carbohydrate antigens in human colonic and gastric cancers. *Cancer Res*. 1989 Jul 1;49(13):3662-9
- Nakayama T, Watanabe M, Katsumata T, Teramoto T, Kitajima M. Expression of sialyl Lewis(a) as a new prognostic factor for patients with advanced colorectal carcinoma. *Cancer*. 1995 Apr 15;75(8):2051-6.
- Nakayama T, Watanabe M, Teramoto T, Kitajima M. CA19-9 as a predictor of recurrence in patients with colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 1997 Dec;66(4):238-43
- Nakayama T, Watanabe M, Teramoto T, Kitajima M. Slope analysis of CA19-9 and CEA for predicting recurrence in colorectal cancer patients. *Anticancer Res*. 1997 Mar-Apr;17(2B):1379-82.
- Narita T, Funahashi H, Satoh Y, Watanabe T, Sakamoto J, Takagi H. Association of expression of blood group-related carbohydrate antigens with prognosis in breast cancer. *Cancer*. 1993 May 15;71(10):3044-53.
- Narita T, Watanabe T, Funahashi H, Kawakami-Kimura N, Kannagi R. Biological malignant potential and carbohydrate antigens in breast cancer.] *Nippon Geka Gakkai Zasshi*. 1996 Feb;97(2):172-6. Review.
- Nazato DM, Matos LL, Waisberg DR, Souza JR, Martins LC, Waisberg J. Prognostic value of carcinoembryonic antigen distribution in tumor tissue of colorectal carcinoma. *Arq Gastroenterol*. 2009 Jan-Mar;46(1):26-31
- Newland RC, Dent OF, Lyttle MN, Chapuis PH, Bokey EL. Pathologic determinants of survival associated with colorectal cancer with lymph node metastases. A multivariate analysis of 579 patients. *Cancer*. 1994 Apr 15;73(8):2076-82.

- Newmark HL, Lipkin M, Maheshwari N. Colonic hyperplasia and hyperproliferation induced by a nutritional stress diet with four components of Western-style diet. *J Natl Cancer Inst.* 1990 Mar 21;82(6):491-6.
- Newmark HL, Yang K, Kurihara N, Fan K, Augenlicht LH, Lipkin M. Western-style diet-induced colonic tumors and their modulation by calcium and vitamin D in C57Bl/6 mice: a preclinical model for human sporadic colon cancer. *Carcinogenesis.* 2009 Jan;30(1):88-92. Epub 2008 Nov 18.
- Nicolson GL. Cancer metastasis. Organ colonization and the cell-surface properties of malignant cells. *Biochim Biophys Acta.* 1982 Dec 21;695(2):113-76. Review.
- Niell BL, Rennert G, Bonner JD, Almog R, Tomsho LP, Gruber SB. BRCA1 and BRCA2 founder mutations and the risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Jan 7;96(1):15-21.
- Nilsen TI, Vatten LJ. Prospective study of colorectal cancer risk and physical activity, diabetes, blood glucose and BMI: exploring the hyperinsulinaemia hypothesis. *Br J Cancer.* 2001 Feb 2;84(3):417-22.
- Nissan A, Guillem JG, Paty PB, Wong WD, Cohen AM. Signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum: a matched control study. *Dis Colon Rectum.* 1999 Sep;42(9):1176-80.
- Niv Y, Kim YS. Effect of serum in the growth medium on mucin synthesis by colon cancer cell line. *Isr J Med Sci.* 1995 Oct;31(10):600-3.
- Niv Y. MUC1 and colorectal cancer pathophysiology considerations. *World J Gastroenterol.* 2008 April 14; 14(14): 2139–2141
- Nomura H, Mai M. Enhanced expression of CA19-9 in mucinous gastric carcinoma. *Am J Gastroenterol.* 1997 Dec;92(12):2331-2.
- Norwood MG, Bailey N, Nanji M, Gillies RS, Nicholson A, Ubhi S, Darnton JJ, Steyn RS, Womack C, Hughes A, Hemingway D, Harrison R, Waters R, Jankowski JA. Cytoplasmic beta-catenin accumulation is a good prognostic marker in upper and lower gastrointestinal adenocarcinomas. *Histopathology.* 2010 Jul;57(1):101-11. Epub 2010 Jun 21.

- Nozoe T, Rikimaru T, Mori E, Okuyama T, Takahashi I. Increase in both CEA and CA19-9 in sera is an independent prognostic indicator in colorectal carcinoma. *J Surg Oncol*. 2006 Aug 1;94(2):132-7
- Numahata K, Satoh M, Handa K, Saito S, Ohyama C, Ito A, Takahashi T, Hoshi S, Orikasa S, Hakomori SI. Sialosyl-Le(x) expression defines invasive and metastatic properties of bladder carcinoma. *Cancer*. 2002 Feb 1;94(3):673-85.
- 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 Oct 6;96(19):1420-5.
- O'Connell JB, Maggard MA, Liu JH, Etzioni DA, Ko CY. A report card on outcomes for surgically treated gastrointestinal cancers: are we improving? *J Surg Res*. 2004 Oct;121(2):214-21.
- O'Connell MJ, Mailliard JA, Kahn MJ, Macdonald JS, Haller DG, Mayer RJ, Wieand HS. Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. *J Clin Oncol*. 1997 Jan;15(1):246-50.
- Ogawa H, Ghazizadeh M, Araki T. Tn and sialyl-Tn antigens as potential prognostic markers in human ovarian carcinoma. *Gynecol Obstet Invest*. 1996;41(4):278-83.
- Ogawa J, Inoue H, Koide S. Expression of alpha-1,3-fucosyltransferase type IV and VII genes is related to poor prognosis in lung cancer. *Cancer Res*. 1996 Jan 15;56(2):325-9.
- Ogawa J, Sano A, Inoue H, Koide S. Expression of Lewis-related antigen and prognosis in stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 1995 Feb;59(2):412-5.
- Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Kraft P, Loda M, Fuchs CS. Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample. *J Mol Diagn*. 2007 Jul;9(3):305-14
- Ohana-Malka O, Benharroch D, Isakov N, Prinsloo I, Shubinsky G, Sacks M, Gopas J. Selectins and anti-CD15 (Lewis x/a) antibodies transmit activation signals in Hodgkin's lymphoma-derived cell lines. *Exp Hematol*. 2003 Nov;31(11):1057-65.

- Olding LB, Thurin J, Svalander C, Koprowski H. Expression of gastrointestinal carcinoma-associated antigen (GICA) detected in human fetal tissues by monoclonal antibody NS-19-9. *Int J Cancer*. 1984 Aug 15;34(2):187-92.
- Ono M, Sakamoto M, Ino Y, Moriya Y, Sugihara K, Muto T, Hirohashi S. Cancer cell morphology at the invasive front and expression of cell adhesion-related carbohydrate in the primary lesion of patients with colorectal carcinoma with liver metastasis. *Cancer*. 1996 Sep 15;78(6):1179-86.
- Onodera M, Nishigami T, Torii I, Sato A, Tao LH, Kataoka TR, Yoshikawa R, Tsujimura T. Comparison between colorectal low- and high-grade mucinous adenocarcinoma with MUC1 and MUC5AC. *World J Gastrointest Oncol*. 2009 Oct 15;1(1):69-73.
- Orntoft TF, Holmes EH, Johnson P, Hakomori S, Clausen H. Differential tissue expression of the Lewis blood group antigens: enzymatic, immunohistologic, and immunochemical evidence for Lewis a and b antigen expression in Le(a-b-) individuals. *Blood*. 1991 Mar 15;77(6):1389-96
- Orntoft TF, Vestergaard EM. Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Electrophoresis*. 1999 Feb;20(2):362-71. Review.
- Osako M, Yonezawa S, Siddiki B, Huang J, Ho JJ, Kim YS, Sato E. Immunohistochemical study of mucin carbohydrates and core proteins in human pancreatic tumors. *Cancer*. 1993 Apr 1;71(7):2191-9.
- Osinaga E, Bay S, Tello D, Babino A, Pritsch O, Assemat K, Cantacuzene D, Nakada H, Alzari P. Analysis of the fine specificity of Tn-binding proteins using synthetic glycopeptide epitopes and a biosensor based on surface plasmon resonance spectroscopy. *FEBS Lett*. 2000 Mar 3;469(1):24-8.
- Oudard S, Rixe O, Beuselinck B, Linassier C, Banu E, Machiels JP, Baudard M, Ringeisen F, Velu T, Lefrere-Belda MA, Limacher JM, Fridman WH, Azizi M, Acres B, Tartour E. A phase II study of the cancer vaccine TG4010 alone and in combination with cytokines in patients with metastatic renal clear-cell carcinoma: clinical and immunological findings. *Cancer Immunol Immunother*. 2011 Feb;60(2):261-71. Epub 2010 Nov 11.

- Pancione M, Forte N, Fucci A, Sabatino L, Febbraro A, Di Blasi A, Daniele B, Parente D, Colantuoni V. Prognostic role of beta-catenin and p53 expression in the metastatic progression of sporadic colorectal cancer. *Hum Pathol.* 2010 Jun;41(6):867-76. Epub 2010 Feb 4
- Pantel K, Cote RJ, Fodsyad O. Detection and Clinical Importance of Micrometastatic Disease. *Journal of the National Cancer Institute.* 91 (1999): 1113-1124.
- Park IJ, Choi GS, Jun SH. Prognostic value of serum tumor antigen CA19-9 after curative resection of colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2009 Oct;29(10):4303-8
- Park YJ, Park KJ, Park JG, Lee KU, Choe KJ, Kim JP. Prognostic factors in 2230 Korean colorectal cancer patients: analysis of consecutively operated cases. *World J Surg.* 1999 Jul;23(7):721-6.
- Park YJ, Youk EG, Choi HS, Han SU, Park KJ, Lee KU, Choe KJ, Park JG. Experience of 1446 rectal cancer patients in Korea and analysis of prognostic factors. *Int J Colorectal Dis.* 1999 Apr;14(2):101-6.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. *CA A Cancer Journal for Clinicians* 2005;74-108.
- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 1999 Jan-Feb;49(1):33-64
- Pasqualini CD, Nepomnaschy I, Piazzon I. Inmunología de la relación materno-fetal. *Medicina (Buenos Aires)* 1990; 50: 369-73.
- Pasqualini CD. Cuatro décadas de oncohematología ex experimental. *Bol Acad Nac Med* 1998; 76: 429-44.
- Pasqualini CD. La etiología del cáncer. *Medicina (Buenos Aires)* 2003; 63: 757-60.
- Pasqualini CD. Visión retrospectiva de la inmunidad tumoral. *Medicina (Buenos Aires)* 1996; 56(Supl I):3-12.
- Paulson. ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science.* 1990 Nov 23;250(4984):1130-2.
- Pedersen A, Johansen C, Grønbaek M. Relations between amount and type of alcohol and colon and rectal cancer in a Danish population based cohort study. *Gut.* 2003 Jun;52(6):861-7.



- Peifer M. Cancer, catenins, and cuticle pattern: a complex connection. *Science*. 1993 Dec 10;262(5140):1667-8.
- Peifer M. Regulating cell proliferation: as easy as APC. *Science*. 1996 May 17;272(5264):974-5. Review.
- Perçinel S, Savaş B, Ensari A, Kuzu I, Kuzu MA, Bektaş M, Cetinkaya H, Kurşun N. Mucins in the colorectal neoplastic spectrum with reference to conventional and serrated adenomas. *Turk J Gastroenterol*. 2007 Dec;18(4):230-8.
- Perez RO, Bresciani BH, Bresciani C, Proscurshim I, Kiss D, Gama-Rodrigues J, Pereira DD, Rawet V, Cecconello I, Habr-Gama A. Mucinous colorectal adenocarcinoma: influence of mucin expression (Muc1, 2 and 5) on clinico-pathological features and prognosis. *Int J Colorectal Dis*. 2008 Aug;23(8):757-65. Epub 2008 May 6.
- Petersen S, Freitag M, Hellmich G, Ludwig K. Anastomotic leakage: impact on local recurrence and survival in surgery of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 1998;13(4):160-3.
- Petersen VC, Baxter KJ, Love SB, Shepherd NA. Identification of objective pathological prognostic determinants and models of prognosis in Dukes' B colon cancer. *Gut*. 2002 Jul;51(1):65-9.
- Petrarca C, Casalino B, von Mensdorff-Pouilly S, Rughetti A, Rahimi H, Scambia G, Hilgers J, Frati L, Nuti M. Isolation of MUC1-primed B lymphocytes from tumour-draining lymph nodes by immunomagnetic beads. *Cancer Immunol Immunother*. 1999 Jan;47(5):272-7.
- Petrarca C, Rughetti A, Rahimi H, D'Agostini F, Turchi V, Apollonj Ghetti C, Scambia G, Frati L, Nuti M. Human antibodies against the polymorphic epithelial mucin in ovarian cancer patients recognise a novel sequence in the tandem repeat region. *Eur J Cancer*. 1996 Nov;32A(12):2155-63.
- Petrasch S, Schmiegel W. Adjuvant therapy of colon carcinoma: results of two Intergroup Studies (INT-0035 and INT-0089), a study by the German Cancer Aid 17-1A Study Group and the IMPACT Study] *Z Gastroenterol*. 1997 Jan;35(1):49-52.

- Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FC, Perez M, Singhal AK, Hakomori S, Paulson JC. ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science*. 1990 Nov 23;250(4984):1130-2
- Pierce A, Saldova R, Abd Hamid UM, Abrahams JL, McDermott EW, Evoy D, Duffy MJ, Rudd PM. Levels of specific glycans significantly distinguish lymph node-positive from lymph node-negative breast cancer patients. *Glycobiology*. 2010 Oct;20(10):1283-8. Epub 2010 Jun 24.
- Pierre M, Bertrand N, Najib B, Jean-Louis L, Robert R. The influence of different components of a polymer hydrogel in the the fixation and liberation of an active ingredient] *Pharm Acta Helv*. 1987;62(7):197-208.
- Pietinen P, Malila N, Virtanen M, Hartman TJ, Tangrea JA, Albanes D, Virtamo J. Diet and risk of colorectal cancer in a cohort of Finnish men. *Cancer Causes Control*. 1999 Oct;10(5):387-96.
- Pigman W, Moschera J, Weiss M, Tettamanti G. The occurrence of repetitive glycopeptides sequences in bovine submaxillary glycoprotein. *Eur J Biochem*. 1973 Jan 3;32(1):148-54.
- Pigny P, Guyonnet-Duperat V, Hill AS, Pratt WS, Galiegue-Zouitina S, d'Hooge MC, Laine A, Van-Seuningen I, Degand P, Gum JR, Kim YS, Swallow DM, Aubert JP, Porchet N. Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes. *Genomics*. 1996 Dec 15;38(3):340-52.
- Pigny P, Van Seuningen I, Desseyn JL, Nollet S, Porchet N, Laine A, Aubert JP. Identification of a 42-kDa nuclear factor (NF1-MUC5B) from HT-29 MTX cells that binds to the 3' region of human mucin gene MUC5B. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Mar 7;220(1):186-91.
- Piller F, Piller V, Fox RI, Fukuda M. Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. *J Biol Chem*. 1988 Oct 15;263(29):15146-50.
- Pinho S, Marcos NT, Ferreira B, Carvalho AS, Oliveira MJ, Santos-Silva F, Harduin-Lepers A, Reis CA. Biological significance of cancer-associated sialyl-Tn antigen: modulation of malignant phenotype in gastric carcinoma cells. *Cancer Lett*. 2007 May 8;249(2):157-70. Epub 2006 Sep 11.

