



Universitat de Lleida

# **Factores predictivos de respuesta en el tratamiento del cancer de recto: estudio de la asociación entre la activación del factor nuclear KB (NF-KB), la proteína inhibitoria Flice (FLIP) y el factor inducido por la hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) con la respuesta a la radio-quimioterapia neoadyuvante**

Moisés Mira Flores

<http://hdl.handle.net/10803/393888>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.







Universitat de Lleida

**FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA EN EL  
TRATAMIENTO DEL CANCER DE RECTO: ESTUDIO  
DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LA ACTIVACIÓN DEL  
FACTOR NUCLEAR  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ), LA PROTEÍNA  
INHIBITORIA FLICE (FLIP) Y EL FACTOR  
INDUCIDO POR LA HIPOXIA (HIF-1 $\alpha$ ) CON LA  
RESPUESTA A LA RADIO-QUIMIOTERAPIA  
NEOADYUVANTE**

**Moisés Mira Flores**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la  
Universitat de Lleida (Programa de Doctorado en Salud)

Directores de tesis:

Dra. Antonieta Salud Salvia

Dr. Xavier Matias-Guiu Guia

Lleida, 2016



*A mis padres que, seguramente, se hubiesen sentido muy orgullosos.*





**Universitat de Lleida**  
Departament de Medicina

Av. Alcalde Rovira Roure, 80  
(Hospital Universitari Arnau de Vilanova)  
25198 LLEIDA  
Catalunya (Espanya)  
Tel.: +34 973 702433  
Fax: +34 973 702435



**D. Xavier Matías Guiu**, Catedrático de Medicina de la Universitat de Lleida, y **Dña Antonieta Salud Salvia**, Profesora Titular de Medicina de la Universitat de Lleida

### **CERTIFICAN**

Que el estudio que lleva por título “**Factores predictivos de respuesta en el tratamiento del cáncer de recto: estudio de la asociación entre la activación del factor nuclear kB (NF-kB), la proteína inhibitoria Flice (FLIP) y el factor inducido por la hipoxia (HIF-1) con la respuesta a la radio-quimioterapia neoadyuvante**” y del que es autor el licenciado **Moisés Mira Flores**, se ha realizado bajo nuestra dirección para aspirar al grado de **Doctor en Medicina** y se encuentra en condiciones de ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Lo que firmo en Lleida a 1 de octubre de 2015

  
Fdo: **Xavier Matías-Guiu**

  
**Antonieta Salud Salvia**





## ÍNDICE

---



# INDICE

RESUMEN.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	IX
ABREVIACIONES.....	XIII
INTRODUCCION .....	1
EPIDEMIOLOGIA.....	1
ANATOMIA .....	2
ESTADIFICACION .....	4
HISTOLOGIA .....	5
FACTORES DE RIESGO.....	5
1. Factores genéticos.....	5
2. Factores no genéticos.....	6
PRESENTACION CLINICA .....	8
DIAGNOSTICO .....	8
TRATAMIENTO .....	11
CIRUGIA .....	12
RADIOTERAPIA .....	16
QUIMIOTERAPIA .....	29
FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA.....	35
HIPOTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	45
MATERIAL Y MÉTODO .....	49
Población .....	49
Criterios de inclusión.....	49
Criterios de exclusión .....	49
Periodo de estudio .....	49
Descripción de estudio .....	49
RESULTADOS .....	61
RESULTADOS CLINICO-PATOLOGICOS.....	61
ESTUDIO DE BIOMARCADORES.....	75
DISCUSION .....	89
CONCLUSIONES.....	101

ANEXO 1. CLASIFICACION TNM.....	105
ANEXO 2. CLASIFICACION ANATOMOPATOLOGICA .....	107
ANEXO 3. RESULTADOS .....	109
<i>ARTÍCULO</i> .....	117
BIBLIOGRAFIA.....	131

## *RESUMEN*

---



## RESUMEN

El tratamiento estándar del cáncer de recto localmente avanzado, estadios II y III, es la radio-quimioterapia neoadyuvante. El mejor marcador de respuesta al tratamiento neoadyuvante y de pronóstico es la obtención de una respuesta completa patológica (RCp), que se caracteriza por la esterilización de células tumorales en la pieza quirúrgica y se observa entre el 20 y el 30% de los pacientes tratados.

Conocemos factores clínicos, histológicos y moleculares que se asocian a un peor pronóstico y resistencia al tratamiento aplicado, pero todavía desconocemos qué pacientes se van a beneficiar más del tratamiento neoadyuvante o por el contrario en qué casos habría que realizar otro tratamiento “personalizado”.

La predicción del pronóstico y de respuesta a la radio-quimioterapia basada en la expresión de 5 proteínas (c-FLIP<sub>L</sub>/s, HIF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -catenin, p65, and p105/p50 NF- $\kappa$  $\beta$ ) es la base de este estudio retrospectivo.

Un total de 152 pacientes, con confirmación histológica de adenocarcinoma de recto y en estadios II y III, se trataron siguiendo el protocolo en vigor con quimio-radioterapia de forma neoadyuvante. Tras un plazo entre 6 y 8 semanas se realizó la cirugía con escisión total del mesorrecto.

Se confeccionó un array de tejidos para el estudio inmunohistoquímico con muestras representativas del tumor de origen, muestras obtenidas tras aplicación del tratamiento neoadyuvante y muestras de tejido normal para realizar los controles adecuados.

Los resultados obtenidos se han relacionado con la respuesta clínica obtenida (grado de regresión tras el tratamiento mediante la clasificación de Mandard) y con la supervivencia libre de progresión.

Cuatro perfiles inmunohistoquímicos se han mostrado como factores independientes para la supervivencia libre de progresión. La combinación de tres de los perfiles estudiados han demostrado que tienen significación pronóstica.



Con la estrategia de determinar en los pacientes estos marcadores, se puede identificar aquellos pacientes con peor pronóstico y utilizar, en estos casos, tratamientos alternativos o más intensos.

## SUMMARY

The standard treatment for locally advanced rectal cancer, in stages II and III, is neoadjuvant radiochemotherapy. The best indicator of response to neoadjuvant treatment and therefore of prognosis, is obtaining a pathological complete response (pCR), characterized by a complete disappearance of detectable cancer cells in the surgical specimen and it is observed in between 20% and 30% of the treated patients.

We know THE clinical, histological and molecular factors associated with poor prognosis and resistance to neoadjuvant treatment, but we still don't know which patients would benefit the most from neo-adjuvant treatment or otherwise in which cases WE should provide an individualized treatment.

The prediction of both prognosis and response to radio-chemotherapy based on the expression of 5 proteins (c-FLIPL / S, ...) is the basis of this retrospective study.

A total of 152 patients with histologically confirmed rectal adenocarcinoma and stages II and III were treated following the standard radio-chemotherapy protocol of neoadjuvant therapy. After a period of 6-8 weeks surgery was performed with total mesorectal excision.

An array of tissue for immunohistochemical study was performed with representative samples of the tumor of origin, samples obtained after neoadjuvant therapy and samples of normal tissue as controls.

The results have been associated with the clinical response obtained (degree of regression after treatment by the Mandard classification) and with progression-free survival.

The results achieved have been associated with the clinical response obtained, (the degree of regression after the treatment based on the Mandard classification).

Four immunohistochemical profiles have been shown as independent factors for progression-free survival. The combination of three of these profiles has shown to have prognostic significance.

With the strategy of determining these indicators in patients, it may be identified those patients with a worse prognosis and in this case, the use of either alternative or more intensive treatments.

## RESUM

El tractament estàndard del càncer de recte localment avançat, estadis II i III, és la ràdio- quimioteràpia neoadjuvant. El millor marcador de resposta al tractament neoadjuvant i del pronòstic és l'obtenció d'una resposta completa patològica (RCP) que es caracteritza per l'esterilització de cèl·lules tumorals en la peça quirúrgica i s'observa entre el 20 i el 30% dels pacients.

Coneixem factors clínics, histològics i moleculars que s'associen amb pitjor pronòstic i resistència al tractament aplicat, però encara desconeixem quins malalts es beneficiaran del tractament neoadjuvant o per contra s'hauria de realitzar un altre tractament "personalitzat".

La predicció del pronòstic i de la resposta a la radio-quimioteràpia basada en l'expressió de 5 proteïnes (c-FLIP<sub>L</sub>/s, HIF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -catenina, p65, i P105 / p50 NF- $\kappa$  $\beta$ ) és la base d'aquest treball retrospectiu.

Un total de 152 malalts amb confirmació histològica d'adenocarcinoma de recte i en estadis II i III es van tractar seguint el protocol vigent de quimio-radioteràpia de forma neoadjuvant. Un cop finalitzat i en un termini entre 6 i 8 setmanes es va realitzar la cirurgia amb l'escissió total del mesorrecte.

Es va confeccionar array de teixits per l'estudi immunohistoquímic amb mostres representatives del tumor d'origen, mostres obtingudes després de l'aplicació del tractament neoadjuvant així com mostres de teixit normal per poder realitzar els controls adients. Els resultats s'han relacionat amb la resposta clínica obtinguda (grau de regressió després del tractament mitjançant la classificació de Mannard) i amb la supervivència lliure de progressió.

Quatre perfils immunohistoquímics s'han mostrat com factors independents per la supervivència lliure de progressió i la combinació de tres dels biomarcadors estudiats han demostrat que tenen significació pronòstica.

Amb l'estratègia d'identificar en els pacients aquests marcadors, es pot identificar aquells malalts amb pitjor pronòstic i utilitzar en aquests casos tractaments alternatius o més intensos.



## *AGRADECIMIENTOS*

---



## **AGRADECIMIENTOS**

El realizar la tesis doctoral siempre supone un esfuerzo importante. El no haberla hecho en el momento adecuado aumenta este esfuerzo y el compaginar tu trabajo diario con la elaboración de la tesis tampoco ayuda. Pero el tener a tu lado a personas que te han apoyado y ayudado, desde el principio hasta el final, hace que este esfuerzo sea mucho más llevadero.

Por eso es justo agradecer a estas personas que también son protagonistas de la elaboración de esta tesis.

Tengo que agradecer de forma muy especial a mis directores de tesis, la Dra. Antonieta Salud y el Dr. Xavier Matías-Guiu, por su esfuerzo, apoyo, comprensión, actitud y disponibilidad que en todo momento ha sido excelente. Mi admiración y gratitud a la Dra. Salud ya que su motivación insistente y su paciencia ha sobrepasado ampliamente sus funciones de directora.

Quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Anna Novell ya que su trabajo, en un campo que no me es familiar, ha hecho posible la realización de esta tesis. Sin su esfuerzo no hubiese sido posible la tesis.

Al Dr. José Antonio Carceller también tengo que agradecerle que, a lo largo de estos años, siempre me ha estado animando y ayudando para que salga este trabajo.

Quiero agradecer a todo el personal del IRBLleida, el departamento de Bioestadística y del Servicio de Anatomía Patológica que han colaborado en la realización del estudio.

A mis compañeros y amigos la Dra. Palmira Foro y el Dr. Serafín Morales.

Al Dr. Antonio Llombart que fue uno de los primeros impulsores de este trabajo.

A la Dra. Oncins y al Dr. Badía por facilitar las muestras histológicas de algunos pacientes.

A Rosa y Marc por su comprensión y apoyo. Han estado siempre ahí.



Finalmente quiero agradecer a todos esos protagonistas anónimos que son los pacientes. Ellos son la razón de este estudio.

## *ABREVIACIONES*

---



## ABREVIACIONES

5-FU: 5 Fluorouracilo

AJCC: American Joint Committee on Cancer

CTV: Clinical Tumor Volume

FLIP: Proteína inhibitoria FLICE

GRT: Grado de regresión tumoral

GTV: Gross Tumor Volume

Gy: Gray

HIF-1: Factor inducible por la hipoxia

HSC: Puntuación o *score* histológico

HUAV: Hospital Universitario Arnau de Vilanova

IHQ: Inmunohistoquímica

IUAC: Union Against Cancer

NF-kB: Factor nuclear kB

PTV: Planning Tumor Volume

QT: Quimioterapia

RCp: Respuesta completa patológica

RT: Radioterapia

SG: Supervivencia global

SLP: Supervivencia libre de progresión

TMA: Array matricial de tejidos

TME: Escisión total del mesorrecto



## *INTRODUCCION*

---



## INTRODUCCION

### EPIDEMIOLOGIA

A nivel mundial el cáncer colorrectal representa el 10% del total de cánceres siendo el tercer cáncer con más incidencia: 1.360.500 nuevos casos en 2012. Las tasas más elevadas se observan en Nueva Zelanda, Australia y algunos países del centro y del este de Europa.

En España, la estimación del número de casos para 2014 ha sido de 39.553 nuevos casos (23.482 en hombres y 16.071 en mujeres) con unas tasas ajustadas a la población estándar mundial de 49,8 en hombres y 27,7 en mujeres<sup>1</sup>.

La incidencia en Cataluña es una de las más altas de Europa solamente superada por la República Checa, Eslovenia y Holanda, según datos de un reciente estudio de la Generalitat de Cataluña<sup>2</sup>. Esta alta incidencia, sobre todo en los hombres, se debe a un incremento que ocurrió en el periodo 1985-1994 llegando al 4,76 % anual y en mujeres del 1,79 anual. En el período comprendido entre 1995-2002 se frenó esta incidencia alcanzando unos valores del 3,4% anual en hombres y del 1,38% en mujeres.<sup>3</sup>

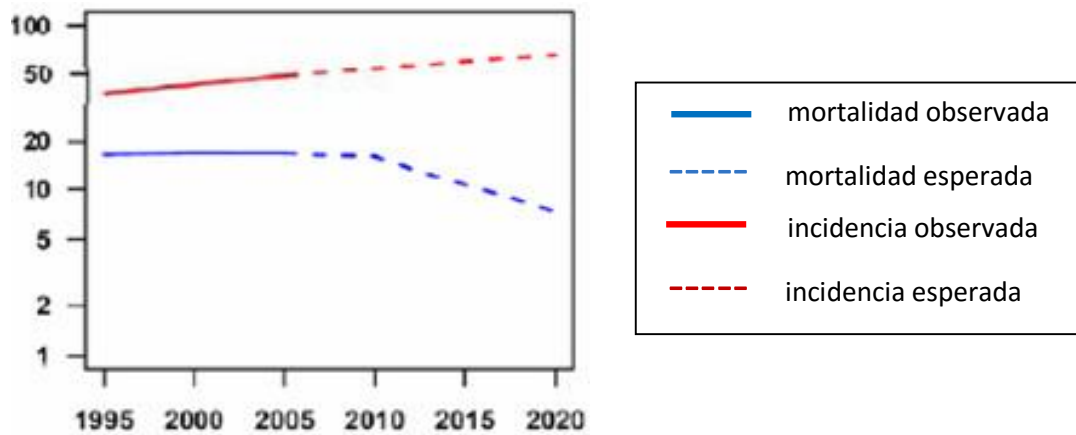
En el 2015 se han diagnosticado en Cataluña 46.424 casos de cáncer (27.438 hombres y 18.986 mujeres) siendo el tumor más frecuente el colorrectal, con una incidencia de 7.750 casos/año, seguido del cáncer de próstata y el de mama<sup>4</sup>

El riesgo de padecer un cáncer de recto hasta los 74 años se ha estimado en un 1,8% en hombres y un 1,0% en mujeres según datos del Registro de Tarragona<sup>5</sup>. De estos datos podríamos decir que uno de cada 8 hombres y una de cada 14 mujeres padecerán un cáncer colorrectal a lo largo de su vida.

La mortalidad del cáncer de recto se sitúa en el 4,5% de todas las muertes por cáncer en el hombre y en un 5% en la mujer lo que supone un 12,6% y 15,1% respectivamente respecto a la mortalidad global por cáncer.



Las cifras de mortalidad europeas sitúan a Catalunya por debajo de la media y se prevé una disminución progresiva para el año 2020.



Proyecciones de cáncer 1993-2020. Generalitat de Catalunya. Departament de Salut

La supervivencia del cáncer colorrectal ha mejorado en los últimos años en España. En los pacientes diagnosticados durante el periodo 2000-2007, la supervivencia relativa a 5 años estandarizada por edad, fue de 56,4% en hombres y de 55,8% en mujeres<sup>6</sup>. Comparándolos con la media europea se sitúa por encima de la media pero claramente por debajo de la supervivencia en USA, probablemente debido a una mayor utilización del diagnóstico precoz.

## ANATOMIA

Es importante conocer bien la anatomía para realizar correctamente el estadiaje locorregional y para la definición de un esquema de tratamiento adecuado.

Anatómicamente el recto es el segmento terminal del tubo digestivo alojado en la concavidad del sacro. El límite inferior corresponde a la unión anorrectal, y el límite superior, que se denomina unión rectosigmoidea, se sitúa aproximadamente entre 12 y 15 cm desde el margen anal.

La distancia al margen anal varía de manera considerable, según se utilice un rectoscopio rígido o uno flexible y de las condiciones anatómicas y posturales del sujeto. Así si se mide la cara anterior, el fondo de saco de Douglas se sitúa a veces a menos de 5 cm del margen anal en la mujer y si medimos la cara posterior, que se apoya sobre el sacro, la distancia desde el margen anal hasta la unión rectosigmoidea es de 18-19 cm.

Una mención especial merece el mesorrecto que, aunque no figura en los tratados de anatomía clásicos, aparece en la literatura quirúrgica en 1982<sup>7</sup>. Se trata de un tejido graso, situado entre la muscularis mucosa rectal y la hoja visceral de la fascia pélvica o “fascia recti” y asienta sobre las tres cuartas partes de la circunferencia rectal

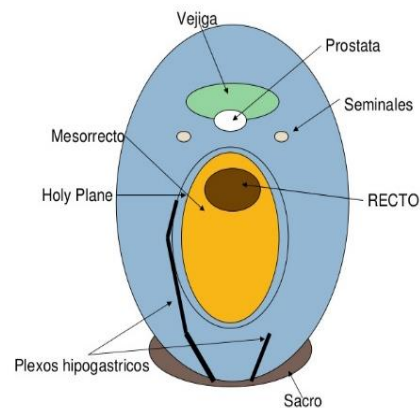


Figura 1

infraperitoneal, posterior y lateralmente (Figura 1). El recto pélvico comparte el mismo origen embrionario<sup>8</sup> que el intestino primitivo mientras que el ano y el conducto anal poseen origen ectodérmico, de ahí que no tengan meso. Estas particularidades embriológicas apoyadas por Heald constituyen la base de la cirugía moderna del recto que se discute en el apartado del tratamiento.

La vascularización arterial del recto se realiza mediante la arteria rectal superior, la arteria rectal media, la arteria rectal inferior que irriga el esfínter anal externo, el esfínter anal interno, el músculo elevador del ano y la submucosa del conducto anal, y por la arteria sacra media.

El drenaje venoso se realiza a través de la vena rectal superior y, de manera accesoria por las venas rectal inferior, media y la vena sacra media. Las venas rectales inferiores y medias drenan el canal anal y la parte baja de la ampolla rectal y se dirigen hacia la vena pudenda y la vena ilíaca interna.

El drenaje linfático se realiza por los plexos linfáticos, localizados en la pared rectal bajo la mucosa rectal y anal, y que forman los ganglios perirrectales. Los ganglios perirrectales superiores drenan a un grupo ganglionar perirrectal localizado en la bifurcación de la arteria rectal superior (el ganglio principal del recto de Mondor para los anatomistas)<sup>9</sup>. Los linfáticos de la región media acompañan a la arteria mesentérica inferior, hasta alcanzar los ganglios periaórticos, y más tarde los ganglios superiores, hasta llegar al conducto torácico.

En el recto perineal y en la unión anorrectal, ambos de origen ectodérmico, los linfáticos se dirigen lateralmente hacia estructuras perineales a través de los esfínteres, los músculos elevadores y a través la "*fascia recti*" hacia los vasos ilíacos internos siguiendo los vasos rectales medios. Los linfáticos de la mucosa y de la piel del ano drenan en los ganglios inguinales. Esta particularidad del drenaje linfático del recto inferior explica que las tasas de recidivas pélvicas sean más elevadas para lesiones más bajas.

La inervación es por el plexo hipogástrico que se encarga de la inervación de la zona pélvica, que abarca recto, vejiga y órganos sexuales. El plexo presacro se divide al nivel del promontorio en dos nervios hipogástricos, derecho e izquierdo, cuyo trayecto es internamente paralelo al de los uréteres a 1 o 2 cm, y como ellos, siempre posteriores a la fascia urinaria de Gerota y también posterior a la fascia presacra de Waldeyer. El parasimpático está formado por las ramas de S2, S3 y S4 y es el responsable de la erección en el varón.

## ESTADIFICACION

La estadificación del cáncer colorrectal (ANEXO 1) es necesaria para planificar el tratamiento, establecer el pronóstico y evaluar los resultados del tratamiento. Constituye una parte esencial y punto de referencia de los factores pronósticos. Se utiliza la clasificación TNM<sup>10</sup> en su séptima edición, descrita en el 2010 por la International Union Against Cancer (IUAC) y la American Joint Committee on Cancer (AJCC).

## HISTOLOGIA

La Organización mundial de la Salud (ANEXO 2) clasifica a los tumores del recto en epiteliales y no epiteliales<sup>11</sup> siendo el adenocarcinoma la histología más frecuente, alcanzando casi el 95% del total. El resto constituye entre el 2 y el 5% de los tumores colorrectales<sup>12</sup>.

En el caso del cáncer localizado en el ano o en el canal anal, la variante escamo-celulares (epidermoides) constituyen la gran mayoría de los cánceres primarios de ano siendo los tumores cloacogénicos (de células de transición basaloides) un importante subgrupo. Estas dos variantes histológicas están relacionadas con la infección por el papilomavirus humano<sup>13</sup>.

Los adenocarcinomas de las glándulas anales o de formaciones de fístulas y los melanomas no son muy frecuentes.

## FACTORES DE RIESGO

### 1. Factores genéticos:

Las alteraciones en la línea germinal sólo representan el 10-15% de todos los cánceres de recto y las entidades relacionadas con un aumento del riesgo de padecer cáncer de recto son:

- Trastornos no polipósicos
  - **Síndrome de Lynch** o cáncer colorrectal sin poliposis hereditario (CCSPH). El síndrome de Lynch, resultado de defectos de los genes de REE (que involucran a hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 o hMSH6) representa la forma más común de cáncer colorrectal hereditario y constituye de 3 al 5% de todas las neoplasias malignas colorrectales<sup>14</sup>. La prevalencia de las mutaciones está más elevada en ciertas poblaciones (judíos azkantzis)<sup>15</sup>
- Trastornos polipósicos
  - **Poliposis adenomatosa familiar (PAF)**: la poliposis adenomatosa familiar (FAP) está causada por mutaciones en el gen APC. Es la responsable de

aproximadamente 1% de todos los cánceres colorrectales y se hereda de forma autosómica dominante. En estos pacientes es fundamental el diagnóstico y tratamiento precoz, porque el riesgo de cáncer se aproxima al 100% a los 50 años de edad<sup>16</sup>

- **Síndrome de Turcot:** presenta alteraciones en el gen APC y genes de REE. Es una afección hereditaria poco frecuente en la que los pacientes presentan riesgo aumentado de pólipos adenomatosos y cáncer colorrectal, así como tumores cerebrales.
- **Poliposis adenomatosa familiar atenuada (PAFA):** gen APC alterado
- **Síndrome poliposo hiperplásico:** alteraciones en los genes BRAF y KRAS2.

- Trastornos hamartomatosos: son muy raros y representan menos del 1% de los casos totales de cáncer

- **Síndrome de Peutz-Jeghers:** los pacientes con éste síndrome tienen un riesgo significativamente mayor de cáncer colorrectal, así como de otros cánceres, los cuales usualmente se presentan a una edad más temprana que lo normal. Este síndrome es causado por mutaciones en el gen STK1.
- **Síndrome de poliposis juvenil:** presenta alteraciones en los genes SMAD4 o DPC4, y BMPR1A.
- **Síndrome de Cowden y Síndrome de Ruvalcaba-Myhre-Smith:** alteración en el gen PTEN.
- **Síndrome de poliposis mixta hereditario.**

## 2. Factores no genéticos

Entre las afecciones más comunes con un aumento del riesgo podemos enumerar:

- **Antecedente personal de enfermedad inflamatoria del intestino:** La enfermedad inflamatoria intestinal de más de 8 años de evolución, es un factor predisponente para el desarrollo de tumores colorrectales. El 1% de todos los cánceres colorrectales se producen en pacientes diagnosticados de colitis ulcerosa<sup>17</sup>

- **Antecedentes familiares de cáncer colorrectal**<sup>18</sup>: El riesgo es alrededor del doble para aquellas personas con un solo familiar de primer grado afectado.
- **Antecedentes personales de cáncer colorrectal** o adenomas colorrectales<sup>19</sup>.
- **Antecedentes personales de cáncer de ovario, endometrio o mama**: Las mujeres menores de 60 años de edad con estos antecedentes de cáncer tienen mayor riesgo de desarrollar un cáncer colorrectal, probablemente asociado al Síndrome de Lynch.
- **Edad** mayor de 50 años: el 90% de los casos se diagnostican después de los 50 años.
- **Alimentación**: un alto consumo de carne roja y carnes procesadas pueden aumentar el riesgo de cáncer colorrectal<sup>20</sup>. Cocinar las carnes a temperaturas muy altas (freír, asar o cocinar a la parrilla) produce elementos químicos que pueden aumentar el riesgo de cáncer, aunque no está claro cuánto de esto puede contribuir a un aumento en el riesgo de cáncer colorrectal. El alto consumo de vegetales, verduras, frutas y granos integrales se asocia con un menor riesgo de cáncer colorrectal<sup>21</sup>.
- **La inactividad física**<sup>22</sup> y la obesidad aumentan el riesgo de cáncer de colon y recto en ambos sexos, aunque parece ser mayor en los hombres.
- **Tabaco**: Los fumadores<sup>23</sup> tienen una probabilidad mayor de padecer cáncer colorrectal que los no fumadores debido a que algunas de las sustancias cancerígenas que se encuentran en el humo se disuelven en la saliva y se absorben.
- **Consumo excesivo de alcohol**<sup>24</sup> y el déficit de ácido fólico.
- **Diabetes tipo 2**: la diabetes tipo 2 y el cáncer colorrectal comparten algunos de los mismos factores de riesgo (como el exceso de peso).
- **Antecedentes de radioterapia**<sup>25</sup> en el abdomen: algunos estudios han sugerido que los hombres que recibieron radioterapia para tratar el cáncer de próstata pueden tener un mayor riesgo de cáncer rectal, ya que el recto recibe una dosis de radiación durante el tratamiento. La mayoría de estos estudios<sup>26</sup> están basados en

hombres tratados en los años '80 y '90, y el efecto de los métodos de radiación más modernos en el riesgo de cáncer rectal no está claro.

## PRESENTACION CLINICA

Durante una etapa de su historia natural el cáncer rectal permanece asintomático, pero probablemente el signo más frecuente es el sangrado rectal acompañado en ocasiones de secreción mucosa. Este sangrado suele ser escaso e intermitente y muchas veces el paciente lo atribuye a hemorroides.

Otros signos y síntomas asociados son:

- Cambio en el hábito intestinal: diarrea y/o estreñimiento. La diarrea se produce por el proceso de irritación y el estreñimiento debido a que el tumor está estenosando la luz del intestino y no permite el paso de la materia fecal.
- Tenesmo rectal.
- Síndrome tóxico con astenia, anorexia y adelgazamiento.
- Dolor abdominal, sensación de plenitud o molestia a veces difusa y otras veces localizada.
- Dolor rectal ocasionado por infiltración de estructuras perirrectales.

## DIAGNOSTICO

Las pruebas necesarias para confirmar y estadificar el cáncer de recto son:

- **Colonoscopia:** es la exploración más precisa para el diagnóstico del cáncer de recto ya que permite visualizar la lesión y conseguir material para el estudio anatomopatológico. Su sensibilidad es muy alta, alrededor del 95% y se considera el "gold estándar". Es claramente superior al enema opaco y a la colonoscopia virtual<sup>27</sup>. A pesar de lo anterior algunos estudios han objetivado una tasa de infradiagnósticos sobre todo cuando se trata de lesiones planas o de pequeño tamaño (< 1 cm)<sup>28</sup>. Los

factores relacionados con los fallos en el diagnóstico dependen directamente de la calidad de la colonoscopia (realización incompleta de la colonoscopia que puede alcanzar hasta el 26%<sup>29</sup>, inadecuada preparación del colon) y de la experiencia del endoscopista (interpretación errónea de las lesiones visualizadas y/o la obtención inadecuada de las biopsias)<sup>30,31</sup>. Además, la colonoscopia es imprescindible para localizar las lesiones ya que permite el marcaje endoscópico mediante inyección de sustancias o colocación de clips metálicos<sup>32</sup>. En los casos que no se haya podido realizar la colonoscopia bien por que estuviese contraindicada (perforación) o porque la lesión estenosa la luz, debería realizarse en los primeros 3-6 meses tras la cirugía para descartar lesiones sincrónicas, si no se ha completado previamente con la colonoscopia virtual.

- **Colonoscopia virtual:** el estudio del colon y del recto mediante reconstrucción de cortes de TAC en dos y tres dimensiones tiene una alta especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de lesiones mayores de 6 mm. No puede sustituir a la colonoscopia convencional en el diagnóstico de CCR por la imposibilidad de la toma de muestras para el estudio anatomopatológico<sup>33</sup>.

- **Tomografía axial computerizada TAC:** es una técnica imprescindible para el estudio de la invasión locorregional del tumor y para la valoración exacta del número y tamaño de las lesiones metastásicas candidatas a tratamiento oncológico posterior. Su utilidad en el seguimiento de la enfermedad se centra en la detección de metástasis hepáticas, afectación ganglionar y de recidivas locales. En cuanto la detección de metástasis hepáticas la TAC tiene mayor sensibilidad que la ecografía, por lo que resulta útil en aquellos casos en que existen dudas de persistencia de actividad tumoral (postratamientos) o negatividad de otras técnicas de imagen con sospecha evidente (por marcadores tumorales) de actividad tumoral<sup>34</sup>.

- **La ecografía endorrectal:** está considerada como la prueba con mayor fiabilidad para valorar el grado de invasión de la pared rectal y está especialmente indicada para tumores precoces. Un estudio realizado en 2004 por Bipat et al<sup>35</sup> demuestra unas tasas de sensibilidad y especificidad del 94% y 86% respectivamente para demostrar invasión de la muscular propia, del 90% y 75% para la invasión perirectal



y del 67% y 78% para la invasión ganglionar, presentando una fiabilidad superior a la RMN, para confirmar la invasión muscular y la perirectal. Como sucede en pruebas técnico-dependientes requiere una curva de aprendizaje con una recomendación de al menos 50 exploraciones.

Las limitaciones técnicas que presenta son la imposibilidad de valorar tumores estenosantes, y los errores de imagen causados por la dificultad para posicionar correctamente la sonda respecto al tumor. Presenta una mayor limitación, comparada con la RMN pélvica, para la evaluación de la afectación del margen circunferencial lateral y la fascia mesorrectal<sup>36</sup>.

- **Resonancia Magnética Nuclear (RMN):** se caracteriza por su capacidad de obtención de una señal que permite la discriminación entre tejidos y órganos sanos y patológicos. La RMN ha incrementado su uso debido a la capacidad de predecir la resecabilidad del tumor así como determinar que pacientes pueden ser tratados sólo con cirugía<sup>37</sup> y cuales requieren tratamiento neoadyuvante para promover la regresión del tumor<sup>38</sup>.

Las indicaciones de la RMN son:

- Estudio de las relaciones anatómicas del recto con todas las estructuras y órganos pélvicos sin limitaciones técnicas por estenosis tumoral
- Análisis total del mesorrecto desde el promontorio hasta el canal anal.
- Determinación de la localización respecto a la reflexión peritoneal y la extensión longitudinal del tumor a lo largo de la pared rectal<sup>39</sup>.
- Visualización de la infiltración y penetración del tumor en la pared rectal así como el grado de infiltración de la grasa del mesorrecto.
- Visualización, análisis y medición (en mm) de la relación del tumor con la Fascia del Mesorrecto y por tanto con el Margen de Resección Circunferencial (MRC.) de capital importancia para la cirugía.<sup>40,41</sup> La RMN, como demuestra el MERCURY Study, tiene una efectividad del 88% con una sensibilidad del 59% y una especificidad del 98%<sup>42</sup>.

- Visualización y análisis del grado de infiltración del tumor con estructuras osteomusculares y vasculares pélvicas y órganos pélvicos de vecindad (tumores T4)<sup>43</sup>.
- Evaluación global de los implantes y adenopatías en el conjunto de la grasa del mesorrecto desde el promontorio hasta el canal anal<sup>44</sup>.

- **Tomografía por emisión de Positrones (PET):** Dos estudios demuestran una sensibilidad que varía del 21% al 29% para la invasión ganglionar, una agudeza del 56 al 75% para detectar metástasis hepáticas con una sensibilidad del 78% y una especificidad del 96% con una eficacia del 91%<sup>45,46</sup>.

La Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del Ministerio de Sanidad y Consumo (AETS)<sup>47</sup>, recomienda la utilización de esta prueba para la reestadificación de carcinoma colorrectal con sospecha de recurrencia y susceptible de cirugía. Las indicaciones son:

- Metástasis única o múltiple siempre que sea resecable.
- Elevación progresiva del CEA con pruebas de diagnóstico por la imagen (TAC, RM) no concluyentes.
- Valoración de la respuesta terapéutica de lesiones metastásicas ante técnicas de imagen no concluyentes.

Desde el punto de vista del Oncólogo Radioterápico, la utilización de las imágenes y la información aportada por la PET<sup>48</sup> proporciona una herramienta muy atractiva para la delimitación de volúmenes de forma más precisa.

## TRATAMIENTO

El tratamiento del cáncer de recto, a pesar que ha cambiado sustancialmente en los últimos años, sigue siendo multidisciplinar. La elección del tratamiento se basa en el estadiaje preoperatorio y en las condiciones del paciente. En cualquier caso es imprescindible la presentación del caso en los comités de tumores para asegurar la

valoración de los distintos especialistas que participan en el tratamiento del cáncer de recto.

## CIRUGIA

La cirugía permanece todavía como el principal tratamiento y puede utilizarse de forma aislada, en los tumores en estadios I, o lo que es más frecuente asociada a radioterapia y quimioterapia en los demás estadios.

En estadios precoces, estadios I, se puede realizar la resección local o resección transanal mientras que en el resto de los estadios se realiza una resección anterior o abdominoperineal dependiendo de la situación del tumor.

La **escisión local** incluye la exéresis del tumor con un margen libre de al menos 1cm e incluyendo el espesor completo de la pared rectal (hasta la grasa perirrectal) presenta una baja morbilidad, evita la formación de estomas definitivos y preserva la función anorrectal. La escisión local del tumor solamente estaría justificada<sup>49</sup> en los T1 N0.

Su utilización en los T2 es objeto de debate y a falta de estudios se debería realizar solamente ante contraindicación quirúrgica o por deseo del paciente, debidamente informado, debido al alto riesgo de metástasis linfáticas (entre el 12 y 28%) que presentan estos tumores y las tasas inaceptables de recidivas locales (27-47%)<sup>50</sup>.

La resección transanal en pacientes seleccionados, presenta ventajas sobre la escisión local tradicional (mejor exposición, visualización, y accesibilidad a lesiones más proximales) y parece tener una menor tasa de recidivas locales. Series institucionales y multicéntricas, como la británica, muestran tasas de recidiva local del orden del 8-20% para los T1, del 9-25% para los T2 y del 59% para los T3, y concluyen que la escisión local queda reservada únicamente para algunos tumores T1 y reivindicando la necesidad de futuros estudios que evalúen este tipo de resección combinada con un tratamiento adyuvante<sup>51</sup>.

Tanto la **resección anterior (AR)** como la **resección abdominoperineal (AAP)** tienen como finalidad principal extirpar todo el tumor con unos márgenes adecuados para asegurar el control local. Es mandatorio la extirpación conjunta de los ganglios linfáticos de drenaje para poder realizar un estadiaje postoperatorio correcto que nos determinará la conveniencia de tratamientos adyuvantes, para evitar la diseminación ganglionar que acompaña a estos tumores y para disminuir las tasas de fracaso local<sup>52</sup>.

El número de ganglios extirpados que se considera adecuado es de 12 tal como recomiendan el American College of Surgery,<sup>53</sup> the American College of Pathology, la National Comprehensive Cancer Network (NCCN)<sup>54</sup> y la American Association of Clinical Oncology (ASCO) for Colorectal Cancers<sup>55</sup>.

En los tumores localizados a una distancia superior a 5 cm se realiza la resección anterior con anastomosis colorrectal. La preservación de la función anal en centros especializados se puede conseguir en más de dos tercios de los pacientes y se asocia con una baja morbilidad (14-40%) y mortalidad (<4%). En cambio, en cirugía de urgencia la morbilidad se incrementa hasta un 30-70% y la mortalidad hasta un 15%<sup>56</sup>.

