

**VALOR PLASMÁTICO E HISTOLÓGICO DE  
CATEPSINA B EN CÁNCER COLORRECTAL Y  
PATOLOGÍA ABDOMINAL INFLAMATORIA.  
SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA  
CATEPSINA B, CEA Y CA 19,9.**

Autor: David Padilla Valverde

Director:

Eugenio Arévalo Jiménez

Codirector:

José Hernández Calvo

Facultad de Medicina

Universidad de Córdoba

2001

## **INDICE**

### **INTRODUCCION**

• CANCER COLORRECTAL	5
Proceso metastásico	7
Factores genéticos y moleculares del proceso metastásico	8
• CATEPSINA B	
Definición	13
Catepsina B y enfermedad neoplásica	17
Catepsina B y enfermedad inflamatoria	19
Catepsina B y cáncer colorrectal	21
• CEA, CA 19.9, p53	27

<b>HIPOTESIS DE TRABAJO</b>	35
-----------------------------	----

<b>OBJETIVOS</b>	37
------------------	----

<b>MATERIAL Y METODO</b>	40
--------------------------	----

• DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO	42
• VARIABLES CLINICOPATOLOGICAS	43
• MARCADORES TUMORALES	46
• CATEPSINA B	49
• PLAN DE TRABAJO	51
• ANALISIS ESTADÍSTICO	55

<b>RESULTADOS</b>	61
-------------------	----

<b>DISCUSIÓN</b>	103
<b>CONCLUSIONES</b>	120
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	123

# **INTRODUCCION**

## CANCER COLORRECTAL

El cáncer colorrectal representa el 13% respecto al resto de enfermedades neoplásicas malignas, siendo el responsable de hasta un 10% de los fallecimientos por cáncer. En mujeres sólo el cáncer de pulmón y de mama son más frecuentes, mientras que en varones sólo se ve superado en frecuencia de aparición por el cáncer de pulmón y de próstata ( 1 ).

La supervivencia global a los cinco años del cáncer colorrectal es del 50%, sin embargo estos datos se verán radicalmente modificados dependiendo de la extensión de la enfermedad maligna. La supervivencia será del 90%, si sólo existe afectación local, disminuyendo considerablemente hasta 58% y 5% si existe metástasis regional y a distancia respectivamente ( 2 ).

La presencia de metástasis regional y/o a distancia de la enfermedad colorrectal maligna constituye la causa principal de muerte del enfermo por la enfermedad maligna.

Esta metástasis puede ocurrir incluso en etapas tempranas de la enfermedad y hasta en un 20% de los enfermos existirá metástasis a distancia en el momento del diagnóstico.

La presencia de micrometástasis de células neoplásicas colorrectales en un estadio precoz de la enfermedad y supuestamente de buen pronóstico permite que la evolución del enfermo sea mala incluso una vez realizado tratamiento quirúrgico con intención curativa.

Por lo tanto, deberemos hacer una reflexión en nuestra actitud terapéutica, sobre todo en aquellas neoplasias colorrectales en estadios precoces, A y

B1, resecadas quirúrgicamente y a las cuales habitualmente no incluimos en protocolos de terapia adyuvante.

La detección de estas neoplasias colorrectales de gran agresividad haría posible una terapia más agresiva con intención curativa.

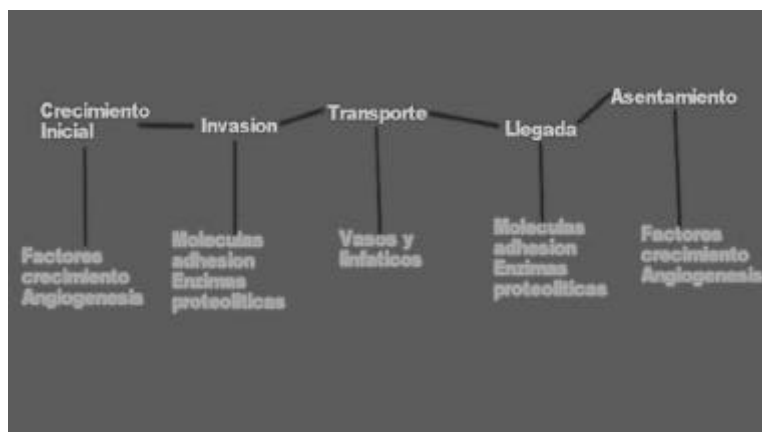
Con este motivo hemos intentado dar a conocer el valor en la metastatización del cáncer colorrectal de la Catepsina B y por lo tanto la utilidad pronóstica de su determinación, con el fin de utilizar terapia adyuvante más agresiva o nuevas terapias, genética y/o inmunológica y la posibilidad de considerarla como un marcador de agresividad biológica independiente del estadiaje histológico convencional.

## PROCESO METASTASICO

El proceso metastásico del cáncer colorrectal se desarrollará de forma multiescalonada mediante la cumplimentación de una serie de etapas. El desarrollo secuencial puede incluso considerarse positivo, a pesar de los resultados devastadores del proceso, ya que el conocimiento profundo de cada una de las etapas y factores que intervienen permitirá el desarrollo de nuevos métodos terapéuticos.

Las diferentes etapas que deberán desarrollar las células neoplásicas colorrectales, no sin la existencia de dificultades múltiples, son:

- Crecimiento tumoral inicial
- Invasión local
- Diseminación sanguínea
- Invasión del órgano diana
- Establecimiento y crecimiento progresivo en el organo diana( 3 )

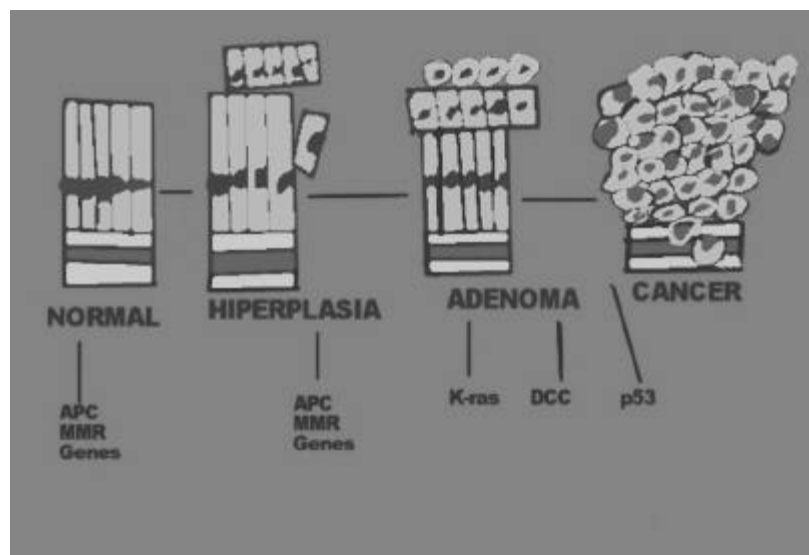


## FACTORES GENETICOS Y MOLECULARES DEL PROCESO METASTASICO

- **Crecimiento tumoral inicial**

El cáncer colorrectal se genera como resultado de mutaciones de genes encargados de controlar la división celular, apoptosis y las reparaciones del DNA. El resultado es una transformación del crecimiento y división celular, y puede producirse mediante oncogenes activados o supresores inactivados.

La activación de los oncogenes *ras* y *c-myc*, permitirá la estimulación de la división celular neoplásica. Por otro lado la inactivación de los oncogenes “ Adenomatous Polyposis Coli”, *APC*, “Delección del cáncer cólico”, *DCC*, y *p53*, permitirá la pérdida de mecanismos supresores en el crecimiento anómalo de la célula neoplásica.





En nuestro trabajo estudiaremos la alteración genética del gen *p53*, situado en el cromosoma 17p. Esta mutación se encuentra presente en el 70-80% de los carcinomas colorrectales, interviniendo en el proceso de transformación de adenoma a carcinoma, siendo su papel en la angiogenesis de gran importancia . La sobreexpresión de la proteína *p53*, es utilizada como marcador de la mutaciones del gen *p53*, relacionandose con un peor pronóstico (4-13 ).

El aporte de nutrientes es fundamental para mantener el crecimiento tumoral inicial y será posible gracias a la formación de nuevos vasos a partir de los ya existentes. A este proceso se denomina *angiogenesis* ( 14-16 ).

La angiogenesis precisa de un proceso secuencial en el que se distinguen cuatro etapas una vez activadas las células endoteliales:

- Degradación de la membrana basal y matriz extracelular por enzimas proteolíticas.
- Proliferación de las células endoteliales.
- Retracción de los pericitos y migración de las células endoteliales para formar cordones celulares sólidos.
- Los nuevos vasos formados se anastomosarán con los ya existentes, iniciándose el flujo ( 17 ).

La activación de las células endoteliales se debe a factores angiogénicos con origen en las propias células tumorales o bien elaborados por células del estroma tumoral, mastocitos, macrófagos...reclutados por las células tumorales. La angiogenesis está regulada por factores activadores e inhibidores que se encuentran en un estado de equilibrio, alterado en condiciones patológicas como el proceso neoplásico, permitiendo la puesta en marcha del “ interruptor angiogénico” ( 18-20 ).

Entre los factores activadores del proceso angiogénico destacaremos el “Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular”, *VEGF*, *Angipoyetina-1*, “Factor de Crecimiento Fibroblástico de tipo básico”, *bFGF* o *FGF2*, *Angiogenina*, *Citoquinas*, *Integrinas alfa y beta*, *Metaloproteinasas* ( *MMP-2* y *MMP-9*) y *E-selectina* .

Por otro lado la *Trombospondina-1*, *Angiostatina* y *Endostatina* actuarán *inhibiendo la angiogénesis* ( 21-37 ).

- **Invasión local**

Las células neoplásicas deben tener capacidad de separación del tumor primario para poder alcanzar tejidos adyacentes y/o a distancia. Para ello deberán vencer los mecanismos de adhesión que tienden a mantenerlas unidas debido a las moléculas de adhesión, *Cateninas* y *E-caderina*. La reducción de estas moléculas se relacionan con neoplasias de peor pronóstico ( 38-41 ).

Una vez desprendidas la células neoplásicas del tumor primario, deberán invadir y abrirse paso a través de la membrana basal y matriz extracelular. La degradación de la membrana basal y matriz extracelular se realizará gracias a enzimas proteolíticas secretadas por las células tumorales y del tejido conjuntivo normal. Conocemos cuatro familias diferente de proteasas: *Serín proteasas, cisteinil proteasas, aspartil proteasas y metaloproteasas* ( 3, 42-58 ).

En nuestro estudio definiremos el valor de la *Catepsina B*, perteneciente a la familia de las cisteín-proteinasas.

- **Diseminación sanguínea**

Las células neoplásicas deberán defenderse del sistema inmunitario del enfermo si quieren alcanzar el órgano diana, y para ello se unirán a los linfocitos T gracias a glucoproteínas como *ICAM-1*. Los valores de *ICAM-1*, son superiores en enfermos con cáncer colorrectal respecto individuos sanos ( 59-60 ).

- **Invasión del organo diana**

Las células neoplásicas se adherirán a los capilares del organo metastatizado mediante moléculas de adhesión como *E-selectina* y *Sialyl-LewisX*. Ambas moléculas se encuentran elevadas en enfermos con cáncer colorrectal y metastatización hepática ( 61-63 ). Posteriormente deberán realizar un proceso de invasión local mediante las moléculas previamente descritas.

- **Asentamiento, mantenimiento y crecimiento progresivo en el organo diana**

El desarrollo de las metástasis requiere de la puesta en marcha de los factores de crecimiento y mecanismos angiogénicos analizados.

## **CATEPSINA B**

### **DEFINICIÓN.OTRAS CATEPSINAS**

Las catepsinas son enzimas lisosómicas que intervienen en la degradación proteica y se clasifican según la estructura aminoacida que define su centro activo. Aunque se encuentran en todos los tejidos su concentración es significativamente más elevada en riñón, bazo, hígado y macrófagos.

De acuerdo a su actividad lítica y centro activo se denominarán como exopeptidasas o endopeptidasas. Las catepsinas presentan un peso molecular que oscila entre 14 y 650Kd.

Se sintetizan en los ribosomas celulares, desde donde son transferidos al retículo endoplásmico, aparato de Golgi y por último a los lisosomas mediante el reconocimiento por un receptor, de la manosa 6-fosfato que se halla presente en la molécula enzimática. Se sintetizan como preproenzimas para posteriormente y tras un proceso de glucosilación y fosforilación alcanzarán la forma enzimática activa ( 64 ).

La existencia de procesos patológicos, oncológicos e inflamatorios, permitirá una alteración en el transporte hasta los lisosomas de las catepsinas, que provocaría la secreción de las catepsinas, en forma de proenzima, a la matriz extracelular.

## Clasificación de catepsinas.

<b>Catepsina</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Definición</b>
Catepsina A	Exopeptidasa	(20KDa,25KDa,55Kda) Serina*
Catepsina B	Endopeptidasa	( 5Kda,24Kda) Cisteina
Catepsina C	Exopeptidasa	(210Kda)
Catepsina D	Endopeptidasa	(34Kda,14Kda) Aspartato
Catepsina E	Endopeptidasa	( 86Kda) Aspartato
Catepsina G	Endopeptidasa	(27-30 Kda) Serina
Catepsina H	Endopeptidasa	Cisteina
Catepsina L	Endopeptidasa	Cisteina
Catepsina S	Endopeptidasa	( 14 Kda-30Kda) Cisteina
Catepsina T	Endopeptidasa	Cisteina
Catepsina K	Endopeptidasa	Cisteina

\*Definición: Aminoácido que constituya el centro activo proteico.

La catepsina B es una endopeptidasa caracterizado por la presencia de cisteina formando parte del centro activo proteico.

Se encuentra constituido por una cadena ligera ( 5 KDa), que contiene el centro activo, y una cadena pesada con un peso molecular de 24 Kda. Cataliza la hidrólisis de moléculas pequeñas preferiblemente péptidos del tipo Arg-Arg-x. Requiere para su activación, 2-mercaptoetanol y un quelante (EDTA). Puede ser inhibida mediante iodoacetato y 4-cloromercuribenzoato. La catepsina B actua degradando los diferentes componentes de la matriz extracelular mediante actividad dipeptidilcarboxipeptidasa, o bien indirectamente estimulando otras proteasas de la matriz extracelular y degradando sus inhibidores proteicos ( 64 ).

Valores elevados de algunas catepsinas han sido relacionadas con la destrucción patológica de la matriz extracelular permitiendo la existencia de enfermedades inflamatorias crónicas como enfisema pulmonar, osteoporosis, arterioesclerosis, artritis reumatoide y participando en el proceso metastásico de numerosas enfermedades malignas.

Además de la catepsina B, existen referencias múltiples en la literatura médica sobre la participación activa de otras catepsinas en estos procesos de los cuales citaremos sólo algunos ejemplos.

González-Vela et al ( 65 ), demostraron en un estudio en el que incluyeron a 102 enfermos con diagnóstico de cáncer de mama, que la expresión de catepsina D en células estromales se asociaba a una mayor vascularización tumoral y mayor agresividad de la neoplasia.

De igual forma se implicó a la catepsina D en el estudio de otras neoplasias. En 1995, Tumminello et al ( 66 ), relacionaron la actividad de la catepsina D y la progresión del cáncer colorrectal, aunque su verdadero valor como variable pronóstica es dudoso ( 67,68 ).

Más tarde se intentó estudiar el valor de la catepsina D en el adenocarcinoma gástrico, encontrando que sus valores en el tejido neoplásico eran superiores a los encontrados en mucosa gástrica sana, aunque no se modificaron de forma significativa con la progresión tumoral ( 69 ).



## CATEPSINA B Y OTRAS NEOPLASIAS

El estudio de la actividad de la catepsina B tumoral ha permitido conocer el valor de esta enzima proteica en diferentes neoplasias, de las que citaremos algunos ejemplos.

- Carcinoma gástrico

La actividad de la catepsina B se encuentra elevada en tejido neoplásico en relación a tejido gástrico sano ( 70 ). Posteriormente Watanabe et al ( 71 ), demostraron un incremento de la actividad de la catepsina B relacionado con el desarrollo tumoral, confirmado posteriormente en un nuevo estudio en el que incluyeron el estudio de catepsina L, activador del plasminogeno (uPA) y su inhibidor, ( PAI-1). También encontraron un incremento de actividad en estadios preneoplásicos gástricos ( 72 ).

- Cancer de mama

La actividad de la catepsina B se encuentra elevada en el cancer de mama respecto a tejido displásico mamario ( 73 ), además existe según algunos autores relación con la agresividad tumoral ( 74).

- Glioma

Existe un incremento de la expresión y actividad de la catepsina B respecto a la progresión tumoral ( 75 ).

- Melanoma

El estudio inmunohistoquímico de la catepsina B demuestra que practicamente en la totalidad de los casos la enzima proteolítica se encuentra en las células neoplásicas. La intensidad inmunohistoquímica

encontrada se relaciona con el tamaño tumoral del melanoma y no así con el tipo de melanoma ( 76 ).

- Cáncer de próstata

Existe relación entre el estudio inmunohistoquímico de la catepsina B e histológico en la neoplasia prostática ( 77,78 ).

- Carcinoma renal

Jung et al ( 79 ), en 1998, refieren la no relación de enzimas proteolíticas como la catepsina B en el proceso metastásico del cáncer renal.

## **CATEPSINA B Y ENFERMEDAD INFLAMATORIA**

La participación de la catepsina B en los mecanismos fisiológicos que permiten el desarrollo y mantenimiento de procesos inflamatorios es amplia y variada.

Recientemente se ha desarrollado la hipótesis que considera que la activación enzimática intrapancreática en la inflamación pancreática se debe a la activación de enzimas lisosómicas. Estudios in vitro permitió describir como enzimas lisosómicas tales como la catepsina B, pueden activar el tripsinógeno, pudiendo la tripsina activar el resto de precursores proteicos. Esta hipótesis rechazaría la teoría del canal común que permitiría el reflujo intrapancreático de la bilis, así como la teoría de la obstrucción del conducto principal pancreático ( 80).

Por otro lado los fibroblastos sinoviales en la artritis reumatoide producen enzimas como colagenasas y catepsinas que pueden degradar los componentes de la matriz articular. Sin embargo y a pesar de ello la determinación sérica de catepsina B en estos enfermos no puede ser utilizado como marcador de actividad de la enfermedad ( 81 ). De todos modos se han utilizado satisfactoriamente in vitro agentes inhibidores de la catepsina B en la enfermedad inflamatoria articular crónica ( 82 ).

Igualmente se ha confirmado el poder destructivo de la catepsina B en otras enfermedades inflamatorias como son enfermos con gingivitis crónica, mediante su identificación tisular ( 83 ), y enfermos con enfisema pulmonar.

Se han descrito como mecanismos patógenos del enfisema pulmonar la existencia de lisis de elastina por enzimas secretadas por células inflamatorias, como es la catepsina B. En estudio in vitro esta teoría fue demostrada mediante la instilación de esta enzima en animales de experimentación de esta enzima ( 84 ).

