



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

Escola de Doctorat

TESIS DOCTORAL:

EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO COMO FACTOR PRONÓSTICO EN PACIENTES CON NEOPLASIA DE RECTO TRATADOS CON RADIOTERAPIA PREOPERATORIA

AUTORA:

María Aránzazu Eraso Urién

DIRECTORES:

Dr. Jordi Giralt López de Sagredo

Dra. Inés de Torres Ramírez

Dr. Ferran Guedea Edo

Programa de Doctorado en Medicina Interna

Facultad de Medicina. Departamento de Medicina

Barcelona, 2015

Jordi Giral López de Sagredo e Inés de Torres Ramírez.

Profesores titulares del Departamento de Medicina de la UAB

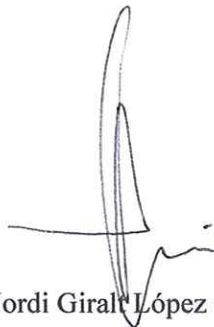
Ferran Guedea Edo.

Profesor titular del Departamento de medicina de la UB

INFORMAN

Que la tesis titulada “EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO COMO FACTOR PRONÓSTICO EN PACIENTES CON NEOPLASIA DE RECTO TRATADOS CON RADIOTERAPIA PREOPERATORIA” realizada por María Aránzazu Eraso Urién ha sido llevada a cabo en el Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) bajo su dirección y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para que la interesada opte al grado de Doctor.

Barcelona, 27 de Octubre de 2015



Dr. Jordi Giral López de Sagredo



Dra. Inés de Torres Ramírez



Dr. Ferran Guedea Edo

Para Juan el amor de mi vida.

A mi pequeña hija, Edurne, de seis años, gracias por existir, eres mi milagro, cada día me enseñas cosas y me haces recordar lo que fui.

A la memoria de mi madre que estaría orgullosa de mi en estos momentos, te echo de menos cada día.

Para mi familia por estar ahí en todo momento.

A la memoria de todos los pacientes con cáncer.

AGRADECIMIENTOS

Han pasado unos cuantos años desde que inicie la aventura de escribir esta tesis. Durante este recorrido ha habido personas que han estado ahí y sin ellas esta tesis no hubiera sido posible. A ellos dedico estas palabras:

A mis directores de Tesis, Dr. Jordi Giralt López de Sagredo y a la Dra. Inés de Torres por hacer posible esta investigación, sin su apoyo no hubiera puesto en marcha este proyecto ni lo hubiera llevado a cabo. Gracias por vuestro rigor científico.

A mi Co- director, Dr. Ferran Guedea Edo por transmitirme la emoción de lo que esto significaba para mi, Gracias Ferran, por hacer fácil lo que lo es difícil.

A Cristian Tebe del Servei d'Assessoria en Estadística Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL) por su ayuda en el análisis estadístico de los datos.

A Montse Ventura por creer en mi en todo momento, me ha dado la fuerza para seguir en los momentos difíciles.

A todos aquellos amigos y compañeros, unos profesionales de la medicina y otros no, gracias por estar ahí cuando os he necesitado y ayudarme a finalizar este puzzle.

En especial, a los pacientes que de forma altruista han participado en esta investigación.

Finalmente a mi familia, por su apoyo incondicional.

ABREVIATURAS

aPK:	Proteínas quinasa atípicas
AR:	Anfirregulina
BTC:	Betacelulina
CDK:	Quinasas dependientes de ciclina
DAG:	1,2-diacilglicerol
DFS:	Supervivencia libre de enfermedad
EGFR :	Receptor del factor de crecimiento epidérmico.
ePK:	Proteínas quinasa eucariotas.
EGF:	factor de crecimiento epidérmico
ECM:	Matriz extracelular
EPG:	Epígeno
EPR:	Epirregulina
GFs:	Factores de crecimiento
Grb2	Growth factor receptor-bound protein2
Grb7	Growth factor receptor-bound protein7
HB-EGF:	Factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina
IHQ:	Técnica de inmunohistoquímica
LVI:	Invasión linfovascular
MAPK:	Mitogen-Activated Protein Kinases, proteína quinasa activadas por mitógenos)
MAPKKs:	Proteína quinasa activadas por <i>mitogen-activated protein kinase kinases</i>)
MAPKKKs:	Proteína quinasa activadas por <i>mitogen-activated protein kinase kinase kinases</i>
Nrg-1/2/3/4:	Neuregulina-1/2/3/4
NRGs:	Neuregulinas
OS:	Supervivencia Global
PI3K:	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PIP2:	fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PLC y PLA:	fosfolipasas C y A
PNI:	Invasión perineural
RC/pRC:	Respuesta completa/ respuesta completa patológica
RP:	Repuesta parcial
RPKs:	Receptores de membrana con actividad proteína-quinasa
SH1:	Src-homologo-1 del EGFR
SH2:	Src-homologo-2 del EGFR
STATs:	Signal transducers and activators of transcription
TAM:	Macrófagos Asociados al Tumor
TGF-α:	Factor de crecimiento transformador alfa
TME:	Exéresis mesorrectal total
TRG:	Grado de regresión tumoral

INDICE

INDICE	11
INTRODUCCIÓN	17
1. FAMILIA DE ERBB DE RECEPTORES CON ACTIVIDAD PROTEÍNA QUINASAS	21
QUE SON LAS PROTEÍNAS QUINASAS (RPKS)	21
MIEMBROS DE FAMILIA DE RECEPTORES CON ACTIVIDAD TIROSINA QUINASA	22
ESTRUCTURA DE RTKS	23
FAMILIA DE RECEPTORES ERBB I (FAMILIA DE RECEPTOR DE EGF) Y SUS LIGANDOS	24
2. RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO. BIOLOGÍA DE EGFR	29
IDENTIFICACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO Y DEL EGFR.	29
PROTO-ONCOGEN	33
ESTRUCTURA MOLECULAR DEL EGFR	34
UNIÓN DE LIGANDOS AL EGFR Y FORMACIÓN DE HOMO/ HETERODÍMEROS CON EGFR	39
ACTIVACIÓN DE LA TIROSINA QUINASA	40
SEÑALES INTRACELULARES	41
EFFECTO BIOLÓGICO DE LA ACTIVACIÓN DEL EGFR	45
3. EGFR Y CÁNCER	46
EXPRESIÓN EN TUMORES SÓLIDOS	46
EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN	46
EXPRESIÓN DE EGFR Y PRONÓSTICO TUMORAL	53
4. EFECTOS BIOLÓGICOS DEL EGFR EN CÁNCER	55
CARACTERÍSTICAS DE LA CÉLULA TUMORAL	55
EFFECTOS O CONSECUENCIAS DE LA ALTERACIÓN DE EGFR O SUS VÍAS	56
5. EGFR Y RADIOTERAPIA	68
6. BLOQUEO EGFR Y RADIOTERAPIA	70
7. TUMORES DE RECTO	71
EPIDEMIOLOGIA	71
ANATOMÍA PATOLÓGICA	74
DIAGNÓSTICO Y ESTADIO	74

RESPUESTA A TRATAMIENTO PREOPERATORIO Y PRONÓSTICO	76
NEOPLASIA DE RECTO LOCALIZADO, ESTADIO PRECOZ. ESTADIO I	79
ESTADIO INTERMEDIO (ESTADIO II-III RESECABLES)	80
PAPEL DE LA RADIOTERAPIA EN ESTADIO INTERMEDIO O LOCALMENTE AVANZADO DE NEOPLASIA DE RECTO	81
TIMING DE LA CIRUGÍA TRAS NEADYUVANCIA	82
ESQUEMAS DE RADIOTERAPIA PREOPERATORIA	84
RADIOTERAPIA PREOPERATORIA ESQUEMA CORTO VS CIRUGÍA SOLA.	84
RADIOTERAPIA PREOPERATORIA ESQUEMA LARGO.	87
EL PAPEL DE LA QUIMIOTERAPIA ADYUVANTE TRAS RADIOTERAPIA O RADIOQUIMIOTERAPIA PREOPERATORIA	90
8. EGFR Y TUMORES RECTO	91
EXPRESIÓN DEL EGFR EN TUMORES DE RECTO Y VALOR PRONÓSTICO	91
INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	93
MUTACIÓN EGFRVIII DEL RECEPTOR	93
<u>JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS</u>	95
PRIMER Y SEGUNDO ESTUDIO	97
TERCER ESTUDIO	98
<u>OBJETIVOS</u>	99
PRIMER ESTUDIO	101
OBJETIVO PRIMARIO	101
OBJETIVOS SECUNDARIOS	101
SEGUNDO ESTUDIO	101
OBJETIVO PRIMARIO	101
OBJETIVOS SECUNDARIOS	102
TERCER ESTUDIO	102
OBJETIVOS PRIMARIOS	102
OBJETIVOS SECUNDARIOS	102
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	105

1. PACIENTES. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	107
2. TRATAMIENTO	109
RADIOTERAPIA CON O SIN QUIMIOTERAPIA NEADYUVANTE	109
3. DETERMINACIÓN DE EGFR	110
TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA	110
SISTEMA DE SCORING	111
4. SEGUIMIENTO	114
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	114
PRIMER ESTUDIO	114
SEGUNDO ESTUDIO	115
TERCER ESTUDIO	116
<u>RESULTADOS</u>	<u>119</u>
1. PRIMER ESTUDIO	121
2. SEGUNDO ESTUDIO	124
ANÁLISIS DESCRIPTIVO	124
EGFR COMO FACTOR PREDICTIVO DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO PREOPERATORIO EN CÁNCER DE RECTO.	125
EGFR COMO FACTOR PRONÓSTICO TRAS TRATAMIENTO PREOPERATORIO EN CÁNCER DE RECTO.	126
3. TERCER ESTUDIO	129
ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECIDIVA LOCAL / METÁSTASIS / LIBRE DE ENFERMEDAD / GLOBAL:	131
ASOCIACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE EGFR TUMOR PRE-TRATAMIENTO Y RECIDIVA LOCAL / METÁSTASIS:	133
ACUERDO ENTRE LA EXPRESIÓN DE EGFR TUMOR PRE Y POST TRATAMIENTO	134
ANÁLISIS DE LA INTENSIDAD Y LA EXTENSIÓN EGFR TUMOR PRETRATAMIENTO	136
ANÁLISIS DE LA RESPUESTA EN FUNCIÓN DE EGFR EN TUMOR PRE TRATAMIENTO	138
<u>DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.</u>	<u>141</u>
VALOR PREDICTIVO DE RESPUESTA	144
EGFR Y FACTOR PRONÓSTICO	146

CUAL ES LA MEJOR MANERA DE ANALIZAR EL EGFR	149
1. ES EGFR UN FACTOR PREDICTIVO DE RESPUESTA O UN FACTOR PRONÓSTICO?	149
2. ¿CONSIDERAMOS EL EGFR COMO UN MARCADOR POSITIVO O NEGATIVO, COMO SERÍA EL CASO DE LOS RECEPTORES HORMONALES EN CÁNCER DE MAMA QUE SI EXPRESA EL 1% LO CONSIDERAMOS POSITIVO O COMO OTROS MARCADORES CUANTITATIVOS MEDIDOS POR INMUNOHISTOQUÍMICA COMO EL K167, CON LO QUE HARÍA PENDIENTE DEFINIR EL PUNTO DE CORTE?.	150
3. DE QUÉ MANERA LA HETEROGENEIDAD DEL TUMOR PUEDE AFECTAR A LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE EGFR.	150
NUEVO ENDPOINT SUBROGADO	152
CAMBIO DE LA EXPRESIÓN	153
PROPUESTAS DE FUTURO	154
LIMITACIONES DEL ESTUDIO	159
RESULTADOS VARIABLES	161
TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA. ANTICUERPO MONOCLONAL UTILIZADO	161
CONCLUSIONES	163
ANEXOS	167
BIBLIOGRAFÍA	183

INTRODUCCIÓN

En tumores localmente avanzado de recto, la recidiva loco-regional sigue siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad. Hasta la introducción del TEM la tasa de recurrencias locales era del 30% en los pacientes tratados quirúrgicamente¹. En 2001, el ensayo alemán² demostró que la radioterapia preoperatoria reduce de forma significativa la tasa de recidiva pélvica a los 3 años del 10,1% al 3,4%. El metaanálisis del Colorectal Cancer Collaborative Group con 19 ensayos aleatorios que incluyen radioterapia preoperatoria demuestra ganancia en la supervivencia global de un 3% a los 5 años³. Sin embargo, a pesar de estas investigaciones clínicas, sigue habiendo una necesidad de desarrollar nuevas estrategias de tratamiento en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado debido a la de progresión en forma de metástasis.

Por otro lado, las últimas dos décadas han supuesto un importante avance en el conocimiento de los principios básicos de la génesis y progresión del cáncer. Se han identificados muchas anomalías moleculares que son la clave del cáncer, las cuales conducen a una transformación maligna de la célula normal.

La identificación de las vías bioquímicas y moleculares que diferencian las células tumores de las células sanas ha permitido plantearse el desarrollo de nuevos agentes para mejorar el pronóstico en pacientes con tumores sólidos. Una de las características de dichas moléculas, a diferencia de los tratamientos tradicionales, es su especificidad, discriminan entre células tumorales y células sanas, con lo que se consigue un alto índice terapéutico y menor toxicidad.

El que una célula sana se transforme, es decir, pase de un estado quiescente a un estado de proliferación activa, depende de señales mitogénicas de factores de crecimiento. Estas señales son transmitidas al interior de la célula a través de receptores de membrana. El crecimiento y la progresión tumoral depende

de la actividad de dichos receptores de membrana que controlan las vías intracelulares y señales de transducción que regulan la proliferación celular, apoptosis, angiogénesis, adhesión y movilidad. Uno de los receptores de membrana más conocido y estudiado es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el cual juega un papel importante en el crecimiento y en la supervivencia de muchos tumores sólidos.

Los avances en la comprensión de la biología molecular del cáncer de recto han abierto muchas nuevas direcciones de investigación. Un esfuerzo cada vez mayor se ha orientado hacia el desarrollo de terapias moleculares específicas, o bien a la búsqueda de marcadores moleculares que son útiles tanto en la predicción de los resultados del tratamiento o en la selección de pacientes para determinadas terapias moleculares específicas, basadas en las características del tumor en particular.

A lo largo de este trabajo desarrollare el posible papel del EGFR, uno de los receptores de membrana más conocido e implicados en cáncer, como marcador pronóstico (control local y supervivencia) y/o predictivo de respuesta a radioterapia. Así como si hay alguna relación entre el cambio de la expresión de EGFR con Radioterapia y supervivencia.

1. FAMILIA DE ErbB DE RECEPTORES CON ACTIVIDAD PROTEÍNA QUINASAS

Los receptores de la familia ErbB son una subclase de receptores de membrana celular con actividad tirosina quinasa. Los ligandos que se unen al receptor son factores de crecimiento. El EGFR pertenece a una de estas familias, en concreto a las de clase I, RTK clase I (Familia de receptor de EGF) que luego describiré con más detalle.

Que son las Proteínas quinasas (PKs)

Las proteínas quinasas son las enzimas mediadoras de la transmisión de señales extracelulares al interior de la célula para el control de la diferenciación y proliferación celular. Múltiples enfermedades donde se incluye cáncer, diabetes, enfermedades autoinmunes, cardiovasculares, inflamatorias, y del sistema nervioso presentan alteraciones de dichas enzimas.

La función de las proteínas quinasas es la fosforilación de residuos de aminoácidos específicos, es decir, se encargan de añadir un grupo fosfato. Los principales sitios de fosforilación de estas quinasas son el grupo alcoholico de la serina y treonina o de la tirosina.

La reacción que cataliza la transferencia del fosfato de ATP al grupo hidroxilo de las de la proteínas (tirosinas) es la siguiente⁴:



En base a la naturaleza del grupo hidroxilo (–OH) fosforilado, estas enzimas se clasifican en proteínas serina/ treoninas quinasas y proteínas tirosina quinasas.

Hunter⁵ identificó 518 genes de proteínas quinasas en humanos (478 proteínas quinasa eucariotas, ePK y 40 atípicas, aPK) que corresponden al 1.7%

del genoma humano. La familia de los receptores de membrana con actividad quinasa incluye 385 proteínas serina/ treonina quinasa, 90 proteínas tirosina quinasa, y 43 proteínas tirosina quinasa like. De las 90 proteínas tirosina quinasa, 58 son receptores de membrana y 32 son quinasa no-receptores. Hay un tercer grupo de proteínas quinasa que son capaces de catalizar la fosforilación de ambos residuos (serina/ treonina y tirosina). Estas enzimas, son similares a las quinasa serina/treonina, y se clasifican en este grupo, son llamadas de especificidad dual⁶. La relación de proteínas fosfoserina/ fosfotreonina/ fosfotirosina/ dual en células animales normales es 3000/300/1.

Las proteínas serina/treonina quinasa se encargan de la fosforilación de proteínas exógenas, una molécula de proteína quinasa es capaz de fosforilar a muchas proteínas lo que se denomina como amplificación, a diferencia de las proteínas tirosina quinasa que no se suelen asociar a este fenómeno. Las proteínas tirosina quinasa sufren autofosforilación y catalizan la fosforilación de pocas moléculas de sustratos exógenos.

El EGFR pertenece a esta familia de tirosina quinasa. En células que expresan EGFR estas pueden ser estimuladas por el factor de crecimiento epidérmico u otros factores de crecimiento. El propio receptor estimulado produce la síntesis de fosfotirosinas. La proteína tirosina fosfato resultante sirve como lugar de anclaje para las moléculas que transmiten cascada de señales, que a menudo incluyen la activación de las quinasa proteínas quinasa serina/treonina.

Miembros de familia de receptores con actividad tirosina quinasa

Se han identificado varios tipos de RTK⁷, entre los más relevantes se encuentran: RTK clase I (Familia de receptor de EGF), RTK clase II (Familia de receptor de insulina), RTK clase III (familia del receptor de PDGF), RTK clase IV (familia del receptor de FGF), RTK clase V (familia del receptor de

VEGF), RTK clase VI (familia del receptor de HGF), RTK clase VII (familia del receptor de Trk), RTK clase IX (familia del receptor de AXL), RTK clase X (familia del receptor de LTK), RTK clase XI (familia del receptor de TIE), RTK clase XII (familia del receptor de ROR), RTK clase XIII (familia del receptor de DDR), RTK clase XV (familia del receptor de KLG), RTK clase XVI (familia del receptor de RYK), RTK clase XVII (familia del receptor de MuSK).

Estructura de RTKs

La mayoría de los RTKs tienen una estructura similar, son receptores transmembrana monoméricos, es decir con una única subunidad. En algunos casos, como es el del receptor de la insulina, son complejos multiméricos.

Cada monómero está formado por 3 regiones, un dominio transmembrana, hidrófobo, compuesto por 25-38 aminoácidos, una región extracelular N-Terminal y una región intracelular C-terminal.

La **región extracelular N-terminal** contiene unos dominios que son el lugar de unión con el ligando. Los dominios son característicos de cada subfamilia de RTKs y exhiben una variedad de elementos constantes los dominios inmunoglobulina (Ig)-like o factor de crecimiento epidérmico (EGF)-like, que son repeticiones de fibronectina tipo III o regiones ricas en cisteína.

La **región intracelular C-terminal** está formada por los dominios catalíticos, son los responsables de la actividad quinasa del receptor, la cual se encarga de la fosforilación del mismo⁸.

La unión del ligando al receptor induce a su dimerización, la activación de la actividad tirosina quinasa intrínseca y la transfosforilación de los monómeros dimerizados. La fosforilación activa el dominio catalítico del receptor y permite el acceso de sustratos y ATP al dominio catalítico. Además, los residuos

de fosfotirosina en el dominio no catalítico del receptor crean sitios de unión trans para proteínas adaptadoras como Gab-1, Sch, y Grb-2 que poseen la homología Src (SH) de dominio, mas adelante se describe todo este proceso con mas detalle.

Familia de receptores ErbB I (Familia de receptor de EGF) y sus ligandos

Todas las proteínas del receptor erbB pertenecen a la subclase I de la superfamilia de receptores de RTKs, y se clasifican según su homología de secuencia y la organización del dominio.

Los receptores erbB se expresan en la mayor parte de las células que se originan tanto en el mesodermo como en el ectodermo, es decir en una variedad de tejidos epiteliales, origen mesenquimal, y neuronales, donde juegan un papel fundamental en procesos del desarrollo, proliferación y diferenciación.

La familia erbB esta constituida por cuatro tipos de receptores transmembrana: erbB1, también llamado EGFR o HER1, erbB2 (HER2 o Neu), erbB3 (HER3), y erbB4 (HER4).

Ligandos de los receptores erbB

La activación de los receptores de ErbB se lleva a cabo por la unión de los ligandos o factores de crecimiento. Cada uno de estos factores son el producto de un único gen y sirve como agonista específico de los receptores ErbB. Los ligandos son pequeñas proteínas solubles de entre 6–10 kDa que comparte un fragmento de tipo EGF con tres enlaces disulfuro generados por la colocación constante de seis residuos de cisteína).

La mayoría de los ligandos de receptores de la familia erbB se sintetizan como precursores transmembrana que pueden ser escindidos proteolíticamente para

liberar la forma soluble del péptido o pueden funcionar como ligandos anclados a la membrana como ocurre en la señalización yuxtacrina^{9,10, 11,12,13}

Los péptidos comparten un dominio homólogo que comprende 50 aminoácidos. La característica sobresaliente de este dominio es la región similar a EGF o EGF-homóloga, que se requiere para la unión y activación erbB. La expresión y procesamiento de los precursores de los ligandos están muy regulados, en parte por las conexiones horizontales extensas con otros moduladores y los sistemas de señalización

Cada factor de crecimiento es específico para su receptor, la especificidad de cada factor de crecimiento se muestra en la siguiente *Tabla 1*¹⁴.

Tabla 1. Especificidad de cada ligando por los distintos receptores

Ligando	Receptor			
	ErbB-1	ErbB-2	ErbB-3	ErbB-4
EGF	+	-	-	-
TGF- α	+	-	-	-
HB-EGF	+	-	-	+
Anfirregulina	+	-	-	-
Betacelulina	+	-	-	+
Epigeno	+	-	-	-
Epiregulina	+	-	-	+
Neuregulina-1	-	-	+	+
Neuregulina-2	-	-	+	+
Neuregulina-3	-	-	-	+
Neuregulina-4	-	-	-	+

Los ligandos erbB conocidos son 11 y se han clasificado en 3 grupos en función del receptor al cual se unen según la siguiente *Figura 1*.

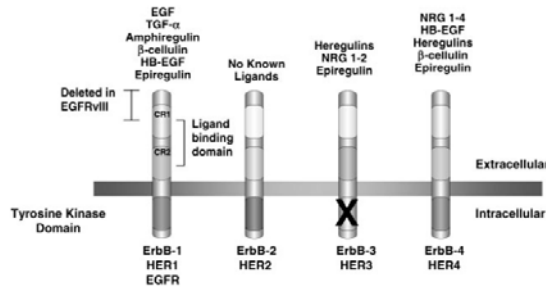


Figura 1. Los ligandos *erbB* y sus receptores. Al grupo 1 (HER1) se unen 7 ligandos: EGR, EPG, TGF- alfa, AR, BTC, HB-EGF, EPR. Al grupo 2 (HER2): no se conocen ligandos. Al grupo 3 (HER3): Nrg-1/2. Al grupo 4 (HER4): Nrg-1/2/3/4.

Primer grupo de ligandos: Se une exclusivamente a *erbB1*. Formado por el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformador alfa (TGF- α) y anfirregulina (también llamada factor de crecimiento derivado de schwannoma). Las formas de EGF y TGF- α unidas a la membrana pueden interactuar con receptores de la superficie de las células adyacentes, con lo que potencialmente contribuyen a la adherencia célula a célula e interacciones estimuladoras entre célula y célula.

El segundo grupo está representado por el factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina (HB-EGF), betacelulina, y epregulina. HB-EGF y betacelulina se unen y activan a dos receptores, el *erbB1* y el *erbB4*. La epregulina tiene afinidad por todos los receptores excepto *erbB2*^{15, 16}.

El tercer grupo está formado por una familia compleja de polipeptidos llamados heregulinas o neuregulinas (NRGs). Las neuregulinas se unen directamente a *ErbB3* y / o *ErbB4*. Neuregulina-1 and neuregulina-2 se unen a ambos receptores, mientras que neuregulina-3 and neuregulina-4 se unen solo a *ErbB4*. Las diferentes isoformas de NRG tienen afinidades diferentes por los distintos receptores heterodímeros, lo que conduce a respuestas biológicas

diferentes pero superpuestas⁵¹. Las Neuregulinas inducen la formación de homodímeros ErbB3/ErbB3 o ErbB4/ErbB4 y heterodímeros ErbB2/ErbB3 o ErbB2/ErbB4¹⁷. No se han identificado ligandos solubles para receptores ErbB2. La función del receptor ErbB2 es como co-receptor de ErbB1, ErbB3 and ErbB4. Esta preferencia por heterodimerización dentro de la familia de receptores ErbB explica las señales ErbB2 en ausencia de un ligando conocido.

El receptor se puede activar por unión directa de un ligando según hemos visto, además los 4 miembros de la familia ErbB forman 28 homo y heterodímeros, y que estos dímeros se unen a los ligandos dando formas activas. Hay que tener en cuenta que ErbB2–ErbB2 y ErbB3–ErbB3 son inactivos, son 26 posibles combinaciones de receptores diméricos activos.

A estos dímeros también se unen los ligandos, es decir que la combinación de 11 ligandos y 28 dímeros da lugar a 614 combinaciones de complejo ligando receptor y 611 complejos ligando receptor activados (excluyendo ErbB2–ErbB2, que no tiene ligando y ErbB3–ErbB3 que carece de actividad quinasas).

Los receptores *erbB*

ErbB 1

Su principal función es regular el crecimiento y diferenciación celular, la alteración en su funcionamiento puede llevar a crecimiento tumoral. Como se ha explicado en el apartado previo, a ErbB 1 se unen el EGF y el TGF- α . Excepto las NRGs, todos los ligandos se unen a él produciendo efectos mitogénicos en las células. Su sobreexpresión o disfunción conllevan a una alteración de las vías de MAPK (mitogen-activated protein kinase) y PI3K (phosphatidylinositide-3-kinase). Estas vías cuando se activan traducen proteínas necesarias para el ciclo celular, ciclinas, que permiten el paso de fase

G1 a la fase S o la fosforilación de las proteínas antiapoptóticas que conducen a la supervivencia celular.