La longitud de los márgenes es un tema capital y controvertido<sup>57</sup>. Se sabe que además de la extensión directa hacia los ganglios de drenaje, los tumores localizados por debajo de la reflexión peritoneal pueden extenderse distalmente utilizando rutas intramurales.

En los tumores localizados en los 5 últimos centímetros del recto se suele utilizar la resección abdomino-perineal, aunque hay estudios<sup>58,59</sup> que demuestran que dejando 1 o 2 cm de margen distal no se compromete el fracaso local ya que se sabe que la extensión intramural del tumor llega hasta 2 cm excepto en los tumores pobremente diferenciados. La amputación abdominoperineal podría limitarse a aquellos tumores que infiltran el aparato esfinteriano y los indiferenciados a menos de 2 cm de la línea pectínea (Figura 2).

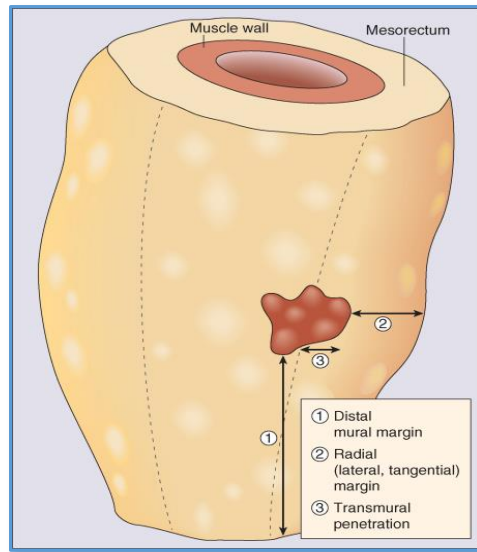


Figura 2

Otra indicación de la AAP es la existencia de una incontinencia fecal previa a la aparición de la sintomatología tumoral o pacientes muy ancianos o con enfermedades asociadas, que supongan un alto riesgo de fracaso anastomótico o bien de incontinencia fecal severa.

Estudios retrospectivos que han comparado la resección anterior con la abdominoperineal concluyen que los resultados son peores en cuanto a supervivencia y control local con la abdominoperineal<sup>60</sup>.

Si el margen distal es importante más aún lo es el margen radial<sup>61,62</sup> o circunferencial que se ha mostrado como factor independiente de la recidiva local y de la supervivencia<sup>63</sup>, siendo además un factor determinante para indicar la conveniencia o no de un tratamiento neoadyuvante.

La extirpación total del mesorrecto, (Figura 3) técnica descrita por Heald<sup>64</sup> en 1982, se considera hoy en día la técnica de elección tanto si se realiza una resección anterior o una resección abdominoperineal y se debe de extender 4-5 cm distalmente al tumor. La extirpación en bloque del mesorrecto garantiza que se

disminuyan a un 5% el índice de recidivas tal como lo demuestran diversos trabajos<sup>65,66</sup>.

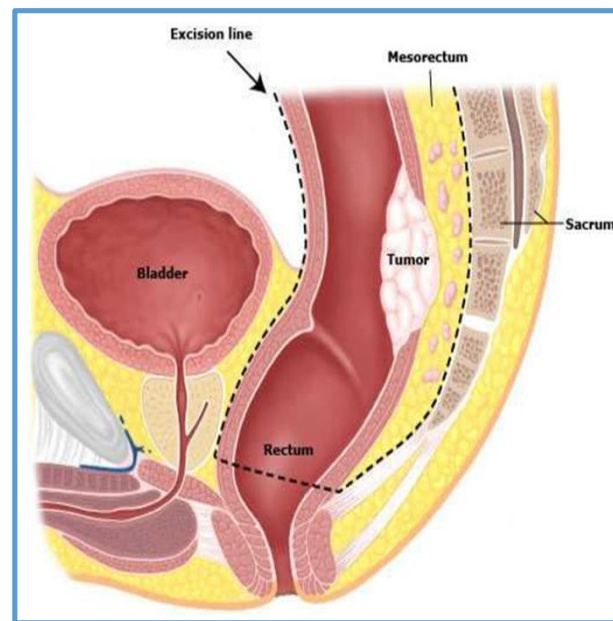


Figura 3

Como mayor inconveniente de la realización de ésta técnica es que prolonga la duración del acto quirúrgico y aumenta la tasa de fugas anastomóticas. Hoy en día es el “gold estándar” de la cirugía del recto.

La escisión total del mesorrecto por vía laparoscópica es una alternativa a la TME abierta que se utiliza cada vez más ya que presenta ventajas frente a la laparotomía en cuanto a la recuperación de la función intestinal, menor número de complicaciones postquirúrgicas y menor estancia hospitalaria. En un estudio<sup>67</sup> realizado comparando las dos modalidades no se han encontrado diferencias en cuanto al número de recidiva local, supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad. En una revisión a los 5 años de dicho estudio se mantienen las cifras anteriores pero parece que hay una tendencia, no significativa, en cuanto a mejor supervivencia global (SG) con la cirugía abierta<sup>68</sup>. Los estudios actualmente en marcha (NCT00297791 y NCT00470951) aclararán esta circunstancia.

## **RADIOTERAPIA**

Una de las principales finalidades de la radioterapia (RT) es la disminución de la recidiva local. En el cáncer de recto se ha demostrado que el grado de penetración en la pared y la afectación ganglionar son factores que se asocian a mayores tasas de recidiva local y un peor pronóstico<sup>69</sup>. Las tasas de recidiva que aparecen tras cirugía exclusiva oscila entre el 10% para los T1 N0 hasta el 40-50% para los T3-4 N1-2<sup>70</sup>.

En la década de los 70, se investigaron las regiones anatómicas donde aparece la recidiva local tras la cirugía con intención curativa<sup>71</sup>. Este primer trabajo allanó el camino para la identificación de pacientes con enfermedad de alto riesgo y traza la evolución de la radioterapia en el arsenal de tratamiento complementario en el cáncer de recto.

La RT ha demostrado su eficacia al disminuir las tasas de recidiva en el cáncer de recto y se puede utilizar de forma postoperatoria (adyuvante) o previo al tratamiento quirúrgico (neoadyuvante) unida o no a quimioterapia (QT).

Estaría indicada en aquellos pacientes en los que el tumor haya penetrado toda la pared y/o haya afectado a los ganglios regionales, es decir los estadios II y III. En el subgrupo de pacientes localizados en tercio superior y estadiados como T3 N0 M0 con mínima invasión al tejido perirrectal, hay probablemente poco beneficio con la RT adyuvante, pero todavía carecemos de estudios con un nivel de evidencia alto que demuestren que podemos prescindir de la RT en estos pacientes.

En los últimos años se está planteando en casos seleccionados prescindir del tratamiento radioterápico con la utilización de QT neoadyuvante<sup>72</sup>.

## **RADIOTERAPIA POSTCIRUGIA**

La experiencia de más de tres décadas con la utilización de RT tras la cirugía y numerosos trabajos demostraron que su empleo tras la cirugía consigue disminuir a un 20% el índice de recidivas locales. Hay que destacar que la RT, por sí sola, no

ha mejorado la supervivencia global en el cáncer de recto pero el mero hecho de poder disminuir la recidiva local es una meta muy importante a conseguir.

Con la publicación en 1990 de los ensayos prospectivos de dos grupos independientes: el Gastrointestinal Tumor Study Group (GITSG) y el North Central Cancer Treatment Group se demostró una mejoría, estadísticamente significativa, en cuanto al control local y en la supervivencia global cuando se asociaba la quimioterapia a la radioterapia. Estos resultados llevaron a la publicación en 1991 de la Consensus Conference del NIH<sup>73</sup>, en el que se recomendaban el tratamiento combinado con QT (5-FU modulado con Ac Folínico o Levamisol) y RT en aquellos pacientes en estadios II y III intervenidos por cáncer de recto. Durante ese tiempo la cirugía y la radioterapia aplicada de forma adyuvante fue el tratamiento estándar en pacientes con afectación de toda la pared y/o afectación ganglionar.

La extirpación del tejido graso que rodea a la pared rectal, que se considera responsable de la recidiva local (la recidiva en la anastomosis se considera anecdótica), ha permitido reducir la incidencia de fracaso local a menos del 10% pero a pesar de los magníficos resultados que se consiguen con la TME es arriesgado prescindir de la radioterapia tras la cirugía y numerosos estudios avalan esta afirmación como el trabajo de Kapiteijn y colaboradores<sup>74</sup> publicado en el NEJM en agosto del 2001 en que demuestra que la adición de radioterapia a la cirugía mejora el control local y es superior a la cirugía exclusiva.

El estudio canadiense de Temple <sup>75</sup> (Tabla 1) obtiene estos resultados a los 2 años de seguimiento:

	<b>RT más TME</b>	<b>TME exclusiva</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Recurrencia local %</b>	2,4	8,2	<b>&lt; 0,001</b>
<b>Supervivencia global %</b>	<b>82,0</b>	<b>81,8</b>	<b>0,84</b>

Tabla 1



Se puede afirmar que las menores tasas de fracasos locales observadas en los ensayos no se deben a la compensación de una cirugía de baja calidad sino más bien lo contrario, es decir que la RT potencia relativamente más a la “buena cirugía” que a la antigua cirugía habitual.

Para poder entender qué papel juega la RT en el tratamiento del cáncer de recto sería importante conocer cuántos pacientes van a recidivar tras la cirugía, aun realizando la escisión total del mesorrecto.

En la literatura médica podemos extraer datos muy favorables que justifican la utilización de RT, obtenidos de estudios realizados en grupos de pacientes considerados de pronóstico favorable, es decir aquellos con márgenes libres (R0), sin perforación y realización de una cirugía curativa correcta.

En la mayoría de los ensayos que han estudiado el papel de la RT postcirugía frente a cirugía exclusiva, se han observado diferencias estadísticamente significativas a favor del grupo tratado con RT, independientemente de la dosis y del fraccionamiento empleado (Tabla 2)

Estudio	Recidiva local %	Metástasis %	Supervivencia 5 años %
<b>GITSG (1986)</b>			
Cirugía	24	34	44
Cirugía + RT	20	30	52
<b>NASBP R-01 (1998)</b>			
Cirugía	25	26	48
Cirugía+RT	16	31	50
<b>Tveit (1997)</b>			
Cirugía	30	39	50
Cirugía+RT+QT	12	33	64

NASBP R-02 (2000)			
Cirugía+QT	13	29	65
Cirugía+QT+RT	8	31	66

Tabla 2

La principal ventaja de la radioterapia aplicada tras un tratamiento quirúrgico estriba en que se puede seleccionar los subgrupos de pacientes con mal pronóstico y permite una definición más clara del volumen tumoral, permitiendo al cirujano la utilización de marcadores radiopacos en aquellas localizaciones que se consideren de mayor riesgo de recidiva.

Como desventaja está que, a pesar de la utilización de mallas, se aumenta la cantidad de intestino delgado que entra dentro del campo de tratamiento, que el tejido es más hipóxico y por lo tanto se disminuye la eficacia de la radiación. Además en aquellos pacientes en los que se ha realizado una resección abdominoperineal es necesario incluir en el campo de tratamiento la cicatriz perineal lo que aumenta los efectos secundarios

## **RADIOTERAPIA PRECIRUGIA**

A mediados de los 90' comenzaron a aparecer, sobre todo en Europa, numerosos trabajos randomizados y no randomizados que demostraban que con la utilización de radioterapia antes de la cirugía se conseguía una disminución en la tasa de recidiva con unas tasas de complicaciones semejantes a las obtenidas con cirugía exclusiva, pero no fue hasta la publicación del ensayo sueco<sup>76</sup> en 1997 en que se demostró además, un aumento en la supervivencia en aquellos pacientes tratados con radioterapia preoperatoria. Este trabajo marcó un hito al ser el primero en demostrar que la RT, además de disminuir la recidiva local, podía por sí misma aumentar la SG. Rápidamente hubo un cambio en la mentalidad y cada vez más grupos de trabajo utilizaron la radioterapia de forma preoperatoria y de hecho Le

French Consensus Conference<sup>77</sup> recomendó la utilización de RT preoperatoria como tratamiento a pesar de la falta de ensayos randomizados controlados.

Tres metaanálisis publicados<sup>78, 79, 80</sup> (Camma, CRCCG y Figueredo) demuestran que la RT preoperatoria, con dosis efectivas biológicas mayores de 30 Gy, disminuye significativamente el riesgo de fracaso local y la mortalidad global comparándola con cirugía, siendo la reducción absoluta del fracaso local del 8,6% y la reducción absoluta de mortalidad a los 5 años del 3,5%. A pesar de estos datos se necesita identificar mejor a los pacientes que más se van a beneficiar

En cuanto a la toxicidad, en los ensayos que utilizan la radioterapia preoperatoria con fraccionamiento estándar o con una sola fracción de 5 Gy, no se observa ningún aumento en la mortalidad. En los ensayos que utilizan 5 fracciones de 5 Gy se observó un aumento en la mortalidad preoperatoria cuando se emplearon 2 haces (técnica no utilizada en la actualidad).

La incidencia de complicaciones postoperatorias incluyendo el sangrado, retraso en la cicatrización, dehiscencia de anastomosis y fístulas no se incrementan con la utilización de tratamiento preoperatorio.

Respecto a los efectos secundarios los más frecuentes son la diarrea (grado 3-4 en el 9% de los pacientes), náuseas, vómitos y astenia.

La mayoría de trabajos que han estudiado los efectos secundarios coinciden que son menores que los producidos con el tratamiento postcirugía.<sup>81</sup> (Tabla 3)

Efecto secundario	Tto. Preoperatorio	Tto. Postoperatorio	p
<b>Agudos</b>			
Diarrea	12	18	0,04
Hematológicos	6	8	0,27

Dermatológicos	11	15	0,09
Grado 3-4	27	40	0,001
<b>Crónicos</b>			
Gastrointestinales	9	15	0,07
Estenosis anastomótica	4	12	0,003
Urológicos	2	4	0,21
Grado 3-4	14	24	0,01

Tabla 3

Varios ensayos han comunicado que la función esfinteriana de los pacientes operados con una resección anterior baja es peor entre los pacientes irradiados que entre los no irradiados. La importancia de la inclusión del canal anal en el volumen de irradiación se desconoce, así como la evolución a largo plazo respecto al control de esfínteres.

Las ventajas de la utilización de la RT antes de la cirugía son varias:

- Al no estar manipulado el intestino delgado es más móvil y es menos probable que se incluya dentro del campo de irradiación.
- No se incluye la región perineal dentro del volumen a irradiar.
- El tejido está más oxigenado y la vascularización no está alterada mejorando la radiosensibilidad del tumor al disminuir la fracción hipóxica. Esto conlleva que radiobiológicamente a igualdad de dosis, sea más efectiva la radioterapia precirugía que la post, necesitándose teóricamente menos dosis. Así mismo, el tratamiento combinado aplicado previo a la cirugía es capaz de esterilizar el lecho tumoral y disminuir la siembra quirúrgica.

- Puede disminuir el tamaño del tumor y conseguir una disminución en el estadio (downstaging), que en la literatura médica alcanzan cifras de alrededor del 30-50%<sup>82</sup> consiguiendo convertir en operables aquellos tumores que previamente a la RT no lo eran. Esto es importante en el caso de tumores grandes, fijos y en aquellos considerados como inoperables al diagnóstico. El trabajo de Minsky<sup>83</sup> muestra que el 90% de los pacientes considerados por el cirujano como irresecables, se convirtieron en resecables con la utilización de un tratamiento combinado con RT y QT consiguiendo tasas muy altas de respuestas completas y tasas de resecabilidad global y completa del 60 y 90% respectivamente. Todos estos estudios demuestran la capacidad de reducción tumoral en estadios avanzados con un tratamiento combinado preoperatorio permitiendo potenciales resecciones curativas siendo el tratamiento estándar en muchas instituciones.
- Una ventaja cada vez más importante es la conservación del esfínter en aquellos pacientes con tumores en recto inferior. Al disminuir el tamaño del tumor se ganan unos centímetros vitales para la conservación de dicho esfínter. Por otra parte, la utilización de radioterapia permite dejar un margen quirúrgico de 2 cm o menos sin comprometer la recurrencia local, tal como lo demuestran numerosos trabajos publicados<sup>85,86</sup>.

#### Inconvenientes de la RT preoperatoria

El mayor inconveniente es el de tratar a pacientes que no necesitarían un tratamiento adyuvante, esto se consigue resolver seleccionando a los pacientes. La RMN con bobina transrectal permiten seleccionar con escaso margen de error a los pacientes junto con la TAC y la ecografía transrectal (con una alta sensibilidad del 90 y 75% para detectar la afectación parietal y ganglionar respectivamente).

#### Comparación entre la RT pre y post

Hay estudios que han comparado las dos modalidades de tratamiento, uno de ellos es el estudio de Sauer<sup>87</sup> en el que llega a las siguientes conclusiones:

- El tratamiento se puede llevar a cabo en la mayoría de los pacientes (89%) de forma preoperatoria.
- Tras el tratamiento preoperatorio hay un aumento significativo en el *downstaging* y se incrementa de forma significativa, más del doble, la preservación de esfínter.
- Las tasas globales de toxicidades tanto agudas como crónicas son menores para la aproximación precirugía, especialmente referido a la diarrea aguda o crónica y la estenosis en la anastomosis.
- La recurrencia local es significativamente menor en el grupo de la RT preoperatorio 6% vs 13%  $p < 0,006$ .
- No se demuestran diferencias significativas en la incidencia de metástasis ni en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) ni en la SG.

Como conclusión podemos decir que, debido a la disminución estadísticamente significativa de las recurrencias locales, la eficacia frente a los tumores localmente avanzados, la mayor conservación de esfínteres, el no presentar mayor número de complicaciones postquirúrgicas, la disminución de efectos secundarios y el conseguir la misma supervivencia hacen que el tratamiento prequirúrgico, con radioterapia con fraccionamiento estándar asociado a quimioterapia, sea el tratamiento estándar de los pacientes con cáncer de recto, especialmente en los casos de pacientes jóvenes con tumores situados en recto medio-inferior y especialmente en los tumores localmente avanzados.

### **Técnica de radioterapia**

La modalidad de tratamiento estándar es la RT3D aunque la utilización de la radioterapia de intensidad modulada (IMRT) se está aplicando cada vez con más asiduidad con objeto de poder administrar dosis más altas minimizando los efectos secundarios.

Los pacientes se colocan habitualmente en decúbito prono con la finalidad de desplazar cranealmente las asas intestinales debido a la presión que ejerce el abdomen sobre la mesa de tratamiento.

En pacientes con un abdomen voluminoso la utilización de dispositivos tipo “belly board” (Figura 4) permite proteger aún más las asas intestinales.



Figura 4

La técnica más empleada es la de 3 campos: PA y dos laterales opuestos (Figura 5). Con esta técnica se protege una parte de la vejiga y el intestino delgado, que es el órgano más sensible a la radiación.

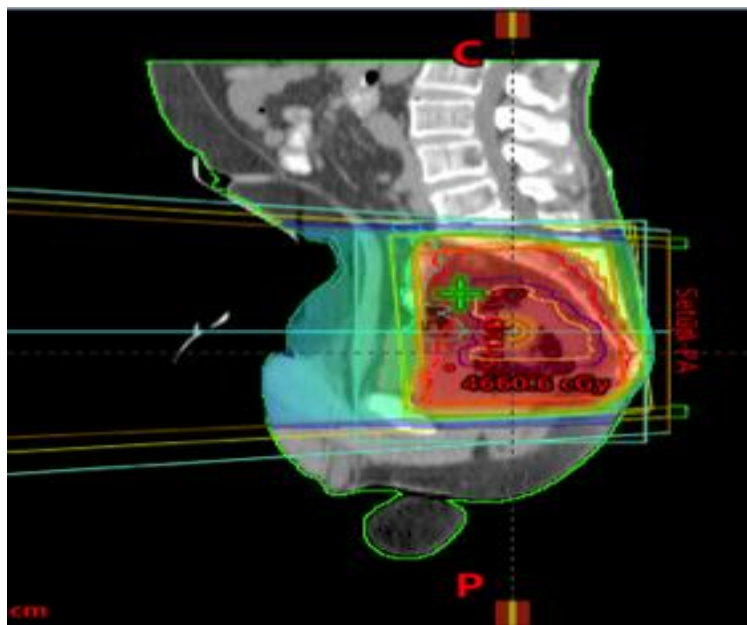
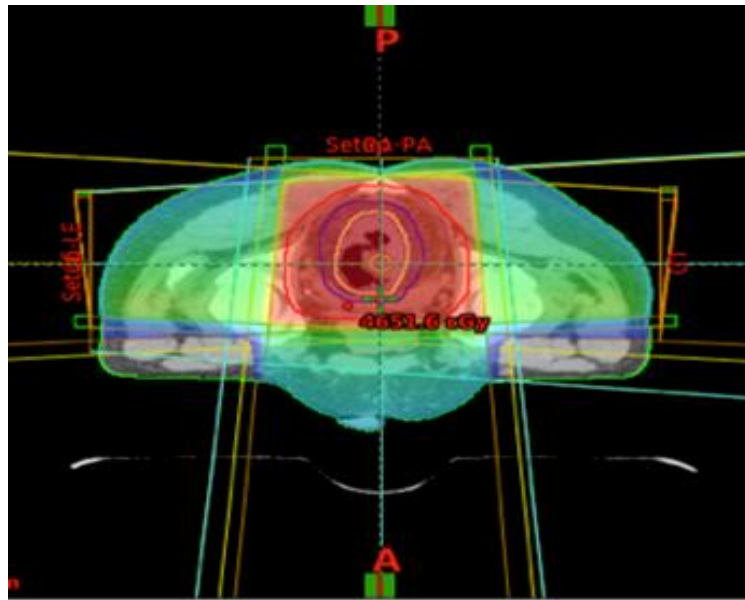


Figura 5



### 1.- Dosis

La dosis de radioterapia administrada varía en función si se hace un tratamiento en 5 sesiones (“short course”) o lo que es más habitual, si se combina con quimioterapia y se administra una dosis entre 45 y 50 Gy en 25-28 sesiones.

En nuestro medio existe una infrautilización del ciclo corto que preferentemente estaría indicado cuando no se puede asociar quimioterapia, en pacientes ancianos o frágiles y en pacientes metastásicos cuando se va a realizar una cirugía rectal.

### 2.- Regiones anatómicas a irradiar:

- Mesorrecto, tejido adiposo con estructuras neurales y linfocvasculares que queda englobado por la fascia mesorrectal
- Área pélvica posterior: espacio presacro y el plexo hipogástrico inferior.
- Área pélvica lateral y zona lateral más allá de la fascia mesorrectal.
- Área pélvica inferior: incluye el triángulo anal del periné, esfínter anal, espacio perianal, y la fosa isquiorrectal.
- Área pélvica anterior: órganos pélvicos anteriores al mesorrecto (si hay afectación).
- Ganglios linfáticos.

### 3.-Determinación de volúmenes de tratamiento

Existen varias guías clínicas para la delimitación de volúmenes. Las más utilizadas son las que proponen la EORTC<sup>88</sup> y la RTOG<sup>89</sup>.

Para definir el volumen a tratar siguen las indicaciones de la ICRU donde se distinguen varios volúmenes:

#### - GTV (gross tumor volumen):

Se determina por la palpación o técnicas de imagen, contiene el GTV primario y el ganglionar

GTV-1: tumor + adenopatías

GTV-2: tumor y mesorrecto.

**- CTV (clinical target volumen):**

CTV: incluye áreas de enfermedad macroscópica (GTV) y localizaciones de enfermedad subclínica. Para cubrir bien el mesorrecto se debe dar un margen de 2 cm en sentido craneal y caudal a la enfermedad macroscópica. Los límites laterales a cubrir deben alcanzar la musculatura de la pared pélvica o el hueso pélvico cuando no existe músculo. Anteriormente se recomienda coger dentro del campo la pared posterior vesical. Para cubrir bien los linfáticos es suficiente seguir el trayecto de los grandes vasos con un margen de 7-8 mm.

Si el tumor afecta al esfínter, al ano o infiltra estructuras pélvicas se deben irradiar también los ganglios ilíacos externos.

En caso de tratamiento postoperatorio se incluye el lecho tumoral (definido por clips quirúrgicos o por técnicas de imagen) con el mismo margen de seguridad.

**- PTV (Planning Target Volume)**

Es el volumen que debemos generar a partir del CTV para asegurar que la dosis prescrita se administre realmente a ese volumen. Debemos tener en cuenta: movimientos fisiológicos y variaciones en tamaño, localización, forma de órganos y tejidos que están contenidos o adyacentes al CTV. Esto corresponde al Margen Interno (IM).

Nuytten<sup>90</sup> concluye que en tumores de recto superior todos los bordes del CTV son estables ya que están determinados por el hueso, músculo y grandes vasos, mientras que en la pelvis inferior, próximo a vejiga es donde más variaciones hay en el desplazamiento anterior del CTV (desviación estándar de 1 cm). El PTV se obtendrá expandiendo el CTV 1 cm de manera uniforme en todos los niveles pélvicos excepto en aquellos en que coincidan con la vejiga en donde se aumentará el margen a 2 cm.

Habitualmente definimos 2 PTV:

- PTV-1: se genera a partir del CTV + 1 cm. de margen y recibe habitualmente una dosis de 45 Gy a un fraccionamiento de 180 cGy por sesión
- PTV-2: a partir del CTV-2 se administra una dosis de 5.4 Gy si los márgenes son negativos o no se puede excluir el intestino delgado o de 9 Gy si los márgenes son próximos o están afectados y al mismo tiempo se puede excluir intestino delgado

#### 4. Órganos de riesgo

El intestino delgado es el órgano más importante a tener en cuenta en el momento de la planificación. Se contornea la porción de intestino delgado que se encuentra dentro de la pelvis, hasta 2-3 cm. por encima del límite craneal del PTV y por lo tanto deberemos hablar de volumen de órgano y no de porcentaje al no estar contorneado el órgano completo. Siguiendo las tablas de Emami <sup>91</sup> se recomienda que no más de 150 cc reciban una dosis mayor a 40 Gy ( $V_{40} < 150$  cc). Si se determina las asas intestinales de forma aislada se aconseja que el volumen de intestino que reciba 15 Gy sea menor de 120 cc. (Figura 6).

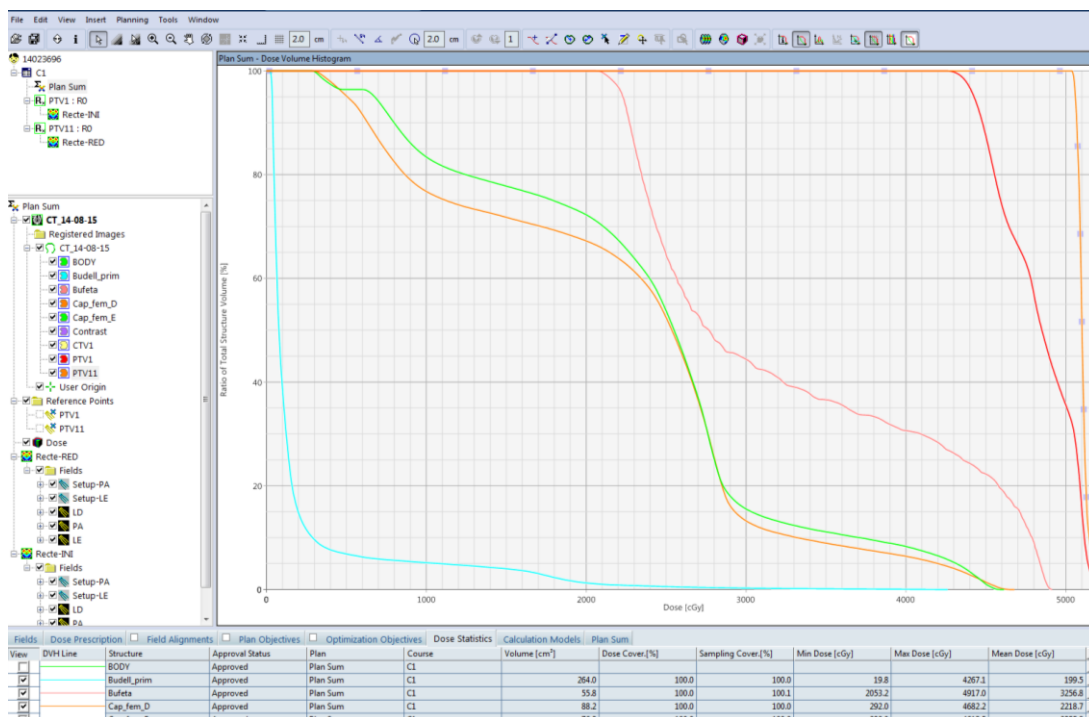


Figura 6

## QUIMIOTERAPIA

En una reciente revisión de la Cochrane se demuestra que la adición de quimioterapia a la radioterapia preoperatoria en pacientes estadio III reduce el riesgo de recidiva local sin afectar mortalidad perioperatoria, la conservación de esfínteres y la toxicidad tardía<sup>92</sup>.

El fármaco más utilizado en el cáncer de recto es el 5-fluorouracilo (5-FU) y a pesar que se ha utilizado durante más de 50 años no es muy efectivo para el cáncer de recto. Al principio los esquemas utilizados administraban el 5-FU en forma de “bolus” a dosis de 500 mg/m<sup>2</sup>/día, 3 días durante la primera y última semana de la radioterapia.

Con la publicación del estudio de la Clínica Mayo/NCCTG 86-47-51 se observó una mayor eficacia en los pacientes tratados con 5-FU en infusión continua (IC) frente aquellos que recibieron 5FU en bolus junto a la radioterapia<sup>93</sup>. La infusión continua consigue mejores tasas de control local, supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad por lo que esta modalidad ha reemplazado a la utilización en forma de bolus y se ha convertido en la estándar.

La **capecitabina** es una fluoropirimidina oral que se absorbe en el tracto gastrointestinal y se convierte en 5-FU. Se ha demostrado, al igual que el 5-FU, su efecto sinérgico con la RT. Estudios recientes<sup>94</sup> han demostrado que la capecitabina obtiene unos resultados similares o por lo menos no inferiores a la infusión de 5-FU pero con las ventajas de la administración oral y existiendo una tendencia a la superioridad de resultados con la utilización de capecitabina. De hecho, actualmente la utilización concomitante con RT de la capecitabina es el tratamiento recomendado en las guías más utilizadas. Como efectos secundarios a destacar el síndrome mano-pie que se presenta con mayor frecuencia que con el 5-FU y la toxicidad hematológica y digestiva que es similar a la del 5-FU. La dosis más utilizada es la de 825 mg/m<sup>2</sup> cada 12 horas, 5 días a la semana durante la radioterapia.

En un intento de mejorar los resultados del 5-FU se ha utilizado el **oxaliplatino**, un platino de tercera generación que impide la replicación y transcripción del DNA. Cuando se combina con 5-FU y Leucovorín en cáncer de colon metastásico aumenta

la SG pero su utilidad en el cáncer de recto se estudió en el ensayo randomizado NASBP R-04<sup>95</sup> que comparó la administración del 5-FU en IC con/sin oxaliplatino y capecitabina con/sin oxaliplatino. Los resultados obtenidos de los 1069 pacientes demuestran que no se encuentran diferencias en las respuestas completas obtenidas ni en la tasa de conservación de esfínter ni en el downstaging. En cambio, se ha comprobado un aumento de la toxicidad cuando se añade oxaliplatino<sup>96</sup> por lo que actualmente su utilización no se recomienda. Sin embargo, hay que destacar que en los pacientes tratados con oxaliplatino se mejora la recurrencia local (39.4% vs. 28.9%, P=0.008), como lo demuestra el estudio ACCORD 12<sup>97</sup> por lo que se deja una puerta abierta a su utilización en espera de futuros resultados.

El abanico terapéutico del tratamiento con quimioterapia en el cáncer de recto es muy amplio y se ha ensayado numerosos fármacos como el **UFT** (una combinación oral de ftorafur más uracilo) que se mostró eficaz y cómodo en el tratamiento preoperatorio del cáncer de recto con unas tasas de RCp del 9%<sup>98</sup>.

El **leucovorín** es un fármaco que se ha utilizado en cáncer de colon metastásico y aumenta la eficacia del 5-FU. Su papel no está definido ya que no hay ensayos randomizados.

Otro fármaco utilizado es el **irinorecán**, que es un inhibidor de la topoisomerasa I con propiedades radiosensibilizantes, pero que no ha demostrado beneficio frente al 5-FU y en contraposición aumenta la toxicidad<sup>99</sup>.

La utilización de agentes biológicos como el **bevacizumab** en neo adyuvancia parece prometedora, sobre todo en tumores localmente avanzados<sup>100 101</sup>. No se han observado aumento en la toxicidad aguda, pero hay que esperar resultados de los ensayos fase III. Los ensayos con **cetuximab** no han demostrado beneficios por lo que no se recomienda su utilización combinada con 5-FU<sup>102</sup>.

Nuevos agentes diana como el **gefitinib y el panitumumab** se están mostrando prometedores en ensayos preclínicos, aunque se necesitan más estudios para poder recomendarlos en la práctica diaria.

Como resumen podemos afirmar que múltiples ensayos fase I y II sugieren que la utilización de nuevos fármacos citotóxicos con los clásicos esquemas basados en el

5-FU, para pacientes con cáncer de recto probablemente aumenten las tasas de respuestas patológicas y los resultados a largo plazo.

Actualmente el tratamiento estándar y recomendado por guías de práctica clínica en pacientes diagnosticados de cáncer de recto localmente avanzados (estadios II y III) consiste en la utilización de radioterapia concomitante con quimioterapia. Últimamente están apareciendo estudios que apoyan la utilización de QT neoadyuvante con el objetivo de incrementar las tasas de respuesta y aumentar la supervivencia.<sup>103,104</sup>.

Todos estos hechos han permitido que el tratamiento adyuvante en el cáncer de recto permanezca como una de las mayores controversias en la Oncología y aún hoy en día no esté claramente establecido qué tratamiento es el más adecuado.



# *FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA*

---





## FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA

Dado que actualmente el tratamiento estándar es ofrecer a los pacientes estadiados como T3-T4 y/o N+ radio-quimioterapia preoperatoria, el efecto del “downstaging” y la obtención de respuesta completa al tratamiento adquiere cada día más importancia.

En el estudio del German Rectal Cancer Study<sup>105</sup> se demostró que los factores pronósticos independientes más importantes, en el análisis multivariado en cuanto a la supervivencia libre de la enfermedad, son la categoría T y el estado ganglionar patológico. En este ensayo, se utilizó la clasificación de Dworak <sup>107</sup>.

El grado de regresión tumoral tras el tratamiento (TRG) se determinó por la cantidad de tumor viable frente a la fibrosis. Así el TRG 0 se definió como la ausencia completa de fibrosis, mientras que TRG 4 no mostró células tumorales viables. El TRG 1 se define como una masa tumoral morfológicamente inalterada, el TRG 2 muestra la regresión <50% y el TRG 3 muestra la regresión > 50% con la fibrosis superando la masa. Los resultados mostraron que la tasa de supervivencia libre de enfermedad a los 5 años después del tratamiento fue del 86% para TRG 4, el 75% de TRG agrupados 2 -3, y 63% para TRG agrupadas 0-1 (p = 0,006).

Con la premisa de que una mejor respuesta patológica a la neoadyuvancia se correlaciona con mejores resultados, la búsqueda de factores relacionados, bien con tratamientos más activos bien con la determinación de factores clínicos y biológicos, se ha vuelto más importante que nunca.

La biología del cáncer rectal presenta unas alteraciones genéticas y moleculares que se han estudiado en los últimos veinte años y algunas de estas alteraciones se han identificado como marcadores de pronóstico mientras que otras predicen la respuesta al tratamiento.

El conocimiento de factores que puedan predecir la respuesta a la radio-quimio preoperatoria es muy importante porque podría permitir la utilización de estrategias más agresivas en aquellos pacientes que es poco probable que

respondan al tratamiento estándar. Además, se favorecería el desarrollo de nuevos esquemas terapéuticos con una mejor utilización del gasto sanitario, ya que se piensa que la respuesta al tratamiento prequirúrgico va a predecir la respuesta a largo plazo. Actualmente no se ha establecido de forma absoluta cuales serían estos factores.

Entre los criterios clínicos e histológicos clásicos estudiados como posibles marcadores de respuesta al tratamiento estarían:

- la distancia menor de 5 cm al margen anal
- la extensión circunferencial del tumor
- el TNM clínico
- el grado de diferenciación histológico
- el grado de regresión tras el tratamiento neo-adyuvante<sup>108</sup>
- los niveles de CEA > de 5 ng/mL determinados antes del tratamiento neoadyuvante<sup>109</sup>.