## **CATEPSINA B Y CANCER COLORRECTAL**

La invasión tumoral y metastatización del cáncer colorrectal es un proceso multiescalonado en el que la degradación de la matriz extracelular es de vital importancia. El papel desempeñado por la catepsina B ha sido estudiado utilizando diferentes métodos de trabajo.

Maciewicz et al ( 85 ), realizaron determinación inmunohistoquímica en un estudio in vitro en células pre-malignas y malignas colorrectales, de catepsina B junto a catepsina L, con el deseo de mostrar la participación de estas enzimas en la progresión de la enfermedad colorrectal maligna, mediante la degradación de la membrana basal y el tejido extracelular.

Posteriores estudios in vitro, se encargaron de demostrar como se distribuye la catepsina B en las células neoplásicas, sus mecanismos de activación e inhibición, así como su actividad indirecta en la degradación de la matriz extracelular ( 86, 87, 88,89 ).

Rozhin et al ( 86 ), demostraron como la acidificación intracelular y pericelular del medio desencadenaría la secreción por las células neoplásicas de la catepsina B, previa distribución periférica intracelular. La acidificación del medio permitiría la autoactivación de la procatepsina B, confirmado posteriormente en 1996, por Van der Stappen et al( 87 ).

Kobayashi et al ( 88 ), muestran en un estudio experimental como la catepsina B además de desempeñar un papel fundamental en el desarrollo del cáncer colorrectal mediante la degradación de colágeno tras la conversión de la procólagenasa IV en su forma enzimática activa, tiene la capacidad de activar el uPA( Activador del Plasminogeno).

Las primeras determinaciones plasmáticas realizadas en enfermos con cáncer colorrectal, mostraron una elevación significativa respecto a las determinaciones obtenidas en grupos sanos o con patología benigna ( 90,91).

Dufek et al ( 90), mostraron niveles de catepsina B elevados en enfermos con cáncer colorrectal respecto a individuos sanos y sujetos que presentaban patología benigna. Se apresuraron en considerar la catepsina B como marcador diagnóstico o de utilidad a la hora de monitorizar la enfermedad tras realizar tratamiento.

En 1982, Kolár et al ( 91 ), confirma el aumento de actividad plasmática de catepsina B en enfermos con cáncer de mama y colorrectal respecto a individuos sanos.

Hirano et al ( 92 ), confirmarían estos hallazgos previamente descritos. Los valores serológicos de catepsina B en enfermos oncológicos fueron superiores en su estudio a los encontrados en individuos sanos. Incluso los valores fueron superiores en enfermos oncológicos con metastasis respecto a los individuos que no presentaban metástasis. Estos estudios fueron realizados también mediante muestras de orina, con resultados similares.

El papel fundamental de la catepsina B en la progresión del cáncer colorrectal también ha sido descrito ampliamente mediante estudio inmunohistoquímico de la pieza resecada. Tendremos que destacar y analizar por separado aquellos autores que consideran el papel desempeñado por la catepsina B en etapas precoces de la enfermedad maligna.

Sheahan et al ( 93 ), demostraron en su estudio valores elevados de catepsina B en tejido neoplásico respecto a tejido sano. Además mostraron una elevación significativa de los valores de catepsina B en estadios precoces, A de Dukes.

En un nuevo estudio con 80 enfermos realizado por Hirai ( 94 ), los valores de catepsina B fueron superiores en aquellos enfermos que presentaron metástasis . Sin embargo en aquellos enfermos sin metástasis los niveles de catepsina B fueron superiores en el estadio A de Dukes respecto a B y C.

En 1991, dos autores en diferentes estudios también concluyeron con la presencia de valores de catepsina B superiores en cáncer colorrectal respecto a individuos sanos, siendo los valores superiores en los estadios de Dukes, A y B, respecto a C y D ( 95, 96 ).

El resto de estudios mediante determinación inmunohistoquímica relacionaron la mutación del gen activador K-ras con el aumento de la agresividad del cancer colorrectal debido a la acción de catepsina B y L ( 97 ), mostraron la disminución de la laminina tumoral en relación al incremento de la actividad de la catepsina B en la progresión tumoral ( 98 ), y relacionaron valores de catepsina B respecto al resto de parámetros pronósticos ( 99-103).

Adenis et al ( 99 ), establecieron la relación existente entre los valores de catepsina B, L y D, en 55 enfermos con diagnóstico de cáncer colorrectal y variables clinicopatológicas, siendo la catepsina B el parámetro de mayor valor pronóstico.

En 1994, Campo et al ( 100 ),demostraron que una expresión elevada de catepsina B en cáncer colorrectal se hallaba asociado a una supervivencia menor del enfermo, para ello relacionaba los valores de catepsina B en cáncer colorrectal con adenomas y mucosa colorrectal sana.

Con el deseo de realizar un perfil mediante la determinación de proteasas en el cáncer colorrectal, McKerrow et al ( 104 ), también encontraron una actividad de catepsina B en el tumor primario elevada, siendo mayor con la presencia de metástasis.

Ultimamente los estudios realizados se han orientado hacia el valor y actividad de la catepsina B según su localización (105,106 ). Hazen et al ( 107), encontraron una expresión moderada en el estroma de la pared colorrectal en enfermos sanos, y variable en el epitelio. La matriz estromal de la pared colorrectal en enfermos con adenoma y cáncer colorrectal presentaban niveles proteicos de moderados a altos aunque con escasa actividad excepto en aquellas areas con angiogénesis, inflamación o



necrosis. Esto realzaba el papel desempeñado por la catepsina B en la progresión tumoral.

De todos estos estudios se desprende, ante el papel decisivo desempeñado por la catepsina B en el proceso metastásico del cáncer colorrectal, la necesidad de métodos terapéuticos que contrarresten la función de la catepsina B.

Satoh et al ( 107 ), en 1996, estudiaron experimentalmente el efecto supresor de dos tipos de inhibidores proteicos en la carcinogénesis y progresión tumoral, obteniendo resultados que indicaban el poder supresor de la leupeptina en el crecimiento tumoral mediante la disminución de actividad de la catepsina B.

En 1998, Cornelis et al ( 108 ), mostró en un estudio experimental en ratas que habían sido sometidas a metastatización hepática, mediante células neoplásicas inyectadas en el territorio portal, la utilidad de un inhibidor de la catepsina B ( Mu- Phe- homoPhe-fluoromethylketone). Los resultados fueron de una reducción del 60% del número de tumores; con reducción del 80% del volumen del resto, encontrándose dificultad al tratamiento en las tumoraciones en el lóbulo caudado.

Lee et al ( 109 ), informaron acerca de dos péptidos derivados de la caseína pancreática, ( Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile y Gly-Pro-Phe-Pro-Ile). Correspondían a las secuencias 61-66 y 203-207 de la beta-caseína bovina.

Recientemente, Muehlenweg et al ( 110 ), presentaron un tipo de inhibidor bifuncional con reducción de la actividad enzimática de las cisteina proteasas y limitación de la interacción de uPA con su receptor,uPAR. Se debe a la inserción de una secuencia de reconocimiento de uPAR por uPA, no esencial para la inhibición, en las cistatinas.

## CEA

Los marcadores tumorales son sustancias de carácter bioquímico producidas o bien inducidas por la célula neoplásica o por células del individuo enfermo, que pueden ser detectados en el suero u otros tejidos biológicos, reflejando el crecimiento y/o actividad neoplásica, lo que nos permitirá conocer la evolución, pronóstico y respuesta neoplásica a la actitud terapéutica empleada.

El CEA es una glicoproteína de 180-210 KDa., descrita por Gold y Freedman (111), en 1965. Inicialmente fue descrita como característica tanto del intestino fetal como del cáncer colorrectal. Debido a esto, fue denominado como antígeno carcinoembrionario, sugiriendo que sería un componente de las células de la mucosa del intestino en su estadio fetal. Posteriormente alcanzada la diferenciación sería reexpresado en los procesos neoplásicos.

Se han encontrado niveles de CEA en enfermos con enfermedades no neoplásicas, inflamatorias como pancreatitis, bronquitis, hepatitis y colitis ulcerosa.

En el cáncer colorrectal con extensión locorregional los niveles séricos de CEA son similares a los que podemos encontrar en enfermedades benignas gastrointestinales. Debido a lo cual podemos descartar su utilización para la detección precoz del cáncer colorrectal (112).

Sin embargo sí existe relación respecto a la supervivencia del enfermo, por lo que podremos utilizarlo como marcador pronóstico independientemente de otros parámetros como el estadio tumoral ( 113 ).

El CEA es por lo tanto un marcador sin utilidad para la realización de un diagnóstico precoz de neoplasias gastrointestinales, sin embargo sí ha sido demostrada su utilidad como marcador pronóstico preoperatorio, capaz de monitorizar el tratamiento antineoplásico utilizado y la aparición de recidiva neoplásica gastrointestinal tras tratamiento.

Carriquiry et al ( 114 ), en 1998 quisieron establecer el verdadero valor de este marcador tumoral como variable pronóstica capaz de monitorizar la existencia de recidiva de la enfermedad maligna colorrectal una vez tratada. Realizaron determinación plasmática preoperatoria en 209 enfermos con diagnóstico de cáncer colorrectal y en 196 enfermos que fueron tratados quirúrgicamente con intención curativa. Concluyeron destacando la importancia de la determinación preoperatoria del CEA debido a su gran valor pronóstico independiente de su estadio tumoral. También destacaron su gran sensibilidad como marcador de recurrencia de la enfermedad una vez tratada.

Park et al ( 115 ), realizaron un estudio que incluyó el seguimiento de múltiples factores pronósticos, clínico-patológicos y CEA preoperatorio, en 1446 carcinomas colorrectales intervenidos quirúrgicamente. En sus conclusiones destacaron el enorme valor pronóstico preoperatorio del CEA.

El valor postoperatorio de la determinación plasmática tras resección hepática de metástasis colorrectales fue llevada a cabo por Hohenberger et al ( 116 ), en 1994, en un estudio de 166 enfermos intervenidos quirúrgicamente con carácter curativo por metástasis hepáticas.

Consideraron que la determinación postoperatoria debía hacerse en estos enfermos con la intención de indicar aquellos enfermos con riesgo de recurrencia y poder aplicar el tratamiento adecuado.

Wang et al ( 117 ), en un estudio retrospectivo de 318 enfermos intervenidos quirúrgicamente con diagnóstico de cáncer consideraron al marcador CEA como el mejor marcador pronóstico independiente y monitor de recurrencia de la enfermedad.

Se ha comparado el valor de CEA con otros marcadores tumorales en numerosos estudios e incluso se han utilizado conjuntamente con el deseo de obtener mayores beneficios pronósticos y a la hora de monitorizar el cáncer colorrectal tras tratamiento quirúrgico ( 118-121).

En 1998, Kos et al ( 122 ), realizaron un estudio en el que realizaron determinaciones preoperatorias de CEA y Catepsina B en 325 enfermos con el objetivo de llegar a conocer el verdadero valor pronóstico de estas variables proteicas. Sólo hallaron poder pronóstico en aquellos enfermos con valores elevados de las dos variables.

## CA 19.9

El CA 19.9, descrita por Koprowski et al ( 123 ), es un oligosacárido, sialil lacto-n-fucopentosa II que se encuentra en el glicocáliz de las células tumorales gastrointestinales, aunque con técnicas inmunohistoquímicas se ha detectado su presencia en tejidos normales ( 124,125).

Se ha intentado a través de numerosos estudios conocer realmente el valor pronóstico de CA 19.9 y su valor como marcador de la recurrencia de la enfermedad colorrectal maligna una vez realizado tratamiento quirúrgico.

Forones et al ( 124 ), realizaron en 1999 un estudio prospectivo de 74 enfermos con diagnóstico de cáncer colorrectal, en los que se realizó determinación preoperatoria plasmática de CEA y CA 19.9. Encontraron que aquellos enfermos con valores elevados de CEA y CA 19.9 podían ser considerados de alto riesgo, además consideraron un valor superior la determinación de ambos marcadores.

Filella et al ( 125), describen el papel que desempeña la determinación de CA 19.9 en 293 enfermos. Sus resultados catalogan al CA 19.9 como buen marcador pronóstico.

Diez et al, ( 126), en 1994, justifica la utilización de este marcador en un amplio análisis multivariante de supervivencia.

También han existido autores que han relacionado este marcador con otros marcadores convencionales o de reciente aparición.

Tsavaris et al ( 127 ), realizaron determinación sérica múltiple ( CA19.9, CEA,  $\alpha$ -fetoproteína y CA 125), en 111 enfermos con cáncer colorrectal en estadio avanzado con el objetivo de conocer el significado de estos marcadores como monitores de la enfermedad durante el tratamiento y seguimiento. El CEA fue el mejor marcador. Sólo la combinación de CA 19.9 y CEA fue de utilidad en el seguimiento de estos enfermos.

## **P53**

El patrón neoplásico de la mucosa colónica puede ser debido a la activación de la mutación de un oncogén seguida y combinada con la pérdida de ciertos genes que habitualmente suprimirían la carcinogénesis.

La pérdida del material genético del brazo corto del cromosoma 17, se asocia a la activación de un gen que lleva a la producción de una proteína asociada a la transformación neoplásica y a la que se conoce como p53.

La pérdida alélica del cromosoma 17p, se ha asociado a la presencia de tumores en estadio D y con elevado riesgo de desarrollar metástasis, por lo que se le asocia con valor pronóstico.

La sobreexpresión de la proteína p53, como forma de presentación de la mutación del gen p53 se ha estudiado en numerosas ocasiones con el deseo de clarificar su valor en la progresión neoplásica y por lo tanto su valor pronóstico.



Takano et al ( 128 ), en 1996, establecieron el papel desempeñado por la expresión de p53 y el marcador de proliferación celular, Ki 67, con la apoptosis con una muestra de 95 enfermos con cáncer de colon. No hallaron relación estadísticamente significativa entre los valores de p53 y la apoptosis celular. De igual manera no existió relación entre la actividad proliferativa celular y los valores de p53. Sólo encuentran valores relacionados de forma significativa entre el índice de proliferación celular y la apoptosis celular.

Ese mismo año, 1996, Hirota et al, analizaron los valores inmunohistoquímicos de p53 y Ki67 en 565 enfermos con diagnóstico de neoplasias colorrectales en estadio precoz con el deseo de estudiar su influencia en el desarrollo estructural definitivo. Encontraron relación entre los valores de p53 de neoplasias con crecimiento vegetante e infiltrante ( 129 ).

En 1999, Sato et al, ( 130 ), con el deseo de definir el valor pronóstico de la sobreexpresión de p53 y Ki67, diseñaron un estudio con enfermos con cancer rectal y enfermos con recidiva de cáncer rectal. Sus resultados demostraron que la recurrencia local de cáncer colorrectal se asociaba a la expresión inmunohistoquímica de p53.

Estos resultados fueron puestos en duda por Forones et al ( 131 ), tras estudio inmunohistoquímico de p53 y Ki 67 en 38 carcinomas colorrectales, ya que no encontraron relación con otros parámetros clinicopatológicos estudiados, o utilidad pronóstica.

El estudio inmunohistoquímico de la proteína p53 ha sido llevado a cabo por algunos autores junto a la determinación de los valores de enzimas proteicas como las catepsinas ( 132-136).

Ioachim et al, encontraron relación entre la expresión de catepsina D y p53 , sugiriendo la utilización de ambas variables en un modelo multivariante con la posibilidad de obtener mayor información pronóstica ( 132 ).

## **HIPOTESIS DE TRABAJO**

Establecido el papel desempeñado por la CATEPSINA B en el proceso de metastatización, para confirmar su valor pronóstico, los valores plasmáticos preoperatorios e histológicos de CATEPSINA B deberían estar elevados en enfermos con diagnóstico de cáncer colorrectal con un peor pronóstico

## **OBJETIVOS**

## **OBJETIVOS PRIMARIOS**

- MOSTRAR EL AUMENTO DE LOS VALORES PLASMÁTICOS PREOPERATORIOS E HISTOLOGICOS DE CATEPSINA B EN ENFERMOS CON CANCER COLORRECTAL, EN RELACION A PATOLOGÍA COLONICA INFLAMATORIA ( APENDICITIS)
- DETERMINAR LA VARIACIÓN DE LOS VALORES PLASMÁTICOS PREOPERATORIOS E HISTOLOGICOS DE CATEPSINA B RESPECTO A LOS DIFERENTES ESTADIOS DEL CANCER COLORRECTAL SEGÚN LA CLASIFICACION DE ASTLER Y COLLER MODIFICADA
- RELACIONAR LOS VALORES DE CATEPSINA B TRAS ESTUDIO SEROLOGICO E HISTOLOGICO CON LA RECIDIVA DE LA ENFERMEDAD COLORRECTAL DEL ENFERMO CON CANCER COLORRECTAL ESTUDIADO
- RELACIONAR LOS VALORES DE CATEPSINA B TRAS ESTUDIO SEROLOGICO E HISTOLOGICO CON LA SUPERVIVENCIA DEL ENFERMO CON CANCER COLORRECTAL ESTUDIADO

## OBJETIVOS SECUNDARIOS

- DETERMINAR EL VALOR DE CEA Y CA 19.9 PLASMÁTICO PREOPERATORIO EN RELACION A LA RECIDIVA DE LA ENFERMEDAD COLORRECTAL Y SUPERVIVENCIA DEL ENFERMO.
- DETERMINAR LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE CATEPSINA B PREOPERATORIA, CEA Y CA 19,9 RESPECTO A LA SUPERVIVENCIA DE LOS ENFERMOS.
- DETERMINAR EL VALOR DE p53 TISULAR EN RELACION A LA RECIDIVA DE LA ENFERMEDAD COLORRECTAL Y SUPERVIVENCIA DEL ENFERMO.
- DETERMINAR LA VARIACIÓN DE LOS VALORES PLASMÁTICOS E HISTOLOGICOS DE CATEPSINA B RESPECTO A UN REESTADIAJE HISTOLOGICO EN CONSIDERACIÓN A LA UTILIZACIÓN DE TERAPIA ADYUVANTE,( GRUPO I, ESTADIOS A Y B1 Y GRUPO II, B2,C1,C2,D)

## **MATERIAL Y METODO**



## **MATERIAL Y METODO**

- **DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO**

- **VARIABLES CLINICAS Y ANATOMOPATOLÓGICAS**

- **MARCADORES TUMORALES**

METODOLOGÍA DE DETERMINACIÓN DE CEA

METODOLOGÍA DE DETERMINACIÓN DE CA 19.9

METODOLOGIA DE DETERMINACIÓN DE p53

- **CATEPSINA B**

METODOLOGÍA DE DETERMINACION PLASMÁTICA PREOPERATORIA

METODOLOGÍA DE DETERMINACIÓN HISTOLÓGICA

- **PLAN DE TRABAJO**

- **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

ANÁLISIS DESCRIPTIVO

ANÁLISIS INTERFERENCIAL

## DESCRIPCION DEL ESTUDIO

Hemos realizado un estudio transversal y cohorte de un total de 78 enfermos, 23 enfermos con diagnóstico de apendicitis aguda y 55 enfermos con diagnóstico de cáncer colorrectal, intervenidos quirúrgicamente en el Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo (Dr. Hernández Calvo), entre los años 1998 a 2000.