- Polissar L, Sim D, Francis A. Survival of colorectal cancer patients in relation to duration of symptoms and other prognostic factors. *Dis Colon Rectum*. 1981 Jul-Aug;24(5):364-9.
- Pollheimer MJ, Kornprat P, Pollheimer VS, Lindtner RA, Schlemmer A, Rehak P, Langner C. Clinical significance of pT sub-classification in surgical pathology of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2010 Feb;25(2):187-96. Epub 2009 Oct 9.
- Ponz de Leon M, Sassatelli R, Benatti P, Roncucci L. Identification of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the general population. The 6-year experience of a population-based registry. *Cancer*. 1993 Jun 1;71(11):3493-501.
- Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 2005 Jan 20;23(3):609-18. Review.
- Popat S, Matakidou A, Houlston RS. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2004 Feb 1;22(3):529-36.
- Porchet N, Pigny P, Buisine MP, Debailleul V, Degand P, Laine A, Aubert JP. Human mucin genes: genomic organization and expression of MUC4, MUC5AC and MUC5B. *Biochem Soc Trans*. 1995 Nov;23(4):800-5.
- Porschen R, Bermann A, Löffler T, Haack G, Rettig K, Anger Y, Strohmeyer G; Arbeitsgemeinschaft Gastrointestinale Onkologie. Fluorouracil plus leucovorin as effective adjuvant chemotherapy in curatively resected stage III colon cancer: results of the trial adjCCA-01. *J Clin Oncol*. 2001 Mar 15;19(6):1787-94.
- Powell AA, LaRue JM, Batta AK, Martinez JD. Bile acid hydrophobicity is correlated with induction of apoptosis and/or growth arrest in HCT116 cells. *Biochem J*. 2001 Jun 1;356(Pt 2):481-6.
- Prehn RT, Prehn LM. Immunostimulation of cancer versus immunosurveillance. *Medicina (Buenos Aires)* 1996; 56 (Supl I): 65-73.
- Price MR; Pugh JA, Hudecz F; Griffiths W; Jacobs E; Symonds IM; Clarke AJ; WC Chan and Baldwin RW. C595 - a monoclonal antibody against the protein core of human urinary epithelial mucin commonly expressed in breast carcinomas. *Br J Cancer*. 1990; 61: 681-686.

- Psathakis D, Schiedeck TH, Krug F, Oevermann E, Kujath P, Bruch HP. Ordinary colorectal adenocarcinoma vs. primary colorectal signet-ring cell carcinoma: study matched for age, gender, grade, and stage *Dis Colon Rectum*. 1999 Dec;42(12):1618-25.
- Qiu LX, Mao C, Zhang J, Zhu XD, Liao RY, Xue K, Li J, Chen Q. Predictive and prognostic value of KRAS mutations in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab: a meta-analysis of 22 studies. *Eur J Cancer*. 2010 Oct;46(15):2781-7. Epub 2010 Jun 25. Review.
- Quasar Collaborative Group, Gray R, Barnwell J, McConkey C, Hills RK, Williams NS, Kerr DJ. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet*. 2007 Dec 15;370(9604):2020-9.
- Quentmeier A, Möller P, Schwarz V, Abel U, Schlag P. Carcinoembryonic antigen, CA 19-9, and CA 125 in normal and carcinomatous human colorectal tissue. *Cancer*. 1987 Nov 1;60(9):2261-6.
- Quin RJ, McGuckin MA. Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the MUC1 mucin correlates with changes in cell-cell adhesion. *Int J Cancer*. 2000 Aug 15;87(4):499-506.
- Ragupathi G. Carbohydrate antigens as targets for active specific immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 1996 Nov;43(3):152-7. Review.
- Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status *Nature*. 2002 Aug 29;418(6901):934.
- Raju, TN. The Nobel Chronicles. *The Lancet*. 352 (1998) 1635. PMID: 9843145.
- Rampazzo E, Bertorelle R, Serra L, Terrin L, Candiotti C, Pucciarelli S, Del Bianco P, Nitti D, De Rossi A. Relationship between telomere shortening, genetic instability, and site of tumour origin in colorectal cancers. *Br J Cancer*. 2010 Apr 13;102(8):1300-5.
- Reddy BS, Watanabe K, Weisburger JH, Wynder EL. Promoting effect of bile acids in colon carcinogenesis in germ-free and conventional F344 rats. *Cancer Res*. 1977 Sep;37(9):3238-42

- Reddy BS. Dietary fat and colon cancer: animal model studies. *Lipids*. 1992 Oct;27(10):807-13. Review.
- Regimbald LH, Pilarski LM, Longenecker BM, Reddish MA, Zimmermann G, Hugh JC. The breast mucin MUC1 as a novel adhesion ligand for endothelial intercellular adhesion molecule 1 in breast cancer. *Cancer Res*. 1996 Sep 15;56(18):4244-9.
- Regimbald LH, Pilarski LM, Longenecker BM, Reddish MA, Zimmermann G, Hugh JC. The breast mucin MUC1 as a novel adhesion ligand for endothelial intercellular adhesion molecule 1 in breast cancer. *Cancer Res*. 1996 Sep 15;56(18):4244-9.
- Reis CA, David L, Nielsen PA, Clausen H, Mirgorodskaya K, Roepstorff P, Sobrinho-Simões M. Immunohistochemical study of MUC5AC expression in human gastric carcinomas using a novel monoclonal antibody. *Int J Cancer*. 1997 Feb 20;74(1):112-21.
- Reis CA, Hassan H, Bennett EP, Clausen H. Characterization of a panel of monoclonal antibodies using GalNAc glycosylated peptides and recombinant MUC1. *Tumour Biol*. 1998;19 Suppl 1:127-33.
- Ren J, Agata N, Chen D, Li Y, Yu WH, Huang L, Raina D, Chen W, Kharbanda S, Kufe D. Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents. *Cancer Cell*. 2004 Feb;5(2):163-75.
- Ren JQ, Zhou ZW, Wan DS, Lu ZH, Chen G, Wang GQ, Tang SX, Wang JJ. Univariate and multivariate regression analyses of recurrence and metastasis of colon cancer after radical resection. *Ai Zheng*. 2006 May;25(5):591-5.
- Renkonen J, Paavonen T, Renkonen R. Endothelial and epithelial expression of sialyl Lewis(x) and sialyl Lewis(a) in lesions of breast carcinoma. *Int J Cancer*. 1997 Jun 20;74(3):296-300.
- Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, Tu D, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer *N Engl J Med*. 2003 Jul 17;349(3):247-57.
- Richards ER, Devine PL, Quin RJ, Fontenot JD, Ward BG, McGuckin MA. Antibodies reactive with the protein core of MUC1 mucin are present in ovarian cancer patients and healthy women. *Cancer Immunol Immunother*. 1998 Jul;46(5):245-52.

- Riddell RH, Levin B. Ultrastructure of the "transitional" mucosa adjacent to large bowel carcinoma. *Cancer*. 1977 Nov;40(5 Suppl):2509-22.
- Ridge JP, Fuchs EJ, Matzinger P. Neonatal tolerance revisited: Turning on newborn T cells with dendritic cells. *Science* 1996; 271: 1723-6.
- Rieger A, Wahren B. CEA levels at recurrence and metastases; importance for detecting secondary disease. *Scand J Gastroenterol*. 1975;10(8):869-74.
- Ries LA, Wingo PA, Miller DS, Howe HL, Weir HK, Rosenberg HM, Vernon SW, Cronin K, Edwards BK. The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer. *Cancer*. 2000 May 15;88(10):2398-424.
- Rizzatti EG, Portieres FL, Martins SL, Rego EM, Zago MA, Falcão RP. Microgranular and t(11;17)/PLZF-RARalpha variants of acute promyelocytic leukemia also present the flow cytometric pattern of CD13, CD34, and CD15 expression characteristic of PML-RARalpha gene rearrangement. *Am J Hematol*. 2004 May;76(1):44-51.
- Rognum TO, Heier HE, Orjasaeter H, Thorud E, Brandtzaeg P. Comparison of two CEA assays in primary and recurrent large bowel carcinoma with different DNA ploidy pattern. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1986 Oct;22(10):1165-9.
- Rose DP, Komninou D, Stephenson GD. Obesity, adipocytokines, and insulin resistance in breast cancer. *Obes Rev*. 2004 Aug;5(3):153-65. Review.
- Rosner, Fred. *The Medical Legacy of Moses Maimonides*. Hoboken, NJ: KTAV Publishing House Inc., 1998.
- Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P. Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science*. 1996 May 17;272(5264):1023-6.
- Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Munemitsu S, Polakis P. The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin. *J Biol Chem*. 1995 Mar 10;270(10):5549-55.
- Rughetti A, Turchi V, Ghetti CA, Scambia G, Panici PB, Roncucci G, Mancuso S, Frati L, Nuti M. Human B-cell immune response to the polymorphic epithelial mucin. *Cancer Res*. 1993 Jun 1;53(11):2457-9.

- Rustgi AK. Hereditary gastrointestinal polyposis and nonpolyposis syndromes. *N Engl J Med.* 1994 Dec 22;331(25):1694-702.
- S. Tejpar, F. Bosman, M. Delorenzi, R. Fiocca, P. Yan, D. Klingbiel, D. Dietrich, E. Van Cutsem, R. Labianca, A. Roth. Microsatellite instability (MSI) in stage II and III colon cancer treated with 5FU-LV or 5FU-LV and irinotecan (PETACC 3-EORTC 40993-SAKK 60/00 trial). *J Clin Oncol* 27:15s, 2009 (suppl; abstr 4001)
- Sakamoto S, Watanabe T, Tokumaru T, Takagi H, Nakazato H, Lloyd KO. Expression of Lewisa, Lewisb, Lewisx, Lewisy, sialyl-Lewisa, and sialyl-Lewisx blood group antigens in human gastric carcinoma and in normal gastric tissue. *Cancer Res.* 1989 Feb 1;49(3):745-52.
- Salces I, Vegh I, Rodríguez-Muñoz S, Colina F, Pérez A, Soto S, Sánchez F, de la Cruz J, Solís-Herruzo JA. Tissue CA-19.9 content in colorectal adenomas and its value in the assessment of dysplasia. *Rev Esp Enferm Dig.* 2004 Apr;96(4):246-54
- Salem RR, Wolf BC, Sears HF, Lavin PT, Ravikumar TS, DeCoste D, D'Emilia JC, Herlyn M, Schlom J, Gottlieb LS, et al. Expression of colorectal carcinoma-associated antigens in colonic polyps. *J Surg Res.* 1993 Sep;55(3):249-55
- Samowitz WS, Wolff RK, Ma KN, Andersen K, Caan B, Slattery ML. Polymorphisms in insulin-related genes predispose to specific KRAS2 and TP53 mutations in colon cancer. *Mutat Res.* 2006 Mar 20;595(1-2):117-24.
- Sandler RS, Sandler DP. Radiation-induced cancers of the colon and rectum: assessing the risk. *Gastroenterology.* 1983 Jan;84(1):51-7.
- Sandmaier BM, Oparin DV, Holmberg LA, Reddish MA, MacLean GD, Longenecker BM. Evidence of a cellular immune response against sialyl-Tn in breast and ovarian cancer patients after high-dose chemotherapy, stem cell rescue, and immunization with Theratope STn-KLH cancer vaccine. *J Immunother.* 1999 Jan;22(1):54-66.
- Santisteban AS. Cancer in XXIst century. *Acta Med Per.* 23 (2).2006.
- Sasaki M, Yamato T, Nakanuma Y, Ho SB, Kim YS. Expression of MUC2, MUC5AC and MUC6 apomucins in carcinoma, dysplasia and non-dysplastic epithelia of the gallbladder. *Pathol Int.* 1999 Jan;49(1):38-44.
- Sato H, Maeda K, Sugihara K, Mochizuki H, Kotake K, Teramoto T, Kameoka S, Saito Y, Takahashi K, Hirai T, Ohue M, Shirouzu K, Sakai Y, Watanabe T, Hirata K,

- Hatakeyama K. High-risk stage II colon cancer after curative resection. *J Surg Oncol*. 2011 Mar 17. doi: 10.1002/jso.21914.
- Sato T, Nishimura G, Nonomura A, Miwa K, Miyazaki. Serological studies on CEA, CA 19-9, STn and SLX in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 1999 Mar-Apr;46(26):914-9
  - Sawada T, Ho JJ, Chung YS, Sowa M, Kim YS. E-selectin binding by pancreatic tumor cells is inhibited by cancer sera. *Int J Cancer*. 1994 Jun 15;57(6):901-7.
  - Schachter H. 9th annual symposium on biotechnology: the new biology of carbohydrates. University College London Medical School, 16-17 December 1993. *Glycoconj J*. 1994 Apr;11(2):V-VII.
  - Schena M. Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science*. 270 (1995): 467-470.
  - Schlemper RJ, Itabashi M, Kato Y, Lewin KJ, Riddell RH, Shimoda T, Sipponen P, Stolte M, Watanabe H. Differences in the diagnostic criteria used by Japanese and Western pathologists to diagnose colorectal carcinoma. *Cancer*. 1998 Jan 1;82(1):60-9.
  - Schlepper-Schäfer J, Springer GF. Carcinoma autoantigens T and Tn and their cleavage products interact with Gal/GalNAc-specific receptors on rat Kupffer cells and hepatocytes *Biochim Biophys Acta*. 1989 Oct 9;1013(3):266-72.
  - Schlimok G, Pantel K, Loibner H, Fackler-Schwalbe I, Riethmüller G. Reduction of metastatic carcinoma cells in bone marrow by intravenously administered monoclonal antibody: towards a novel surrogate test to monitor adjuvant therapies of solid tumours. *Eur J Cancer*. 1995 Oct;31A(11):1799-803.
  - Schol DJ, Meulenbroek MF, Snijdwint FG, von Mensdorff-Pouilly S, Verstraeten RA, Murakami F, Kenemans P, Hilgers J. 'Epitope fingerprinting' using overlapping 20-mer peptides of the MUC1 tandem repeat sequence. *Tumour Biol*. 1998;19 Suppl 1:35-45.
  - Schrag D, Rifas-Shiman S, Saltz L, Bach PB, Begg CB. Adjuvant chemotherapy use for Medicare beneficiaries with stage II colon cancer. *J Clin Oncol*. 2002 Oct 1;20(19):3999-4005.