Entre los factores moleculares relacionados con la respuesta al tratamiento destacan:

- La expresión del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)<sup>110,111</sup> que ocurre en el 50-70% de los tumores predice la respuesta a la radioterapia preoperatorio o a la quimio-radioterapia.
- La sobreexpresión de la ciclooxygenasa-2<sup>112</sup> se asocia con una peor respuesta al tratamiento preoperatorio y conlleva peor pronóstico ya que media en la producción de metástasis y la invasión tumoral.
- La sobreexpresión de p53 y de p21 que están asociadas a radio-resistencia.
- La expresión de Bcl 2 y Bax se ven implicadas en la activación de las caspasas.
- El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) incrementa la angiogénesis y es un marcador de hipoxia que está implicado tanto en la resistencia a la QT como a la RT<sup>113</sup> y su determinación pre-tratamiento predice la respuesta al mismo<sup>114</sup>.

- El índice de proliferación elevado, que está regulado por los tejidos hipóxicos, predice a los no respondedores o a los que responden parcialmente<sup>115</sup>.
- La familia K-ras se considera que juega un papel en los procesos de señalización. La mutación de K-ras en el codón 12, se asocia especialmente a un peor pronóstico<sup>116</sup> y la combinación de mutaciones de p53 y K-ras representan un valioso factor predictivo negativo para el cáncer rectal.
- El gen de la timidilato sintetasa (TS), localizado en el brazo corto del cromosoma 18, es el responsable de la resistencia al 5-Fluorouracilo y se relaciona con la presencia de metástasis a nivel pulmonar y hepático. Aproximadamente el 65-69% de los cánceres de recto son TS positivo y tienen peor pronóstico que los TS negativos. Se considera que es uno de los mejores predictores de sensibilidad o resistencia a la radio-quimioterapia preoperatoria en tumores localmente avanzados<sup>117</sup>.
- La aneuploidía se asocia con menor supervivencia.
- La determinación de la fracción celular que está en fase S podría predecir una mayor tasa de recurrencias<sup>118</sup>.

Dado que ninguno de los factores enumerados anteriormente ha resultado ser absolutamente específico para predecir resistencia al tratamiento neoadyuvante en el cáncer colorrectal, **en este estudio se pretende objetivar el valor de la expresión de tres proteínas (NF-kB, HIF-1 $\alpha$  y FLIP), como marcadores predictivos de respuesta a la quimio-radioterapia neoadyuvante en el cáncer de recto.**

El **factor nuclear kB (NF-kB)** comprende una familia de factores de transcripción relacionados con la regulación de una amplia variedad de respuestas biológicas como la respuesta inmune y la inflamación, pero desempeña un papel aún más importante en la oncogénesis. NF-kB juega un papel primordial en el desarrollo y progresión del cáncer, así como la proliferación, la migración y la apoptosis<sup>119</sup>. Esta familia está compuesta por cinco miembros: p65 (Rel A), p50/105, p52/100, c-Rel y

Rel B. Los miembros de esta familia forman homo y heterodímeros que son la forma activa de NF- $\kappa$ B. En la mayoría de células el dímero más común es p50/p65.

Las cinco subunidades de NF- $\kappa$ B se encuentran en forma inactiva en el citoplasma, asociadas a distintos miembros de la familia de proteínas inhibidoras I $\kappa$ B. Una gran variedad de estímulos (TNF $\alpha$ , quimioterapia) induce la fosforilación de I $\kappa$ B, por acción de las cinasas de I $\kappa$ B (IKKs), y su consiguiente ubiquitinización y degradación por el proteasoma. A continuación, las subunidades de NF- $\kappa$ B son liberadas, y se translocan al núcleo, en donde forman dímeros, y activan la transcripción de genes involucrados en proliferación celular, angiogénesis, adhesión celular o apoptosis. En la práctica es sencillo valorar la activación de NF- $\kappa$ B en las células tumorales; las células con actividad de NF- $\kappa$ B muestran expresión nuclear de las distintas subunidades, mientras que la expresión citoplásmica refleja falta de activación. NF- $\kappa$ B tiene un papel crítico en la respuesta a la quimioterapia.

La activación de NF- $\kappa$ B es un efecto común de los fármacos antitumorales, ya que fármacos distintos sin ninguna relación estructural o funcional, como las antraciclinas, los taxanos o los alcaloides de la vinca son capaces de activar a NF- $\kappa$ B. Esta activación de NF- $\kappa$ B puede bloquear parcial o completamente el efecto citotóxico de la quimioterapia, por la expresión de genes antiapoptóticos.

Los tumores con activación de NF- $\kappa$ B suelen mostrar un aumento de resistencia a la quimioterapia ya que se ha comprobado que dicha activación bloquea la eficacia de la misma, así como de la radioterapia y se ha sugerido que la NF- $\kappa$ B induciría la expresión de resistencia a múltiples fármacos mediada por P-glicoproteína. Por otra parte, se piensa que la inhibición de NF- $\kappa$ B mejoraría la respuesta apoptótica a la radioterapia y a la quimioterapia, y se propone la asociación de inhibidores del proteasoma (como el Bortezomib) a este último tratamiento. También se plantea el uso de agentes que inhiban la vía NF- $\kappa$ B de forma más específica que los inhibidores del proteasoma, como por ejemplo los inhibidores de IKK.

Es importante tener en cuenta que la inhibición de NF- $\kappa$ B puede dar lugar tanto a activación como a inhibición de la apoptosis, dependiendo del tipo de estímulo, tipo celular o situación adaptativa en que se encuentra la célula. La expresión de NF- $\kappa$ B en el cáncer colorrectal es positiva en un 60% de los casos, aproximadamente. Se ha

comprobado que los tumores que no expresan NF-kB presentan unas mayores tasas de respuestas, un mayor tiempo hasta la progresión y una mejor supervivencia global<sup>120 121</sup>.

La adaptación celular a la hipoxia y la neovascularización tumoral están relacionadas con un comportamiento agresivo y resistente a los tratamientos clásicos. Actualmente conocemos que algunos genes implicados en la eritropoyesis, angiogénesis y en el metabolismo energético son activados por el **factor inducible por la hipoxia (HIF-1)**<sup>122 123</sup> que es un factor de transcripción que regula la homeostasis y la respuesta fisiológica a la privación de oxígeno. HIF-1 es un heterodímero compuesto por dos subunidades, HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$ . HIF-1 $\alpha$  determina la actividad de HIF-1 y su expresión está regulada por el oxígeno (O<sub>2</sub>). En condiciones de hipoxia, la degradación de HIF-1 $\alpha$  por la vía del proteasoma está inhibida, lo que conduce a la acumulación de la proteína HIF-1 $\alpha$ .

HIF-1 $\alpha$  controla la expresión de genes que contienen elementos de respuesta a la hipoxia HREs y que juegan un papel crucial en la adaptación a la privación de O<sub>2</sub>, la glicolisis, la inhibición de la apoptosis, la diferenciación celular y la angiogénesis. Entre ellos se encuentra el VEGF. Sin embargo, bajo ciertas condiciones HIF-1 $\alpha$  induce la apoptosis y lo hace por dos mecanismos. Por una parte, incrementa la estabilidad de la proteína p53, que induce la apoptosis por mediación de BAX, PUMA y NOXA. Por otra parte, HIF-1 $\alpha$  activa las proteínas proapoptóticas BNIP3 y NIX. HIF-1 $\alpha$  se expresa en tumores sólidos, pero no en tejidos normales o tumores benignos. HIF-1 $\alpha$  se expresa frecuentemente en el cáncer de colon.

Entre un 45-80% de los casos muestran expresión citoplasmática y nuclear, cuando la expresión en tejidos normales es citoplasmática. La expresión de HIF-1 $\alpha$  se ha asociado con la invasión profunda, venosa, linfática, el estadio de Dukes, la presencia de metástasis hepáticas y un pronóstico adverso<sup>124</sup>.

A pesar de la dualidad de función de HIF-1 $\alpha$  (pro y antiapoptótica), parece claro que HIF-1 $\alpha$  participa en la apoptosis inducida por la radioterapia, lo que hace pensar que la resistencia a la radioterapia podría estar debida a la protección vascular inducida durante la hipoxia.

Existen muchas evidencias que señalan que HIF-1 $\alpha$  tiene un importante papel, no sólo en la respuesta a la radioterapia, sino también en el tratamiento general del cáncer con sustancias quimioterápicas, ya que HIF-1 $\alpha$  activa múltiples genes que participan en diversos procesos celulares.

Numerosos estudios clínicos y preclínicos han implicado a HIF-1 $\alpha$  en la resistencia a la radiación. En diversos tipos de tumores, como por ejemplo los cánceres de orofaringe, la sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$  en la biopsia pre-tratamiento se asocia a menor probabilidad de alcanzar la remisión completa tras la radioterapia. Se ha postulado que la radioterapia causa reoxigenación de células tumorales hipóxicas, y la producción de especies reactivas de oxígeno, que inducen la actividad de HIF-1 $\alpha$ , incrementan la transcripción de VEGF y bFGF y promueven la supervivencia de las células endoteliales, y a su vez, de las propias células tumorales.

Otra de las vías implicadas en el fracaso del tratamiento antitumoral es la supresión de la apoptosis. Aunque la resistencia a la radioterapia se ha atribuido generalmente a procesos de resistencia a la apoptosis por la vía intrínseca o mitocondrial, parece que la apoptosis extrínseca también puede jugar un importante papel.

Algunas proteínas anti-apoptóticas como la proteína inhibitoria FLICE (**FLIP**)<sup>125</sup> están sobre-expresadas en algunos tumores como el de próstata, linfoma de Hodgkin, cáncer gástrico y de vejiga. Altos niveles de expresión de FLIP conllevan una inhibición de la apoptosis extrínseca.

En la vía extrínseca, se han aislado ocho receptores de la superfamilia de receptores del TNF $\alpha$ . Después de la unión a sus ligandos naturales, los DD (death domain) de los receptores reclutan proteínas adaptadoras como FADD y TRADD que, a su vez, se unen a las caspasas iniciadoras (caspasa8/caspasa10). Estas se procesarán generando sus formas activas. La apoptosis por la vía extrínseca se encuentra regulada por diferentes genes. c-FLIP codifica para una proteína con gran homología estructural a caspasa-8 y compite con ella por la unión a FADD.

La sobreexpresión de FLIP confiere resistencia de estas líneas a la apoptosis mediada por FasL y TRAIL. Aunque la apoptosis extrínseca se desencadena predominantemente por la acción de los factores de muerte, existen evidencias que

apuntan que también puede activarse por otras causas, como es el caso de fármacos quimioterápicos.

También se ha visto que la radiación o la quimioterapia aumentan la sensibilidad de las células tumorales a la muerte celular por factores de muerte, y se ha sugerido que la sobreexpresión de FLIP interferiría en este proceso. Se ha visto que el receptor DR5 es un importante mediador de la apoptosis tras el tratamiento con 5-FU u oxaliplatino.

De la misma manera que la sobreexpresión de FLIP inhibe la apoptosis en respuesta a la quimioterapia común en el cáncer colorrectal, la supresión de FLIP sensibiliza a las células de cáncer de colon a la quimioterapia, en ausencia de factores de muerte.

Estos resultados sugieren que FLIP pudiera ser un importante marcador de resistencia a la quimioterapia en el cáncer colorrectal<sup>126</sup>, especialmente si se tiene en cuenta que la sobreexpresión de FLIP se observa en más del 33% de los cánceres colorrectales<sup>127</sup>.





## *HIPOTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO*

---



## **HIPOTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO**

### **HIPOTESIS DE TRABAJO**

La activación de NF-kB, FLIP y HIF-1, en el tejido tumoral, es capaz de predecir la respuesta a la quimio-radioterapia neoadyuvante en pacientes diagnosticados de cáncer de recto estadios II y III.

### **OBJETIVO PRINCIPAL**

Analizar la relación de la expresión de NF-kB, FLIP y HIF-1 (tanto por separado como en conjunto), valorados por inmunohistoquímica, en el tumor inicial (biopsia diagnóstica) con la respuesta patológica completa final (pieza de resección) determinada por el grado de regresión tumoral, según criterios de Mandard, y de “downstaging” (disminución del estadio clínico).

### **OBJETIVO SECUNDARIOS**

- Analizar el grado de respuesta obtenido tras el tratamiento neoadyuvante
- Analizar el porcentaje de metástasis y recidivas locales



## *MATERIAL Y METODO*

---



## **MATERIAL Y MÉTODO**

### **Población**

La población sobre la que se realizó el estudio fue de 152 pacientes, diagnosticados de adenocarcinoma de recto estadio II y III (cT3-4 N0/+M0) remitidos al Servicio de Oncología Radioterápica del H.U. Arnau de Vilanova de Lleida.

### **Criterios de inclusión**

Todos los pacientes debían ser mayores de 18 años y tener un diagnóstico de adenocarcinoma de recto confirmado histológicamente. La localización del tumor bien por endoscopia o por técnicas de imagen fue entre 0 y 15 cm a partir del margen anal.

El estadio clínico se estableció por métodos de imagen de acuerdo a la estadificación TNM (Anexo 1).

Todos los pacientes presentaron un estado general con un valor de la escala ECOG<sup>128</sup> (Eastern Cooperative Oncology Group) entre 0 y 1

### **Criterios de exclusión**

La presencia de comorbilidad severa, la administración previa de radioterapia pélvica, el antecedente de enfermedad oncológica previa no controlada, el embarazo y las limitaciones psíquicas o sociales que impidiesen una correcta aplicación del tratamiento fueron los criterios de exclusión.

### **Periodo de estudio**

El periodo de inclusión de los pacientes intervenidos en el HUAV fue el comprendido desde enero del 2002 hasta agosto del 2009 aunque se incluyeron algunos pacientes tratados desde 1998 y que fueron intervenidos en el hospital de Barbastro.

### **Descripción de estudio**

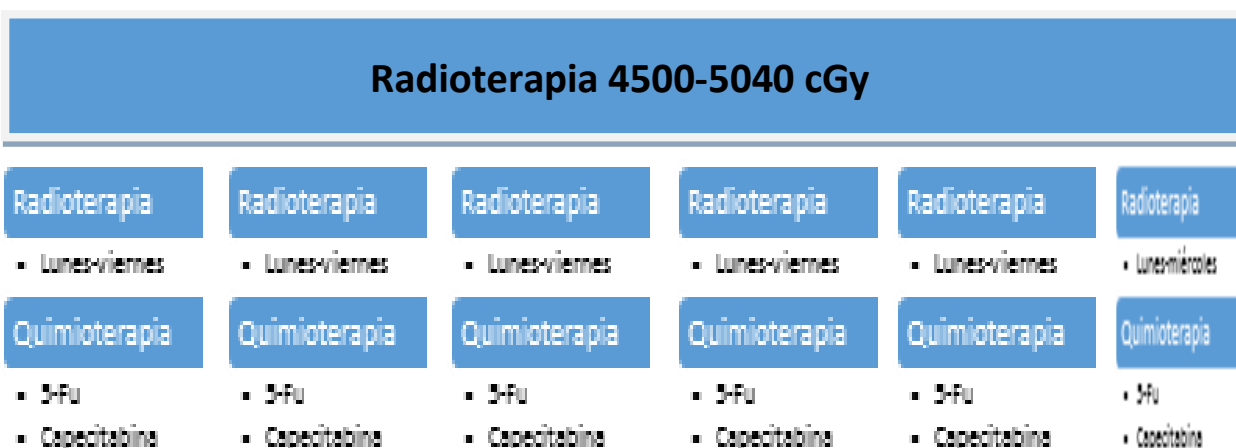
Todos los pacientes completaron un tratamiento neoadyuvante con radioterapia-quimioterapia y posterior cirugía en el H.U. Arnau de Vilanova, en el Hospital de Santa María de Lleida, la Clínica de Ponent de Lleida o el Hospital de Barbastro.



En todos los pacientes se realizó una historia clínica, una exploración física que incluía el tacto rectal, rectoscopia o colonoscopia con toma de biopsia del tumor, una RNM o TC para determinar el grado de penetración a través de la pared rectal y la presencia o ausencia de adenopatías loco-regionales.

El consentimiento informado, que fue aprobado por el comité ético del hospital Arnau de Vilanova, se obtuvo en todos los pacientes.

Tras la confirmación histológica de cáncer de recto y tras la realización de pruebas complementarias para la estadificación del tumor cada paciente recibió tratamiento neoadyuvante con quimio-radioterapia. La radioterapia consistió en la administración de 45-50,4 Gy a un fraccionamiento de 180 cGy/día 5 días a la semana.



Todos los pacientes fueron tratados con un esquema de quimioterapia concomitante basado en fluoropirimidinas, esto incluye esquemas de tratamiento que combinan Oxaliplatino con 5-FU en infusión continua, Irinotecán con 5-FU en infusión continua, Oxaliplatino con Capecitabina o Capecitabina exclusiva según el protocolo imperante en el momento del tratamiento.

A la finalización del tratamiento se realizó nueva valoración clínica y radiológica, previa a la cirugía, para evaluar la eficacia del tratamiento.

Después de un periodo de 6-8 semanas tras la finalización del tratamiento neoadyuvante los pacientes se intervinieron en los distintos hospitales de referencia. En todos los casos se realizó cirugía con escisión total del mesorrecto.

Las muestras quirúrgicas se examinaron siguiendo un protocolo preciso. El margen del mesorrecto fue teñido y, después de la fijación, las muestras se seccionaron en cortes de 3-5mm. La superficie del recto que carece de peritoneo fue examinada en toda su circunferencia determinando su integridad. En todos los casos, la calidad de la técnica quirúrgica fue completa con sólo pequeñas irregularidades de la superficie mesorrectal y en ningún espécimen había defectos en su superficie de más de 5 mm de profundidad.

Se confeccionó un informe protocolizado que incluía el tipo de tumor, el grado histológico, márgenes tumorales (infiltrativos o expansibles), afectación linfovascular y la invasión perineural, el estado de los márgenes: proximal, distal y el radial (éste último se consideró negativo si el tumor estaba a más de 1 mm de la superficie), la afectación ganglionar, el estadio tras el tratamiento (ypTNM), y el grado de regresión del tumor (TRG), basado en la clasificación de Mandard<sup>129</sup>.

<b>Grado de regresión del tumor</b>	<b>Descripción</b>	<b>% células tumorales</b>
<b>GR1</b>	no se encuentra carcinoma	<1%
<b>GR2</b>	algunas células neoplásicas/glándulas aisladas residuales	1-20%
<b>GR3</b>	predominio de fibrosis sobre el tumor	21-50%
<b>GR4</b>	regresión parcial con predominio de tumor sobre fibrosis	51-80%
<b>GR5</b>	tumor sin cambios	> 80%

Se revisaron las historias clínicas y la documentación radiológica de los pacientes y se recogieron los siguientes parámetros:

- Edad
- Sexo
- Distancia del tumor
- Fecha diagnóstico histológico
- Estadio tumoral
- Clasificación T N M
- Cuantificación del valor del antígeno carcinoembrionario (CEA) pre-tratamiento
- Fecha inicio tratamiento neoadyuvante
- Esquema de quimioterapia utilizado
- Dosis de radioterapia administrada
- Toxicidades recogidas
- Fecha fin de tratamiento neoadyuvante
- Fecha de la cirugía
- Tipo de cirugía empleada
- Complicaciones postoperatorias inmediatas
- Informe anatomopatológico con determinación del grado de regresión tumoral
- Estadio tumoral post-tratamiento
- Clasificación T N M patológico
- Fecha último seguimiento
- Existencia de toxicidad crónica
- Fecha del primer evento tumoral
- Tratamiento empleados tras el primer evento tumoral
- Fecha del último seguimiento
- Fecha del éxitus

El tiempo de seguimiento fue calculado entre la fecha de la resección del tumor y la fecha de la muerte o la de la última visita, para los pacientes que sobreviven. Noviembre del 2011 fue la última fecha de seguimiento. La supervivencia libre de

enfermedad (SLE) se definió como el tiempo libre de recidiva local, metástasis o fallecimiento del paciente.

### Muestras de tejidos

De cada paciente se utilizaron dos muestras, que fueron fijadas previamente en formol e incluidas en parafina:

- 1) la biopsia diagnóstica obtenida durante la colonoscopia;
- 2) tejido de la pieza quirúrgica después del tratamiento neoadyuvante.

Para cada muestra, se analizaron tanto el tejido tumoral como el tejido normal.

### Diseño del array matricial de tejidos (TMA)

Se confeccionó un array que permitió la identificación de cada cilindro, la disposición de la muestra en el array y la determinación del número de muestras incluidas representativas del tumor. Para ello se utilizó un “manual arrayer” (Beecher Instruments) (Figura 7).

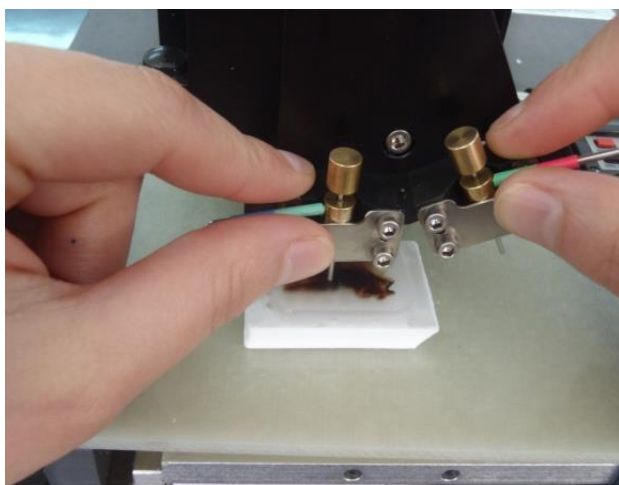


Figura 7. Foto del Manual Arrayer de Beecher Instruments.

Bloque de array

De las muestras de tejido tumoral de cada paciente se extrajeron 4 cilindros de 0,6 mm de diámetro mayor y un cilindro de muestra de tejido no tumoral siempre que la muestra histológica lo permitió.

Una vez hecho el bloque de array se utilizó una sección, es decir, un corte de 5 micras del bloque del array de tejidos fijado en un portaobjetos, para teñir con eosina y hematoxilina y poder corroborar el tipo de tejido de cada cilindro.

Finalmente, se valoró la integridad antigénica de los cilindros del bloque array, realizando una tinción inmunohistoquímica de Ki67 y vimentina, que permitió valorar la integridad antigénica de las proteínas nucleares y citoplasmáticas, respectivamente. Se valoró de cada caso, la tinción del tumor y del tejido normal. Aquellos casos, donde la expresión de estos antígenos no fue la esperada, se excluyeron de la interpretación de las proteínas objeto de estudio.

### **Análisis inmunohistoquímico**

Se ha utilizado una técnica de Inmunohistoquímica enzimática, que permite una localización precisa, siendo su tinción permanente, estable y puede ser contrastada y evaluada en el microscopio de luz. En concreto se trata de la técnica inmunoperoxidasa, ya que la enzima utilizada es la peroxidasa, donde a la visualización de la reacción antígeno-anticuerpo, se añade este trazador enzimático junto con un cromógeno (diaminobenzidina, color marrón).

El método de Envision es un método indirecto que se basa en dos fases, en la primera fase se une el anticuerpo primario específico al antígeno del tejido. En la segunda fase, se añade un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa, obtenido de otro animal (rata, conejo o cabra), que se une específicamente. Esta técnica presenta una gran sensibilidad, y el anticuerpo secundario puede utilizarse para varios anticuerpos primarios de una misma especie.

El método de Envision utiliza como anticuerpo secundario un polímero de dextrano donde se encuentran conjugadas múltiples moléculas enzimáticas (Dako 2006).

Los bloques de TMA se cortaron en secciones de 3  $\mu\text{m}$  de grosor y secados en un periodo de 60 minutos a 65 $^{\circ}$  C. Las secciones de TMA se desparafinizaron con xilol y posteriormente fueron hidratadas con concentraciones decrecientes de etanol.

El pretratamiento de recuperación de antígenos para c-FLIP<sub>L</sub>/s , p65,  $\beta$ -catenina y HIF-1- $\alpha$  se logró (Figura 8), mediante calentamiento a 95  $^{\circ}$  C durante 20 minutos a un pH de 9 (Dako) en un PT Link (Dako, Dinamarca) y para p50 se realizó en una solución de bajo pH de 6 (Dako).

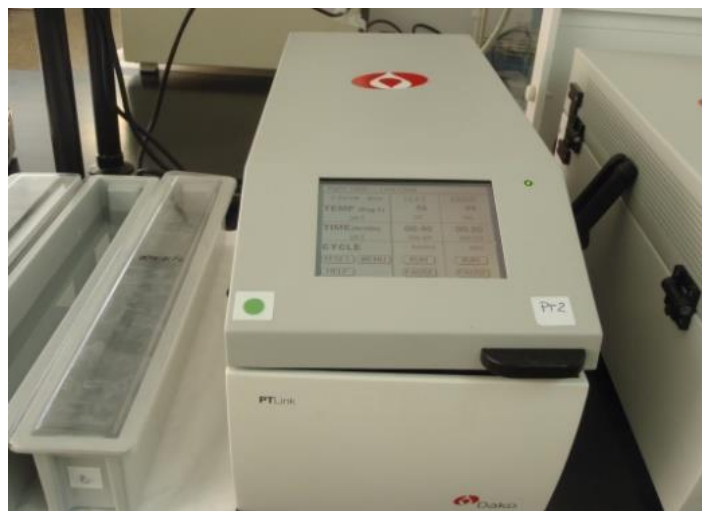


Figura 8

Las peroxidasas endógenas se bloquearon antes de realizar la incubación con el anticuerpo.

Los anticuerpos primarios utilizados y los tiempos de incubación y dilución fueron los siguientes:

- c-FLIP<sub>L</sub>/s (1:200; c-19; Proveedor: Santa Cruz Biotechnology, Inc.; tiempo de incubación 20 minutos a temperatura ambiente)
- NF  $\kappa\beta$  p65 (1:50; c-20; Proveedor: Santa Cruz Biotechnology, Inc.; tiempo de incubación 30 minutos a temperatura ambiente).

- NFκβ p105/ p50 (1:100; tiempo de incubación 35 minutos a temperatura ambiente).
- HIF-1-α (1:100; ab-1; Proveedor: Abcam; tiempo de incubación 35 minutos a temperatura ambiente).
- β-catenin (1:300; Proveedor: BD Transduction Laboratories; tiempo de incubación 20 minutos a temperatura ambiente).

La visualización del anticuerpo primario se realizó con el anticuerpo secundario Envision Flex (Dako) y las secciones fueron teñidas con hematoxilina/eosina.

La fiabilidad de la valoración de la tinción inmunohistoquímica de los TMAs ha sido probada en estudios publicados previamente<sup>130</sup>.

La evaluación IHC se realizó por dos observadores. Las discrepancias se resolvieron mediante un examen conjunto. Se obtuvo una puntuación o *score* histológica (HSC) que tiene en cuenta el porcentaje de células positivas y la intensidad de su tinción. El HSC varía de 0 a 300. La fiabilidad de tales puntuaciones ha sido contrastada y demostrada<sup>131</sup>.

Para asegurar que las muestras incluidas en el array eran representativas se realizó una validación que consistió en la tinción, de forma aleatoria de 20 casos del bloque de origen obteniéndose una concordancia del 90% entre las áreas seleccionadas del tejido tumoral y las muestras de origen.

### **Análisis estadístico**

La concordancia entre las intensidades de expresión de los biomarcadores en las muestras de los cilindros del TMA y las secciones enteras se comprobó a través de la correlación lineal de Pearson y las diferencias no sistemáticas con el test de Wilcoxon.

Cuando la validación del score histológico para una proteína particular fracasó como variable cuantitativa, los resultados HSC se convirtieron en variables categóricas.

En este proceso de validación, la fiabilidad se estudió a través del Intraclass Correlation Coefficient (ICC). Los resultados de HSC variaron desde 0,747 hasta

0,948 y el índice Kappa, en variables categóricas, oscilaron desde 0,51 hasta 0,94 con  $p < 0,05$  en todos los casos. Esto implica calcular el porcentaje de los tumores que presentan una tinción nuclear o citoplasmática con baja, moderada o alta expresión proteica.

La prueba de Wilcoxon se utilizó para la comparación del HSC de las proteínas medidos en el tejido tumoral en la biopsia diagnóstica y la pieza quirúrgica mientras que la prueba binomial se ha utilizado para comparar las diferencias estadísticas en los resultados.

La asociación entre la expresión de la proteína y la puntuación histológica se comprobó utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y el test de Fisher para los valores categóricos.

Se efectuó un análisis comparativo de las curvas de supervivencia respecto al tiempo libre de progresión utilizando para ello las curvas de Kaplan-Meier, la prueba de long-rank y la prueba exacta de Fisher.

Para el análisis de supervivencia se excluyeron los pacientes que fallecieron por complicaciones quirúrgicas. Los fallecimientos por causas no relacionadas con el cáncer de recto fueron censurados en el momento de la muerte.

Se utilizó el análisis multivariante mediante el modelo de riesgos proporcionales de Cox, para determinar los cocientes de riesgo e identificar variables con significación pronóstica independiente en esta cohorte de pacientes.

En todos los casos, los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos





## *RESULTADOS*

---



## RESULTADOS

### RESULTADOS CLINICO-PATOLOGICOS

Respecto a las variables clínico-patológicas los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 5.

**Tabla 5. Variables clínico-patológicas pacientes estadios II/III (N=152)**

<b>Edad media ( rango)</b>	71 ( 61-77)
<b>Género n (%)</b>	
<b>Masculino</b>	107 (70.4)
<b>Femenino</b>	45 (29.6)
<b>Tamaño del tumor al diagnóstico; media (rango)</b>	40 (30-55)
<b>Tamaño tumor resecado; media (rango)</b>	15 (9-25)
<b>Grado histológico, n (%)</b>	
<b>Bajo</b>	7 (4.5)
<b>Intermedio</b>	135 (89)
<b>Alto</b>	10 (6.5)
<b>TGR n (%)</b>	
<b>1</b>	29 (19.1)
<b>2</b>	64 (42.1)
<b>3</b>	29 (19.1)
<b>4</b>	22 (14.5)
<b>5</b>	4 (2.6)
<b>Desconocido</b>	4 (2.6)
<b>Estado n (%)</b>	
<b>Muerto (relacionado con cancer recto)</b>	20 (13.2)
<b>Muerto (otras causas)</b>	44 (28.4)
<b>Recurrencia n (%)</b>	
<b>Local</b>	7 (4.5)
<b>Metástasis</b>	24 (15.8)

La inclusión de los pacientes se inició en 1998 y finalizó en diciembre 2009 aunque la gran mayoría de los pacientes se reclutaron a partir de enero de 2002. Durante este periodo se incluyeron un total de 152 pacientes previamente aceptados y que cumplían todos los criterios de inclusión para el tratamiento neoadyuvante.

La media de seguimiento de los pacientes ha sido de 49,2 meses con un rango que oscila entre los 30 y los 68,4 meses. El tiempo de seguimiento ha sido calculado entre la fecha de la cirugía y la fecha de la muerte o en los pacientes vivos hasta la última visita que se estableció en noviembre 2011

Las características clínico-patológicas son las siguientes:

**- Edad:**

El rango de edad de nuestros pacientes osciló entre los 61 y 77 años con una media de 71 años.

**- Género:**

La mayoría de los pacientes tratados (107) fueron hombres lo que supone un 70,4% frente a un 29,6% de mujeres (Figura 9).

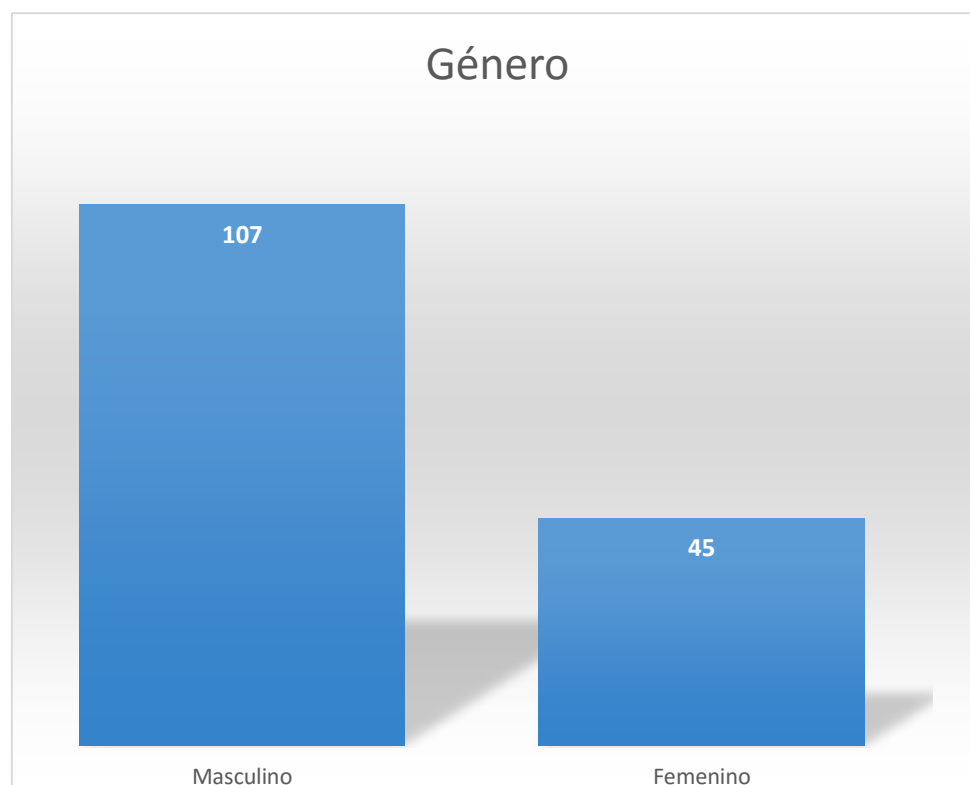


Figura 9

### - Tamaño tumoral

Medimos el tamaño tumoral antes del tratamiento bien de forma directa con la visualización en la colonoscopia o bien por métodos de imagen como el TAC o la RMN.

Los resultados muestran que la media en milímetros al diagnóstico fue de 40 mm, con un rango que oscila de 30 hasta 55 mm.

Una vez aplicado el tratamiento con quimio-radioterapia neoadyuvante pudimos observar en casi todos los casos una reducción en el tamaño del tumor, con una media de 15 mm (rango desde 9 hasta 25 mm) de reducción (Figura 10).

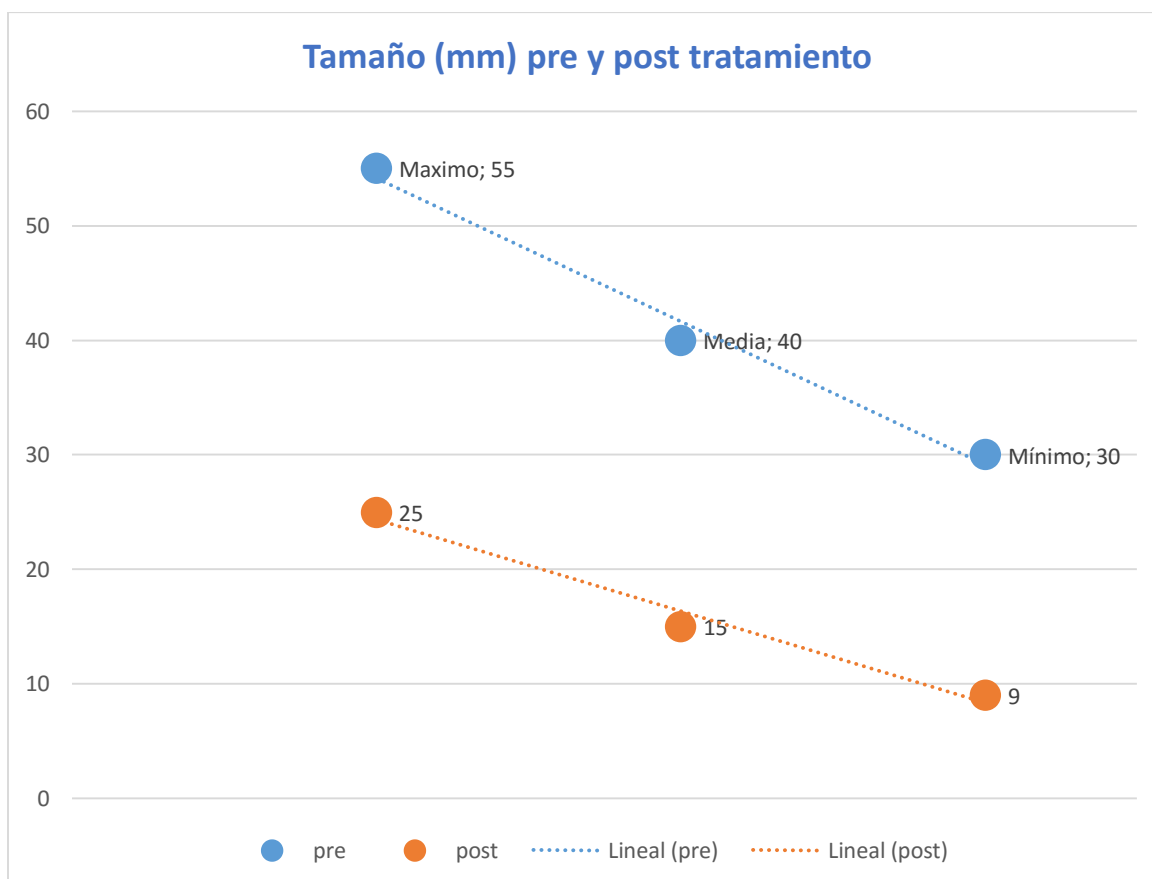


Figura 10

### - Localización del tumor

La distancia fue medida desde el ano y se incluyeron tumores localizados hasta 15 cm. Los datos se obtuvieron del informe de la colonoscopia y/o de la resonancia magnética nuclear.