Las variables estudiadas en los enfermos intervenidos quirúrgicamente en nuestro Servicio con diagnóstico de apendicitis fueron, edad, sexo, catepsina B plasmática , catepsina B histológica y estadiaje anatomopatológico.

Las variables estudiadas en los enfermos intervenidos quirúrgicamente en nuestro Servicio con diagnóstico de cáncer colorrectal fueron, edad, sexo, tratamiento quirúrgico, tamaño tumoral, localización tumoral, diferenciación neoplásica, estadiaje histológico, metastatización ganglionar, CEA preoperatorio, CA19.9 preoperatorio, catepsina B preoperatoria, p53, catepsina B tisular, recidiva local y/o a distancia de la enfermedad neoplásica colorrectal y supervivencia.

## VARIABLES CLÍNICAS Y ANATOMOPATOLÓGICAS

. En los 23 enfermos intervenidos quirúrgicamente con diagnóstico de apendicitis aguda se estudió las variables clínicas, edad y sexo.

El estadiaje anatomopatológico que definió la variable anatomopatológica incluyó los valores, eritematoso, flemonoso, gangrenoso y perforación apendicular.

. En los 55 enfermos intervenidos quirúrgicamente con diagnóstico de cáncer colorrectal se estudiaron las variables clínicas, edad, sexo, tratamiento quirúrgico, recidiva local y/o a distancia de la enfermedad y supervivencia.

De acuerdo a la edad se distribuyó a los enfermos en dos grupos: I, edad igual o inferior a 50 años y II, edad superior a 50 años.

La distribución según el sexo, agrupó a varones y mujeres.

El tratamiento quirúrgico utilizado fue variado, realizándose con carácter electivo en todas las situaciones, e incluía:

Hemicolectomía derecha

Hemicolectomía transversa

Hemicolectomía izquierda

Resección anterior

Amputación abdominoperineal

Operación de Hartmann. Colostomía de descarga

Colectomía segmentaria

Laparotomía exploradora

La recidiva local se definió como la recurrencia del carcinoma colorrectal como tumor localizado en el sitio de la anastomosis o como la recurrencia en el lecho del carcinoma primario con crecimiento hacia la región anastomótica.

El tiempo transcurrido desde la intervención quirúrgica hasta el cierre del estudio libre de enfermedad caracterizarán la supervivencia del enfermo. No existió mortalidad operatoria, considerada esta como la muerte del enfermo dentro de los 30 días tras un procedimiento quirúrgico.

Las variables anatomopatológicas estudiadas se clasificaron de acuerdo a la descripción macroscópica y microscópica de la neoplasia reseca.

El tamaño de la tumoración, caracterizado por el diámetro máximo del mismo, caracterizó a las neoplasias en menores o iguales a cinco centímetros, y neoplasias superiores a cinco centímetros.

La neoplasia pudo estar localizada anatómicamente, localización, en ciego, colon ascendente, ángulo hepático colónico, colon transversal, ángulo esplénico colónico, colon descendente, sigma y recto.

Número de ganglios linfáticos examinados y con metastatización neoplásica.

Se consideró la diferenciación neoplásica como buena, moderada o mala.

La estadificación tumoral se realizó según el sistema de clasificación de Astler y Coller modificado. En 1954 Astler y Coller realizaron una modificación del sistema de clasificación de Dukes:

A, tumoración limitada a la mucosa

B1, tumoración dentro de la muscular propia sin llegar a rebasarla

B2, tumoración que rebasa la muscular propia afectando grasa perivisceral

C1, similar a B1, aunque con metastatización ganglionar

C2, similar a B2, aunque con metastatización ganglionar

Posteriormente Turnbull( 137 ) introdujo el estadio D, que definió como la presencia de metastatización a distancia.

Para nuestro Estudio, realizamos una clasificación adicional mediante la modificación del sistema de estadiaje en relación a la utilización de terapia adyuvante o no. Agrupamos en el grupo I, a aquellos enfermos con estadio tumoral, A y B1. En el grupo II, incluimos a enfermos con estadios B2, C1, C2 y D.

## **METODOLOGÍA DE DETERMINACIÓN DE CEA**

La determinación preoperatoria de valores de CEA sérico, se realizó mediante la utilización del analizador automático INMULITE 2000, mediante el ensayo INMULIT 2000 CEA, ( Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA), que representa un enzimoimmunoensayo quimioluminiscente, secuencial en dos etapas, de amplificación tipo “ sándwich”, heterogéneo, cuya fase sólida se compone de “ beads” de anticuerpo policlonal anti-CEA unido a fosfatasa alcalina. El sustrato quimioluminiscente es, nuevamente, un ester de fosfato de adamantil dioxoetano.

Unidades reportadas: ng/ml. El valor de corte habitual de 5 ng/ml abarca el percentil 95,05% de los individuos sanos.

## **METODOLOGÍA DE DETERMINACIÓN DE CA19.9**

La determinación preoperatoria de CA19.9 se realizó mediante el analizador automático INMULITE con el ensayo INMULITE GI-MA ( Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA), que representa un enzimoimmunoensayo quimioluminiscente de dos pasos, con procedimiento de amplificación tipo “ sándwich”, heterogéneo, cuya fase sólida está constituida por “ beads” de poliestireno recubiertas con anticuerpo monoclonal específico para CA 19.9, ( anticuerpo de captura) y que utiliza como anticuerpo marcado, anticuerpo monoclonal murino anti-CA 19.9, unido covalentemente a fosfatasa alcalina y como sustrato un ester fosfato de adamantil dioxoetano.

Unidades reportadas: U/ml. El valor de corte de 37 u/ml representa el percentil 99,4% de individuos sanos.

## **METODOLOGÍA DE DETERMINACIÓN DE p53**

Una vez resecada la pieza tumoral y realizadas las técnicas histológicas e inmunohistoquímicas protocolizadas, las muestras se incubaron con el anticuerpo anti-p53, ( clon D07, Dako, prediluido), durante una hora a temperatura ambiente, prosiguiendo normalmente con el método Envision. La expresión de p53 es valorada como negativa o positiva en relación a la siguiente clasificación:

0, ninguna

1, positividad evidente en menos del 2% de los núcleos

2, positividad manifiesta en el 40-50% de los núcleos

3, positividad en más del 90% de los núcleos

En nuestro estudio se realizó una cuantificación de los núcleos que mostraron positividad.



## **CATEPSINA METODOLOGÍA DE DETERMINACIÓN PLASMÁTICA PREOPERATORIA**

La h-Catepsina B se determinó mediante un enzimoimmunoensayo secuencial en dos pasos, de amplificación, tipo “sándwich”, heterogéneo, con fase sólida tipo microplaca con un anticuerpo de captura policlonal IgG anti-h-catepsina B procedente de conejo, utilizando como anticuerpo marcado anti-h-catepsina procedente de oveja, unido a peroxidasa de rábano ( KRKA, dd Novo mesto Slovenia).

Las placas se leyeron en un lector Boehlis ( Ingelheim Diagnóstica y Tecnología S.A., Barcelona).

Unidades reportadas: ng/ml.

## **METODOLOGÍA DE DETERMINACIÓN HISTOLÓGICA**

Las secciones para el estudio inmunohistoquímico de 4  $\mu$  de grosor fueron desparafinadas mediante técnica habitual y sometidas a desenmascaramiento antigénico mediante microondas durante 15 minutos. Se diseñó un protocolo específico mediante el sistema Envision, que incluyó los pasos habituales, como la inactivación de preoxida endógena, y la exposición al anticuerpo primario de cabra anticatapsina B humana ( C-19, Santa Cruz Biotechnology), a una dilución 1:3000, durante 60 minutos.

Como anticuerpo puente se utilizó IgG de conejo anti-cabra a una dilución 1:500, ( Jackson InmunoResearch Laboratoires, Inc.), durante 15 minutos.

Posteriormente se realizó la técnica Envision (Dako) automatizada idéntica a la utilizada con otros anticuerpos policlonales.

Se realizaron secciones de control negativo si no se observaba inmunotinción o esta se detectaba en menos de un 1% de las células.

Existió expresión baja de catepsina B, cuando menos del 25% de las células tumorales eran positivas.

La expresión se consideró alta, con inmunorreacción en más del 25% de las células neoplásicas. En nuestro estudio se realizó una cuantificación de la expresión positiva.

Las células epiteliales y estromales se evaluaron por separado.

## **PLAN DE TRABAJO**

· Los enfermos con diagnóstico de apendicitis aguda incluidos en nuestro Servicio, 23 enfermos, e intervenidos quirúrgicamente con carácter urgente fueron elegidos de forma aleatoria. Todos los enfermos fueron incluidos en el protocolo profiláctico ordinario del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Complejo Hospitalario de Ciudad Real. Se realizó la recogida de determinaciones sanguíneas de forma preoperatoria, dentro de un periodo de 24 horas previas a la intervención quirúrgica, para su posterior conservación a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar el estudio con todas las muestras. La determinación de los valores de catepsina B se realizaron según el método previamente descrito por el Departamento de Bioquímica del Complejo Hospitalario de Ciudad Real.

Una vez intervenido quirúrgicamente, la pieza quirúrgica es sometida al estudio histológico habitual por el Servicio de Anatomía Patológica. Consideramos cuatro estadios de evolución en el proceso inflamatorio apendicular,( eritematoso, flemonoso, gangrenoso, perforado). La pieza quirúrgica fue tallada y fijada en formol tamponado al 10 % para su procesamiento habitual en bloques de parafina. Se realizaron cortes de  $4\mu$  de grosor y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Para el estudio inmunohistoquímico de la catepsina B se utilizó un equipo automático polivalente, ( Envision,Dako Corp.), con previo desenmascaramiento antigénico y según el método protocolizado definido previamente.

Los enfermos una vez fueron dados de alta hospitalaria siguieron controles ordinarios en régimen ambulatorio.

· Los enfermos con diagnóstico preoperatorio de cáncer colorrectal, 55 enfermos, fueron incluidos en nuestro estudio de forma aleatoria, una vez remitidos a nuestro Servicio para intervención quirúrgica bien desde el Servicio de Digestivo o bien desde nuestra Consulta Ambulatoria. Todos los enfermos fueron sometidos a un estudio completo endoscópico del colon y recto en régimen ambulatorio tras preparación habitual y completa colorrectal. Se realizó biosia excisional preoperatoria en todas las ocasiones. En algunos enfermos se realizó enema opaco adicional. El despistaje preoperatorio de metástasis a distancia se realizó mediante la realización de TAC abdominopélvico, y radiología torácica ante la posibilidad de metastatización pulmonar.

Todos los enfermos fueron ingresados al menos 24 horas antes de la intervención quirúrgica con idea de realizar preparación mecánica colorrectal preoperatoria, realizar profilaxis tromboembólica, mediante el uso de heparina de bajo peso molecular, y profilaxis antibiótica. Del mismo modo estos enfermos fueron informados de la naturaleza de la enfermedad y riesgos asociados a la realización de un tratamiento quirúrgico.

La extracción de muestras sanguíneas se realizó 24 horas antes de la intervención quirúrgica. La determinación de los valores de CEA, CA 19.9 y catepsina B se realizó según los métodos definidos, por el Departamento de Bioquímica del Complejo Hospitalario de Ciudad Real.

Una vez resecada la pieza tumoral se realizaron las técnicas histológicas e inmunohistoquímicas para la determinación de los valores de p53 y catepsina B tisular según las técnicas previamente descritas, por el Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario de Ciudad Real.

Se realizó el tallado de las piezas quirúrgicas, seleccionando material, procurando que incluyese tejido neoplásico y borde con epitelio intestinal no neoplásico, así como suficiente pared intestinal en profundidad. Este material una vez fijado en formol tamponado al 10%, se procesó de forma habitual en bloques de parafina. Se realizaron cortes de 4 $\mu$  de grosor con tinción mediante hematoxilina-eosina.

El estudio inmunohistoquímico se realizó mediante un equipo automático polivalente ( Envision, Dako Corp.), previo desenmascaramiento antigénico. Como cromógeno se usó DAB (Dako).

Se utilizó el sistema de clasificación histológica de Astler y Coller modificado por Turnbull et al ( 137 ).

La valoración en todos los enfermos fue realizada por dos patólogos que desconocían la historia clínica del enfermo en cada caso.

La utilización de tratamiento adyuvante fue llevado a cabo según protocolos de actuación del Servicio de Oncología del Complejo Hospitalario de Ciudad Real en enfermos con cáncer colorrectal en estadios más avanzados a A y B1.

Los enfermos una vez dados de alta hospitalaria se incluyeron en un programa de seguimiento con carácter ambulatorio y flexible ante la características del enfermo.

## Cáncer colorrectal. Programa de seguimiento.

	8 <sup>o</sup> -12 <sup>o</sup> meses	18 meses	24 meses	36 meses	48 meses	60 meses
Clinica/Exploración Física	+	+	+	+	+	+
CEA	+	+	+	+	+	+
ECO Abdominopélvica	+	+	+	+	+	+
Radiografía torácica	+	+	+	+	+	+
Colonoscopia	+		+			
TAC abdominopélvico	+		+			

## **ANALISIS ESTADISTICO**

### **ANALISIS DESCRIPTIVO**

Estudio transversal y cohorte de 78 enfermos, 23 enfermos con diagnóstico de apendicitis aguda y 55 enfermos con diagnóstico de cáncer colorrectal. El análisis descriptivo comprenderá para cada parámetro cuantitativo en cada una de las muestras ( neoplásica o no); media, desviación estandar, mínimo, máximo, mediana, número de valores ausentes.

Los parámetros cualitativos se expresarán por la frecuencia de distribución y su intervalo de confianza bilateral al 95 %.

## ANALISIS INTERFERENCIAL

### OBJETIVOS PRIMARIOS

- La relación existente entre los valores plasmáticos preoperatorios e inmunohistoquímicos de catepsina B en enfermos con cáncer colorrectal respecto a patología colónica benigna, enfermos con diagnóstico de apendicitis, se estudió mediante la prueba de T de Student para muestras independientes, previa utilización del test de Kormogorov Smirnof.
- El análisis de los valores de catepsina B plasmáticos preoperatorios e inmunohistoquímicos respecto a los diferentes estadios del cáncer colorrectal según la clasificación de Astler y Coller modificada por Turnbull et al ( 137 ), se realizó mediante el análisis de varianza, ANOVA.
- El estudio de la relación existente entre los valores de catepsina B serológicos preoperatorios e histológicos con la recidiva de la enfermedad colorrectal se realizó mediante regresión logística.
- El estudio de la relación existente entre los valores de catepsina B serológicos preoperatorios e histológicos con la supervivencia del enfermo con cáncer colorrectal estudiado se realizó mediante regresión de Cox.



## OBJETIVOS SECUNDARIOS

- El estudio de los valores serológicos preoperatorios de CEA y CA 19.9 respecto a recidiva de la enfermedad neoplásica colorrectal se realizó mediante regresión logística.
- El estudio de los valores serológicos preoperatorios de CEA y CA 19.9 respecto a supervivencia se realizó mediante regresión de Cox.
- La sensibilidad y especificidad de los valores preoperatorios ( Catepsina B, CEA y CA 19,9 ), respecto a la mortalidad se determinó mediante curvas de ROC.
- El estudio del valor de p53 tisular respecto a la recidiva de la enfermedad neoplásica colorrectal, se realizó mediante regresión logística.
- El estudio del valor de p53 tisular respecto a supervivencia se realizó mediante regresión de Cox.
- El estudio de los valores serológicos preoperatorios e inmunohistoquímicos de catepsina B respecto a los estadios histológicos modificados,( I,estadios A y B1, II, estadios B2,C1,C2,D),

se realizó mediante la prueba T de Student para muestras independientes.

## **OTROS OBJETIVOS**

- El análisis de la relación existente entre las variables serológicas preoperatorias en cáncer colorrectal y recidiva de la enfermedad, se realizó mediante regresión logística para variables múltiples independientes.
- El análisis de la relación existente entre las variables inmunohistoquímicas en cáncer colorrectal y recidiva de la enfermedad se realizó mediante regresión logística para variables múltiples independientes.
- El análisis de la relación existente entre variables serológicas preoperatorias y tisulares en cáncer colorrectal y recidiva de la enfermedad se realizó mediante regresión logística para variables múltiples independientes.
- El análisis de la relación existente entre las variables serológicas preoperatorias en cáncer colorrectal y supervivencia se realizó mediante regresión de Cox.

- El análisis de la relación existente entre las variables inmunohistoquímicas en cáncer colorrectal y supervivencia se realizó mediante regresión de Cox.
- El análisis de la relación existente entre variables serológicas preoperatorias y tisulares en cáncer colorrectal y supervivencia se realizó mediante regresión de Cox.
- El análisis de la relación existente entre cada una de las variables clínicas y anatomopatológicas en cáncer colorrectal con recidiva de la enfermedad se realizó mediante regresión logística.
- El análisis de la relación existente entre cada una de las variables clínicas y anatomopatológicas en cáncer colorrectal con supervivencia se realizó mediante regresión de Cox.
- El análisis de la relación existente entre grado de diferenciación neoplásica y valores séricos preoperatorios e inmunohistoquímicos de catepsina B se realizó mediante el test de ANOVA.
- El análisis de la relación existente entre tamaño tumoral neoplásico y valores séricos preoperatorios e inmunohistoquímicos de catepsina B se realizó mediante T de Student.
- El análisis de la relación existente entre el número de ganglios con metastatización neoplásica y valores séricos preoperatorios e inmnohistoquímicos de catepsina B se realizó mediante el test de ANOVA.

- El análisis de la relación existente entre valores serológicos preoperatorios de catepsina B e inmunohistoquímicos con los diferentes grados de apendicitis aguda se realizó mediante el test de ANOVA.
- La relación existente entre los valores de catepsina B preoperatorios plasmáticos e inmunohistoquímicos, con la expresión de proteína p53 se realizó mediante el test de Wilcoxon.

Todas las pruebas estadísticas se realizaron con un nivel de significación estadístico del 95%.

Todos los cálculos estadísticos se realizaron a través del paquete estadístico SPSS 10.0.

## **RESULTADOS**

## **RESULTADOS**

- **ESTADISTICA DESCRIPTIVA**  
ENFERMOS CON APENDICITIS AGUDA  
ENFERMOS CON CANCER COLORRECTAL
- **OBJETIVOS PRIMARIOS**
- **OBJETIVOS SECUNDARIOS**
- **OTROS OBJETIVOS**

## ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

### ENFERMOS CON APENDICITIS AGUDA

Durante el periodo comprendido entre 1998 hasta 2000, realizamos un estudio transversal y cohorte en el que incluimos a 23 enfermos con diagnóstico de apendicitis aguda, intervenidos quirúrgicamente en nuestro Servicio con carácter urgente.