- Schub R, Steinheber FU. Rightward shift of colon cancer. A feature of the aging gut. *J Clin Gastroenterol*. 1986 Dec;8(6):630-4.
- Schutte B, Reynders MM, Wiggers T, Arends JW, Volovics L, Bosman FT, Blijham GH. Retrospective analysis of the prognostic significance of DNA content and proliferative activity in large bowel carcinoma. *Cancer Res*. 1987 Oct 15;47(20):5494-6.
- Sears HF, Herlyn M, Del Villano B, Steplewski Z, Koprowski H. Monoclonal antibody detection of a circulating tumor-associated antigen. II. A longitudinal evaluation of pacientes with colorrectal cancer. *J Clin Immunol*. 1982 Apr;2(2):141-9.
- Secco GB, Fardelli R, Campora E, Lapertosa G, Gentile R, Zoli S, Prior C. Primary mucinous adenocarcinomas and signet-ring cell carcinomas of colon and rectum. *Oncology*. 1994 Jan-Feb;51(1):30-4.
- Segal-Eiras A, Croce MV. Immune complexes in human malignant tumours. A review. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1984 May-Jun;12(3):225-32
- Shaw JH, Wolfe RR. Glucose and urea kinetics in patients with early and advanced gastrointestinal cancer: the response to glucose infusion, parenteral feeding, and surgical resection. *Surgery*. 1987 Feb;101(2):181-91.
- Shekels LL, Lyftogt CT, Ho SB. Bile acid-induced alterations of mucin production in differentiated human colon cancer cell lines. *Int J Biochem Cell Biol*. 1996 Feb;28(2):193-201.
- Shen L, Kondo Y, Rosner GL, Xiao L, Hernandez NS, Vilaythong J, Houlihan PS, Krouse RS, Prasad AR, Einspahr JG, Buckmeier J, Alberts DS, Hamilton SR, Issa JP. MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorrectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Sep 21;97(18):1330-8.
- Shen ZL, Wang S, Ye YJ, Yin MJ, Yang XD, Jiang KW, Liu Y. Study on clinicopathological correlations between metabolic syndrome and colorectal carcinoma. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2008 Apr 1;46(7):537-9.
- Shi ZR, McIntyre LJ, Knowles BB, Solter D, Kim YS. Expression of a carbohydrate differentiation antigen, stage-specific embryonic antigen 1, in human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res*. 1984 Mar;44(3):1142-7.

- Shi ZY, Mcintyre LJ, Knowles BB, Solter D, Kim YS: Expression of carbohydrate antigen stage-specific embryonic antigen 1 in human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1984, 44:1142-1147
- Shibata D, Reale MA, Lavin P, Silverman M, Fearon ER, Steele G Jr, Jessup JM, Loda M, Summerhayes IC. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 1996 Dec 5;335(23):1727-32.
- Shimizu M, Yamauchi K. Isolation and characterization of mucin-like glycoprotein in human milk fat globule membrane. *J Biochem (Tokyo)*. 1982 Feb;91(2):515-24.
- Shimizu N, Nagata C, Shimizu H, Kametani M, Takeyama N, Ohnuma T, Matsushita S. Height, weight, and alcohol consumption in relation to the risk of colorectal cancer in Japan: a prospective study. *Br J Cancer*. 2003 Apr 7;88(7):1038-43
- Shimkin MB. *Contrary to Nature*. Monograph. Bethesda: National Institutes of Health, 1977.
- Shimodaira K, Nakayama J, Nakamura N, Hasebe O, Katsuyama T, Fukuda M. Carcinoma-associated expression of core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase gene in human colorectal cancer: role of O-glycans in tumor progression. *Cancer Res*. 1997 Dec 1;57(23):5201-6.
- Shimono R, Mori M, Akazawa K, Adachi Y, Sgimachi K. Immunohistochemical expression of carbohydrate antigen 19-9 in colorectal carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 1994 Jan;89(1):101-5.
- Shin SK, Nagasaka T, Jung BH, Matsubara N, Kim WH, Carethers JM, Boland CR, Goel A. Epigenetic and genetic alterations in Netrin-1 receptors UNC5C and DCC in human colon cancer. *Gastroenterology*. 2007 Dec;133(6):1849-57. Epub 2007 Sep 5.
- Shoreibah MG, Hindsgaul O, Pierce M. Purification and characterization of rat kidney UDP-N-acetylglucosamine: alpha-6-D-mannoside beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase *J Biol Chem*. 1992 Feb 15;267(5):2920-7.
- Silzle T, Randolph GJ, Kreutz M, Kunz-Schughart LA. The fibroblast: sentinel cell and local immune modulation in tumor tissue. *Int J Cancer* 2004; 108: 173-80.
- Singhal A, Fohn M, Hakomori S. Induction of alpha-N-acetylgalactosamine-O-serine/threonine (Tn) antigen-mediated cellular immune response for active immunotherapy in mice. *Cancer Res*. 1991 Mar 1;51(5):1406-11.

- Singhal AK, Orntoft TF, Nudelman E, Nance S, Schibig L, Stroud MR, Clausen H, Hakomori S. Profiles of Lewisx-containing glycoproteins and glycolipids in sera of patients with adenocarcinoma. *Cancer Res.* 1990 Mar 1;50(5):1375-80.
- Sinicrope FA, Foster NR, Sargent DJ, O'Connell MJ, Rankin C. Obesity is an independent prognostic variable in colon cancer survivors. *Clin Cancer Res.* 2010 Mar 15;16(6):1884-93. Epub 2010 Mar 9
- Sinicrope FA, Hart J, Hsu HA, Lemoine M, Michelassi F, Stephens LC. Apoptotic and mitotic indices predict survival rates in lymph node-negative colon carcinomas. *Clin Cancer Res.* 1999 Jul;5(7):1793-804.
- Sirica AE. Cholangiocarcinoma: molecular targeting strategies for chemoprevention and therapy. *Hepatology.* 2005 Jan;41(1):5-15. Review.
- Siriwardana RC, Wijesuriya SR, Kumarage SK, Deen KI. Synchronous liver metastasis in colorectal cancer in Sri Lanka. *Indian J Gastroenterol.* 2010 Jul;29(4):149-51. Epub 2010 Aug 26.
- Slater G, Papatestas AE, Aufses AH Jr. Preoperative carcinoembryonic antigen levels in colorectal carcinoma. *Arch Surg.* 1979 Jan;114(1):52-3.
- Sloane JP, Ormerod MG, Imrie SF, Coombes RC. The use of antisera to epithelial membrane antigen in detecting micrometastases in histological sections. *Br J Cancer.* 1980 Sep;42(3):392-8.
- Smith RE, Colangelo L, Wieand HS, Begovic M, Wolmark N. Randomized trial of adjuvant therapy in colon carcinoma: 10-year results of NSABP protocol C-01. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Aug 4;96(15):1128-32.
- Smorodinsky N, Weiss M, Hartmann ML, Baruch A, Harness E, Yaakovovitz M, Keydar I, Wreschner DH. Detection of a secreted MUC1/SEC protein by MUC1 isoform specific monoclonal antibodies. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Nov 1;228(1):115-21.
- Snijdewint FG, von Mensdorff-Pouilly S, Karuntu-Wanamarta AH, Verstraeten AA, van Zanten-Przybysz I, Hummel P, Nijman HW, Kenemans P, Hilgers J. Cellular and humoral immune responses to MUC1 mucin and tandem-repeat peptides in ovarian cancer patients and controls. *Cancer Immunol Immunother.* 1999 Apr;48(1):47-55.

- Song S, Byrd JC, Koo JS, Bresalier RS. Bile acids induce MUC2 overexpression in human colon carcinoma cells. *Cancer*. 2005 Apr 15;103(8):1606-14.
- Speights VO, Johnson MW, Stoltenberg PH, Rappaport ES, Helbert B, Riggs M. Colorectal cancer: current trends in initial clinical manifestations. *South Med J*. 1991 May;84(5):575-8.
- Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*. 2002 Apr;12(4):43R-56R. Review.
- Spooncer E, Fukuda M, Klock JC, Oates JE, Dell A. Isolation and characterization of polyfucosylated lactosaminoglycan from human granulocytes. *J Biol Chem*. 1984 Apr 25;259(8):4792-801.
- Springer GF. T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science*. 1984 Jun 15;224(4654):1198-206.
- Springer GF, Fry WA, Desai PR, Semerdjian RA, Tegtmeyer H, Neybert CG, Scanlon EF. Further studies on the detection of early lung and breast carcinoma by T antigen. *Cancer Detect Prev*. 1985;8(1-2):95-100.
- Springer GF. Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *J Mol Med*. 1997 Aug;75(8):594-602. Review.
- Springer GF. Tn and T blood group precursor antigens are universal, clonal, epithelial cell-adhesive, autoimmunogenic carcinoma (CA) markers. *Naturwissenschaften*. 1983 Jul;70(7):369-70.
- Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 1990 Aug 2;346(6283):425-34. Review.
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994 Jan 28;76(2):301-14. Review.
- Spruessel A, Steimann G, Jung M, Lee SA, Carr T, Fentz AK, Spangenberg J, Zornig C, Juhl HH, David KA. Tissue ischemia time affects gene and protein expression patterns within minutes following surgical tumor excision. *Biotechniques*. 2004 Jun;36(6):1030-7.

- Steinberg SM, Barkin JS, Kaplan RS, Stablein DM. Prognostic indicators of colon tumors. The Gastrointestinal Tumor Study Group experience. *Cancer*. 1986 May 1;57(9):1866-70.
- Stern L, Palatsides M, de Kretser T, Ford M. Expression of the tumor-associated mucin MUC1 in an ovarian tumor cell line. *Int J Cancer*. 1992 Mar 12;50(5):783-90.
- Sternberg A, Sibirsky O, Cohen D, Blumenson LE, Petrelli NJ. Validation of a new classification system for curatively resected colorectal adenocarcinoma. *Cancer*. 1999 Sep 1;86(5):782-92.
- Stewart RJ, Stewart AW, Turnbull PR, Isbister WH. Sex differences in subsite incidence of large-bowel cancer. *Dis Colon Rectum*. 1983 Oct;26(10):658-60.
- Stewart RJ, Stewart AW, Turnbull PR, Isbister WH. Sex differences in subsite incidence of large-bowel cancer. *Dis Colon Rectum*. 1983 Oct;26(10):658-60.
- Stillwell AP, Buettner PG, Ho YH. Meta-analysis of survival of patients with stage IV colorectal cancer managed with surgical resection versus chemotherapy alone. *World J Surg*. 2010 Apr;34(4):797-807.
- Stillwell AP, Ho YH, Veitch C. Systematic review of prognostic factors related to overall survival in patients with stage IV colorectal cancer and unresectable metastases. *World J Surg*. 2011 Mar;35(3):684-92.
- Streeter PR, Fortner GW. Immune response to ultraviolet-induced tumors. III. Analysis of cloned lymphocyte populations exhibiting antitumor activity. *Transplantation*. 1988 Aug;46(2):256-60.
- Stürmer T, Glynn RJ, Lee IM, Christen WG, Hennekens CH. Lifetime cigarette smoking and colorectal cancer incidence in the Physicians' Health Study I. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Jul 19;92(14):1178-81.
- Stutman O. Immunodepression and malignancy. *Cancer Res* 1975; 22: 261-422.
- Sugarbaker PH. Carcinoembryonic antigen (CEA) assays in obstructive colorectal cancer. *Ann Surg*. 1976 Dec;184(6):752-7.
- Sugarbaker PH. Role of carcinoembryonic antigen assay in the management of cancer. *Adv Immun Cancer Ther*. 1985;1:167-93. Review.
- Sugiura D, Aida S, Denda-Nagai K, Takeda K, Kamata-Sakurai M, Yagita H, Irimura T. Differential effector mechanisms induced by vaccination with MUC1 DNA in the

- rejection of colon carcinoma growth at orthotopic sites and metastases. *Cancer Sci.* 2008 Dec;99(12):2477-84. Epub 2008 Nov 17.
- Sulitzeanu D. Immunosuppressive factors in human cancer. *Adv Cancer Res.* 1993;60:247-67. Review.
  - Sun J, Thurin J, Cooper HS, Wang P, Mackiewicz M, Stepiewski Z, Blaszczyk-Thurin M. Elevated expression of H type GDP-L-fucose:beta-D-galactoside alpha-2-L-fucosyltransferase is associated with human colon adenocarcinoma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jun 6;92(12):5724-8
  - Suzuki H, Masuda N, Shimura T, Araki K, Kobayashi T, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H. Nuclear beta-catenin expression at the invasive front and in the vessels predicts liver metastasis in colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* 2008 May-Jun;28(3B):1821-30.
  - Suzuki H, Shoda J, Kawamoto T, Shinozaki E, Miyahara N, Hotta S, Iizuka Y, Nakahara A, Tanaka N, Yanaka A, Irimura T. Expression of MUC1 recognized by monoclonal antibody MY.1E12 is a useful biomarker for tumor aggressiveness of advanced colon carcinoma. *Clin Exp Metastasis.* 2004;21(4):321-9.
  - Suzuki M, Ando O, Ohta T, Inufusa H, Adachi T, Yasutomi M, Kurimoto M. High expression of glycosphingolipids involved in procoagulant activity of cancer cells. *Oncol Rep.* 1999 Jan-Feb;6(1):113-5.
  - Suzuki M, Inufusa H, Yamamoto S, Hamada T, Aga M, Ando O, Ohta T, Yasutomi M, Kurimoto M. Le(y) glycolipid acts as a co-factor for tumor procoagulant activity. *Int J Cancer.* 1997 Dec 10;73(6):903-9.
  - Suzuki N, Yamamoto K, Toyoshima S, Osawa T, Irimura T. Molecular cloning and expression of cDNA encoding human macrophage C-type lectin. Its unique carbohydrate binding specificity for Tn antigen. *J Immunol.* 1996 Jan 1;156(1):128-35.
  - Swanson BJ, McDermott KM, Singh PK, Eggers JP, Crocker PR, Hollingsworth MA. MUC1 is a counter-receptor for myelin-associated glycoprotein (Siglec-4a) and their interaction contributes to adhesion in pancreatic cancer perineural invasion. *Cancer Res.* 2007 Nov 1;67(21):10222-9. Erratum in: *Cancer Res.* 2008 Jan 1;68(1):338.