Hemos agrupado la localización del tumor en seis grupos (Figura 11) atendiendo al inicio y a la extensión del tumor:

- tumores localizados en los primeros 5 cm: recto inferior:
- tumores localizados entre 5 y 10 cm del canal anal: recto medio
- tumores localizados entre 10 y 15 cm del canal anal: recto superior
- tumores que se inician en recto inferior y llegan al recto medio
- tumores que se inician en recto medio y llegan al superior
- tumores que ocupan todo el recto

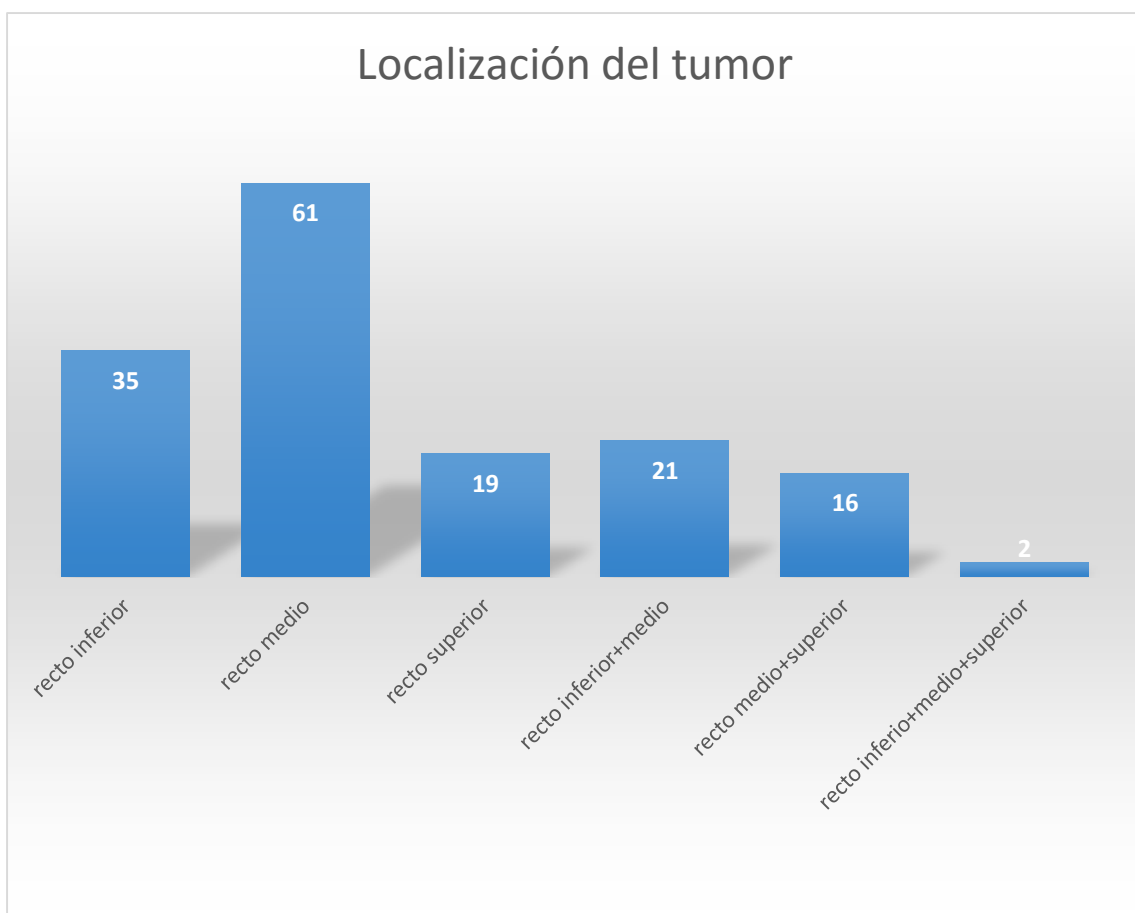


Figura 11

### - Estadio tumoral

Todos los pacientes estudiados pertenecían a estadios II y/o III. La gran mayoría de ellos eran T3, solamente se incluyeron 6 pacientes estadiados como T4. Respecto a la

afectación ganglionar al diagnóstico el porcentaje más importante es el de pacientes con ganglios negativos.

En la Figura 12 se detalla el estadio ganglionar y el estadio T.

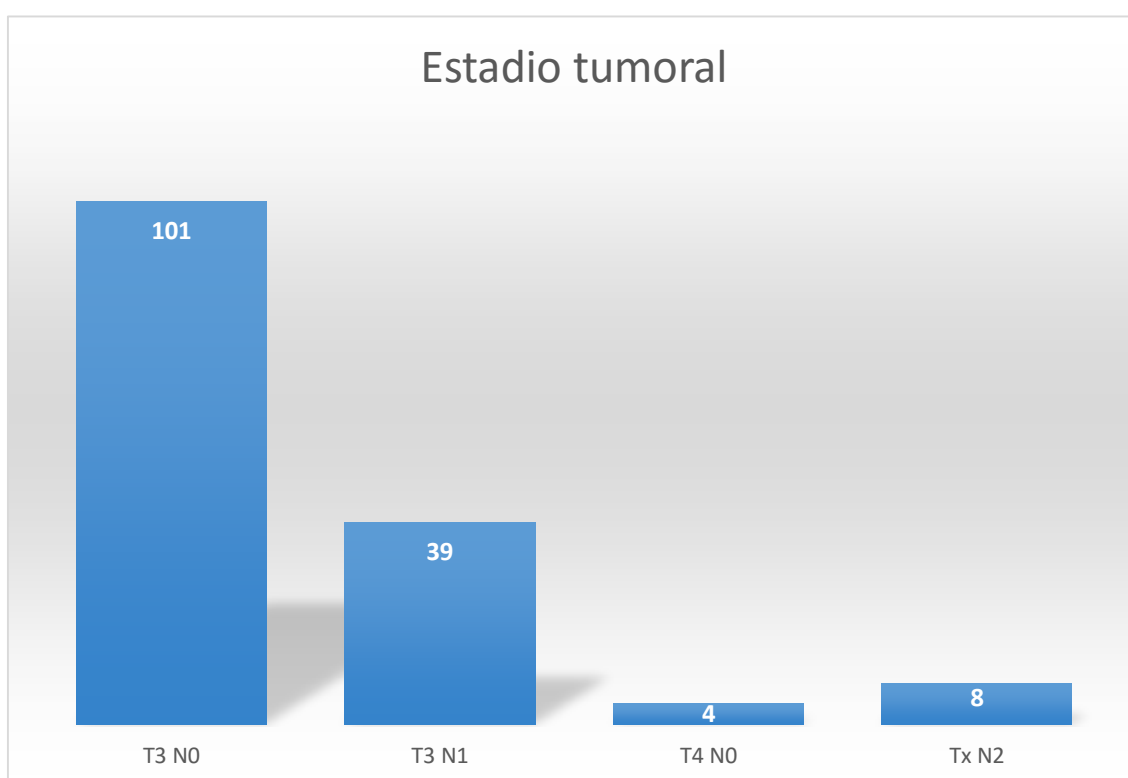


Figura 12

### - Grado histológico

Utilizamos la clasificación de los adenocarcinomas en tres grados en función de la proporción de glándulas:



- Grado 1: bien diferenciado (> 95% del tumor constituido por glándulas).
- Grado2: moderadamente diferenciado (del 50% al 95% del tumor constituido por glándulas)
- Grado 3: poco diferenciado (del 5% al 49% del tumor constituido por glándulas)

La mayoría de los tumores analizados corresponde a un grado intermedio de diferenciación (Figura 13). El 7% de los tumores se clasificaron como de alto grado y solamente un 4% estaban en el grupo de bajo grado.



Figura 13

#### - Grado de regresión

De los 152 pacientes incluidos en el estudio en ningún caso hubo progresión clínica durante la administración del tratamiento y todos pudieron completar el tratamiento previsto al inicio.

Tras la extirpación quirúrgica del mesorrecto se analizó el grado de regresión tumoral utilizando la clasificación de Mandard que se ha comentado previamente.

Atendiendo a la persistencia de células tumorales y relacionándolo con la fibrosis producida por el tratamiento se obtienen 5 tipos de grado de regresión.

Tras el tratamiento neoadyuvante obtuvimos con más frecuencia un grado de regresión 2 (TGR2) lo que condiciona que persistían células tumorales aisladas en la pieza quirúrgica.

En la Figura 14 se recoge los porcentajes obtenidos atendiendo al grado de regresión.

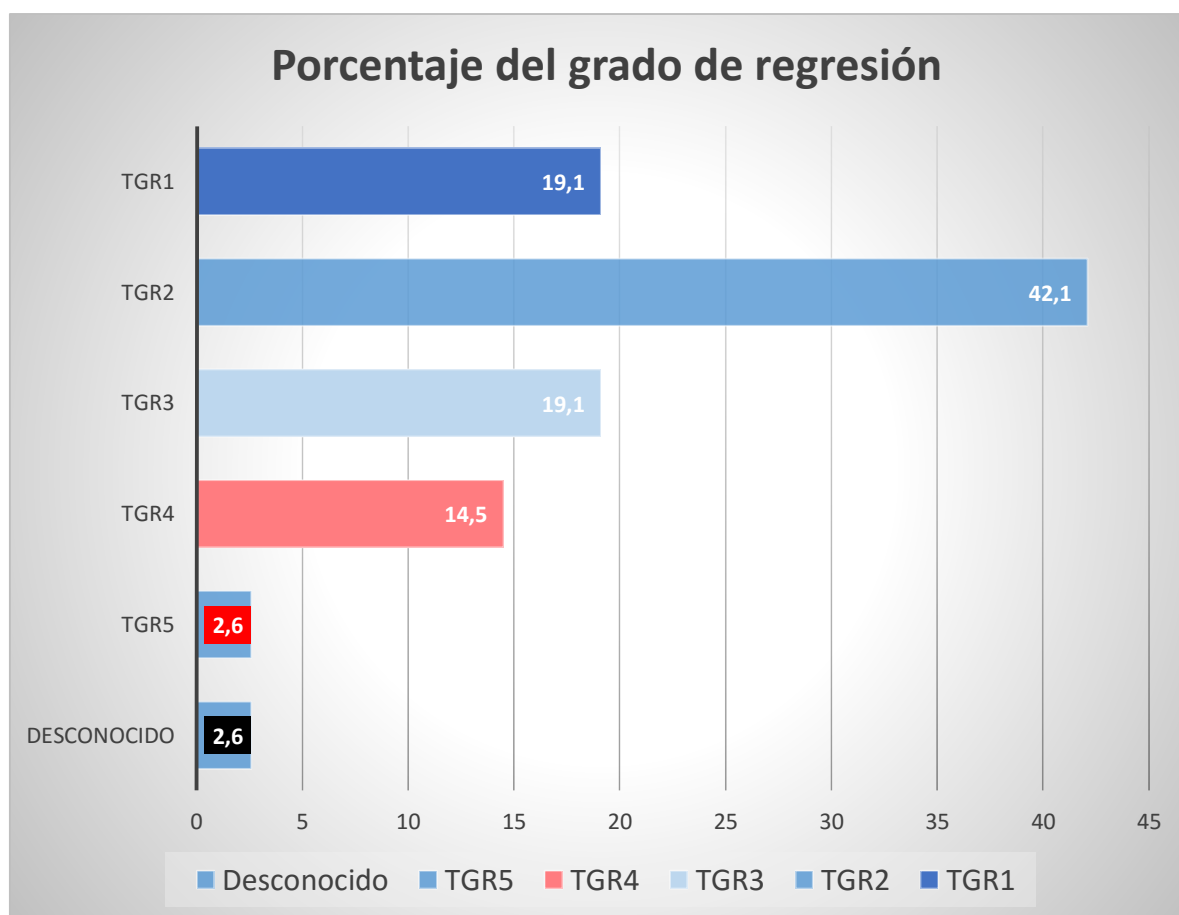


Figura 14

Agrupando los pacientes que han respondido al tratamiento obteniendo una respuesta completa (TGR1), aquellos con presencia de escasas células tumorales (TGR2) y aquellos con predominio de la fibrosis sobre el tumor (TGR3) comprenden el 80,3% de los pacientes.

En 26 pacientes, lo que supone un 17,1%, se obtuvo una mala respuesta. Solamente 4 pacientes no presentaron ninguna respuesta al tratamiento.

Estos datos refuerzan la eficacia de la radio-quimioterapia neoadyuvante (Figura 15).

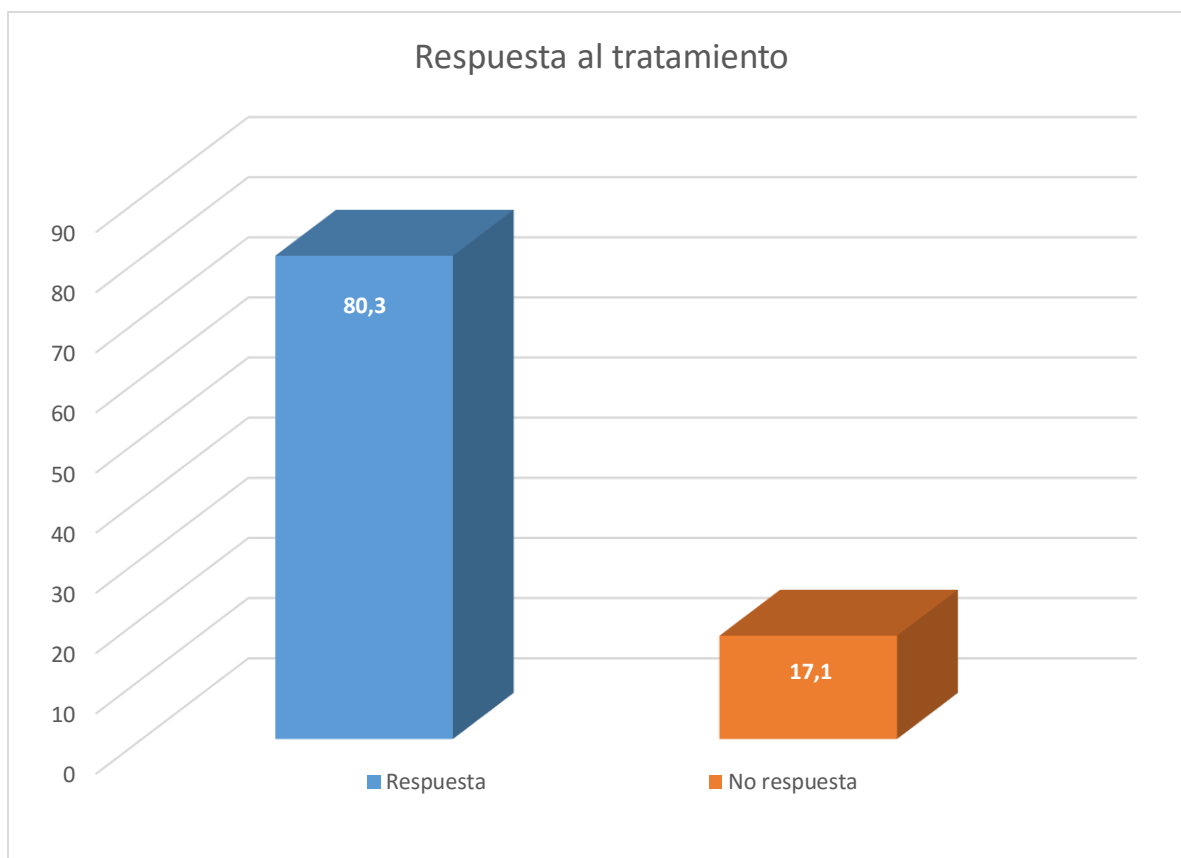


Figura 15

### - Progresión tras el tratamiento

De los 152 pacientes estudiados pudimos demostrar fracaso al tratamiento, en forma de recidiva local y/ metástasis en 27 pacientes lo que supone unas tasas de progresión del 17,7%.

La distribución del fracaso en cuanto a la aparición de metástasis o recidiva local se muestra en la Figura 16.



Figura 16

La recidiva local se pudo demostrar en 7 pacientes lo que supone el 4,5% del total. De estos 7 pacientes en tres casos la recidiva fue la presentación aislada y en 4 pacientes estaba acompañada de metástasis.

Analizando el estadio inicial de estos pacientes podemos observar que predominan ligeramente los pacientes estadiados como T3N1 frente a los T3 N0 (Figura 17).

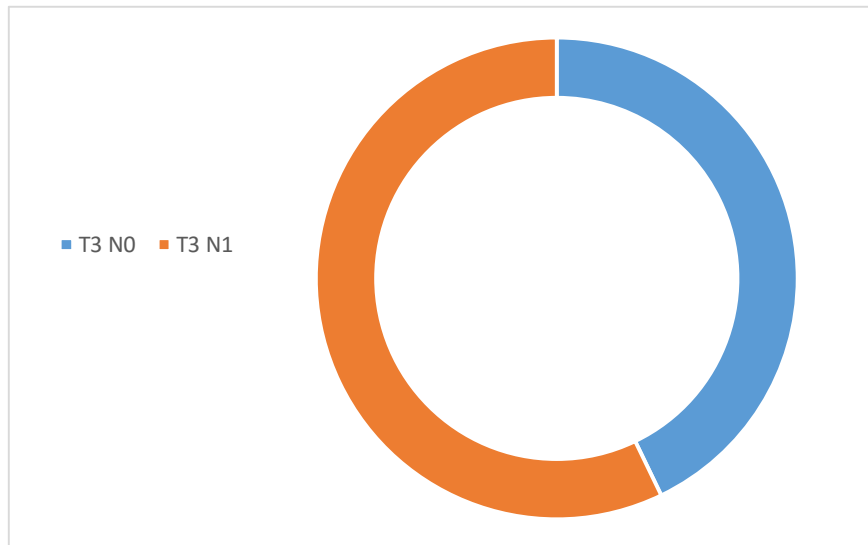


Figura 17

En los pacientes que presentaron recidiva local, la distribución por estadios y localizaciones anatómicas se recogen en la Figura 18.

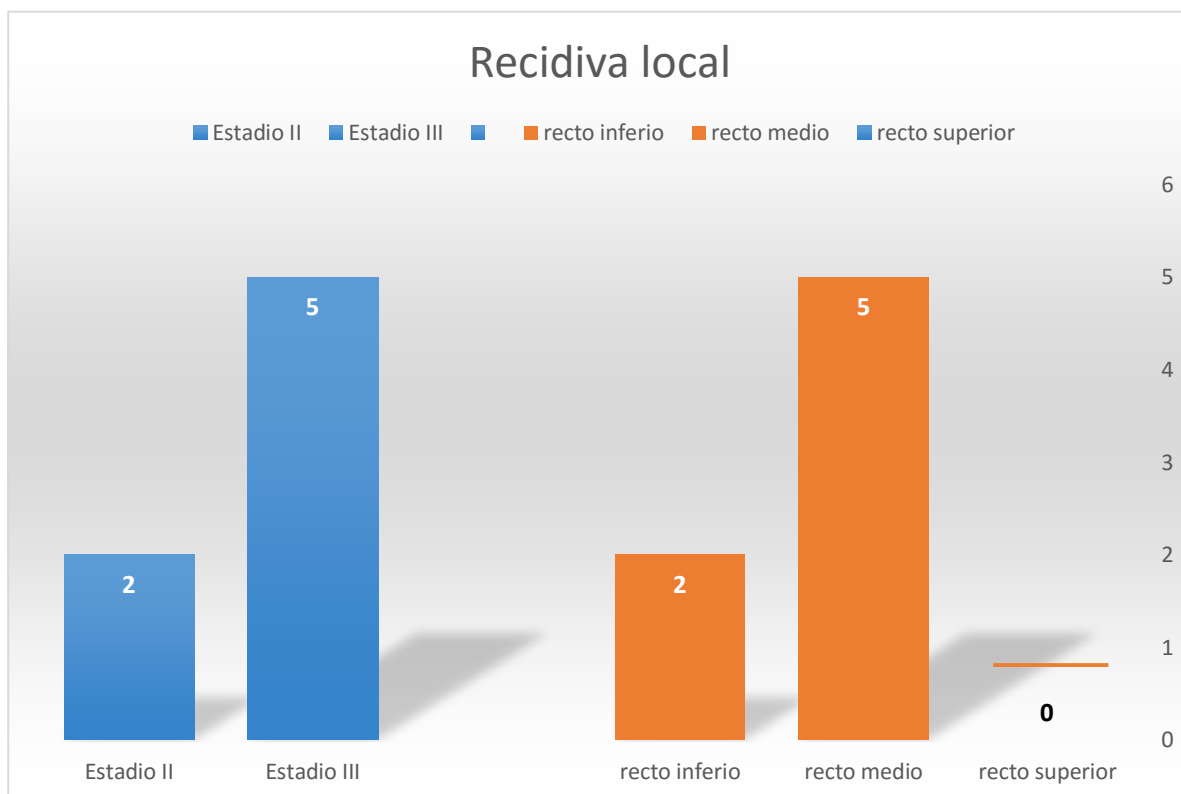


Figura 18

La afectación a distancia en forma de metástasis fue más importante alcanzando un porcentaje del 15,8% (24 pacientes). Predomina la afectación en varias localizaciones frente a la metástasis en un solo órgano (Figura 19).

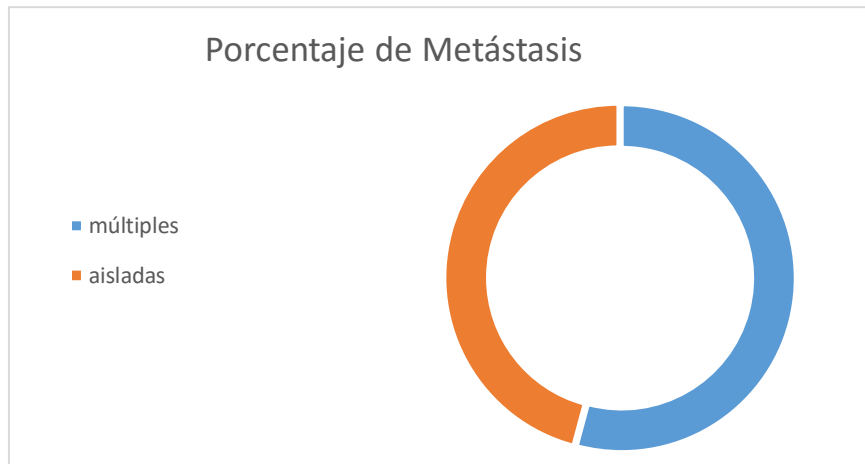


Figura 19

De los 24 pacientes que presentaron metástasis la localización anatómica más frecuente fue el hígado seguido del pulmón.

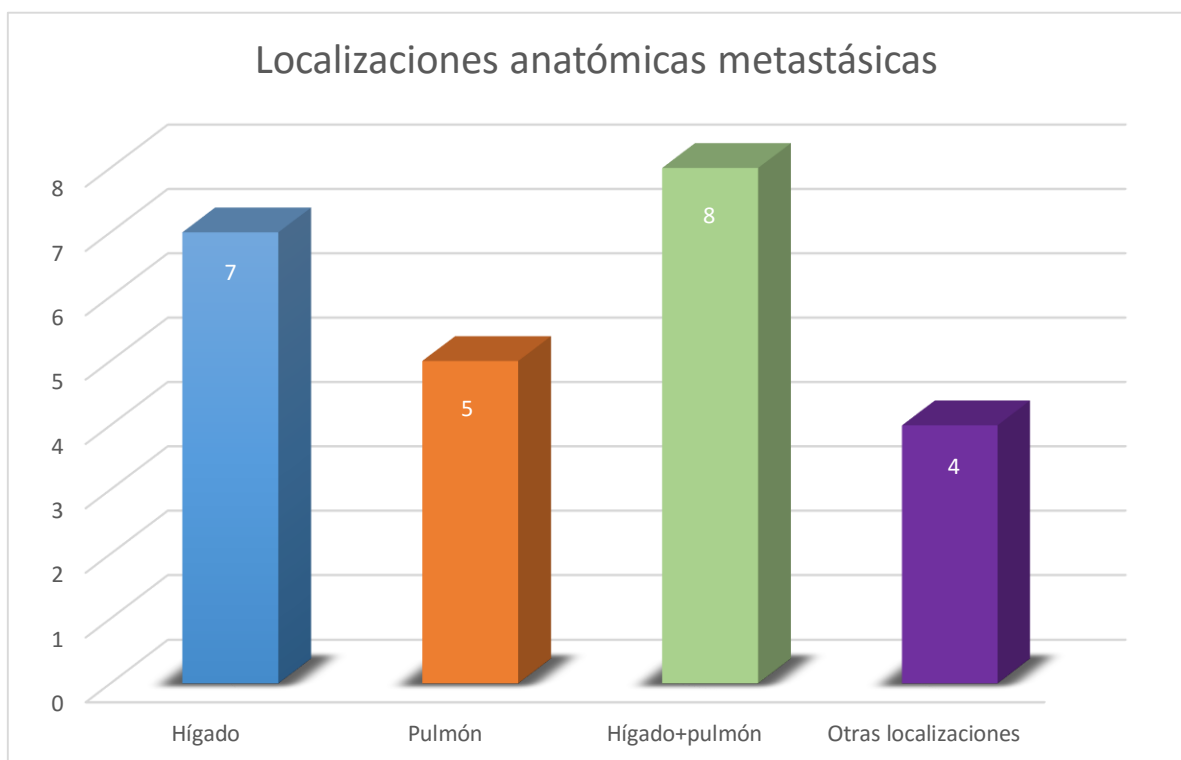


Figura 20

El patrón metastásico predominante fue la afectación de varias localizaciones sincrónicas: 18 pacientes presentaron afectación múltiple y la afectación visceral aislada ocurrió en 6 pacientes (Figura 20).

En cuanto al estadio inicial de los pacientes metastásicos predominan los estadios II frente a los III (Figura 21).

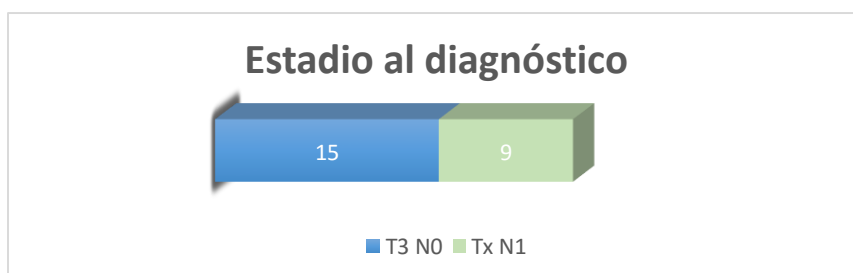


Figura 21

De los 7 pacientes que presentaron metástasis hepáticas aisladas todos excepto dos estaban estadiados como T3 N0. Respecto a la localización anatómica del tumor, en 4 pacientes se habían originado en el tercio superior del recto y el restante se localizó a 3 cm.

La afectación pulmonar de forma exclusiva se presentó en 5 pacientes, dos de ellos coincidiendo con recidiva local. La localización del tumor en tres pacientes fue en tercio inferior y en los otros dos fue el tercio superior (Figura 22).

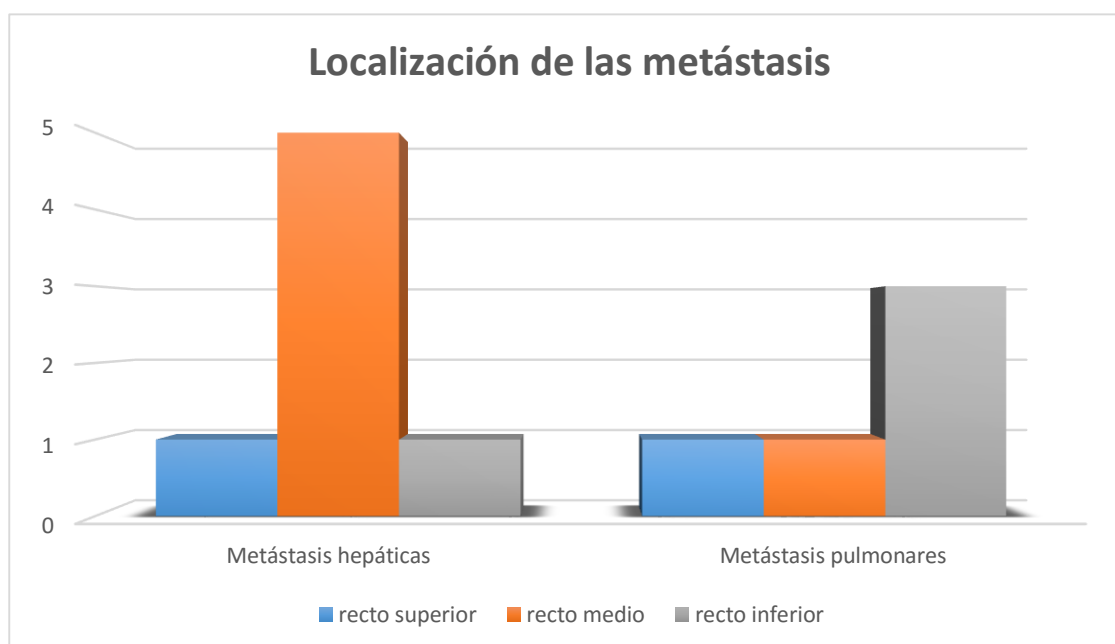


Figura 22

Agrupando todos los pacientes metastásicos y relacionándolos con el estadio y la localización se demuestra que el estadio II es el más frecuente afectando un total de 15 pacientes, el resto tenían afectación ganglionar al diagnóstico. (Figura 23)

Respecto a la relación entre metástasis y localización del tumor vemos que los tumores localizados en el recto inferior y el recto medio, es decir aquellos por debajo de 10 cm del margen anal, suponen la mayoría.

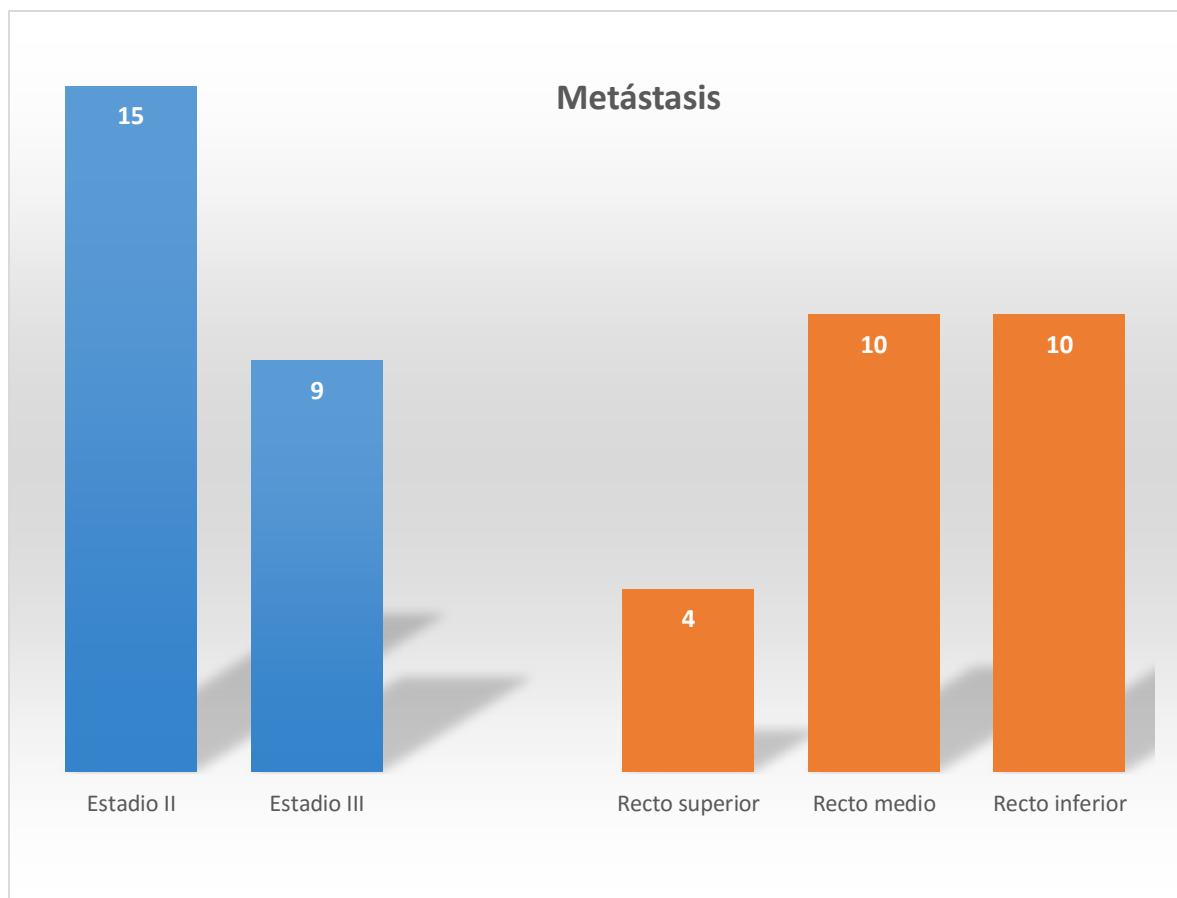


Figura 23





## ESTUDIO DE BIOMARCADORES

Los resultados se muestran en las Tablas y Figuras del Anexo 3

El estudio inmunohistoquímico mostró que, en la biopsia realizada al diagnóstico, la expresión citoplasmática de c-FLIP fue más alta en el tumor (media de HSC: 133) que en el tejido normal (media HSC: 97;  $p < 0.001$ ). La expresión de c-FLIP no se incrementó en la pieza quirúrgica tras haber aplicado el tratamiento con quimio y radioterapia (media HSC de 143;  $p = 0,190$ ).

Resultados muy similares se objetivaron con la expresión baja-moderada (30 % baja, 56 % moderada, 14 % alta) en el tumor en comparación con el tejido normal (33 % baja, 56 % moderada, 11 % alta) del material de biopsia ( $p = 0.770$ ). No se detectaron cambios en la expresión nuclear en el tumor tras el tratamiento neoadyuvante ( $p = 0.360$ ).

La expresión citoplasmática de HIF-1 $\alpha$  fue más alta en el tumor (media HSC=113) que en el tejido normal (media HSC=71) en la biopsia realizada al diagnóstico ( $p < 0.001$ ). Además, se observó una reducción de dicha expresión tras la radioquimioterapia (media HSC=88;  $p < 0.001$ ).

La expresión nuclear de HIF-1 $\alpha$  fue baja tanto en el tumor (media HSC=28) como en el tejido normal (media HSC=21;  $p = 0.330$ ). Hubo un incremento HIF-1 $\alpha$  nuclear en el tejido tumoral tras el tratamiento administrado (media HSC=50;  $p = 0.002$ ).

Respecto a la expresión de NF- $\kappa\beta$  p65 citoplasmática fue más alta en el tumor (media HSC=99) que en el tejido normal (media HSC=70) de la biopsia diagnóstica ( $p < 0.001$ ). La expresión de este biomarcador se incrementó tras la radioquimioterapia (media HSC=115;  $p = 0.010$ ).

La expresión de p65 nuclear fue baja-moderada tanto en el tumor (42% baja, 40% moderada, 18% alta) como en el tejido normal ((51% baja, 36% moderada, 13% alta) en la biopsia al diagnóstico ( $p = 0.52$ ). Se comprobó un incremento de p65 nuclear tras el tratamiento en el 54% de los tumores ( $p < 0.001$ ).

La expresión citoplasmática de NF- $\kappa\beta$  p105/p50 fue más alta en el tumor (media HSC=125) que en el tejido normal (media HSC=101) del material de la biopsia

( $p < 0.001$ ). Se observó una disminución en la expresión en el tumor tras el tratamiento aplicado (media HSC=114;  $p=0.005$ ).

La expresión de p105/p50 nuclear fue ligeramente más alta en el tumor (media HSC=9) que en el tejido normal (media HSC=6;  $p=0.030$ ). Hubo un incremento en la expresión en el tumor tras el tratamiento neoadyuvante (media HSC=17;  $p < 0.001$ ).

No se ha podido comprobar una asociación estadísticamente significativa entre c-FLIP, NF- $\kappa$ B y p65 intracitoplasmáticos. Sin embargo, sí que hemos encontrado una relación lineal, que ha sido estadísticamente significativa, entre la expresión citoplasmática de FLIP y NF- $\kappa$ B p105/p50. Dicha relación se obtuvo entre la expresión citoplasmática de FLIP y NF- $\kappa$ B p105/p50 con la expresión proteica previa al tratamiento neoadyuvante (correlación Pearson  $r=0.41$ ,  $p < 0.001$ ) y los cambios en el citoplasma (correlación Pearson  $r=0.39$ ,  $p=0.002$ ) y en el núcleo (correlación Pearson  $r=0.31$ ,  $p=0.014$ ).