#### Edad

Realizamos una distribución de los enfermos en dos grupos en relación a su edad. 19 enfermos presentaron edad menor o igual a 50 años (82,6%). Sólo 4 enfermos, ( 17,4 % ), presentaron una edad superior a 50 años.

#### EDAD

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
0	19	82,6	82,6	82,6
1	4	17,4	17,4	100,0
Total	23	100,0	100,0	

### Sexo

La mayoría de los enfermos fueron varones (n=19) ( 82,6% ) , respecto a la presencia de mujeres (n=4) ( 17,4%).

#### SEXO

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
0	19	82,6	82,6	82,6
1	4	17,4	17,4	100,0
Total	23	100,0	100,0	

### Anatomía Patológica

El estudio anatomopatológico del apéndice ileocecal reseado fue:  
 Apéndice eritematoso ( n=4) ( 17,4%), apéndice flemonoso (n=13) ( 56,5 %),  
 apéndice gangrenoso (n=3) ( 13%) y apéndice perforado (n=3) ( 13% ).

#### ANATOMIA PATOLOGICA

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
0	4	17,4	17,4	17,4
1	13	56,5	56,5	73,9
2	3	13,0	13,0	87,0
3	3	13,0	13,0	100,0
Total	23	100,0	100,0	



### Valores plasmáticos preoperatorios y tisulares de Catepsina B

Los valores plasmáticos de catepsina B determinados preoperatoriamente y tras estudio inmunohistoquímico fueron:

	CatB pre	Cat tis
<b>Media</b>	5,74	29,56
<b>Error Std.</b>	0,39	3,17
<b>Mediana</b>	5,21	30,00
<b>Moda</b>	4,16	20,00
<b>Desviación Std.</b>	1,90	15,21
<b>Varianza</b>	3,64	231,62
<b>Rango</b>	7,42	60,00
<b>Minimo</b>	3,01	0,00
<b>Máximo</b>	10,43	60,00

## ENFERMOS CON CANCER COLORRECTAL

En nuestro estudio prospectivo incluimos 55 enfermos con diagnóstico preoperatorio de cáncer colorrectal intervenidos quirúrgicamente en nuestro Servicio, desde 1998 hasta 2000, con un seguimiento medio de 18 meses(2-25).

### Edad

Los enfermos presentaron una edad menor o igual a 50 años en sólo 5 ocasiones (9,1%). El resto de enfermos (n=50) (90,9%), fueron mayores de 50 años.

#### EDAD

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
0	5	9,1	9,1	9,1
1	50	90,9	90,9	100,0
Total	55	100,0	100,0	

**Sexo**

29 enfermos fueron varones ( 52,7%) y 26 mujeres ( 47,3%).

**SEXO**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
hombre	29	52,7	52,7	52,7
mujer	26	47,3	47,3	100,0
Total	55	100,0	100,0	

**Tamaño tumoral**

La neoplasia colorrectal fue menor o igual a cinco centímetros de diámetro máximo en 40 enfermos (72,7%). En 15 casos el diámetro máximo fue superior a 5 centímetros (27,3%).

**TAMAÑO TUMORAL**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
menor o igual de 5 cms	40	72,7	72,7	72,7
mayor de 5 cms	15	27,3	27,3	100,0
Total	55	100,0	100,0	

### Localización

La localización de la neoplasia colorrectal fue:

Ciego (n=1) (1,8%)

Colon ascendente (n=12) (21,8%)

Colon transverso (n=2) (3,6%)

Colon decendente (n=12) (21,8%)

Sigma (n=7) (12,7%)

Recto (n=21) (38,2%)

### LOCALIZACION

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
0	1	1,8	1,8	1,8
1	12	21,8	21,8	23,6
3	2	3,6	3,6	27,3
5	12	21,8	21,8	49,1
6	7	12,7	12,7	61,8
7	21	38,2	38,2	100,0
Total	55	100,0	100,0	

### Diferenciación

Las neoplasias presentaron buena diferenciación en 25 ocasiones (45,5%), moderada diferenciación (n=27) (49,1%) y mala diferenciación (n=3) (5,5%).

### DIFERENCIACION

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
0	25	45,5	45,5	45,5
1	27	49,1	49,1	94,5
2	3	5,5	5,5	100,0
Total	55	100,0	100,0	

### Estadaje

De acuerdo al sistema de clasificación histológico de Astler y Coller modificado por Turnbull et al ( 137 ), las neoplasias se distribuyeron de acuerdo a las frecuencias mostradas en la tabla,

### ESTADIAJE

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
a	2	3,6	3,6	3,6
b1	7	12,7	12,7	16,4
b2	22	40,0	40,0	56,4
c1	2	3,6	3,6	60,0
c2	16	29,1	29,1	89,1
d	6	10,9	10,9	100,0
Total	55	100,0	100,0	

### Metastatización ganglionar

34 enfermos (61,8%), no presentaron metastatización ganglionar. El resto de enfermos que presentaron metastatización ganglionar y su cuantificación fue:

**METASTATIZACION GANGLIONAR**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
0	34	61,8	61,8	61,8
1	4	7,3	7,3	69,1
2	8	14,5	14,5	83,6
3	1	1,8	1,8	85,5
4	2	3,6	3,6	89,1
5	1	1,8	1,8	90,9
6	2	3,6	3,6	94,5
7	1	1,8	1,8	96,4
9	1	1,8	1,8	98,2
16	1	1,8	1,8	100,0
Total	55	100,0	100,0	

### Recidiva

Existió recidiva de la enfermedad colorrectal en 17 enfermos ( 30,9%). Rechazamos en nuestro estudio aquellos enfermos con metastatización a distancia ( estadio D), (n=6).

**RECIDIVA**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
0=no	32	58,2	65,3	65,3
1=si	17	30,9	34,7	100,0
Total	49	89,1	100,0	
Rechazados	6	10,9		
Total	55	100,0		

**Mortalidad**

13 enfermos fallecieron debido a la enfermedad colorrectal (23,6%).

**MORTALIDAD**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
NO	42	76,4	76,4	76,4
SI	13	23,6	23,6	100,0
Total	55	100,0	100,0	

**Valores plasmáticos preoperatorios de CEA,CA19,9, Catepsina B e inmunohistoquímicos de Catepsina B y p53**

	<b>CEA pre</b>	<b>CA19.9</b>	<b>CatBpre</b>	<b>P53</b>	<b>CatBtis</b>
Media	46,04	110,52	6,94	44,36	66,90
Error Std	18,09	47,82	0,24	4,83	2,63
Mediana	2,99	7,30	6,82	40,00	70,00
Moda	1,10	2,50	6,13	0,00	70,00
Desviación Std.	134,39	354,64	1,83	35,88	19,51
Varianza	18008,41	125773,00	3,35	1288,01	381,01
Rango	731,79	1917,50	8,03	95,00	80,00
Mínimo	0,21	2,50	3,57	0,00	10,00
Máximo	732,00	1920,00	11,60	95,00	90,00



## OBJETIVOS PRIMARIOS

- Los valores preoperatorios plasmáticos e inmunohistoquímicos de Catepsina B, siguieron la siguiente distribución:

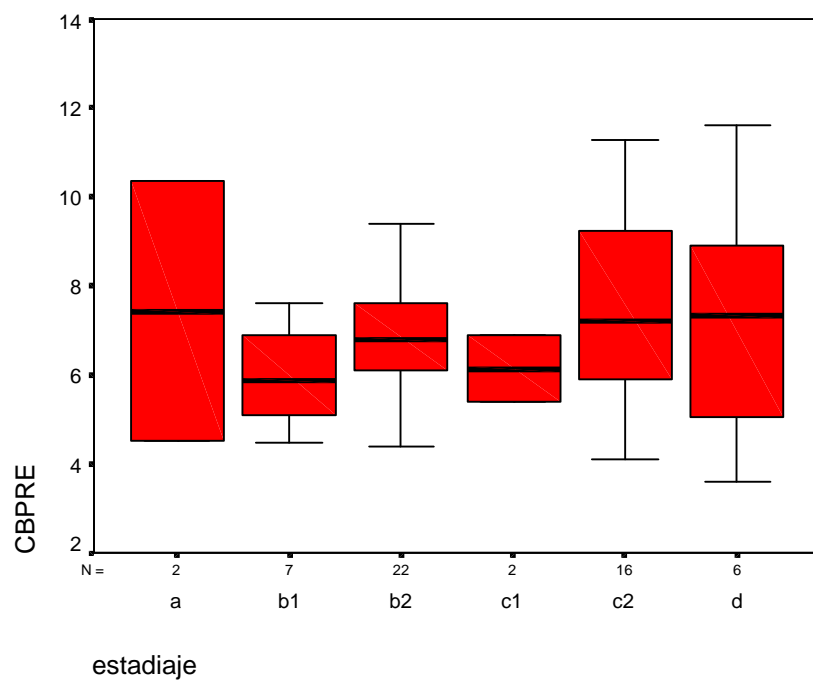
**Estadísticos del grupo**

patología por la que se interviene	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
CBPRE apendicitis cáncer colorrectal	23	5,7465	1,9088	,3980
	55	6,9440	1,8319	,2470
CBTIS apendicitis cáncer colorrectal	23	29,5652	15,2191	3,1734
	55	66,9091	19,5195	2,6320

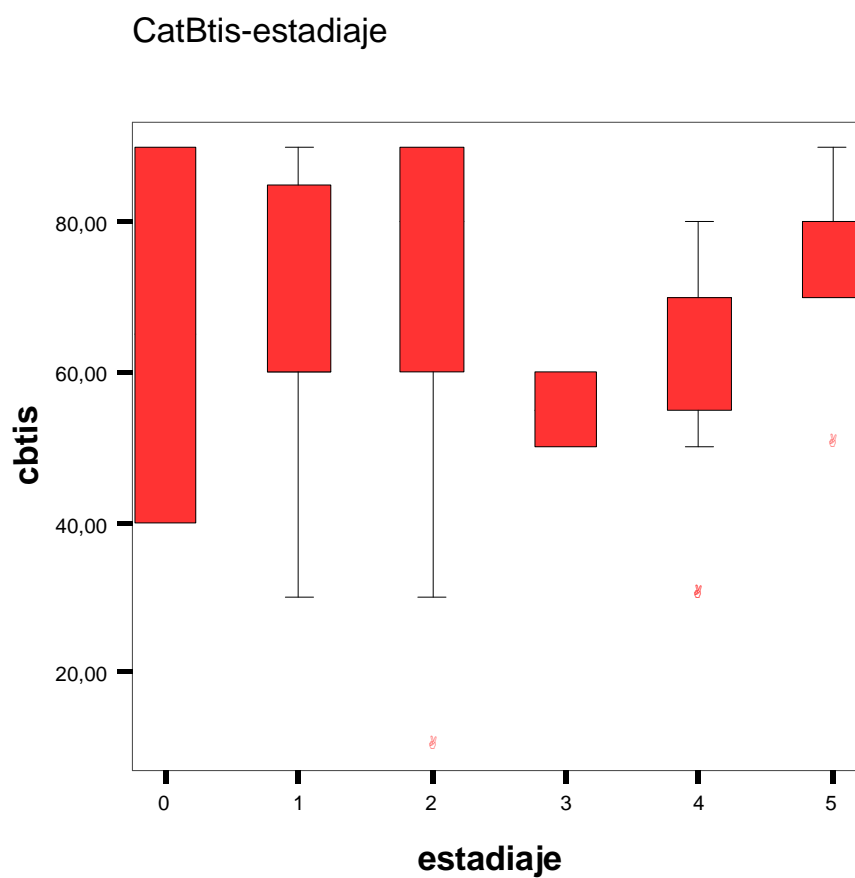
Los valores de Catepsina B plasmáticos en enfermos con cáncer colorrectal fueron significativamente superiores a los hallados en enfermos con apendicitis aguda ( $p=0,011$ ).

Los valores inmunohistoquímicos de Catepsina B en enfermos con cáncer colorrectal fueron significativamente superiores a los hallados en enfermos con apendicitis aguda ( $p=0,000$ )

- Los valores plasmáticos preoperatorios de Catepsina B no son significativamente más elevados en relación a un estadio tumoral más avanzado ( $p=0,549$ ).



Los valores inmunohistoquímicos de Catepsina B tampoco fueron significativamente más elevados en relación a un estadio tumoral más avanzado ( $p=0,823$ ).



- Los valores de Catepsina B plasmáticos preoperatorios no se relacionan significativamente con la aparición de recidiva de la enfermedad colorrectal (  $p=0,118$ ).

Los valores de Catepsina B inmunohistoquímicos tampoco se relacionan significativamente con la aparición de recidiva de la enfermedad colorrectal (  $p=0,399$ ).

	p
<b>CatBpre</b>	0,118
<b>CatBtis</b>	0,399

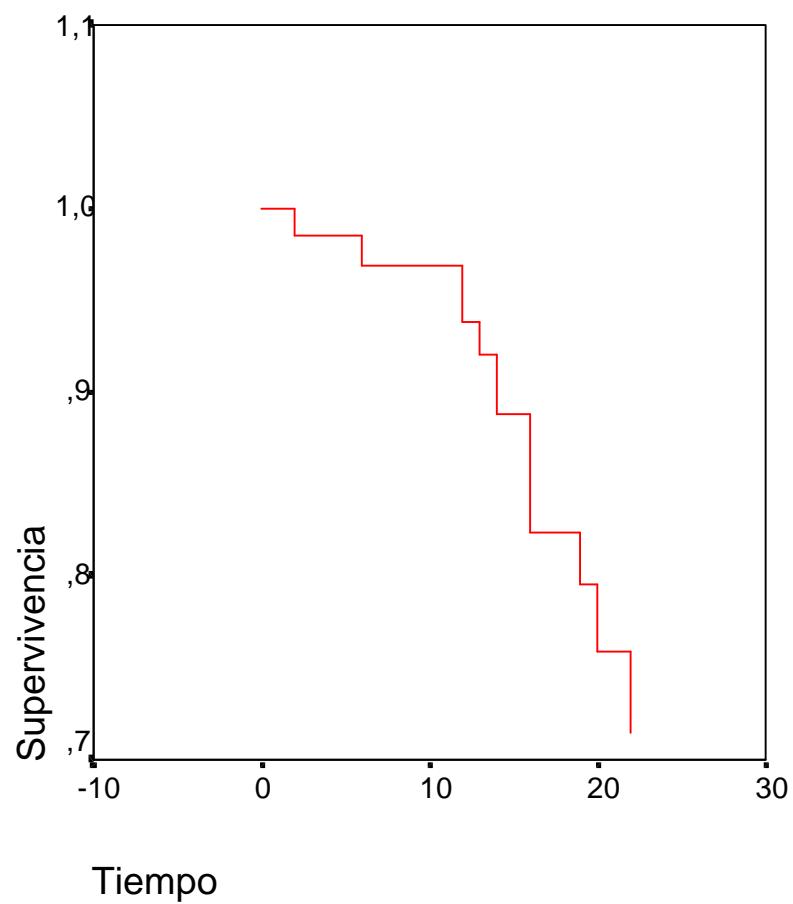
- Los valores plasmáticos preoperatorios de Catepsina B se encuentran relacionados significativamente con la mortalidad del enfermo con cáncer colorrectal ( $p=0,020$ ).

Los valores inmunohistoquímicos de Catepsina B no se relacionan de manera significativa con la mortalidad del enfermo con cáncer colorrectal ( $p=0,209$ ).

	p
<b>CatBpre</b>	0,020
<b>CatBtis</b>	0,209

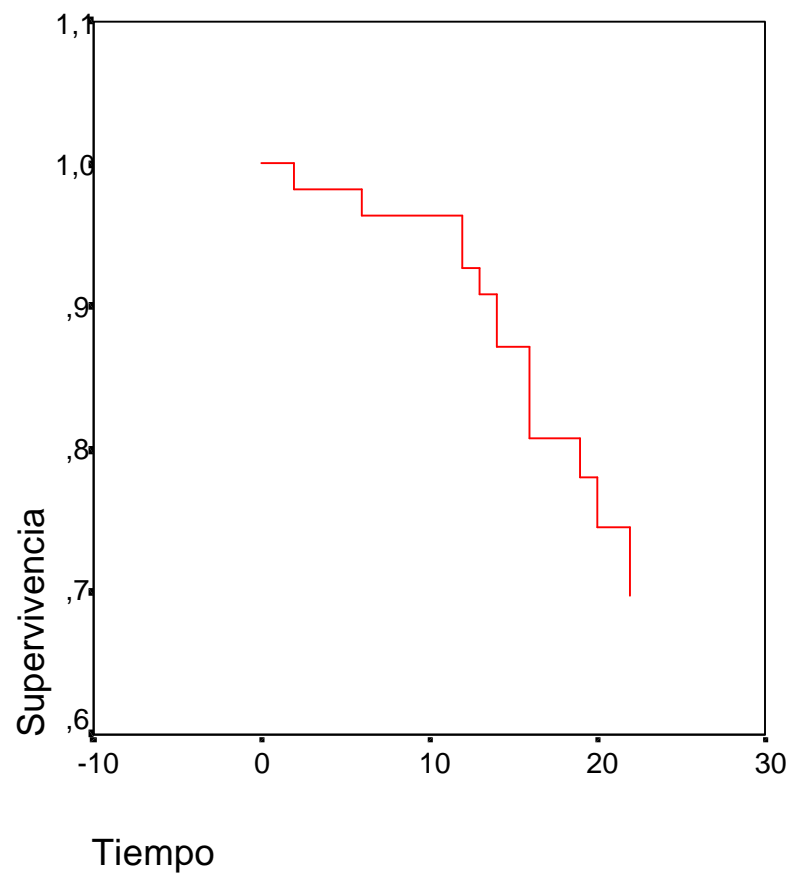
De acuerdo a los valores obtenidos de catepsina B en el estudio plasmático preoperatorio, a los 20 meses más del 70% de la muestra estudiada estaría viva.

## Función de Supervivencia



De acuerdo a los valores obtenidos de catepsina B en el estudio inmunohistoquímico de la pieza resecada, a los 20 meses más del 70% de la muestra estudiada estaría viva.

### Función de supervivencia



## OBJETIVOS SECUNDARIOS

- El valor de CEA plasmático preoperatorio se relacionó de forma significativa con mortalidad del enfermo (  $p=0,001$ ) y no con la recidiva de la enfermedad colorrectal (  $p=0,062$ ).

	Recidiva(Sig.)	Mortalidad(Sig.)
<b>CEApre</b>	0,062	0,001

El valor de CA19.9 plasmático preoperatorio no se relacionó en nuestro estudio con recidiva de la enfermedad colorrectal y mortalidad del enfermo.

	Recidiva(Sig.)	Mortalidad(Sig.)
<b>CA 19.9</b>	0,071	0,807



- La sensibilidad de la Catepsina B respecto a la mortalidad del enfermo con cáncer colorrectal es del 92,3 % para valores preoperatorios de 5,47 ng/ml y más elevados. La especificidad del CEA respecto a la mortalidad del enfermo con cáncer colorrectal es del 85,7 % para valores preoperatorios de 9,59 ng/ml y superiores.