- Swanson RS, Compton CC, Stewart AK, Bland KI. The prognosis of T3N0 colon cancer is dependent on the number of lymph nodes examined. *Ann Surg Oncol*. 2003 Jan-Feb;10(1):65-71.
- Sylvester PA, Myerscough N, Warren BF, Carlstedt I, Corfield AP, Durdey P, Thomás MG. Differential expression of the chromosome 11 mucin genes in colorectal cancer. *J Pathol*. 2001 Oct;195(3):327-35.
- Szpak CA, Johnston WW, Lottich SC, Kufe D, Thor A, Schlom J. Patterns of reactivity of four novel monoclonal antibodies (B72-3, DF3, Bi-1, and B6-2) with cells in human malignant and benign effusions. *Acta Cytol* 1984, 28:356-367.
- Taal BG, Van Tinteren H, Zoetmulder FA. NACCP group Adjuvant 5FU plus levamisole in colonic or rectal cancer: improved survival in stage II and III. *Br J Cancer*. 2001 Nov 16;85(10):1437-43.
- Tabuchi Y, Deguchi H, Imanishi K, Saitoh Y. Colorectal cancer patients with high risk of hematogenous metastasis: correlation with CEA levels in peripheral and draining venous blood during the period of operation. *J Surg Oncol*. 1991 Jun;47(2):87-91
- Tabuchi Y, Deguchi H, Imanishi K, Saitoh Y. Comparison of carcinoembryonic antigen levels between portal and peripheral blood in patients with colorectal cancer. Correlation with histopathologic variables. *Cancer*. 1987 Apr 1;59(7):1283-8.
- Tabuchi Y, Deguchi H, Saitoh Y. Carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 levels of peripheral and draining venous blood in colorectal cancer patients. Correlation with histopathologic and immunohistochemical variables. *Cancer*. 1988 Oct 15;62(8):1605-13.
- Takabayashi T, Watanabe M, Sakurai Y, Sugano K, Kodaira S, Kitajima M. Western blot analysis of glycoproteins bearing Lewis(a) and sialyl-Lewis(a) antigens in human colorectal mucosa. *J Surg Oncol*. 1993 Oct;54(2):91-7.
- Takada A, Ohmori K, Yoneda T, Tsuyuoka K, Hasegawa A, Kiso M, Kannagi R. Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer Res*. 1993 Jan 15;53(2):354-61.
- Takahashi T, Makiguchi Y, Hinoda Y, Kakiuchi H, Nakagawa N, Imai K, Yachi A. Expression of MUC1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL

- against MUC1 from a multiple myeloma patient. *J Immunol.* 1994 Sep 1;153(5):2102-9.
- Takanori Matsui, Hiroshi Kojima, Harumi Suzuki, Hiroshi Hamajima, Hiroaki Nakazato, Katsuki Ito, Akimasa Nakao and Junichi Sakamoto. Sialyl Lewis<sup>a</sup> Expression as a Predictor of the Prognosis of Colon Carcinoma Patients in a Prospective Randomized Clinical Trial. *Jpn. J. Clin. Oncol.* (2004) 34 (10): 588-593.
  - Takebayashi Y, Aklyama S, Yamada K, Akiba S, Aikou T. Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. *Cancer.* 1996 Jul 15;78(2):226-31
  - Tamada S, Goto M, Nomoto M, Nagata K, Shimizu T, Tanaka S, Sakoda K, Imai K, Yonezawa S. Expression of MUC1 and MUC2 mucins in extrahepatic bile duct carcinomas: its relationship with tumor progression and prognosis. *Pathol Int.* 2002 Nov;52(11):713-23.
  - Tanaka F, Miyahara R, Ohtake Y, Yanagihara K, Fukuse T, Hitomi S, Wada H. Lewis Y antigen expression and postoperative survival in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 1998 Nov;66(5):1745-50.
  - Tanaka S, Haruma K, Tatsuta S, Hiraga Y, Teixeira CR, Shimamoto F, Yoshihara M, Sumii K, Kajiyama G. Proliferating cell nuclear antigen expression correlates with the metastatic potential of submucosal invasive colorectal carcinoma. *Oncology.* 1995 Mar-Apr;52(2):134-9.
  - Tanaka S, Hollingsworth MA, Siddiki B, Kim YS, Sato E. MUC2 gene expression is found in noninvasive tumors but not in invasive tumors of the pancreas and liver: its close relationship with prognosis of the pacientes. *Hum Pathol.* 1997 Mar;28(3):344-52.
  - Tangemann K, Bistrup A, Hemmerich S, Rosen SD. Sulfation of a high endothelial venule-expressed ligand for L-selectin. Effects on tethering and rolling of lymphocytes. *J Exp Med.* 1999 Oct 4;190(7):935-42.
  - Taylor KL, Mall AS, Barnard RA, Ho SB, Cruse JP. Immunohistochemical detection of gastric mucin in normal and disease states. *Oncol Res.* 1998;10(9):465-73.



- Taylor-Papadimitriou J, Millis R, Burchell J, Nash R, Pang L, Gilbert J. Patterns of reaction of monoclonal antibodies HMFG-1 and -2 with benign breast tissues and breast carcinomas. *J Exp Pathol*. 1986 Summer; 2(4):247-60.
- Taylor-Papadimitriou J, Peterson JA, Arklie J, Burchell J, Ceriani RL, Bodmer WF. Monoclonal antibodies to epithelium-specific components of the human milk fat globule membrane: production and reaction with cells in culture. *International Journal Of Cancer. Journal International Du Cancer* 1981; 28(1):17-21.
- Taylor-Papadimitriou J. Immunohistochemical analysis of benign and malignant breast tumours. *Pathol Biol (Paris)*. 1990 Oct;38(8):778
- Taylor-Papadimitriou J. Report on the first international workshop on carcinoma-associated mucins. *Int J Cancer*. 1991 Aug 19;49(1):1-5.
- Tei K, Kawakami-Kimura N, Taguchi O, Kumamoto K, Higashiyama S, Taniguchi N, Toda K, Kawata R, Hisa Y, Kannagi R. Roles of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis induced by cotransplantation of cancer and endothelial cells to nude rats. *Cancer Res*. 2002 Nov 1;62(21):6289-96.
- Teixeira CR, Tanaka S, Haruma K, Yoshihara M, Sumii K, Kajiyama G, Shimamoto F. Carcinoembryonic antigen staining patterns at the invasive tumor margin predict the malignant potential of colorectal carcinoma. *Oncology*. 1994 May-Jun;51(3):228-33
- Teixeira CR, Tanaka S, Haruma K, Yoshihara M, Sumii K, Kajiyama G, Shimamoto F. The clinical significance of the histologic subclassification of colorectal carcinoma. *Clin Lung Cancer*. 1999 Aug;1(1):59-67; discussion 68-9
- Teixeira CR, Tanaka S, Haruma K, Yoshihara M, Sumii K, Kajiyama G, Shimamoto F. Carcinoembryonic antigen staining patterns at the invasive tumor margin predict the malignant potential of colorectal carcinoma. *Oncology*. 1994 May-Jun;51(3):228-33.
- Temin HM. The DNA Provirus Hypothesis. *Science*. 192 (1976): 1075-1080.
- Teng MW, Swann JB, Koebel CM, Schreiber RD, Smyth MJ. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J Leukoc Biol*. 2008 Oct;84(4):988-93. Epub 2008 May 30

- Terasawa K, Furumoto H, Kamada M, Aono T. Expression of Tn and sialyl-Tn antigens in the neoplastic transformation of uterine cervical epithelial cells *Cancer Res.* 1996 May 1;56(9):2229-32.
- The American Cancer Society Inc. *The History of Cancer.* 25 Mar.2002.13-17 June.2005
- Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Feb 2;92(3):205-16.
- Thomás P, Toth CA, Saini KS, Jessup JM, Steele G Jr. The structure, metabolism and function of the carcinoembryonic antigen gene family. *Biochim Biophys Acta.* 1990 Dec 11;1032(2-3):177-89. Review.
- Thompson D, Easton DF. Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Sep 18;94(18):1358-65.
- Thompson JA, Grunert F, Zimmermann W. Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal.* 1991;5(5):344-66. Review.
- Thörn M, Bergström R, Kressner U, Sparén P, Zack M, Ekblom A. Trends in colorectal cancer incidence in Sweden 1959-93 by gender, localization, time period, and birth cohort. *Cancer Causes Control.* 1998 Mar;9(2):145-52.
- Thun MJ, Peto R, Lopez AD, Monaco JH, Henley SJ, Heath CW Jr, Doll R. Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly U.S. adults. *N Engl J Med.* 1997 Dec 11;337(24):1705-14.
- Thurnher M, Rusconi S, Berger EG. Persistent repression of a functional allele can be responsible for galactosyltransferase deficiency in Tn syndrome. *J Clin Invest.* 1993 May;91(5):2103-10.
- Tian N, Moore RS, Braddy S, Rose RA, Gu JW, Hughson MD, Manning RD Jr. Interactions between oxidative stress and inflammation in salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Dec;293(6):H3388-95. Epub 2007 Oct 5.

- Tijerina AJ. The biochemical basis of metabolism in cancer cachexia. *Dimens Crit Care Nurs.* 2004 Nov-Dec;23(6):237-43
- Tisdale MJ. Molecular pathways leading to cancer cachexia. *Physiology (Bethesda).* 2005 Oct;20:340-8. Review.
- Todoroki I, Friedman GD, Slattery ML, Potter JD, Samowitz W. Cholecystectomy and the risk of colon cancer. *Am J Gastroenterol.* 1999 Jan;94(1):41-6.
- Tokunaga N, Kijima H, Noto T, Osamura Y, Sadahiro S, Tajima T, Mitomi T. Immunohistochemical localization of carcinoembryonic antigen as a predictor of lymph node status in submucosa-invasive colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum.* 1995 Aug;38(8):842-7.
- Tol J, Punt CJ. Monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer: a review. *Clin Ther.* 2010 Mar;32(3):437-53. Review.
- Tominaga T, Sakabe T, Koyama Y, Hamano K, Yasutomi M, Takahashi T, Kodaira S, Kato T, Ogawa N. Prognostic factors for patients with colon or rectal carcinoma treated with resection only. Five-year follow-up report. *Cancer.* 1996 Aug 1;78(3):403-8.
- Tsai HL, Chu KS, Huang YH, Su YC, Wu JY, Kuo CH, Chen CW, Wang JY. Predictive factors of early relapse in UICC stage I-III colorectal cancer patients after curative resection. *J Surg Oncol.* 2009 Dec 15;100(8):736-43.
- Tsikitis VL, Malireddy K, Green EA, Christensen B, Whelan R, Hyder J, Marcello P, Larach S, Lauter D, Sargent DJ, Nelson H. Postoperative surveillance recommendations for early stage colon cancer based on results from the clinical outcomes of surgical therapy trial. *J Clin Oncol.* 2009 Aug 1;27(22):3671-6. Epub 2009 Jun 29.
- Tsuchiya A, Kanno M, Kawaguchi T, Endo Y, Zhang GJ, Ohtake T, Kimijima I. Prognostic Relevance of Tn Expression in Breast Cancer. *Breast Cancer.* 1999 Jul 25;6(3):175-180.
- Tsumatori G, Ozeki Y, Takagi K, Ogata T, Tanaka S. Relation between the serum E-selectin level and the survival rate of patients with resected non-small cell lung cancers. *Jpn J Cancer Res.* 1999 Mar;90(3):301-7.

- Tucci GF, Grande M, Stroppa I, Federico F, Farinon AM. Tissue expression of carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9) in adenomatous lesions of the colorectum. *Chir Ital.* 1999 Mar-Apr;51(2):165-72.
- Tytgat KM, Büller HA, Opdam FJ, Kim YS, Einerhand AW, Dekker J. Biosynthesis of human colonic mucin: Muc2 is the prominent secretory mucin. *Gastroenterology.* 1994 Nov;107(5):1352-63
- Udwardia, Farokh Erach. *Man and Medicine: A History.* Oxford University Press, 2000.
- Ueda T, Shimada E, Urakawa T. The clinicopathologic features of serum CA 19-9-positive colorectal cancers. *Surg Today.* 1994;24(6):518-25.
- Uen YH, Lin SR, Wu CH, Hsieh JS, Lu CY, Yu FJ, Huang TJ, Wang JY. Clinical significance of MUC1 and c-Met RT-PCR detection of circulating tumor cells in patients with gastric carcinoma. *Clin Chim Acta.* 2006 May;367(1-2):55-61. Epub 2006 Jan 5.
- Uen YH, Lin SR, Wu DC, Su YC, Wu JY, Cheng TL, Chi CW, Wang JY. Prognostic significance of multiple molecular markers for patients with stage II colorectal cancer undergoing curative resection. *Ann Surg.* 2007 Dec;246(6):1040-6.
- Umar A. Lynch syndrome (HNPCC) and microsatellite instability. *Dis Markers.* 2004;20(4-5):179-80. Review.
- Utsunomiya T, Yonezawa S, Sakamoto H, Kitamura H, Hokita S, Aiko T, Tanaka S, Irimura T, Kim YS, Sato E. Expression of MUC1 and MUC2 mucins in gastric carcinomas: its relationship with the prognosis of the pacientes. *Clin Cancer Res.* 1998 Nov;4(11):2605-14.
- Uygur-Bayramicli O, Dabak R, Orbay E, Dolapcioglu C, Sargin M, Kilicoglu G, Guleryuzlu Y, Mayadagli A. Type 2 diabetes mellitus and CA 19-9 levels. *World J Gastroenterol.* 2007 Oct 28;13(40):5357-9.
- Valizadeh A, Karayiannakis AJ, el-Hariry I, Kmiot W, Pignatelli M. Expression of E-cadherin-associated molecules (alpha-, beta-, and gamma-catenins and p120) in colorrectal polyps. *Am J Pathol.* 1997 Jun;150(6):1977-84.

- van de Wiel-van Kemenade E, Ligtenberg MJ, de Boer AJ, Buijs F, Vos HL, Melief CJ, Hilkens J, Figdor CG. Episialin (MUC1) inhibits cytotoxic lymphocyte-target cell interaction. *J Immunol.* 1993 Jul 15;151(2):767-76.
- van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1998;33(3):151-208. Review.
- van der Schouw YT, Verbeek AL, Wobbles T, Segers MF, Thomás CM. Comparison of four serum tumour markers in the diagnosis of colorectal carcinoma. *Br J Cancer.* 1992 Jul;66(1):148-54.
- van Gisbergen KP, Aarnoudse CA, Meijer GA, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Dendritic cells recognize tumor-specific glycosylation of carcinoembryonic antigen on colorectal cancer cells through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin. *Cancer Res.* 2005 Jul 1;65(13):5935-44.
- van Noord PA. Breast cancer and the brain: a neurodevelopmental hypothesis to explain the opposing effects of caloric deprivation during the Dutch famine of 1944-1945 on breast cancer and its risk factors. *J Nutr.* 2004 Dec;134(12 Suppl):3399S-3406S. Review.
- van Seuningen I, Pigny P, Perrais M, Porchet N, Aubert JP. Transcriptional regulation of the 11p15 mucin genes. Towards new biological tools in human therapy, in inflammatory diseases and cancer? *Front Biosci.* 2001 Oct 1;6:D1216-34. Review.
- Verma M, Davidson EA. MUC1 upregulation by ethanol. *Cancer Biochem Biophys.* 1999 Jul;17(1-2):1-11
- Vesalainen S, Lipponen P, Talja M, Syrjänen K. Mitotic activity and prognosis in prostatic adenocarcinoma. *Prostate.* 1995 Feb;26(2):80-6
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988 Sep 1;319(9):525-32.
- von Mensdorff-Pouilly S, Gourevitch MM, Kenemans P, Verstraeten AA, van Kamp GJ, Kok A, van Uffelen K, Snijdwint FG, Paul MA, Meijer S, Hilgers J. An enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of circulating antibodies to polymorphic epithelial mucin (MUC1). *Tumour Biol.* 1998;19(3):186-95.