ErbB2

Similar a su homólogo erbB1. Fue el Segundo en descubrirse tras el erbB1. No hay ligandos conocidos para este receptor. El erbB2 forma heterodímeros con el erbB1, este descubrimiento llevó a pensar que la interacción de los ligandos con erbB2 influía en la heterodimerización de erbB2 con otros receptores erbB. Estudios posteriores demostraron que erbB3 y erbB4 podían formar heterodímeros con erbB2.

Cada vez hay más evidencia de que la función principal de erbB2 es como un socio de dimerización o co-receptor para todos los demás miembros de la familia erbB, y que es importante en la potenciación de la señalización mediada por erbB.

ErbB3 and erbB4

ErbB3 (HER3) and erbB4 (HER4) se consideran como miembros de la familia ErbB por que su estructura es similar, aunque se conoce muy poco sobre su función.

ErbB3 carece de actividad quinasa y es activado por la tirosinas quinasas de otros receptores. Los heterodímeros formados con erbB3 y erbB4 activan preferentemente la vía de supervivencia PI3K en relación con otros tipos de heterodímeros.

2. RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO. BIOLOGÍA DE EGFR

Identificación del Factor de Crecimiento Epidérmico y del EGFR.

Identificación del Factor de Crecimiento Epidérmico murino (EGFm)

El estudio sobre la familia de receptores con actividad quinasa (ErbB/ HER) donde se incluye el EGFR, fue iniciado en 1962 por Stanley Cohen (*Figura 2*), el cual recibió posteriormente el premio Nobel en 1986.



Figura 2. Stanley Cohen

Stanley Cohen durante la investigación sobre el factor de crecimiento neuronal (NGF) detectado en glándulas submaxilares de ratón, observó¹⁸ que cuando se inyectaba en ratas recién nacidas preparaciones en crudo de glándulas submaxilares, se producía un efecto inesperado, no relacionado con el NGF. Estos efectos consistían en apertura precoz de los ojos en 6-7 días comparado con 12-14 días para los controles y erupción dentaria precoz, 5-6 días comparado con 8-10 días para los controles. En 1962, S. Cohen aisló¹⁹ de glándulas salivares murinas, una pequeña proteína de aproximadamente 15000 daltons que era responsable de estos hechos y que paso a denominarse inicialmente “factor diente-parpado” y posteriormente fue renombrado como EGF porque estimulaba la proliferación de células epiteliales. En este experimento, inyectó diariamente en ratas 1 µg de proteína activa por 1 mg de peso corporal. El examen histológico del grupo control y el de los animales tratados con EGF (*Figura 3*) reveló²⁰ que la separación precoz de los ojos era consecuencia de un efecto biológico generalizado que conducía a crecimiento epidérmico y de queratinización.

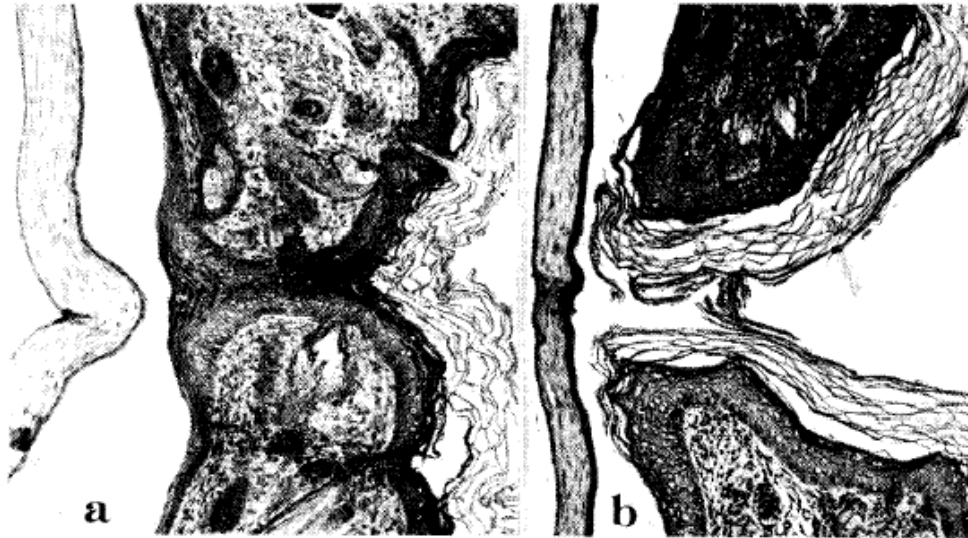


Figura 3. Imagen a: Sección del área de control de los párpados y sección b: experimental, en ratas de 8 días de vida. El grupo de animales experimental recibió inyecciones diaria de la proteína activa X100 (1 μ g por 1 mg) (reprinted de *Journal of Investigative Dermatology* (1963) 40, 1-5.)

En estos momentos se desconocía si este factor actuaba directamente sobre células epiteliales o era un mecanismo indirecto. Es a partir de la realización de técnicas de cultivos de tejido y órganos en 1965 cuando se ve que actúa²¹ sobre células epidérmicas por lo que pasa a denominarse EGF. Estos estudios demuestran que el EGF estimula directamente la proliferación de células epidérmicas en cultivos de piel de embrión de pollo uniéndose de forma específica con un receptor de membrana²² y a nivel práctico la aplicación tópica de EGF aceleraba la re-epitelización corneal en heridas corneales en conejos.

Caracterización del EGFm e identificación de su homólogo humano.

En 1972 se desarrolló²³ un procedimiento que permitió purificar EGF de glándulas submaxilares murinas (mEGF) y determinar la secuencia de aminoácidos del EGF. Taylor reportó²⁴ las características fisicoquímicas de mEGF, el peso molecular era de 6100, constituido por una única cadena polipeptídica. El análisis de los aminoácidos de mEGF reveló que estaba formado por 53 residuos polipeptídicos que carecía de alanina, fenil-alanina y lisina. La Figura 4 muestra la secuencia primaria²⁵ de mEGF y la posición²⁶ de las tres uniones disulfido.

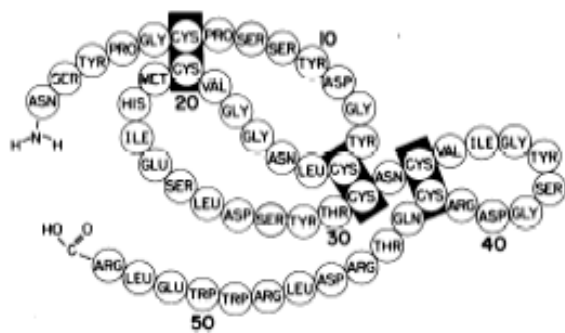


Figura 4. La secuencia de aminoácidos de EGF con sus uniones disulfido. (impreso de *Journal of Biological Chemistry* (1973) 248, 7669-7672).

Los homogeneizados en crudo de glándula submaxilar, mostraban que el EGF era²⁷ una parte de un complejo de alto peso molecular de aproximadamente 74000 daltons. Este complejo podía ser disociado en dos componentes el EGF y una proteína de unión de 29000 Daltons.

En 1973 Armelin y Hollenberg fueron los primeros que demostraron^{28, 29} que los fibroblastos en cultivo respondían a EGF con aumento de la síntesis de DNA. Dos años después Cohen y Canperter realizan³⁰ el mismo experimento con cultivos de fibroblastos humano lo cual indica que las células humanas

también poseen receptores para EGF y por lo tanto, un polipéptido similar podría encontrarse en tejido humano.

Dos experimentos consiguieron aislar^{31, 32} una sustancia de orina humana con actividad biológica similar a la hormona de ratón, se aisló factor de crecimiento puro de orina humana. Los efectos biológicos del polipéptido humano purificado eran cualitativamente idénticos a aquellos antes descritos para el factor de crecimiento de ratón. Éstos incluyeron el estímulo de la proliferación in vitro de fibroblastos y células epiteliales corneales, así como la inducción de la apertura precoz del párpado en el ratón recién nacido. La composiciones de aminoácidos de los polipéptidos humano y del ratón se diferenciaron, pero las similitudes fueron claras. Ambos polipéptidos compitan por la misma localización de la membrana celular. Se concluyó que se había aislado el homólogo humano del EGF murino.

En 1975; Gregory vio³³ que la urogastrona (hormona antisecretora gástrica aislada de orina humana) era similar a EGF humano y estrechamente relacionada con el mEGF. La presencia de una molécula que se unía específicamente a EGF, el receptor se confirmó en 1975 al demostrar que EGF marcado con yodo125 se unía de manera específica a la superficie del Fibroblasto.

Identificación de EGFR

En 1980 Ushiro y Cohen^{34, 35} identifican EGFR como un componente de la membrana celular de 170 Kdaltons y demuestran que EGFR es dependiente de tirosin-quinasa. Realizaron un experimento con el que consiguen purificar y caracterizar a partir de membranas celulares preparadas de células de carcinoma epidermoide humano A-431 el EGFR (Proteína endógena de la membrana celular cuyo peso molecular está entre 150.000 y 170.000). Además de demostrar que el receptor del EGF y el sistema fosforilación no depende de la preparación de la membrana, se descarta la hipótesis de la endocitosis pero

si es un componente integral de la membrana. En estos experimentos demuestra^{36 37 34} que la unión de EGF a EGFR activa una proteína quinasa, tirosin-específica, intrínseca del EGFR

Demostración de la actividad quinasa del EGFR

Hacia finales de la década de lo 70, Cohen había demostrado que las tanto las membranas celulares intactas³⁶ como las solubilizadas³⁷ tenían la habilidad de ligar EGF marcado con ¹²⁵I. Por otro lado demostró que la unión del EGF a membranas celulares intactas in Vitro en presencia de ATP marcado con ³²P provocaba la fosforilación de proteínas de membrana^{33, 36}. Para ello utilizó la línea celular de carcinoma epidermoide humano A-431, línea que se había demostrado tener una concentración alta de receptores EGF³⁷, 2-3 X 10⁶ receptores/ célula. En alícuotas de preparado de membrana A-431, se examinó la capacidad de fosforilación de los componente de la membrana.

Los componentes fosforilados de la membrana son proteínas de peso molecular de 170,000 y 150,000 daltons. La adición de EGF a preparaciones de la membrana A-431 estimuló la fosforilación no solo de proteínas endógenas de la membrana , sino también exógenas de la proteína sustrato, lo que hizo pensar que la fosforilación de componentes de la membrana o asociados a la misma suponían el proceso inicial en la generación de señales intracelulares que regulan el crecimiento de célula.

Proto-oncogen

EGFR esta codificada por el proto-oncogen c-erb B1³⁸ , formado por 26 exones. Hay 4 genes que codifican a los diferentes receptores de la familia erbB (Tabla 2).

Tabla 2. Genes que codifican los diferentes receptores.

Proto-oncogen	gen	Receptor
c-erb B1	7p12	EGFR
c-erb B2	17q21.1	HER2
c-erb B3	12q13	HER3
c-erb B4	2q33.3-q34	HER4

Estructura molecular del EGFR

Organización de dominios y relación entre los distintos receptores

Los 4 receptores tirosina quinasas (erbB) tienen una estructura similar, están constituidos por una cadena glicoproteica transmembrana. El factor de crecimiento epidérmico (EGFR) humano está formado por 1186 aminoácidos, cuya masa molecular es de 170 kilodalton (kDa). Su estructura consta de 3 dominios con distintas funciones, un dominio extracelular, un dominio transmembrana y una porción intracelular.

El **dominio extracelular glicosilado** está constituido por 622 aminoácidos, tiene un peso molecular de 100 kDa. Su función es la unión a ligandos. Esta región extracelular de cada receptor ErbB contiene 4 subdominios de dos tipos diferentes^{39,40}.

Dos dominios homólogos L (large), que tienen un 37% aproximadamente de secuencia de aminoácidos idéntica⁴¹ y dos dominios ricos en cisteína CR1 y CR2 (cystein-rich) que tienen un 17% de secuencia similar y son ricos en cisteína⁴². Aparecen en el siguiente orden L1-CR1-L2-CR2⁴³.

Estos 4 dominios han sido denominados de forma alternativa dominios I, II, III y IV^{44, 45} y L1-S1-L2-S1⁴⁶. En la actualidad, los dominios I-III han sido descritos con estudios cristalográficos y de difracción de rayos X, por Garret y Ogiso, el dominio IV todavía se desconoce Figura 5.

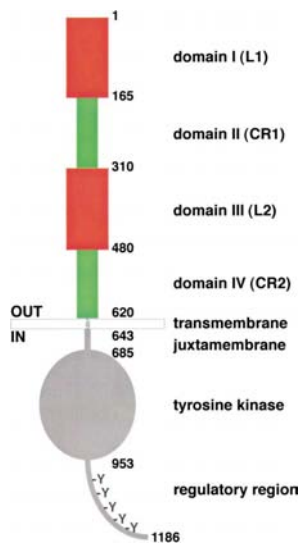


Figura 5. Organización de los dominios de receptores ErbB. En este esquema nos referimos a los dominios utilizando la nomenclatura I, II, III, IV (Lax et al., 1988b). Otra alternativa es la de llamar a los dominios L1, CR1, L2, CR2 (Impreso de Ward et al., 1995)

Dominio transmembrana, rico en aminoácidos hidrófobos (23 residuos) y está unido al dominio intracelular por una región yuxtamembrana que tiene un rol regulatorio en la función del receptor.

Dominio intracelular o citoplasmático, (formado por 264 residuos, 60 kDa), es el dominio con actividad tirosin quinasa formado por la región yuxtamembrana o región amino terminal y la región C-terminal. El dominio tirosina quinasa también es denominado como dominio Src-homologo-1 (SH1). La unión de los ligandos, tales como EGF o TGF alfa, provoca la autofosforilación del EGFR y se inician las señales de transducción que regulan la división celular y la diferenciación

Activación del EGFR

Los estudios cristalográficos de rayos X del dominio extracelular han demostrado que los ligandos se unen a un solo receptor, induciendo la posterior dimerización del mismo. La dimerización de un receptor de la familia ErbB es

imprescindible para la iniciación de la cascada de señales. Se denomina homodimerización si la dimerización se produce con el mismo receptor, y heterodimerización si se une a otro receptor diferente.

El dominio extracelular glicosilado de todos los miembros de la familia ErbB esta formado por cuatro subdominios. Los dominios llamados I y III, son homólogos, β -hélices plegadas, ricos en Leucina, que participan en la unión con el ligando. Los dominios II y IV son ricos en residuos Cisteína y participan en la formación de puentes disulfuro. El subdominio II participa en la formación de homo y heterodímeros con otros miembros de la familia ErbB a través de la llamada asa de dimerización (β -hairpin).

El EGFR se encuentra⁴⁷ en un equilibrio dinámico entre 2 formas: Inactiva, por un mecanismo de auto-inhibición (Figura 6) y activa provocada por la unión al ligando (EGF). La forma inactiva se caracteriza por interacciones intermoleculares entre el dominio II y IV.

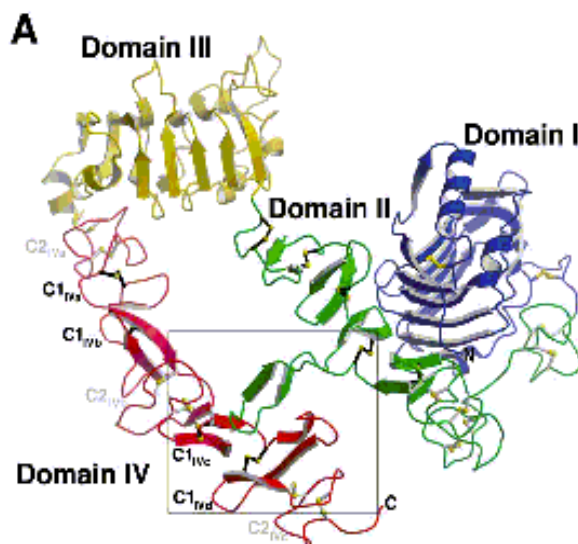


Figura 6. Forma inactiva del receptor no unida a ligando. La forma inactiva se caracteriza por interacciones intermoleculares entre el dominio II y IV. (Impreso de Ferguson, *Molecular Cell*, Vol. 11, 507–517, 2003.

El ligando se une al receptor a través los subdominios I y III del dominio extracelular provocando dimerización del EGFR. La unión del ligando induce un cambio conformacional que provoca la exposición de una superficie de dimerización en el dominio II que media la interacción con otro receptor, dando paso a la formación del dímero, formando una estructura conjunta con el ligando; esta es la forma activa del receptor. El complejo ligando-EGFR puede unirse a un complejo similar, lo que ocurre por la interacción directa de dicha asa de dimerización en el dominio II de otra molécula de EGFR (Figura 7). Este mecanismo también explica la heterodimerización del EGFR con otros receptores erbB⁴⁸.

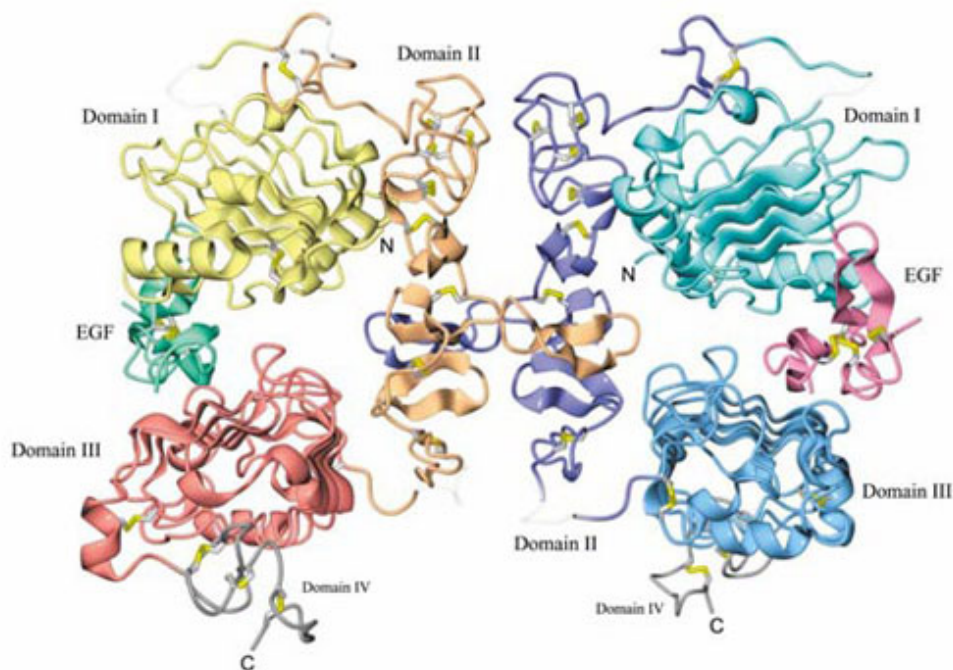


Figura 7. Estructura cristalografía de la dimerización del dominio extracelular del EGFR unido al ligando. Ambos receptores están unidos a EGF. Reprinted from *Cell* vol 110, Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, et al. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains, pp 775-787.

EGF y TGF α se unen con el receptor en relación 1:1, la subregión II es el principal componente en la unión de dos receptores, a manera de un brazo extendido compuesto por 242-259 residuos. EGF y TGF α interactúan con los residuos estructurales del dominio I y con los grupos R de los aminoácidos de la subregión III, los residuos de Arg 41 en EGF y Arg42 en TGF α , altamente conservados, interactúan con Asp355 del receptor y Leu47 en EGF y Leu48 en TGF α se proyectan formando un sitio hidrofóbico en la superficie de la subregión III.

En el receptor inactivo las subregiones II y IV se encuentran unidas de tal manera que el brazo de dimerización se encuentra plegado impidiendo la interacción con un receptor adyacente. Las subregiones de unión a ligando I y III próximas entre sí pero separadas del asa de dimerización de manera que un solo ligando pueda interactuar con ambas simultáneamente. Es una de barril-like structure (estructura similar a un barril).

La unión del ligando al receptor provoca la rotación de 130° de las subregiones I y III provocando la rotura de las uniones intermoleculares de las subregiones II/IV permitiendo la conformación extendida que facilita la formación de dímeros (Figura 7).

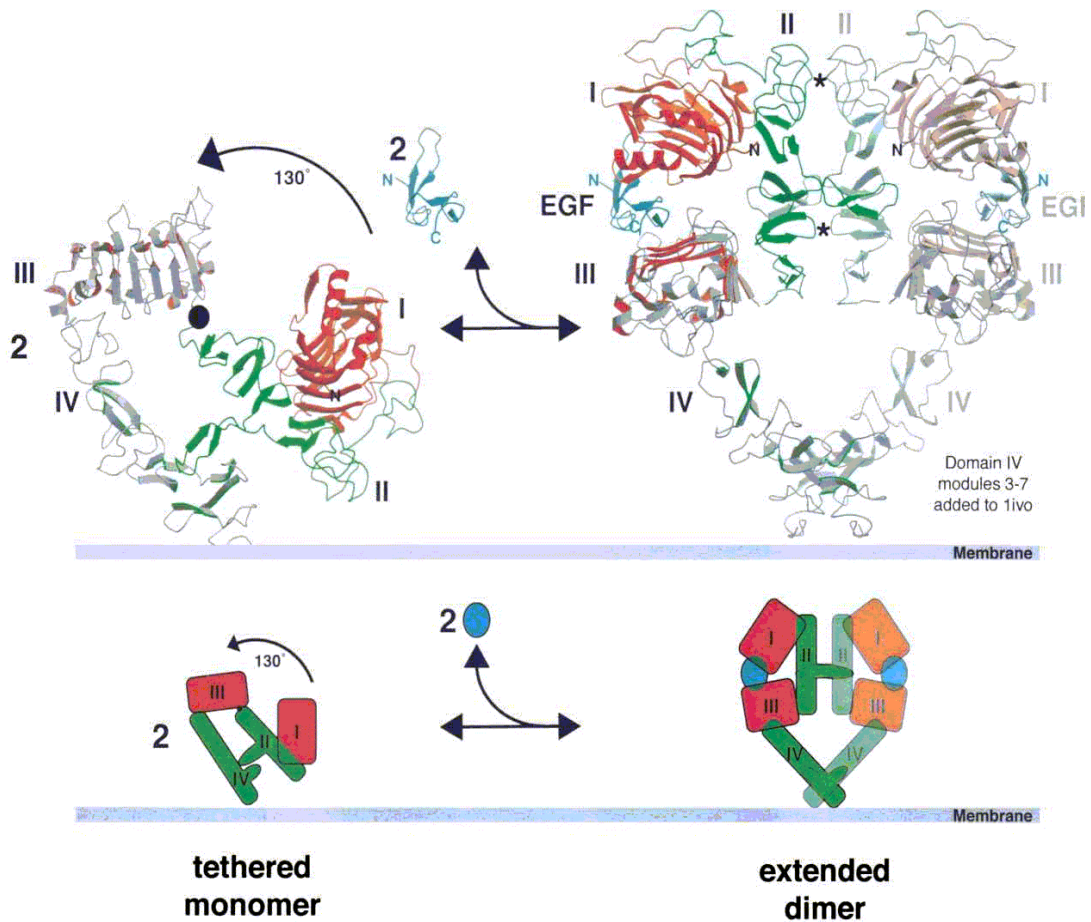


Figura 7. Como la unión del ligando induce cambio conformacional. Impreso de Ferguson, *Molecular Cell*, Vol. 11, 507–517, 2003

Unión de ligandos al EGFR y formación de Homo/ heterodímeros con EGFR

El EGFR es un receptor altamente expresado en la membrana celular. Como he explicado previamente pertenece a la familia de receptores de membrana con actividad quinasa. Contiene un dominio extracelular encargado de la

unión de los ligandos, una región transmembrana hidrofóbica y un componente intracelular con actividad tirosina quinasa.

En el apartado de ligandos de los receptores erbB de las familias de receptores tirosin quinasa se ha explicado: para que el EGFR se active necesita que su dominio extracelular se una al ligando. Hasta ahora se conocen al menos 7 ligandos con afinidad por el EGFR: EGF, TGF- α , HB-EGF, anfiregulina, betacelulina y epiregulina y epígeno.

La unión del ligando provoca la dimerización de EGFR, la activación y la autofosforilación de varios residuos de tirosina en la región carboxi-terminal del dominio intracelular. Posteriormente, los sustratos intracelulares con homología Src-2 y dominios de unión a fosfotirosina se unen a los residuos de tirosina fosforilados, lo que lleva a la activación de múltiples vías de señalización intracelular, y a su vez, a la proliferación celular, supervivencia, diferenciación, migración, y otras respuestas celulares⁴⁹.

La unión de los ligandos EGF-like al receptor inducen la formación de homodímeros ErbB1 / ErbB1 y heterodímeros ErbB1 / ErbB2 (heterodímeros mas frecuentes), ErbB1 / ErbB3 y ErbB1 / ErbB4.

El mismo receptor puede ser activado por diferentes ligandos, sin variar su función (efecto redundante y especificidad). La unión de TGF- α y EGF a erbB1 tienen actividad biológica diferente, TGF- α es más potente que EGF como angiogénico in vivo y como estimulador en la formación de colonias in vitro^{50, 51}.

Activación de la tirosina quinasa

Cuando un ligando extracelular se une al receptor, en este caso el EGFR, se produce la dimerización del mismo, lo que da lugar a la activación de su actividad tirosina quinasa y la transfosforilación de los residuos de tirosina de

su extremo C-terminal del dominio intracelular del receptor⁵². Los residuos de fosfotirosina del receptor activado son reconocidos por proteínas que poseen dominios SH2⁵³ o dominios PTB⁵⁴. Estas proteínas pueden ser de dos tipos: **proteínas adaptadoras** que pueden reclutar a otras proteínas transductoras, o bien **factores o enzimas directamente transductores/as** que tras unirse al receptor son fosforilados por éste, pasando de un estado inactivo a otro activo. Por lo tanto, mediante estos reclutamientos y/o fosforilaciones se producen cambios conformacionales y/o cambios en la localización intracelular de estas proteínas señalizadoras, siendo así capaces éstas de transmitir sus mensajes a otros componentes de las diversas rutas intracelulares de transducción de señales.