	Catepsina B	CEA	CA 19.9
<b>Percentil 25</b>	s: <b>92,3</b>	s:84,6	s:84,6
	e:26,1	e:26,1	e:28,5
	área:0,59	área:0,55	área:0,56
<b>Percentil 50</b>	s:69,2	s:84,6	s:76,9
	e:54,7	e:59,5	e:57,1
	área:0,62	área:0,72	área:0,67
<b>Percentil 75</b>	s:38,4	s:61,5	s:53,8
	e:78,5	e: <b>85,7</b>	e:85,3
	área:0,58	área:0,73	área:0,69

- Los valores de p53 en pieza de resección se encontraron relacionados en nuestro estudio de forma significativa con recidiva de la enfermedad colorrectal (  $p=0,048$ ), y no con la mortalidad del enfermo.

	Recidiva(Sig.)	Mortalidad(Sig.)
P53	0,048	0,875

- No existió relación significativa entre los valores plasmáticos preoperatorios e inmunohistoquímicos de Catepsina B respecto a los estadios anatomopatológicos modificados (I, A y B1; II B2,C1,C2,D).

	P
<b>CatBpre</b>	0,219
<b>CatBtis</b>	0,972

## OTROS OBJETIVOS

- El modelo multivariante de regresión logística que incluyó a la variables bioquímicas plasmáticas preoperatorias independientes CEA, CA19.9 y Catepsina B en relación a la recidiva de la enfermedad colorrectal no demostró una relación significativa de estas variables con recidiva.

	Recidiva(Sig.)
<b>CEApre</b>	0,062
<b>CA19.9pre</b>	0,071
<b>Catpre</b>	0,118

- El modelo multivariante de regresión logística que incluyó a las variables inmunohistoquímicas independientes p53 y Catepsina B en relación a la recidiva de la enfermedad colorrectal demostró la relación significativa de p53 con recidiva de la enfermedad colorrectal ( 0,042).

	Recidiva(Sig.)
<b>P53</b>	0,042
<b>CatBtis</b>	0,399

- El modelo multivariante de regresión logística que incluyó a todas las variables bioquímicas estudiadas en nuestro estudio, CEA, CA 19.9, p53, Catepsina B y tisular, en relación a la recidiva de la enfermedad colorrectal demostró la relación significativa de p53 ( 0,042).

	Recidiva (Sig.)
<b>CEA</b>	0,062
<b>CA19.9</b>	0,071
<b>P53</b>	0,042
<b>CatBpre</b>	0,118
<b>CatBtis</b>	0,399

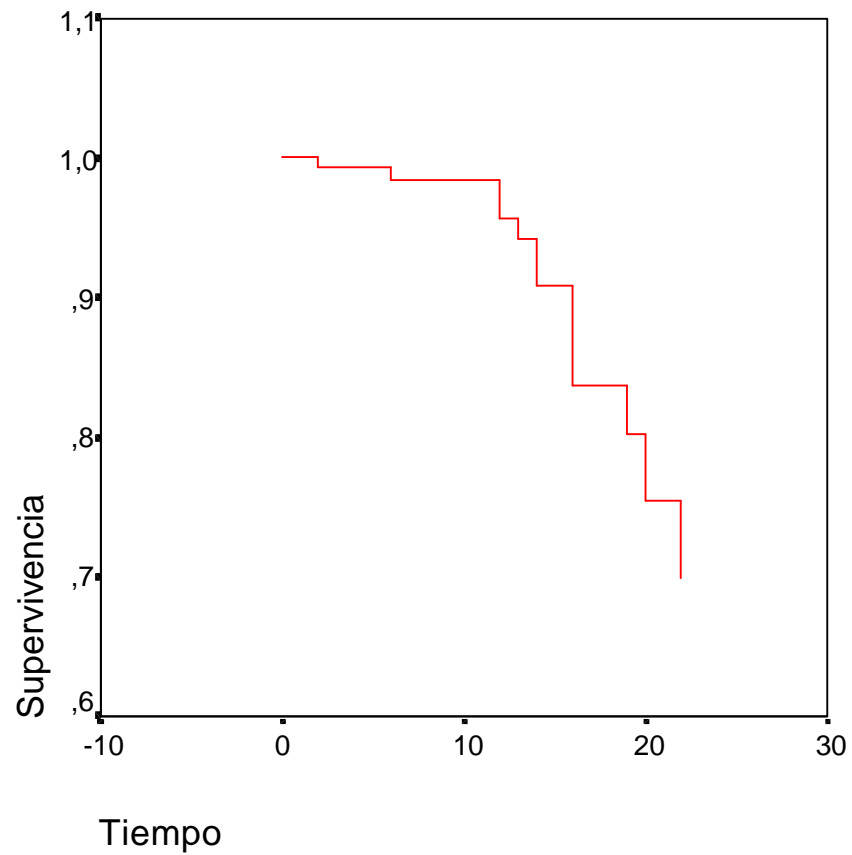
- El modelo multivariante de Cox que incluyó las variables bioquímicas plasmáticas preoperatorias CEA, CA 19.9 y Catepsina B, en relación a la supervivencia de los enfermos con cáncer colorrectal, mostró una relación significativa de CEA (0,002) y CatBpre ( 0,025).

Supervivencia (Sig.)	
<b>CEA</b>	0,002
<b>CA19.9</b>	0,428
<b>CatBpre</b>	0,025

Relacionando los valores hallados de las variables CEA, CA 19,9 y catepsina B en nuestro estudio, a los 20 meses más del 70% de los enfermos continúan vivos.



## Función de Supervivencia

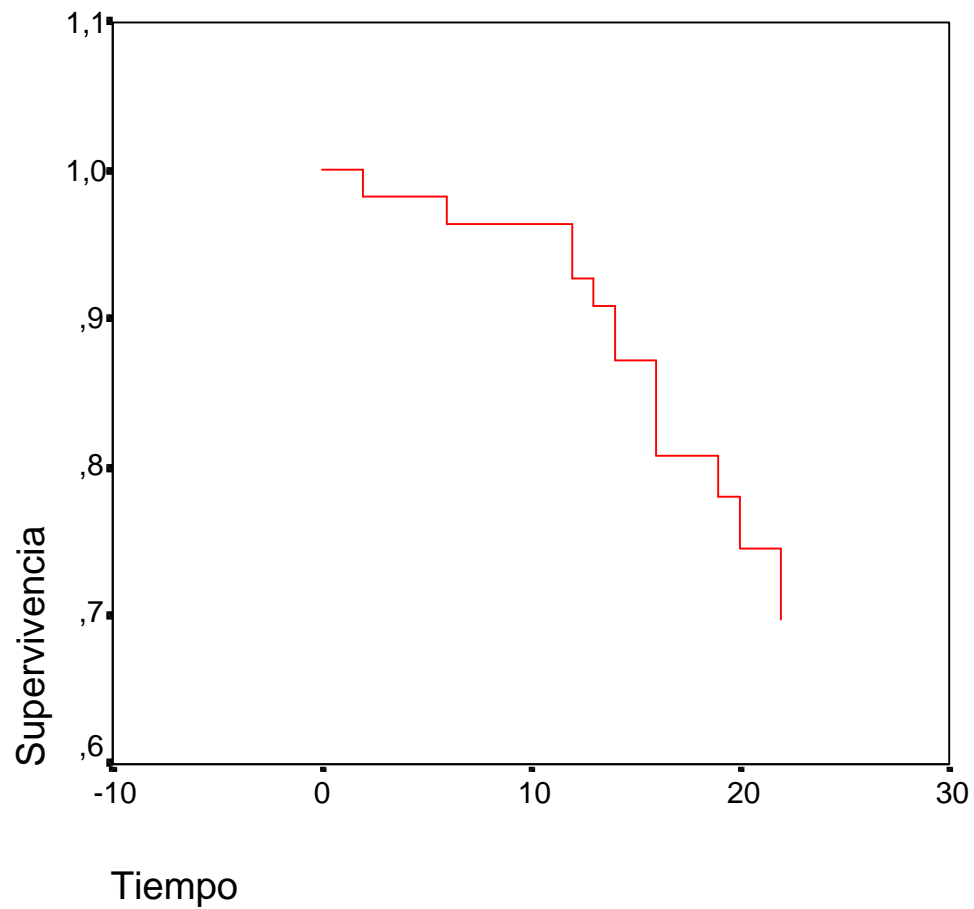


- El modelo multivariante de Cox que incluyó las variables bioquímicas inmunohistoquímicas p53 y Catepsina B tisular, en relación a la supervivencia de los enfermos con cáncer colorrectal no demostró relación significativa de alguno de los parámetros.

Supervivencia(Sig.)	
<b>P53</b>	0,775
<b>CatBpre</b>	0,206

Relacionando los valores de encontrados de Catepsina B en el estudio inmunohistoquímico de la pieza resecada y p53 más del 70% de la muestra estudiada continúan vivos

## Función de Supervivencia



- El modelo multivariante de Cox que incluyó todas las variables bioquímicas estudiadas en nuestro estudio, CEA, CA19,9, p53, Catepsina B plasmático y tisular, en relación a la supervivencia, demostró la relación significativa de CEA ( 0,000) y CatBpre ( 0,008).

	Supervivencia(sig.)
<b>CEA</b>	0,000
<b>CA19.9</b>	0,664
<b>P53</b>	0,403
<b>CatBpre</b>	0,008
<b>CatBtis</b>	0,081

- El modelo univariante de regresión logística que incluyó a variables clinico-patológicas en relación a la recidiva demostró la relación significativa de las variables localización tumoral (  $p=0,018$  ) , metastatización ganglionar ( 0,049) y estadiaje histológico tumoral (0,012).

	Recidiva(Sig.)
<b>Edad</b>	0,230
<b>Sexo</b>	0,299
<b>Tamaño</b>	0,448
<b>Localización</b>	0,018
<b>Diferenciación</b>	0,195
<b>Ganglios</b>	0,049
<b>Estadaje</b>	0,012
<b>Tratamiento</b>	0,136

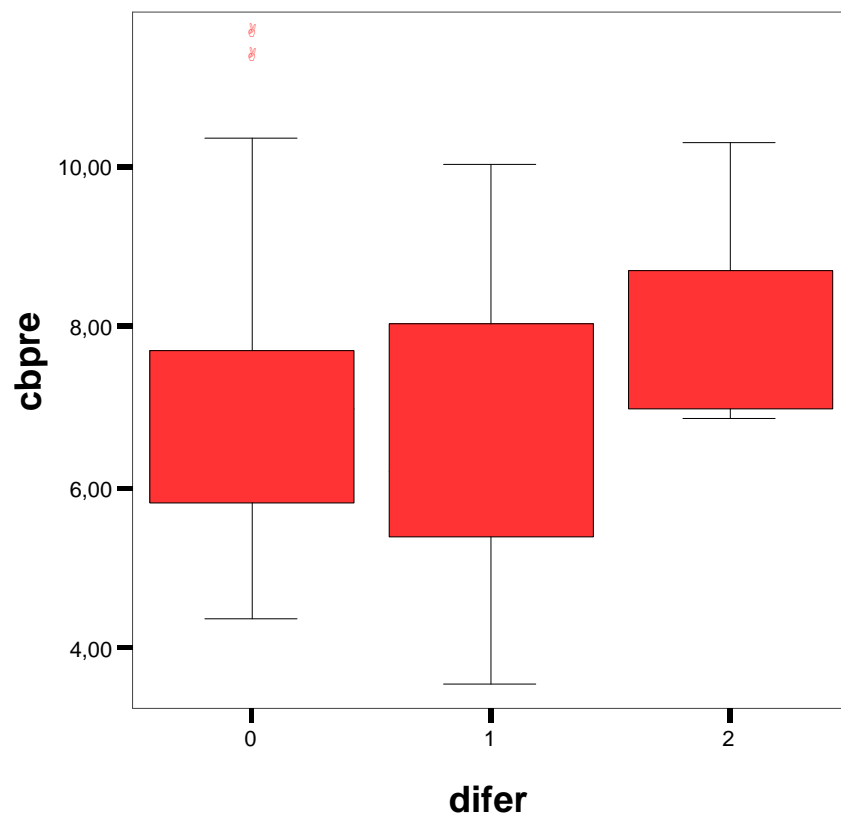
- El modelo univariante de Cox que incluyó cada una de las variables clínico-patológicas en relación con la supervivencia del enfermo con cáncer colorrectal, demostró la relación significativa de sexo ( $p=0,034$ ) y estadaje histológico ( $p=0,001$ ).

Supervivencia(Sig.)	
<b>Edad</b>	0,165
<b>Sexo</b>	0,034
<b>Estadiaje</b>	0,001
<b>Tamaño</b>	0,376
<b>Ganglios</b>	0,398
<b>Localización</b>	0,140
<b>Tratamiento</b>	0,210
<b>Diferenciación</b>	0,404

- No existió relación significativa entre valores de Catepsina B preoperatorios y tisulares respecto a las variables diferenciación, tamaño, y metastatización ganglionar.

	Diferenciación (Sig.)	Ganglios (Sig.)	Tamaño (Sig.)
<b>CatBpre</b>	0,343	0,102	0,910
<b>CatBtis</b>	0,445	0,735	0,956

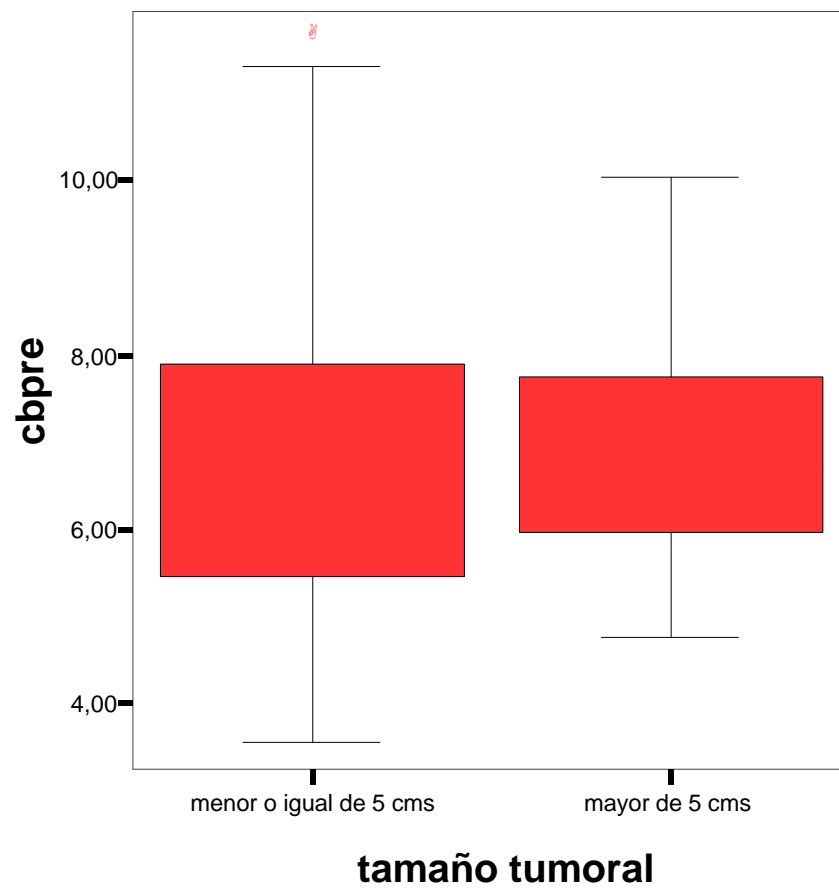
### CatBpre-diferenciación



Distribución de valores de catepsina B plasmática preoperatoria en relación a las características histológicas de diferenciación de la neoplasia colorrectal.

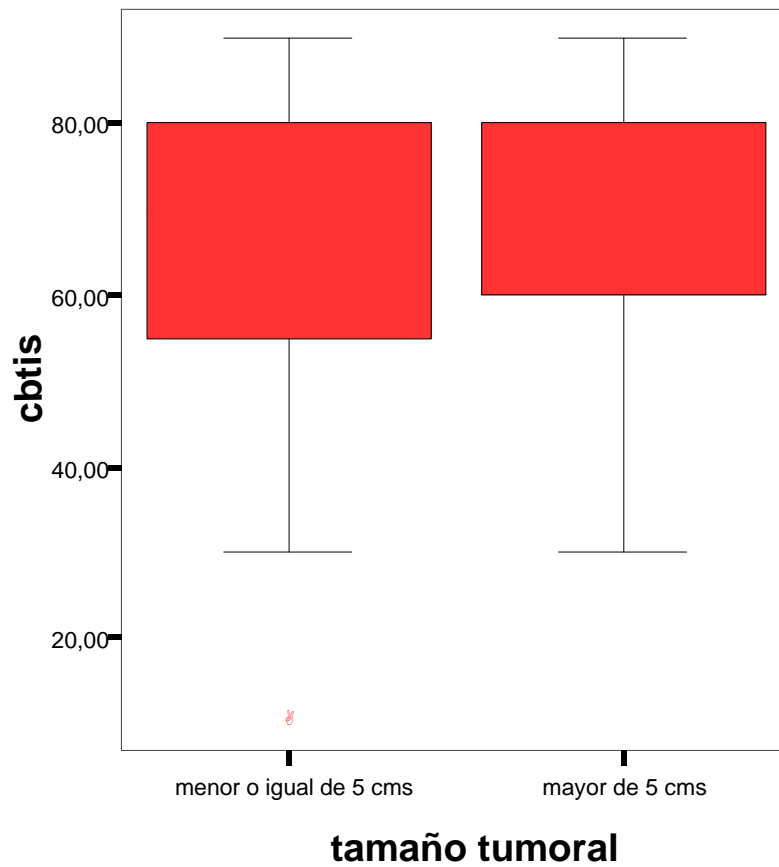


### CatBpre-tamaño



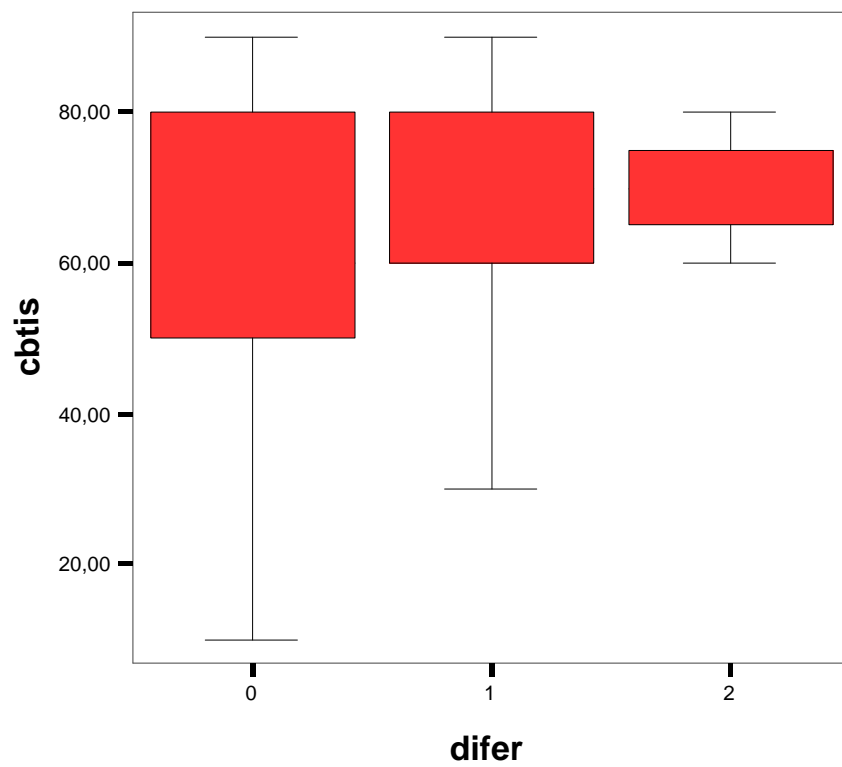
Distribución de los valores de catepsina B plasmáticos preoperatorios de acuerdo al tamaño de la neoplasia colorrectal.