- von Mensdorff-Pouilly S, Gourevitch MM, Kenemans P, Verstraeten AA, Litvinov SV, van Kamp GJ, Meijer S, Vermorken J, Hilgers J. Humoral immune response to polymorphic epithelial mucin (MUC-1) in pacientes with benign and malignant breast tumours. *Eur J Cancer*. 1996 Jul;32A(8):1325-31.
- von Mensdorff-Pouilly S, Snijdwint FG, Verstraeten AA, Verheijen RH, Kenemans P. Human MUC1 mucin: a multifaceted glycoprotein. *Int J Biol Markers*. 2000 Oct-Dec;15(4):343-56. Review.
- von Mensdorff-Pouilly S, Verstraeten AA, Kenemans P, Snijdwint FG, Kok A, Van Kamp GJ, Paul MA, Van Diest PJ, Meijer S, Hilgers J. Survival in early breast cancer pacientes is favorably influenced by a natural humoral immune response to polymorphic epithelial mucin. *J Clin Oncol*. 2000 Feb;18(3):574-83.
- Vukasin AP, Ballantyne GH, Flannery JT, Lerner E, Modlin IM. Increasing incidence of cecal and sigmoid carcinoma. Data from the Connecticut Tumor Registry. *Cancer*. 1990 Dec 1;66(11):2442-9.
- Wakabayashi M, Shiro T, Seki T, Nakagawa T, Itoh T, Imamura M, Shiozaki Y, Inoue K, Okamura A. Lewis Y antigen expression in hepatocellular carcinoma. An immunohistochemical study. *Cancer*. 1995 Jun 15;75(12):2827-35.
- Waldock A, Ellis IO, Armitage N, Turner DR, Hardcastle JD, Embleton J. Differential expression of the Lewis Y antigen defined by monoclonal antibody C14/1/46/10 in colonic polyps. *Cancer*. 1989 Jul 15;64(2):414-21.
- Walker RA, Day SJ. Expression of the antigen detected by the monoclonal antibody Ca 19.9 in human breast tissues. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1986;409(3):375-83.
- Walz G, Aruffo A, Kolanus W, Bevilacqua M, Seed B. Recognition by ELAM-1 of the sialyl-Lex determinant on myeloid and tumor cells. *Science*. 1990 Nov 23;250(4984):1132-5.
- Wanebo HJ, Rao B, Pinsky CM, Hoffman RG, Stearns M, Schwartz MK, Oettgen HF. Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 1978 Aug 31;299(9):448-51.

- Wang BL, Springer GF, Carlstedt SC. Quantitative computerized image analysis of Tn and T (Thomsen-Friedenreich) epitopes in prognostication of human breast carcinoma. *J Histochem Cytochem.* 1997 Oct;45(10):1393-400.
- Wang QY, Wu SL, Chen JH, Liu F, Chen HL. Expressions of Lewis antigens in human non-small cell pulmonary cancer and primary liver cancer with different pathological conditions. *J Exp Clin Cancer Res.* 2003 Sep;22(3):431-40.
- Wang WS, Lin JK, Chiou TJ, Liu JH, Fan FS, Yen CC, Lin TC, Jiang JK, Yang SH, Wang HS, Chen PM. CA19-9 as the most significant prognostic indicator of metastatic colorectal cancer. *Hepatogastroenterology.* 2002 Jan-Feb;49(43):160-4.
- Wang XQ, Zhu ZM, Fenderson BA, Zeng GQ, Cao YJ, Jiang GT. Effects of monoclonal antibody directed to LeY on implantation in the mouse. *Mol Hum Reprod.* 1998 Mar;4(3):295-300.
- Wang Y, Jatkoe T, Zhang Y, Mutch MG, Talantov D, Jiang J, McLeod HL, Atkins D. Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer. *J Clin Oncol.* 2004 May 1;22(9):1564-71. Epub 2004 Mar 29.
- Wanitsuwan W, Kanngurn S, Boonpipattanapong T, Sangthong R, Sangkhathat S. Overall expression of beta-catenin outperforms its nuclear accumulation in predicting outcomes of colorectal cancers. *World J Gastroenterol.* 2008 Oct 21;14(39):6052-9.
- Watanabe Y, Ozasa K, Ito Y, Suzuki K, Kojima M, Suzuki S, Tokudome S, Tamakoshi K, Toyoshima H, Kawado M, Hashimoto S, Hayakawa N, Wakai K, Tamakoshi A; JACC Study Group. Medical history of circulatory diseases and colorectal cancer death in the JACC Study. *J Epidemiol.* 2005 Jun;15 Suppl 2:S168-72.
- Watkins LF, Lewis LR, Levine AE. Characterization of the synergistic effect of insulin and transferrin and the regulation of their receptors on a human colon carcinoma cell line. *Int J Cancer.* 1990 Feb 15;45(2):372-5.
- Wei J, Cui L, Liu F, Fan Y, Lang R, Gu F, Guo X, Tang P, Fu L. E-selectin and Sialyl Lewis X expression is associated with lymph node metastasis of invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Int J Surg Pathol.* 2010 Jun;18(3):193-200. Epub 2008 Jul 8

- Weinstein D, Simon M, Yehezkel E, Laron Z, Werner H. Insulin analogues display IGF-I-like mitogenic and anti-apoptotic activities in cultured cancer cells. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009 Jan;25(1):41-9.
- Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, Kang GH, Widschwendter M, Weener D, Buchanan D, Koh H, Simms L, Barker M, Leggett B, Levine J, Kim M, French AJ, Thibodeau SN, Jass J, Haile R, Laird PW. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2006 Jul;38(7):787-93. Epub 2006 Jun 25.
- Wesseling J, van der Valk SW, Vos HL, Sonnenberg A, Hilkens J. Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *J Cell Biol*. 1995 Apr;129(1):255-65.
- Westra JL, Schaapveld M, Hollema H, de Boer JP, Kraak MM, de Jong D, ter Elst A, Mulder NH, Buys CH, Hofstra RM, Plukker JT. Determination of TP53 mutation is more relevant than microsatellite instability status for the prediction of disease-free survival in adjuvant-treated stage III colon cancer patients. *J Clin Oncol*. 2005 Aug 20;23(24):5635-43.
- Whitehouse C, Burchell J, Gschmeissner S, Brockhausen I, Lloyd KO, Taylor-Papadimitriou J. A transfected sialyltransferase that is elevated in breast cancer and localizes to the medial/trans-Golgi apparatus inhibits the development of core-2-based O-glycans. *J Cell Biol*. 1997 Jun 16;137(6):1229-41.
- Wiggers T, Arends JW, Schutte B, Volovics L, Bosman FT. A multivariate analysis of pathologic prognostic indicators in large bowel cancer. *Cancer*. 1988 Jan 15;61(2):386-95.
- Wiggers T, Arends JW, Volovics A. Regression analysis of prognostic factors in colorectal cancer after curative resections. *Dis Colon Rectum*. 1988 Jan;31(1):33-41.
- Wiley EL, Mendelsohn G, Eggleston JC. Distribution of carcinoembryonic antigens and blood group substances in adenocarcinoma of the colon. *Lab Invest*. 1981 Jun;44(6):507-13.
- Wilkins PP, McEver RP, Cummings RD. Structures of the O-glycans on P-selectin glycoprotein ligand-1 from HL-60 cells. *J Biol Chem*. 1996 Aug 2;271(31):18732-42.



- Wils J, Blijham GH, Wagener T, De Greve J, Jansen RL, Kok TC, Nortier JW, Bleiberg H, Couvreur ML, Genicot B, Baron B; EORTC Gastrointestinal Group. High-dose 5-fluorouracil plus low dose methotrexate plus or minus low-dose PALA in advanced colorectal cancer: a randomised phase II-III trial of the EORTC Gastrointestinal Group. *Eur J Cancer*. 2003 Feb;39(3):346-52.
- Wilson AP, Van Dalen A, Sibley PE, Kasper LA, Durham AP, el Shami AS. Multicentre tumour marker reference range study. *Anticancer Res*. 1999 Jul-Aug;19(4A):2749-52.
- Winawer SJ, Zauber AG, Gerdes H, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Bond JH, Waye JD, Schapiro M, Panish JF. Risk of colorectal cancer in the families of patients with adenomatous polyps. National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med*. 1996 Jan 11;334(2):82-7.
- Winawer SJ, Zauber AG, O'Brien MJ, Ho MN, Gottlieb L, Sternberg SS, Waye JD, Bond J, Schapiro M, Stewart E. Randomized comparison of surveillance intervals after colonoscopic removal of newly diagnosed adenomatous polyps. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med*. 1993 Apr 1;328(13):901-6.
- Witzig TE, Loprinzi CL, Gonchoroff NJ, Reiman HM, Cha SS, Wieand HS, Katzmann JA, Paulsen JK, Moertel CG. DNA ploidy and cell kinetic measurements as predictors of recurrence and survival in stages B2 and C colorectal adenocarcinoma. *Cancer*. 1991 Aug 15;68(4):879-88.
- Wolf BC, Salem RR, Sears HF, Horst DA, Lavin PT, Herlyn M, Itzkowitz SH, Schlom J, Steele GD Jr. The expression of colorectal carcinoma-associated antigens in the normal colonic mucosa. An immunohistochemical analysis of regional distribution. *Am J Pathol*. 1989 Jul;135(1):111-9
- Wolmark N, Fisher B, Rockette H, Redmond C, Wickerham DL, Fisher ER, Jones J, Glass A, Lerner H, Lawrence W. Postoperative adjuvant chemotherapy or BCG for colon cancer: results from NSABP protocol C-01. *J Natl Cancer Inst*. 1988 Mar 2;80(1):30-6.
- Wolmark N, Fisher B, Wieand HS, Henry RS, Lerner H, Legault-Poisson S, Deckers PJ, Dimitrov N, Gordon PH, Jochimsen P, et al. The prognostic significance of preoperative carcinoembryonic antigen levels in colorectal cancer. Results from

- NSABP (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) clinical trials. *Ann Surg.* 1984 Apr;199(4):375-82.
- Wolmark N, Fisher B. Adjuvant chemotherapy in stage-II breast cancer: an overview of the NSABP clinical trials. *Breast Cancer Res Treat.* 1983;3 Suppl:S19-26.
  - Wolmark N, Rockette H, Fisher B, Wickerham DL, Redmond C, Fisher ER, Jones J, Mamounas EP, Ore L, Petrelli NJ. The benefit of leucovorin-modulated fluorouracil as postoperative adjuvant therapy for primary colon cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol C-03. *J Clin Oncol.* 1993 Oct;11(10):1879-87.
  - Wolmark N, Rockette H, Mamounas E, Jones J, Wieand S, Wickerham DL, Bear HD, Atkins JN, Dimitrov NV, Glass AG, Fisher ER, Fisher B. Clinical trial to assess the relative efficacy of fluorouracil and leucovorin, fluorouracil and levamisole, and fluorouracil, leucovorin, and levamisole in patients with Dukes' B and C carcinoma of the colon: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-04. *J Clin Oncol.* 1999 Nov;17(11):3553-9.
  - Wolmark N, Wieand HS, Hyams DM, Colangelo L, Dimitrov NV, Romond EH, Wexler M, Prager D, Cruz AB Jr, Gordon PH, Petrelli NJ, Deutsch M, Mamounas E, Wickerham DL, Fisher ER, Rockette H, Fisher B. Randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy with or without radiotherapy for carcinoma of the rectum: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol R-02. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Mar 1;92(5):388-96.
  - Wolmark N, Wieand HS, Rockette HE, Fisher B, Glass A, Lawrence W, Lerner H, Cruz AB, Volk H, Shibata H. The prognostic significance of tumor location and bowel obstruction in Dukes B and C colorectal cancer. Findings from the NSABP clinical trials. *Ann Surg.* 1983 Dec;198(6):743-52.
  - Wolmark N. Adjuvant therapy for colorectal cancer: the NSABP clinical trials. *Adv Exp Med Biol.* 1988;244:261-6.
  - Woutersen RA, Appel MJ, van Garderen-Hoetmer A, Wijnands MV. Dietary fat and carcinogenesis. *Mutat Res.* 1999 Jul 15;443(1-2):111-27. Review.

- Wu J, Gong J, Geng J, Song Y. Deoxycholic acid induces the overexpression of intestinal mucin, MUC2, via NF-kB signaling pathway in human esophageal adenocarcinoma cells. *BMC Cancer*. 2008 Nov 13;8:333.
- Wu ZY, Wan J, Zhao G, Peng L, Du JL, Yao Y, Liu QF, Lin HH. Risk factors for local recurrence of middle and lower rectal carcinoma after curative resection. *World J Gastroenterol*. 2008 Aug 14;14(30):4805-9.
- Wulfkühle J, Espina V, Liotta L, Petricoin E.JI. Genomic and Proteomic Technologies for Individualization and Improvement of Cancer Treatment. *Eur J Cancer*. 2004 Nov;40(17):2623-32.
- Xing PX, Tjandra JJ, Stacker SA, Teh JG, Thompson CH, McLaughlin PJ, McKenzie IF. Monoclonal antibodies reactive with mucin expressed in breast cancer. *Immunol Cell Biol*. 1989 Jun;67 ( Pt 3):183-95.
- Yakabe T, Nakafusa Y, Sumi K, Miyoshi A, Kitajima Y, Sato S, Noshiro H, Miyazaki K. Clinical significance of CEA and CA19-9 in postoperative follow-up of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2010 Sep;17(9):2349-56. Epub 2010 Mar 9.
- Yamada T, Ohyama H. Apoptosis: concept, research history and clinical significance *Nippon Rinsho*. 1996 Jul;54(7):1731-5. Review.
- Yamagishi S, Nakamura K, Inoue H, Kikuchi S, Takeuchi M. Possible participation of advanced glycation end products in the pathogenesis of colorectal cancer in diabetic patients. *Med Hypotheses*. 2005;64(6):1208-10.
- Yamasaki F, Tokunaga O, Sugimori H. Apoptotic index in ovarian carcinoma: correlation with clinicopathologic factors and prognosis. *Gynecol Oncol*. 1997 Sep;66(3):439-48.
- Yamáshita K, Yonezawa S, Tanaka S, Shirahama H, Sakoda K, Imai K, Xing PX, McKenzie IF, Hilkens J, Kim YS. Immunohistochemical study of mucin carbohydrates and core proteins in hepatolithiasis and cholangiocarcinoma. *Int J Cancer*. 1993 Aug 19;55(1):82-91.
- Yao M, Zhou DP, Jiang SM, Wang QH, Zhou XD, Tang ZY, Gu JX. Elevated activity of N-acetylglucosaminyltransferase V in human hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1998 Jan;124(1):27-30.