Dentro del amplio grupo de proteínas adaptadoras, mencionaremos como ejemplos a tres de gran importancia: la proteína Grb2 (por *growth factor receptor-bound protein 2*), cuyo papel es importante en la activación de la proteína G monomérica Ras y la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs, por *mitogen-activated protein kinases*); la proteína Grb7 (por *growth factor receptor-bound protein 7*); y la proteína Shc (por *SH2 domain-containing protein*), que actúa como un sistema auxiliar de señalización alternativo pudiendo sustituir a elementos funcionales del propio receptor.

Señales intracelulares

La fosforilación del dominio C-terminal del EGFR, ya sea por autofosforilación o transfosforilación por otras quinasas tales como Src y Jak-2, proporciona sitios de unión específicos para los dominios SH2 o PTB, transductores de señales intracelulares y adaptadores que inician las vías de transducción de señales.

Las principales vías de transducción de señal procedentes de receptores de la familia EGFR descritas en la célula epitelial son, (1) vía de Ras-Raf-MAPK,

(2) vía PI3K-Akt, (3) vía de la fosfolipasa C (PLC) y (4) Señalización celular por proteínas reguladoras de la transcripción STATs. Estas vías de transducción son mecanismos complejos regulados por múltiples proteínas de carácter inhibitorio y activador, existiendo numerosos entrecruzamientos entre ambas.

En la siguiente Figura 8 quedan esquematizadas las vías de señalización.

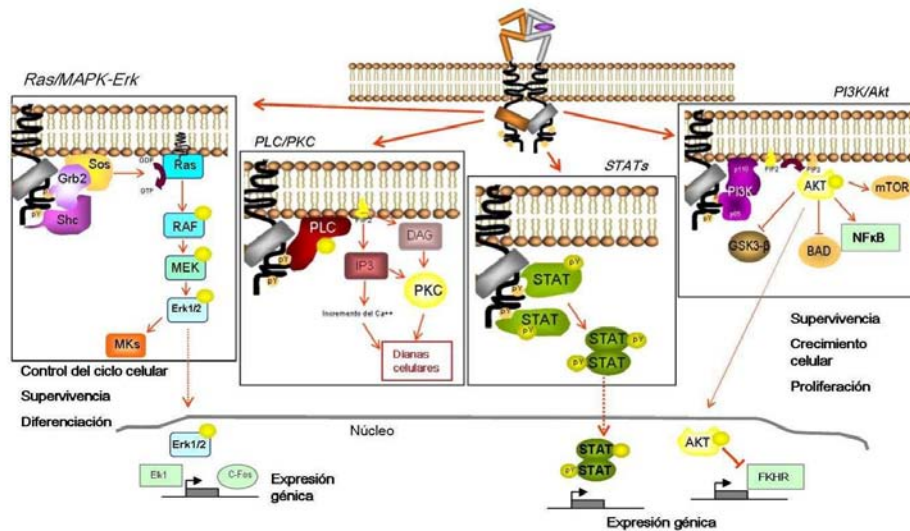


Figura 8. Vías de señalización activadas por los receptores ErbBs y sus funciones biológicas. La unión del ligando al receptor induce la formación de Homo y/o Heterodímeros y se fosforilan las tirosinas del extremo C- terminal. De esta manera se reclutan proteínas que activan las vías de señalización Ras/Mapk-Erk, PI3K/Akt, PLC/PKC y STATs. Esto induce proliferación y crecimiento celular, diferenciación y supervivencia

Señalización celular por la vía de Ras/MAPK-Erk

La unión del ligando (EGF) al receptor (EGFR) desencadena una cascada de fosforilaciones sucesivas lo que significa la activación de señales^{55, 56, 57, 58, 59, 60}. Esta unión fosforila el dominio SH2 de la proteína Grb2 y transporta la señal a ras (proteína monomérica) a través de sos. El dominio SH2, interactúa con los residuos de fosfotirosina del receptor, y acaba interaccionando con factores intercambiadores de nucleótidos de guanina tales como Sos1/2. Se forma un complejo Grb2/Sos, que se trasloca a la membrana plasmática

estimulando el intercambio de nucleótidos en Ras, transformando Ras-GDP (forma inactiva) en Ras-GTP (forma activa)^{61, 62, 63}.

Una vez activada estimula a tres proteínas quinasas de forma secuencial hasta activar la quinasa MAP (llamada Erk).

El complejo Ras- GTP activo se fija al dominio regulador de Raf (situado en su N terminal) y activa a las serina/treonina quinasas Raf-1, A-Raf y B-Raf (también denominadas MAPKKKs, por *mitogen-activated protein kinase kinase kinases*). Estas últimas a su vez fosforilan a las tirosina/treonina quinasas duales MEK1/2 (también denominadas MAPKKs, por *mitogen-activated protein kinase kinases*), y éstas finalmente fosforilan a las serina/treonina quinasas ERK1/2 (también denominadas MAPKs). Erk o MAP quinasa es una proteína serina/ treonina quinasa que llega al núcleo y puede fosforilar diversos factores de transcripción como c-Myc, c-Jun, c-Fos, Elk-1 y p62TCF que regulan la expresión de genes⁶⁴.

En resumen, la activación de Ras por fosforilación desde GTP (forma activada de proteína G) inicia una cascada de fosforilaciones en diferentes proteínas citosólicas que acaba en la activación o fosforilación de una proteína clave, la Proteína-Quinasa Activada por Mitógenos (MAPK). MAPK está formada por un dímero de dos quinasas de 42 y 44 kD, y es capaz de translocarse al núcleo de la célula cuando se activa, y allí regular diversos procesos de transcripción génica relacionados con la proliferación celular, la supervivencia y la diferenciación celular.

Señalización celular por la vía de PI3K

La segunda vía de transducción de señal desde la membrana está regulada por PTEN, y tras fosforilación de un mediador citosólico (PI3K), se produce la activación de la proteína Akt, que está relacionada con los procesos de supervivencia celular por inhibición de la muerte celular por apoptosis mediada por

caspasas, y con los procesos de proliferación celular regulados por mTOR, STAT 1/3 y eIF-4E^{65, 66, 67}.

Señalización celular por la vía de las fosfolipasas, C (PLCg) y A (PLA2)

La PLCg tras interaccionar con las fosfotirosinas del EGFR activado a través de sus dos dominios SH2 es fosforilada por el receptor. Este proceso da lugar a la activación de esta enzima, la cual cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), generando inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3, por *inositol 1,4,5-trisphosphate*) y 1,2-diacilglicerol (DAG)^{68, 69}. Tanto el IP3 como el DAG son potentes segundos mensajeros que están implicados en la activación de ciertas isoformas de la proteína quinasa C (PKC, por *protein kinase C*), bien directamente como lo hace el DAG, o bien aumentando transitoriamente la concentración de Ca²⁺ citosólico como lo hace el IP3.

La activación de la PLCg por el receptor atenúa la señal mitogénica, ya que el DAG activa a la PKC y ésta retroinhibe la actividad tirosina quinasa del receptor.

Otra fosfolipasa que resulta fosforilada tras la activación del EGFR es la PLA2. En este caso, sin embargo, esta fosforilación es indirecta ya que tiene lugar en residuos de serina, pudiendo estar mediada por la PKC. Esta fosfolipasa también participa en la generación de la señal del calcio tras la estimulación de las células por EGF, ya que hidroliza ciertos fosfolípidos (FL) de la membrana plasmática liberando ácido araquidónico (AA), que es transformado, a través de la vía de la 5-lipoxigenasa, en leucotrieno C4 (LC4). Este último es un potente efector que abre canales de Ca²⁺ presentes en la membrana plasmática, contribuyendo así al aumento transitorio de la concentración de Ca²⁺ citosólico mediado por el receptor⁷⁰.

Señalización celular por proteínas reguladoras de la transcripción STATs

En determinadas ocasiones, la unión del ligando al receptor puede provocar la síntesis de las proteínas reguladoras de la transcripción denominadas STATs (por *signal transducers and activators of transcription*) que aumentan la expresión del inhibidor del ciclo celular p21WAF1/CIP1, quedando así bloqueado el mismo, y de la caspasa 1, proteasa implicada en apoptosis⁷¹.

Efecto biológico de la activación del EGFR

La activación del EGFR es imprescindible para las siguientes funciones celulares^{72, 73, 74} :

- (1) Proliferación celular por la vía Ras/ MAPK mediada por EGF.
- (2) Supervivencia celular por la vía de la PI3K. La vía ras/MAPK no es esencial en el proceso de supervivencia. La supervivencia celular también puede estar mediado por vías de ras independientes de EGF.
- (3) Ambas vías y otras señales de ErbB modulan la participación en: angiogénesis, adhesión celular, movilidad celular, desarrollo y organogénesis.
- (4) En general la activación del EGFR lleva a las células a un estado de proliferación o de supervivencia celular sin embargo a través STATs (proteínas reguladoras de la transcripción) que aumentan la expresión del inhibidor del ciclo celular p21WAF1/CIP1, quedando así bloqueado el mismo, y de la caspasa 1, proteasa implicada en apoptosis la activación del EGFR puede inducir en ciertas células tumorales una parada de la proliferación celular y la inducción de apoptosis.

3. EGFR Y CÁNCER

Expresión en tumores sólidos

La alteración del funcionamiento normal del sistema de señales celulares relacionadas con EGFR y sus ligandos pueden provocar la transformación maligna de la célula.

En múltiples tumores se han descrito niveles elevados de expresión de EGFR (sobrexpresión) y en la mayoría de ellos se relaciona con mal pronóstico. El aumento del número de receptores expresados en la célula tumoral implica la respuesta a bajas concentraciones de ligando. Los tumores donde se ha visto sobreexpresado el EGFR son: carcinoma escamoso de cabeza y cuello (80-100%), cáncer de pulmón no-célula pequeña (40-80%), carcinoma de colon (25-77%), carcinoma de mama (14-91%), carcinoma de ovario (35-70%), carcinoma transicional (31-48%), o en gliomas (40-63%).

Se han descrito también mutaciones del dominio extracelular del EGFR como es la mutación del EGFRvIII en tumores del sistema nervios central, glioblastoma, en cáncer de pulmón y cáncer de mama.

Otros tumores presenta producción de TGF-alfa, factores de crecimiento autocrinos como ocurre en el carcinoma escamoso de pulmón, mama, adenocarcinoma de próstata, páncreas y mesotelioma.

La expresión de EGFR en cáncer colorrectal se describirá mas adelante.

Evaluación de la expresión

Métodos para determinar la expresión del EGFR

Para la determinación del EGFR se han utilizado múltiples técnicas. Un mar-

cador pronóstico o posible diana terapéutica requiere poder evaluarse al diagnóstico y con precisión. Asimismo requiere estandarización en su determinación, reproductibilidad, y capacidad de evaluación en muestras congeladas, fijadas en formol y parafinadas. La expresión/ actividad del EGFR se puede evaluar de varias maneras: cuantificación del receptor a nivel del DNA, RNA o proteína; o evaluación de la transducción de señales mediadas por el receptor mediante análisis de su activación o de la activación secundaria de diversos sustratos intracelulares. La determinación de la expresión del EGFR en tumores se realiza por varias técnicas que incluyen (Tabla 3):

1. Determinación de la proteína : Se puede realizar por las siguientes técnicas: Inmunohistoquímica, Western blot analysis, enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA, fluorescence-activated cell sorting: FACS.
2. Determinación de RNA de transcripción. Utilizando Northern blot analysis o reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)
3. Determinación de DNA: con PCR cuantitativa, Southern blot analysis o fluorescence in situ hybridisation (FISH).

Tabla 3 . Detección de EGFR en tumores.

Método	Tipo de muestra	limitaciones
<i>Métodos in situ</i>		
IHC	Sección de tejido	Pérdida de estandarización
FISH	Sección de tejido	Ninguna
<i>Métodos extractivos</i>		
Western/Northern blot	Extracto de tejido o suero	Técnica compleja
RT-PCR	Extracto de tejido o suero	Técnica compleja
ELISA	Extracto de tejido o suero	Ninguna
Citometría de flujo	Extracto de tejido	Ninguna

IHC: inmunohistoquímica; FISH: fluorescencia hibridación in situ; RT-PCR: reverse transcript-polymerase chain reaction; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay.

Amplificación del gen. Puede determinarse mediante las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Southern-blot o hibridación in situ con sondas fluoresceinadas (FISH). Estas técnicas se pueden estandarizar y son cuantificables. Sin embargo, el Southern-blot no es adecuado para un programa de cribado, dado que requiere el uso de radioisótopos para conseguir una buena sensibilidad. Además, esta técnica precisa de tecnología específica

y no puede evaluar muestras fijadas en formol. De las técnicas basadas en análisis del DNA, tanto FISH como PCR son adecuadas para cribado poblacional, pero sólo FISH se puede usar para muestras fijadas. Hay que tener en cuenta, adicionalmente, en relación con las técnicas basadas en análisis del DNA, que los cambios en la expresión del EGFR suelen ocurrir independientemente de su amplificación genética. Por ejemplo, la amplificación del gen del EGFR no se correlacionó con un aumento en la expresión del EGFR en una cohorte de cáncer renal, y no es un hecho frecuente en cáncer gástrico. Además, la presencia de EGFR en cáncer de mama suele asociarse a cambios post-transcripcionales. En cáncer de cabeza y cuello, a pesar de que lo expresan del 80% al 100%, solo se atribuye a amplificación genética en una parte de ellos. En todas estas situaciones, las técnicas de análisis del DNA no detectarían niveles elevados de EGFR.

Mutación del gen. Se han detectado formas mutadas del receptor en diferentes tipos de tumores. La mayoría de técnicas de análisis del DNA no detectan dichas mutaciones. La mutación que se identifica con mayor frecuencia es el EGFRvIII, que resulta de una delección en el gen que codifica para el EGFR o bien procesos de corte y empalme alternativo del RNA mensajero (mRNA). Se considera un marcador tumor-específico en algunas formas de cáncer de pulmón, mama, ovario y sistema nervioso central.

Transcripción de mRNA. Para cuantificar los niveles de mRNA transcrito se usan las técnicas de Northern-blot y de hibridación in situ de RNA. No son adecuadas para cribado, principalmente por problemas de degradación y contaminación asociados a la manipulación del RNA. Sin embargo, se han usado de manera extensa en los estudios preclínicos y han contribuido a aclarar los mecanismos de sobreexpresión del EGFR en diversos tipos de tumores. Recientemente se han incorporado técnicas de reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR), en que el DNA se sintetiza a partir de

RNA transcrito. Las modificaciones post-translacionales pueden afectar la cantidad de proteína que se produzca y, por lo tanto, pueden no ser métodos apropiados para estimar los niveles de EGFR.

Expresión proteica. La evaluación del EGFR en tumores suele hacerse mediante técnicas que determinan el nivel de expresión proteica. Las técnicas de Western-blot, enzimoimmunoanálisis tipo ELISA para membranas celulares solubilizadas y de FACS (fluorescence-activated cell sorting) para análisis de suspensiones celulares pueden usarse para evaluar los niveles de EGFR, pero no se pueden usar en muestras fijadas. Las técnicas que evalúan la interacción de ligandos con proteínas se utilizan en diversos estudios preclínicos y tienen la ventaja de evaluar las formas activas del receptor. Sin embargo, este tipo de ensayos sólo reconoce receptores con dominios con capacidad de interactuar con ligandos y son técnicamente complejos, por lo que no son adecuados para cribado.

Las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) probablemente sean las más adecuadas para la evaluación clínica del EGFR, ya que pueden usarse en muestras congeladas, fijadas en formol y parafinadas, y pueden efectuarse en la mayoría de laboratorios. Sin embargo, una de sus limitaciones es la pérdida de estandarización. Existen varios anticuerpos (con diferentes especificidades y afinidades) así como diferentes resultados en función del método de detección. Además, la IHQ no es una técnica diseñada para cuantificar, y la subjetividad de la técnica explica las diferencias en los resultados publicados. La introducción de técnicas que usan un anticuerpo estándar y sistemas de gradación proporcionan resultados mucho más reproducibles. En este sentido, la técnica se puede calibrar de manera que los niveles normales de EGFR en determinados tejidos (por ejemplo, colon-recto) se asocien con mínima o nula tinción y se puedan diferenciar de las células tumorales que lo expresan.

La activación de las vías de transducción asociadas al EGFR puede estimarse

cuantificando la fosforilación del EGFR usando técnicas de Western-blot o IHQ; o bien evaluando la activación secundaria de sustratos intracelulares, por ejemplo, de proliferación.

Técnica de inmunohistoquímica

Consideramos que la técnica de inmunohistoquímica es una de las más útiles y la empleada en este trabajo. La mayor parte de los estudios publicados utilizan esta técnica. Una de las ventajas más importantes de dicha técnica es que no modifica la morfología celular y nos permite tener información de la distribución de la proteína en el tejido estudiado, es un método sencillo y rápido.

La fidelidad de la información que proporciona depende de dos factores importantes, los reactantes utilizados, la experiencia del patólogo en realizar la técnica y que procede a su interpretación y la utilización de sistemas de gradación que proporcionan resultados mucho más reproducibles..

Sistema de Evaluación del EGFR. Immunohistochemistry scoring

De acuerdo con los datos publicados la expresión de EGFR se considera positiva cuando se observa una tinción de membrana circunferencial completa o incompleta en al menos 5% de las células tumorales. La tinción se define como cualquier tinción IHC de la membrana de las células del tumor sobre el nivel del fondo, es decir, débil, moderado o fuerte. La ausencia de tinción o citoplasma es reportado como negativo. Azria²¹⁵ (2005) , Italiano (2005) y Bibeau (2006) valoran para sus resultados la expresión positiva o negativa.

La lectura de la expresión de EGFR es una determinación subjetiva y lo que queda claramente consensuado es que la interpretación debe llevarse a cabo

por dos patólogos expertos, en caso de no concordancia entre las interpretaciones se debe llegar a un consenso. Todos los métodos utilizados están basados en la proporción de positividad con o sin la intensidad.

Varios autores han desarrollado algoritmos con el fin de dar un valor numérico a la expresión del EGFR^{75, 76, 77, 78, 79}.(Tabla 3).

Tabla 3. Métodos de evaluación de EGFR

Referencia	% células marcadas	Intensidad de la tinción	Score global
Cunningham	<10% >10-20% 20-35% >35%	Leve Moderado fuerte	No existe
Hirsch	Variable continua de 0 a 100%	Negativo= 1 Leve=2 Moderado=3 Fuerte=4	% de células teñidas multiplicado por la intensidad - 0-200: negativo o bajo - 201-300: intermedia - 301-400: alto
Kersemeckers	0:Ninguna celula positiva 1: (1-25%) 2: (26-50%) 3: (51 - 75%) 4: (76-100%)	Negativo= 0 Leve=1 Moderado=2 Fuerte=3	Suma de proporción e intensidad 0 negativo 2-3 leve 4-5 moderado 6-7 fuerte
Scartozzi	<1% de células tumorales teñidas >1% de células marcadas	Leve=1 Moderado=2 Fuerte=3	Positivo o negativo basado en la proporción de células marcadas
Spano	Grado 0 (ninguna) Grado 1 (1-25%) Grado 2 (25-50%) Grado 3 (>50%)	Negativo= 0 Leve=1 Moderado=2 Fuerte=3	Grado multiplicado x intensidad, rango de 0-9 - <6 expresión baja - <6 expresión alta

Goldstein⁸⁰ estandarizó como interpretar la reactividad al EGFR. Utilizó un sistema de cuatro niveles para valorar la intensidad de la reactividad de EGFR en las células de adenocarcinoma. Los 4 niveles fueron los siguientes:

0: No reactividad;

1+: expresión débil. Reactividad marrón claro a nivel de la membrana, citoplasma, o ambos. La tinción de la membrana no necesariamente completa. La tinción del citoplasma es uniforme. No presenta acentuación de la intensidad en la región citoplasmática submembrana.

2+: expresión moderada. La tinción de la membrana celular es marrón intermedio en cuanto a intensidad se refiere. Normalmente la reacción es completa alrededor de la célula, también se considera nivel 2 si en alguna célula no es

completa. La mayoría de las células presentan reactividad citoplasmática que es de intensidad más débil que la reactividad de la membrana. Algunas células pueden presentar un reborde periférico de la reactividad citoplasmática moderada que era más oscuro y más intenso en la región inmediatamente subyacente a la membrana celular.

3+: expresión fuerte. Color marrón oscuro con manchas negro y normalmente en un patrón de membrana completo, produciendo un contorno grueso de la célula. Muchas células con reactividad 3+ membrana presentan también intensa moderada citoplasmática. Muchas células tienen una región prominente de acentuación citoplasmática submembrana, produciendo una zona de espesa nebulosa de reactividad membranosa. Algunas células pueden tener un pequeño segmento de la membrana de menor intensidad. Las células que presentaban con fuerte reactividad citoplasmática exclusivamente también fueron clasificados como expresión fuerte, 3+.

Al igual que Goldstein, varios investigadores han tenido en cuenta la intensidad de la expresión de EGFR.

Spano (2005)⁸¹ tiene en cuenta extensión e intensidad. El porcentaje de células marcadas se calificó como sigue:

- grado 0: no hay células positivas;
- grado 1: 1-25 % de las células tumorales expresan EGFR;
- grado 2: 25-50% células tumorales expresan EGFR;
- grado 3: > 50 % de células tumorales positivas .

La intensidad de la expresión de EGFR la evaluó visualmente según el color de la membrana celular, el citoplasma o ambos, desde beige claro a marrón y se puntuó como 0 (negativo) , 1 (débil) , 2 (moderado) o 3 (fuerte) . Definió un score que integraba la extensión y la intensidad, va desde 0 a 9: Dicho score se obtuvo multiplicando el grado por la intensidad. Los pacientes fueron analizados en función de su expresión de EGFR : baja: < 6 y alta: > 6 .

Es decir, que varios autores han intentado definir la expresión del EGFR.

Expresión de EGFR y pronóstico tumoral

Ya es conocido que el EGFR interviene en el desarrollo embrionario y el crecimiento de diferentes tejidos. La expresión de EGFR varía según con la etapa del desarrollo en la que se encuentran los tejidos.

Estudios in vivo de tejido epitelial de ratón sano han demostrado que la expresión de EGFR es mayor en células con capacidad proliferativa que en aquellos tejidos que ya que han comenzado a diferenciarse o han perdido su potencial de crecimiento cuya expresión de EGFR es menor.

A fecha de hoy se conoce el papel que juegan los factores de crecimiento en la patogénesis del cáncer. Los factores de crecimiento contribuyen a la progresión del tumor a través de diferentes mecanismos:

1. El aumento de la expresión de los receptores de membrana de las células tumorales que incrementa la sensibilidad frente a concentraciones bajas de factores de crecimiento.
2. Existe una relación directa entre los factores de crecimiento y proto-oncogenes celulares. De hecho, varios proto-oncogenes codifican proteínas que son: factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, o proteínas que están implicadas en la vía de transducción de señales intracelulares para factores de crecimiento. Además, los proto-oncogenes celulares activados también pueden controlar la producción endógena y / o la respuesta de las células tumorales a los factores de crecimiento.
3. Se ha demostrados la participación de los factores de crecimiento en el mantenimiento de la supervivencia de las células tumorales, promoviendo la angiogénesis inducida por el tumor.

La expresión de EGFR varía en función de los tumores de cada órgano o tejido, y también pueden variar en tumores del mismo tipo. Las posibles causas de esta situación son:

- En primer lugar, que los tumores sólidos se han clasificado clásicamente según sus características histológicas, sin embargo, las nuevas técnicas moleculares han demostrado que los que considerábamos como mismo tipo histológico son heterogéneas respecto a la citogenética y los perfiles de expresión proteica.
- En segundo lugar, las diferencias debidas a los diferentes métodos utilizados para la medida de la expresión de EGFR
- En tercer lugar, la determinación del EGFR se realiza sobre una muestra de tumor que en alguna situación podría no ser representativa.

La sobreexpresión de EGFR en los diferentes tipos de tumores se ha correlacionado con mal pronóstico, períodos libres de enfermedad más cortos, con estadios de la enfermedad más avanzados en el momento del diagnóstico, menor diferenciación del tumor o un comportamiento más agresivo del mismo. Nicholson⁸² y colegas publicaron en 2001 un extenso trabajo que incluye más de 200 estudios realizados entre 1985 y 2000, en el cual participaron más de 20.000 pacientes. En esta revisión se dispone de datos de expresión de EGFR y su significado pronóstico. Hay datos de la sobreexpresión de EGFR en 10 tipos de tumores respecto al tejido sano normal. De estos, la sobreexpresión de EGFR es indicador pronóstico en cinco tipos de tumores: cérvix, ovario, cabeza y cuello, vejiga y esofágicos. En mama, gástrico, endometrio y colorrectal esta relación pronóstica fue moderada y en NSCLC menos importante.

La crítica que se hacen los mismos autores es que el verdadero significado pronóstico de EGFR probablemente puede estar subestimado por tratarse de un análisis retrospectivo. En primer lugar, hay una considerable heterogeneidad en las poblaciones de pacientes en relación con la enfermedad en estadio

precoz y tardía. En segundo lugar, la determinación de la expresión de EGFR en el tumor es variable, así como las definiciones de lo que significa sobreexpresión alta.

Aunque las determinaciones fueron por técnica de inmunohistoquímica en todos los casos, hubo variaciones respecto al laboratorio utilizado, los reactivos y el método empleado. Por último, los estudios sólo midieron la expresión de EGFR celular en lugar del receptor fosforilado, forma activa del receptor.

Los mecanismos por los que el EGFR podría relacionarse en estos tumores con una biología más agresiva se explican por la interacción del receptor de la célula tumoral, mediante mecanismos autocrinos, yuxtacrinos y paracrinos, con el microambiente tumoral, favoreciendo la multiplicación celular, la supervivencia celular, la permeabilidad de los vasos y la formación de una red vascular más rica (angiogénesis), que favorezca la aparición de metástasis a distancia.

Describiremos mas adelante el papel pronóstico del EGFR en cáncer colorrectal

4. EFECTOS BIOLÓGICOS DEL EGFR EN CÁNCER

Características de la célula tumoral

En el año 2000 Hanahan y Weinberg⁸³ describieron seis alteraciones esenciales en la fisiología de la célula, capacidades adquiridas que conducen a un crecimiento tumoral.

Las capacidades adquiridas son:

1. Autonomía frente a señales de crecimiento.
2. No respuesta frente a señales que inhiben el crecimiento celular.

3. Pérdida de muerte celular programada, es decir pérdida de apoptosis.
4. Potencial replicativo ilimitado.
5. Angiogénesis mantenida.
6. Capacidad de invasión tisular y metástasis.