La expresión citoplasmática de  $\beta$ -catenina fue más alta en el tumor (10% bajo, 75% moderado, 14% alto) que en el tejido no tumoral obtenido en la biopsia diagnóstica (10 % bajo, 75 % moderado 14 % alto).

Un porcentaje significativo de tumores (34%) mostraron un incremento en la expresión de los biomarcadores tras el tratamiento ( $p=0.040$ ). La expresión nuclear de  $\beta$ -catenina fue más alta en el tumor (49 % bajo, 42 % moderado, 9 % alto) comparándolo con la muestra de tejido sano, obtenida en la biopsia realizada al diagnóstico (96 % bajo, 4 % moderado, 0 % alto) ( $p < 0.001$ ).

No se demostró un incremento en la expresión nuclear en las células tumorales tras el tratamiento neoadyuvante ( $p=0.060$ ).

***Predicción del grado de respuesta al tratamiento neoadyuvante mediante el análisis de la expresión de los biomarcadores realizado en la biopsia de diagnóstico***

El análisis de la expresión de cualquiera de estas proteínas no permite predecir el grado de respuesta en la pieza quirúrgica ( $p > 0.05$ ). Se agruparon los grupos con escasa respuesta al tratamiento (TRG4 y TRG5).

### ***Valor pronóstico de la expresión y del perfil de las proteínas estudiadas***

Los casos estudiados se distribuyeron en tres grupos, según el grado de respuesta (TRG1, TRG2 y el resto: TRG3+TRG4+TRG5), debido a que encontramos que la mediana de supervivencia libre de progresión (PFS) fue similar en los grupos TRG3, TRG4 y TRG5.

Se ha estudiado el valor pronóstico para cada proteína y su expresión tras la combinación de varias proteínas.

Son cuatro los marcadores que han demostrado tener un valor pronóstico independiente para la supervivencia libre de progresión con una  $p < 0,05$ :

- Valor citoplasmático de c-FLIP<sub>L</sub>/s (HSC>140;  $p=0.007$ )
- Valor nuclear HIF-1 $\alpha$  (HSC>10;  $p=0.020$ )
- Incremento en la expresión citoplasmática de p65 entre la biopsia realizada en el diagnóstico y la muestra obtenida tras la realización del tratamiento con quimio-radioterapia (HSC>10;  $p=0.004$ )
- Disminución o estabilidad en la expresión en el citoplasma de c-FLIP<sub>L</sub>/s entre la biopsia diagnóstica y la pieza de resección (HSC $\leq$ 0;  $p=0.020$ ).

Se ha podido identificar tres perfiles de expresión distintos (Tabla 4) utilizando un modelo de regresión logística multivariante. Los puntos de corte de cada marcador

con un valor predictivo son los que mejor determinan el resultado y se han seleccionado desde los valores de HSC optimizados tras el modelo matemático.

Nº de condiciones presentes	HR	95% IC	p	PFS 5 años (%)	95% IC
<b>Perfil 1</b>					
0	1	-	-	92,7	83,5-100
1	2,69	1,48-4,89	0,001	81,1	71,6-91,8
2	7,22	2,19-23,87	0,001	61,3	45,4-82,8
<b>Perfil 2</b>					
0	1	-	-	92,8	83,7-100
1	3,13	1,6-6,12	<0,001	74,5	58,8-94,5
2	9,78	2,55-37,5	<0,001	48,6	29,4-80,3
<b>Perfil 3</b>					
0	1	-	-	100	-
1-2	4,9	1,8-13,1	0,002	84,5	72,8-98
3-4	24,0	3,4-172	0,002	50,4	32,9-77,1

Tabla 4

El perfil de expresión de proteínas 1 requiere la evaluación en el tejido tumoral de la biopsia diagnóstica de 2 supuestos o condiciones:

- Valores citoplasmáticos c-FLIP (HSC>140)
- Valores nucleares de HIF-1 $\alpha$  (HSC>10)

Cuando los pacientes se analizan sin tener en cuenta el grado de regresión obtenido, la supervivencia libre de progresión a los 5 años fue del 92,8% cuando no presentaron ninguno de los dos supuestos descritos previamente.

Cuando se cumple uno de los dos supuestos las PFS a los 5 años desciende al 81,1% y si se dan las dos condiciones la supervivencia los 5 años llega al 61,3% (Figura 24).

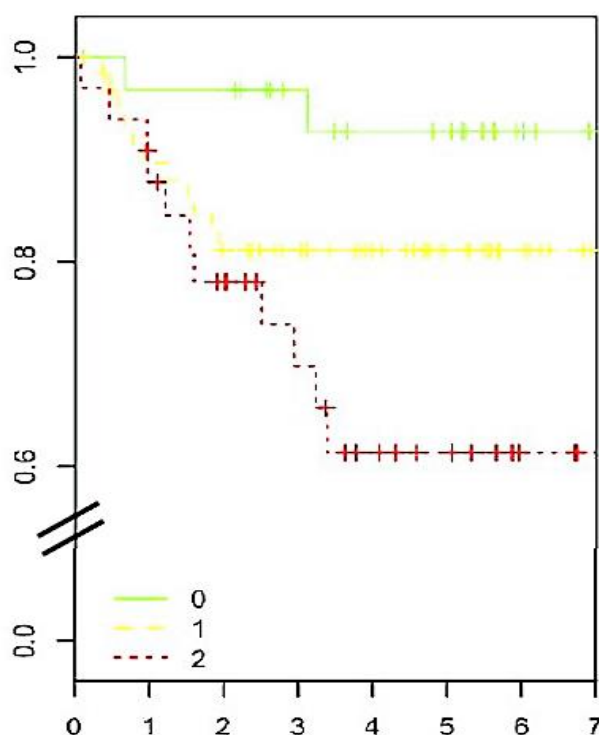


Figura 24

En el grupo de pacientes con respuesta completa patológica (**TRG1**) y que no presentan ninguno o solamente presentan uno de los dos valores (c-FLIP citoplasmáticos con HSC>140 y HIF-1 $\alpha$  nuclear con un HSC>10), la supervivencia a los 5 años fue del 100%, mientras que disminuye al 66,7% cuando se dan las dos condiciones (Figura 25).

Todos los pacientes clasificados como **TGR2** estaban libres de enfermedad cuando no presentaban ninguno de los dos factores, mientras que cuando presentan una

condición, la supervivencia a los 5 años fue del 81,5% y del 62,3% cuando las dos condiciones estaban presentes (Figura 26).

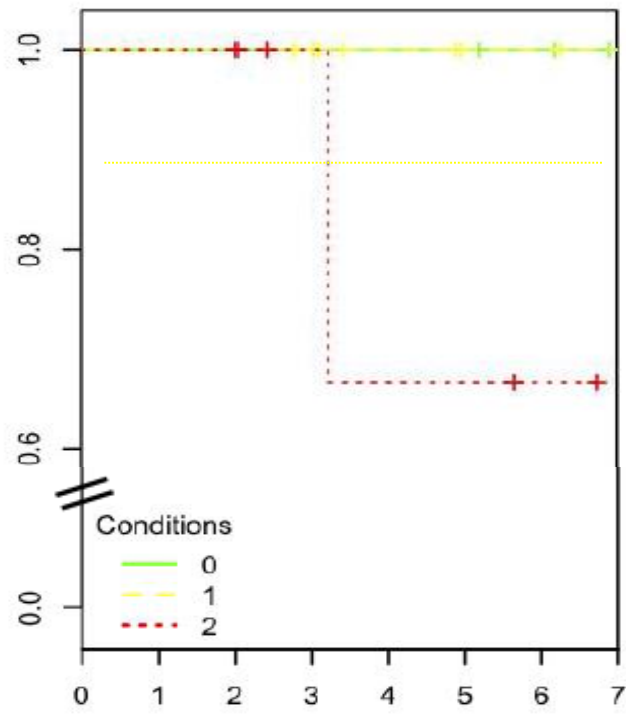


Figura 25

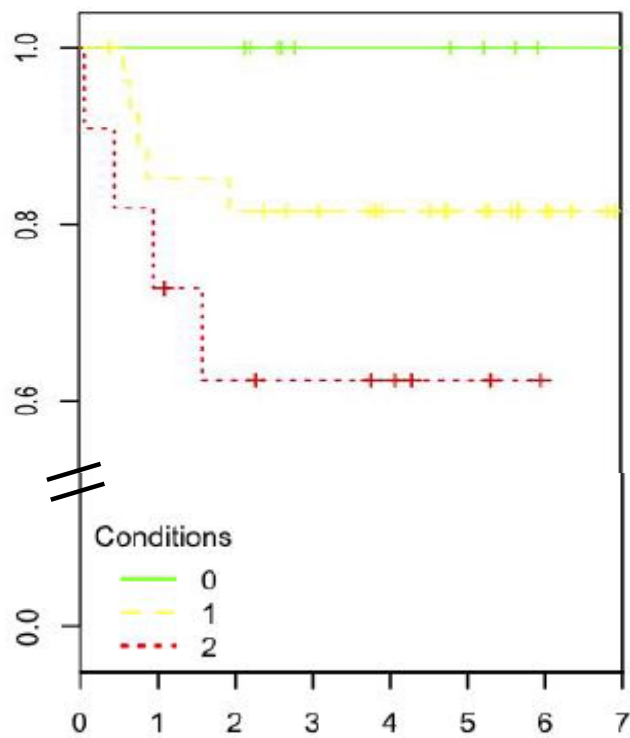


Figura 26

En el grupo de pacientes con escasa respuesta al tratamiento, es decir los **TRG3/TRG4/TRG5** y que no presentaban ninguna condición la supervivencia fue del 80,8%. En aquellos que presentaban una condición la supervivencia bajó al 70,4% y con las dos condiciones presentes la supervivencia fue del 53,9% a los 5 años (Figura 27).

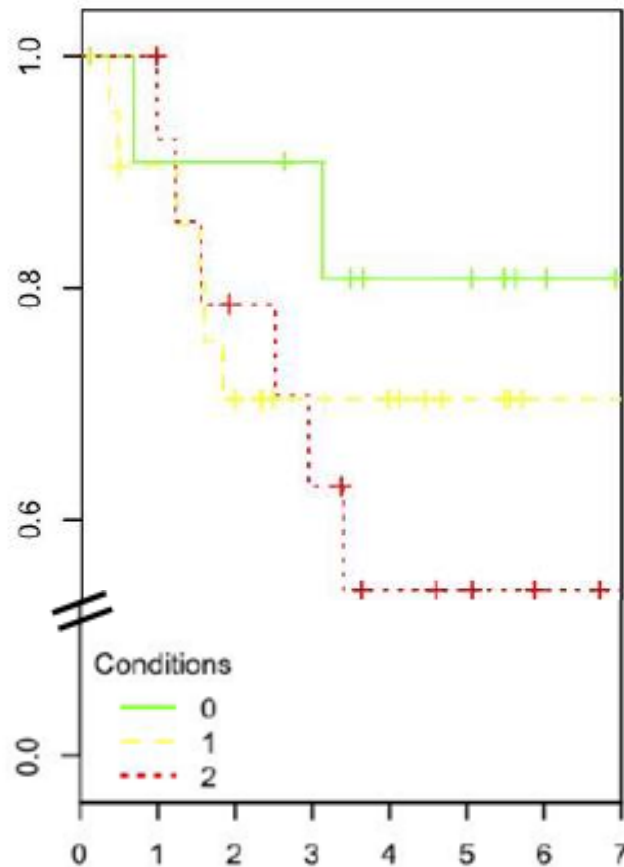


Figura 27

El segundo perfil que se analizó es el que requiere la confirmación de la presencia, tanto en el tejido tumoral de la biopsia del diagnóstico como en la pieza quirúrgica de resección, de dos condiciones:

- Diagnóstico citoplasmático previo al tratamiento de c-FLIP<sub>L</sub>/s (HSC>140) junto con un HSC ≤0 en el espécimen quirúrgico



- Cambio en el histocore citoplasmático de p65 (HSC>10) entre la biopsia al diagnóstico y en el tejido post-tratamiento.

Sin tener en cuenta el grado de regresión la supervivencia a los 5 años es del 92,7% cuando no hay ninguna condición, 74,5% para los tumores que presentan una de las dos condiciones y del 48,6% cuando presentas ambas condiciones (Figura 28).

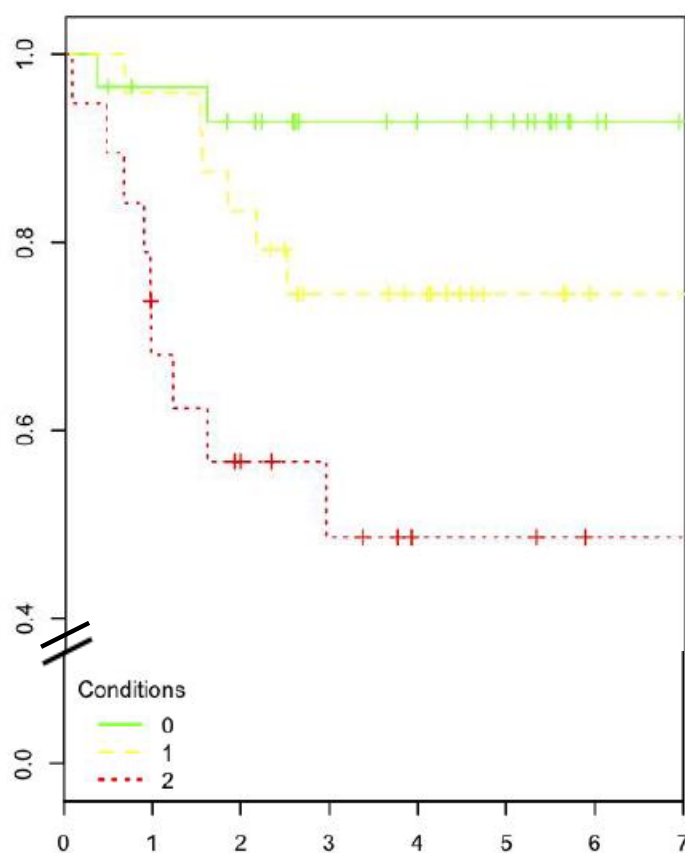


Figura 28

Curiosamente, la supervivencia a los 5 años fue del 100% para los pacientes en los que se consiguió un grado de regresión de TRG2 y que no presentaban ninguna de las condiciones o solamente una de ellas. En este grupo de pacientes cuando cumplían las dos condiciones la supervivencia bajó al 37,5% (Figura 29).

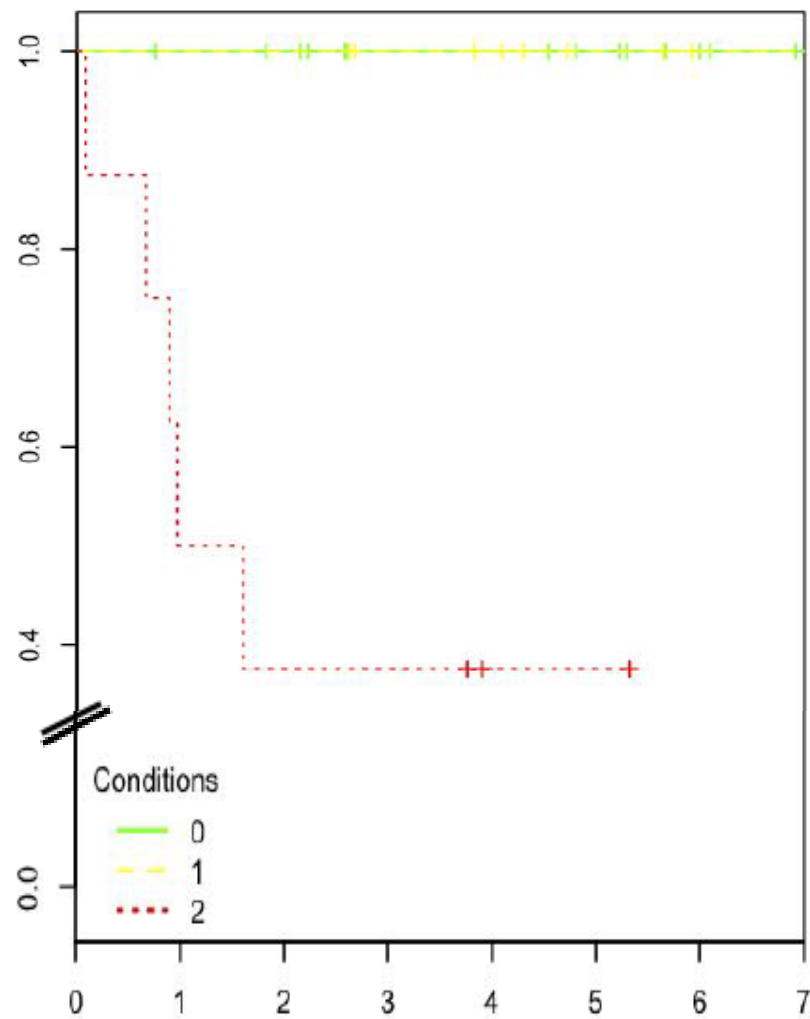


Figura 29

De forma parecida, en el grupo de pacientes con escasa respuesta al tratamiento (grados de regresión TGR3, TGR4 y TGR5) y que no presentaban ninguna condición, la SLP a los 5 años fue del 83,9%.

En aquellos que presentaron una condición la supervivencia fue menor (58,3%) y finalmente cuando se manifiestan las dos condiciones la supervivencia disminuyó hasta el 53% (Figura 30).

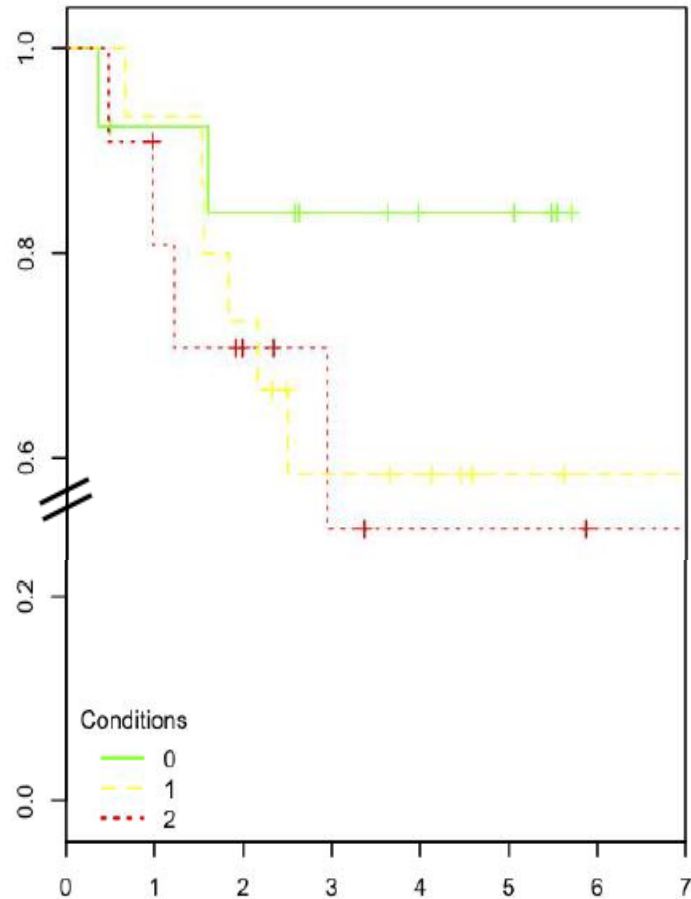


Figura 30

El tercer perfil de expresión es una combinación estadísticamente más potente y que combina el primer y el segundo perfil:

- Expresión citoplasmática de c-FLIP<sub>L</sub>/s (HSC>140) en la biopsia diagnóstica
- Expresión de HIF-1 $\alpha$  (HSC>10) nuclear en la biopsia diagnóstica
- Cambio en la expresión citoplasmática de c-FLIP<sub>L</sub>/s (HSC $\leq$ 0) entre la biopsia al diagnóstico y la pieza de resección quirúrgica y
- Cambio en la expresión citoplasmática de p65 (HSC>10) entre el tejido al diagnóstico y la pieza de escisión quirúrgica.

En términos de supervivencia libre de progresión a los 5 años, sin tener en cuenta el grado de regresión, se obtiene una supervivencia del 100% cuando no se presenta

ninguna condición, 84,55% cuando se da una o dos condiciones y 50,4% cuando existen 3 o 4 condiciones (Figura 31).

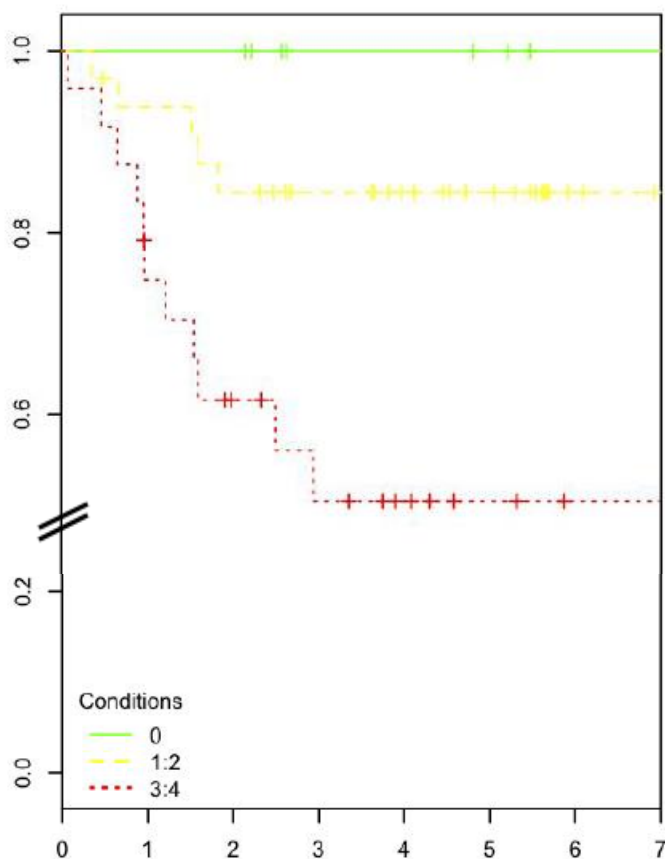


Figura 31

La SFP a los 5 años para los pacientes con un grado de regresión TRG2 con 0, 1 o 2 condiciones fue del 100% y del 50% para los pacientes con 3 o 4 condiciones (Figura 32).

En el grupo de pacientes con TRG3/TRG4/TRG5 y ninguna condición, la supervivencia a los 5 años fue del 100%. En los que presenta una o dos condiciones la SLE fue del 73,9% y bajó al 46,4% para aquellos pacientes con 3 o 4 condiciones (Figura 33).

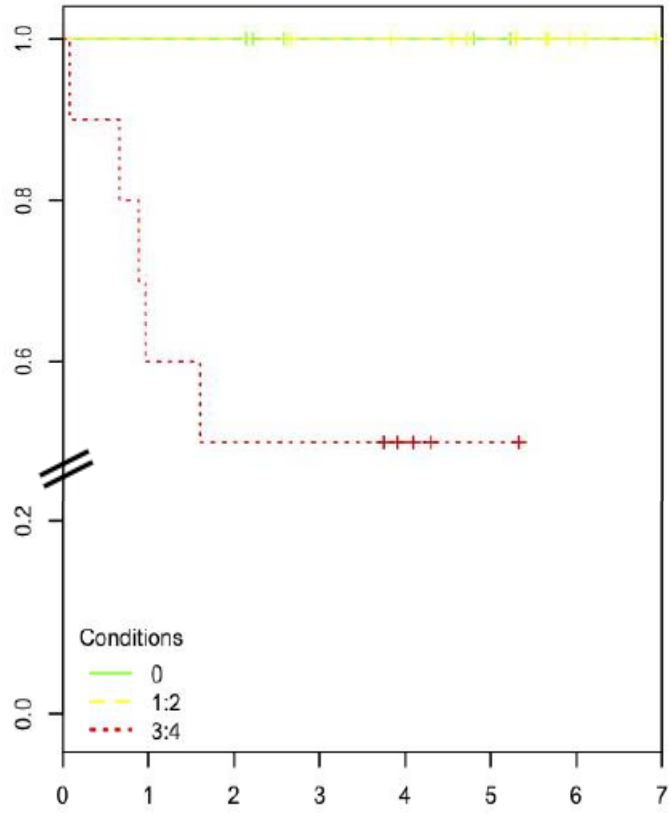


Figura 32

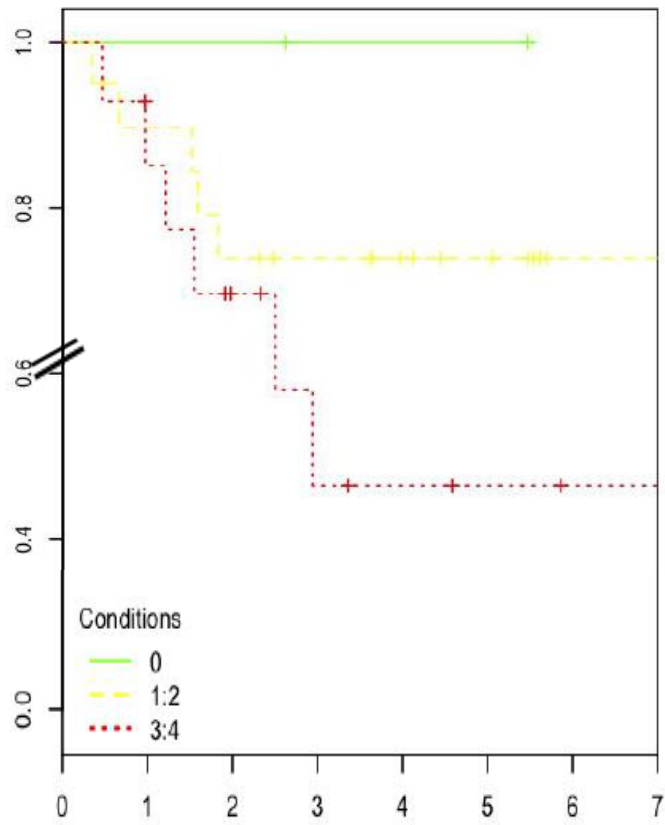


Figura 33

## DISCUSIÓN

---



## DISCUSION

### *DISCUSION RESULTADOS CLINICO-PATOLOGICOS*

Todos los pacientes se trataron de una forma homogénea y por los mismos profesionales. Tanto la simulación del tratamiento, como la técnica de radioterapia utilizada, la dosis administrada y los controles dosimétricos fueron muy similares en todos los pacientes. En nuestro estudio, de los 152 pacientes tratados con quimioterapia y radioterapia, se obtuvieron un total de 29 respuestas completas lo que supone un 19,1%.

Esta cifra está en concordancia con diversos estudios publicados que cifran las tasas de respuesta completa en un 15-27%<sup>132</sup>. Concretamente el estudio publicado por Myint<sup>133</sup> recoge los resultados obtenidos por las principales series:

<b>Serie</b>	<b>n</b>	<b>RCp %</b>
<b>ACCORD</b> <sup>134</sup>	598	11-25
<b>STAR</b> <sup>135</sup>	720	16
<b>NSABP-4</b> <sup>136</sup>	1608	20
<b>CAO-4</b> <sup>137</sup>	1265	13-17
<b>PETTAC-6</b> <sup>138</sup>	1094	11-13

Hay que destacar que los pacientes se trataron con fotones procedentes de una unidad de cobalto 60 (Theratron 780) que era la que disponíamos en ese momento en nuestro Servicio. Actualmente todos los pacientes se tratan con aceleradores lineales y con técnicas de exclusión de asas intestinales.



Además de las cifras de respuesta completa especificadas, en la mayoría de los casos se obtuvieron una disminución en el estadio, *downstaging*, que se recogen en la siguiente tabla:

TGR	n	(%)
1	29	19,1
2	64	42,1
3	29	19,1
4	22	14,5
5	4	2,6
<b>Desconocido</b>	4	2,6

Sumando los grados de regresión TGR1, TGR2, y TGR3 se obtiene un 80,3% de pacientes en que el tratamiento fue efectivo atendiendo a la disminución del componente tumoral.

Así mismo hemos podido comprobar que el *downsizing*, es decir la disminución de la medida del tumor comprobada por métodos de imagen y posteriormente medida en la pieza quirúrgica ocurrió en casi todos los pacientes. El tamaño del tumor al diagnóstico fue de 40 mm de media (30-55 mm). En la pieza quirúrgica la media fue de 15 mm (9-25 mm).

El pronóstico de los pacientes diagnosticados de cáncer de recto localmente avanzado a pesar de los avances en los métodos de imagen (RMN) y el tratamiento administrado sigue siendo subóptimo ya que un 25-30% fallece a causa del cáncer, por recidiva local o por metástasis<sup>139</sup>.

Las tasas de recidiva local recogidas en nuestro estudio alcanzan el 4,5% de los pacientes, es decir 7 pacientes presentaron una recidiva local (en 3 casos en forma

asislada). Estos datos son extrapolables a los de la literatura como anteriormente se ha comentado<sup>70, 71</sup>.

En el tiempo de realización de este estudio, en 24 pacientes se comprobó la existencia de metástasis lo que supone un porcentaje del 15,8%. Estos datos son también similares a los publicados que oscilan entre un 7-16%<sup>140,141</sup>, siendo la localización anatómica más frecuente fue el hígado. La afectación hepática en el cáncer de recto es la más frecuente ya que las vías de diseminación tanto linfática como vascular confluyen en el hígado debido al drenaje venoso y arterial comentado anteriormente.

En nuestro estudio la afectación aislada hepática ha ocurrido en 7 pacientes lo que supone un 4,9% y de forma sincrónica con otras localizaciones alcanza el 6,3% siendo la combinación de metástasis hepáticas y pulmonares la presentación más frecuente.

Un hecho que nos llamó la atención es la cifra relativamente alta de metástasis pulmonares de forma aislada que en nuestro estudio que es prácticamente idéntica a la afectación hepática. El porcentaje de afectación pulmonar combinada o no con otras localizaciones en nuestro estudio supone un 10,5%.

Estudios publicados han demostrado que el cáncer de recto presenta, comparándolo con el cáncer de colon, una elevada incidencia de metástasis pulmonares tanto sincrónicas como metacrónicas<sup>142</sup>. El estudio publicado por Mitry revela unas tasas de afectación pulmonar del 16% en cáncer de recto frente a 7'5% en cáncer de colon<sup>143</sup>.

Una de las explicaciones que se apuntan es la localización del tumor ya que sabemos que la vascularización del recto es distinta en recto superior o recto inferior-medio. Los tumores originados en el tercio inferior y medio tienen mayor probabilidad de metastatizar en pulmón ya que el drenaje venoso puede alcanzar directamente la vena cava sin tener que pasar por el sistema porta. En nuestra serie podríamos añadir otra explicación y que sistemáticamente se solicita un TAC torácico y abdominal de forma rutinaria en todos los pacientes pudiéndose detectar de forma precoz dichas lesiones.

A la finalización del estudio el 13,2% (20 pacientes) habían fallecido por causa relacionada con el cáncer. El fallecimiento por causa no relacionada con la enfermedad oncológica ocurrió en 44 pacientes (28,4%).

Esta cifra es relativamente alta, pero se ha de tener en cuenta que la media de edad de nuestra serie fue de 71 años. No se recogió la comorbilidad de los pacientes lo que seguramente ayudaría también a explicar la cifra relativamente alta de mortalidad no atribuible a la enfermedad oncológica.

Otras localizaciones metastásicas menos frecuentes que hemos detectado son la afectación ósea y del sistema nervioso central.

La afectación ósea se suele presentar como focos de hiperdensidad y en ocasiones sin lesiones líticas asociadas. Nuestros datos, que coinciden con los publicados<sup>144</sup>, muestran una frecuencia de metástasis óseas del 2,1%.

La afectación del SNC en forma de metástasis cerebrales ha sido anecdótica en nuestra serie, aunque estudios recientes informan de tasas hasta el 5%<sup>145</sup>.

### *DISCUSION BIOMARCADORES*

En este trabajo hemos analizado la expresión de 5 proteínas en pacientes diagnosticados de adenocarcinoma de recto en estadios II y III a los que se les realizó un tratamiento neoadyuvante con radioterapia y quimioterapia siguiendo los estándares actuales.

Las proteínas estudiadas participan en vías de señalización que modulan la supervivencia, la apoptosis y están relacionadas con la hipoxia tumoral.

Estas tres proteínas han sido seleccionadas por dos motivos:

1. Existen múltiples evidencias que demuestran un papel de estas tres proteínas en la resistencia a la quimioterapia y radioterapia en diversos tipos de cánceres.
2. Estas tres proteínas han sido motivo de estudio por los grupos de investigación del IRBLLEIDA en diversos modelos tumorales, que han dado

lugar a diversas publicaciones en revistas de impacto, por lo que existe experiencia en la optimización e interpretación de las técnicas inmunohistoquímicas, lo que garantiza el éxito de este enfoque metodológico<sup>146,147,148</sup>.

En nuestro trabajo se ha realizado un estudio inmunohistoquímico comparativo entre el tejido normal, que se obtuvo de la muestra de biopsia realizada al diagnóstico de la enfermedad, y el tejido tumoral antes y tras la aplicación del tratamiento neoadyuvante.

La finalidad ha sido la de estudiar el valor predictivo y pronóstico de la determinación de las proteínas analizadas.

Sabemos que NF- $\kappa$ B juega un papel importante en la inhibición de la apoptosis y la promoción y progresión tumoral<sup>149</sup>. La subunidad de NF- $\kappa$ B mejor estudiada es la p65 que forma heterodímeros con p50 en la activación clásica y la atípica<sup>150</sup>. La inhibición de la señal de NF- $\kappa$ B aumenta la respuesta apoptótica de la radioterapia y de la quimioterapia<sup>151</sup>.

HIF-1 $\alpha$  regula la expresión de los genes que participan en el metabolismo glucídico, la angiogénesis y la supervivencia celular<sup>152</sup>.

La proteína inhibitoria FLICE (c-FLIP) inhibe la señal en el receptor que provoca la muerte celular<sup>153</sup>. Diversos estudios in vitro han demostrado que c-FLIP determina la resistencia frente a la apoptosis inducida por ligandos de muerte y sensibiliza a la célula irradiada a entrar en apoptosis. Sinérgicamente aumenta la apoptosis quimio inducida<sup>154</sup> y la presencia moderada de esta proteína en algunas células tumorales las sensibiliza a la muerte celular inducida<sup>155</sup>.

$\beta$ -catenina es una proteína que actúa tanto como co-regulador transcripcional como adaptador para la adhesión intracelular en la señal de transducción Wnt. Algunos tumores expresan niveles altos de  $\beta$ -catenina a nivel citoplasmático y nuclear<sup>156</sup>.

Las proteínas NF- $\kappa$ B, c-FLIP, HIF-1 $\alpha$ , and  $\beta$ -catenina muestran interacciones entre ellas mismas en el seno de ciertas vías moleculares. En el caso de c-FLIP se ha comprobado que en algunos tipos de células está regulado por NF- $\kappa$ B. La activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B es una de los más importantes inductores a la

resistencia a la muerte celular mediada por el receptor, que está regulado por la caspasa 8 que a su vez está regulada por c-FLIP que es un importante modulador de la activación de caspasa 8 y la apoptosis<sup>157</sup>. De hecho, c-FLIP aumenta la señalización de Wnt inhibiendo la degradación proteosómica de  $\beta$ -catenina<sup>158</sup>. Por otra parte, también sabemos que HIF-1 $\alpha$  está regulado por NF- $\kappa$ B y  $\beta$ -catenina<sup>159,160</sup>.

Nuestros resultados confirman lo que previamente habían demostrado otros estudios<sup>161,162,163, 164, 165</sup>, que estos biomarcadores están sobre-expresados en el tumor comparándolos con el tejido normal.

En nuestro estudio se demuestra que la expresión de proteínas fue mayor en el tejido tumoral después del tratamiento neoadyuvante, lo que sugiere que esta mayor expresión ha sido inducida por la radio-quimioterapia. Sin embargo, estos resultados muestran que estas proteínas no juegan un papel como predictores de respuesta al tratamiento precirugía y su expresión no se correlaciona con el grado de respuesta anatomopatológico.

Cuando hemos analizado individualmente el valor pronóstico de estas proteínas se obtuvieron resultados interesantes. Se pudieron identificar cuatro biomarcadores pronóstico independiente. Dos de ellos (c-FLIP<sub>L/S</sub> citoplasmático y HIF-1 $\alpha$  nuclear) se pudieron objetivar en la biopsia realizada al diagnóstico. En los otros dos (p65 citoplasmática y expresión de c-FLIP<sub>L/S</sub> citoplasmático) comprobamos que su expresión cambió entre la biopsia diagnóstica y el estudio anatomopatológico tras el tratamiento aplicado.

Estos resultados apuntan a una nueva forma de diferenciar la agresividad del tumor. De hecho, la intensidad de la expresión nuclear de c-FLIP<sub>L/S</sub> es similar a la descrita en la literatura<sup>169</sup>. Por otra parte, la correlación entre la expresión citoplasmática c-FLIP<sub>L/S</sub> y la supervivencia también ha sido demostrada previamente<sup>170</sup>.