- Yazawa S, Nakamura J, Asao T, Nagamachi Y, Sagi M, Matta KL, Tachikawa T, Akamatsu M. Aberrant alpha 1-->2fucosyltransferases found in human colorectal carcinoma involved in the accumulation of Leb and Y antigens in colorectal tumors. *Jpn J Cancer Res.* 1993 Sep;84(9):989-95.
- Ye W, Romelsjö A, Augustsson K, Adami HO, Nyrén O. No excess risk of colorectal cancer among alcoholics followed for up to 25 years *Br J Cancer.* 2003 Apr 7;88(7):1044-6.
- Ye YJ, Wang S, Wu J, Shen ZL, Yin MJ, Yang XD, Jiang KW, Zhou J. Clinicopathological analysis of synchronous hepatic metastases from colorectal cancer. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi.* 2008 May;11(3):208-12
- Yeh JC, Hiraoka N, Petryniak B, Nakayama J, Ellies LG, Rabuka D, Hindsgaul O, Marth JD, Lowe JB, Fukuda M .Novel sulfated lymphocyte homing receptors and their control by a Core1 extension beta 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase. *Cell.* 2001 Jun 29;105(7):957-69.
- Yin BW, Finstad CL, Kitamura K, Federici MG, Welshinger M, Kudryashov V, Hoskins WJ, Welt S, Lloyd KO. Serological and immunochemical analysis of Lewis y (Ley) blood group antigen expression in epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer.* 1996 Feb 8;65(4):406-12.
- Yin L, Kharbanda S, Kufe D. Mucin 1 oncoprotein blocks hypoxia-inducible factor 1alpha activation in a survival response to hypoxia. *J Biol Chem.* 2007 Jan 5;282(1):257-66. Epub 2006 Nov 13.
- Yin L, Li Y, Ren J, Kuwahara H, Kufe D. Human MUC1 carcinoma antigen regulates intracellular oxidant levels and the apoptotic response to oxidative stress. *J Biol Chem.* 2003 Sep 12;278(37):35458-64. Epub 2003 Jun 25.
- Yonezawa S, Sato E. Expression of mucin antigens in human cancers and its relationship with malignancy potential. *Pathol Int.* 1997 Dec;47(12):813-30. Review.
- Yonezawa S, Sueyoshi K, Nomoto M, Kitamura H, Nagata K, Arimura Y, Tanaka S, Hollingsworth MA, Siddiki B, Kim YS, Sato E. MUC2 gene expression is found in noninvasive tumors but not in invasive tumors of the pancreas and liver: its close relationship with prognosis of the patients *Hum Pathol.* 1997 Mar;28(3):344-52.

- You JF, Hsieh LL, Changchien CR, Chen JS, Chen JR, Chiang JM, Yeh CY, Hsieh PS, Fan CW, Liu CT, Tang R. Inverse effects of mucin on survival of matched hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4244-50
- Yu XW, Rong W, Xu FL, Xu GY, Sun YR, Feng MY. Expression and clinical significance of Mucin and E-cadherin in colorectal tumors. *Ai Zheng.* 2007 Nov;26(11):1204-10
- Yuan M, Itzkowitz SH, Boland CR, Kim YD, Tomita JT, Palekar A, Bennington JL, Trump BF, Kim YS. Comparison of T-antigen expression in normal, premalignant, and malignant human colonic tissue using lectin and antibody immunohistochemistry. *Cancer Res.* 1986 Sep;46(9):4841-7
- Yuan S, Shi C, Liu L, Han W. MUC1-based recombinant Bacillus Calmette-Guerin vaccines as candidates for breast cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2010 Jul;10(7):1037-48. Review.
- Zamcheck N, Liu P, Thomas P, Steele G. Search for useful biomarkers of pre- or early malignant colonic tumors. *Prog Clin Biol Res.* 1988;279:251-75.
- Zaniboni A, Labianca R, Marsoni S, Torri V, Mosconi P, Grilli R, Apolone G, Cifani S, Tinazzi A. GIVIO-SITAC 01: A randomized trial of adjuvant 5-fluorouracil and folinic acid administered to patients with colon carcinoma--long term results and evaluation of the indicators of health-related quality of life. *Gruppo Italiano Valutazione Interventi in Oncologia. Studio Italiano Terapia Adiuvante Colon. Cancer.* 1998 Jun 1;82(11):2135-44.
- Zar JH, *Biostatistical Análisis*, 3rd Ed. Prentice Hall, New Jersey; pags. 662.
- Zenita K, Kirihata Y, Kitahara A, Shigeta K, Higuchi K, Hirashima K, Murachi T, Miyake M, Takeda T, Kannagi R. Fucosylated type-2 chain polylactosamine antigens in human lung cancer. *Int J Cancer.* 1988 Mar 15;41(3):344-9.
- Zhang B, Ougolkov A, Yamashita K, Takahashi Y, Mai M, Minamoto T. beta-Catenin and ras oncogenes detect most human colorectal cancer *Clin Cancer Res.* 2003 Aug 1;9(8):3073-9.

- Zhang K, Baeckström D, Hansson GC. A secreted mucin carrying sialyl-Lewis a from colon carcinoma cells binds to E-selectin and inhibits HL-60 cell adhesion. *Int J Cancer*. 1994 Dec 15;59(6):823-9
- Zhang K, Sikut R, Hansson GC A. MUC1 mucin secreted from a colon carcinoma cell line inhibits target cell lysis by natural killer cells. *Cell Immunol*. 1997 Mar 15;176(2):158-65.
- Zhang S, Gao F, Luo J, Yang J. Prognostic factors in survival of colorectal cancer patients with synchronous liver metastasis. *Colorectal Dis*. 2010 Aug;12(8):754-61.
- Zhang SM, Buring JE, Lee IM, Cook NR, Ridker PM. C-reactive protein levels are not associated with increased risk for colorectal cancer in women. *Ann Intern Med*. 2005 Mar 15; 142(6):425-32.
- Zhang W, Tang W, Inagaki Y, Qiu M, Xu HL, Li X, Sugawara Y, Nagawa H, Nakata M, Kokudo N. Positive KL-6 mucin expression combined with decreased membranous beta-catenin expression indicates worse prognosis in colorectal carcinoma. *Oncol Rep*. 2008 Nov;20(5):1013-9
- Zheng CX, Zhan WH, Zhao JZ, Zheng D, Wang DP, He YL, Zheng ZQ. The prognostic value of preoperative serum levels of CEA, CA19-9 and CA72-4 in patients with colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2001 Jun;7(3):431-4.
- Zhu ZM, Kojima N, Stroud MR, Hakomori S, Fenderson BA. Monoclonal antibody directed to Le(y) oligosaccharide inhibits implantation in the mouse. *Biol Reprod*. 1995 Apr;52(4):903-12.
- Zlobec I, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *Postgrad Med J*. 2008 Aug;84(994):403-11. Review.
- Zoghbi S, Drouin E, Claustre J, Bara J, Scoazec JY, Plaisancié P. Intestinal MUC2 and gastric M1/MUC5AC in preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in rat: a sequential analysis. *Int J Oncol*. 2007 Feb;30(2):489-97.

---

## Índice de Tablas y Figuras

**Figura 1:** Alteraciones somáticas en la carcinogénesis. En las figuras muestran, a 400X, los cortes histológicos coloreados con la técnica hematoxilina-eosina de: A) una mucosa colónica normal, B) un adenoma con displasia leve, C) un adenoma con displasia moderada, D) un adenoma con displasia severa y E) un adenocarcinoma de colon. \*MMR: enzima reparadora del ADN alterado, LOH: pérdida de heterocigocidad; DCC: deleción en el gen del cáncer de colon y APC: gen de la poliposis adenomatosa coli.....9

**Tabla 1:** Clasificación de la OMS de carcinomas de colon y recto..... 12

**Tabla 2:** Estadificación TNM para CCR.....23

**Tabla 3:** Estadificación comparativa del CCR por la AJCC (v.2002), la modificada por Aster-Coller y la de Duke.....24

**Tabla 4:** Sobrevida global (SG) a los 5 años según el estadio T y N.....26

**Figura 2:** Histograma de frecuencia de distribución según la edad.....91

**Figura 3:** Histograma de frecuencias donde se muestra las formas de presentación de CCR.....92

**Tabla 5:** Frecuencia de distribución del sitio de cáncer colorrectal primario según el género.....93

**Tabla 6:** Promedio de índice mitótico en relación al estadio.....93

**Tabla 7:** Distribución de frecuencias características histológicas.....93

**Figura 4:** Correlación entre el tamaño tumoral y el número de ganglios positivos.....94

**Tabla 8:** Frecuencia de distribución según el estadio TNM.....94

**Figura 5:** Histograma de frecuencias de distribución de los pacientes por estadio.....94

**Tabla 8bis:** Frecuencia de distribución de la localización tumoral según el estadio TNM.....95

**Tabla 9:** Frecuencia de la presentación de factores de riesgo en pacientes con estadio II.....95

**Tabla 10:** Tabla de frecuencia de distribución de tipos de cirugía según el estadio.....96

**Tabla 11:** Número de pacientes que recibieron distintos esquemas citostáticos adyuvantes según el estadio y la localización del tumor primario.....96

**Tabla 12:** Número de pacientes que recibieron distintos esquemas citostáticos según la línea de tratamiento.....96



<b>Tabla 13:</b> Tabla de distribución de frecuencias de respuesta al tratamiento quimioterápico asignado.....	97
<b>Tabla 14:</b> Se muestra el tiempo medio de SG (medido en años) y TLE (medido en meses).....	98
<b>Tabla 15:</b> Anticuerpos utilizados .....	100
<b>Figura 6:</b> Sección de un carcinoma mucinoso de colon, bien diferenciado e infiltrante, donde se observa reacción positiva de MUC1 con un patrón citoplasmático y con una intensidad +/-+++ (400X).....	111
<b>Tabla 16:</b> Expresión antigénica obtenida por inmunohistoquímica en tumores primarios.....	112
<b>Figura 7:</b> Corte histológico de un adenocarcinoma de colon moderadamente diferenciado e infiltrante en la cual se determinó la expresión de MUC1 luego de la incubación con el anticuerpo HMFG-1. Se observa reacción difusa predominantemente en la membrana apical de las células tumorales con una intensidad +++/+++. También se puede observar reactividad en el lumen (400X).....	113
<b>Figura 8:</b> Inmunohistoquímica de una sección de un adenocarcinoma de colon bien diferenciado e infiltrante donde se observa tinción difusa de MUC2 evidenciada mediante el uso del anticuerpo H-300. Predomina la expresión citoplasmática con una intensidad ++/+++ (400X).....	113
<b>Figura 9:</b> Microscopía óptica de una sección de un adenocarcinoma de colon tipo NOS, bien diferenciado e infiltrante donde se observa tinción difusa de MUC2, predominantemente en la membrana apical con una intensidad +++/+++ (400X).....	114
<b>Figura 10:</b> Sección de un adenocarcinoma, bien diferenciado e infiltrante donde se observa tinción difusa de MUC5AC, mixta y en el contenido de la luz glandular tumoral, con una intensidad de ++/+++ (400X).....	114
<b>Figura 11:</b> Corte histológico de una sección de un adenocarcinoma de recto bien diferenciado en la cual se determinó la expresión de <i>Tn</i> a través de la incubación con el anticuerpo HBTN. Se observa tinción difusa con un patrón de expresión citoplasmático y con una intensidad +++/+++ (400X).....	115
<b>Figura 12:</b> Microfotografía de un adenocarcinoma mucinoso de colon, bien diferenciado e infiltrante donde se observa tinción difusa de <i>sialil Lewis a</i> ,	

predominantemente en la membrana apical, con una intensidad +++/+++ . Se pueden observar glándulas normales con una reacción muy leve a nivel de la membrana apical (400X)..... 116

**Figura 13:** Sección de un adenocarcinoma de colon tipo NOS, bien diferenciado e infiltrante donde se observa tinción difusa de *Lewis x*, predominantemente en la membrana apical y con una intensidad +/+++ . Se observa reacción en la luz glandular (400X)..... 116

**Figura 14:** Corte histológico que muestra una sección de un adenocarcinoma de colon bien diferenciado en el cual se determinó la expresión de *sialil Lewis x* a través de la incubación con el anticuerpo KM93. Se observa una tinción difusa, con un patrón de expresión principalmente en la membrana apical y con una intensidad ++/+++ (400X)..... 117

**Figura 15:** Microscopía óptica de una sección de un adenocarcinoma de colon tipo NOS, bien diferenciado e infiltrante donde se observa tinción difusa de *sialil Lewis x* con un patrón mixto (citoplasmático y membrana apical) y una intensidad de +++/+++ (400X)..... 117

**Figura 16:** Inmunohistoquímica de una sección de un adenocarcinoma de colon bien diferenciado en la cual se utilizó el anticuerpo KM380. Se observa reacción difusa de *Lewis y* con un patrón predominantemente citoplasmático y con una intensidad de ++/+++ (400X)..... 118

**Figura 17:** Microfotografía de una sección de un adenocarcinoma de colon, bien diferenciado e infiltrante donde se observa reacción difusa de CEA, predominantemente en la membrana apical y con una intensidad de +++/+++ (400X)..... 119

**Figura 18:** Sección de un adenocarcinoma de colon tipo NOS, bien diferenciado e infiltrante donde se observa tinción difusa de CEA, con un patrón mixto y con una intensidad +++/+++ (400X)..... 119

**Tabla 17:** Expresión de *β-catenina* en los TP según el área celular (%)..... 119

**Figura 19:** Corte histológico que muestra la sección de un adenocarcinoma de colon bien diferenciado donde se observa expresión difusa de *β-catenina* principalmente en el citoplasma y en las membranas basolaterales, con una intensidad +++/+++ (400X)

.....	120
<b>Figura 20:</b> Microscopía óptica de una sección de un adenocarcinoma de colon bien diferenciado donde se observa expresión $\beta$ -catenina en los núcleos de las células tumorales (flecha blanca); con una intensidad ++/+++ (400X) .....	120
<b>Tabla 18:</b> Expresión antigénica obtenida por inmunohistoquímica en ganglios linfáticos metastáticos.....	121
<b>Figura 21:</b> Microfotografía de una sección a 100X y a 400X (cuadro pequeño) de un ganglio linfático con metástasis de un adenocarcinoma bien diferenciado donde se observa una reacción difusa de MUC1, con una intensidad de +++/+++ y un patrón de expresión principalmente citoplasmático.....	122
<b>Figura 22:</b> Inmunohistoquímica de una metástasis de un adenocarcinoma moderadamente diferenciado en un ganglio linfático; sección a 100X y a 400X (cuadro pequeño). Se observa expresión de MUC1 con un patrón predominantemente en la membrana apical y con una intensidad de ++/+++.....	122
<b>Figura 23:</b> Sección a 400X de un ganglio linfático con metástasis de un adenocarcinoma bien diferenciado donde se observa una reacción positiva de MUC2 en luz de la glándula tumoral con una intensidad de +/-+++.....	123
<b>Figura 24:</b> Microscopía óptica de una sección a 100X y a 400X (cuadro pequeño) de un ganglio linfático con metástasis de un adenocarcinoma moderadamente diferenciado. Se observa una tinción difusa de MUC5AC con un patrón principalmente en la membrana apical y una intensidad de +++/+++ .....	123
<b>Figura 25:</b> Corte histológico a 400X donde se observa la sección de un ganglio linfático con metástasis de un adenocarcinoma pobremente diferenciado. La inmunohistoquímica realizada en este ganglio muestra un patrón de reacción de MUC5AC mixto y una intensidad de ++/+++.....	124
<b>Figura 26:</b> Sección a 100X y a 400X de un GLM de un adenocarcinoma moderadamente diferenciado donde observa expresión difusa de <i>Tn</i> con un patrón de expresión principalmente citoplasmático y una intensidad de ++/+++.....	124
<b>Figura 27:</b> Microfotografía de una sección de un GLM de un adenocarcinoma pobremente diferenciado donde se observa una reacción difusa de <i>sialil Lewis a</i> con un patrón de expresión mixto y una intensidad de ++/+++ (400X).....	125

**Figura 28:** Inmunohistoquímica realizada a una sección de un ganglio con una metástasis de un adenocarcinoma bien diferenciado, donde se observa una reacción positiva difusa de *Lewis x* obtenida luego de la incubación con KM380. Se observa un patrón de expresión mixto y una intensidad de +++/+++ (400X)..... 125