Dos años más tarde Mendelsohn⁸⁴ añadió dos capacidades adicionales:

7. Inhibición de la capacidad de regeneración tras quimioterapia y radioterapia.
8. Ataque inmunológico.

En el año 2011 Hanahan y Weinberg⁸⁵ publican una actualización sobre el tema: *Hallmarks of cancer: the next generation*.

Los autores defienden que la noción de "sellos distintivos del cáncer" representa un principio de organización para racionalizar la diversidad y complejidad de las enfermedades neoplásicas.

Estos autores matizan e identifican la inflamación como una de las dos nuevas "**características capacitadoras**" (junto con la inestabilidad genómica y mutación) que harían posible la adquisición de los "sellos distintivos".

En su revisión de 2011, Hanahan y Weinberg incorporan otros **dos nuevos sellos distintivos del cáncer**. Por una parte, reconocen el impacto y la importancia de la adquisición por parte de las células tumorales de la capacidad de evitar su destrucción por el sistema inmune. Por otra parte, reconocen la enorme influencia que está teniendo en oncología el "redescubrimiento" de las alteraciones del metabolismo energético tumoral.

Efectos o consecuencias de la alteración de EGFR o sus vías

Teniendo en cuenta que la señalización a través de EGFR juega un papel importante en la proliferación celular normal, la supervivencia, la adhesión, la

migración y la diferenciación, el mal funcionamiento de esta vía puede conducir a la oncogénesis. Hemos visto en el apartado anterior las características de la célula tumoral, describiré en este apartado lo supone una hiperactivación del EGFR respecto a esas características. Los mecanismos con los que la célula se transforma en una célula tumoral relacionados con el EGFR pueden ser por secreción autocrina o paracrina (sobreexpresión del receptor) o a través de una activación constitutiva independiente del receptor provocada por una mutación, como puede ser la alteración de dominio extracelular EGFR-vIII, que presenta una actividad tirosina quinasa en ausencia de ligando, normalmente usa la vía intracelular PI3K.

En varios tumores como gliomas malignos, tumores de cabeza y cuello, pulmón, colorrectal y cáncer de mama entre otros se ha demostrado que presentan sobreexpresión de EGFR, amplificación génica, mutación o reordenación lo que apoya la relación entre la hiperactivación EGFR y el cáncer.

Aberraciones del EGFR en cáncer: Mutaciones en el dominio quinasa (NSCLC), deleciones mayores (GBM, NSCLC, mama y otros), amplificación de genes (GBM, mama y NSCLC)

Tabla 4. *Capacidades de la célula tumoral afectadas por la Inhibición del EGFR*

Capacidad	Inhibición EGFR
Adquiridas	
Autonomía frente a señales de crecimiento	SI
Insensibilidad frente a señales anti-crecimiento	SI
Evitar apoptosis.	SI
Potencial replicativo ilimitado.	NO
Angiogénesis mantenida.	SI
Capacidad de invasión tisular y metástasis.	SI
Adicionales	
Inhibición de la reparación.	SI
Capacidad de evitar su destrucción por el sistema inmune.	SI

Autonomía frente a señales de crecimiento

Uno de los mecanismos o sellos del cáncer definidos por Hanahan y Weinberg es la autonomía frente a señales de crecimiento.

Las células requieren de una serie de señales mitogénicas para pasar de un estado quiescente a un estado de proliferación activa. Estas señales se transmiten al interior de la célula a través de los receptores de membrana, a los cuales se pueden unir diferentes tipos de moléculas como factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular (ECM) o moléculas de adhesión. En ausencia de estas señales ninguna célula puede dividirse. Se ha visto en cultivos celulares que la progresión celular requiere de estos factores mitogénicos y de un sustrato adecuado. Sin embargo las células tumorales no dependen de dichos estímulos externos, son ellas mismas quienes generan sus propias señales de crecimiento, volviéndose independientes del medio que les rodea. Las estrategias moleculares para conseguir esta autonomía son tres que vamos a describir:

1. Alteración de las señales de crecimiento extracelular.
2. Alteración de la transducción de dichas señales a través de la membrana
 - a. Receptores de factores de crecimiento
 - b. Modificación de integrinas
3. Alteración de las vías intracelulares

Alteración de las señales de crecimiento extracelular. Estimulación autocrina

Las células normales producen factores de crecimiento (GFs) para estimular la proliferación de otras células (estimulación heterotópica). Las células tumorales son capaces de sintetizar GFs a los cuales responden ellas mismas, creando un feedback positivo llamado estimulación autocrina⁸⁶.

Alteración de la transducción a través de la membrana:

1. Alteración de los receptores de membrana

- La sobreexpresión del receptor que provoca proliferación con niveles normales de GFs. Esta descrito que muchos tumores humanos sobre-expresan el EGFR. El modelo de dimerización explica como la sobreexpresión de los receptores del factor de crecimiento favorece la formación del cáncer. Debido al alto número de receptores, estos chocan con frecuencia a medida que avanzan alrededor de la membrana plasmática, dando como resultado la dimerización, transfosforilación, la activación del receptor, y la emisión de señales mitogénicas.
- La modificación de los receptores de membrana que conllevan a señales independientes de ligando. Las mutaciones que afectan a cualquiera de los tres dominios de RTK pueden generar activación del receptor independiente de la unión del ligando. Un EGFR con un ectodominio modificado no puede reconocer a su ligando, pero si puede emitir señales de crecimiento estimuladoras de una manera constitutiva. Eventos de fusión de genes puede crear receptores que señalizan sin descanso por fusión de sus ectodominios con proteínas que provocan dimerización o oligomerización. Las sustituciones de aminoácidos o deleciones en los dominios transmembrana y citoplasmáticos de los receptores también se encuentran en algunos tipos de cáncer.
- Otro mecanismo para la transformación celular se ejemplifica por la oncoproteína Sis del virus del sarcoma de simio. El virus provoca una célula infectada que liberar grandes cantidades de una proteína similar a PDGF, que se une a los receptores de PDGF de la misma célula. Esto crea un bucle de señalización autocrina en el que una célula fabrica un mitógeno a la que también puede responder.
- Hay otros tipos de receptores, además de las RTK importantes en la génesis del cáncer:

- Los receptores de citoquinas carecen de dominios de tirosina quinasa y se basan en las tirosina quinasas asociadas no covalentemente para la señalización en lugar de los conocimientos tradicionales asociados a dominios covalentemente.
- Los receptores para TGF- β tienen dominios quinasa citoplásmicos que fosforilan serina y treonina en lugar de residuos de tirosina.
- Receptor Notch, no realiza la activación por fosforilación, en su lugar se basa en proteasas para liberar un fragmento de dominio citoplásmico involucrado en expresión génica.
- El sistema de Patched-Smoothedse basado en una proteína transmembrana que controla a otra, lo que a su vez controla un factor de transcripción.
- La unión de factores Wnt a un receptor Frizzled
- Receptores G-acoplados a proteínas (GPCRs)

2. Modificación de las integrinas

Las integrinas son receptores de matriz extracelular (ECM) que en los tumores se expresan favoreciendo aquellas que transmiten señales pro-crecimiento.

La unión de integrinas a ECM dan lugar a señales citoplasmáticas que permiten el paso de la célula a estado activo, confieren resistencia a la apoptosis y entrada en el ciclo celular.

Alteración de las vías intracelulares

Las unión de factores de crecimiento al receptor así como la unión de integrinas a ECM activa la vía intracelular de sos-ras-raf-MAP quinasa.

En un 25% de los tumores humanos hay una alteración de la proteína Ras y hasta un 40% en cáncer colorrectal metastásico, lo que activa la cascada de

señales mitogénicas, sin previa unión de los ligandos al receptor ni de la ECM a integrinas. Además dentro del tejido normal las células reciben señales del tejido de alrededor (señales paracrinas) o sistémicas (señales endocrinas), que juegan un papel importante en la proliferación celular: BIOLOGÍA CELULAR HETEROTOPICA.

- Oncogenes KRAS: mutación del gen kras.

En condiciones normales, el KRAS no mutado (wild type) actúa en la vía de señalización del EGFR. La estimulación de este receptor causa la activación de moléculas (RAS) que se unen al GTP, lo cual activa en forma simultánea varias cascadas intracelulares que median la proliferación y progresión en el ciclo celular, actividad estrechamente regulada y no induce una señalización continua que promueva la progresión del cáncer. Las mutaciones en el gen KRAS, que se encuentran aproximadamente en el 40 % de los tumores colorectal metastásico (CCRM), inducen la activación de forma constitutiva de la proteína KRAS, que provoca una señalización continua.

- Mutaciones en genes supresores de tumores

- Mutaciones del gen PIK3CA confieren un aumento en la actividad quinasa del PI3K, produciendo una ganancia en su función a favor de señales activadoras. El PIP2 generado por fosforilación activa la cascada de señales dependientes de fosfatidilinositol (PDK1) y proteína quinasa B (PKB, también conocida como AKT) que a su vez inhibe moléculas pro-apoptóticas (por ejemplo, BAD y BIM), con lo que median la supervivencia celular. El resultado de la activación vía PI3K permite la supervivencia celular bajo condiciones adversas de estrés celular, restricción nutrientes y el tratamiento farmacológico del cáncer citotóxica.

Falta de respuesta frente a señales que inhiben el crecimiento celular.

Las células normales responden a las señales anti-proliferación a través de los diferentes componentes que controlan la transición de la fase G1 a S del ciclo celular. Pueden estar mediadas por inhibidores solubles o por inhibidores embebidos en la matriz extracelular y en la superficie de las células.

Los mecanismos que presentan para bloquear la división celular son de dos tipos, inducir a la célula a un estado quiescente (G0) que es reversible (pérdida de la capacidad de supresión tumoral) o a la pérdida del potencial proliferativo de forma definitiva, lo que se llama estado post mitótico (diferenciación celular).

A nivel molecular unas de las proteínas que controla esta función es la proteína pRb y p27KIP1 (inhibidor de CDK, inhibidor de quinasas dependientes de ciclina). Se ha visto en estudios preclínicos que ambas proteínas pueden estar controladas por EGFR

- EGF puede inducir la expresión de ciclina D1, una proteína que se requiere para la progresión de la fase G1 a la fase S.

Hay estudios preclínicos que demuestran que la proliferación de células tumorales epiteliales en cultivos celulares está inhibida cuando bloqueamos EGFR con cetuximab o gefitinib. El mecanismo principal de la detención del crecimiento es el bloqueo de la progresión del ciclo celular en fase G1^{87, 88}.

- Otro de los mecanismos incluye la acumulación p27KIP1 un inhibidor de quinasas dependientes de ciclina (CDK2)⁸⁹. Para la progresión de la fase G1 y la entrada en fase S se requiere la activación de las quinasas dependientes de ciclina (CDK4 / CDK6 y CDK2). La progresión a la fase S está controlada, en parte, por la disponibilidad de factores de crecimiento, entre ellos el EGF para la activación de las quinasas CDK. En este estudio preclínico se vio que

el bloqueo con anticuerpo monoclonal anti-receptor de EGF (mAb) 225 , es decir el bloqueo de la activación del EGFR en las células de adenocarcinoma de colon humano DiFi induce la detención del ciclo celular en fase G1. El tratamiento de las células DiFi con mAb 225 durante 24 horas, provoca una disminución en la actividad de CDK2 quinasa y de la actividad de ciclina E asociada a quinasa CDK sin presentar una reducción de los niveles de ciclina E y CDK2. Sin embargo, la cantidad de p27KIP1 (inhibidor de CDK, inhibidor de quinasas dependientes de ciclina) aumento en las células tratadas con mAb y p27KIP1 se une a CDK2 en cantidades crecientes. Los resultados sugieren p27KIP1 esta implicado en la detención en fase G1 del ciclo celular inducida por el bloqueo del receptor EGF.

- El bloqueo de EGFR con C225 en carcinoma escamoso de cabeza y cuello incluye la acumulación de la proteína retinoblastoma hipofosforilada⁹⁰. La acumulación de esta proteína conduce a una reducción en la actividad de CDK2, que a su vez inhibe la transición del ciclo celular desde la fase G1.

Perdida de muerte celular programada, apoptosis.

La apoptosis o muerte celular programada fue descrita por primera vez en 1972 por Kerr⁹¹ como una serie de cambios a nivel microscópico asociados a muerte celular. Es un fenómeno frecuente en el desarrollo embrionario, la renovación tisular y en la regulación del sistema inmunitario. Se considera a la apoptosis como un mecanismo fisiológico de muerte (inherente al desarrollo celular), que se desencadena por diversas señales, las cuales pueden ser fisiológicas, o por estimulaciones exógenas ambientales⁹². Estas señales pueden actuar sobre receptores de superficie y causar la activación en cascada de proteínas citoplasmáticas; ello trae como resultado la activación de un programa genético que conduce, generalmente, a la nucleolisis por la acción de las endonucleasas. La apoptosis es un proceso activo que implica síntesis proteica,

en el cual la célula sufre una condensación nuclear y citoplasmática. Se caracteriza por una serie de cambios morfológicos, en un primer momento se produce la condensación de cromatina nuclear, desintegración nucleolar, disminución del tamaño nuclear, compactación del citoplasma y de organelas (excepto mitocondrias y ribosomas), alteraciones del citoesqueleto y aspecto de burbuja de la membrana, aunque no se rompa. Durante el proceso final ocurre fragmentación del DNA debido a una ruptura internucleosomal del DNA y se forman fragmentos nucleares recubiertos de membrana (cuerpos apoptóticos), que son fagocitados sin evidencia de reacción inflamatoria y fragmentación del núcleo^{93 94}.

El crecimiento tumoral depende del equilibrio entre la proliferación y la pérdida celular, donde juega un papel importante la apoptosis. Los estudios preclínicos en cultivos celulares, modelos animales y biopsias de tumores humanos han demostrado que las células tumorales son resistentes a la apoptosis.

Una posible estrategia contra el cáncer es aprovechar programas de muerte celular intrínsecas. La vía de señalización de EGFR es un objetivo importante para esta estrategia ya que EGF actúa como un factor de supervivencia mediante la inhibición de la apoptosis y provoca el crecimiento del tumor^{95, 96}. Las vías de señalización de PI3K / Akt y MAP / Erk parecen ser importantes mediadores de la supervivencia celular inducida por EGF. Los estudios preclínicos de la inhibición de la señalización de EGFR dirigidos demuestran que este enfoque puede inducir o promover la apoptosis en células tumorales humanas. Como un ejemplo de este efecto, el tratamiento de NSCLC humano o DiFi células (cáncer de colon) en cultivo induce apoptosis^{97,89}. Esta observación no se limita a los anticuerpos anti-EGFR, dado que los inhibidores de EGFR tirosina quinasa (TKIs) también son inductores eficaces de apoptosis.

Una de las mutaciones relacionadas con las vías el EGFR, es la mutación del gen PIK3CA confieren un aumento en la actividad quinasa del PI3K, produciendo una ganancia en su función a favor de señales activadoras. El PIP3 generado por fosforilación activa la cascada de señales dependientes de fosfatidilinositol (PDK1) and protein kinase B (PKB), también conocida como AKT) que a su vez inhibe moléculas pro-apoptóticas (por ejemplo, BAD y BIM), con lo que median supervivencia celular. El resultado de la activación vía PI3K permite la supervivencia celular bajo condiciones adversas de estrés celular, restricción nutrientes y el tratamiento farmacológico del cáncer citotóxica.

La estructura de la maquinaria apoptótica, su programa, y las estrategias utilizadas por las células tumorales para evadir sus acciones, han sido muy apreciadas en el inicio de la última década. Los avances conceptuales más notables desde entonces han implicado otras formas de muerte celular que amplían el alcance de "muerte celular programada" como una barrera para el cáncer.

Potencial replicativo ilimitado.

Capacidad no controlada por EGFR

Angiogénesis mantenida.

En 1971 Folkman propuso por primera vez que para el crecimiento tumoral es necesario la formación de nuevos vasos (angiogénesis)⁹⁸. La Angiogénesis es la formación de nuevos vasos a partir de vasos existentes. Proceso fisiológico en la cicatrización de heridas y el ciclo menstrual. Proceso esencial para la tumorigénesis. En los tumores se produce el 'angiogenic switch' se refiere a la activación de genes específicos que promueven la angiogénesis en una fase temprana de la tumorigénesis mediada por VEGF. La producción de esta

proteína varía en intensidad según la neoplasia (riñón, tumores neuroendocrinos ejemplos de producción alta de VEGF).

La angiogénesis es un importante objetivo para la terapia contra el cáncer. Participan las siguientes moléculas;

- 1) **VEGF/A**: inductor de la angiogénesis. Es una Proteína tirosin quinasa. Se activa por HIPOXIA, por oncogenes específicos, por proteasas de la matriz extracelular, por el FGF (factor de crecimiento de fibroblastos).
- 2) **TSP1 (trombospondina)**: inhibidor de la angiogénesis. Principal efector a la baja del switch angiogénico
- 3) **Angiostatina y endostatina**: inhibidor de la angiogénesis
- 4) Otras vías promotoras de angiogénesis: Ras y MYC

En la formación de nuevos vasos sanguíneos intervienen varios factores angiogénicos, como el factor de crecimiento de fibroblastos básico, citoquinas tales como la interleuquina-8 (IL-8), y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Tanto las células tumorales como las células del estroma (células endoteliales, fibroblastos, células musculares lisas, o pericitos) producen estos factores.

El EGFR está presente en las células del endotelio vascular y también desempeña un papel en la regulación de la angiogénesis⁹⁹. El EGFR, el EGF y el TGF-alfa estimulan la angiogénesis¹⁰⁰. A nivel celular, la expresión de VEGF se incrementa por la activación de EGFR por EGF y TGF- alfa¹⁰¹.

La transcripción de VEGF se ha relacionado con TGF-alfa y está mediada por AP-1 /AP-2 y EGR-1.41

Además, los inhibidores de EGFR disminuyen VEGF, IL-8 y el factor de crecimiento de fibroblastos básico en una variedad de líneas células tumorales^{102,103}.

Por lo tanto, estrategias de bloqueo de EGFR, además de su efecto antiproliferativo directo y los efectos proapoptóticos, también puede inhibir el crecimiento de tumores mediante la limitación de la formación de vasos del tumor.

Capacidad de invasión tisular y metástasis.

Cada vez es más evidente la relación entre las células tumorales y las células del estroma neoplásico para la adquisición de la capacidad de crecimiento invasivo y metástasis¹⁰⁴: contribución heterotópica de las células estromales a la invasión y Metástasis, donde puede jugar el EGF y EGFR. En un modelo experimental de cáncer de mama metastásico, los Macrófagos Asociados al Tumor (TAM) suministran el factor de crecimiento epidérmico (EGF) a estas células tumorales, mientras que las células tumorales recíprocamente estimulan a los macrófagos con CSF-1, su interacción facilita la intravasación en el sistema circulatorio y la diseminación metastásica de las células tumorales.

En modelos in vitro de varios tumores, entre ellos NSCLC, mama y próstata se ha visto que la sobreexpresión de EGFR y /o sus ligandos, se asocian con un fenotipo invasivo. Estos efectos son probablemente mediados por MMPs (metaloproteinassas), dado que los niveles de EGFR se correlacionan directamente con la expresión de MMP-9 y varían inversamente con la inhibición de EGFR.

A partir de modelos de xenoinjertos en carcinoma de células transicionales de vejiga humana tratados con cetuximab y en un modelo de xenoinjerto de cáncer de páncreas tratados con cetuximab solo o en combinación con gemcitabine se han obtenido hallazgos similares.

5. EGFR Y RADIOTERAPIA

Hay varios estudios preclínicos que demuestran la relación del EGFR y la radioterapia:

1. Estudios que han demostrado relación entre el nivel de expresión de EGFR y la resistencia celular a radiación^{105, 106, 107}.
2. Líneas celulares de cáncer transfectadas con vectores de expresión de EGFR son más radioresistentes que líneas parentales^{108, 109, 110}.
3. El grado de radioresistencia se correlaciona positivamente con la magnitud de la sobreexpresión de EGFR¹¹¹.
4. Al contrario, algunas líneas de células transfectadas con EGFR no presentan mayor radioresistencia, indicando que la respuesta a la radiación y la señalización de EGFR dependen de muchos factores. Los niveles de EGFR y estado de activación pueden afectar a la supervivencia de células tumorales durante la irradiación, dado que la irradiación induce la formación de EGFR y TGF-alfa^{112, 113}.
5. Además, la sobreexpresión EGFRvIII constitutivo también conduce a una mayor radioresistencia¹¹⁴. Se ha demostrado que la radiación ionizante imita la interacción ligando-receptor induciendo la auto-fosforilación de los dominios intracelulares de EGFR independiente de ligando¹¹⁵. Como las células tumorales activan la vía intracelular mediada por Ras, generan un bucle sobre EGFR mediante la producción autocrina y paracrina de factor de crecimiento epidérmico, TGF, y anfirregulina y ciclina D1. Esto se traduce en un aumento de la actividad de proliferación, y la repoblación consiguiente puede contrarrestar los efectos de RT (Figura 10).

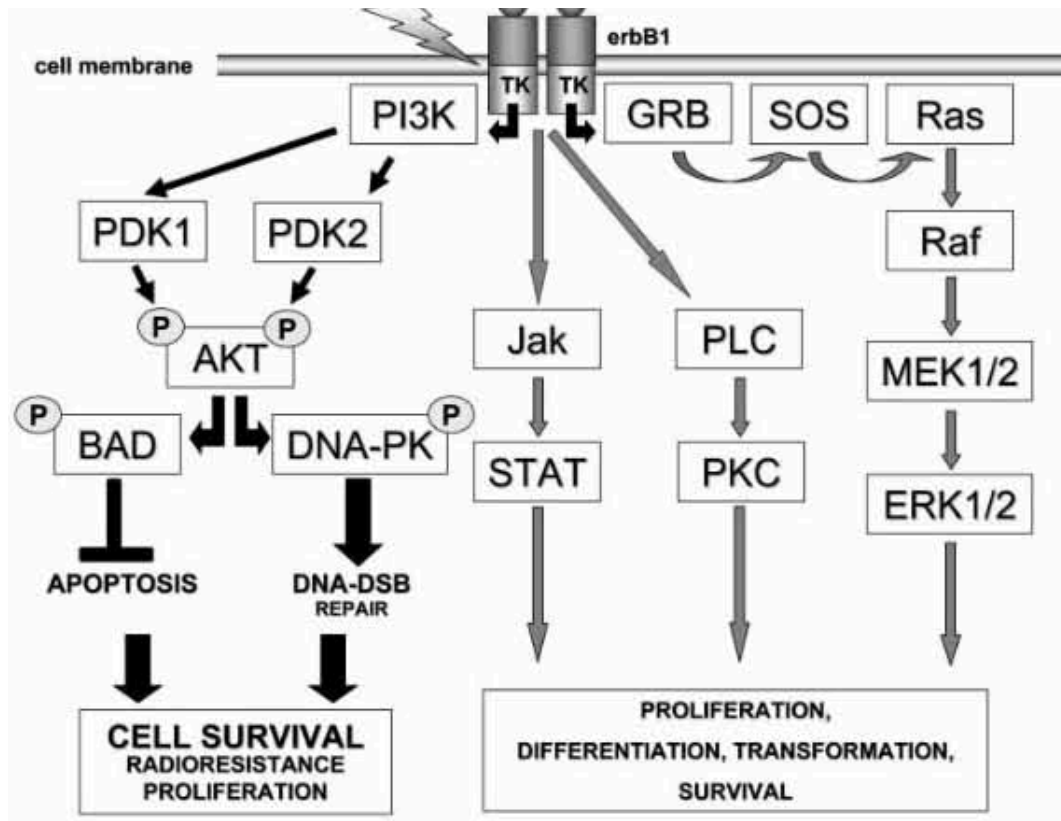


Figura 10. Cascadas de señalización reguladas por EGFR: Representación de erbB1 (EGFR) vías de señalización que directa o indirectamente controlan la actividad de las proteínas clave que regulan el crecimiento, la proliferación y supervivencia celular tras radioterapia.

La expresión de EGFR se correlaciona con radioresistencia, muy probablemente debido a la reparación de la rotura de la doble cadena de DNA^{116, 117, 118, 119}, principal parámetro para respuesta celular a la radioterapia^{120, 121}

6. BLOQUEO EGFR Y RADIOTERAPIA

Como he explicado en el apartado anterior, uno de los mecanismos de radioresistencia es el aumento de la proliferación que condiciona repoblación disminuyendo el efecto de la radioterapia. La proliferación durante la radioterapia se puede explicar por la autofosforilación del dominio intracelular del EGFR que provoca la radioterapia. Como consecuencia, en respuesta a la radiación ionizante, las células tumorales son capaces, a través de hiperactivación Ras desarrollar un bucle autocrino EGFR mediante la producción de forma autónoma de factor de crecimiento epidérmico, TGF, y anfirregulina. Esto se traduce en un aumento de la actividad de proliferación, y la consiguiente repoblación puede contrarrestar los efectos de la RT. En este contexto la inhibición de la señalización de EGFR en combinación con la radioterapia es algo que se ha planteado durante los últimos años, como una estrategia para incrementar el valor terapéutico (figura 11).

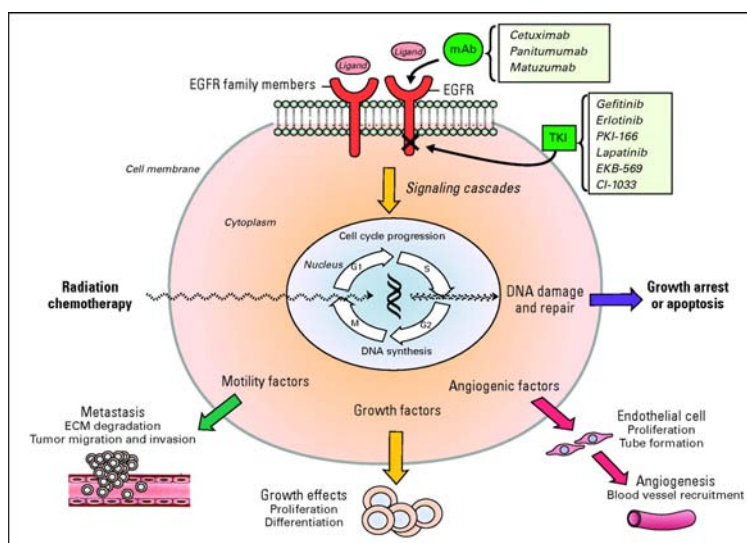


Figura 11. Ilustración de las señales inhibitorias del EGFR y modelos de interacción con quimioterapia y radioterapia.