### CatBtis-tamaño



Distribución de los valores de catepsina B tisulares en relación al tamaño de las neoplasias colorrectales.

## CatBtis-diferenciación

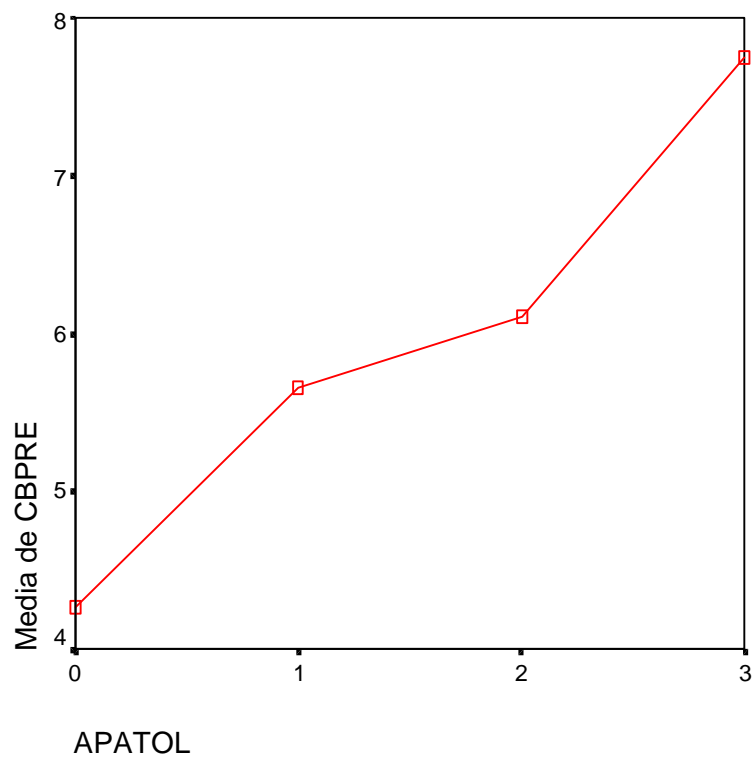


Distribución de los valores de catepsina B tisular según diferenciación de la neoplasia colorrectal.

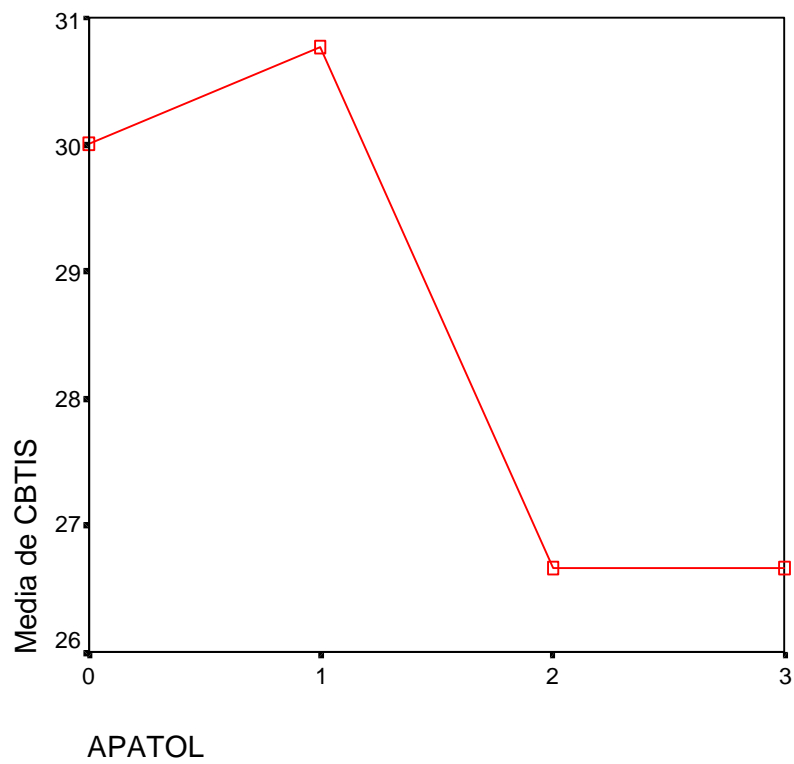
- No existe relación significativa entre valores de Catepsina B preoperatorios y tisulares y la clasificación anatomopatológica en enfermos con apendicitis aguda.

	Clasificación anatomopatológica (Sig.)
CatBpre	0,111
CatBtis	0,966

Los valores de catepsina B preoperatorios aumentaron considerablemente conforme el grado de inflamación fue mayor, aunque las diferencias en cada estadio no fueron estadísticamente significativas.



Los valores de catepsina B detectados tras estudio inmunohistoquímico de la pieza reseca no aumentaron en relación al incremento de la inflamación del apéndice ileocecal. Las diferencias entre los diferentes estadios de inflamación no fueron significativas.



- Existe una relación significativa entre los valores determinados en nuestros enfermos con cáncer colorrectal de p53 y los valores de catepsina B determinados en plasma de forma preoperatoria.

Existe relación significativa entre los valores de p53 determinados en nuestros enfermos con cáncer colorrectal y los valores determinados inmunohistoquímicamente de catepsina B.

	Sig.
<b>P53-CatBpre</b>	0,000
<b>P53-CatBtis</b>	0,001

## **DISCUSSION**



## **DISCUSIÓN**

La invasión tumoral y metastatización neoplásica colorrectal a distancia precisa de la activación de varios sistemas proteolíticos que permitan a las células neoplásicas alcanzar el torrente circulatorio a través de la membrana basal y matriz extracelular.

Los sistemas proteolíticos implicados en procesos antiadhesivos y migratorios en el proceso metastásico incluiría varias proteasas como son las metaloproteinasas, el activador del plasminogeno tipo-urokinasa ( uPA ) y las catepsinas, sobre todo la catepsina B.

La catepsina B es una cisteina proteinasa lisosómica que permite el progreso de la tumoración neoplásica directamente mediante su propia actividad lítica, o bien indirectamente mediante la degradación de inhibidores proteicos de otras proteasas, o activando proenzimas como pro-uPA ( 102, 138,139).

Una vez hemos descrito el importante papel que desempeña en la progresión maligna la catepsina B (140,141,142), hemos intentado en nuestro estudio acercarnos un poco más al verdadero valor de la catepsina B en el cáncer colorrectal.

Existen referencias en la literatura médica sobre el papel desempeñado por esta enzima, no sólo en cáncer colorrectal sino en otras patologías benignas y malignas. Nosotros hemos puesto al día estos estudios de forma que podamos aceptar o rechazar la utilización de dicha enzima ( 143-6).

La incidencia del cáncer colorrectal presenta gran variabilidad geográfica, encontrándose elevada en países como Australia, América del Norte, Nueva Zelanda y Europa, siendo la enfermedad maligna del tracto gastrointestinal más común ( 147).

Una vez realizado un tratamiento correcto de la enfermedad maligna mediante resección quirúrgica tumoral, la supervivencia alcanza cifras de hasta un 90% a los cinco años. Sin embargo si existe metastatización regional esta supervivencia a cinco años se reduce a un 58 %.

Es importante, por lo tanto, alcanzar un diagnóstico de la enfermedad maligna en estadios precoces para poder utilizar un arsenal terapéutico que nos garantice resultados satisfactorios. Por otro lado , en aquellos casos en

los que hemos realizado un tratamiento radical de la enfermedad es conveniente la detección precoz de la posible recidiva de la enfermedad colorrectal. Para ello, se realizan protocolos de seguimiento del enfermo que incluyen habitualmente controles clínicos, pruebas diagnósticas de imagen además de la utilización de marcadores tumorales.

La utilidad de muchos marcadores tumorales habitualmente utilizados en procesos neoplásicos son motivo de controversia y muchos de ellos son introducidos en la práctica clínica habitual sin un análisis riguroso, con las consecuencias que puede acarrear ante una errónea interpretación de las variaciones en los niveles de estas sustancias, además de aumentar el gasto de recursos humanos sin beneficios concretos.

Hoy en día consideramos que una elevación persistente y progresiva del CEA después del tratamiento quirúrgico en el cáncer colorrectal es sugestivo de recidiva de la enfermedad colorrectal. Sin embargo el uso de este marcador continua siendo controvertido debido a que en la mayoría de las ocasiones en las que un enfermo se encuentra en una situación similar no se benefician de una reintervención quirúrgica ( 147 ).

En la actualidad definimos a los marcadores tumorales como sustancias de características bioquímicas producidas o bien inducidas por la célula neoplásica o por el organismo huésped, que pueden ser detectadas en suero u otros líquidos biológicos, y reflejan el crecimiento y/o la actividad de la neoplasia. De esta forma podremos conocer la evolución , el pronóstico y la respuesta de la neoplasia al tratamiento empleado.

Para evaluar y utilizar con garantía un marcador tumoral deberemos estudiar su sensibilidad y especificidad.

La sensibilidad representa la capacidad del marcador de mostrarnos un resultado positivo en pacientes con diagnóstico de la enfermedad.

La especificidad representa la capacidad del marcador de mostrarnos resultados negativos cuando no existe la enfermedad.

Hoy en día no existen marcadores con una especificidad y sensibilidad del 100%, lo cual sería ideal y de gran ayuda.

Para que un marcador tumoral sea eficaz deberá reunir una serie de requisitos, como son:

- Debe ser fácilmente accesible para realizar el estudio, como las determinaciones séricas, que nos permita realizar un diagnóstico precoz.
- Deberá ser producido por una clase de células neoplásicas malignas y ser específico de esa clase celular no debiendo estar presentes en condiciones benignas.
- Deberá reflejar alteraciones que se producen en el crecimiento desordenado celular y ser detectable en una fase temprana del crecimiento tumoral ( 148 ).
- También deberá ser eficaz respecto al costo del marcador tumoral.

Hoy en día los marcadores tumorales no se utilizan como único método diagnóstico de un proceso neoplásico o en programas de diagnóstico precoz en poblaciones amplias. Son utilizados para la realización de un diagnóstico precoz en muestras de alto riesgo, como ayuda para la confirmación de una

sospecha de existencia de neoplasia, como factor pronóstico en determinados carcinomas y para monitorizar el enfermo una vez tratado.

En nuestro estudio , una vez aclarado conceptos, hemos intentado aplicar los mismos, a la catepsina B para definirlo como marcador tumoral o no.

- Al inicio de nuestro estudio, si bien no encontramos dificultades en el método de extracción de muestras sanguíneas y su conservación hasta su estudio y tampoco en la preparación histológica para el estudio inmunohistoquímico, sí aparecieron dificultades añadidas que incrementaron la laboriosidad del estudio.

En nuestro primer proyecto la determinación de los valores plasmáticos de catepsina B serían obtenidos mediante estudio de su actividad plasmática. Para ello era imprescindible la utilización del espectrofluorímetro, del cual carecíamos en nuestras instalaciones , precisando de la colaboración de la Facultad de Ciencias Químicas de nuestra ciudad.

Medíamos la fluorescencia emitida a 433nm, tras excitación a 340nm, del compuesto 7-amino 4metil-cumarina, que resulta de la hidrólisis de N-alfa CBZ-Arg-Arg 7-amido 4-metil cumarina ( sustrato ) por la acción de la catepsina B. Utilizamos como estándar 7-amino 4-metilcumarina, incluido en la matriz sérica; como blanco se utilizó esa misma matriz.

Procedimiento: 100 microlitros de suero se incuban con 890 microlitros de tampón de activación ( 0,1 M de fosfato sódico, 1mM de

DDT, 2mM de EDTA, pH 6,0 ) a 37 °C durante 10 minutos. La reacción se inicia por adición de 10 microlitros de sustrato 10mM, y se monitoriza la producción de 7-amino 4-metil-cumarina durante 10 minutos. La producción de este compuesto por unidad de tiempo representa la actividad de catepsina B en el suero.

A las dificultades que presentaba la realización de este proceso se añadieron problemas de carácter burocrático al hacer uso de material no disponible en nuestro medio habitual.

Debido a ello decidimos abandonar este proceso, y adoptar la técnica de enzimoimmunoensayo secuencial tipo "sándwich", descrita previamente, con lectura posterior de las placas mediante el lector Boehlisia.

En el proceso de determinación inmunohistoquímica, debido seguramente a la escasez o nula utilización de esta enzima en la práctica habitual clínica, nos encontramos con la necesidad de un anticuerpo puente, IgG, de conejo anticabra, utilizado como anticuerpo primario anticcatepsina B.

Ante lo expuesto es evidente que encontramos dificultades para obtener el valor de esta enzima, tanto en plasma como en el estudio inmunohistoquímico, debido seguramente a la inexistencia de estudios previos extensos y a largo plazo de esta enzima, que hubiera hecho posible la disposición de kits de catepsina B para ensayo y la aceptación de su utilización en nuestro Hospital de forma ordinaria. Esto sería deseable para un buen marcador tumoral

- Otro de los requisitos que debe cumplir un buen marcador tumoral es su producción por células neoplásicas malignas, siendo si es posible específico de esa clase celular, no debiendo aparecer en condiciones benignas.

Como hemos descrito previamente se ha relacionado continuamente a la catepsina B con procesos benignos inflamatorios ( 80-84 ), aunque escasamente a patología abdominal inflamatoria benigna.

Jochum et al ( 149 ) ,en 1999, intentaron definir el valor proteolítico destructivo que presentaba la catepsina B de los monocitos y macrófagos, junto a otras sustancias proteicas en el mecanismo patogénico de la peritonitis. Sus conclusiones hicieron referencia a que valores elevados de enzimas proteicas como la catepsina B, aislados extracelularmente se relacionaban con la aparición de fracaso multiorgánico sobre todo en enfermos con peritonitis persistente.

En nuestro estudio realizamos la determinación plasmática preoperatoria e inmunohistoquímica de catepsina B en enfermos con patología colónica inflamatoria, con el deseo de conocer el comportamiento de esta enzima en el desarrollo del proceso inflamatorio.

Decidimos que el grupo control fueran los 23 enfermos con diagnóstico de apendicitis aguda por el mecanismo patogénico inflamatorio de la enfermedad, su localización colónica y frecuencia de aparición.

Los valores de catepsina B plasmáticos en enfermos con apendicitis, (  $m= 5,74$  ) e inmunohistoquímicos, (  $m= 29,56$  ), fueron inferiores a los valores medios encontrados en patología colorrectal maligna.

La catepsina B plasmática preoperatoria en enfermos con cáncer colorrectal fue significativamente superior a los valores encontrados en enfermos con apendicitis, (  $p= 0,011$  ).

La catepsina B en la pieza de resección del cáncer colorrectal fue significativamente superior a los valores encontrados en el apéndice ileocecal, (  $p= 0,000$  ).

Uno de nuestros primeros objetivos para definir las excelencias de esta enzima estaba cumplido al encontrar valores superiores en relación a células neoplásicas colorrectales .

El éxito tampoco es completo si consideramos las referencias de la literatura médica en relación a la catepsina B y otras células neoplásicas, no siendo por lo tanto específica su producción por las células neoplásicas colorrectales ( 70, 73, 76 ).



- También quisimos demostrar si existía alteraciones en los valores determinados respecto al crecimiento desordenado del proceso neoplásico.

Para ello nos marcamos como objetivo primario el conocimiento de las variaciones de los valores de catepsina B tanto en suero como en pieza respecto a los diferentes estadios del cáncer colorrectal según Turnbull et al ( 137 ).

Las referencias que hemos encontrado en la literatura son contradictorias respecto a los valores de catepsina B determinados en la pieza de resección colorrectal.

Autores como Adenis et al ( 99 ), y Campo et al ( 100 ), consideraron que los valores inmunohistoquímicos de catepsina B eran más elevados conforme la progresión neoplásica y por lo tanto el estadio era superior.

Pero no todos los autores estaban de acuerdo con esta teoría. Shuja et al ( 95 ), y Murnane et al ( 96 ), concluyeron en sus estudios con resultados totalmente diferentes a los anteriores autores. Consideraron que los valores mayores de catepsina B en la pieza neoplásica eran superiores en estadios tempranos A y B de Dukes respecto a estadios C y D. Intentaron explicar este fenómeno

refiriéndonos al enorme papel desempeñado por la catepsina B en la invasión local con la destrucción de la membrana basal y matriz extracelular.

Sheahan et al ( 93 ), llegaron incluso a considerar que los valores inmunohistoquímicos de catepsina B estaban aumentados en el estadio A de Dukes respecto al resto de estadiaje.

Estos resultados supuestamente nos permitiría detectar el crecimiento tumoral en una etapa temprana. Sin embargo y como hemos comentado previamente nos encontramos con teorías adversas.

Hirano et al ( 92 ), encontraron valores en suero de la catepsina B más elevados en enfermos con cáncer colorrectal respecto a sujetos sanos. Estos valores fueron superiores si además presentaban estadios avanzados y presentaban metástasis a distancia respecto a estadios precoces.

En nuestros enfermos los valores inmunohistoquímicos de catepsina B no fueron significativamente superiores respecto a un estadio tumoral más avanzado (  $p= 0,823$  ).

Tampoco los valores plasmáticos de catepsina B fueron significativamente superiores en estadios más avanzados (  $p= 0,549$  ).

Ante estos resultados y la confusión reinante realizamos un reestadiaje respecto a la clasificación histológica utilizada, y agrupamos en un grupo, I, a los estadios sin afectación fuera de la

pared intestinal, A y B1, y otro grupo, II, que agrupa los estadios con afectación neoplásica fuera de la pared intestinal.

Este reagrupamiento lo realizamos por dos motivos. Por un lado con el deseo de saber si valores elevados de catepsina B se correspondían con aquellas neoplasias infraestadiadas en el grupo I con un pronóstico posterior infausto y por lo tanto podíamos detectarlas. Por otro lado con la intención de utilizar tratamiento adyuvante incluso en tumores en estadio A y B1 ante la posibilidad de que estos sean muy agresivos.

No encontramos una relación significativa entre los valores determinados en plasma y en la pieza de resección de catepsina B y los grupos de estadiaje histológico reclasificados (  $p= 0,219$  y  $p=0,972$  respectivamente ). Quizás sea conveniente incluir un mayor número de enfermos en estadio I con el fin de llevar a cabo la teoría previamente planteada.