Este estudio proporciona información sobre el significado biológico de la expresión de HIF-1 $\alpha$  nuclear frente a la citoplasmática, ya que estudios publicados anteriormente sugieren valores pronósticos tanto para la expresión citoplasmática<sup>172,173</sup> como para la expresión nuclear<sup>174,175,176</sup>.

Nuestros resultados también confirman a NF- $\kappa$ B/p65 como marcador pronóstico adverso, como se sugiere también en estudios anteriores publicados<sup>177</sup>.

La particularidad de este trabajo estriba en que es el primer estudio que utiliza combinaciones específicas de biomarcadores. Estas combinaciones permiten interpretar el comportamiento y la respuesta al tratamiento del cáncer de recto.

La contribución de este estudio es la utilización de distintos perfiles de expresión, en los pacientes diagnosticados de cáncer de recto en estadios II y III, para poder predecir supervivencia y determinar la expresión de dichos marcadores, no solo en el tejido tumoral obtenido en el diagnóstico, sino también los cambios en la expresión proteica que ocurren tras la aplicación de quimio-radioterapia como tratamiento adyuvante.

Curiosamente hemos observado una fuerte asociación entre los perfiles de expresión de estas proteínas y la supervivencia libre de progresión entre los pacientes con ciertos grados de regresión. La combinación del grado de regresión con los perfiles de expresión resulta útil para predecir el pronóstico atendiendo a las subcategorías de grado de regresión.

Este hallazgo es de gran importancia porque sugiere que solamente teniendo en cuenta los grados de regresión no es suficiente para predecir la supervivencia libre de progresión.

Según los resultados de este trabajo, la utilización en la práctica clínica de estos biomarcadores podría suponer una nueva estrategia para decidir en qué pacientes sería útil aplicar el tratamiento neoadyuvante con quimio y radioterapia o utilizar otros tipos de tratamiento que no es el estándar actualmente.

Adicionalmente con la determinación de los perfiles de expresión se podría llegar a identificar aquellos pacientes de alto riesgo que van a tener peor supervivencia, a pesar de haberse obtenido una buena respuesta al tratamiento, si solamente tenemos en cuenta el grado de regresión.

Un ejemplo de lo que supone la determinación de la expresión de estas proteínas es el que se muestra en la Figura 34.

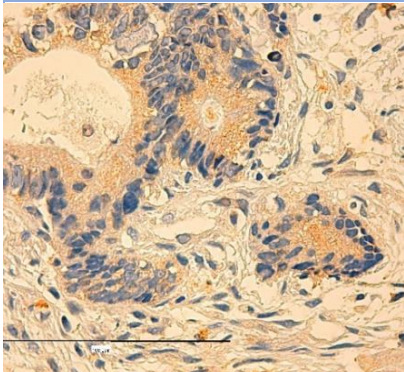
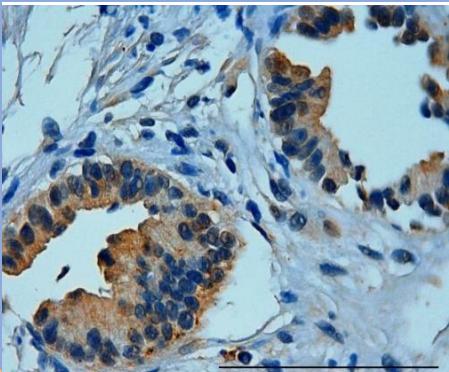
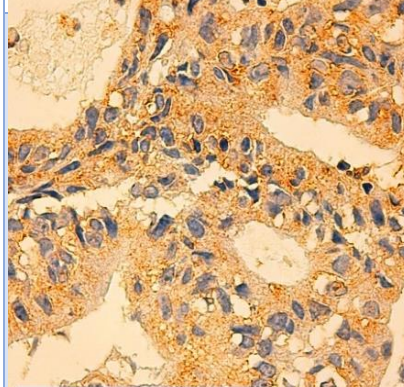
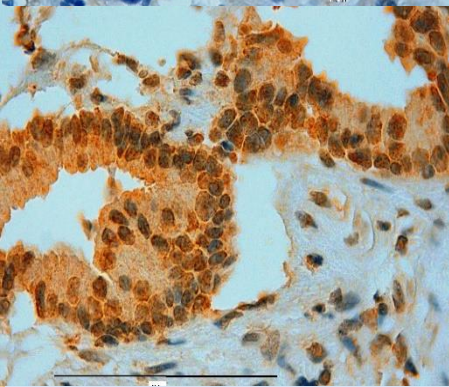
	PACIENTE A	PACIENTE B
<b>TGR</b>	<b>TGR1</b>	<b>TGR2</b>
<i>c-FLIPL/s</i> <b>BIOPSIA</b> <b>DIAGNÓSTICO</b>		
<i>HIF-1α</i> <b>BIOPSIA</b> <b>DIAGNÓSTICO</b>		
<b>SLE</b>	9 años	1 año
<b>Estado</b>	Vivo	Muerto
<b>Metastasis</b>	No	Si

Figura 34

El paciente A no presentaba ninguna de las dos condiciones que caracterizan al perfil 1 y su supervivencia a los 5 años, con un TRG1, fue del 100% estando vivo y sin enfermedad al final del seguimiento.

En contrapartida, el paciente B cumplía dos condiciones que caracterizan al perfil I. Tras el tratamiento neoadyuvante se consiguió un TRG2.

La SLE en este paciente fue de 62,3% y falleció a los 4 años tras el diagnóstico.

En la Figura 35 se muestra la expresión de los biomarcadores en otros dos pacientes: el paciente C no presentaba ninguna de las condiciones requeridas para el perfil de expresión 2.

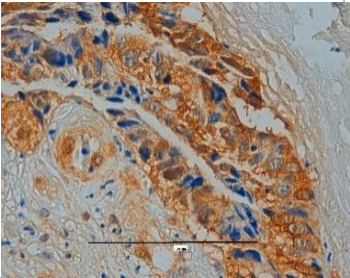
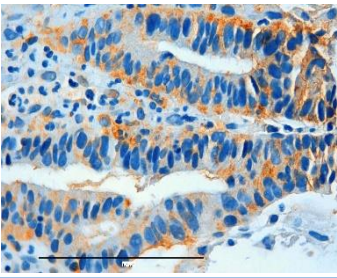
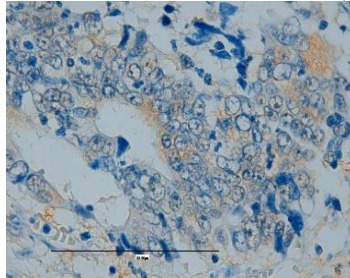
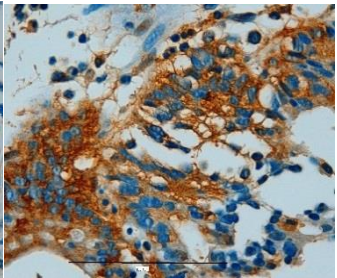
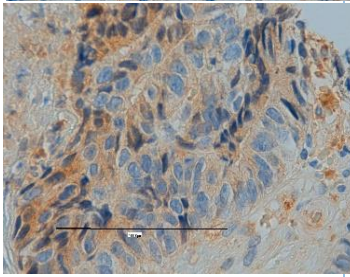
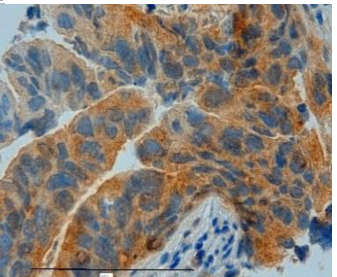
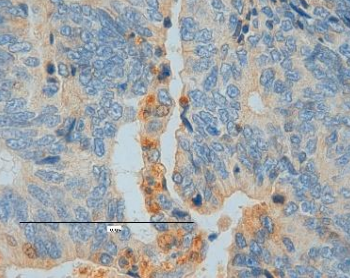
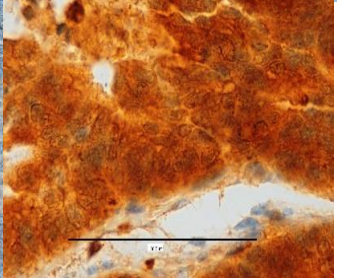
	PACIENTE C	PACIENTE D
<i>TGR</i>	TGR4	TGR4
<i>P65</i> <i>biopsia diagnóstico</i>		
<i>P65</i> <i>pieza quirúrgica</i>		
<i>c-FLIP<sub>L/s</sub></i> <i>biopsia diagnóstico</i>		
<i>c-FLIP<sub>L/s</sub></i> <i>pieza quirúrgica</i>		
<i>SLE</i>	6 años	1 año
<i>Estado</i>	Fallecido	Fallecido
<i>Metastasis</i>	No	Si

Figura 35



Tras el tratamiento aplicado se consiguió un grado de regresión 4 (TGR4) pero la supervivencia a los 5 años fue del 83,9%. El paciente a pesar de la escasa respuesta al tratamiento aplicado, falleció a los 6 años del diagnóstico.

El paciente D presentó dos condiciones del mismo perfil (perfil 2). Tras obtener un TGR4, similar al paciente C, la SLE a los 5 años fue del 53%. El paciente falleció 1 año después del diagnóstico presentando metástasis viscerales.

## *CONCLUSIONES*

---



## CONCLUSIONES

- La expresión de NF- $\kappa$ B, c-FLIP y HIF-1 $\alpha$  en la pieza quirúrgica, está aumentada tras el tratamiento con radio-quimioterapia.
- La expresión de estas proteínas en la pieza quirúrgica, a pesar de estar aumentada, no permite predecir el grado de respuesta a la radio-quimioterapia neoadyuvante.
- La expresión aumentada de NF- $\kappa$ B/p65 es un marcador de mal pronóstico.
- La utilización del grado de respuesta obtenido combinado con los perfiles de expresión de estos biomarcadores, ayuda a identificar los pacientes que tienen un mayor riesgo de metástasis.
- El porcentaje de recidivas locales y de metástasis de nuestra serie concuerdan con los datos publicados en la literatura.



*ANEXOS*

---



## ANEXO 1. CLASIFICACION TNM

Estadio	T	N	M	Dukes <sup>c</sup>	MAC <sup>c</sup>
0	Tis	N0	M0	--	--
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4a	N0	M0	B	B2
IIC	T4b	N0	M0	B	B3
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0	C	C2
	T2-T3	N2a	M0	C	C1/C2
	T1-T2	N2b	M0	C	C1
IIIC	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3-T4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1-N2	M0	C	C3
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a	--	--
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b	--	--

TX	No se puede evaluar el tumor primario.
T0	No hay prueba de tumor primario.
Tis	Carcinoma in situ: intraepitelial o invasión de la lámina propia. <sup>b</sup>
T1	El tumor invade la submucosa.
T2	El tumor invade la muscularis propia.
T3	El tumor invade los tejidos pericolicorrectales a través de la muscularis propia.
T4a	El tumor penetra la superficie del peritoneo visceral. <sup>c</sup>
T4b	El tumor invade directamente o se adhiere a otros órganos o estructuras. <sup>c,d</sup>

NX	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.
N0	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales.
N1	Hay metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos regionales.
N1a	Metástasis en un ganglio linfático regional.
N1b	Metástasis en 2 a 3 ganglios linfáticos regionales.
N1c	Depósito(s) tumoral(es) en los tejidos de la subserosa, mesentéricos o pericólicos no peritonealizados, o tejidos perirectales sin metástasis en los ganglios regionales.
N2	Metástasis en ≥4 ganglios linfáticos regionales.
N2a	Metástasis en 4 a 6 ganglios linfáticos regionales.
N2b	Metástasis en ≥7 ganglios linfáticos regionales.

M0	No hay metástasis a distancia.
M1	Metástasis a distancia.
M1a	Metástasis está confinada a un órgano o sitio (es decir, hígado, pulmón, ovario, ganglio no regional).
M1b	Metástasis en >1 órgano o sitio, o el peritoneo.





## ANEXO 2. CLASIFICACION ANATOMOPATOLOGICA

La Organización mundial de la Salud clasifica a los tumores del recto en epiteliales y no epiteliales<sup>178</sup>:

### *Tumores epiteliales*

#### Adenoma

- Tubular.
- Velloso.
- Tubulovelloso.
- Dentado.

Neoplasia intraepitelial (displasia) relacionada con enfermedades inflamatorias crónicas

- Neoplasia intraepitelial glandular de grado bajo.
- Neoplasia intraepitelial glandular de grado alto.

#### Carcinoma

- Adenocarcinoma.
- Adenocarcinoma mucinoso.
- Carcinoma de células en anillo de sello.
- Carcinoma de células pequeñas.
- Carcinoma adenoescamoso.
- Carcinoma medular.
- Carcinoma indiferenciado.

Carcinoide (neoplasia neuroendocrina bien diferenciada)

- Célula enterocromafina (CE), neoplasia secretora de serotonina.
- Célula L, péptido similar al glucagón y tumor secretor del polipéptido/péptido YY pancreático (PYY).
- Otros.

Carcinoma-adenocarcinoma mixto

- Otros.

*Tumores no epiteliales*

- Lipoma.
- Leiomioma.
- Tumor del estroma gastrointestinal.
- Leiomiosarcoma.
- Angiosarcoma.
- Sarcoma de Kaposi.
- Melanoma.
- Otros.

Linfomas malignos

- Linfoma de célula B de zona marginal con tipo de tejido linfoide relacionado con mucosa.
- Linfoma de célula de manto.
- Linfoma difuso de células B grandes.
- Linfoma de Burkitt.
- Linfoma similar al linfoma de Burkitt o linfoma de Burkitt atípico.

## ANEXO 3. RESULTADOS

Biomarcador	Tejido	H score biopsia endoscópica		Mann-Whitney test valor p	H score Pieza quirúrgica	
		Media (SD)	Mediana(P25P75)		media (SD)	mediana (P25P75)
c-FLIP <sub>L/S</sub> citoplasmático	Normal N=62,60	97 (37.5)	100 (80,120)	<b>&lt;0.0001</b>	130.5 (41.4)	131 (103,150)
	Tumor N=144,84	133 (42.2)	130(105,160)		143 (41.5)	135.5(114.8,180.3)
HIF-1α citoplasmático	Normal N=57,61	70.8(35.8)	70 (50,100)	<b>&lt;0.0001</b>	63.0 (41.4)	50 (40,100)
	Tumor N=134,78	112.8(39.8)	110 (90,135)		87.8 (35.1)	100 (50,108)
HIF-1α nuclear	Normal N=57,61	20.2 (20.7)	17 (0,35)	0.3349	21.3 (23)	30 (15,83)
	Tumor N=134,78	25.8 (28.1)	20 (4.3,38.8)		49.5 (31)	70 (47,160)
P65 citoplasmático	Normal N=55,63	70.4 (52.3)	58(30,100)	<b>0.0002</b>	77.1 (45.2)	8 (46,106)
	Tumor N=140,84	98.8 (46.5)	98 (69,125.8)		115.4(41.5)	115 (98,138.5)
P50 citoplasmático	Normal N=49,55	101 (35.8)	110 (90,125)	<b>0.0003</b>	111.6 (34.1)	110 (99,132.5)
	Tumor N=140,72	124.9 (45.7)	130 (100,150)		111.3 (41.4)	117 (100,135)
P50 nuclear	Normal N=49,55	6.2 (11.3)	0 (0,7)	<b>0.0305</b>	16.7 (13.5)	20 (5,29)
	Tumor N=140,72	8.8 (13.1)	5 (0,10)		16.7 (11.8)	15 (8.8,25)

Análisis inmunohistoquímico en tejido normal, biopsia pre-tratamiento y post-tratamiento



Biomarcador	Tejido	Rango H score Biopsia endoscópica			Mann Whitney test valor p	Rango H score Pieza quirúrgica		
		bajo	moderado	alto		bajo	moderado	alto
c-FLIPL/s nuclear	Normal N=62,60	19 (33%)	32 (56%)	6 (11%)	0.7709	4 (7%)	26 (46%)	26 (46%)
	Tumor N=144,84	40 (30%)	76 (56%)	19 (14%)		23 (30%)	36 (47%)	17 (22%)
P65 nuclear	Normal N=55,63	28 (51%)	20 (36%)	7 (13%)	0.5166	25 (40%)	31 (49%)	7 (11%)
	Tumor N=140,84	59 (42%)	56 (40%)	25 (18%)		21 (25%)	27 (32%)	36 (43%)
B catenin citoplásmico	Normal N=53,52	24 (45%)	29 (55%)	0 (0%)	<0.0001	9 (17%)	41 (79%)	2 (4%)
	Tumor N=138,71	14 (10%)	104 (75%)	20 (14%)		5 (7%)	42 (59%)	24 (34%)
B-catenin nuclear	Normal N=53,52	51 (96%)	2 (4%)	0 (0%)	<0.0001	48 (92%)	3 (6%)	1 (2%)
	Tumor N=138,71	67 (49%)	58 (42%)	13 (9%)		14 (20%)	34 (48%)	23 (32%)

### Análisis inmunohistoquímico en tejido normal y biopsia pre y post-tratamiento



## Perfil de expresión 1

<i>Nº de condiciones presentes</i>	<i>Modelo de regresión de Cox</i>			<i>SLE (Kaplan-Meier)</i>	
	<b>HR</b>	<b>CI 95%</b>	<b>p</b>	<b>SLE a los 5 a</b>	<b>CI 95%</b>
0	1	-		92.7%	83.5-100
1	2.688	1.48-4.89	0.001	81.1%	71.6-91.8
2	7.224	2.19-23.87	0.001	61.3%	45.4-82.8

## Perfil de expresión 2

<i>Nº de condiciones presentes</i>	<i>SLE (Kaplan-Meier)</i>			
	<b>TGR2</b>		<b>TGR3-5</b>	
	<b>SLE a los 5 a</b>	<b>CI 95%</b>	<b>SLE a los 5 a</b>	<b>CI 95%</b>
0	100%		83.9%	65.7-100
1	100%		58.3%	37.4-90.9
2	37.5%	15.3-91.7	53%	26.6-100





## Perfil de expresión 3

<i>SLE (Kaplan-Meier)</i>				
<i>Número de condiciones presentes</i>	<b>TGR2</b>		<b>TGR3-5</b>	
	SLE a los 5 a	<b>CI 95%</b>	SLE a los 5 a	<b>CI 95%</b>
<b>0</b>	100%		100%	
<b>1-2</b>	100%		73.9%	56.6-96.5
<b>3-4</b>	50%	26.9-92.9	46.4%	23.8-90.7

## Perfil de expresión 3

<i>Número de condiciones presentes</i>	<i>Modelo de regresión de Cox</i>			<i>SLE (Kaplan-Meier)</i>	
	<b>HR</b>	<b>CI 95%</b>	<b>p</b>	<b>SLE a los 5 a</b>	<b>CI 95%</b>
<b>0</b>	1	-		100%	
<b>1-2</b>	4.9	1.8-13.1	0.002	84.5%	72.8-98
<b>3-4</b>	24.0	3.4-172	0.002	50.4%	32.9-77.1



*ARTÍCULO*

---



# Prognostic value of c-FLIP<sub>L/s</sub>, HIF-1 $\alpha$ , and NF- $\kappa$ $\beta$ in stage II and III rectal cancer

Anna Novell · Montserrat Martínez-Alonso ·  
Moises Mira · Jordi Tarragona · Antonieta Salud ·  
Xavier Matias-Guiu

Received: 2 November 2013 / Revised: 21 February 2014 / Accepted: 13 March 2014 / Published online: 8 April 2014  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

**Abstract** Locally advanced rectal cancer (LARC) is associated with a 25 % rate of metastases. The prognostic and predictive relevances of the expression of five proteins (c-FLIP<sub>L/s</sub>, HIF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -catenin, p65, and p105/p50 NF- $\kappa$  $\beta$ ) were assessed. This is a retrospective study. From 1998 to 2009, 152 patients with stage II/III rectal cancer were treated with radio-chemotherapy. TMAs constructed with tumor and normal tissue from the diagnostic endoscopic biopsy and the surgical specimen after chemoradiotherapy were subjected to immunohistochemical (IHC) analysis. Results were correlated with clinical and pathological data, including progression-free survival (PFS). Four different IHC conditions were independent prognostic parameters for PFS: (1) cytoplasmic c-FLIP<sub>L/s</sub> ( $p=0.007$ ), (2) nuclear HIF-1 $\alpha$  ( $p=0.020$ ), (3) a change in the cytoplasmic p65 between the diagnostic biopsy and the post-treatment specimen ( $p=0.004$ ), and (4) a change in the cytoplasmic c-FLIP<sub>L/s</sub> between the diagnostic biopsy

and the post-treatment specimen ( $p=0.021$ ). Three different protein expression profiles, combining biomarkers, showed prognostic significance. IHC evaluation of these biomarkers in our three protein expression profiles may help to identify patients with worse prognosis and design more effective therapeutic strategies to personalize the treatment of rectal cancer.

**Keywords** c-FLIP<sub>L/s</sub> · HIF-1 $\alpha$  · p65 · Prognosis · LARC · Protein expression profile

## Introduction

Colorectal cancer (CRC) accounted for 9.7 % of all new cancers in the world in 2008 [3] and was the second most common cause of death from cancer [8]. Rectal cancer represents more than 30 % of CRC [29].

Improvements in management of locally advanced rectal cancer (LARC) have resulted in multimodality treatments by combining pre-operative-intensified chemoradiotherapy (CRT) and a standardized surgical approach [27]. This approach allows sphincter preservation and reduces local recurrences, but there is still a 25 % risk of distant metastases [18, 27]. There is need to identify prognostic/predictive markers to improve progression-free survival (PFS) as an important step for individualizing patient management [4, 15].

We have assessed protein expression (c-FLIP<sub>L/s</sub>, HIF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -catenin, p65 NF- $\kappa$  $\beta$ , and p105/p50 NF- $\kappa$  $\beta$ ) in rectal tissue at diagnosis, before pre-operative chemoradiotherapy, and in the resected specimen, after multimodal therapy. The possible predictive/prognostic role on progression-free survival (PFS) was evaluated in stage II/III rectal cancer patients.

---

Antonieta Salud and Xavier Matias-Guiu are both senior co-authors.

A. Novell · J. Tarragona · A. Salud (✉) · X. Matias-Guiu (✉)  
Departments of Pathology and Medical Oncology, Hospital  
Universitari Aina de Vilanova. Universitat de Lleida, IRBLleida,  
Av. Rovira Roure, 80, 25198 Lleida, Spain  
e-mail: asaluds@hotmail.com  
e-mail: fmatiasguiu.lleida.ics@gencat.cat

M. Martínez-Alonso  
Department of Biostatistics & Methodological Support, IRBLleida,  
Lleida, Spain

M. Mira  
Department of Radiation Oncology, Hospital Universitari Aina de  
Vilanova. Universitat de Lleida, IRBLleida, Lleida, Spain

A. Salud  
Department of Medical Oncology, Hospital Universitari Aina de  
Vilanova. Universitat de Lleida, IRBLleida, Lleida, Spain

## Materials and methods

### Patients

The series was composed of 152 rectal cancer patients, stages II/III, subjected to CRT at the Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida (HUAV), and surgically treated in HUAV, Hospital Santa Maria, Clinica de Ponent, and Barbastro Hospitals in Spain (1998–2009). An informed consent was obtained from each patient, and the study was approved by the local ethical committee.

After pathologic diagnosis in a colonoscopic biopsy, every patient underwent pre-operative 45- to 50.4-Gy radiation treatment in standard fraction at 1.8 Gy/fraction, together with administration of a member of fluorinated pyrimidines as chemotherapy. Approximately 6 weeks after CRT, standardized surgery (total mesorectal excision, TME) was performed.

Surgical specimens were examined by following a precise protocol. The mesorectal margin was inked, and after fixation, the specimens were serially sectioned in 3 to 5 mm intervals. The non-peritonealized surface was examined circumferentially, and the completeness of the mesorectum was scored. In all cases, the quality of the surgical technique was excellent with only minor irregularities of the mesorectal surface and no surface defects greater than 5 mm in depth. A standardized report included tumor type, grade, tumor borders (infiltrative or expansile), lymphovascular and perineural invasion, proximal, distal, and radial margins, lymph nodes, pTNM stage, and tumor regression grade (TRG), based on Mandard's classification. The circumferential (radial) margin was considered negative if the tumor was more than 1 mm from the inked non-peritonealized surface.

Follow-up data is shown in Table 1. Follow-up ranged from 30 to 68.4 months (mean 49.2). Follow-up time was calculated between the date of tumor resection and date of death, or that of the last visit, for surviving patients. November 2011 was the last follow-up date. PFS was defined as the time free of local or distant recurrences or death.

### Tissue samples

There were two different tissue samples, fixed in formalin and embedded in paraffin, with controlled pre-analytical variables (delayed fixation and overfixation): (1) the diagnostic biopsy obtained during colonoscopy and (2) tissue from the surgical specimen after CRT. For each sample, both tumor and normal tissues were analyzed.

### Tissue microarray (TMA)

A tissue arrayer device (Beecher Instrument) was used. Four cylinders, 0.6 mm in largest diameter, were taken from the tumor and one cylinder from normal tissue per sample. This

**Table 1** Clinicopathological variables in stage II/III rectal cancer patients (N=152)

Age (years), median (range)	71 (61–77)
Gender, <i>n</i> (%)	
Male	107 (70.4)
Female	45 (29.6)
Diagnostic tumor size (cm), median (range)	40 (30–55)
Resected tumor size (cm), median (range)	15 (9–25)
Histologic grade, <i>n</i> (%)	
Low	7 (4.5)
Intermediate	135 (89)
High	10 (6.5)
TRG (Mandard's classification), <i>n</i> (%)	
TRG1 (complete regression; <1 % tumor cells)	29 (19.1)
TRG2 (isolated tumor cell nests; 1–20 % tumor cells)	64 (42.1)
TRG3 (more residual cancer cells but fibrosis still predominates; 21–50 % tumor cells)	29 (19.1)
TGR4 (residual cancer outgrowing fibrosis; 51–80 % tumor cells)	22 (14.5)
TGR5 (absence of regressive changes; >80 % tumor cells)	4 (2.6)
Unknown	4 (2.6)
Status, <i>n</i> (%)	
Dead (rectal cancer related)	20 (13.2)
Dead (non-rectal cancer causes)	44 (28.4)
Recurrence, <i>n</i> (%)	
Local	7 (4.5)
Distant	24 (15.8)

approach has previously shown a >90 % concordance with conventional whole sections [20, 21].

### IHC analysis

Comparative studies were performed on sequential serial sections. TMA blocks were sectioned at a thickness of 3  $\mu$ m, dried for 1 h at 65 °C, dewaxed, and rehydrated. Antigen retrieval for c-FLIP<sub>L/s</sub>, p65,  $\beta$ -catenin, and HIF-1 $\alpha$  was achieved by heating in a PT Link (Dako, Denmark) at 95 °C for 20 min at pH 9. Heat-induced antigen retrieval for p50 was performed in a PT Link (Dako, Denmark) at 95 °C for 20 min at pH 6. Endogenous peroxidase was blocked. Primary antibodies and incubation times were as follows: c-FLIP<sub>L/s</sub> (1:200; c-19; Santa Cruz Biotechnology, Inc.; incubation 20 min), NF- $\kappa$ B p65 (1:50, c-20; Santa Cruz Biotechnology, Inc; incubation 30 min), NF- $\kappa$ B p105/p50 (1:100; incubation 35 min), HIF-1 $\alpha$  (1:100; ab-1; Abcam; incubation 35 min), and  $\beta$ -catenin (1:300; BD Transduction Laboratories; incubation 20 min). The reaction was visualized with EnVision Flex (Dako). Sections were counterstained with hematoxylin. Appropriate positive and negative controls were tested.

Immunohistochemical (IHC) evaluation was done by two observers. Discrepancies were solved by joint examination. A histological score (Hsc) was obtained. Hsc takes into consideration the percentage of positive cells and the intensity of their staining, and ranges from 0 to 300. The reliability of such approach scores in TMA IHC has been reported [21]. The reproducibility of TMA immunostaining was confirmed by comparing TMA cylinders and corresponding whole sections obtained from the paraffin donor blocks of 20 randomly selected cases.

#### Sample size

Sample size was estimated to be able to detect a statistically significant hazard ratio of 3 for patients with the maximum value compared to patients with minimum value in the score based on candidate protein expression profiles. Fixing a significance level of 0.05, a power of 0.80, an expected progression of 20 %, and protecting by a maximum 15 % of missing information is expected to affect immunohistochemical protein expression quantifications when taking into account similar proportion of patients in each of the groups to be compared, with a minimum required number of 152 patients [22].

#### Statistical analysis

Concordant expression of tumor markers in TMA cylinders and whole sections was checked by Pearson linear correlation as well as by Wilcoxon test for systematic differences in the 20 randomly selected cases. When the validation of the Hsc for a particular protein was not statistically significant as a quantitative variable, Hsc results were converted into categorical variables. This involves calculating the percentage of tumors with an intensity of either nuclear or cytoplasmic staining of low, moderate, or high protein expression. In this validation process, the reliability was studied through intraclass correlation coefficient (ICC) in Hsc results ranged from 0.747 to 0.948, and kappa index in categorical variables ranged from 0.51 to 0.94, statistically significant in all cases. The Wilcoxon test was used for the difference of protein Hsc expression between tumor at diagnosis vs. surgical tissue, while McNemar's test was used to compare changes in categorical results.

The association between protein expression and TRG was examined using the Kruskal–Wallis test for Hsc values and the Fisher exact test for categorical values. Differences in PFS between groups were calculated using the Kaplan–Meier curves and compared by log-rank test. Patients who died from postoperative complications were excluded from the survival analyses. Deaths resulting from non-rectal cancer-related causes were censored at the time of death. Multivariate analysis using the Cox proportional-hazards model was used to determine hazard ratios and identify variables with prognostic

potential. A significance level of 0.05 and the freeware software R were used in all the statistical analysis.

## Results

### Biomarker expression in pre-treatment diagnostic biopsy and post-treatment resection (normal and tumor tissue)

Results are shown in Tables 2 and 3. c-FLIP<sub>L/S</sub> showed cytoplasmic and nuclear expression. Cytoplasmic expression of c-FLIP<sub>L/S</sub> was higher in tumor (mean Hsc=133) than in normal tissue (mean Hsc=97) of the diagnostic biopsy ( $p<0.001$ ), and there was no increase in the tumor after treatment (mean Hsc=143;  $p=0.190$ ). Similar low-moderate nuclear expression was seen in tumor (30 % low, 56 % moderate, 14 % high) in comparison with normal tissue (33 % low, 56 % moderate, 11 % high) in the diagnostic biopsy ( $p=0.770$ ). There was no change of nuclear expression in the tumor after CRT ( $p=0.360$ ).

Cytoplasmic HIF-1 $\alpha$  expression was higher in tumor (mean Hsc=113) than in normal tissue (mean Hsc=71) of the diagnostic biopsy ( $p<0.001$ ). There was a decrease in the tumor after CRT (mean Hsc=88) ( $p<0.001$ ). Nuclear HIF-1 $\alpha$  expression was similarly low in tumor (mean Hsc=28) and normal tissue (mean Hsc=21) in the diagnostic biopsy ( $p=0.330$ ). There was an increase in nuclear HIF-1 $\alpha$  in the tumor after treatment (mean Hsc=50;  $p=0.002$ ).

Cytoplasmic NF- $\kappa$ B p65 expression was higher in tumor (mean Hsc=99) than in normal tissue (mean Hsc=70) of the diagnostic biopsy ( $p<0.001$ ). There was an increased expression after CRT (mean Hsc=115;  $p=0.010$ ). Nuclear p65 expression was similarly low-moderate in tumor (42 % low, 40 % moderate, 18 % high) and in normal tissue (51 % low, 36 % moderate, 13 % high) of the diagnostic biopsy ( $p=0.52$ ). An increase in nuclear p65 after treatment was seen in 54 % of tumors ( $p<0.001$ ).

Cytoplasmic NF- $\kappa$ B p105/p50 expression was higher in tumor (mean Hsc=125) than in normal tissue (mean Hsc=101) of the diagnostic biopsy ( $p<0.001$ ). There was a decreased expression in the tumor after CRT (mean Hsc=114;  $p=0.005$ ). p105/p50 nuclear expression was slightly higher in tumor (mean Hsc=9) than in normal tissue (mean Hsc=6) of the diagnostic biopsy ( $p=0.030$ ). There was an increased expression in the tumor after treatment (mean Hsc=17;  $p<0.001$ ).

There was no statistically significant linear association between cytoplasmic c-FLIP and NF- $\kappa$ B p65, but we found a statistically significant linear association between cytoplasmic FLIP and NF- $\kappa$ B p105/p50. The correlation between cytoplasmic c-FLIP and NF- $\kappa$ B p105/p50 was with pre-treatment cytoplasmic NF- $\kappa$ B p105/p50 expression (Pearson correlation  $r=0.41$ ,  $p<0.001$ ) and their



**Table 2** Quantitative IHC analysis in tumor and normal tissue in diagnostic, pre-treatment biopsy, and post-treatment surgical specimen

Biomarker	Type of tissue	H score endoscopic biopsy		Mann–Whitney test <i>p</i> value	H score surgical specimen	
		Mean (SD)	Median (P25, P75)		Mean (SD)	Median (P25, P75)
Cytoplasmic c-FLIP <sub>L/S</sub>	Normal <i>N</i> =62, 60	97 (37.5)	100 (80, 120)	<0.001	130.5 (41.4)	131(103, 150)
	Tumor <i>N</i> =144, 84	133 (42.2)	130(105, 160)		143 (41.5)	135.5(114.8, 180.3)
Cytoplasmic HIF-1 $\alpha$	Normal <i>N</i> =57, 61	70.8(35.8)	70 (50, 100)	<0.001	63.0 (41.4)	50 (40, 100)
	Tumor <i>N</i> =134, 78	112.8(39.8)	110 (90, 135)		87.8 (35.1)	100 (50, 108)
Nuclear HIF-1 $\alpha$	Normal <i>N</i> =57, 61	20.2 (20.7)	17 (0, 35)	0.335	21.3 (23)	30 (15, 83)
	Tumor <i>N</i> =134, 78	25.8 (28.1)	20 (4.3, 38.8)		49.5 (31)	70 (47, 160)
Cytoplasmic P65	Normal <i>N</i> =55, 63	70.4 (52.3)	58(30, 100)	<0.001	77.1 (45.2)	8 (46, 106)
	Tumor <i>N</i> =140, 84	98.8 (46.5)	98 (69, 125.8)		115.4(41.5)	115 (98, 138.5)
Cytoplasmic P50	Normal <i>N</i> =49, 55	101 (35.8)	110 (90, 125)	<0.001	111.6 (34.1)	110 (99, 132.5)
	Tumor <i>N</i> =140, 72	124.9 (45.7)	130 (100, 150)		111.3 (41.4)	117 (100, 135)
Nuclear P50	Normal <i>N</i> =49, 55	6.2 (11.3)	0 (0, 7)	0.031	16.7 (13.5)	20 (5, 29)
	Tumor <i>N</i> =140, 72	8.8 (13.1)	5 (0, 10)		16.7 (11.8)	15 (8.8, 25)

*N* (*x*, *y*) *x*=number of patients for the tissue analysis at diagnosis, *y*=number of patients for the tissue analysis in surgically resected tumors. P25 25th percentile, P75 75th percentile

cytoplasmatic (Pearson correlation  $r=0.39$ ,  $p=0.002$ ) and nuclear (Pearson correlation  $r=0.31$ ,  $p=0.014$ ) change post-treatment.

Cytoplasmic  $\beta$ -catenin expression was higher in tumor (10 % low, 75 % moderate, 14 % high) than in normal tissue (45 % low, 55 % moderate, 0 % high) in the diagnostic biopsy ( $p<0.001$ ). A significant proportion of tumors (34 %) showed an increased expression after treatment ( $p=0.040$ ). Nuclear  $\beta$ -catenin expression was higher in tumor (49 % low, 42 % moderate, 9 % high) than in normal tissue (96 % low, 4 % moderate, 0 % high) in the diagnostic biopsy ( $p<0.001$ ). There was no increase in nuclear expression in the tumor after CRT ( $p=0.060$ ).

Possible prediction of TRG in post-treatment resection by analysis of protein expression in the pre-treatment diagnostic biopsy

Analysis of the expression of any of these proteins did not allow prediction of TRG in the surgical specimen ( $p$  value  $>0.050$ ). Groups TRG4 and TRG5 were combined.