Los resultados preclínicos proporcionan un fundamento para la inhibición de señalización de EGFR durante radioterapia¹²². Varios estudios in vitro de bloqueo de EGFR han demostrado radiosensibilización¹²³. Esta radiosensibilización se ha demostrado tras administración de mAb anti-EGFR o TKIs^{124, 125, 126, 127}. El bloqueo de EGFR mejora la apoptosis inducida por radiación, lo que sugiere un mecanismo de radiosensibilización mediada por EGFR^{128, 124}.

Los datos de modelos de xenoinjerto in vivo demuestran una interacción positiva similar entre la inhibición de señalización de EGFR e irradiación^{129, 130, 131, 132}. El tratamiento de xenoinjertos de carcinoma de células escamosas con cetuximab y radiación provoca la regresión importante de tumores en ratones atímicos a los 100 días y una disminución de tres veces el tumor en A431 con cetuximab después de la exposición a una fracción de radiación.

Resultados similares se han obtenido tanto para gefitinib y erlotinib. El tratamiento de xenoinjertos cáncer de cabeza y cuello con gefitinib o erlotinib más radiación fue significativamente más eficaz que cualquiera de las modalidades únicas, potencialmente refleja una mayor capacidad de reparación del ADN en tumores expuestos a inhibidores EGFR¹³³. Estos datos presentan evidencia de que en modelos de tumores preclínicos seleccionados, la inhibición de señalización de EGFR interactúa positivamente, y quizás sinérgicamente, con la radiación ionizante.

7. TUMORES DE RECTO

Epidemiología

Incidencia y prevalencia

El cáncer rectal es uno de los tumores más frecuentes.

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) que es el organismo especializado para el cáncer de la Organización Mundial de la Salud (OMS), publicó en 2012, **GLOBOCAN 2012**¹³⁴, son los datos más actualizados a nivel mundial sobre incidencia, prevalencia (1,3 y 5 años) y mortalidad por cáncer de los 28 tipos más frecuentes de 184 países. GLOBOCAN 2012 ofrece una importante información sobre el cáncer también en particular para España, considerando una población de 46.771.000 habitantes, que analizó con detalle la SEOM en el informe de El Cáncer en España 2014 (SEOM)¹³⁵.

El cáncer colorrectal en España es el tumor mas frecuente en 2012, siendo el tercer tumor mas frecuente en hombres tras próstata y pulmón y el segundo en mujeres tras cáncer de mama. La incidencia en ambos sexos es de 15% de entre todos los tumores, con un mortalidad por cáncer de 14.3% y una prevalencia a 5 años de 15,14%.

Factores de riesgo

Aproximadamente entre 5- 10% de los tumores colorrectales tienen una base genética, entre el 1-2% tiene una herencia autosómica dominante. El riesgo de cáncer colorrectal aumenta con el diagnostico de adenomas colorrectales o cáncer colorrectal invasivo en familiares de primer grado. Aquellos con un familiar de primer grado con cáncer colorrectal tienen dos veces mayor riesgo de desarrollar cáncer de colon que la población general.

La susceptibilidad genética al cáncer colorrectal incluye síndromes hereditarios bien definidos, como el síndrome de Lynch (también conocido como cáncer colorrectal hereditario no poliposis [HNPCC]) y la poliposis adenomatosa familiar (PAF) .

Otros factores de riesgo para cáncer colorrectal son¹³⁶:

- Enfermedad inflamatoria intestinal (es decir, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn).
- Tabaco.
- La Carne roja y procesada aumenta significativamente el riesgo de cáncer rectal (RR = 1,65 IC del 95% 1,05- 2,62), así como el papel protector de pescado, con un RR de 0,41 (IC del 95% 0,17-0,97).
- La diabetes mellitus.
- Poca actividad física.
- El síndrome metabólico, la obesidad y el índice de masa / alta corporal (IMC).
- El calcio y la ingesta de leche (> 250 g / día de leche) pueden ser protectores para el cáncer rectal (RR = 0,80; 95% CI 0,66-0,96), así como para el cáncer de colon.
- Algunas terapias médicas como AINE, Terapia hormonal sustitutiva, 0,83).
- El consumo de alcohol (de más de 30 g / día) se asocia con un riesgo ligeramente mayor de cáncer de recto (OR: 1,42; IC del 95%: 1,07-1,88) y se asocia principalmente con la cerveza y el vino.

Anatomía del recto

El recto es la parte mas distal del intestino grueso. Se extiende desde el colon sigmoide hasta el canal anal, por delante del sacro y el cóccix.

Tiene una porción inferior dilatada denominada ampolla rectal, que se sitúa inmediatamente por encima del diafragma pélvico. Tiene un recubrimiento peritoneal en sus lados anterior, derecho e izquierdo en su tercio proximal; solo anteriormente en su tercio medio, y no está recubierto en su tercio distal

Tiene una mucosa y una capa circular que forma tres pliegues transversos permanentes o válvulas de Houston, que parecen sujetar la masa fecal.

Recibe irrigación de las arterias rectales superior, media e inferior y de la arteria sacra media.

La sangre venosa retorna al sistema de la vena porta hepática a través de la vena rectal superior y al sistema de la vena cava o sistémico por medio de las venas rectales media e inferior.

Recibe fibras parasimpáticas a través del nervio esplácnico pélvico.

Anatomía patológica

El tipo histológico predominante en los tumores de recto es el adenocarcinoma, supone el 90% de los cánceres de recto. Otros tipos histológicos menos frecuentes como son carcinomas epidermoides, leiomiomas, tumores carcinoides, melanomas y linfomas. Los adenocarcinomas se suelen subclasificar en tres grados: bien, moderada y pobremente diferenciados; siendo los adenocarcinomas moderadamente diferenciados los más frecuentes.

La evaluación patológica de la pieza quirúrgica de los tumores de recto debe incluir: 1) tipo histológico; 2) el grado de diferenciación; 3) profundidad de penetración y extensión a las estructuras adyacentes (T); 4) el número de ganglios linfáticos regionales evaluados; 5) el número de ganglios linfáticos regionales positivos (N); 6) la presencia de metástasis a distancia a otros órganos o otras localizaciones incluyendo los ganglios linfáticos no regionales (M); 7) márgenes proximal, distal y circunferencial (radial); 8) respuesta al tratamiento neoadyuvante realizado; 9) presencia o no de invasión linfovascular (LVI); 10) presencia o no de invasión perineural (PNI); y 11) el número de tumores.

Diagnóstico y Estadío

El estadío clínico (cTNM) como en todos los tumores permite clasificar los tumores en función del pronóstico y tratamiento a seguir. Se utiliza el sistema

TNM, que para la descripción de la extensión anatómica de la enfermedad se basa en la evaluación en la extensión del tumor primario (T); la ausencia o presencia de las metástasis linfáticas regionales (N) y la presencia o ausencia de metástasis a distancia (M). Se siguen los criterios de la 7ª edición de la American Joint Committee on Cancer (AJCC) y clasifica por estadios del cáncer de recto como se especifica en la siguiente Tabla 5 y Tabla 6.

Tabla 5: CÁNCER COLORRECTAL TNM 7ª edición

T	Tx: no puede evaluarse el tumor primario
	T0: no evidencia de tumor primario
	T1: tumor que invade la lámina propia o la submucosa
	T2: tumor que invade la muscularis propia o subserosa
	T3: tumor que atraviesa la serosa (grasa perirrectal)
N	T4: tumor que invade estructuras adyacentes
	Nx: no pueden evaluarse ganglios linfáticos regionales
	N0: no hay metástasis a los ganglios linfáticos regionales
M	N1: metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos regionales
	N2: metástasis en ≥ 4 ganglios linfáticos regionales
	Mx: no pueden evaluarse metástasis a distancia
M	M0: no hay metástasis a distancia
	M1: metástasis a distancia

Tabla 6: Clasificación por Estadios

Estadio 0	Tis N0 M0
Estadio I	T1-2 N0 M0
Estadio IIA	T3 N0 M0
Estadio IIB	T4 N0 M0
Estadio IIIA	T1-2 N1 M0
Estadio IIIB	T3-4 N1 M0
Estadio IIIC	Cualquier T N2 M0
Estadio IV	Cualquier T N M1

El estadio patológico (pTNM) es el resultado del examen anatómico-patológico de la pieza quirúrgica tras la cirugía. Debe incluir: histología, grado de diferenciación tumoral, el número de ganglios linfáticos extirpados, el número de ganglios con metástasis, los márgenes quirúrgicos (proximal, distal y radial) en los tumores que se haya realizado tratamiento neoadyuvante el grado de regresión tumoral. En estos casos, se añade el prefijo “y” (iatrogénico) al estadio pTNM (ypTNM) para diferenciarlos de aquellos que han sido sometidos directamente a resección quirúrgica sin ningún tipo de terapia neoadyuvante. El estadio patológico es el factor pronóstico más importante en los pacientes con cáncer de recto y es de gran utilidad para hacer una estimación de las probabilidades de control de la enfermedad a largo plazo.

Respuesta a tratamiento preoperatorio y Pronóstico

En pacientes con cáncer de recto tratados con terapia neoadyuvante es importante la respuesta patológica al tratamiento. La máxima respuesta es la respuesta completa patológica (pCR; ypT0N0), que significa que la pieza quirúrgica no presenta células tumorales viables. En caso del recto la respuesta completa patológica supone entre el 10 al 25% de los pacientes.

En el otro extremo esta la progresión tumoral y entre ambas situaciones diferentes grados de regresión pasando por la no respuesta. La respuesta al tratamiento preoperatorio es un factor pronóstico importante en cáncer de recto. La respuesta completa patológica se asocia con una supervivencia del 90%. Para interpretar esta información hay que considerar, sin embargo, el tipo de definición de respuesta utilizada: TNM (ypRC, residuo microscópico, *downstaging*), o criterios de regresión. La utilización de ypRC representa un binario "todo o nada". Hay cuatro escalas para definir la TRG que las represento en la siguiente *Tabla 7*.

Tabla 7. Sistemas de grado de regresión tumoral TRG)

Score	Dworak, (score 0–4) ¹³⁷	AJCC (score 0–3) ¹³⁸	Mandard et al. (score 1–5) ¹³⁹	Memorial Sloan Kettering CC (score 1–3) ¹⁴⁰
TRG 0	Mínima respuesta del tumor al tratamiento	No células tumor residuales	–	–
TRG 1	Fibrosis en <25 % del tumor	Único o pequeño grupo de células	No células tumorales residuales	No tumor residual 86–99 %
TRG 2	Fibrosis en 25–50 % del tumor	Tumor y fibrosis respuesta	Células tumorales excepcionales	Respuesta tumoral: 86–99 %
TRG 3	Fibrosis en >50 % del tumor	Mínima respuesta del tumor al tratamiento	Fibrosis>tumor residual	Respuesta tumoral: ≤85 %
TRG 4	No células tumorales residuales	–	Tumor Residual >fibrosis	–
TRG 5	–	–	Mínima respuesta del tumor al tratamiento	–

Dworak et al. clasifican el grado de regresión en 5 grupos de la siguiente manera, grado 0: no regresión; grado 1: regresión menor (masa tumoral dominante con fibrosis menor del 25%); grado 2: regresión moderada (masa tumoral dominante con fibrosis entre el 26% al 50%); grado 3: regresión buena (predominio de la fibrosis, mayor del 50% de regresión tumoral); grado 4: regresión total (sin células tumorales, solo masa fibrosa). Se publicó el impacto del grado de regresión tumoral (TRG) y la correlación para establecer factores pronósticos en pacientes con cáncer de recto tratados con radio-quimioterapia preoperatoria¹⁴¹. Para ello se utilizaron las muestras quirúrgicas de 385 pacientes tratados dentro del brazo de quimio-radioterapia preoperatoria del ensayo CAO /ARO /AIO-94 (50,4 Gy con fluorouracilo la primera y quinta semana de la radioterapia y cirugía a las 6 semanas a partir del fin de la radioterapia). Se evaluó el grado de regresión tumoral según la cantidad de tumor viable en comparación con la fibrosis, que van desde TRG 4 cuando no se detectaron células tumorales viables, a TRG 0 sin respuesta, ausencia de fibrosis estaba completamente ausente. TRG 3 de regresión se definió como fibrosis en más del 50% con fibrosis superando la masa tumoral, TRG 2 se definió como la regresión de menos de 50%, y TRG 1 se define básicamente como una masa tumoral morfológicamente inalterada. Se encontró TRG 4, 3, 2, 1, 0 en 10,4%, 52,2%, 13,8%, 15,3% y 8,3% de los especí-

menes resecados, respectivamente. La supervivencia a cinco años libre de enfermedad (DFS), después de la quimio-radioterapia neadyuvante y la resección curativa fue 86% para TRG 4, 75% para TRG agrupados 2 + 3, y 63% para los agrupados TRG 0 + 1 (P = 0,006). En el análisis multivariado, los factores pronósticos independientes más importantes para DFS fueron, la T patológica y el estado ganglionar después de la quimio-radioterapia preoperatoria. En resumen, en este ultimo artículo Rodell agrupa los 5 puntos del sistema TRG en tres grupos que incluyen: Regresión completa (TRG 4), Regresión intermedia (TRG 2 and 3), Regresión pobre (TRG 0 and 1). La regresión tumoral completa e intermedia se asociaron con un mejor resultado a largo plazo en pacientes con carcinoma rectal después de radioquimioterapia preoperatoria independiente de los parámetros clínico-patológicas. Estos resultados se mantienen con seguimiento mas largo (tasas DFS a 10 años para pacientes con TRG 4, 2 - 3, o 0 - 1 fueron 90, 74, y 63 %, respectivamente)¹⁴².

Esta definida una relación entre la respuesta al tratamiento y la escala TRG (Tabla 8)

Tabla 8. Relación entre la respuesta al tratamiento y la escala TRG

TRG Dworak (<i>Tumor Regression Grade</i>)	Respuesta al tratamiento
TRG 4	RC
TRG 3	RP MAYOR
TRG 2	RP
TRG 1	RP MENOR
TRG 0	ESTABLE

Según la nccn Version 3.2015 (18/06/15) la respuesta tumoral al tratamiento neadyuvante debe ser gradada en una escala de 0 (Respuesta completa – no células tumorales viables observadas) a 3 (mala respuesta– mínimas o no células muertas; enfermedad tumoral extensa)^{143, 144, 145}.

Tabla 9. *Colorectal cancer tumor regression grade. AJCC Cancer Staging Manual, 7^a Edition (2010) published by Springer NY, Inc.*

Description	Tumor regression grade
No viable cancer cells	0 (complete response)
Single cells or small groups of cancer cells	1 (moderate response)
Residual cancer outgrown by fibrosis	2 (minimal response)
Minimal or no tumor kill; extensive residual cancer	3 (poor response)

Actualmente hay diferentes sistemas de TRG en uso con dos grandes diferencias: los que tienen en cuenta la presencia de tumor residual y los que consideran el tumor residual junto con la presencia de lo que sustituye al tumor (fibrosis, inflamación, grasa, necrosis.). Los rangos van de 3 a 5. Minsky publica un análisis ¹⁴⁶ entre los diferentes sistemas y concluye que el Sistema mas fiable es el de la AJCC y debería ser considerado el estándar.

Un importante punto es que los scores de TRG no tiene encuentra la afectación de los ganglios. La correlación entre los diferentes valores de TRG y la incidencia de ganglios positivos es un área de investigación ¹⁴⁷.

Neoplasia de recto localizado, estadio precoz. Estadio I

El estadio inicial en cáncer de recto se considera a aquellos tumores limitados a la pared rectal, es decir tumores (c /pT1-2 N0 M0). Representan el 3-5% de las neoplasias de recto. Incluyen tumores pequeños móviles, exofíticos, sin factores patológicos adversos como pueden ser el alto grado, invasión vascular o linfática, la histología coloidal, o la infiltración del tumor través de la pared intestinal. Son tumores que pueden ser tratados adecuadamente con tratamiento local.

En pacientes bien seleccionados es decir, aquellos con tumores bien diferenciados, tumores T1, afectación <40% de la circunferencia, sin invasión linfovascular, si la única opción es la resección abdominoperineal (APR), se puede plantear la escisión local como una alternativa¹⁴⁸.

Estadio intermedio (estadio II-III resecables)

Son los tumores localmente avanzados de recto, es decir tumores con extensión más allá de la muscularis propia ($\geq T3$, sin invadir órganos vecinos) y / o aquellos con evidencia clínica o patológica de metástasis ganglionares; en estos tumores el tratamiento es la cirugía, la escisión total del mesorrecto (TME) en un contexto de tratamientos multidisciplinarios de quimioterapia y/o radioterapia neoadyuvante/ adyuvante. Son tumores de recto localizados por debajo de la reflexión peritoneal. Esto se refiere a tumores a 12-14 cm del margen anal. Todo tumor localizado a más de esta distancia, sigue el tratamiento de los tumores de colon.

En cuanto a la posibilidad de que los tumores T3N0 no se consideran candidatos a tratamiento neoadyuvante hay que tener en cuenta que el diagnóstico de ganglios positivos en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado tiene cierto grado de dificultad. La mayoría de los ganglios linfáticos afectados por neoplasia de recto son menores de 1 cm y por los medios diagnósticos habituales como son la resonancia magnética o la ecografía transrectal (EUS) son considerados N0. Según los resultados de un estudio multicéntrico retrospectivo¹⁴⁹, el 22% de los 188 pacientes analizados con neoplasia de recto que se clasificaron con resonancia magnética endorrectal como T3N0 tenían ganglios linfáticos positivos en el análisis patológico de la pieza quirúrgica tras tratamiento preoperatorio, lo que sugiere que muchos pacientes están infraestadiados. Por lo tanto, las guías recomiendan radio-quimioterapia preoperatoria para los pacientes con enfermedad T3N0.

Otra indicación de tratamiento multidisciplinar es cuando en el estudio de extensión se observa invasión del mesorrecto¹⁵⁰. La invasión del mesorrecto es un factor predictivo de enfermedad residual en el margen radial tras cirugía¹⁵¹.

La quimio- radioterapia neoadyuvante es más eficaz que la terapia adyuvante en la reducción de la recurrencia local y en la minimización de la toxicidad¹⁵². Se asocia con downstaging tumoral, mayor tasa de respuesta completa patológica (pRC), estadios pT y pN menos avanzado, menor afectación venosa y perineural, o invasión linfática y aumento de la resecabilidad del tumor¹⁵³. El análisis multivariado confirmó que la respuesta al tratamiento neoadyuvante fue predictivo de mejor supervivencia global en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado^{154, 155}. La pregunta de si el downstaging tumoral tras quimio-radioterapia neoadyuvante aumenta la posibilidad de la cirugía conservadora del esfínter es compleja¹⁵⁶. En este estudio se analizaron un total de 17 ensayos aleatorios, para responder a la pregunta de si el tratamiento neoadyuvante en el cáncer rectal es capaz de aumentar la conservación del esfínter. Los autores concluyeron que el análisis de los más recientes y grandes ensayos fases III no apoya esta hipótesis. No hay datos de la progresión de la enfermedad durante el tratamiento en los grandes ensayos de fase III neoadyuvante.

Papel de la radioterapia en estadio intermedio o localmente avanzado de neoplasia de recto

En el estadio localmente avanzado del cáncer de recto hay dos enfoques de tratamiento. El primer enfoque es el tratamiento preoperatorio, radioterapia o quimio- radioterapia, seguida de cirugía y posterior valoración de quimioterapia adyuvante. El segundo es la cirugía inicial seguida de tratamiento adyuvante de radioterapia y quimioterapia concomitante si el tumor es pT3-4 y / o N1-2¹⁵⁷.

Hay 4 metaanálisis ^{158, 159, 160, 161} sobre el papel de la radioterapia (quimio) neoadyuvante vs adyuvante cuyos resultados son parcialmente contradictorios. Todos ellos demuestran una disminución en la tasa de recurrencia local. El análisis por Camma et al. ¹⁵⁸ y el del Grupo Colaborativo de cáncer Colorrectal ¹⁵⁹ demuestran una ventaja de supervivencia, mientras que el análisis realizado por Munro y Bentley ¹⁶⁰ no lo hizo. El Consejo Sueco de Evaluación de Tecnologías en Salud (SBU) realizó una revisión sistemática de ensayos de radioterapia ¹⁶¹ que demostró que la radioterapia preoperatoria a dosis adecuada mejoraba la supervivencia en un 10%.

Timing de la cirugía tras neoadyuvancia

El intervalo de tiempo óptimo entre finalización de la radioterapia y la cirugía en cáncer de recto es desconocido. A mayor tiempo entre el fin de la radioterapia y la cirugía, mayor downstaging y respuesta completa ¹⁶². Tradicionalmente, en base al intervalos utilizado por el estudio alemán ¹⁵² este intervalo ha sido seis semanas (12 semanas desde el inicio de la radioterapia hasta la cirugía).

Sin embargo, los datos de un estudio que intenta determinar el tiempo de reducción a la mitad de volumen obtenido tras quimioradioterapia en tumores de recto para obtener el tiempo ideal entre el inicio de la radioterapia y la cirugía ¹⁶³ observa que un tumor de tamaño 54 cm³ requiere un intervalo de 20 semanas después del inicio del tratamiento a la cirugía para disminuir a <0,1 cm³ (10 veces el volumen-reducir a la mitad: 140 días). Estos resultados sugieren que retrasar la cirugía más de seis semanas puede ser beneficioso.

Un metaanálisis ¹⁶⁴ de 13 estudios no controlados (principalmente series retrospectivas, un total de 3584 pacientes) concluyó que esperar mas de ocho semanas desde el final de la quimio- radioterapia preoperatoria hasta la ciru-

gía: Aumenta la tasa de respuestas completas patológicas en un 6%; sin diferencias en la tasas de complicaciones y no había evidencia en los resultados oncológicos (el porcentaje de resecciones completas [R0], DFS o la supervivencia global).

- En el ensayo de Lyon 90-01¹⁶⁵ los pacientes con tumores de recto medio y bajo, T2-3 fueron aleatorizados a realizar radioterapia neoadyuvante (39 Gy en 13 fracciones de 3 Gy), seguido de intervalo corto (a las 2 semanas) y intervalo largo (6 -8 semanas) de la cirugía. Se demostró que en el brazo de intervalo largo tuvo mejor respuesta tumoral (72% frente a 53%) y downstaging (26% frente a 10%) que el intervalo corto. En cuanto a la preservación del esfínter fue mayor en el grupo de intervalo largo (76% frente a 68%) aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. No hubo diferencia significativa en OS a 3 años (81% frente a 73%), la recurrencia local (10,3% frente a 9,9%), la mortalidad postoperatoria temprana (3 frente a 4%), o la morbilidad (18 frente a 17%). Sin embargo, la dosis y el fraccionamiento de radioterapia utilizado difiere sustancialmente del esquema típicamente utilizados en la quimio-radioterapia neoadyuvante.

- Actualmente hay un ensayo multicéntrico en marcha (Stockholm III trial), que esta en fase de reclutamiento de pacientes para responder esta pregunta. En 2010 se publicó un análisis interino¹⁶⁶ de 303 pacientes reclutados hasta ese momento. Se aleatoriza a radioterapia esquema corto (5×5 Gy) y posterior cirugía a la semana (grupo 1), esquema corto y cirugía a las 4-8 semanas grupo 2) o radioterapia esquema largo (25×2 Gy) y cirugía a las 4-8 semanas (grupo 3). La toxicidad aguda grave fue baja, con independencia de fraccionamiento. El grupo de pacientes que realizaron radioterapia esquema corto con cirugía a los 11- 17 días después del fin de la RT tubo una mayor tasa de complicaciones. Estos resultados indican que la cirugía tras radioterapia con esquema corto se debe realizar inmediatamente, en un plazo aproximado de

5 días después de la última fracción de RT, o retrasarse durante más de 4 semanas.

- El estudio francés con un seguimiento mas largo (6 años)¹⁶⁷ realizar la cirugía tras 5-6 semanas de finalizar la radioterapia aumenta la respuesta (downstaging) y puede mejorar la viabilidad de la cirugía conservadora de esfínter sin empeorar la mortalidad, la morbilidad, la recidiva local, la supervivencia ni el status funcional.

Esquemas de radioterapia preoperatoria

En el tratamiento de radioterapia neoadyuvante para el cáncer de recto reseca-ble hay dos tipos de esquemas aceptados como estándar: el esquema corto (5 sesiones de 5 Gy) seguido de cirugía inmediata y el esquema largo combinado con cirugía tardía (dosis de radiación convencionales de 1,8 a 2 Gy por fracción, 5-6 semanas, para una dosis total de 45 a 50,4 Gy).

Radioterapia preoperatoria esquema corto vs cirugía sola.

Hay tres ensayos fase III (the Swedish Rectal Cancer Trial, the Dutch Trial, y el MRC trial) que han demostrado un mejor control local en pacientes con cáncer de recto que recibieron radioterapia esquema preoperatoria seguido de cirugía versus cirugía sola, aunque sólo uno demuestra beneficio en la supervivencia (Swedish Rectal Cancer Trial).

- El estudio sueco¹⁶⁸ randomizó 1.168 pacientes a radioterapia esquema corto 25 Gy, administrado en cinco fracciones en una semana, seguida de cirugía versus cirugía sola. Con un seguimiento de cinco años, el grupo de radioterapia sola se asoció con mejora significativa tanto en el control local (89% frente a 73%) como en la supervivencia global (58% vs 48%). Con un segui-

miento mas largo, los pacientes irradiados presentaron mayor número de ingresos hospitalarios por trastornos GI (obstrucción intestinal, dolor abdominal) de dos a cuatro veces mayor en los pacientes irradiados.