- La utilización de reactivos de ensayo sérico para catepsina B para la determinación fluorimétrica dispararon desde el inicio el presupuesto de nuestro estudio. El coste de los reactivos fue:
  - 7 amino 4 methyl coumarin, ( 6330 ptas.).
  - N-alfa-CBZ- Arg-Arg-7 amido-4 methyl coumarin, ( 2×4570 ptas. ).
  - Ditioneitol, ( 2×5800 ptas.).
  - EDTA disódico, ( 3510 ptas. ).

El precio del kit de ensayo para la determinación plasmática de catepsina B fue de 162.500 ptas.

El coste de la determinación inmunohistoquímica de la catepsina B fue de 83.246 ptas. Además fue preciso un anticuerpo de unión que permitiera la unión específica del anticuerpo policlonado de origen caprino con el grupo carboxilo de la cadena pesada de la catepsina B, ( 50.000 ptas. )

Las determinaciones de CEA, CA 19.9 y p53 se encuentran aceptadas para su determinación de forma ordinaria en el Departamento de Bioquímica y Servicio de Anatomía Patológica de nuestro Hospital.

Los precios encontrados en los kits de ensayo son elevados, ya que habitualmente son sólo utilizados en proyectos de investigación y no en la práctica habitual, sobre todo si tenemos en cuenta los resultados obtenidos. Estudios con mayor número de enfermos y seguimiento a largo plazo serán necesarios para poder confirmar los resultados encontrados en nuestro estudio y hacer común su utilización en nuestra labor diaria.

Los resultados y análisis hasta ahora obtenidos no permiten constituir a la catepsina B como un marcador del cáncer colorrectal ideal. Debido a ello intentamos conocer su valor como marcador pronóstico y su papel en el proceso metastásico con la intención de poder utilizar nuevos métodos terapéuticos.

- En nuestro estudio la catepsina B tanto plasmática como inmunohistoquímica, fue incapaz de forma significativa de relacionarse con la recidiva de la enfermedad maligna una vez tratada quirúrgicamente (  $p=0,118$  y  $p= 0,399$  ).

Sin embargo y a pesar de que los valores determinados inmunohistoquímicamente de catepsina B no se relacionaron con la supervivencia del enfermo con cáncer colorrectal (  $p=0,209$  ), sí existió una relación significativa (  $0,020$  ), entre los valores plasmáticos preoperatorios de catepsina B y supervivencia del enfermo.

Esto nos ha permitido definir a la catepsina B como un buen marcador pronóstico independientemente de las variables clínico-patológicas habitualmente estudiadas.

Nuestro intento de comparar su valor pronóstico con otros marcadores tumorales más aceptados como son CEA, CA 19,9 y p53, tuvo resultados variables.

Son escasas las referencias en la literatura que utilizan conjuntamente algunos de estas moléculas biológicas en el cáncer colorrectal ( 122 ).

En nuestro estudio el valor preoperatorio de CEA sí se relacionó con la supervivencia del enfermo (  $p= 0,001$  ) de forma independiente al resto de las variables estudiadas y en un modelo conjunto en el que incluimos parámetros preoperatorios como fueron CEA, CA 19,9 y catepsina B (  $p= 0,002$  ).

Valores preoperatorios de Catepsina B en enfermos con cáncer colorrectal de 5,47 ng/ml y superiores permiten pronosticar la mortalidad de un enfermo con cáncer colorrectal con una sensibilidad de hasta el 92,3%. Por otro lado hemos encontrado que la determinación de valores preoperatorios de CEA de 9,59 ng/ml y superiores permiten pronosticar la mortalidad de un enfermo con cáncer colorrectal con una especificidad del 85,7%. Por lo tanto la utilización de ambos parámetros de forma preoperatoria en enfermos con cáncer colorrectal nos permitirá conseguir valores de sensibilidad y especificidad aceptables respecto a la población respecto a la mortalidad de la población estudiada.

La expresión de la proteína p53 se encontraba relacionada de forma significativa con la recidiva de la enfermedad colorrectal tras tratamiento quirúrgico (  $p= 0,048$  ), como variable independiente y dentro de un método multivariante (  $p= 0,042$  ).

A la transformación neoplásica debido a la pérdida genética del brazo corto del cromosoma 17, se le unirá el papel desempeñado en el

desarrollo del proceso metastásico ante los resultados obtenidos en nuestro estudio que relacionaban la expresión de p53 con valores de catepsina B plasmáticos e inmunohistoquímicos (  $p= 0,000$  y  $p= 0,001$ , respectivamente ).

- En definitiva, y a pesar de que los porcentajes de supervivencia mejoran cada año, actualmente el 40% de los enfermos con diagnóstico de cáncer colorrectal fallecen por su enfermedad. El abordaje a esta enfermedad debe ser multidisciplinario y debemos ser optimistas ante las nuevas terapias genéticas e inmunológicas que se están desarrollando con el deseo de controlar de forma óptima la enfermedad.

Uno de estos métodos terapéuticos se basa en el conocimiento profundo del proceso metastásico y el papel desempeñado por la catepsina B en dicho proceso ( 110 ), y consiste en un inhibidor bifuncional diseñado a partir de la inserción en las cistatinas de una secuencia del receptor del activador del plasminogeno ( uPAR ). De esta forma se inhibirá por un lado el sistema proteolítico desarrollado por la catepsina B y por otro el desarrollado por el activador del plasminogeno ( uPA ).



## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

- Los valores de catepsina B determinados en plasma preoperatoriamente en enfermos con diagnóstico de cáncer colorrectal (  $m=6,94$  ), difieren significativamente de los valores de catepsina B determinados en enfermos con diagnóstico de apendicitis aguda (  $m=5,74$  ), (  $p= 0,011$  ).
- Los valores de catepsina B determinados mediante estudio inmunohistoquímico en el carcinoma colorrectal resecado (  $m= 66,9$  ), difieren significativamente de los valores de catepsina B determinados en el apéndice ileocecal resecado (  $m= 29,56$  ), (  $p= 0,000$  ).
- Los valores de catepsina B serológicos determinados preoperatoriamente en enfermos con diagnóstico de cancer colorrectal no son más elevados en relación a un estadio tumoral más avanzado (  $p= 0,549$  ).

- Los valores de catepsina B determinados inmunohistoquímicamente en el cáncer colorrectal no son superiores en relación a un estadio tumoral más avanzado (  $p= 0,823$  ).
- No existe relación entre valores de catepsina B plasmáticos preoperatorios y recidiva de la enfermedad maligna (  $p= 0,118$  ).
- No existe relación entre los valores determinados inunohistoquímicamente en el cáncer colorrectal y la aparición de recidiva de la enfermedad maligna tras tratamiento con carácter curativo (  $p= 0,319$  ).
- Los valores preoperatorios serológicos de catepsina B se relacionan intensamente con la disminución de la supervivencia de los enfermos con cáncer colorrectal (  $p= 0,020$  ); esto justificaría su utilización como factor pronóstico independiente de los factores clinico-patológicos habitualmente utilizados.
- Los valores de catepsina B determinados inmunohistoquímicamente no se relacionan con la disminución de la supervivencia y por lo tanto peor pronóstico de los enfermos con cáncer colorrectal (  $p= 0,209$  ).

## **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Corman ML, editor. Colon & Rectal Surgery, 4<sup>th</sup> ed.  
Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. p.625-732
  
- 2.-Midis GP, Feig BW. Cancer of the Colon, Rectum and Anus. En: Feig BW, Berger DH, Fuhrman GM editors. The M.D. Anderson Surgical Oncology Handbook, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins;1999.p. 178-222.
  
- 3.- Cubo T, Padilla D, Ortega G, Ramia JM, Pardo R, Martín J et al.  
Biología molecular del proceso metastásico del cáncer colorrectal.  
Cir Esp 2000; 68: 577-587.
  
- 4.- Lledó Matoses S, editor. Cirugía Colorrectal.  
Madrid: Arán ediciones; 2000. p. 249-254
  
- 5.- Fearon ER, Vogelstein B.  
A genetic model for colorectal tumorigenesis.  
Cell 1990; 61: 759-67.
  
- 6.- Iniesta P, de Juan C, Caldes T, Vega FJ, Massa MJ, Cerdán FJ, et al. Genetic abnormalities and microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Detect Prev 1998; 22(5): 383-95.
- 7.- Rosen N. Cancer of the gastrointestinal tract. En: De Vita V,Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. Cáncer principles and practice of oncology, 5<sup>a</sup> ed. Filadelfia: Lippincott-Raven, 1997; 971-78.
  
- 8.- Remvikos Y, Tominaga O, Hammael P, Laurent-Puig P, Salmon RJ, Dutrillaux B et al.  
Increased p53 protein content of colorectal tumors correlates with poor survival.

Br J Cancer 1992; 66: 758-64.

9.- Sun FX, Carstensen JM, Zhang H, Stal O, Ningren S, Hatschek T et al. Prognostic significance of cytoplasmic p53 oncoprotein in colorectal adenocarcinoma.

Lancet 1992; 340: 1369-73.

10.- Bosari S, Giuseppe V, Bossi P, Maggioni M, Coggi G, Murray JJ et al. Cytoplasmic accumulation of p53 protein: An independent prognostic indicator in colorectal adenocarcinoma.

J Natl Cancer Inst 1994; 86: 681-87.

11.- Jernvall P.

Morphological and genetic abnormalities in prediction of recurrence in radically operated colorectal cancer.

Anticancer Res 1999; 19(2): 1357-62.

12.- Caldes T, Iniesta P, Vega FJ, De Juan C, López JA, Diaz-Rubio E et al.

Comparative survival analysis of p53 gene mutations and protein accumulation in colorectal cancer.

Oncology 1998; 55: 249-57.

13.- Kressner U.

Prognostic value of p53 genetic changes in colorectal cancer.

J Clin Oncol 1999; 17(2): 593-9.

14.- Folkman J.

Tumor angiogenesis: therapeutic implications.

N Engl J Med 1971; 285: 1182-6.

15.- Folkman J.

What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?

Natl Cancer Inst 1990; 82: 4-6.

16.- Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG.

Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation.

Cell 1991; 64: 327-36.

17.- Cockerill GW, Gamble JR, Vadas MA.

Angiogenesis: models and modulators.

Int Rev Cytol 1995; 159: 113-160.

18.- Folkman J. Tumor angiogenesis. In: Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA, eds. The molecular basis of cancer. Philadelphia: WB. Saunders, 1995: 206-32.

19.- Böhle AS, Kalthoff H.

Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis.

Langenbeck's Arch Surg 1999; 384: 133-40.

20.- Hanahan D, Folkman J.

Patterns and emerging mechanisms of the angiogenesis switch during tumorigenesis

Cell 1996; 86: 353-64.

21.- Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins.

Endocr Rev 1992; 13: 18-32.

22.- Leung DW.

The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA.

Mol Endocrinol 1991; 5: 1806-14.

23.- Park JE, Keller GA, Ferrara N .

The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of ECM- bound VEGF.

Mol Biol Cell 1993; 4: 1317-26.

24.- Millauer R, Wizigmann-Voss S, Schnürch H, Martinez R, Moller NP, Risau W et al.

High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis.

Cell 1993, 72: 835-46.

25.- Shibaya M.

Role of VEGF-FLT receptor system in normal and tumoral angiogenesis.

Adv Cancer Res 1995, 67: 281-316.

26.- Beck L, D'Amore PA.

Vascular development cellular and molecular regulation.

FASEB J 1997; 11: 365-73.

27.- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C et al.

Angiopoietin-2, a natural antagonist for tie 2 that disrupts in vivo angiogenesis.

Science 1997; 277: 55-60.

28.- Holash J, Mainsopierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D et al.

Vessel cooption, regression and growth in tumors mediated by angiopoiteins and VEGF.



Science 1999; 284: 1994-98.

29.- Seghezzi G, Patel S, Ren CS, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES et al.

Fibroblast growth factor-2(FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: An autocrine mechanism contributing to angiogenesis.

J Cell Biol 1998; 141(7): 1659-73.

30.- Moenner M, Gusse M, Hatzl E, Badet J.

The widespread expression of angiogenin in different human cells suggest a biological function not only related to angiogenesis.

Eur J Biochem 1994; 226: 483-90.

31.- Kim TS, Kim YB.

Correlation between expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and angiogenesis in colorectal adenocarcinoma.

J Korean Med Sci 1999 ;14 (3):263-70.

32.- Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G et al.

Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels.

Cell 1994;79(7):1157-64.

33- Eliceiri BP, Cheresh DA.

The role of alphav integrins during angiogenesis.

Mod Mde 1998;4(12):741-50.

34.- Raugi GJ, Mumby SM, Abbott-Brown D, Bornstein P.

Thrombospondin: synthesis and secretion by cells in culture.

J Cell Biol 1982;95(1):351-4.

35.- Bussolino F, Mantovani A, Persico G.

Molecular mechanisms of blood vessel formation.

Trends Biochem Sci 1997;22(7):251-6.

36.- O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J.

Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice.

Nat Med 1996; 2(6):689-92.

37.-O'Really MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS et al. Endostatin:an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth.

Cell 1997; 88(2):277-85.

38.-Gofuku J, Shiozaki H, Tsujinaka T, Inoue M, Tamura S, Doki Y et al.

Expression of E-cadherin and alpha-catenin in patients with colorectal carcinoma. Correlation with cancer invasion and metastasis.

Am J Clin Pathol 1999; 111(1):29-37.

39.- Dorudi S, Sheffield JP, Poulson R, Northover JM, Hart IR.

E-cadherin expression in colorectal cancer.An immunocytochemical and in situ hybridization study.

Am J Pathol 1993;142(4):981-6.

40.- Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava EM, Kosma MV. Reduced expression of alpha catenin is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma.

J Clin Pathol 1999;52(1):10-6.

41.- Karatzas G, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Chatzgianni E, Papanikolaou S, Riza F et al.

E-cadherin expression correlates with tumor differentiation in colorectal cancer.

Hepatogastroenterology 1999;46(25):232-5.

42.- Liotta LA, Abe S, Robey PG, Martin GR.

Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor.

Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76 (5): 2268-72.

43.- Yu AE, Hewitt RE, Connor EW, Stetler-Stevenson WG.

Matrix metalloproteinases. Novel targets for directed cancer therapy.

Drugs & Aging 1997; 11 (3): 229-244.

44.- Seiki M.

Membrane type-matrix metalloproteinase and tumor invasion. Curr Top Microbiol Immunol 1996; 213: 23-32.

45.- Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E et al.

A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. Nature 1994; 370: 61-65.

46.- Will H, Hinzmann B.

cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment.

Eur J Biochem 1995; 231: 602-608.

47.- Parsons SL, Watson SA, Brown PD, Collins HM, Steele RJC.

Matrix metalloproteinases.

Br J Surg 1997; 84: 160-166.

48.- McDonnell S, Chaudhry V, Mansilla-Soto J, Zeng ZS, Shu WP, Guillem JG.

Metastatic and non-metastatic colorectal cancer cells induce host metalloproteinase production in vivo.

Clin Exp Metastasis 1999; 17(4): 341-49.

49.- Zeng ZS, Guillem JG.

Unique activation of matrix metalloproteinase-9 within human liver metastasis from colorectal cancer.

Br J Cancer 1998; 78(3): 349-53.

50.- Zeng ZS, Guillem JG.

Distinct pattern of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 mRNA expression in human colorectal cancer and liver metastasis.

Br J Cancer 1995;72(3):575-82.

51.- Zeng ZS, Guillem JG.

Colocalisation of matrix metalloproteinase-9-mRNA and protein in human colorectal cancer stromal cells.

Br J Cancer 1996; 74(8):1161-7.

52.- Swallow CJ, Murray MP, Guillem JG.

Metastatic colorectal cancer cells induce matrix metalloproteinase release by human monocytes.

Clin Exp Metastasis 1996; 14(1): 3-11.

53.- Zeng ZS, Cohen AM, Guillem JG.

Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis.

Carcinogenesis 1999; 20(5): 749-55.

54.- Zeng ZS, Huang Y, Cohen AM, Guillem JG.

Prediction of colorectal cancer relapse and survival via tissue RNA levels of matrix metalloproteinase-9.

J Clin Oncol 1996; 14(12):3133-40.

55.- Karakiulakis G, Papanikolaou C, Jankovic SM, Aletras A, Papakonstantinou E, Vretou E, Mirtsou-Fidani V.

Increased type IV collagen-degrading activity in metastases originating from primary tumors of the human colon.

Invasion Metastasis 1997; 17(3): 158-68.

56.- Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F, Hinoda Y, Okada Y, Imai K.

Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers.

Gut 1999; 45(2): 252-8.

57.- Mori M, Barnard GF, Mimori K, Ueo H, Akiyoshi T, Sugimachi K. Overexpression of matrix metalloproteinase-7 mRNA in human colon carcinomas.

Cancer 1995;75:1516-19.

58.- Murray G, Duncan M, O'neil P, Melvin W, Fothergill J.

Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer.

Nature Medicine 1996; 2:461-62.

59.- Sanchez-Rovira P, Jimenez E, Carracedo J, Barneto IC, Ramirez R, Aranda E.

Serum levels of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in patients with colorectal cancer: inhibitory effect on cytotoxicity.

Eur J Cancer 1998;34(3):394-8.

60.- Velikova G, Banks RE, Gearing A, Hemingway I, Forbes MA, Preston SR et al.

Serum concentrations of soluble adhesion molecules in patients with colorectal cancer.

Br J Cancer 1998;77(11):1857-63.

61.- Wittig BM, Kaulen H, Thees R, Schmitt C, Knolle P, Stock J et al. Elevated serum E-selectin in patients with liver metastases of colorectal cancer.

Eur J Cancer 1996; 32(7):1215-8.

62.- Brodt P, Fallavollita L, Bresalier RS, Meterissian S, Norton CR, Woltzky BA.

Liver endothelial E-selectin mediates carcinoma cell adhesion and promotes liver metastasis.

Int J cancer 1997; 71(4):612-9.

63.- Hoff SD, Matsushita Y, Ota DM, Cleary KR, Yamori T, Hakomori S et al. Increased expression of sialyl-dimeric LeX antigen in liver metastases of human colorectal carcinoma.

Cancer Res 1989;49:6883-8.

64.- Schwartz MK.

Tissue cathepsins as tumor markers.

Clinica Chimica Acta 1995;237:67-68.

65.- Gonzalez-Vela MC, Garijo MF, Fernández F, Buelta L, Val-Bernal JF. Cathepsin D in host stromal cells is associated with more highly vascular and aggressive invasive breast carcinoma.

Histopathology 1999; 34 :35-42.

66.- Tumminello FM, Gebbia N, Pizzolanti G, Ruso A, Bazan V, Leto G. Cathepsin D content in colorectal cancer.

Oncology 1995;52 :237-242.

67.- Valentín AM, Pirrelli M, Armentano R, Caruso ML.

The immunohistochemical expresión of cathepsin D in colorectal cancer.

Anticancer Research 1996; 16: 77-80.