Prognostic value of protein expression and protein expression profiles

Cases were distributed in three groups (TRG1, TRG2, and TRG3+TRG4+TRG5), because similar median of PFS were

**Table 3** Categorical IHC analysis in tumor and normal tissue in diagnostic, pre-treatment biopsy, and post-treatment surgical specimen

Biomarker	Type of tissue	H score range endoscopic biopsy, <i>n</i> (%)			Mann–Whitney test <i>p</i> value	H score range surgical specimen, <i>n</i> (%)		
		Low	Moderate	High		Low	Moderate	High
Nuclear c-FLIP <sub>L/S</sub>	Normal <i>N</i> =62, 60	19 (33)	32 (56)	6 (11)	0.770	4 (7)	26 (46)	26 (46)
	Tumor <i>N</i> =144, 84	40 (30)	76 (56)	19 (14)		23 (30)	36 (47)	17 (22)
Nuclear p65	Normal <i>N</i> =55, 63	28 (51)	20 (36)	7 (13)	0.520	25 (40)	31 (49)	7 (11)
	Tumor <i>N</i> =140, 84	59 (42)	56 (40)	25 (18)		21 (25)	27 (32)	36 (43)
Cytoplasmic $\beta$ -catenin	Normal <i>N</i> =53, 52	24 (45)	29 (55)	0 (0)	<0.001	9 (17)	41 (79)	2 (4)
	Tumor <i>N</i> =138, 71	14 (10)	104 (75)	20 (14)		5 (7)	42 (59)	24 (34)
Nuclear $\beta$ -catenin	Normal <i>N</i> =53, 52	51 (96)	2 (4)	0 (0)	<0.001	48 (92)	3 (6)	1 (2)
	Tumor <i>N</i> =138, 71	67 (49)	58 (42)	13 (9)		14 (20)	34 (48)	23 (32)

H score range of nuclear p65 and c-FLIP<sub>L/S</sub> is low (0), moderate (1–25), and high ( $>25$ ). H score range of cytoplasmic and nuclear  $\beta$ -catenin is low (0–99), moderate (100–199), and high (200–300)

*N* (*x*, *y*) *x*=number of patients for the tissue analysis at diagnosis, *y*=number of patients for the tissue analysis in surgically resected tumors

seen in TRG3, TRG4, and TRG5 groups. Prognostic value was assessed for every single protein, but also for protein expression profiles, obtained after combining several proteins.

Four relevant biomarkers exhibited an independent prognostic value for PFS with  $p < 0.050$ : (1) diagnostic cytoplasmic c-FLIP<sub>L/s</sub> (Hsc > 140;  $p = 0.007$ ), (2) diagnostic nuclear HIF-1 $\alpha$  (Hsc > 10;  $p = 0.020$ ), (3) an increase in p65 cytoplasmic expression between the diagnostic biopsy and the post-treatment resection (Hsc > 10;  $p = 0.004$ ), and (4) a decrease or equal expression in cytoplasmic c-FLIP<sub>L/s</sub> between the diagnostic biopsy and the resection (Hsc  $\leq 0$ ;  $p = 0.020$ ).

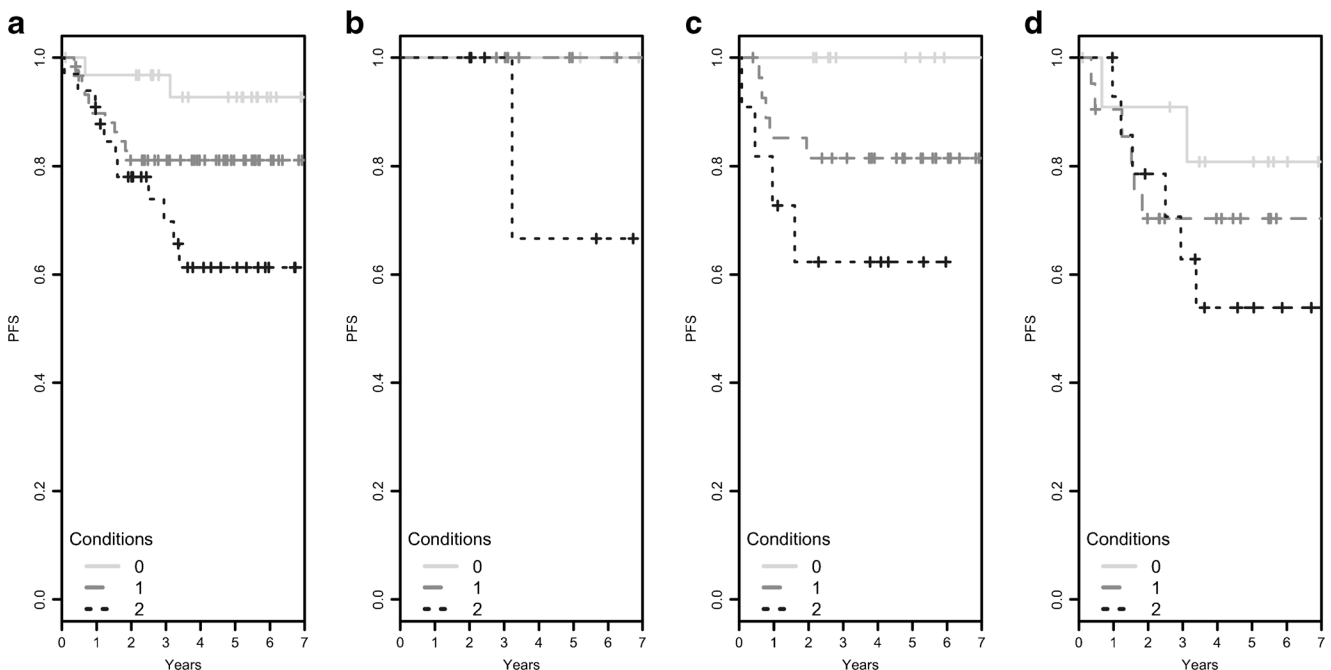
Three different protein expression profiles were identified through a multivariate logistic regression. The cutoff point for each biomarker was selected from the Hsc values that optimized the logistic model.

Protein expression profile 1 required evaluation, in the tumor at the diagnostic biopsy, of two conditions: (1) cytoplasmic c-FLIP (Hsc > 140) and (2) nuclear HIF-1 $\alpha$  (Hsc > 10; Fig. 1). When patients were not discriminated by TRG (Fig. 1a), a 5-year PFS was 92.8 % when 0 condition was present, 81.1 % for 1 condition, and 61.3 % for 2 conditions (Table 4). The presence of 0, 1, or 2 conditions correlated with survival, even in TRG1 patients. Figure 1b shows that the 5-year PFS for TRG1 patients with 0 or 1 condition was 100 %, and it was 66.7 % for 2 conditions. All TRG2 patients with 0 condition were free of disease. However, the 5-year PFS for TRG2 patients was 81.5 % for 1 condition and 62.3 % for 2 conditions (Fig. 1c; Table 5). Similarly, the 5-year PFS for TRG3/TRG4/TRG5 patients with 0 condition was 80.8 %,

70.4 % with 1 condition, and 53.9 % with 2 conditions (Fig. 1d; Table 5).

Protein expression profile 2 required assessment in the tumor in the diagnostic biopsy and the resected tumor of two conditions: (1) diagnostic cytoplasmic c-FLIP<sub>L/s</sub> (Hsc > 140) together with a Hsc  $\leq 0$  change between diagnostic biopsy and surgical specimen, and (2) change in cytoplasmic p65 (Hsc > 10) between the diagnostic biopsy and the surgical specimen (Fig. 2). When patients were not discriminated by TRG (Fig. 2a), the 5-year PFS was 92.7 % when 0 condition was present, 74.5 % for tumors with 1 condition, and 48.6 % for 2 conditions (Table 4). Moreover, the 5-year PFS was 100 % for TRG2 patients with 0 or 1 condition and 37.5 % for patients with 2 conditions (Fig. 2b; Table 5). Similarly, the 5-year PFS was 83.9 % for TRG3/TRG4/TRG5 patients with 0 condition, 58.3 % for 1 condition, and 53 % for 2 conditions (Fig. 2c; Table 5).

Protein expression profile 3 is a statistically more powerful combination of the first and the second profiles: (1) cytoplasmic c-FLIP<sub>L/s</sub> (Hsc > 140) in the diagnostic biopsy, (2) nuclear HIF-1 $\alpha$  (Hsc > 10) in the diagnostic biopsy, (3) change in cytoplasmic c-FLIP<sub>L/s</sub> expression (Hsc  $\leq 0$ ) between the diagnostic biopsy and surgical specimen, and (4) change in cytoplasmic p65 expression (Hsc > 10) between the diagnostic biopsy and surgical specimen (Fig. 3). When patients were not discriminated by TRG (Fig. 3a), the 5-year PFS was 100 % for 0 condition, 84.5 % for 1 or 2 conditions, and 50.4 % for 3 or 4 conditions (Table 4). The 5-year PFS for TRG2 patients presenting 0, 1, or 2 conditions was 100 %, and



**Fig. 1** PFS in correlation with protein expression profile 1. Survival was examined without and with discrimination of TRG, according to the presence of 0, 1, or 2 conditions. **a** Kaplan–Meier plot for PFS without

discriminating TRG. **b** Kaplan–Meier plot for PFS for TRG1. **c** Kaplan–Meier plot for PFS for TRG2. **d** Kaplan–Meier plot for PFS for TRG $\geq 3$

**Table 4** HR and PFS of each protein expression profile, examined in patients without discrimination of TRG, according to the presence of satisfied conditions

Number of satisfied condition <sup>a</sup>	Cox proportional-hazards regression model		<i>p</i> value	PFS (Kaplan–Meier estimates)	
	HR	95 % CI		5-year survival (%)	95 % CI
Protein expression profile 1					
0	1	–	–	92.7	83.5–100
1	2.69	1.48–4.89	0.001	81.1	71.6–91.8
2	7.22	2.19–23.87	0.001	61.3	45.4–82.8
Protein expression profile 2					
0	1	–	–	92.8	83.7–100
1	3.13	1.6–6.12	<0.001	74.5	58.8–94.5
2	9.78	2.55–37.5	<0.001	48.6	29.4–80.3
Protein expression profile 3					
0	1	–	–	100	–
1–2	4.9	1.8–13.1	0.002	84.5	72.8–98
3–4	24.0	3.4–172	0.002	50.4	32.9–77.1

<sup>a</sup> Estimated as ordinal score, not factor

50 % for 3 or 4 conditions (Fig. 3b; Table 5). The 5-year PFS for TRG3/TRG4/TRG5 patients with 0 condition was 100 %, 73.9 % for 1 or 2 conditions, and 46.4 % for 3 or 4 conditions (Fig. 3c; Table 5).

Figures 4 and 5 show representative examples of application of protein expression profile 1 and 2.

## Discussion

In this study, we assessed the expression of five proteins in rectal cancer patients with stage II/III, subjected to CRT. These proteins participate in signaling pathways modulating survival, apoptosis, and hypoxia in cancer. A comparative IHC study

was done in normal tissue and tumor tissue before and after CRT. Their possible predictive/prognostic value was assessed.

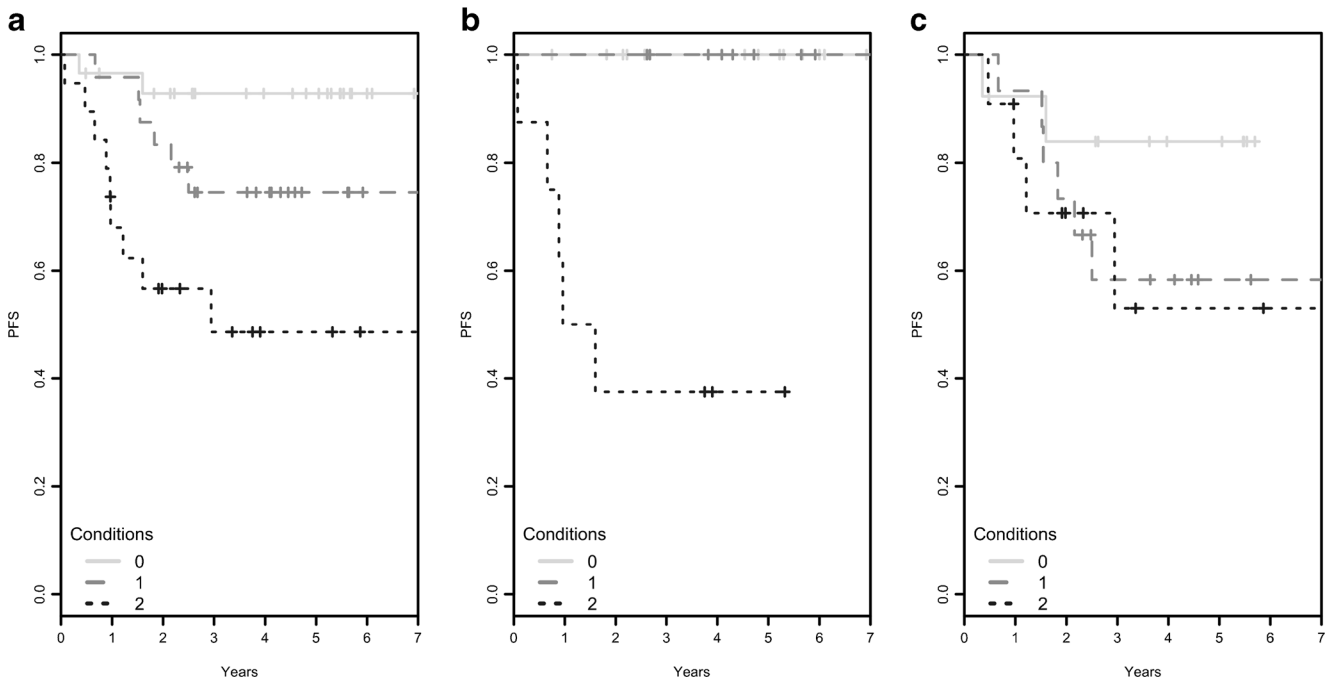
NF- $\kappa$ B has a role in apoptosis inhibition and tumor promotion and progression [5]. The best characterized subunit of NF- $\kappa$ B is p65, which forms heterodimers with p50 for classical and atypical activation [29]. Inhibition of NF- $\kappa$ B signals enhances apoptotic response to chemotherapy and radiotherapy [13]. HIF-1 $\alpha$  regulates the expression of genes responsible for glucose metabolism, angiogenesis, and cell survival [2], and has an important role by mediating hypoxia signaling [1]. FLICE inhibitory protein (c-FLIP) is an inhibitor of death receptor signaling [26, 30]. In vitro studies showed that c-FLIP downregulation sensitizes to death ligand-induced apoptosis and synergistically enhances chemotherapy-induced

**Table 5** PFS of each protein expression profile examined in patients after discriminating for TRG, according to the presence of satisfied conditions

Number of satisfied conditions <sup>a</sup>	<i>N</i>	PFS (Kaplan–Meier estimates)							
		TRG1		<i>N</i>	TRG2		<i>N</i>	TRG3–5	
		5-year PFS (%)	95 % CI		5-year PFS (%)	95 % CI		5-year PFS (%)	95 % CI
Protein expression profile 1 (125 patients; 26 events)									
0	7	100	–	13	100	–	12	80.8	60–100
1	10	100	–	28	81.5	68.1–97.5	21	70.4	53–93.4
2	6	66.7	30–100	11	62.3	38.9–99.9	15	53.9	32.3–89.9
Protein expression profile 2 (72 patients; 18 events)									
0	–	–	–	16	100	–	13	83.9	65.7–100
1	–	–	–	9	100	–	15	58.3	37.4–90.9
2	–	–	–	8	37.5	15.3–91.7	11	53	26.6–100
Protein expression profile 3 (72 patients; 18 events)									
0	–	–	–	6	100	–	3	100	–
1–2	–	–	–	13	100	–	20	73.9	56.6–96.5
3–4	–	–	–	10	50	26.9–92.9	14	46.4	23.8–90.7

*N* number of patients

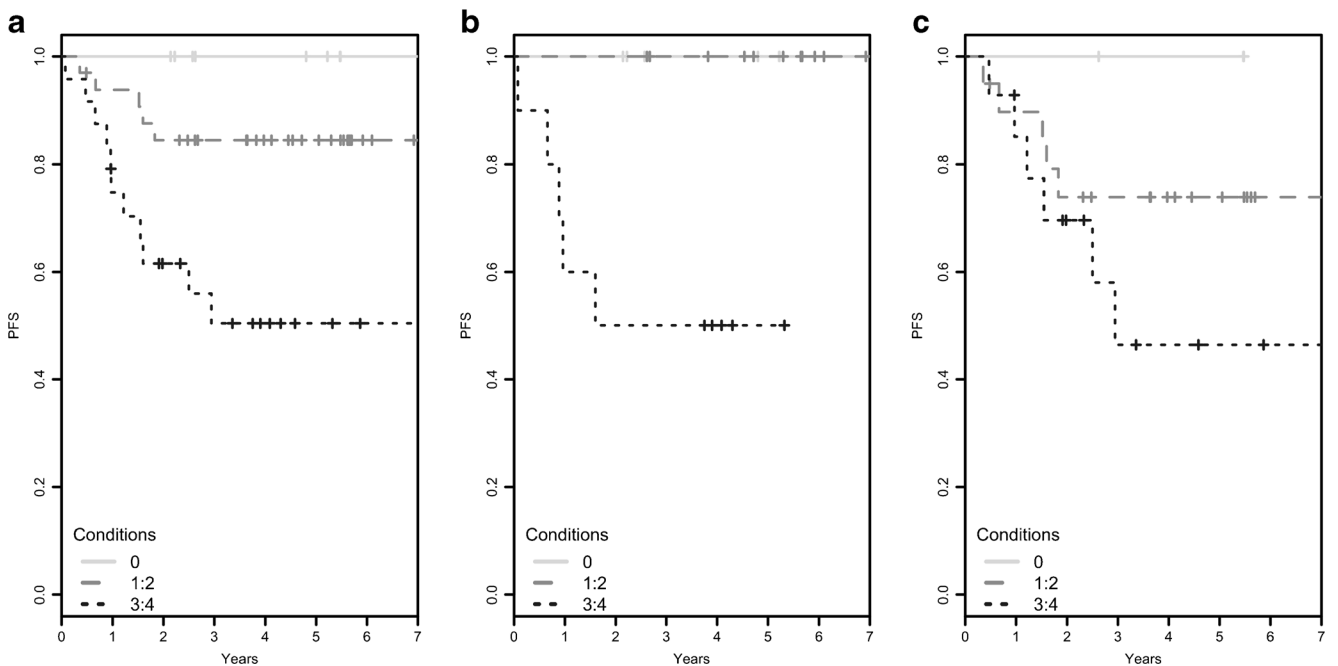
<sup>a</sup> Estimated as ordinal score, not factor



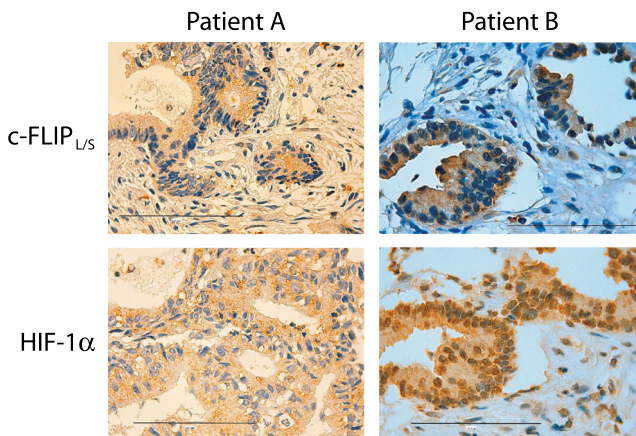
**Fig. 2** PFS in correlation with protein expression profile 2. Survival was examined without and with discrimination of TRG, according to the presence of 0, 1, or 2 conditions. **a** Kaplan–Meier plot for PFS without distinguishing TRG. **b** Kaplan–Meier plot for PFS for TRG2. **c** Kaplan–Meier plot for PFS for TRG3, 4, or 5

apoptosis [30].  $\beta$ -catenin is an oncogenic protein that acts both as a transcriptional co-regulator and an adaptor protein for intracellular adhesion in Wnt signal transduction [24]. High levels of cytoplasmic and nuclear  $\beta$ -catenin expression are frequent in some types of tumors [16].

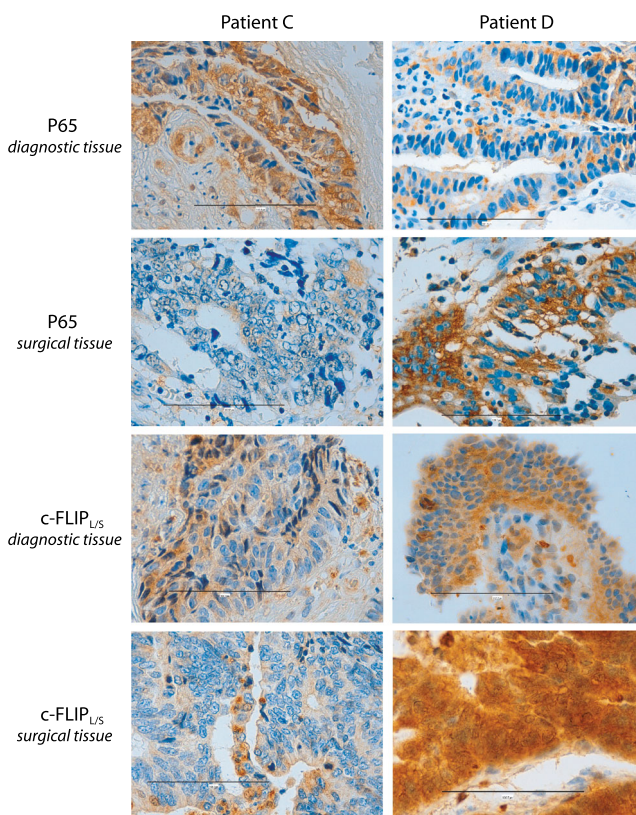
$\text{NF-}\kappa\beta$ , c-FLIP, HIF-1 $\alpha$ , and  $\beta$ -catenin show some interactions in the setting of some molecular pathways. For example, c-FLIP has been shown to be regulated by  $\text{NF-}\kappa\beta$  in several types of cells. Activation of the transcription factor  $\text{NF-}\kappa\beta$  is a major effector of the inducible resistance to death



**Fig. 3** PFS in correlation with protein expression profile 3. Survival was examined without and with discrimination of TRG, according to the presence of 0, 1, 2, 3, or 4 conditions. **a** Kaplan–Meier plot for PFS without distinguishing TRG. **b** Kaplan–Meier plot for PFS for TRG2. **c** Kaplan–Meier plot for PFS for TRG3, 4, or 5



**Fig. 4** Two representative examples of application of protein expression profile 1. *Patient A* showed no condition of protein expression profile 1, so the 5-year PFS for TRG1 with 0 conditions was 100 %. This person was alive without metastases in the last follow-up date. *Patient B* showed two conditions of protein expression profile 1. Consequently, the 5-year PFS for TRG2 with 2 conditions was 62.3 %. This patient died with metastases 4 years after diagnosis. Zoom 63 $\times$ , Bar 100  $\mu$ m



**Fig. 5** Two representative examples of application of protein expression profile 2. *Patient C* showed no condition of protein expression profile 2, so the 5-year PFS for TRG4 with 0 conditions of protein expression profile 2 was 83.9 %. This patient died without metastases 6 years after diagnosis. *Patient D* showed two conditions of protein expression profile 2. Consequently, the 5-year PFS for TRG4 with 2 conditions of protein expression profile was 53 %. This patient died with metastases 1 year after diagnosis. Zoom 63 $\times$ , Bar 100  $\mu$ m

receptor-mediated apoptosis, which upregulates the caspase 8 inhibitor FLIP [17]. Thus, c-FLIP enhances canonical Wnt signaling by inhibiting proteasomal degradation of  $\beta$ -catenin [19]. Moreover, HIF-1 $\alpha$  is regulated by both NF- $\kappa$ B and  $\beta$ -catenin [10, 11].

Our results show that these biomarkers are overexpressed in tumor in comparison with normal tissue, confirming previous studies [6, 7, 28, 31, 32]. Interestingly, protein expression was higher in tumor tissue after CRT, suggesting that it was induced in response to chemoradiotherapy. However, the results show that these proteins do not play a role as predictors of response to CRT and that their expression does not correlate with TRG.

Interesting results were obtained when assessing the prognostic value of these proteins. Four independent prognostic biomarkers were identified. Two of them (cytoplasmic c-FLIP<sub>L/s</sub> and nuclear HIF-1 $\alpha$ ) were found in the diagnostic pre-treatment biopsy. The other two (cytoplasmic p65 and c-FLIP<sub>L/s</sub> cytoplasmic expression) were identified as changes of expression between the diagnostic biopsy and the post-treatment resection.

Our results point to a novel way of differentiating tumor aggressiveness but agree with previously reported data. In fact, the intensity of c-FLIP<sub>L/s</sub> nuclear expression is similar to what was described previously [26]. Moreover, correlation between c-FLIP<sub>L/s</sub> cytoplasmic expression and survival was also previously shown [12, 26]. Moreover, our study provides information regarding the biologic significance of nuclear versus cytoplasmic HIF-1 $\alpha$  expression, since previously published studies suggested prognostic values for both cytoplasmic [1, 23] or nuclear [9, 14, 25] expression. Our results also confirm NF- $\kappa$ B/p65 as an adverse prognostic marker, as also suggested in previous studies [28]. As far as we know, this is the first study to concentrate on this specific combination of specific biomarkers.

Our most important contribution is the generation of three distinct protein expression profiles with a potential to predict PFS if examined not only at diagnosis but also their changes with therapy. Curiously, we have observed a strong association between these distinct protein expression profiles and outcomes within patients of a certain TRG in determining PFS. The combination of TRG with protein expression profiles stratifies the prognosis in subcategories of TRG. This finding is of high relevance because it suggests that TRG levels are not enough to predict PFS and that the inclusion of the identified biomarkers in this novel profiling for rectal cancer could be of value to design more effective therapeutic strategies. Even more, protein expression profiling may be helpful in identifying patients at a higher risk of a worse PFS regardless of the initial good response to standard pre-operative therapy.

In conclusion, combination of TRG with our protein expression profiles provides a more refined assessment of prognosis within subcategories of TRG. Assessment of c-FLIP<sub>L/S</sub>, HIF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -catenin, p65 NF- $\kappa$ B, and p105/p50 NF- $\kappa$ B expression in rectal cancer in the diagnostic endoscopic biopsy and the surgical specimen after CRT may help to identify patients with higher risk of metastases.

**Acknowledgements** The authors thank Dr. F. Badia and Dr. R. Oncins and the members of the Colorectal Cancer Tumor Boards in Lleida for providing the pathological material and follow-up data. Work supported by the Xarxa de Bancs de Tumors de Catalunya sponsored by Pla Director d'Oncologia de Catalunya (XBTC) and IRBLleida Biobank (B.0000682) and Plataforma Biobancos PT13/0010/0014.

**Funding sources for this work** This work was supported by grants 2009SGR794, RD12/0036/0013.

**All financial disclosures** No financial disclosures.

**Conflict of interest statement** We declare that we have no conflict of interest.

## References

- Baba Y, Noshio K, Shima K, Irahara N, Chan AT, Meyerhardt JA, Chung DC, Giovannucci EL, Fuchs CS, Ogino S (2010) HIF1A overexpression is associated with poor prognosis in a cohort of 731 colorectal cancers. *Am J Pathol* 176:2292–2301
- Ben Lassoued A, Beaufile N, Dales JP, Gabert J (2013) Hypoxia-inducible factor-1alpha as prognostic marker. *Expert Opin Med Diagn* 7:53–70. doi:10.1517/17530059.2012.719022
- Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (2010) WHO classification of tumors of the digestive system.
- Brennan DJ, O'Connor DP, Rexhepaj E, Ponten F, Gallagher WM (2010) Antibody-based proteomics: fast-tracking molecular diagnostics in oncology. *Nat Rev Cancer* 10:605–617. doi:10.1038/nrc2902
- Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X (2005) NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 446:475–482. doi:10.1007/s00428-005-1264-9
- Ellis RD, Goodlad JR, Limb GA, Powell JJ, Thompson RP, Pouchard NA (1998) Activation of nuclear factor kappa B in Crohn's disease. *Inflamm Res* 47:440–445
- Evertsson S, Sun XF (2002) Protein expression of NF-kappaB in human colorectal adenocarcinoma. *Int J Mol Med* 10:547–550
- Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E (2010) Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 46:765–781. doi:10.1016/j.ejca.2009.12.014
- Furlan D, Sahnane N, Carnevali I, Cerutti R, Bertoni F, Kwee I, Uccella S, Bertolini V, Chiaravalli AM, Capella C (2008) Up-regulation of the hypoxia-inducible factor-1 transcriptional pathway in colorectal carcinomas. *Hum Pathol* 39:1483–1494
- Gorlach A, Bonello S (2008) The cross-talk between NF-kappaB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. *Biochem J* 412:e17–e19
- Kaidi A, Williams AC, Paraskeva C (2007) Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. *Nat Cell Biol* 9:210–217
- Korkolopoulou P, Saetta AA, Levidou G, Gigelou F, Lazaris A, Thymara I, Scliri M, Bousboukea K, Michalopoulos NV, Apostolikas N, Konstantinidou A, Tzivras M, Patsouris E (2007) c-FLIP expression in colorectal carcinomas: association with Fas/FasL expression and prognostic implications. *Histopathology* 51:150–156
- Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS (2007) NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors* 29:19–35
- Lu XG, Xing CG, Feng YZ, Chen J, Deng C (2006) Clinical significance of immunohistochemical expression of hypoxia-inducible factor-1alpha as a prognostic marker in rectal adenocarcinoma. *Clin Colorectal Cancer* 5:350–353
- Ludwig JA, Weinstein JN (2005) Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer* 5:845–856. doi:10.1038/nrc1739
- Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Bühr HJ, Hanski C (1999) Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1603–1608
- Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J (2001) NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* 21:5299–5305. doi:10.1128/mcb.21.16.5299-5305.2001
- Musio D, De Felice F, Bulzonetti N, Guarnaccia R, Caiazzo R, Bangrazi C, Raffetto N, Tombolini V (2013) Neoadjuvant-intensified treatment for rectal cancer: time to change? *World J Gastroenterol* 19:3052–3061. doi:10.3748/wjg.v19.i20.3052
- Naito M, Katayama R, Ishioka T, Suga A, Takubo K, Nanjo M, Hashimoto C, Taira M, Takada S, Takada R, Kitagawa M, Matsuzawa S, Reed JC, Tsuruo T (2004) Cellular FLIP inhibits beta-catenin ubiquitylation and enhances Wnt signaling. *Mol Cell Biol* 24:8418–8427. doi:10.1128/mcb.24.19.8418-8427.2004
- Pallares J, Santacana M, Puente S, Lopez S, Yeramian A, Eritja N, Sorolla A, Llobet D, Dolcet X, Matias-Guiu X (2009) A review of the applications of tissue microarray technology in understanding the molecular features of endometrial carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 31:217–226
- Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Costa J, Olsen DA, Reiss M (2001) Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. *Cancer J* 7:24–31
- Schoenfeld DA (1983) Sample-size formula for the proportional-hazards regression model. *Biometrics* 39:499–503
- Simiantonaki N, Taxeidis M, Jayasinghe C, Kurzik-Dumke U, Kirkpatrick CJ (2008) Hypoxia-inducible factor 1 alpha expression increases during colorectal carcinogenesis and tumor progression. *BMC Cancer* 8:320
- Thakur R, Mishra DP (2013) Pharmacological modulation of beta-catenin and its applications in cancer therapy. *J Cell Mol Med* 17:449–456. doi:10.1111/jcmm.12033
- Theodoropoulos GE, Lazaris AC, Theodoropoulos VE, Papatheodosiou K, Gazouli M, Bramis J, Patsouris E, Panoussopoulos D (2006) Hypoxia, angiogenesis and apoptosis markers in locally advanced rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 21:248–257
- Ullenhag GJ, Mukherjee A, Watson NF, Al-Attar AH, Scholefield JH, Durrant LG (2007) Overexpression of FLIPL is an independent marker of poor prognosis in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 13:5070–5075. doi:10.1158/1078-0432.ccr-06-2547
- Valentini V, van Stiphout RG, Lammering G, Gambacorta MA, Barba MC, Bebenek M, Bonnetain F, Bosset JF, Bujko K, Cionini L, Gerard JP, Rodel C, Sainato A, Sauer R, Minsky BD, Collette L, Lambin P (2011) Nomograms for predicting local recurrence, distant metastases, and overall survival for patients with locally advanced rectal cancer on the basis of European randomized clinical trials. *J Clin Oncol* 29:3163–3172
- Voboril R, Voborilova J, Rychterova V, Jirasek T, Dvorak J (2008) Dissociated invasively growing cancer cells with NF-kappaB/p65 positivity after radiotherapy: a new marker for worse clinical

- outcome in rectal cancer? Preliminary data Clin Exp Metastasis 25: 491–496. doi:[10.1007/s10585-008-9155-5](https://doi.org/10.1007/s10585-008-9155-5)
29. Voboril R, Weberova-Voborilova J (2007) Sensitization of colorectal cancer cells to irradiation by IL-4 and IL-10 is associated with inhibition of NF-kappaB. Neoplasma 54:495–502
30. Wilson TR, McLaughlin KM, McEwan M, Sakai H, Rogers KM, Redmond KM, Johnston PG, Longley DB (2007) c-FLIP: a key regulator of colorectal cancer cell death. Cancer Res 67: 5754–5762
31. Yu HG, Yu LL, Yang Y, Luo HS, Yu JP, Meier JJ, Schrader H, Bastian A, Schmidt WE, Schmitz F (2003) Increased expression of RelA/nuclear factor-kappa B protein correlates with colorectal tumorigenesis. Oncology 65:37–45. doi:[10.1159/000071203](https://doi.org/10.1159/000071203)
32. Yu HG, Zhong X, Yang YN, Luo HS, Yu JP, Meier JJ, Schrader H, Bastian A, Schmidt WE, Schmitz F (2004) Increased expression of nuclear factor-kappaB/RelA is correlated with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. Int J Colorectal Dis 19:18–22. doi:[10.1007/s00384-003-0494-z](https://doi.org/10.1007/s00384-003-0494-z)

## *BIBLIOGRAFÍA*

---





## BIBLIOGRAFIA

---

<sup>1</sup> Estimaciones de la incidencia y la supervivencia del cáncer en España y su situación en Europa. Red Española de Registros de Cáncer (Redecan). Octubre 2014.

<sup>2</sup> <http://canalsalut.gencat.cat>

<sup>3</sup> Borrás J.M., Pareja L., Peris M, Espinás J.A. Análisis de la incidencia, la supervivencia y la mortalidad según las principales localizaciones tumorales, 1985-2019: cáncer colorrectal. *Med Clin (Barc)*. 2008;131(Supl 1):58-62.

<sup>4</sup> Ribes J et al. El impacto del cáncer en Catalunya. *Med Clin*. 2008; 131(Supl 1):32-41.

<sup>5</sup> Galcerán J, Ameijide A, Cardó X et al. El càncer a Tarragona, 1980-2001. Incidència, mortalitat, supervivència i prevalença. Registre de càncer de Tarragona. Fundació Lliga per a la Investigació i Prevenció del Càncer. Reus. 2008.

<sup>6</sup> De Angelis R, et al. 2014; Base de datos EUROCCARE.

<sup>7</sup> Heald RJ, Husband EM, Ryall RD. The mesorectum in rectal cancer surgery. The clue to pelvic recurrence? *Br J Surg* 1982; 69: 613-616.

<sup>8</sup> Godlewski G, Prudhomme M. Embryology and anatomy of the rectum. *Basis of surgery*. *Surg Clin North Am* 2000; 80: 319-343.

<sup>9</sup> Rouvière H. Anatomie humaine descriptive, topographique et fonctionnelle. In: Paris Masson 1974; 421-431.

<sup>10</sup> Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 143-164.

<sup>11</sup> Hamilton SR, Aaltonen LA: *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2000.

<sup>12</sup> Kang H, O'Connell JB, Leonardi MJ, et al.: Rare tumors of the colon and rectum: a national review. *Int J Colorectal Dis* 22 (2): 183-9, 2007.

<sup>13</sup> Palefsky JM, Holly EA, Gonzales J, et al. Detection of human papillomavirus DNA in anal intraepithelial neoplasia and anal cancer. *Cancer Res* 51 (3): 1014-9, 1991.

<sup>14</sup> Strate LL, Syngal S: Hereditary colorectal cancer syndromes. *Cancer Causes Control* 16 (3): 201-13, 2005.