- El ensayo MRC/NCIC¹⁶⁹ randomiza 1.350 pacientes afectos de neoplasia de recto, en estadio I a III resecables, a radioterapia preoperatoria corta (25 Gy en cinco fracciones durante una semana) vs cirugía sola. En el grupo control, si la pieza quirúrgica presentaba margen radial positivos se administraba quimio-radioterapia postoperatoria (45 Gy con infusión concomitante 5-FU). Ambos grupos realizaron quimioterapia postoperatoria si tenían márgenes afectos (radial) y / o ganglios positivos. Con una mediana de seguimiento de cuatro años, la tasa de recidiva local fue significativamente menor en el grupo de radioterapia preoperatoria (4,4% frente a 11%). En los pacientes con cirugía TME (596 pacientes)¹⁷⁰ la tasa de recidiva local fue 1% frente al 6%. La supervivencia libre de enfermedad a 3 años fue significativamente mejor en el grupo que recibió radioterapia preoperatoria (78% frente a 72 %, respectivamente), pero no hubo diferencias en la supervivencia global (80% vs. 79%). Un posterior análisis de la calidad de vida¹⁷¹ demostró que el grupo de radioterapia preoperatoria presentaba mayor disfunción sexual, diferencia que fue estadísticamente significativa a los seis meses que aquellos tratados con cirugía sola y que la diferencia persistió hasta dos años. Las críticas de este ensayo son que 315 pacientes eran estadios I y que la mitad de los pacientes no se realizo exéresis mesorrectal total.

- El tercer estudio randomizado¹⁷² fue el Dutch trial que incluyó 1861 pacientes con neoplasia de recto resecable randomizados a solo TME vs. radioterapia preoperatoria esquema corto (25 Gy en 5 fracciones) seguido de TME. El grupo de radioterapia preoperatoria se asocio con mejor tasa de control local a 5 años comparada con TME (5.6 versus 10.9 %) sin diferencias en la supervivencia a 5 años (64% en ambos grupos). Globalmente ambos grupos

tuvieron la misma tasa de complicaciones intraoperatorias y postoperatorias. El grupo de radioterapia presento mas problemas de herida quirúrgica que el de cirugía solo (29%vs. 18%)¹⁷³. Hubo también mayor disfunción sexual y recuperación más lenta de la función intestinal en el grupo de radioterapia frente al de cirugía sola. Con un seguimiento mas largo¹⁷⁴ mas incontinencia fecal (62% versus 38%), rectorragias (11% versus 3%).

El consenso europeo publicado en el Acta Oncológica 2010¹⁷⁵ acuerda que el esquema corto de radioterapia preoperatoria en cáncer de recto localmente avanzado reduce el riesgo de recidiva local. La reducción del riesgo relativo puede ser mayor en cuanto menor es el riesgo absoluto de fallo local. El mayor beneficio absoluto se observa en pacientes con diseminación extramural y con enfermedad ganglionar.

Después de la estandarización de la cirugía TME (conservación del mesorrecto) el único ensayo aleatorizado que compara esquema corto de radioterapia¹⁷⁶ no demuestra beneficio en la supervivencia global. La reducción en la tasa de control local en la mayoría de los tumores intermedios después de la estandarización de TME son demasiado pequeños como para traducirse en un beneficio de supervivencia global con independencia de la modalidad de radioterapia utilizada. Sin embargo los estudios basados en la población¹⁷⁷ han demostrado que desde la normalización de la cirugía del cáncer de recto con TME y la aplicación de la radioterapia preoperatoria se ha producido un beneficio en la supervivencia.

Los ensayos aleatorios que comparan este enfoque con esquema largo de quimio- radioterapia han llegado a la conclusión de que las tasas de recurrencia local (al menos para los tumores no distales), DFS, la recurrencia distal, la supervivencia global y la toxicidad tardía grave no fueron significativamente diferentes.

Sin embargo, en muchas instituciones, se sigue utilizando el esquema largo con quimioterapia neoadyuvante dejando los esquemas cortos en pacientes seleccionados, con enfermedad metastásica para reducir al mínimo el tiempo hasta el inicio de terapia sistémica

Radioterapia preoperatoria esquema largo.

El análisis de los ensayos randomizados que comparan la radioterapia preoperatoria vs cirugía sola han demostrado que el tratamiento combinado a dosis biológicamente efectivas superiores a 30 Gy reduce el riesgo relativo de fracaso local. Sin embargo, estos análisis no incluyen sólo pacientes con esquema radioterapia largo y la mayoría de los pacientes en los ensayos recibieron esquema corto^{158, 159, 160, 161}. Desde la estandarización de TME no ha habido ningún ensayo aleatorizado que compare radioterapia preoperatoria esquema largo vs cirugía sola.

Papel de radio- quimioterapia preoperatoria esquema largo.

Hay dos estudios randomizados publicados que comparan el esquema de radioterapia corto sueco con quimio-radioterapia concomitante preoperatoria con fraccionamiento estándar:

- El ensayo Polaco¹⁷⁸ randomiza 316 pacientes con tumores de recto T3 /4 a radioterapia neoadyuvante corta (5 x 5 fracciones Gy) seguida de TME a los 7 días tras finalizar la radioterapia con radioterapia neoadyuvante esquema largo (fraccionamiento convencional 50,4 Gy con 5-FU en bolus y LV durante las semanas 1 y 5) seguido de TME a las 4-6 semanas. La tasa de pCR fue significativamente mayor en el grupo de radio-quimioterapia convencional (16% vs 1%) y había menos casos de margen radial positivo (4% vs 13%), sin embargo a pesar de que el brazo de quimio-radioterapia preoperatoria pre-

sento una disminución significativa del estadio esto no se tradujo en una mayor tasa de preservación del esfínter, la tasa de preservación del esfínter en ambos grupos fue comparable (58% y 61% , respectivamente), ni en la tasa de recurrencia local (9% vs 14%) ni en DFS (58% vs 56%).

La toxicidad aguda grado 3/4 fue mayor en el grupo de quimio- radioterapia (18% vs 3%). La toxicidad postoperatoria fue similar en ambos grupos (28,3% vs. 27%). No hubo diferencias significativas en la toxicidad tardía grave (10% vs 7%).

El 98% de los pacientes que reciben esquema corto completaron el tratamiento prescrito en comparación con sólo el 69,2% de los pacientes que recibieron quimio-radioterapia larga ¹⁷⁹.

- El segundo estudio randomizado Trans-Tasman Radiation Oncology Group 01.04 trial, randomizó 326 pacientes a esquema corto de radioterapia (5 x 5 fracciones Gy) versus quimio-radioterapia convencional a fraccionamiento estándar (50,4 Gy con infusión concomitante 5-FU) ¹⁸⁰. Los pacientes del brazo de esquema corto realizaron seis ciclos de quimioterapia adyuvante postquirúrgica, mientras que los del grupo de quimio-radioterapia fraccionamiento convencional recibió cuatro ciclos. La tasa de RCp fue mayor en esquema largo (15% vs 1%), no hubo diferencias en las tasas de margen radial positivo o en la preservación del esfínter. Con una mediana de seguimiento de seis años, los pacientes que recibieron esquema largo de quimio-radioterapia tenían una tasa de recidiva local acumulada a 5 años de 2% menor (5,7 vs 7,5%); ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa. Tampoco hubo diferencias significativas en las tasas de recurrencia a distancia, en la supervivencia libre de recidiva, ni supervivencia global, o toxicidad tardía grado 3 o 4. Un sub-análisis de 79 pacientes con tumores distales reveló una incidencia acumulada de recidiva local del 12,5% para el esquema corto y 0% para el esquema largo de quimio-radioterapia.

En conclusión, los dos estudios randomizados demuestran que la radioterapia preoperatoria esquema largo en pacientes con cáncer de recto etapa intermedia, cuando se añade quimioterapia basada en 5-FU a la radioterapia mejora los resultados. Se observó una disminución estadísticamente significativa en la recurrencia local en los que recibieron quimioterapia, así como una mayor tasa de RCp. No hubo beneficio en supervivencia global a cinco años al añadir quimioterapia a la radioterapia preoperatoria.

Como se ha comentado previamente, desde la estandarización del TME, no ha habido ningún ensayo aleatorio que compara el esquema de radioquimioterapia preoperatoria largo con cirugía. Si que hay dos ensayos randomizados que comparan la RT corta preoperatoria con el esquema largo de radioterapia y quimioterapia^{181, 182}. Ninguno de los ensayos, ha demostrado diferencias en cuanto a la tasa de recidiva local, supervivencia libre de enfermedad, la supervivencia global y la toxicidad tardía. La toxicidad aguda fue menor en los grupos de radioterapia preoperatoria corta.

Actualmente, como se ha comentado previamente, esta en marcha el ensayo de Estocolmo III¹⁸³ que dará respuesta a esta pregunta. Es un estudio randomizado fase III que compara radioterapia esquema corto seguido de cirugía inmediata, radioterapia esquema corto con cirugía a las cuatro a ocho semanas o radioterapia esquema largo con cirugía a las cuatro a ocho semanas. Una publicación preliminar¹⁸⁴ de 585 pacientes randomizados sugiere que esquema de radioterapia corta seguida de cirugía inmediata se asocia con un menor conteo de leucocitos y mayor riesgo de complicaciones postoperatorias en comparación con los otros dos grupos.

El papel de la quimioterapia adyuvante tras radioterapia o radioquimioterapia preoperatoria

No hay evidencia suficiente sobre el beneficio de la quimioterapia postoperatoria adyuvante después de la radioterapia o quimio- radioterapia preoperatoria para llegar a un consenso sobre el uso de la quimioterapia adyuvante. Varios ensayos clínicos que han abordado el uso de quimioterapia adyuvante en pacientes con adenocarcinoma recto tratados con terapia neoadyuvante no han demostrado un claro beneficio para su uso. Un metaanálisis recientemente publicado ha evaluado 1.200 pacientes de 4 ensayos aleatorios que estudiaron el papel de la quimioterapia adyuvante en pacientes con cáncer de recto que se habían sometido a radiación preoperatoria o quimiorradioterapia¹⁸⁵. Sólo 1 de los estudios, lo que contribuyó al menor número de pacientes para el análisis, incorporó oxaliplatino en el régimen de quimioterapia adyuvante. La quimioterapia adyuvante no produjo ninguna mejoría estadísticamente significativa en el control de la enfermedad a distancia o supervivencia libre de enfermedad ni supervivencia general. Hubo una tendencia de mejor supervivencia libre de enfermedad con el uso de la quimioterapia adyuvante sólo en los tumores altos (tumores a 10 - 15 cm del margen anal).

Hoy en día los investigadores continúan extrapolando los datos en el cáncer de colon, diferentes guías de consenso tienen diferentes recomendaciones sobre el papel de la quimioterapia adyuvante en pacientes con cáncer de recto (por ejemplo, las directrices de la Red Nacional Integral del Cáncer y el segundo informe europeo rectal Conferencia de Consenso de cáncer).

8. EGFR Y TUMORES RECTO

Expresión del EGFR en tumores de recto y valor pronóstico¹⁸⁶

Esta demostrado que el EGFR puede jugar un papel en la tumorigénesis colorrectal. Los datos preclínicos nos sugieren que los niveles de expresión de ARNm de EGFR y los niveles de EGF son más altos en las áreas del tumor colorrectal que en la mucosa circundante¹⁸⁷. En los modelos experimentales de cáncer de colon, la expresión de TGF- α y la activación de EGFR permiten un aumento del crecimiento de células tumorales y la supervivencia. Por otra parte, en estudios animales, los ratones tratados con inhibidores EGFR y ratones deficientes en tirosina quinasa desarrollan menos pólipos colorrectales en comparación con los ratones no tratados y wild-type, respectivamente, tras administración de agentes inductores de cáncer de colon. En cáncer colorrectal, EGFR esta también asociado a desarrollo tumoral y progresión.

La expresión de EGFR en las células tumorales de la neoplasia de recto es mayor que su expresión en los tejidos vecinos. Los niveles de expresión publicados varían de unos estudios a otros. Esto es debido a los métodos utilizados para detectar la expresión del receptor. Los estudios que utilizan técnicas de unión a ligandos, métodos de blotting o métodos moleculares, tiene normalmente niveles de expresión mas altos que cuando se utilizan técnicas de inmunohistoquímica¹⁸⁸. En los estudios de inmunohistoquímica la expresión varía entre el 50 y 80%^{189, 190, 191, 192, 193} (Tabla 10.).

Tabla 10. Expresión de la familia de *erbB* en cáncer colorrectal

	Aumento expresión comparado con tejido normal	Rango de expresión publicado (%)
EGFR	SI	50-80
erbB2	SI	26- 90
erbB3	SI	55- 89
erbB4	No examinado	No disponible
EGFRvIII	No examinado	No disponible

La amplificación de EGFR se correlaciona con la sobreexpresión de EGFR pero no la predice de manera fiable¹⁹⁴. Las mutaciones en el gen EGFR son poco frecuentes en el cáncer colorrectal, se producen regularmente en otros tipos de tumores, como el cáncer de pulmón .

La expresión de EGFR en cáncer colorrectal, se asocia normalmente a estadios más avanzados de la enfermedad , tumores de más alto grado y tumores con invasión linfovascular^{195, 196}. Sin embargo, esto no esta claro del todo ya que hay otros estudios que no han demostrado una asociación entre expresión de EGFR y estadio o supervivencia en cáncer de colorrectal (Yasui et al, 1988; Moorghen et al, 1990; Koenders et al, 1992; Saeki et al, 1995; McKay et al, 2002).

Niveles altos de expresión de EGFR se ha correlacionado con peores tasas de respuesta en pacientes con neoplasia localmente avanzada de recto tratada con radioterapia preoperatoria y sugieren que la sobreexpresión de EGFR esta asociada a enfermedad mas avanzada, aumento de la habilidad de metástasis y peor pronóstico¹⁹⁷.

La expresión de EGFR en cáncer colorrectal ha sido valorado por Nicholson⁸² como una influencia pronóstica moderada, hasta la actualidad esto aún no ha

sido investigado por más metaanálisis. El papel pronóstico de EGFR en tumores de recto es actualmente controvertido con varios estudios recientes que la expresión no impacta en la supervivencia frente a otros que han encontrado que si lo hace.

Interpretación de los resultados

La expresión del EGFR no es homogénea dentro de las células del tumor^{198, 199, 200}. Para su interpretación se ha utilizado el scoring system publicado por Goldstein¹⁸⁸, en su estudio analiza 102 pacientes con adenocarcinoma colorrectal. El 75,5% de los casos de adenocarcinoma tenía reactividad EGFR; 31,4% de los tumores tenían reactividad 3 en 10-50% de las células neoplásicas y 3.9% reactividad 3 en 50% de las células. La expresión y los resultados para carcinoma colorrectal se define como se muestra en la Tabla 11. Tiene en cuenta el porcentaje de células que expresan y la intensidad con que lo hacen.

Tabla 11. Resultados de Goldstein de la intensidad de inmunorreactividad de EGFR

Extensión de células reactivas (%)	Proporción de casos con reactividad (%)		
	1+	2+	3+
0-10	35.3	29.4	24.5
10-50	33.3	42.1	31.4
> 50	0	0	2.9

Definición: 1+: tinción leve; 2+: tinción moderada; 3+: tinción fuerte

Mutación EGFRvIII del receptor

La mutación del receptor se presenta en varios tumores humanos como mama, pulmón, ovario y gliomas y esta asociada con tumorigénesis. Dicho gen en raras ocasiones esta mutado en cáncer colorrectal. De acuerdo con la Cosmic database on somatic mutations in cáncer, menos del 1% de los carcinomas colorrectales presentan mutación. Hasta la fecha la expresión de EGFRvIII no ha sido descrita en cáncer colorrectal.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

PRIMER Y SEGUNDO ESTUDIO

1. EGFR esta sobreexpresado en muchos tumores humanos.
2. EGFR y otros receptores del familia erbB y la unión a sus ligandos en tumores implica la activación de señales de transcripción que tienen un papel fundamental en la progresión tumoral (proliferación tumoral), disminuye la apoptosis y aumenta reparación DNA.
3. La inhibición del EGFR in vitro e in vivo con radioterapia ha supuesto la inhibición de la proliferación tumoral y la mayor respuesta a radioterapia.
4. La radioterapia puede activar el EGFR y otros receptores tirosin quinasa.
5. La radioterapia sobre las células tumorales puede inducir un incremento de la proliferación celular, disminuye la apoptosis y aumenta reparación DNA. Expresión de EGFR como mecanismo de radioresistencia.
6. Asociación de la expresión de EGFR a mal pronóstico en varios tumores

Todo ello unido a:

7. Posibilidad de determinación del EGFR en tumor, realización de tratamiento preoperatorio en cáncer de recto y posterior valoración de respuesta en función de la anatomía patológica de la pieza

Me planteo:

8. Posibilidad de desarrollar determinaciones inmunohistoquímicas de EGFR que permitan seleccionar pacientes más radio-resistentes que se puedan beneficiar de la estrategias mas agresivas a nivel local.
9. Mejorar el pronóstico de la radioterapia en tumores de recto añadiendo anticuerpos contra dichos receptores que disminuyan la repoblación tumoral (mecanismos de resistencia a la radioterapia) mejorando la respuesta a la misma.

TERCER ESTUDIO

Se ha demostrado recientemente que en tumores localmente avanzado de recto tras tratamiento con cirugía TME se consiguen buenos resultados de control local (7,1% a 10 años) pero sigue presentando una alta tasa de metástasis a distancia (30%)²²².

Esta situación haría pensar que la quimioterapia adyuvante, al igual que en el cáncer de colón, podría disminuir las metástasis pero esto no se ha demostrado.

Me planteo en nuestra serie, si un seguimiento mas largo (10 años), la expresión de EGFR impacta en el pronóstico como objetivo principal. (Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia local).

Si la expresión de EGFR afecta la tasa de respuestas completas a la radioterapia preoperatoria y al pronóstico, si también ocurre con el grado de regresión tumoral.

OBJETIVOS

A partir de la hipótesis previamente descrita nos proponemos los siguientes objetivo:

PRIMER ESTUDIO

OBJETIVO PRIMARIO

1. Estudio para valorar si la sobreexpresión de EGFR en tumores de recto es un predictor de respuesta a la radioterapia preoperatoria con o sin quimioterapia en pacientes tratados en un centro (anexo: publicación en 2002).

OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Describir los niveles de expresión de EGFR en cáncer de recto, en las biopsias diagnósticas previas al tratamiento como en la piezas quirúrgicas tras radioterapia y cirugía.
2. Determinación de posibles factores predictores de respuesta completa patológica.
3. Ver si existe correlación entre expresión de EGFR y los indicadores pronósticos clínicos conocidos (T, N , M, grado de diferenciación...)

SEGUNDO ESTUDIO

OBJETIVO PRIMARIO

1. Estudio para valorar si la sobreexpresión de EGFR en tumores de recto es un marcador pronóstico de supervivencia global, DFS, fallo locorregional y a distancia en pacientes diagnosticados de neoplasia de recto localmente avanzado tratados con radioterapia neadyuvante. (anexo: publicación en 2005 con un seguimiento de 36 meses

OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Describir los niveles de expresión de EGFR en cáncer de recto, en las biopsias diagnósticas previas al tratamiento y en las piezas quirúrgicas tras radioterapia neoadyuvante y cirugía en una muestra con mayor número de pacientes y multicéntrico.
2. Estudio para valorar si la sobreexpresión de EGFR en tumores de recto es un predictor de respuesta a la radioterapia preoperatoria con o sin quimioterapia en pacientes tratados en un varios centros y una muestra más representativa.

TERCER ESTUDIO

OBJETIVOS PRIMARIOS

1. Si la expresión de EGFR esta relacionada con la incidencia de metástasis a distancia como objetivo principal. (Supervivencia libre de enfermedad a distancia) con un seguimiento a largo plazo, 10 años.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Estudio para valorar si la sobreexpresión de EGFR en tumores de recto es un marcador pronóstico de supervivencia global, DFS, fallo locorregional y a distancia en pacientes diagnosticados de neoplasia de recto tratados con radioterapia neoadyuvante a largo plazo
2. Tipo de respuesta a quimio- radioterapia (grado de regresión tumoral) en función de EGFR y su relación con control local y supervivencia.
3. Analizar el patrón de recaída en función de la sobreexpresión de EGFR

4. Significado pronóstico del cambio de expresión de EGFR tras radioterapia preoperatoria con o sin quimioterapia tiene algún significado con control local y supervivencia.
5. Relación entre la intensidad de la expresión o la extensión en el pronóstico y la respuesta. Para valoración como afecta la expresión en el tipo de respuesta al tratamiento neadyuvante.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. PACIENTES. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Este trabajo de investigación es un estudio retrospectivo y multicéntrico en el cual han participado tres centros de nuestro país, en concreto Hospital Vall d'Hebron de Barcelona, Hospital de la Princesa de Madrid y Hospital de Arrixaca de Murcia. Liderado por los Servicios de Oncología Radioterápica y servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron.

En el primer estudio realizado se incluyeron 45 pacientes del Hospital Universitario Vall d'Hebron. En la Tabla 12 se muestran las características de estos primeros pacientes incluidos.

Tabla 12. *Características de los pacientes*

	Número	%
Número de pacientes	45	100
Edad (años)	63.8 (38- 85)	
Sexo (hombre/mujer)	32/13	
Estadio Tumoral		
T2	4	9
T3	35	78
T4	6	13
Estadio ganglionar		
N0	20	44
N1-2	25	56
Grado histológico		
G1	6	14
G2	34	74
G3	5	12

En el segundo y tercer estudio se amplió la muestra y se realizó un estudio multicéntrico. Se han analizado 104 pacientes.

Todos los pacientes fueron tratados durante tres años y medio , entre diciembre de 1997 y agosto de 2001.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- (1) Pacientes diagnosticados de neoplasia de recto, es decir localizados entre el margen anal y a menos de 14 cm del margen anal.
- (2) Confirmación histológica de adenocarcinoma, se excluyeron los tumores con histología de carcinoma escamoso.
- (3) Tumores de recto localmente avanzado, es decir T3- T4 y/o con afectación ganglionar. Se definió como neoplasia de recto localmente avanzada aquella que se extendía a través de la pared rectal o con afectación de adenopatías. Sin metástasis a distancia en el momento del diagnóstico. Todos los pacientes fueron estadiados de acuerdo con la clasificación International Union Against Cancer TNM (UICC/ TNM)²⁰¹.
- (4) Pacientes que realizaron tratamiento de radioterapia neoadyuvante con o sin quimioterapia seguido de exéresis quirúrgica
- (5) Disponer de muestras de tejido tumoral de la biopsia diagnóstica y de la pieza quirúrgica para realizar la inmunohistoquímica.

El estudio de extensión de todos los pacientes consistió en exploración física y pruebas radiológicas. Las pruebas diagnósticas realizadas fueron endoscopia colorrectal, ecografía transrectal, determinación de antígeno carcinoembrionario antes de la cirugía, Tomografía computerizada abdomino pélvica, radiografía de tórax y analítica general.

Tras la aprobación del Comité de Ética del Hospital Vall d'Hebron se obtuvieron las muestras archivadas en los distintos Servicios de anatomía patológica para su análisis.

Se estudiaron las siguientes características: sexo, edad, tamaño tumoral, grado de diferenciación histológica, afectación ganglionar y respuesta patológica al tratamiento preoperatorio

2. TRATAMIENTO

Radioterapia con o sin quimioterapia neoadyuvante

El tratamiento neoadyuvante consistió en radioterapia sobre pelvis, el volumen de tratamiento (CTV) incluyó el tumor y el recto, la pared anterior del sacro y la pared posterior de la próstata o vagina. Los ganglios linfáticos : perirrectales, presacros, hipogástricos, obturadores e iliacos.

Todos los pacientes se trataron con fraccionamiento convencional a 1.80 Gy/sesión, 5 fracciones a la semana hasta una dosis total de 45 Gy. En 8 pacientes se administro una sobreimpresión de 5.4 Gy sobre el tumor. La radioterapia se llevo a cabo con dosimetría 3D, con campos conformados isocéntricos (posterior, anterior y dos campos laterales opuestos con cuñas). La radioterapia preoperatoria sobre la pelvis se administro con fotones de 18 Mv provenientes de un acelerador lineal.

En 63 pacientes se realizó quimioterapia concomitante a la radioterapia (61%). Los esquemas de quimioterapia utilizados fueron dos: 2 ciclos de 5-FU (350 mg/m² iv bolus 1 h antes de la radioterapia los días 1 a 5 y 29 a 33) y leucovorin (20 mg/m² iv bolus inmediatamente antes de cada dosis 5-FU) tratamiento de quimioterapia con fluoropirimidinas orales, UFT 500 mg/día y leucovorin 60 mg/día, de forma diaria durante la radioterapia.

Tras la finalización del los tratamientos preoperatorios se procedió a la valoración de la respuesta al tratamiento realizado. Para el re-estadiaje se realizó examen físico, TC pélvico, radiografía de tórax y analítica general, realizados entre 4-8 semanas tras finalizar los tratamientos.

Posteriormente todos los pacientes realizaron cirugía. La técnica quirúrgica fue resección anterior baja en el 58% de los pacientes y resección abdomino-

peritoneal en el 42%. En todos los casos se realizó resección total del meso-recto.

El estudio patológico de la muestra quirúrgica se estadió de acuerdo con la clasificación International Union Against Cancer TNM (UICC/ TNM).

El tiempo medio entre el fin de la radioterapia y la cirugía fue de 52 días (rango 34-68 días)

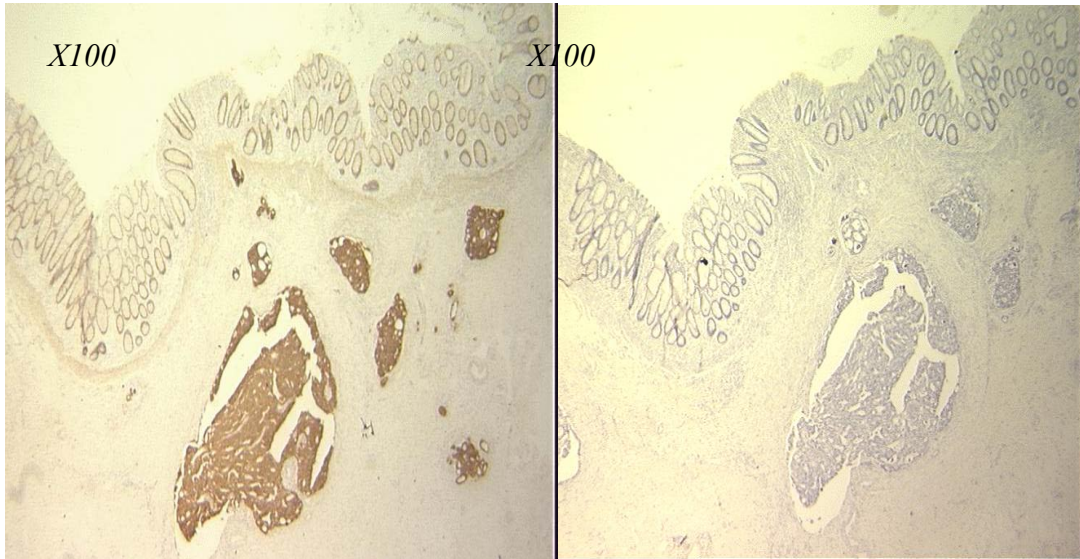
3. DETERMINACIÓN DE EGFR

Técnica de Inmunohistoquímica

La determinación del EGFR ha sido realizada por técnica de inmuno-histoquímica. Se realizó la determinación en los bloques de parafina de las biopsias tanto diagnósticas como en los bloques de las piezas quirúrgicas. Todos los bloques fueron centralizados en un mismo servicio de Anatomía patológica. Se analizaron 104 muestras de biopsia endoscópica y 104 muestras del espécimen quirúrgico del tumor primario.