68.- Mayer A, Fritz E, Fortelny R, Kofler K, Ludwig H.

Inmunohistochemical evaluation of cathepsin D expression in colorectal cancer.

Cancer Investigation 1997; 15: 106-110.

69.- Peláez Buján MC, Ruibal Morell A, Aza González J.

Comportamiento biológico de los receptores de estrógenos, receptores de progesterona y catepsina D en el adenocarcinoma gástrico.

Cir Esp 1999; 65: 91-95.

70.- Watanabe M, Higashi T, Hashimoto M, Tomoda I, Tominaga S, Hashimoto M et al.

Elevation of tissue cathepsin B and L activities in gastric cancer. Hepato-gastroenterol 1987; 4:120-122.

71.- Watanabe M, Higashi T, Watanabe A, Osawa T, Sato Y, Kimura Y et al. Cathepsin B and L activities in gastric cancer tissue: correlation with histological findings.

Biochem Med Metabol Biol 1989; 42 :21-29.

72.- Farinati F, Herszényi L, Plebani M, Carraro P, De Paoli M, Cardin R, et al.

Increased levels of cathepsin B and L, urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type-1 as an early event in gastric carcinogenesis.

Carcinogenesis 1996; 17: 2581-2587.

73.- Krepela E, Vicar J, Cernoch V.

Cathepsin B in human breast tumor tissue and cancer cells.

Neoplasma 1989; 36: 41-52.

74.- Lah TT, Calef G, Kalman E, Shinde BG, Russo J, Jarosz D et al. Cathepsins D, B and L in breast carcinoma and in transformed human breast epithelial cells ( HBEC ).

Biol Chem Hoppe-Seyler 1995; 376: 357-63.

75.- Rempel SA, Rosenblum ML, Mikkelsen T, Yan P-S, Ellis KD, Golembieski WA et al.

Cathepsin B expression and localization in glioma progression and invasion.

Cancer Res 1994; 54: 6027-31.

76.- Frohlich E, Schaumburg-Lever S, Klessen C.

Immunocytochemical and immunoelectron microscopic demonstration of cathepsin B in human malignant melanoma.

Br J Dermatol 1995; 132: 867-875.

77.- Sinha AA, Wilson MJ, Gleason DF, Reddy PK, Sameni M, Sloane BF. Immunohistochemical localization of cathepsin B in neoplastic human prostate.

Prostate 1995; 26: 171-8.

78.- Frosch BA, Berquin I, Emmert-Buck MR, Moin K, Sloane BF.

Molecular regulation, membrane association and secretion of tumor cathepsin B.

APMIS 1999; 107: 28-37.

79.- Jung K, Friedrich B, Türk I, Roigas J, Lein M, Schnorr D et al.

Cathepsin B, H, L and cysteine proteinase inhibitors in renal cell carcinoma: no evidence for dysregulated proteolytic balance.

J Cancer Res Clin Oncol 1998; 124: 60-61.



80.- Greenberger NJ, Toskes PP, Isselbacher KI. Pancreatitis aguda y crónica. En : Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martín JB, Fauci AS, Kasper DL editores. Harrison, Principios de Medicina Interna, 13ª ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España. 1994; p. 1748-1762.

81.- Keyszer G, Lambiri I, Keysser M, Keysser C, Nagel R, Buemester GR et al .

Matrix metalloproteinases, but not cathepsins B, H and L or their inhibitors in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis are potentially useful markers of disease activity.

Z Rheumatol 1998; 57 (6): 392-398.

82.- Esser RE, Watts LM, Angel RA, Thornburg LP, Prior JJ, Palmer JT.

The effects of fluoromethyl ketone inhibitors of cathepsin B on adjuvant induced arthritis.

J Rheumatol 1993; 20: 1176-83.

83.- Kennet CN, Cox SW Eley BM.

Ultrastructural localization of cathepsin B in gingival tissue from chronic periodontitis patients.

Histochem J 1997; 29: 727-34.

84.- Lesser M, Padilla ML, Cardozo C.

Induction of emphysema in hamster by intratracheal instillation of cathepsin B.

Am Rev Respir Dis 1992; 145: 661-8.

85.- Maciewicz RA, Wardale RJ, Etherington DJ, Paraskeva C. Immunodetection of cathepsins B and L present in and secreted from human pre-malignant and malignant colorectal tumour cell lines.

Int J Cancer 1989; 43: 478-486.

86.- Rozhin J, Sameni M, Ziegler G, Sloane BF.

Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells.

Cancer Research 1994; 54: 6517-6525.

87.- Van der Stappen JWJ, Williams AC, Maciewicz RA, Paraskeva C. Activation of cathepsin B, secreted by a colorectal cancer cell line requires low pH and is mediated by cathepsin D.

Int J Cancer 1996; 67: 547-554.

88.- Kobayashi H, Manfred S, Goretzki L, Chucholowski N, Calvete J, Kramer M et al.

Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator ( Pro-uPA)\*.

J Biol Chem 1991; 15: 5147-5152.

89.- Corticchiato O, Cajot JF, Abrahamson M, Chan SJ, Keppler D.

Cystatin C and Cathepsin B in human colon carcinoma: expresión by cell lines and matriz degradation.

Int J Cancer 1992; 52: 645-652.

90.- DufeK V, Jirásek V, Král V, Matous B, Drazná E.

Changes in serum cathepsin B-like activity in patients with colorectal cancer.

Neoplasma 1985; 3251-54.

91.- Kólar Z, Krepela E, Kovarík J, Kohoutek M, Rypka M, Vicar J.

Clinical experience with the testing of serum proteinase activity by cathepsin B-like sensitive amino acid derivatives of 7 –amino- 4-methylcoumarine.

Neoplasma 1987; 34: 601-608.

92 .- Hirano T, Manabe T, Takeuchi S.

Serum Cathepsin B levels and urinary excretion of cathepsin B in the cancer patients with remote metastasis.

Cancer Letters 1993 ; 70 :41-44.

93.- Sheahan K, Shuja S, Murnane MJ.

Cysteina protease activities and tumor development in human colorectal carcinoma.

Cancer research 1989; 49: 3809-3814.

94.- Hirai K.

Expression of cathepsin B and cystatin C in human colorectal cancer.

Hum Pathol 1999; 30 (6):680-686.

95.- Shuja S, Sheahan K, Murnane MJ.

Cysteine endopeptidase activity levels in normal human tissues, colorectal adenomas and carcinomas.

Int J Cancer 1991; 49: 341-346.

96.- Murnane MJ, Sheahan K, Ozdemirli M, Shuja S.

Stage-specific increases in Cathepsin B messenger RNA content in human colorectal carcinoma.

Cancer Research 1991, 51: 1137-1142.

97.- Kim K, Cai J, Shuja S, Kuo T, Murnane MJ.

Presence of activated ras correlates with increased cysteine proteinase activities in human colorectal carcinomas.

Int J Cancer( Pred Oncol). 1998; 79: 324-333.

98.-Khan A, Path MRC, Krishna M, et al.

Cathepsin B and tumor-associated laminin expression in the progression of colorectal adenoma to carcinoma.

Mod Pathol 1998; 11 ( 8 ): 704-708.

99.- Adenis A, Huet G, Zerimech F, Hecquet B, Balduyck M, Peyrat JP.

Cathepsin B, L, and D activities in colorectal carcinomas: relationship with clinicopathological parameters.

Cancer Letters 1995; 96:267-275.

100.- Campo E, Muñoz J, Miquel R, Palacín A, Cardesa A, Sloane BF et al.

Cathepsin B expression in colorectal carcinomas correlates with tumour progression and shortened patient survival.

American Journal of Pathology 1994; 145 (2):301-309.

101.- Nanashima A, Tagawa Y, Nakagoe T, Nishizawa-Takano J-E, Hatano K, Uchikawa T, Matsumoto Y et al.

Relationship between morphological diversity and AgNORs or cathepsin B expresión in colorectal cancers.

J Gastroenterol 1996; 31: 646-653.

102.- Herszényi L, Plebani M, Carraro P, De Paoli M, Roveroni G, Cardin M et al.

The role of cysteine and serine proteases in colorectal carcinoma.

Cancer 1999; 86 : 1135-1142.

103.- Herszenyi L, Farinati F, Plebani M, Istvan G, Sapi Z, Carraro P et al. The role of cathepsins and plasminogen activator/inhibitor system in colorectal cancer.

Orv Hetil 1999; 140: 1833-6.

104.- McKerrow JH, Bhargava V, Hansell E, Huling S, Kuwahara T, Matley M et al.

A functional proteomics screen of proteases in colorectal carcinoma.

Mol Med 2000; 6: 450-460.

105.- De stefanis D, Demoz D, Dragonetti A, Hourii JJ, Ogier-Denis E, codogno P et al.

Differentiation-induced changes in the content, secretion, and subcellular distribution of lysosomal cathepsins in the human colon cancer HT-29 cell line.

Cell Tissue Res 1997; 289: 109-117.

106.- Hazen LG, Bleeker FE, Lauritzen B, Bahns S, Song J, Jonker A et al. Comparative localization of cathepsin B protein and activity in colorectal cancer.

J Histochem Cytochem 2000; 48: 1421-1430.

107.- Satoh Y, Higashi T, Nouse K, Shiota T, Kinugasa N, Yoshida K et al.  
Cathepsin B in the growth of colorectal cancer: suppressive effect of leupeptin  
on the growth of DMH-induced rat colon neoplasm.

Acta Med Okayama 1996; 50: 299-303.

108.- VanNoorden CJF, Jonges TGN, Van Marle J, Bissell ER, Griffini P, Jans  
M et al.

Heterogeneous suppression of experimentally induced colon cancer metastasis  
in rat liver lobes by inhibition of extracellular cathepsin B.

Clin Exp Metastasis 1998; 16: 159-167.

109.- Lee HS, Lee KJ.

Cathepsin B inhibitory peptides derived from beta-casein.

Peptides 2000; 21:807-9.

110.- Muehlenweg B, Assfalg-Machleidt I, Gil Parrado S, Bürgle M, Creutzburg  
S, Schmitt M et al.

A novel type of bifunctional inhibitor directed against proteolytic activity and  
receptor/ligand interaction.

J Biol Chem 2000; 43 33562-33566.

111.- Gold P, Freedman SO.

Demonstration of tumor specific antigens in human colon carcinoma by  
immunologic tolerance and adsorptive technique.

J Exp Med 1965; 121: 439-462.

112.- American Society of Clinical Oncology.

Clinical Practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal  
cancer.

J Clin Oncology 1996; 14: 2843-2877.

113.- Grem J.

The prognostic importance of tumor markers in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract.

Curr Op Oncol 1997; 9: 380-387.

114.- Carriquiry LA, Piñeyro A.

Should carcinoembryonic antigen be used in the management of patients with colorectal cancer?

Dis Colon Rectum 1999; 42: 921-929.

115.- Park YJ, Youk EG, Choi HS, Han SU, Park KJ, Lee KU et al.

Experience of 1446 rectal cancer patients in Korea and analysis of prognostic factors.

Int J Colorect Dis 1999; 14 : 101-106.

116.- Hohenberger P, Schlag PM, Gerneth T, Herfarth C.

Pre- and postoperative carcinoembryonic antigen determinations in hepatic resection for colorectal metastases. Predictive value and implications for adjuvant treatment based on multivariate analysis.

Annals of surgery 1994; 219: 135-143.

117.- Wang JY, Tang R, Chiang JM.

Value of carcinoembryonic antigen in the management of colorectal cancer.

Dis Colon Rectum 1994; 37: 272-277.

118.-Vallejo Lamíquiz A, Loizate Totiricagüena A, Domínguez Merru-Urrutia MJ.

Elevación preoperatoria de CEA, CA 19.9 y CA50 en los estadios irresecables del cáncer colorrectal.

Rev Esp Enferm Digest 1998; 73: 323-324.

119.- Alvarez JA, Marín J, Jover JM, Fernández R, Fradejas J, Moreno M et al.  
Sensitivity of monoclonal antibodies to carcinoembryonic antigen, tissue polypeptide antigen, alpha-fetoprotein, carbohydrate antigen 19-9 in the diagnosis of colorectal adenocarcinoma.

Dis Colon Rectum 1995; 38 : 535-542.

120.- Van der Schow YT, Verbeek ALM, Wobbes Th, Segers MFG, Thomas CMG.

Comparison of four serum tumour markers in the diagnosis of colorectal carcinoma.

Br J Cancer 1992; 66: 148-154.

121.-Plebani M, De Paoli M, Basso D, Roveroni G, Giacomini A, Galeotti F et al

Serum tumor markers in colorectal cancer staging, grading, and follow-up.

J Surg Oncol 1996; 62: 239-244.

122.- Kos J, Nielsen H-J, Krasovec M, Christensen IJ, Cimerman N, Stephens RW et al.

Prognostic values of cathepsin B and carcinoembryonic antigen in sera of patients with colorectal cancer.

Clin Cancer Res 1998; 4: 1511-1516.



- 123.- Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D, Fuhrer P.  
Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies.  
Somatic Cell Mol Genet 1979; 5: 957-972.
- 124.- Forones NM, Tanaka M.  
CEA and CA 19.9 as a prognostic indexes in colorectal cancer.  
Hepato-Gastroenterology 1999; 46: 905-908.
- 125.- Filella X, Molina R, Grau JJ, Piqué M, García-Valdecasas JC, Astudillo E  
et al.  
Prognostic value of CA 19.9 levels in colorectal cancer.  
Ann Surg 1992; 216: 55-59.
- 126.- Díez M, Cerdán FJ, Pollán M, Maestro ML, Ortega MD, Martínez S et al.  
Prognostic significance of preoperative serum CA19.9 assay in patients with  
colorectal carcinoma.  
Anticancer Res 1994; 14: 2819-2826.
- 127.- Tsavaris N, Vonorta K, Tsoutsos H, Kozatsani-Halividi D, Mylonakis N,  
Papagrigoriou D et al.  
Carcinoembryonic antigen ( CEA ),  $\alpha$ -fetoproteina, CA 19.9 and CA 125 in  
advanced colorectal cancer ( ACC).  
Int J Biol Markers 1993; 8: 88-93.
- 128.- Takano Y, Saegusa M, Ikenaga M, Mitomi H, Okayasu I.  
Apoptosis of colon cancer: comparison with Ki 67 proliferative activity and  
expression .  
J Cancer Res Clin Oncol 1996;122; 166-70.

129.- Hirota S, Hosobe S, Ikeda M, Kobayashi T, Himori M, Takemoto Y et al.  
Ki 67 and p53 immunoreactive stain and early colorectal neoplasms.  
J Exp Ther Oncol 1996; 1: 317-21.

130.- Sato T, Nishimura G, Fushida S, Fujimura T, Yonemura Y, Nonomura A et al.  
Evaluation of p53, Ki-67 and DNA ploidy in both primary rectal carcinomas and locally recurrent tumors.  
Oncol Rep 1998; 5: 1225-9.

131.- Forones NM, Oshima C, Nanogaki S, Tanaka M, Barbosa V.  
Determination of proliferative activity using Ki-67 and expression of p53 in colorectal cancer.  
Arq Gastroenterol 1999; 36: 122-6.

132.- Ioachim EE, Goussia AC, Machera M, Tsianos EV, Kappas AM, Agnantis NJ.  
Immunohistochemical evaluation of cathepsin D expression in colorectal tumours: a correlation with extracellular matrix components, p53, pRb, bcl-2, c-erbB-2, EGFR and proliferation indices.  
Anticancer Res 1999; 19: 2147-55.

133.- Ioachim E, Goussia A, Agnantis NJ.  
Glycoprotein CD 44 expression in colorectal neoplasms. An immunohistochemical study including correlation with cathepsin D, extracellular matrix components, p53, Rb, bcl-2, c-erbB-2, EGFR and proliferation indices.  
Virchows Arch 1999; 434: 45-50.

134.- Wu GS, Saffig P, Peters C, El-Deiry WS.

Potential role for cathepsin D in p53-dependent tumor suppression and chemosensitivity.

Oncogene 1998; 16; 2177-83.

135.- Takahashi H, Mitomi H, Igarashi M, Katsumata T, Okayasu Y.

Markedly elevated cell turnover is characteristic of small, deeply invasive carcinomas of the colorectum.

Cancer 1999; 85: 796-802.

136.- Akpolat I, Baris YS, Yilmaz AF, Bakirtas M, Saylik A, Karagoz F, Kandemir B.

Cathepsin B, p53 expression and AgNORs in transitional cell carcinoma.

Neoplasm 1998; 45: 365-8.

137 .- Staniunas RJ, Schoertz DJ,Jr. Ablación extensa del carcinoma colorectal. Murria JJ,editor. En: Clinicas Quirúrgicas de Norteamérica.

México,DF: McGraw-Hill, Inc. 1993. p133-146.

138 .- Yan S, Sameni M, Sloane BF.

Cathepsin B and human tumor progression.

Biol Chem 1998; 379 : 113-23.

139.- Mort JS, Buttle DJ.

Cathepsin B.

Int J Biochem Cell Biol 1997; 29: 715-720.

140.- Keppler D, Sloane BF.

Cathepsin B: multiple enzyme forms from a single gene and relation to cancer.

Enzyme Proteine 1996; 49: 94-105.

141.- Keppler D, Sameni M, Moin K, Mikkelsen, Diglio CA, Sloane BF.  
Tumor progression and angiogenesis: cathepsin B&Co.  
Biochem Cell Biol 1996; 74: 799-810.

142.- Satoh Y, Higashi T, Nouse K, Shiota T, Kinugasa N, Yoshida K et al.  
Cathepsin B in the growth of colorectal cancer.  
Acta Med Okayama 1996; 50: 305-11.

143.- Kos J, Werle B, Lah T, Brunner N.  
Cysteine proteinases and their inhibitors in extracellular fluids: markers for  
diagnosis and prognosis in cancer.  
Int J Biol Markers.

144.- Herszenyi L, Plebani M, Carraro P, De Paoli M, Roveroni G, Cardin R et  
al.  
Proteases in gastrointestinal neoplastic diseases.  
Clin Chim Acta 2000; 15; 291: 171-87.

145.- Amiguet JA, Jimenez J, Monreal JI, Hernández MJ, López-Vivanco G,  
Vidan JR et al.  
Serum proteolytic activities and antiproteases in human colorectal carcinoma.  
J Physiol Biochem 1998; 54: 9-13.

146.- del RE EC, Shuja S, Cai J, Murnane MJ.  
Alterations in cathepsin H activity and protein patterns in human colorectal  
carcinomas.  
Br J Cancer 2000; 82: 1317-26.

147.- Wu JS, Fazio VW.

Colon cancer.

Dis Colon Rectum 2000; 43: 1743-1486.

148.- Bland KI, Copeland III EM, editores.

La Mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas.

Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A. 1993. p 1207-1220.

149.- Jochum M, Billing AG, Frohlich D, Schildberg FW, Machleidt W, Cheronis JC et al.

Proteolytic destruction of functional proteins by phagocytes in human peritonitis.

Eur J Clin Invest 1999; 29: 246-55.