- 
- <sup>15</sup> Syngal S, Fox EA, Li C, et al.: Interpretation of genetic test results for hereditary nonpolyposis colorectal cancer: implications for clinical predisposition testing. *JAMA* 282 (3): 247-53, 1999.
- <sup>16</sup> Petersen GM, Brensinger JD, Johnson KA et al. Genetic testing and counseling for hereditary forms of colorectal cancer. *Cancer* 1999; 86:2540-2550.
- <sup>17</sup> Winawer S, Fleher R, Rex D et al. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology* 2003; 124:544-560.
- <sup>18</sup> Slattery ML, Levin TR, Ma K et al. Family history and colorectal cancer: predictors of risk. *Cancer Causes Control* 2003; 14:879-887.
- <sup>19</sup> Rex DK, Kahi CJ, Levin B et al. Guidelines for colonoscopy surveillance after cancer resection: a consensus update by the American Cancer Society and US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *CA Cancer J Clin* 2006; 56:160-167.
- <sup>20</sup> Trock B, Lanza E, and Greenwald P. Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: critical review and meta-analyses of the epidemiologic evidence. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:650-661.
- <sup>21</sup> World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research. 2011.
- <sup>22</sup> Slattery ML, Edwards S, Curtin K et al. Physical activity and colorectal cancer. *Am J Epidemiol* 2003; 158:214-224.
- <sup>23</sup> Giovannucci E. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10:725-731.
- <sup>24</sup> Moskal A, Norat T, Ferrari P et al. Alcohol intake and colorectal cancer risk: a dose-response meta-analysis of published cohort studies. *Int J Cancer* 2007; 120:664-671.
- <sup>25</sup> Baxter NN, Tepper JE, Durham SB et al. Increased risk of rectal cancer after prostate radiation: a population-based study. *Gastroenterology* 2005; 128:819-824.
- <sup>26</sup> Kleinerman RA, Boice JD, Jr., Storm HH et al. Second primary cancer after treatment for cervical cancer. An international cancer registries study. *Cancer* 1995; 76:442-452.
- <sup>27</sup> Rockey DC, Paulson E, Niedzwiecki D, Davis W, Bosworth HB, Sanders L, et al. Analysis of air contrast barium enema, computed tomographic colonography, and colonoscopy: prospective comparison. *Lancet* 2005;365(9456):305-11.
- <sup>28</sup> Rex DK, Petrini JL, Baron TH, Chak A, Cohen J, Deal SE, et al. Quality indicators for colonoscopy. *Gastrointest Endosc* 2006;63(4 Suppl): S16-28.

- 
- <sup>29</sup> Brown AL, Skehan SJ, Greaney T, Rawlinson J, Somers S, Stevenson GW. Value of double-contrast barium enema performed immediately after incomplete colonoscopy. *AJR Am J Roentgenol* 2001;176(4):943-5.
- <sup>30</sup> Postic G, Lewin D, Bickerstaff C, Wallace MB. Colonoscopic miss rates determined by direct comparison of colonoscopy with colon resection specimens. *Am J Gastroenterol* 2002;97(12):3182-5.
- <sup>31</sup> Leaper M, Johnston MJ, Barclay M, Dobbs BR, Frizelle FA. Reasons for failure to diagnose colorectal carcinoma at colonoscopy. *Endoscopy* 2004;36(6):499-503.
- <sup>32</sup> Ginsberg GG, Barkun AN, Bosco JJ, Burdick JS, Isenberg GA, Nakao NL, et al. Endoscopic tattooing: February 2002. *Gastrointest Endosc* 2002;55(7):811-4.
- <sup>33</sup> Mulhall BP, Veerappan GR, Jackson JL. Meta-analysis: computed tomographic colonography. *Ann Intern Med* 2005;142(8):635-50.
- <sup>34</sup> Kinkel K, Lu Y, Both M, Warren RS, Thoeni RF. Detection of hepatic metastases from cancers of the gastrointestinal tract by using noninvasive imaging methods (US, CT, MR imaging, PET): a meta-analysis. *Radiology* 2002;224(3):748-56.
- <sup>35</sup> Bipat S, Glas AS, Slors FJ, Zwinderman AH, Bossuyt PM, Stoker J. Rectal cancer: local staging and assessment of lymph node involvement with endoluminal US, CT, and MR imaging. A meta-analysis. *Radiology* 2004;232(3):773-83.
- <sup>36</sup> Bali C, Nousias V, Fatouros M, Stefanou D, Kappas AM. Assessment of local stage in rectal cancer using endorectal ultrasonography (EUS). *Tech Coloproctol* 2004;8 Suppl 1: s 170-3.
- <sup>37</sup> Chand M, Palmer T, Blomqvist L, Nagtegaal I, West N, Brown G. Evidence for radiological and histopathological prognostic importance of detecting extramural venous invasion in rectal cancer: recommendations for radiology and histopathology reporting. *Colorectal Dis*. 2015 Jun;17(6):468-73.
- <sup>38</sup> Battersby NJ, Moran B, Yu S, Tekkis P, Brown G. MR imaging for rectal cancer: the role in staging the primary and response to neoadjuvant therapy. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Aug;8(6):703-19.
- <sup>39</sup> Winter L, Bruhn H, Langrehr J, Neuhaus P, Felix R, Hanninen LE. Magnetic resonance imaging in suspected rectal cancer: determining tumor localization, stage, and sphincter-saving resectability at 3-Tesla-sustained high resolution. *Acta Radiol* 2007;48(4):379-87.
- <sup>40</sup> Videhult P, Smedh K, Lundin P, Kraaz W. Magnetic resonance imaging for preoperative staging of rectal cancer in clinical practice: high accuracy in predicting circumferential margin with clinical benefit. *Colorectal Dis* 2007;9(5):412-9.
- <sup>41</sup> Purkayastha S, Tekkis PP, Athanasiou T, Tilney HS, Darzi AW, Heriot AG. Diagnostic precision of magnetic resonance imaging for preoperative prediction of the circumferential margin involvement in patients with rectal cancer. *Colorectal Dis* 2007; 9(5):402-11

- 
- <sup>42</sup> MERCURY Study Group. Diagnostic accuracy of preoperative magnetic resonance imaging in predicting curative resection of rectal cancer: prospective observational study. *BMJ*. 2006 Oct 14;333(7572):779.
- <sup>43</sup> Torkzad MR, Lindholm J, Martling A, Cedermark B, Glimelius B, Blomqvist L. MRI after preoperative radiotherapy for rectal cancer; correlation with histopathology and the role of volumetry. *Eur Radiol* 2007;17(6):1566-73.
- <sup>44</sup> Brown G, Richards CJ, Bourne MW, Newcombe RG, Radcliffe AG, Dallimore NS, et al. Morphologic predictors of lymph node status in rectal cancer with use of high-spatial-resolution MR imaging with histopathologic comparison. *Radiology* 2003;227(2):371-7.
- <sup>45</sup> Kantorová I, Lipská L, Bêlohlávek O, Visokai V, Trubač M, Schneiderová M. Routine (18)F-FDG PET preoperative staging of colorectal cancer: comparison with conventional staging and its impact on treatment decision making. *J Nucl Med*. 2003 Nov;44(11):1784-8.
- <sup>46</sup> Llamas-Elvira JM, Rodríguez-Fernández A, Gutiérrez-Sáinz J, Gomez-Rio M, Bellon-Guardia M, Ramos-Font C, Rebollo-Aguirre AC, Cabello-García D, Ferrón-Orihuela A. Fluorine-18 fluorodeoxyglucose PET in the preoperative staging of colorectal cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007 Jun;34(6):859-67.
- <sup>47</sup> Uso tutelado de la Tomografía por Emisión de Positrones (PET) con 18FDG - AETS - Noviembre / 2005.
- <sup>48</sup> Withofs N, Bernard C, Van der Rest C, Martinive P, Hatt M, Jodogne S, Visvikis D, Lee JA, Coucke PA, Hustinx R. FDG PET/CT for rectal carcinoma radiotherapy treatment planning: comparison of functional volume delineation algorithms and clinical challenges. *J Appl Clin Med Phys*. 2014 Sep 8;15(5):4696. doi: 10.1120/jacmp.v15i5.4696.
- <sup>49</sup> Mellgren A, Sirivongs P, Rothenberger DA, Madoff RD, Garcia-Aguilar J. Is local excision adequate therapy for early rectal cancer? *Dis Colon Rectum* 2000;43(8):1064-71; discussion 1071-4.
- <sup>50</sup> Fang WL, Chang SC, Lin JK, Wang HS, Yang SH, Jiang JK, et al. Metastatic potential in T1 and T2 colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2005;52(66):1688-91.
- <sup>51</sup> Lezoche E, Guerrieri M, Paganini AM, Baldarelli M, De Sanctis A, Lezoche G. Long-term results in patients with T2-3 N0 distal rectal cancer undergoing radiotherapy before transanal endoscopic microsurgery. *Br J Surg* 2005;92(12):1546-52.
- <sup>52</sup> Nelson H, Petrelli N, Carlin A, et al. Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:583.
- <sup>53</sup> Rajput A, Romanus D, Weiser MR, et al. Meeting the 12 lymph node (LN) benchmark in colon cancer. *J Surg Oncol* 2010; 102:3.

- 
- <sup>54</sup> Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:979.
- <sup>55</sup> Tepper JE, O'Connell MJ, Niedzwiecki D, et al. Impact of number of nodes retrieved on outcome in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19:157.
- <sup>56</sup> Alves A, Panis Y, Mathieu P, Kwiatkowski F, Slim K, Manton G. Mortality and morbidity after surgery of mid and low rectal cancer. Results of a French prospective multicentric study. *Gastroenterol Clin Biol* 2005;29(5):509-14.
- <sup>57</sup> Vernava AM 3rd, Moran M, Rothenberger DA, Wong WD. A prospective evaluation of distal margins in carcinoma of the rectum. *Surg Gynecol Obstet* 1992; 175:333.
- <sup>58</sup> Nash GM, Weiss A, Dasgupta R, et al. Close distal margin and rectal cancer recurrence after sphincter preserving rectal resection. *Dis Colon Rectum* 2010; 53:1365.
- <sup>59</sup> Wolmark N, Fisher B. An analysis of survival and treatment failure following abdominoperineal and sphincter-saving resection in Dukes' B and C rectal carcinoma. A report of the NSABP clinical trials. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project. *Ann Surg* 1986; 204:480.
- <sup>60</sup> Dulk M, Putter H, Collette L, et al. The abdominoperineal resection itself is associated with an adverse outcome: the European experience based on a pooled analysis of five European randomised clinical trials on rectal cancer. *Eur J Cancer* 2009; 45:1175-1183.
- <sup>61</sup> Nagtegaal ID, Quirke P. What is the role for the circumferential margin in the modern treatment of rectal cancer? *J Clin Oncol* 2008; 26:303.
- <sup>62</sup> De Haas-Kock DF, Baeten CG, Jager JJ, et al. Prognostic significance of radial margins of clearance in rectal cancer. *Br J Surg* 1996; 83:781.
- <sup>63</sup> Hall NR, Finan PJ, al-Jaberi T et al. Circumferential margin involvement after mesorectal excision of rectal cancer with curative intent. Predictor of survival but not local recurrence? *Dis Colon Rectum* 1998; 41:979.
- <sup>64</sup> Heald RJ, Husband EM, Ryall RD. The mesorectum in rectal cancer surgery. The clue to pelvic recurrence? *Br J Surg* 1982; 69:613.
- <sup>65</sup> Arbmán G, Nilsson E, Hallböök O, Sjö Dahl R. Local recurrence following total mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg* 1996; 83:375.
- <sup>66</sup> Scott N, Jackson P, al-Jaberi T, et al. Total mesorectal excision and local recurrence: a study of tumour spread in the mesorectum distal to rectal cancer. *Br J Surg* 1995; 82:1031.
- <sup>67</sup> Jayne DG, Guillou PJ, Thorpe H, et al. Randomized trial of laparoscopic-assisted resection of colorectal carcinoma: 3-year results of the UK MRC CLASICC Trial Group. *J Clin Oncol* 2007; 25:3061- 3068.

- 
- <sup>68</sup> Jayne DG, Thorpe HC, Copeland J, et al. Five-year follow-up of the Medical Research Council CLASICC trial of laparoscopically assisted versus open surgery for colorectal cancer. *Br J Surg* 2010; 97:1638- 1645.
- <sup>69</sup> Astler VB, Collier FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg.* 1954;139(6):846–852.
- <sup>70</sup> Mendenhall MW, Million RR, Pfaff WW. Patterns of recurrence in adenocarcinoma of the rectum and rectosigmoid treated with surgery alone: implications in treatment planning with adjuvant radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1983; 9:877
- <sup>71</sup> Gunderson LL, Sosin H. Areas of failure found at reoperation (second or symptomatic look) following "curative surgery" for adenocarcinoma of the rectum: clinicopathologic correlation and implications for adjuvant therapy. *Cancer.* 1974;34(4):1278–1292.
- <sup>72</sup> Marinello F, Frasson M et al. Selective approach for upper rectal cancer treatment: total mesorectal excision and preoperative chemoradiation are seldom necessary. *Diseases of the Colon and Rectum.* Vol 58:6. 2015
- <sup>73</sup> National Cancer Institute Clinical Announcement. Adjuvant Therapy of Rectal Cancer. National Cancer Institute, 1991
- <sup>74</sup> Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T, Rutten HJ, Pahlman L, Glimelius B, van Krieken JH, Leer JW, van de Velde CJ; Dutch Colorectal Cancer Group. Preoperative Radiotherapy Combined with total mesorectal Escisión for Resecable Rectal Cancer. *NEJM* 345:638-646, 2001.
- <sup>75</sup> Temple LK, Buie WD, Ellis CN, Schlachta CM. Canadian Association of General Surgens evidence Based Rectal Surgeons: evidence based reviews in surgery-colorectal surgery *Reviews in Surgery. Colon Rectum.* 2011 Sep;54(9):1202-4.
- <sup>76</sup> Swedish Rectal Cancer Trial. Improved survival with preoperative Radiotherapy in Resecable Rectal cancer. *NEJM* 336,14:980, 1997.
- <sup>77</sup> Seitz JF, Faivre J. The French consensus conference on cancer of the colon: simple and precise recommendations *Bull Cancer.* 1998 Apr;85(4):293-4.
- <sup>78</sup> Cammà C, Giunta M, Fiorica F, Pagliaro L, Craxì A, Cottone M Preoperative radiotherapy for resectable rectal cancer: A meta-analysis. *JAMA.* 2000 Aug 23-30;284(8):1008-15.
- <sup>79</sup> Figueredo A, Zuraw L, Wong RK, Agboola O, Rumble RB, Tandan V; Cancer Care Ontario's Program in Evidence-based Care's Gastrointestinal Cancer Disease Site Group. The use of preoperative radiotherapy in the management of patients with clinically resectable rectal cancer: a practice guideline. *BMC Med.* 2003 Nov 24;1: 1. Review.

- <sup>80</sup> Colorectal Cancer Collaborative Group. Adjuvant radiotherapy for rectal cancer: a systematic overview of 8,507 patients from 22 randomised trials. *Lancet*. 2001 Oct 20; 358(9290):1291-304.
- <sup>81</sup> Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C et al. German Rectal Cancer Study Group. Preoperative versus Postoperative Chemoradiation for Rectal Cancer. *N Engl J Med*. 2004 Oct 21; 351(17):1731-40.
- <sup>82</sup> Felipe Calvo y col. Pathologic Downstaging of T3-4 Nx Rectal Cancer after chemoradiation: 5-FU vs. Tegafur. *Int J Rad Onc Biol Phys* 51, 5: 1264-1270, 2001.
- <sup>83</sup> Minsky BD, Cohen AM, Kemeny N, Enker WE, Kelsen DP, Reichman B, Saltz L, Sigurdson ER, Frankel J. Enhancement of radiation induced downstaging of rectal cancer by fluorouracil and high-dose leucovorin chemotherapy. *J. Clin Oncol* 10:79-84, 1992.
- <sup>85</sup> Ota DM, Jacobs L, Kuvshinoff B. Rectal cancer: the sphincter-sparing approach. *Surg Clin North Am*. 2002 Oct; 82(5):983-93.
- <sup>86</sup> Boris Kuvshinoff Distal Margin Requirements After Preoperative Chemoradiotherapy for Distal Rectal Carcinomas: Are 1 cm Distal Margins Sufficient? *Annals of Surgical Oncology* 8:163-169 (2001).
- <sup>87</sup> Sauer R, Fietkau R, Wittekind C, Rödel C, Martus P, Hohenberger W, Tschmelitsch J, Sabitzer H, Karstens JH, Becker H, Hess C, Raab R; German Rectal Cancer Group. Adjuvant vs. neoadjuvant radiochemotherapy for locally advanced rectal cancer: the German trial CAO/ARO/AIO-94. *Colorectal Dis*. 2003 Sep;5(5):406-15.
- <sup>88</sup> S. Roels, W. Duthoy, K. Haustermans, F. Penninckx, V. Vandecaveye, T. Boterberg, W. De Neve. Definition and Delineation of the Clinical Target Volume for Rectal Cancer. *IJ. Radiation Oncology Biol. Phys.*, Vol. 65, No. 4, pp. 1129–1142, 2006.
- <sup>89</sup> R Myerson, M Garofalo, I el Naqa, R Abrams, A Apte, W Bosch, P Das, L Gunderson, T Hong, J Kim, C Willett, L Kachnic. Elective Clinical Target Volumes in Anorectal Cancer: An RTOG Consensus Panel Contouring Atlas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Jul 1;74(3):824-30 2009
- <sup>90</sup> Nuyttens JJ, Robertson JM, Yan D, Martinez A. The variability of the clinical target volume for rectal cancer due to internal organ motion during adjuvant treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002 Jun 1; 53(2):497-503.
- <sup>91</sup> Emami B, Lyman J, Brown A, Coia L, Goitein M, Munzenrider JE, Shank B, Solin LJ, Wesson M. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1991 May 15; 21(1):109-22.
- <sup>92</sup> McCarthy K, Pearson K, Fulton R, Hewitt J. Pre-operative chemoradiation for non-metastatic locally advanced rectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Dec 12;12
- <sup>93</sup> O'Connell MJ, Martenson JA, Wieand HS, Krook JE, Macdonald JS, Haller DG, et al. Improving adjuvant therapy for rectal cancer by combining protracted-infusion



---

fluorouracil with radiation therapy after curative surgery. *N Engl J Med* 1994; 331(8):502-7.

<sup>94</sup> Hofheinz R, Wenz FK, Post S, et al. Capecitabine (Cape) versus 5-fluorouracil (5-FU)-based (neo) adjuvant chemoradiotherapy (CRT) for locally advanced rectal cancer (LARC): Long-term results of a randomized, phase III trial. *J Clin Oncol* 2011;29 (suppl):3504.

<sup>95</sup> Roh MS, Yothers GA, O'Connell MJ, et al. The impact of capecitabine and oxaliplatin in the preoperative multimodality treatment in patients with carcinoma of the rectum: NSABP R-04 (abstract 3503). *J Clin Oncol* 2011; 29:221s.

<sup>96</sup> Aschele C, Cionini L, Lonardi S, et al. Primary tumor response to preoperative chemoradiation with or without oxaliplatin in locally advanced rectal cancer: pathologic results of the STAR-01 randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2011; 29:2773-2780.

<sup>97</sup> Gérard JP, Azria D, Gourgou-Bourgade S, Martel-Laffay I, Hennequin C, Etienne PL, Vendrely V, François E, de La Roche G, Bouché O, Mirabel X, Denis B, Mineur L, Berdah JF, Mahé MA, Bécouarn Y, Dupuis O, Lledo G, Montoto-Grillot C, Conroy T. Comparison of two neoadjuvant chemoradiotherapy regimens for locally advanced rectal cancer: results of the phase III trial ACCORD 12/0405-Prodige 2. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 1;28(10):1638-44.

<sup>98</sup> Fernández-Martos C, Aparicio et al. Preoperative uracil, tegafur, and concomitant radiotherapy in operable rectal cancer: a phase II multicenter study with 3 years' follow-Up. *J Clin Oncol*. 2004; 22(15):3016.

<sup>99</sup> Navarro M, Dotor E, Rivera F, Sánchez-Rovira P, Vega-Villegas ME, Cervantes A, García JL, Gallén M, Aranda E. A Phase II study of preoperative radiotherapy and concomitant weekly irinotecan in combination with protracted venous infusion 5-fluorouracil, for resectable locally advanced rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006; 66(1):201.

<sup>100</sup> Willet, C, Dang G et al. A Safety and Survival Analysis of Neoadjuvant Bevacizumab with Standard Chemoradiation in a Phase I/II Study Compared with Standard Chemoradiation in Locally Advanced Rectal Cancer. *The Oncologist* 2010; 15:845-851.

<sup>101</sup> Nogué M, Salud A, Vicente P, Arriví A, Roca JM, Losa F, Ponce J, Safont MJ, Guasch I, Moreno I, Ruiz A, Pericay C; AVACROSS Study Group. Addition of bevacizumab to XELOX induction therapy plus concomitant capecitabine-based chemoradiotherapy in magnetic resonance imaging-defined poor-prognosis locally advanced rectal cancer: the AVACROSS study. *Oncologist*. 2011; 16(5):614-20. doi: 10.1634/theoncologist. 2010-0285. Epub 2011 Apr 5.

<sup>102</sup> Glynn-Jones R, Mawdsley et al. Cetuximab and chemoradiation for rectal cancer- Is the water getting muddy? *Acta Oncologica*, 2010; 49: 278-286.

<sup>103</sup> Fernandez-Martos C, Brown G, Estevan R, Salud A, Montagut C, Maurel J, Safont MJ, Aparicio J, Feliu J, Vera R, Alonso V, Gallego J, Martin M, Pera M, Sierra E, Serra J,

---

Delgado S, Roig JV, Santos J, Pericay C. Preoperative chemotherapy in patients with intermediate-risk rectal adenocarcinoma selected by high-resolution magnetic resonance imaging: the GEMCAD 0801 Phase II Multicenter Trial. *Oncologist*. 2014 Oct; 19(10):1042-3. doi: 10.1634/theoncologist.2014-0233. Epub 2014 Sep 10.

<sup>104</sup> Fernandez-Martos C, Garcia-Albeniz X, Pericay C, Maurel J, Aparicio J, Montagut C, Safont MJ, Salud A, Vera R, Massuti B, Escudero P, Alonso V, Bosch C, Martin M, Minsky BD. Chemoradiation, surgery and adjuvant chemotherapy versus induction chemotherapy followed by chemoradiation and surgery: long-term results of the Spanish GCR-3 phase II randomized trial†. *Ann Oncol*. 2015 Aug; 26(8):1722-8. doi: 10.1093/annonc/mdv223. Epub 2015 May 8.

<sup>105</sup> Rödel C, Martus P, Papadoupolos T, et al. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23(34):8688–8696.

<sup>107</sup> Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis*. 1997; 12(1):19–23.

<sup>108</sup> Smith FM, Reynolds JV, Miller N, et al. Pathological and molecular predictors of the response of rectal cancer to neoadjuvant radiotherapy. *EJSO* 2006; 32: 55-64.

<sup>109</sup> Yoon SM, Kim DY, Kim TH, et al. Clinical parameters predicting pathologic tumor response after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 69: 1167-1172.

<sup>110</sup> Giralt J, Eraso A, Armengol M, et al. Epidermal growth factor receptor is a predictor of tumor response in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 54:1460-1465.

<sup>111</sup> Giralt J, de las Heras M, Cerezo L, et al. The expression of epidermal growth factor receptor results in a worse prognosis for patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy: a multicenter, retrospective analysis. *Radiother Oncol* 2005; 74:101-108.

<sup>112</sup> Smith FM, Reynolds JV, Kay EW, et al. COX-2 overexpression in pre-treatment biopsies predicts response of rectal cancer to neoadjuvant radiochemotherapy. *Int J Radiat Biol Phys* 2006; 64: 466- 472.

<sup>113</sup> Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms and cellular response. *Oncologist* 2004; 9: 4-9.

<sup>114</sup> Qiu H, Sirivongs P, Rothemberger DA et al. Molecular prognostic factors in rectal cancer treated by radiation and surgery. *Dis Colon Rectum* 2000; 43: 451-459.

<sup>115</sup> Kim NK, Park JK, Yang WI et al. P53, Bcl-2 and Ki-67 expression according to tumor response after concurrent chemoradiotherapy for advanced rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 418-424.

- 
- <sup>116</sup> Andreyev HJ, Norman AR, Cuningham D et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 675-784.
- <sup>117</sup> Okonkwo A, Musunuri S, Talamonti M et al. Molecular markers and prediction as response to chemoradiation in rectal cancer. *Oncol Rep* 2001; 8: 497-500.
- <sup>118</sup> Lammering G, Taher MM, Borchard F et al. The prognostic value of S-phase fraction in preoperative radiotherapy of rectal cancer. *Oncol Rep* 2001; 8: 201-206.
- <sup>119</sup> Voboril R, Voborilova J, Rychterova V et al. Dissociated invasively growing cancer cells with NF-kappaB/p65 positivity after radiotherapy : a new marker for worse clinical outcome in rectal cancer? Preliminary data. *Clin Exp Metastasis* 2008 ; 25 :491-496
- <sup>120</sup> Kojima M, Morisaki T, Sasaki N et al. Increased nuclear factor-kB activation in human colorectal carcinoma and its correlation with tumor progression. *Anticancer Res* 2004; 24: 675 -681.
- <sup>121</sup> Scartozzi M, Bearzi I, Pierantoni C et al. Nuclear Factor-kB tumor expression predicts response and survival in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab-irinotecan therapy. *J Clin Oncol* 2007; 25:3939-3935.
- <sup>122</sup> Theodoropoulos G, Lazaris A, Theodoropoulos V et al. Hypoxia, angiogenesis and apoptosis markers in locally advanced rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21: 248-257.
- <sup>123</sup> Xue-guan L, Chun-gen X, Yi-zhong F et al. Clinical significance of immunohistochemical expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  as a prognostic marker in rectal adenocarcinoma. *Clinical Colorectal Cancer* 2006; 5: 350 -353.
- <sup>124</sup> Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha is associated with tumor vascularization in human colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 105 : 176-181.
- <sup>125</sup> Yang JK. FLIP as a anti-cancer therapeutic target. *Yonsei Med J* 2008; 49 :19-27
- <sup>126</sup> Longley DB, Wilson TR, McEwan MM et al: c-FLIP inhibits chemotherapy-induced colorectal cancer cell death. *Oncogene* 2006; 25:838-848.
- <sup>127</sup> Korkolopoulou P, Saetta AA, Levidou G et al. c-FLIP expression in colorectal carcinomas: association with Fas/FasL expression and prognostic implications. *Histopathology* 2007; 51: 150-156.
- <sup>128</sup> Oken M, Creech R, Tormey D, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*. 1982; 5:649-655.
- <sup>129</sup> Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, Marnay J, Henry-Amar M, Petiot JF, Roussel A, Jacob JH, Segol P, Samama G *Cancer*. 1994 Jun 1; 73(11):2680-6.

- <sup>130</sup> Pallares J, Santacana M, Puente S, Lopez S, Yeramian A, Eritja N, Sorolla A, Llobet D, Dolcet X, Matias-Guiu X. (2009). A review of the applications of tissue microarray technology in understanding the molecular features of endometrial carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol.* 2009 Aug; 31(4):217-26.
- <sup>131</sup> Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Costa J, Olsen DA, Reiss M. (2001). Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. *Cancer J* 7:24-31
- <sup>132</sup> Maas M, Nelemans PJ, Valentini V, et al. Long-term outcome in patients with a pathological complete response after chemoradiation for rectal cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2010;11:835-44.
- <sup>133</sup> Myint AS. Novel radiation techniques for rectal cancer. *J Gastrointest Oncol.* 2014 Jun;5 (3):212-7.
- <sup>134</sup> Gerard J, Azria D, Gourgou-Bourgade S, et al. Randomized multicenter phase III trial comparing two neoadjuvant chemoradiotherapy (CT-RT) regimens (RT45-Cap versus RT50-Capox) in patients (pts) with locally advanced rectal cancer (LARC): Results of the ACCORD 12/0405 PRODIGE 2. *J Clin Oncol* 2009;27:abstr LBA4007.
- <sup>135</sup> Aschele C, Pinto C, Cordio S, et al. Preoperative fluorouracil (FU)-based chemoradiation with and without weekly oxaliplatin in locally advanced rectal cancer: Pathologic response analysis of the Studio Terapia Adiuvante Retto (STAR)-01 randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2009;27:abstr CRA4008.
- <sup>136</sup> Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, et al. Neoadjuvant therapy for rectal cancer. Mature results from NSABP R-04 (abstract). *J Clin Oncol* 32, 2014 (suppl 3; abstr 390).
- <sup>137</sup> Claus Rodel, Torsten Liersch et al. Preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy with 5-fluorouracil and oxaliplatin versus 5-fluorouracil alone in locally advanced rectal cancer: Results of the German CAO/ARO/AIO-04 randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 32:5s, 2014 (suppl; abstr 3500).
- <sup>138</sup> Hans-Joachim Schmoll, Karin Haustermans et al. Preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy with capecitabine and oxaliplatin versus capecitabine alone in locally advanced rectal cancer: First results of the PETACC-6 randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr 3531).
- <sup>139</sup> Sclafani F, Cunningham D. Neoadjuvant chemotherapy without radiotherapy for locally advanced rectal cancer *Future Oncology* Vol. 10, No. 14, 2243-2257. 2014.
- <sup>140</sup> Ishii Y, Hasegawa H, Endo T et al. Mediumterm results of neoadjuvant systemic chemotherapy using irinotecan, 5-fluorouracil, and leucovorin in patients with locally advanced rectal cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* 36(11), 1061-1065 (2010).
- <sup>141</sup> Cercek A, Weiser MR, Goodman KA et al. Complete pathologic response in the primary of rectal or colon cancer treated with FOLFOX without radiation. *J. Clin. Oncol.* 28(Suppl.), Abstract 3649 (2010).

- 
- <sup>142</sup> Tan KK, Lopes G de L Jr, Sim R. How uncommon are isolated lung metastases in colorectal cancer? A review from database of 754 patients over 4 years. *J Gastrointest Surg* 2009, 13:642–648.
- <sup>143</sup> Mitry E, Guiu B, Coscinea S, Jooste V, Faivre J, Bouvier AM: Epidemiology, management and prognosis of colorectal cancer with lung metastases: a 30-year population-based study. *Gut* 2010, 59:1383–1388.
- <sup>144</sup> Besbeas S, Stearns MW Jr. Osseous metastases from carcinomas of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum*. 1978 May-Jun;21(4):266-8.
- <sup>145</sup> Lemke J, Scheele J, Kapapa T, von Karstedt S, Wirtz CR, Henne-Bruns D, Kornmann M. Brain metastases in gastrointestinal cancers: is there a role for surgery? *Int J Mol Sci*. 2014 Sep 22;15(9):16816-30.
- <sup>146</sup> Dolcet X, Llobet D, Pallarés J y Matias-Guiu X. NF-κB in development and progresión on human cancer. *Virchows Archiv* 2005; 446: 475-82.
- <sup>147</sup> Dolcet X, Llobet D, Pallarés J et al. FLIP is frequently expressed in endometrial carcinoma and has a role in resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Laboratory Investigation* 2005; 85:885-894.
- <sup>148</sup> Gallel P, Pallares J, Docet X et al. Nuclear factor-kappaB activation is associated with somatic and germ line RET mutations in medullary thuroid carcinoma. *Hum Pathol* 2008 ; 39 : 994-1001.
- <sup>149</sup> Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X (2005) NF-κB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 446:475–482. doi:10.1007/s00428-005-1264-9
- <sup>150</sup> Voboril R, Weberova-Voborilova J Sensitization of colorrectal cancer cells to irradiation by IL-4 and IL-10 is associated with inhibition of NF-kappaB. *Neoplasma* (2007) 54: 495–502.
- <sup>151</sup> Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS (2007) NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors* 29: 19–35.
- <sup>152</sup> Ben Lassoued A, Beaufils N, Dales JP, Gabert J (2013) Hypoxiainducible factor-1alpha as prognostic marker. *Expert Opin Med Diagn* 7:53–70. doi:10.1517/17530059.2012.719022.
- <sup>153</sup> Ullenhag GJ, Mukherjee A, Watson NF, Al-Attar AH, Scholefield JH, Durrant LG (2007) Overexpression of FLIPL is an independent marker of poor prognosis in colorrectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 13:5070–5075. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-06-2547.
- <sup>154</sup> Wilson TR, McLaughlin KM, McEwan M, Sakai H, Rogers KM, Redmond KM, Johnston PG, Longley DB (2007) c-FLIP: a key regulator of colorrectal cancer cell death. *Cancer Res* 67: 5754–5762.

- 
- <sup>155</sup> Zang F, Wei X, Leng X, Yu M, Sun B. 2014. C-FLIP(L) contributes to TRAIL resistance in HER2-positive breast cancer *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 18; 450(1):267-73.
- <sup>156</sup> Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C (1999) Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1603–1608.
- <sup>157</sup> Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J (2001) NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* 21:5299–5305. doi:10.1128/mcb.21.16.5299-5305.200.
- <sup>158</sup> Naito M, Katayama R, Ishioka T, Suga A, Takubo K, Nanjo M, Hashimoto C, Taira M, Takada S, Takada R, Kitagawa M, Matsuzawa S, Reed JC, Tsuruo T (2004) Cellular FLIP inhibits beta-catenin ubiquitylation and enhances Wnt signaling. *Mol Cell Biol* 24:8418–8427. doi:10.1128/mcb.24.19.8418-8427.2004.
- <sup>159</sup> Gorlach A, Bonello S (2008) The cross-talk between NF-kappaB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. *Biochem J* 412: e17–e19.
- <sup>160</sup> 11. Kaidi A, Williams AC, Paraskeva C (2007) Interaction between betacatenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. *Nat Cell Biol* 9:210–217.
- <sup>161</sup> Ellis RD, Goodlad JR, Limb GA, Powell JJ, Thompson RP, Punchard NA (1998) Activation of nuclear factor kappa B in Crohn's disease. *Inflamm Res* 47:440–445.
- <sup>162</sup> Evertsson S, Sun XF (2002) Protein expression of NF-kappaB in human colorectal adenocarcinoma. *Int J Mol Med* 10:547–550.
- <sup>163</sup> Voboril R, Voborilova J, Rychterova V, Jirasek T, Dvorak J (2008) Dissociated invasively growing cancer cells with NF-kappaB/p65 positivity after radiotherapy: a new marker for worse clinical outcome in rectal cancer? Preliminary data *Clin Exp Metastasis* 25:491–496. doi:10.1007/s10585-008-9155-5.
- <sup>164</sup> Yu HG, Yu LL, Yang Y, Luo HS, Yu JP, Meier JJ, Schrader H, Bastian A, Schmidt WE, Schmitz F (2003) Increased expression of RelA/nuclear factor-kappa B protein correlates with colorectal tumorigenesis. *Oncology* 65:37–45. doi:10.1159/000071203.
- <sup>165</sup> Yu HG, Zhong X, Yang YN, Luo HS, Yu JP, Meier JJ, Schrader H, Bastian A, Schmidt WE, Schmitz F (2004) Increased expression of nuclear factor-kappaB/RelA is correlated with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 19:18–22. doi:10.1007/s00384-003-0494-z.
- <sup>169</sup> Ullenhag GJ, Mukherjee A, Watson NF, Al-Attar AH, Scholefield JH, Durrant LG (2007) Overexpression of FLIPL is an independent marker of poor prognosis in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 13:5070–5075. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-06-2547.

- 
- <sup>170</sup> 12. Korkolopoulou P, Saetta AA, Levidou G, Gigelou F, Lazaris A, Thymara I, Scliri M, Bousboukea K, Michalopoulos NV, Apostolikas N, Konstantinidou A, Tzivras M, Patsouris E (2007) c- FLIP expression in colorectal carcinomas: association with Fas/FasL expression and prognostic implications. *Histopathology* 51:150–156.
- <sup>172</sup> Baba Y, Nosho K, Shima K, Irahara N, Chan AT, Meyerhardt JA, Chung DC, Giovannucci EL, Fuchs CS, Ogino S (2010) HIF1A overexpression is associated with poor prognosis in a cohort of 731 colorectalcolorrectal cancers. *Am J Pathol* 176:2292–2301.
- <sup>173</sup> Simiantonaki N, Taxeidis M, Jayasinghe C, Kurzik-Dumke U, Kirkpatrick CJ (2008) Hypoxia-inducible factor 1 alpha expression increases during colorectal carcinogenesis and tumor progression. *BMC Cancer* 8:320.
- <sup>174</sup> Furlan D, Sahnane N, Carnevali I, Cerutti R, Bertoni F, Kwee I, Uccella S, Bertolini V, Chiaravalli AM, Capella C (2008) Upregulation of the hypoxia-inducible factor-1 transcriptional pathway in colorectal carcinomas. *Hum Pathol* 39:1483–1494.
- <sup>175</sup> Lu XG, Xing CG, Feng YZ, Chen J, Deng C (2006) Clinical significance of immunohistochemical expression of hypoxiainducible factor-1alpha as a prognostic marker in rectal adenocarcinoma. *Clin Colorectal Cancer* 5:350–353.
- <sup>176</sup> Theodoropoulos GE, Lazaris AC, Theodoropoulos VE, Papatheodosiou K, Gazouli M, Bramis J, Patsouris E, Panoussopoulos D (2006) Hypoxia, angiogenesis and apoptosis markers in locally advanced rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 21: 248–257.
- <sup>177</sup> Voboril R, Voborilova J, Rychterova V, Jirasek T, Dvorak J (2008) Dissociated invasively growing cancer cells with NF-kappaB/p65 positivity after radiotherapy: a new marker for worse clinical outcome in rectal cancer? Preliminary data *Clin Exp Metastasis* 25: 491–496. doi:10.1007/s10585-008-9155-5.
- <sup>178</sup> Hamilton SR, Aaltonen LA: *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2000.