Dichos bloques se seccionaron cada 5 milímetros. Las secciones obtenidas se desparafinaron con xileno a temperatura ambiente durante 15 minutos y fueron rehidratadas con soluciones de concentración decreciente de etanol hasta llegar al agua destilada. Se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno al 0.2%. Las secciones fueron incubadas en un medio completo durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo monoclonal MU 207-UC (Biogenex, San Ramon, CA) en una dilución de 1:20 (v/v). La reacción de inmunohistoquímica fue realizada usando el método complejo avidina-biotina peroxidasa. Como control negativo se omitió el anticuerpo primario y reemplazado con buffer salino. Como control positivo para expresión de EGFR se utilizó tejido humano de piel. Tanto el control positivo (skin) como el control negativo (muestra no teñida) fueron incluidos

en cada caso (Figura 1). Las muestras fueron examinadas con microscopio de luz. Todas las laminillas fueron evaluadas por dos anatómo-patólogos expertos en cáncer de recto, quienes evaluaron tanto el EGFR como la respuesta a la radioterapia preoperatoria en la pieza quirúrgica.



Sistema de Scoring

Una célula tumoral es EGFR positiva si presenta tinción de membrana por encima del fondo, tanto si completamente circular como si no. Un tumor sin tinción de la membrana por encima del fondo en cualquier célula tumoral se reporta como un tumor-EGFR negativo. Consideramos el tumor EGFR positivo cuando la extensión fue del 5% o más. Si la extensión era menos del 5% fue considerado como EGFR negativo.

Los resultados inmunohistoquímicos también fueron evaluados de acuerdo con su extensión y su intensidad.

La extensión fue definida como el porcentaje de células tumorales positivas para EGFR. Se asignó un score de 1 a 5 de acuerdo con el porcentaje de positividad de células tumorales: 1, menos del 5% de positividad, 2 entre 5%–25%, 3 entre 25%–50%, 4 entre 50%–75%, and 5 mas del 75%.

La intensidad fue graduada cualitativamente como 0: no detectable, 1= leve, 2 = moderado, 3= intenso, se muestran ejemplos en la Figura 2.

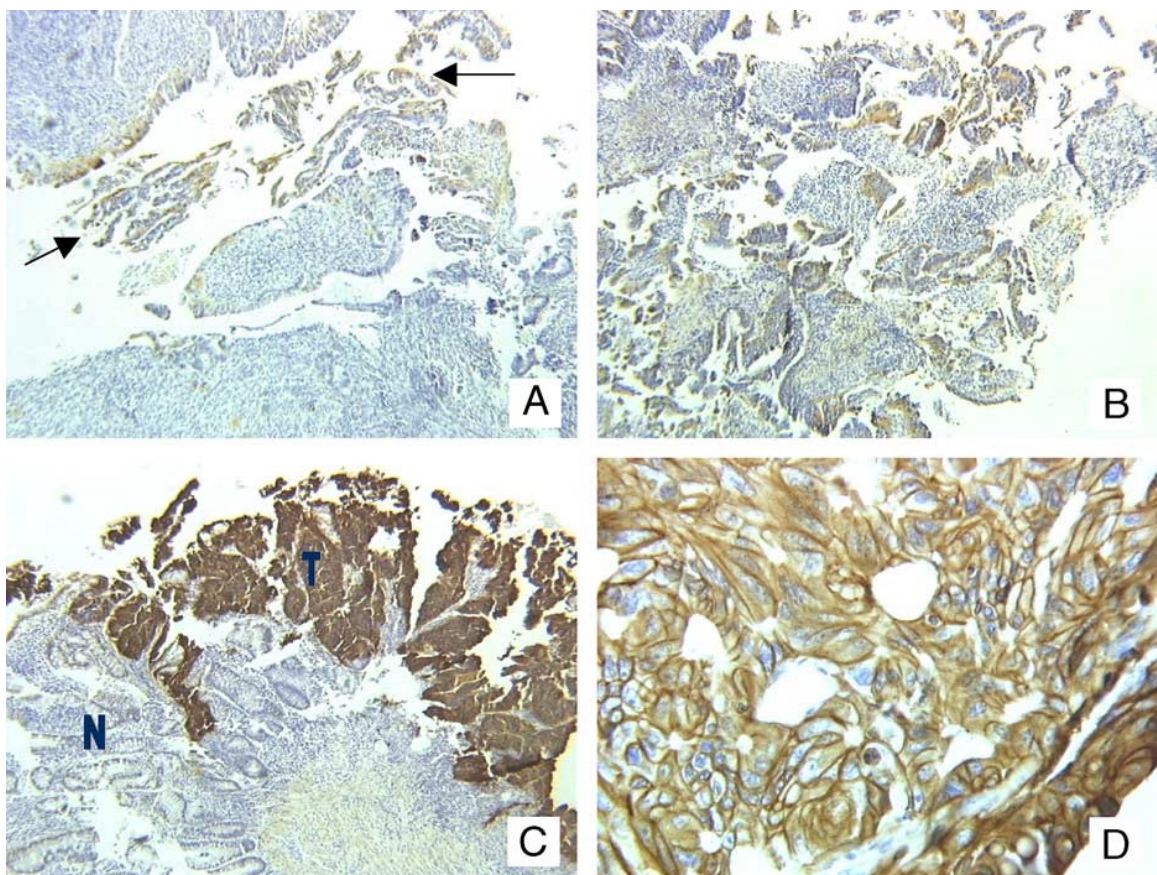


Figura 2 Inmunohistoquímica para EGFR en cáncer de recto: (A) positividad leve en el 50% de las células tumorales (ver flechas) (DAB100X). (B) positividad leve en el 80-90% (DAB100X). (C) inmunoexpresión intensa para EGFR en 100% de las células tumorales (T). Sin expresión inmunohistoquímica en adyacente mucosa normal (N) (DAB100X). (D) la expresión de EGFR con características inmunotinción en membrana (DAB400X).

Se definió como expresión altamente positiva aquella con más del 50% de extensión y/o intensidad grado 3. (EGFR>50).

En figura 3 se muestran otros ejemplos de tinción de inmunohistoquímica y su evaluación.

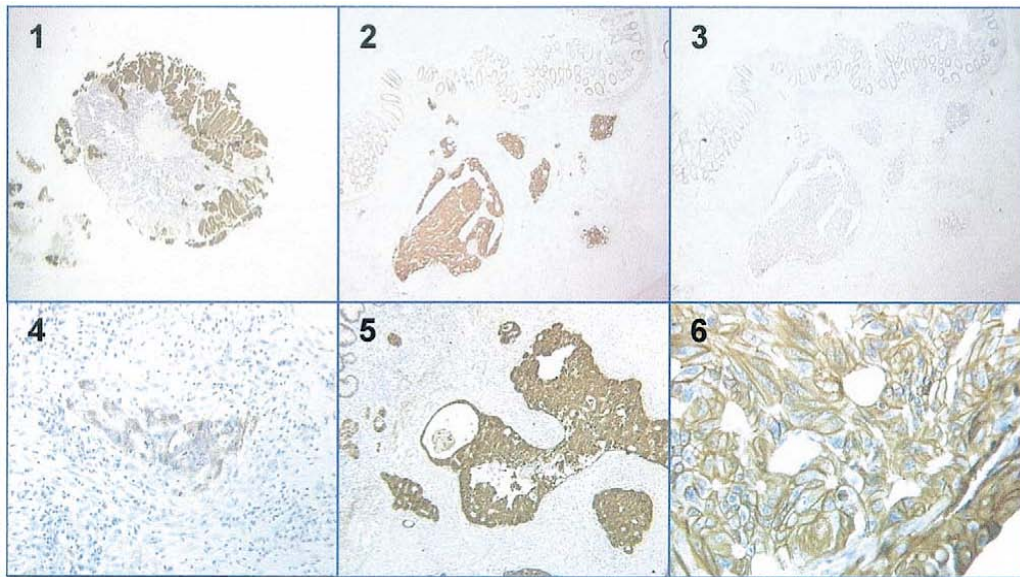


Figura 3. Inmunohistoquímica para EGFR en el cáncer colorrectal: (1) positividad fuerte de las células tumorales en la biopsia endoscópica (X20 aumentos). (2) inmunoreacción positiva en tumor residual post-radioterapia, y (3) Su control negativo (X20). (4) inmunoreacción positiva débil en células tumorales aisladas post-radioterapia (x250). (5) inmunoreactividad muy alta en nido de tumor residual (X100). (6) inmunoreacción positiva en la membrana para EGFR en las células tumorales (X400).

Para valoración de la respuesta al tratamiento neoadyuvante utilizaremos la escala de regresión tumoral de la AJCC descritos en la Tabla 13. El grado de regresión tumoral se clasifica de 0 a 3.

TRG 0: respuesta completa;

TRG 1: respuesta moderada;

TRG 2: respuesta mínima;

TRG 3: mala respuesta.

Tabla 13. El grado de regresión tumoral según la AJCC

Descripción	Tumor regression grade
Células tumorales no viable	0 (Respuesta completa)
Alguna célula tumoral o pequeños grupos de células	1 (Respuesta moderada)
Tumor residual sustituido por fibrosis	2 (Respuesta mínima)
Tumor residual extenso, Mínimas o pocas células muertas	3 (Respuesta pobre)

4. SEGUIMIENTO

Todos los pacientes fueron visitados de forma periódica, el seguimiento realizado constaba de historia clínica, exploración física incluyendo tacto rectal, analítica general, ecografía abdominal, radiografía de tórax y colonoscopia. El seguimiento fue cada 6 meses hasta los 5 años, y a partir del cual fue anual. Se definió como recurrencia como aquel crecimiento dentro de la pelvis, preferiblemente debía hacer biopsiado.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Primer estudio

La posible asociación entre la inmunoexpresión de EGFR y las características clínicas / histopatológicas se determinaron con la prueba de chi cuadrado.

Cuando el número de casos fue menor de 10 se utilizó la prueba exacta de Fisher en tabla de cuatro por cuatro.

Se utilizó un modelo de regresión logística multivariante para estudiar si el género, la localización del tumor, el estadio tumoral, el estadio de los ganglios linfáticos, la diferenciación del tumor y el estatus de EGFR eran predictores independientes de respuesta completa patológica.

Los análisis de datos se realizaron con el software estadístico SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL).

En todo el análisis estadístico se usó un nivel de significación estadística (nivel alfa) de $p=0.05$.

Segundo estudio

Las posibles asociaciones entre inmunexpresión EGFR y características clínicas/histopatológico se determinaron mediante la prueba exacta de Fisher.

El tiempo de seguimiento y el tiempo hasta la recurrencia se calcularon a partir de la fecha de inicio del tratamiento hasta la fecha de resultado pertinente o el último control.

La supervivencia libre de enfermedad (DFS) se calculó como el intervalo entre la fecha de inicio del tratamiento y la fecha de la primera recurrencia de la enfermedad (recidiva local o metástasis a distancia) o el último seguimiento.

El control local y la supervivencia libre de metástasis se definieron como el intervalo entre la fecha de inicio del tratamiento y la fecha de recidiva local o metástasis a distancia, respectivamente.

La supervivencia global (OS), supervivencia libre de enfermedad (DFS), control local y la supervivencia sin metástasis libre se calcularon según el método de Kaplan-Meier.

Los análisis de la asociación entre las variables y el fallo local, metástasis a distancia, DFS y OS generales se realizaron utilizando la regresión Cox.

Para determinar si la expresión de EGFR era un factor independiente de DFS, se utilizó el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox.

La expresión de EGFR y las co-variables relevantes estaban en una base de datos y se analizaron con el paquete estadístico SPSS (SPSS V.11.0, Inc., Chicago, IL). Los test de significación estadística utilizados en este estudio fueron de dos caras y con un nivel de significación de $p=0,05$.

Tercer Estudio

Descripción de las principales características de los pacientes en total y en función de la expresión EGFR. Las variables categóricas nominales son descritas por medio del número de casos, el porcentaje con respecto al total por categoría y el número de datos ausentes. Las variables categóricas ordinales son descritas como las categóricas nominales, o bien por medio del número de casos, la media, el rango intercuartílico y el número de datos ausentes. Las variables continuas son descritas por medio del número de casos, la media, la desviación estándar, la mediana, el rango intercuartílico y el número de datos missing.

Análisis de supervivencia libre de recidiva local / Metástasis / Libre de enfermedad / Global:

El tiempo de supervivencia desde el diagnóstico se analiza por el método de Kaplan-Meyer y se presenta gráficamente para cada una de las medidas de resultado para toda la muestra y en función de la expresión de EGFR tumor pre-tratamiento. Además se estiman los hazard ratio (HR) crudos y ajustados de EGFR positivos respecto EGFR negativos mediante un modelo de Cox para cada una de las medidas de resultado.

Asociación entre la expresión de EGFR tumor pre-tratamiento y recidiva local / metástasis:

Se presenta la asociación entre la expresión de EGFR tumor pre-tratamiento y recidiva local / metástasis por medio de una tabla de frecuencias. La asociación se analiza mediante el test exacto de Fisher.

Acuerdo entre la expresión de EGFR tumor pre y post tratamiento

Se presenta la asociación entre la expresión de EGFR tumor pre-tratamiento y post tratamiento por medio de una tabla de frecuencias. Se analiza el tiempo del diagnóstico hasta la supervivencia libre de recidiva local/ Metástasis / Libre de enfermedad / Global en función de la expresión de EGFR tumor pre y post tratamiento. Se crea una variable con las diferentes opciones de coincidencia y discrepancia entre el EGFR pre/ post tratamiento: ++/+/-+/--. Se estiman los HR crudos y ajustados de cada categoría frente al riesgo de ++ mediante un modelo de Cox para cada una de las medidas de resultado.

Análisis de la intensidad y la extensión EGFR tumor pretratamiento

Se analiza el tiempo del diagnóstico hasta la supervivencia libre de recidiva local /Metástasis /Libre de enfermedad /Global en función de la extensión y la intensidad de la expresión de EGFR tumor pre-tratamiento. Se estiman los HR crudos y ajustados de la intensidad, la extensión y la interacción mediante un modelo de Cox para cada una de las medidas de resultado.

Análisis de la respuesta en función de EGFR tumor pretratamiento

Se analiza el tiempo del diagnóstico hasta la no respuesta /respuesta local /respuesta completa en función de la expresión de EGFR tumor pre-tratamiento. Se estimaran los HR crudos y ajustados de EGFR+ respecto EGFR- mediante un modelo de Cox para cada una de las medidas de resultado.

En todos los modelos de Cox se analizará la asunción de riesgos proporcionales y en caso de violación de la proporcionalidad se procederá en consecuencia. En los modelos de Cox se han utilizado como variables de ajuste la edad, el sexo, el grado de diferenciación y el esquema de tratamiento.

La significación estadística se ha fijado en un nivel de probabilidad $<0,05$. El paquete estadístico que se ha utilizado para hacer los análisis es el R versión 3.2.2 para Windows.

RESULTADOS

1. PRIMER ESTUDIO

De los 45 pacientes estudiados 44% pacientes (20/40) presentaron respuesta a la radioterapia preoperatoria pélvica. Siete pacientes (15%) presentaron respuesta completa patológica, es decir, sin tumor primario residual en la pieza quirúrgica, ni en el tumor primario ni en los ganglios. Trece pacientes presentaron respuesta parcial. En cuanto a la respuesta a nivel ganglionar, no se encontró tumor residual en 11 pacientes de los 25 que inicialmente tenían afectación.

En nuestra serie de 45 pacientes, 29 biopsias fueron EGFR positivas, por lo que la tasa de expresión de EGFR fue del 64%.

En cuanto a la **extensión** de la expresión, en 19 biopsias, la extensión EGFR fue mayor que 75%; en 6 casos, fue entre 25% y 75%; en 4 casos, fue entre el 5% y el 25%.

La **intensidad** fue de grado 1 en 13 biopsias, grado 2 en 7, y grado 3 en el 9. La Tabla 14 muestra la asociación entre la expresión de EGFR en las biopsias tumorales y las características clínicas.

No se encontraron diferencias significativas entre el sexo, la edad, la localización del tumor, estadio tumoral, estadio de los ganglios linfáticos, la diferenciación del tumor, o el tratamiento con quimioterapia y la expresión de EGFR.

Tabla 14. Expresión de EGFR vs variables clínicas

	No	EGFR+		EGFR-		p value
		No.	Rate	No.	Rate	
Total	45	29	64%	16	36%	
Gender						
Male	32	22	75%	10	62%	0.494
Female	13	7	25%	6	38%	
Tumor stage						
T2-T3	39	25	86%	14	87%	0.903
T4	6	4	14%	2	13%	
Nodal stage						
N0	20	13	45%	7	43%	0.944
N1-N2	25	16	55%	9	57%	
Chemotherapy						
Yes	21	13	45%	8	50%	0.739
No	24	16	55%	8	50%	
Clinical response						
Yes	20	10	34%	10	62%	0.07
No	25	19	66%	6	38%	
Pathologic response						
Yes	7	1	3%	6	38%	0.003
No	38	28	97%	10	62%	

Sin embargo, se encontraron diferencias de significación marginal en la tasa de respuesta al tratamiento preoperatorio y la expresión de EGFR. Un 62% de los pacientes con EGFR negativo respondieron a la radioterapia preoperatoria frente al 44% de aquellos con EGFR positivo ($p = 0,07$). Donde si se encontraron diferencias significativas fue en las respuestas completas patológicas. Sólo 1 de los 29 pacientes con EGFR positivo presentaron respuesta respuesta completa patológica (3%), en comparación con el 38% (6/16) de los pacientes EGFR ($p = 0,003$).

El único factor predictor de respuesta al tratamiento con significación estadística en el análisis multivariante fue el estado de EGFR, con una odds ratio de 0,06 (IC: 95%, rango: entre 0,006 y 0,557, $p = 0,013$). Hay una clara relación entre la expresión de EGFR positivo y la falta de respuesta completa patológica.

La expresión de EGFR se evaluó también en las piezas quirúrgicas de 38 pacientes. En los 7 pacientes restantes hubo una respuesta completa por lo que

no se pudo determinar la expresión de EGFR. De las 38 muestras estudiadas, 31 resultaron ser positivos y 7 negativos. Al comparar la expresión en las muestras de biopsia con las de la pieza quirúrgica, encontramos que 25 tumores siguieron siendo positivos de los 29 que lo eran inicialmente, sólo 3 se negativizaron; en una muestra no se encontró tumor (Tabla 15). De las 16 muestras de biopsia que inicialmente fueron EGFR negativas, en 6 muestras no se encontró tumor, sólo el 4 permanecieron negativas, mientras que 6 se convirtieron en positivos.

Tabla 15. *Modificación de la expresión EGFR tras radioterapia preoperatoria*

Biopsy	No.	Surgical specimen	No.	%
EGFR+	29	EGFR+	25	86
		EGFR-	3	10
		pCR	1	4
EGFR-	16	EGFR-	4	24
		EGFR+	6	38
		pCR	6	38

2. SEGUNDO ESTUDIO

Análisis Descriptivo

En esta parte se amplió el estudio a otros centros y el número de pacientes analizados fueron 87. La Tabla 16 recoge las características de los pacientes estudiados. Sesenta y cuatro pacientes fueron hombres y 23 mujeres. La edad media fue de 66 +/- 11.4 años (rango 34–92). Veinticinco pacientes tuvieron afectación ganglionar con una media de número de ganglios afectados de 3,2.

Tabla 16. Características de los pacientes y status de EGFR previo a radioterapia por variables clínicas

	Total		EGFR-		EGFR+		P
	No.	%	No.	%	No.	%	
Total	87	100	35	40	52	60	
Gender							
Male	64	74	28	44	36	56	0.26
Female	23	26	7	30	16	70	
Age							
< 60 years	25	29	10	40	15	60	0.98
≥ 60 years	62	71	25	40	37	60	
Performance status							
0	42	48	19	45	23	55	0.36
1–2	45	52	16	35	29	65	
Tumor stage							
T2	6	7	3	50	3	50	0.47
T3	69	79	29	42	40	58	
T4	12	14	3	25	9	75	
Differentiation grade							
Grade 1	16	21	7	44	9	56	0.91
Grade 2	53	67	20	38	33	62	
Grade 3	10	12	4	40	6	60	
Not evaluable	8	–					
Nodal stage							
N0	50	58	30	60	20	40	0.96
N1-2	37	42	22	59	15	41	
Pathologic response							
Yes	10	11	8	80	2	20	0.006
No	77	89	27	35	50	65	
Pathologic lymph nodes							
Yes	25	29	19	76	6	24	0.059
No	62	71	33	53	29	47	

De los 87 pacientes analizados, treinta y siete pacientes tuvieron respuesta a la radioterapia preoperatoria. El 11% (10 pacientes) tuvieron respuesta completa patológica y en 27 de ellos la respuesta fue parcial (31%).

Respecto a la expresión del EGFR en nuestra serie, fue positiva en 52 de las muestras de las biopsias, una tasa de expresión positiva del 60%.

En cuanto a la **extensión** del EGFR, en 28 biopsias la extensión de EGFR fue mayor del 75%, en 13 casos entre 25 y 75% y en 11 casos menor del 25%.

La **intensidad** del EGFR fue: grado 1 en 25 biopsias, grado 2 en 15 de las biopsias y grado 3 en 12 de las biopsias.

No se encontraron diferencias significativas entre el sexo, la localización del tumor, el estadio tumoral, el estadio ganglionar, el grado de diferenciación del tumor y la expresión de EGFR (Tabla 16).

La expresión de EGFR se evaluó también en las piezas quirúrgicas de 77 pacientes. En los 10 pacientes restantes hubo una respuesta completa por lo que no se pudo determinar la expresión de EGFR. De las 77 muestras estudiadas 53 resultaron ser positivas y 23 negativas. La tasa de expresión en la pieza quirúrgica es de 61%.

EGFR como factor Predictivo de respuesta al tratamiento preoperatorio en cáncer de recto.

Ni la edad, sexo, localización del tumor, estadio tumoral, estadio de los ganglios linfáticos ni el estado de los ganglios linfáticos tras fueron factores predictores de la respuesta al tratamiento preoperatorio. La expresión de EGFR en la biopsia pretratamiento fue el único factor que mostró una asociación estadísticamente significativa con la respuesta al tratamiento. Dos de los 52 pacientes EGFR positivos tuvieron respuesta completa patológica (4%), en comparación con el 23% (8/35) de los pacientes EGFR negativos ($P=0.006$). Por tanto, existe una clara relación entre la expresión de EGFR positivo y falta de respuesta completa patológica.

EGFR como factor pronóstico tras tratamiento preoperatorio en cáncer de recto.

La expresión de EGFR en la biopsia tuvo una fuerte asociación con la DFS (supervivencia libre de enfermedad). Los pacientes con expresión de EGFR positiva tenían DFS significativamente menor que los que tienen expresión negativa de EGFR ($p=0.003$), sin embargo, no se encontraron diferencias en la supervivencia global. Los resultados de la prueba de log-rank para las asociaciones entre las variables clínico-patológicas y DFS se enumeran en la siguiente Tabla 17 y las curvas de supervivencia en la figura 1

Tabla 17. Análisis bivariante de varios factores predictores del pronóstico

	Total		Recurrence		Risk ratio	95% CI	P*
	No.	%	No.	%			
Sex							
Male	64	74	15	34	1		
Female	23	26	11	48	2.65	1.21	5.80
Tumor Stage							
T2-T3	75	86	20	27	1		
T4	12	14	6	50	2.39	0.96	5.96
Differentiation grade							
Grade 1	16	19	5	31	1		0.93
Grade 2	53	57	16	30	0.83	0.30	2.26
Grade 3	10	14	3	33	0.93	0.22	3.88
Nodal stage							
N0	50	58	13	26	1		
N1-2	37	42	13	35	1.19	0.55	2.57
Treatment							
Radiotherapy	37	42	17	46	1		
RT-CT	50	58	9	19	0.30	0.13	0.68
Pathologic Response							
Yes	10	11	1	10	1		
No	77	89	25	34	0.98	0.04	2.20
Pathologic nodes							
Negative	25	29	11	46	1		
Positive	62	71	15	24	2.26	1.04	4.92
EGFR at biopsy							
Positive	52	60	21	41	3.73	1.40	9.92
Negative	35	40	5	14	1		
EGFR > 50							
Positive	38	44	12	41	10.86	1.40	84.22
Negative	49	56	1	5	1		<0.001

*Univariate Cox regression.