**Figura 29:** Microscopía óptica de una sección a 100X y a 400X (cuadro pequeño) de un GLM de un adenocarcinoma moderadamente diferenciado con infiltración de la cápsula. Se observa una tinción difusa de *sialil Lewis x*, luego de la incubación con el anticuerpo KM93, con un patrón mixto y una intensidad de +++/+++ ..... 126

**Figura 30:** Sección de un GLM de un adenocarcinoma bien diferenciado donde se observa un patrón de expresión mixto de *sialil Lewis x* y con una intensidad de +++/+++ (400X)..... 126

**Figura 31:** Microfotografía de una sección a 400X de un ganglio linfático con metástasis de un adenocarcinoma pobremente diferenciado. La reacción difusa de *Lewis y* fue obtenida luego de la incubación con el anticuerpo C14. Se observa una reacción difusa, principalmente citoplasmática y con una intensidad de ++/+++ ..... 127

**Figura 32:** Microscopía óptica, a 100X y en el recuadro a 400X, de una sección de un GLM de un adenocarcinoma moderadamente diferenciado donde se observa una reacción difusa de *Lewis y* principalmente en membrana apical y con una intensidad de ++/+++ ..... 127

**Figura 33:** Corte histológico de un ganglio linfático con metástasis de un adenocarcinoma bien diferenciado. Luego de realizar la técnica de inmunohistoquímica se observa un patrón de expresión mixto de CEA con una intensidad de +/+++ (400X) ..... 128

**Tabla 19:** Expresión de *β-catenina* en los GLM según el área celular (%)..... 128

**Figura 34:** Inmunohistoquímica de una sección de un ganglio linfático con metástasis de un adenocarcinoma moderadamente diferenciado (400X). Se observa reacción de *β-catenina* tanto en el citoplasma como en el núcleo (flecha negra)..... 129

**Tabla 20:** Expresión antigénica obtenida por inmunohistoquímica en los adenomas ..... 130

**Figura 35:** Microfotografía de una sección a 400X de un adenoma tubulovelloso con displasia moderada donde se observa tinción difusa de MUC1 luego de la incubación

con el anticuerpo HMFG-1. La reacción observada fue predominantemente citoplasmática y con una intensidad ++/+++ (400X).....131

**Figura 36:** Porcentaje de expresión de MUC1 en los pólipos según los grados de displasia. DL=displasia leve, DM=displasia moderada y DS=displasia severa.....131

**Figura 37:** Sección de un adenoma tubular con displasia leve donde se observa tinción difusa de MUC2, mixta y con una intensidad +/+++ (400X).....132

**Figura 38:** Porcentajes de expresión MUC2 en los pólipos. Observamos una disminución de expresión de MUC2 conforme el grado de displasia DL=displasia leve, DM=displasia moderada y DS=displasia severa.....132

**Figura 39:** Corte histológico correspondiente a una sección a 400X, de un adenoma tubular con displasia leve donde se observa tinción difusa y mixta de MUC5AC con una intensidad +/+++ .....132

**Figura 40:** Expresión de MUC5AC. En la figura se muestran los porcentajes de reactividad de la mucina según los grados de displasia. Los adenomas con displasia severa (DS) presentaron 40% menos reactividad que aquellos con displasia leve (DL) o displasia moderada (DM).....133

**Figura 41:** Inmunohistoquímica realizada en una sección de un adenoma tubular con displasia leve donde se observa en la zona supranuclear reactividad positiva de *Tn* y con una intensidad +/+++ (400X).....133

**Figura 42:** Expresión de *Tn* según los grados de displasia de los pólipos. Los adenomas con displasia severa (DS) expresaron 25% menos expresión de *Tn* que los adenomas con displasia leve (DL) o moderada (DM).....133

**Figura 43:** Sección de un adenoma tubular con displasia leve donde se observa un patrón de expresión mixto de *sialil Lewis a* con predominio en la membrana apical y con una intensidad ++/+++ (400X).....134

**Figura 44:** La expresión de *sialil Lewis a* disminuyó conforme aumentó el grado de displasia encontrándose reactividad en el 55,6% de los adenomas con displasia leve (DL), 38,9% con displasia moderada (DM) y sólo en el 5,6% con displasia severa (DS) .....134

**Figura 45:** Microfotografía de una sección de un adenoma tubular con displasia leve. Luego de la incubación con el anticuerpo C14 se observa expresión mixta de *Lewis x*

con una intensidad +/+++ (400X).....	135
<b>Figura 46:</b> De los adenomas con reactividad positiva de <i>Lewis x</i> el 50% fueron adenomas con displasia leve (DL), 33,3% con displasia moderada (DM) y 16,7% con displasia severa (DS).....	135
<b>Figura 47:</b> Corte histológico a 400X correspondiente a una sección de un adenoma tubular con displasia severa. Se observa expresión mixta de <i>sialil Lewis x</i> con una intensidad ++/+++ .....	135
<b>Figura 48:</b> <i>Sialil Lewis x</i> se expresó 60% menos en los adenomas con displasia severa (DS) que en aquellos con displasia leve (DL). DM=Displasia Moderada .....	136
<b>Figura 49:</b> Inmunohistoquímica realizada a una sección de un adenoma tubular con displasia severa. Luego de la incubación con el anticuerpo C14 se observa expresión citoplasmática de <i>Lewis y</i> con una intensidad ++/+++ (400X).....	136
<b>Figura 50:</b> La expresión de <i>Lewis y</i> aumentó conforme el grado de displasia siendo positivo en el 57,1% de los adenomas con displasia leve (DL), en el 75% con displasia moderada (DM) y en todos con displasia severa (DS).....	136
<b>Figura 51:</b> Microscopía óptica a 400X de una sección de un adenoma tubular con displasia moderada. Se observa expresión mixta de CEA con una intensidad ++/+++ .....	137
<b>Figura 52:</b> La reactividad de CEA aumentó según el grado de displasia encontrándose expresión en el 33,3% de los adenomas con displasia leve (DL), 75% con displasia moderada (DM) y 66,7% en aquellas con displasia severa (DS) .....	137
<b>Tabla 21:</b> Expresión de $\beta$ - <i>catenina</i> en los adenomas según el área celular (%).....	138
<b>Figura 53:</b> Sección de un adenoma tubular con displasia leve donde se observa expresión de $\beta$ - <i>catenina</i> en las membranas basolaterales, citoplasmas y algunos núcleos. La intensidad en este corte es +/+++ (400X).....	138
<b>Figura 54:</b> Mientras que todos los adenomas con displasia leve (DL) y moderada (DM) expresaron $\beta$ - <i>catenina</i> en la membrana, el 50% y 77,8% presentaron reactividad positiva en el citoplasma (C), respectivamente. En ninguno de estos adenomas se halló expresión en el núcleo (N). Inversamente, en los adenomas con	

displasia severa (DS) se halló un aumento de expresión nuclear (66,7%) y una menor reactividad tanto en la membrana (33,3%) como en el citoplasma (33,3%)..... 138

**Figura 55:** Los adenomas tubulares (T) y tubulovelloso (TV) presentaron similar expresión tanto en las membranas (M) basolaterales (85,7% y 94,7% %) como en el citoplasma (C) (57,1% y 57,9%) mientras que en los tubulares la expresión fue levemente mayor en el núcleo (N) (14,3% versus 5,3%)..... 138

**Figura 56:** Corte histológico de un espécimen normal luego de la incubación con el anticuerpo HMFG-1. Se observa expresión de MUC1 predominantemente en el citoplasma con una intensidad ++/+++ (400X)..... 139

**Tabla 22:** Expresión antigénica obtenida por inmunohistoquímica en muestras colorrectales normales..... 140

**Figura 57:** Microscopía óptica de una sección de un espécimen normal donde se observa expresión mixta de MUC2 con una intensidad +/+++ (400X)..... 141

**Figura 58:** Inmunohistoquímica realizada a una sección de un espécimen normal en donde se observa una expresión citoplasmática de MUC5AC con una intensidad +/+++ (400X)..... 141

**Figura 59:** Microfotografía (400X) de una sección de un espécimen normal donde se observa expresión del antígeno *Tn* en la zona supranuclear con una intensidad +/+++ ..... 142

**Figura 60:** Sección de un espécimen normal donde se observa expresión mixta de *sialil Lewis a* con una intensidad +/+++ (400X)..... 142

**Figura 61:** Corte histológico de una muestra normal que muestra, luego de ser incubado con el anticuerpo KM380, una expresión mixta de *Lewis x* con una intensidad ++/+++ (400X). En el 46,2% de la muestras la expresión fue mayor en el borde superficial ..... 143

**Figura 62:** Microscopía óptica a 400X de una sección de un espécimen normal. Se observa expresión citoplasmática de *sialil Lewis x* con una intensidad +/+++ ..... 143

**Figura 63:** Microfotografía a 400x obtenida de un espécimen normal luego de la incubación con el anticuerpo C14. En la sección se observa expresión citoplasmática de *Lewis* y con una intensidad +/+++ ..... 144

**Figura 64:** Inmunohistoquímica realizada a una sección mucosa colónica normal

donde se observa expresión mixta de CEA con una intensidad +/-+++ (400X)..... 144

**Figura 65:** Sección de un espécimen normal donde se observa expresión de  $\beta$ -*catenina* en las membranas basolaterales y en los citoplasmas; además, se observa la ausencia de expresión nuclear. La intensidad en este caso fue de +/-+++ (400X)..... 145

**Tabla 23:** Patrón de expresión de  $\beta$ -*catenina* en los tejidos normales según el área celular (%)..... 145

**Figura 66:** Comparación de la reactividad de cada antígeno en los diferentes tejidos estudiados. Los colores corresponden a: verde=tejido colorrectal normal, amarillo=adenoma, azul=tumores primarios, rojo=ganglios linfáticos metastáticos... 146

**Tabla 24:** Diferencias de la intensidad de expresión de los antígenos estudiados en los tejidos normales, adenomas, tumores primarios y ganglios linfáticos metastáticos ..... 146

**Tabla 25:** Porcentaje de expresión de los antígenos en la superficie de los antígenos tanto en los tejidos normales, adenomas, tumores primarios como en los ganglios linfáticos metastáticos..... 148

**Tabla 26:** Muestra las diferencias en el índice de expresión de cada antígeno en los especímenes normales, adenomas, tumores primarios y ganglios linfáticos metastáticos..... 149

**Figura 67 A:** La expresión en la membrana apical (azul) y en el citoplasma (rojo) de MUC2 aumentó conforme la secuencia (5,9%, 18,2%, 44,2% y 14,7%, 0%, 48,8%, respectivamente); por otra parte, la expresión mixta (verde) fue alta en las muestras normales (N) y adenomas (A) (79,4% y 81,9%) y baja en los tumores primarios (TP) (7%)..... 150

**Figura 67 B:** La expresión de MUC5AC en la membrana apical (azul) aumentó con la secuencia (14,3%, 15,4% y 66,7%); por otra parte, la expresión en el citoplasma (rojo) disminuyó (42,9%, 30,8% y 25). Verde=citoplasma, N=normal, A=adenoma, TP=tumor primario..... 150

**Figura 67 C:** Se halló un aumento de la expresión de *sialil Lewis a* en la membrana apical (azul) en los TP respecto de las muestras de mucosa colorrectal normal (70,5% versus 2,4%); por otra parte se observó una disminución de la expresión mixta



(verde) (90,2% versus 21,3%). Rojo=citoplasma, N=normal, A=adenoma, TP=tumor primario.....151

**Figura 67 D:** La expresión en la membrana apical (azul) y en el citoplasma (rojo) de *Lewis x* aumentó en los TP respecto a las muestras normales (de 17,9% a 49,2% y de 10,3% a 24,6%, respectivamente); contrariamente, la expresión mixta (verde) disminuyó (de 71,8% a 26,3%). N=normal, A=adenoma, TP=tumor primario.....151

**Figura 67 E:** La expresión de *Lewis y* en la membrana apical (azul) aumentó con la secuencia (2,2%, 5,9% y 10,3%); por otra parte, sólo los tumores primarios (TP) presentaron expresión mixta (verde). Se observó una tendencia a la disminución de la expresión de éste antígeno en el citoplasma (rojo) (97,8%, 94,1% y 69,2%). N=normal, A=adenoma, TP=tumor primario.....151

**Figura 67 F:** *β-catenina* aumentó su expresión citoplasmática (roja) y nuclear (verde) conforme progresó la secuencia (66,6%, 53,6%, 93,8% y 0%, 7,1%, 15%, respectivamente); contrariamente, la expresión en las membranas basolaterales (azul) disminuyó con la misma (100%, 92,9% y 51,3%). N=normal, A=adenoma, TP=tumor primario.....151

**Tabla 27:** Expresión de los antígenos estudiados en las glándulas normales adyacentes al tumor primario (GNA) y en el tumor primario (TP).....152

**Tabla 27 bis:** Expresión antigénica en el tejido colorrectal normal, glándula normal adyacente (GNA) al TP y en el TP.....153

**Figura 68:** Veintisiete de treinta y tres muestras tumorales co-expresaron *sialil Lewis a* (sLea) y *sialil Lewis x* (sLex) en la membrana apical. M=membrana, C=citoplasma, Mx=mixto.....154

**Figura 69:** Correlación entre el patrón de expresión de MUC1 y *β-catenina*. En el 47,7% (43/90) de los TP ambos antígenos presentaron un patrón de reactividad citoplasmática (C) mientras que en el 26,6% (24/90) predominó la tinción de la membrana (M) cuando MUC1 se halló expresada en el citoplasma. N=Nuclear, Mx=Mixto.....155

**Tabla 28:** Relación de la expresión en el TP de MUC1 y *β-catenina* en el núcleo y en la membrana con las características clinicopatológicas. Los valores presentados en la tabla se expresan en porcentajes.....156

<b>Tabla 29:</b> Relación entre el patrón de expresión de MUC1/ $\beta$ -catenina y la sobrevida de los pacientes con CCR.....	157
<b>Tabla 30:</b> Expresión de los antígenos estudiados en los GLM y en los TP.....	158
<b>Tabla 31:</b> Comparación entre expresión antigénica en los tumores primarios y la edad de presentación del CCR.....	159
<b>Figura 70:</b> Distribución porcentual de la expresión antigénica de acuerdo al grupo etáreo estudiado (en azul se encuentran expresados los pacientes menores de 40 años, en rojo los pacientes con edades comprendidas entre 40 y 60 años; y en verde, los pacientes mayores a 60 años).....	160
<b>Figura 71:</b> Distribución porcentual de la expresión antigénica de acuerdo al género (en azul se encuentran expresados los pacientes de género femenino y en rojo los pacientes de género masculino).....	160
<b>Tabla 32:</b> Relación entre las frecuencias de índice de expresión de los antígenos estudiados en los TP y los antecedentes clinicopatológicos de los pacientes con CCR.....	162
<b>Tabla 33:</b> Relación entre la frecuencia del índice de expresión de los antígenos estudiados en los TP y la manifestación clínica del CCR.....	165
<b>Tabla 34:</b> Relación entre la frecuencia del índice de expresión de los antígenos estudiados en el TP y la localización tumoral.....	167
<b>Tabla 35:</b> Relación entre la frecuencia del índice de expresión de los antígenos estudiados en los TP y el tamaño tumoral.....	169
<b>Tabla 36:</b> Relación entre la frecuencia del índice de expresión de los antígenos estudiados en los TP y el estadio TNM.....	169
<b>Tabla 37:</b> Promedio de valores CEA y <i>sialil Lewis a</i> , en el pre- y post-operatorio de acuerdo al estadio.....	171
<b>Tabla 38:</b> Relación entre el índice de expresión en el TP y el promedio de concentración sanguínea de CEA y CA 19-9 en el post-operatorio.....	171
<b>Tabla 39:</b> Distribución de frecuencias porcentuales de los antígenos estudiados según el tipo histológico del TP.....	172
<b>Figura 72 A:</b> Porcentaje de distribución de los adenocarcinomas puros (barras azules) y los carcinomas mucinosos puros (barra verde), de acuerdo a la expresión de los	

antígenos estudiados.....	173
<b>Figura 72 B:</b> Porcentaje de distribución de los adenocarcinomas puros (barras azules) y los adenocarcinomas con componente mucinosos (barra naranja) según la expresión de los antígenos estudiados.....	173
<b>Tabla 40:</b> Relación entre el índice de expresión de los antígenos estudiados en los TP y las características anatomopatológicas tumorales.....	175
<b>Figura 73:</b> Distribución porcentual de la expresión antigénica según el grado histológico tumoral (en azul se encuentran expresados los tumores con ausencia de reactividad antigénica, en verde los tumores con índice de expresión débil del antígeno y en rojo los tumores con índice de expresión fuerte del antígeno).....	176
<b>Figura 74:</b> Distribución porcentual de la expresión antigénica según el grado nuclear tumoral (en azul se encuentran expresados los tumores con ausencia de reactividad antigénica, en verde los tumores con índice de expresión débil del antígeno y en rojo los tumores con índice de expresión fuerte del antígeno).....	177
<b>Figura 75:</b> Índice mitótico (IM) promedio agrupado según el índice de expresión antigénica. El promedio de IM observado en los TP con ausencia (A) de expresión de MUC2 fue 28,8±33,2, con índice de expresión débil (D) 26,9±3,1 y fuerte (F) 20,0±11,6; asimismo, el IM de los TP con ausencia de expresión de <i>Tn</i> fue 29,2±2,8, con expresión débil 22,9±5,7 y fuerte 15,0±9,8. Los antígenos <i>Lewis x</i> , <i>sialil Lewis x</i> , <i>Lewis y</i> y CEA presentaron similar comportamiento.....	178
<b>Tabla 41:</b> Relación entre la distribución porcentual del Índice de expresión de los antígenos estudiados y la respuesta al tratamiento adyuvante según los estadios...	180
<b>Tabla 42:</b> Relación entre la expresión antigénica estudiada y la respuesta a tratamiento adyuvante según los estadios.....	180
<b>Figura 76:</b> Los TP de los pacientes con metástasis únicamente en el hígado (color naranja) presentaron un mayor porcentaje del índice de expresión fuerte (F) de los antígenos <i>Lewis y</i> (42,9%), CEA (28,6%) y $\beta$ - <i>catenina</i> (28,6%) respecto de aquellos con metástasis en “otros” sitios (color azul) distintos al hígado (22,2%, 16,7% y 11,1%, respectivamente). En éstos últimos, MUC5AC se encontró menos ausente (A) que en aquellos con metástasis hepáticas (77,8% versus 92,9%); similar hallazgo se observó	

con *Tn. Sialil Lewis x* se encontró en los TP con metástasis hepáticas mayoritariamente (57,1%) con un índice de expresión débil (D) respecto a aquellos con “otros” sitios (38,9%)..... 183

**Tabla 43:** Relación entre el índice de expresión de los antígenos estudiados en los TP, la sobrevida global (SG) y el tiempo libre de progresión (TLP)..... 184

**Figura 77:** La sobrevida global fue un año más corta en los pacientes con TP con expresión positiva (Si) de *sialil Lewis x* (KM93) ( $4,2\pm 0,6$  años) que en aquellos con expresión negativa (No) ( $3,2\pm 0,4$  años). En la figura se muestra el análisis univariado de sobrevida acorde al método de Kaplan-Meier..... 184

**Figura 78:** El tiempo libre de progresión fue más corto ( $28,3\pm 10,4$  meses) en los pacientes que presentaron tumores con un índice de expresión fuerte (2) de *sialil Lewis x* (KM93) que aquellos con un índice de expresión débil (1) ( $36\pm 6,3$  meses) o cuyo antígeno se encontraba ausente (0) ( $46,3\pm 7,6$  meses). La figura muestra el análisis univariado de sobrevida acorde al método de Kaplan-Meier..... 185

**Tabla 44:** Relación entre el índice de expresión de los antígenos estudiados en los TP con la SG y el TLP, según los estadios de CCR..... 186

**Tabla 45:** Promedio de edad al momento del diagnóstico de CCR según el índice de expresión antigénica..... 188

**Figura 79:** MUC1 se encontró expresado en todos los GLM de los pacientes de género masculino (color azul) y sólo en 9/15 (60%) femeninos (color rojo). La figura muestra la distribución porcentual de la expresión antigénica en los GLM según el género..... 189

**Tabla 46:** Relación entre el índice de expresión de los antígenos estudiados en los GLM y los antecedentes clinicopatológicos de los pacientes con CCR..... 190

**Tabla 47:** Relación entre el índice de expresión de los antígenos estudiados en los GLM y la forma de presentación del CCR..... 192

**Tabla 48:** Relación entre el índice de expresión de los antígenos estudiados en los GLM y la localización del TP ..... 192

**Tabla 49:** Relación entre el índice de expresión de los antígenos estudiados en los ganglios linfáticos metastáticos y el tamaño del tumor primario..... 192

**Tabla 50:** Relación entre el índice de expresión de los antígenos estudiados en los

GLM y el estadio tumoral (TNM).....194

**Figura 80 A:** En la figura se muestra el porcentaje de distribución de la expresión antigénica en los GLM según el tipo histológico de la metástasis. Mientras que la mucina MUC5AC se halló ausente en el 90,5% de las metástasis de AP (color azul); todas aquellas de ACM (color naranja) la expresaron, la mitad lo hicieron con un índice de expresión fuerte. *Tn* se encontró expresado más débilmente en los AP que en aquellos con componente mucinoso (66,7% versus 43,5%). Sólo los antígenos *sialil Lewis x*, *Lewis y* y *CEA* se encontraron expresados fuertemente en los GLM con metástasis de AP mientras que dicha expresión no se encontró en ninguno de los ACM, predominando en éstos un índice de expresión débil. Asimismo, el carbohidrato *sialil Lewis a* se halló expresado débilmente en el 52,2% de las metástasis ganglionares de AP mientras que en aquellas producidas por AM fue del 33,3%. En estas últimas, todas expresaron *Lewis x* débilmente. Por otro lado,  $\beta$ -*catenina* presentó un 22,3% más de índice de expresión débil en los ACM (66,7%) que en aquellos con AP (44,4%).....195

**Figura 80 B:** Todos los GLM con metástasis de AM (color verde) presentaron un índice de expresión débil de MUC1 mientras que aquellos de AP (color azul) predominó un índice de expresión fuerte (27,3%). Ningún GLM con metástasis de AM expresó *Lewis x*. A diferencia de los ACM, los AM presentaron un índice de expresión fuerte de *sialil Lewis x* en el 66,7% de las muestras. En la figura se muestra el porcentaje de distribución de la expresión antigénica en los GLM según el tipo histológico de la metástasis.....196

**Figura 81 A:** Distribución porcentual de la expresión antigénica según el grado histológico tumoral de los GLM. De los GLM *Tn*-positivos el 46,2% tenían metástasis GH1, 30,8% GH2 y 23,1% GH3. También se encontró una disminución de la expresión de *Lewis x* y *Lewis y* conforme aumentó el grado histológico de la metástasis (55%, 30%, 15% y 50%, 27,3%, 22,7% en los tumores GH1, GH2 y GH3, respectivamente). En azul se encuentran expresados los tumores con ausencia de reactividad antigénica, en verde los tumores con índice de expresión débil del antígeno y en rojo los tumores con índice de expresión fuerte del antígeno.....197

<b>Tabla 51:</b> Relación entre el índice de expresión de los antígenos estudiados en los GLM y las características anatomopatológicas tumorales.....	198
<b>Figura 81 B:</b> Distribución porcentual de la expresión antigénica según el grado nuclear de las metástasis ganglionares. En azul se muestran los GLM con ausencia de reactividad, en verde aquellos con un índice de expresión débil y en rojo los GLM con un índice de expresión antigénica fuerte .....	199
<b>Figura 82:</b> Índice mitótico promedio agrupado según el índice de expresión antigénica (en azul se encuentran expresados los GLM con ausencia de reactividad, en verde aquellos con un índice de expresión débil y en rojo los GLM con un índice de expresión antigénica fuerte). El índice mitótico de las metástasis ganglionares fue más elevado cuando se hallaron expresados fuertemente los antígenos <i>sialil Lewis x</i> , <i>Lewis y</i> y <i>β-catenina</i> que cuando éstos fueron hallados con un índice de expresión débil o ausentes.....	199
<b>Tabla 52:</b> Relación entre la expresión antigénica estudiada en los GLM y la respuesta al primer tratamiento quimioterápico según los estadios.....	201
<b>Figura 83:</b> A un año del diagnóstico de CCR el 58,9% (IC95 28,9-73,5) de los pacientes con ausencia de expresión de MUC2 en sus GLM estaban vivos mientras que los pacientes con GLM positivos para esta mucina el 87,5% (IC95 55,2-97,5) sobrevivían independientemente de su estadio. En la figura se muestra el análisis univariado de la SG según la expresión de MUC2 acorde al método de Kaplan-Meier .....	202
<b>Figura 84 A:</b> Análisis univariado de la SG según la expresión de <i>Tn</i> acorde al método de Kaplan-Meier. Se observa una sobrevida a un año de seguimiento del 80% (IC95 55,8-92,6) en los pacientes con ausencia de <i>Tn</i> en sus GLM y del 52,7% (IC95 28,4-68,6) en aquellos con expresión positiva del antígeno.....	202
<b>Figura 84 B:</b> Análisis univariado de sobrevida acorde al método de Kaplan-Meier en donde se puede observar que un año de seguimiento el 74,4% (IC95 50-89,4) de los pacientes con ausencia de <i>Tn</i> en sus GLM aun no habían presentado recurrencia de su enfermedad mientras que los pacientes que expresaron éste antígeno sólo el 49,8% (IC95 25,3-74,4) de los pacientes estaban libres de recurrencia .....	203
<b>Tabla 53:</b> Relación entre el índice de expresión de los antígenos estudiados en los	

GLM y la sobrevida global (SG) y el tiempo libre de progresión de la enfermedad (TLP).....204

**Figura 85:** Al completar un año de seguimiento el 83,3% (IC95 46,8-96,5) de los pacientes con ausencia de *Lewis* y en sus GLM estaban vivos mientras que sólo sobrevivían el 60,4% (IC95 38,9-78,5) de aquellos con un expresión positiva. La figura muestra el análisis univariado de sobrevida según la expresión del antígeno *Lewis* y (C14) acorde al método de Kaplan-Meier .....203

**Tabla 54:** Relación entre el índice de expresión de los antígenos estudiados en los GLM con la sobrevida global (SG) y el tiempo libre de progresión (TLP), según los estadíos de CCR.....205

**Figura 86:** El 83,3% (IC95 56,6-95) de los pacientes con estadío III con GLM negativos para *Tn* estaban vivos a un año de seguimiento mientras que sólo el 53,5% (IC95 23,2-81,4) de los mismos, con reactividad positiva, sobrevivieron en el mismo período de tiempo. La Figura muestra la SG según la expresión de *Tn* de acuerdo al método Kaplan-Meier.....206

**Figura 87:** Al finalizar un año de seguimiento, el 80% (IC 95 41,3-95,7) de los pacientes con estadío III con ausencia de *Lewis* y en sus GLM estaban vivos mientras que sólo sobrevivieron el 61,3% (IC 35,4-82,1) de aquellos con expresión positiva. En la figura se muestran las curvas de SG según la expresión de *Lewis* y (C14) obtenidas con el método de Kaplan-Meier.....206

**Figura 88:** Análisis univariado de sobrevida acorde al método de Kaplan-Meier donde se observa que el 77,8% (IC95 65,9-86,3) de los pacientes con ausencia (NO) de invasión tumoral de la capa subserosa (INVSUSE) aun no habían presentado recurrencia de su enfermedad al año del diagnóstico de CCR mientras que sólo el 51,9% (IC95 26,5-76,4) de los pacientes con invasión (SI) de dicha capa estaban libres de enfermedad.....207

**Tabla 55:** Relación entre las variables clinicopatológicas y la sobrevida de los pacientes estudiados.....208

**Figura 89:** A los dos años de seguimiento el 74,6% (59,5-85,5) de los pacientes con estadío pN<sub>0</sub> (0), el 69,7% (IC95 49,9-84,2) con estadío pN<sub>1</sub> (1) y el 45,6% (IC95 22,9-70-3) de los pacientes con estadío pN<sub>2</sub> (2) estaban vivos. Análisis univariado de SG

según el grado de compromiso ganglionar (NODE) acorde al método de Kaplan-Meier .....211

**Figura 90:** El 87,5% (IC95 77,1-93,5) de los pacientes con CCR sin metástasis (MTS 0) al momento del diagnóstico estaban vivos al año de su seguimiento mientras que sólo el 39,3% (IC95 20-61,9) de los pacientes con enfermedad metastática (MTS 1) sobrevivieron en ese período. Método analítico utilizado: Kaplan-Meier .....212

**Figura 91:** El 90% (IC95 61,3-98) de los pacientes con estadio I (Dukes A), el 80,1% (IC95 61,5-91) con estadio II (Dukes B), el 67,9% (ic95 53,8-85,5) con estadio III (Dukes C) y el 32,8% (IC95 16-55,5) de aquellos con estadio IV (Dukes D) estaban vivos a los dos años de seguimiento. Esta Figura muestra, mediante el análisis de Kaplan-Meier, una disminución gradual de la SG según el estadio del CCR.....212

**Figura 92:** Observamos una distribución uniforme del estadio Dukes A (puntos azules) en el área CP1-, Dukes B (puntos rosas) en el cuadrante CP1-/CP2+, Dukes C (puntos verdes) en CP2- y Dukes D (puntos marrones) en el cuadrante CP1+/CP2+. La Figura muestra la distribución de los estadios luego de la aplicación del test de Componentes Principales .....213

**Figura 93:** Distribución de las variables luego de la aplicación del test de Componentes Principales.....214

**Tabla 56:** Relación entre las variables clinicopatológicas con estadio II y la sobrevida .....218

**Tabla 57:** Relación entre las variables clinicopatológicas con estadio III y la sobrevida .....220

**Figura 94:** Distribución de las variables clinicopatológicas según el análisis de Componentes Principales. Se identifica un predominio del estadio IIA en el área CP2-, IIB en el cuadrante CP1+/CP2-, IIIA en el cuadrante CP1-/CP2-, IIIB en CP1+/CP2+ y finalmente el estadio IIIC en el cuadrante CP1-/CP2+.....222