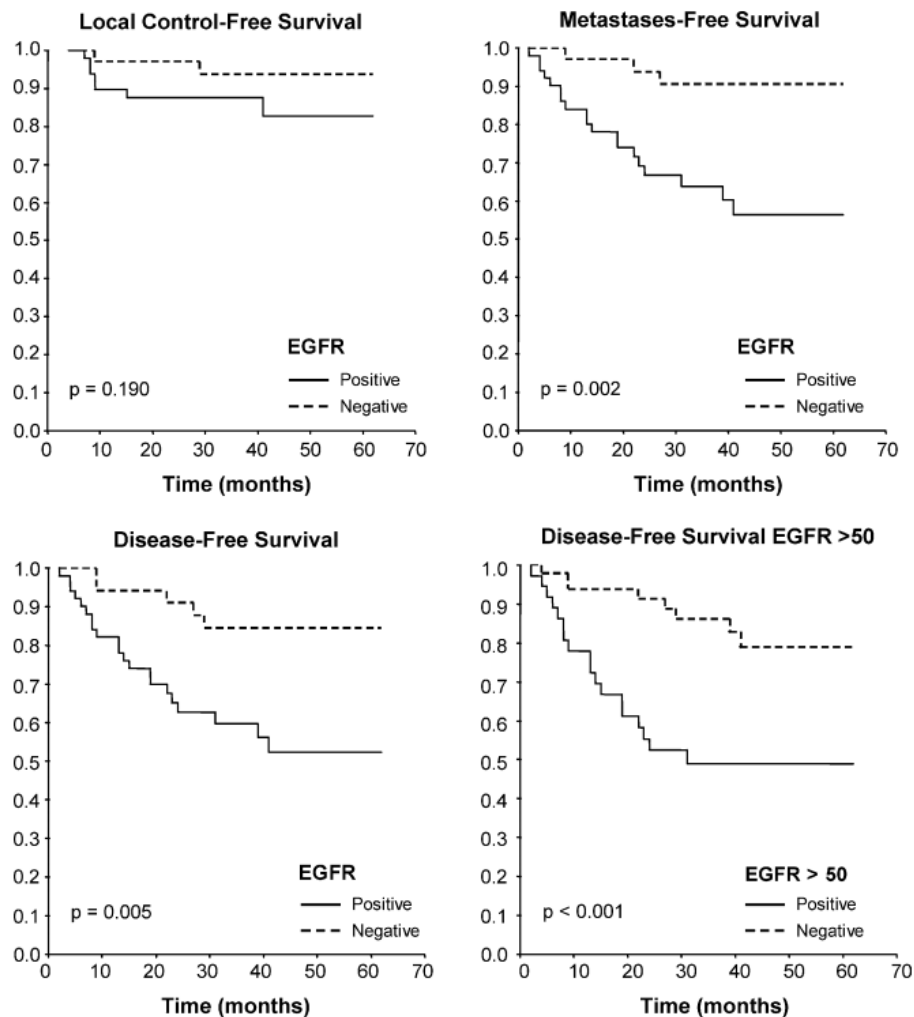


Figura 1. Curvas de Kaplan–Meier para supervivencia libre de enfermedad, control local, supervivencia libre de metástasis con respecto a status antes de radioterapia y DFS en grupo de pacientes EGFR>50.

El control local no mostró asociación significativa con la positividad de EGFR ($P=0.19$) (Log-rank). Siete de los 54 tumores con EGFR positivos presentaron recidiva local (13%) en comparación con la tasa de recidiva del 5% en los tumores EGFR negativo (2 de 42). Sin embargo, los tumores EGFR positivos tienen más probabilidad de presentar metástasis a distancia un 43% (22 de 54) frente al 14% (6 de 42) de los EGFR negativos ($p=0.002$).

También se analizó el valor pronóstico de EGFR>50 (se definió como EGFR>50 o expresión altamente positiva aquella con más del 50% de extensión y/o intensidad grado 3) que se asoció con un DFS más corta, $P<0.001$.

Al examinar el estado de EGFR en la pieza quirúrgica, la DFS de pacientes con EGFR positivos era menor que la de los pacientes EGFR negativos, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0.17$).

El modelo de riesgos proporcionales de Cox para DFS incluye los 87 pacientes. La expresión de EGFR, el estadio tumoral, el tratamiento y el género se introdujeron en el modelo. Estado de EGFR resultó ser un predictor independiente de DFS con un RR= 2,88; IC 95%, 1,07-7,75; $p=0.036$, se muestra en la Tabla 18.

Tabla 18. *Análisis multivariante para Supervivencia libre de enfermedad*

	Risk ratio	95%	CI	P
Treatment	0.35	0.15	0.79	0.012
Gender	2.41	1.10	5.31	0.029
EGFR expression at biopsy	2.88	1.07	7.75	0.036

Basal category: radiochemotherapy; male; EGFR negative.

3. TERCER ESTUDIO

En el momento del análisis actual se tiene información válida de 104 pacientes. Un paciente se retiró del estudio por pérdida en el seguimiento, al no disponer de información fiable sobre su progresión (tipo y fecha). Por otro lado dos pacientes tampoco disponen de información fiable sobre su progresión pero sí sobre su estado vital y la fecha del último contacto. Por tanto el número de pacientes incluidos en el análisis de supervivencia global es de 103 y en el análisis de supervivencia hasta progresión es de 101.

De los 103 pacientes analizados 72 eran hombres (70%) con una edad media de 53 años (desviación estándar de 28 años). Un 25% de los pacientes tenía 50 años o menos y otro 25%, 71 años o más. En un 47% de los pacientes el grado de diferenciación era moderado y en un 40% era desconocido. El esquema de tratamiento era de radioterapia preoperatoria en un 39% y el 61% radio-quimioterapia. En relación al estadio del tumor un 94% eran T3-T4, un 50% N1-2 y un 100% M0.

En cuanto a la expresión de EGFR, 56 pacientes (54%) presentaban EGFR positivo.

Los pacientes EGFR+ y los EGFR- presentan características demográficas y clínicas similares que se muestran en la Tabla 19, si bien los EGFR+, respecto los EGFR-, son de mayor edad (t-test p-value=0.0071).

En la

Tabla 20 se describen las principales medias de resultado por EGFR.

Tabla 19. *Características pacientes.*

Variab les	Total	EGFR-	EGFR+
Sexo			
Hombre	72 (69.9%)	33 (70.2%)	39 (69.6%)
Mujer	31 (30.1%)	14 (29.8%)	17 (30.4%)
Edad (años)			
Mean (SD)	52.9 (28.1)	44.7 (30.9)	59.9 (23.6)
Median (Q1-Q3)	62.0 (49.5 - 71.0)	61.0 (0.0 - 68.5)	65.5 (57.8 - 74.2)
Grado diferenciación			
Bien diferenciado	8 (7.8%)	3 (6.4%)	5 (8.9%)
Moderado	48 (46.6%)	19 (40.4%)	29 (51.8%)
Mal	6 (5.8%)	4 (8.5%)	2 (3.6%)
Desconocido	41 (39.8%)	21 (44.7%)	20 (35.7%)
Esquema de tratamiento			
Radioterapia	40 (38.8%)	14 (29.8%)	26 (46.4%)
Quimio- Radioterapia	63 (61.2%)	33 (70.2%)	30 (53.6%)
T			
T1	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
T2	6 (5.8%)	3 (6.4%)	3 (5.4%)
T3	83 (80.6%)	39 (83.0%)	44 (78.6%)
T4	14 (13.6%)	5 (10.6%)	9 (16.1%)
N			
N0	52 (50.4%)	22 (46.8%)	30 (53.6%)
N1-2	51 (49.6%)	15 (31.9%)	24 (42.9%)
M			
M0	103 (100.0%)	47 (100.0%)	56 (100.0%)
M1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabla 20. *Resultados.*

Variab les	Total	EGFR-	EGFR+
Progresión			
No	74 (71.8%)	39 (83.0%)	35 (62.5%)
Local	3 (2.9%)	1 (2.1%)	2 (3.6%)
Regional	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Metástasis distal sin LR	19 (18.4%)	6 (12.8%)	13 (23.2%)
Metástasis distal con LR	5 (4.9%)	1 (2.1%)	4 (7.1%)
Missing	2 (1.9%)	0 (0.0%)	2 (3.6%)
Estado al final del seguimiento			
NED	60 (58.3%)	33 (70.2%)	27 (48.2%)
ED	1 (1.0%)	0 (0.0%)	1 (1.8%)
Exitus	42 (40.8%)	14 (29.8%)	28 (50.0%)
Respuesta			
No respuesta	50 (48.5%)	18 (38.3%)	32 (57.1%)
Respuesta parcial	41 (39.8%)	20 (42.6%)	21 (37.5%)
Respuesta completa	12 (11.7%)	9 (19.1%)	3 (5.4%)

Análisis de supervivencia libre de recidiva local / Metástasis / Libre de enfermedad / Global:

Los 47 pacientes EGFR- y los 56 EGFR+ presentaron un tiempo de seguimiento de 3644 pacientes-mes y 4060 pacientes-mes respectivamente entre la fecha de progresión/ último control y la fecha de diagnóstico. La mediana del tiempo hasta la progresión de los pacientes EGFR- fue de 59.47 meses y de los pacientes EGFR+ de 43.05 meses. La mediana del tiempo de seguimiento de los pacientes EGFR- fue de 59.47 meses y de los pacientes EGFR+ de 83.37 meses.

Supervivencia Libre de enfermedad

A fecha de progresión 8 pacientes EGFR- y 19 pacientes EGFR+ no estaban libres de enfermedad, equivalente a una tasa de incidencia de enfermedad de 2.20 (IC95% 0.95-4.33) 1000 personas-mes y 4.66 (IC95% 2.81-7.28) 1000 personas-mes respectivamente. El test de log-Rank sugiere la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de supervivencia de EGFR- y EGFR+ (p-valor=0.0418) (figura 2). El hazard ratio (HR) nos indica que el riesgo ajustado de no estar libre de enfermedad es de algo más del doble en el grupo EGFR+ respecto el grupo EGFR- 2.72 (IC95% 1.09-6.77) (tabla 21).

Tabla 21. HR y IC95% de disease-free, local control, metastases-free and overall survival with respect to EGFR status at diagnosis date.

Variables	HR	IC95%	HR ajustado*	IC95%
Time to disease-free ~ EGFR+	2.03	1.01-5.27	2.72	1.09-6.77
Time to local control ~ EGFR+	2.84	0.57-14.12	2.55	0.45-14.52
Time to metastases-free ~ EGFR+	2.36	0.98-5.69	2.73	1.05-7.13
Time to overall survival ~ EGFR+	1.58	0.83-3.01	1.50	0.76-2.94

*Modelo ajustado por edad, sexo, grado y esquema de tratamiento.

Supervivencia Libre de control local

A fecha de progresión 6 pacientes EGFR- y 2 pacientes EGFR+ presentaban enfermedad local, equivalente a una tasa de incidencia de enfermedad local de 1.47 (IC95% 0.54-3.21) 1000 personas-mes y 0.55 (IC95% 0.66-1.98) 1000 personas-mes respectivamente. El test de log-Rank sugiere la no existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de supervivencia de EGFR- y EGFR+ (p-valor=0.1801) (figura 2).

Supervivencia Libre de metástasis

A fecha de progresión 8 pacientes EGFR- y 19 pacientes EGFR+ presentaban metástasis, equivalente a una tasa de incidencia de metástasis de 1.92 (IC95% 0.78-3.96) 1000 personas-mes y 4.17 (IC95% 2.42-6.68) 1000 personas-mes respectivamente. El test de log-Rank sugiere la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de supervivencia de EGFR- y EGFR+ (p-valor=0.0491) (figura 2). El HR nos dice que el riesgo ajustado de metástasis es de algo más del doble en el grupo EGFR+ respecto el grupo EGFR- 2.73 (IC95% 1.05-7.13) (tabla 21).

Supervivencia global

A fecha del último control 14 pacientes EGFR- y 28 pacientes EGFR+ habían fallecido, equivalente a una tasa de incidencia de mortalidad de 3.71 (IC95% 2.03-6.23) 1000 personas-mes y 5.70 (IC95% 3.78-8.23) 1000 personas-mes respectivamente. El test de log-Rank sugiere la no existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de supervivencia de EGFR- y EGFR+ (p-valor=0.1599) (figura 2).

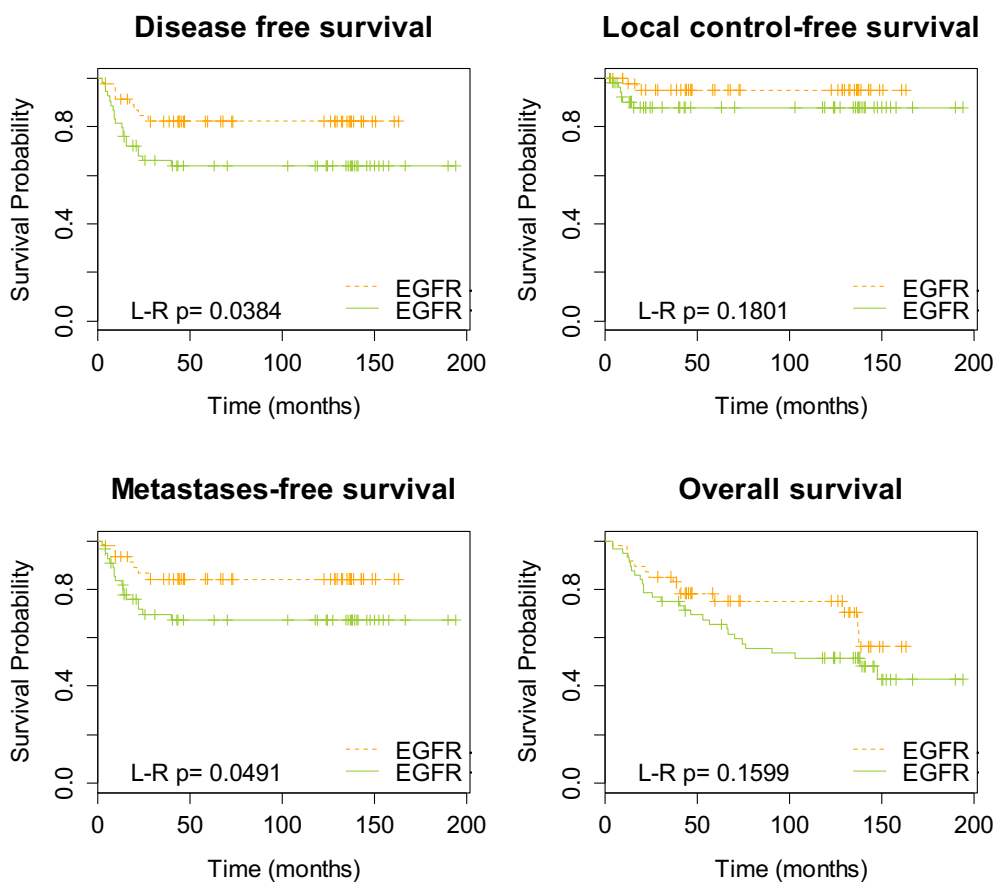


Figura 2. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para, el control local libre de enfermedad, libre de metástasis y la supervivencia global en lo que respecta a la condición de EGFR antes de la fecha del diagnóstico.

Asociación entre la expresión de EGFR tumor pre-tratamiento y recidiva local / metástasis:

En la tabla 22 se presenta la asociación entre recidiva local y metástasis respecto EGFR+. No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre presentar una recidiva local y presentar EGFR positivo (Test exacto de Fischer p-valor=0.4636), sin embargo sí una asociación estadísticamente significativa con padecer metástasis (Test exacto de Fischer p-valor=0.0293). La razón de incidencia de metástasis en los pacientes EGFR + respecto los EGFR - era de 2.17 (IC95% 0.86, 6.19).

Tabla 22. Asociación entre la expresión de EGFR tumor pre-tratamiento y recidiva local / metástasis

Variables	Total	EGFR-	EGFR+
Recidiva local*			
No	78 (75.7%)	33 (70.2%)	45 (80.4%)
Sí	8 (7.8%)	2 (4.3%)	6 (10.7%)
Missing	17 (16.5%)	12 (25.5%)	5 (8.9%)
Metástasis**			
No	68 (66.0%)	32 (68.1%)	36 (64.3%)
Sí	18 (17.5%)	3 (6.4%)	15 (26.8%)
Missing	17 (16.5%)	12 (25.5%)	5 (8.9%)

* Test exacto de Fischer p-valor=0.4636

** Test exacto de Fischer p-valor=0.0293

En la tabla 23 se muestra de forma descriptiva la asociación entre la expresión de EGFR tumor pre-tratamiento y la localización de las recidivas locales.

Tabla 23. Asociación entre la expresión de EGFR tumor pre-tratamiento y localización de las recidivas locales.

Variables	Total	EGFR-	EGFR+
Localización			
Anastomosis	2 (22.2%)	1 (50.0%)	1 (14.3%)
Presacra	5 (55.6%)	0 (0.0%)	5 (71.4%)
Perineal	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Pélvica	2 (22.2%)	1 (50.0%)	1 (14.3%)
Otra	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

Acuerdo entre la expresión de EGFR tumor pre y post tratamiento

En relación al acuerdo entre la expresión de EGFR tumor pre-tratamiento y EGFR tumor post tratamiento se observa que el 79% de los pacientes EGFR positivos permanecen EGFR positivos, el 21% de los pacientes EGFR positivos se negativizan, el 66% de los pacientes EGFR negativos permanecen EGFR negativos y el 34% de los pacientes EGFR negativos se positivizan (tabla 24).

Tabla 24. Acuerdo entre la expresión de EGFR tumor pre-tratamiento y EGFR tumor post tratamiento

Variables	EGFR-	EGFR+
Post-tratamiento*		
EGFR-	25 (65.8%)	11 (20.8%)
EGFR+	13 (34.2%)	42 (79.2%)

*Test Chi cuadrado p-valor<0.0001

El 79% de los pacientes + permanecen +. El 21% de los pacientes + se negativizan.

El 66% de los pacientes - permanecen -. El 34% de los pacientes - se positivizan.

En la figura 3 se comparan las curvas de supervivencia de los diferentes escenarios fruto de la combinación de la expresión de EGFR tumor pre-tratamiento y EGFR tumor post tratamiento. El test de log-Rank no sugiere la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de supervivencia de EGFR++, EGFR+-, EGFR-- y EGFR-+ (p-valor= 0.2415). Un análisis más en detalle comparando los pacientes que se positivizan (EGFR-- vs EGFR-+) y los que se negativizan (EGFR++ vs EGFR+-) tampoco permite ver diferencias estadísticamente significativas (p-valor= 0.9033 y p-valor= 0.8132 respectivamente).

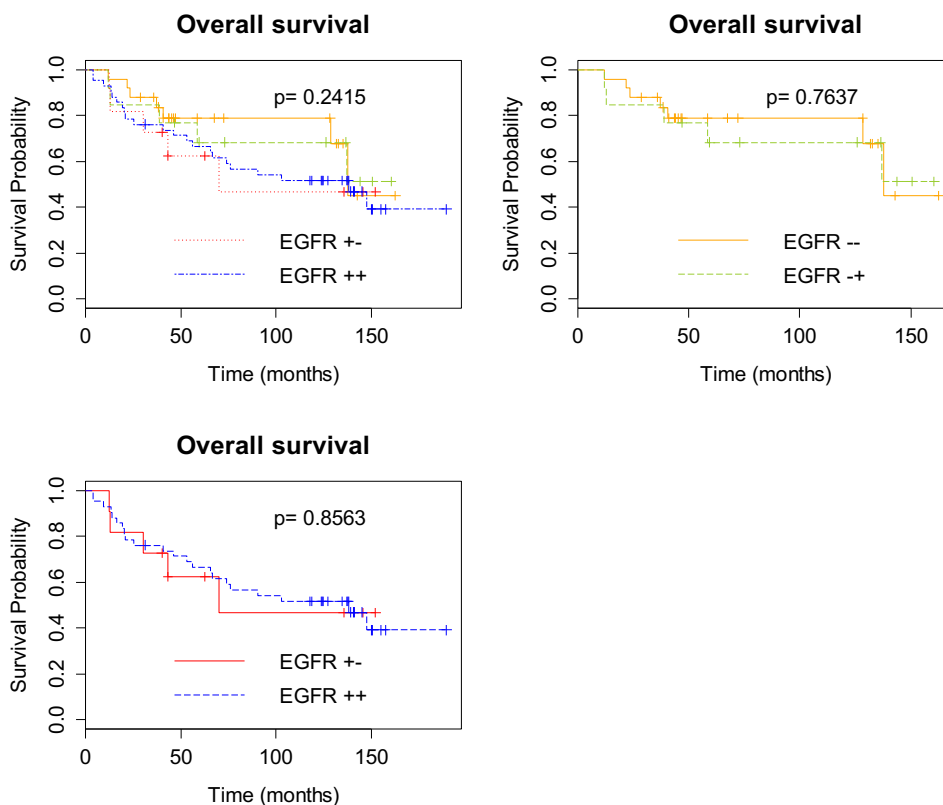


Figura 3 Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para la supervivencia global en lo que respecta a la condición de EGFR pre-post tratamiento.

Análisis de la intensidad y la extensión EGFR tumor pretratamiento

Para el subgrupo de pacientes EGFR positivo, en las tablas 25 a 28, se presenta los HR crudos y ajustados de la intensidad y la extensión en relación a los diferentes outcomes. En general no se han encontrado resultados estadísticamente significativos salvo para libre de enfermedad. El riesgo ajustado de no estar libre de enfermedad es un 20% mayor por cada 10% más de extensión 1.20 (IC95% 1.02- 1.42).

Tabla 25. Modelo de regresión de cox para time to disease-free

VARIABLES	HR	IC95%	HR ajustado*	IC95%
Intensidad				
Normal vs Leve	0.54	0.12-2.45	0.68	0.14-3.17
Normal vs Moderado	0.69	0.14-3.31	0.74	0.12-4.36
Normal vs Intenso	0.72	0.12-4.24	0.72	0.11-4.62
Extensión				
+10%	1.19	1.01-1.39	1.2	1.02-1.42

*Modelo ajustado por edad, sexo, grado y esquema de tratamiento.

Tabla 26. Modelo de regresión de cox para time to local control.

VARIABLES	HR	IC95%	HR ajustado*	IC95%
Intensidad				
Normal vs Leve	0.31	0.01-8.14	0.31	0.01-8.4
Normal vs Moderado	1.18	0.06-22.61	0.74	0.02-24.84
Normal vs Intenso	1.74	0.07-44.14	1.08	0.04-32.41
Extensión				
+10%	1.19	0.88-1.60	1.26	0.92-1.73

*Modelo ajustado por edad, sexo y esquema de tratamiento.

Tabla 27. Modelo de regresión de cox para time metastases-free.

VARIABLES	HR	IC95%	HR ajustado*	IC95%
Intensidad				
Normal vs Leve	0.76	0.17-3.32	0.9	0.2-4.12
Normal vs Moderado	0.58	0.1-3.2	0.64	0.1-4.26
Normal vs Intenso	1.07	0.19-6.06	1.11	0.18-6.92
Extensión				
+10%	1.15	0.99-1.35	1.16	0.98-1.36

*Modelo ajustado por edad, sexo, grado y esquema de tratamiento.

Tabla 28 Modelo de regresión de cox para time overall survival.

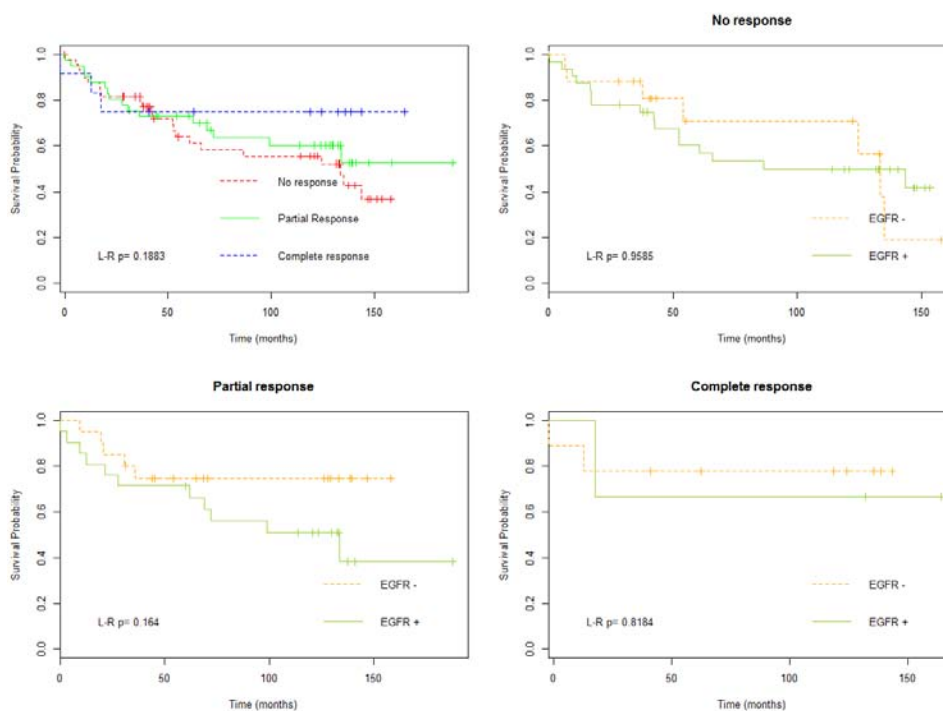
Variables	HR	IC95%	HR ajustado*	IC95%
Intensidad				
Normal vs Leve	0.77	0.28-2.17	0.76	0.27-2.16
Normal vs Moderado	1.25	0.40-3.92	1.19	0.34-4.11
Normal vs Intenso	2.44	0.84-7.07	2.28	0.76-6.80
Extensión				
+10%	1.03	0.93-1.14	1.03	0.93-1.15

*Modelo ajustado por edad, sexo, grado y esquema de tratamiento.

Análisis de la respuesta en función de EGFR en tumor pre tratamiento

El test de log-Rank no sugiere la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de supervivencia de no respuesta, respuesta parcial y respuesta completa (p-valor=0.1883) (figura 4).

Figura 4. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para no respuesta, respuesta parcial y respuesta completa para todos los pacientes y cada tipo de respuesta en relación a la condición de EGFR antes de la fecha del diagnóstico.



En la tabla 29 se presenta la asociación entre la respuesta y la condición de EGFR. El porcentaje de no respuesta de los pacientes EGFR- es del 38.3% y de los pacientes EGFR+ es del 57.1% (p-valor=0.0876). El porcentaje de respuesta parcial de los pacientes EGFR- es del 42.6% y de los pacientes EGFR+ es del 37.5% (p-valor=0.7491). El porcentaje de respuesta completa de los pacientes EGFR- es del 19.2% y de los pacientes EGFR+ es del 5.4% (p-valor=0.0355).

Tabla 29. Asociación entre no respuesta, respuesta parcial y respuesta completa en relación a la condición de EGFR .

Respuesta	EGFR-	EGFR+	p-valor
No respuesta:	No 29 (61.7%)	24 (42.86%)	0.0876*
	Sí 18 (38.3%)	32 (57.14%)	
Respuesta parcial:	No 27 (57.45%)	35 (62.5%)	0.7491*
	Sí 20 (42.55%)	21 (37.5%)	
Respuesta completa:	No 38 (80.85%)	53 (94.64%)	0.0355**
	Sí 9 (19.15%)	3 (5.36%)	

*Test de Chi-cuadrado; **Test exacto de Fisher

No respuesta tumoral

A fecha de cirugía 18 pacientes EGFR- y 32 pacientes EGFR+ no presentaban respuesta, equivalente a una tasa de incidencia de no respuesta de 5.06 (IC95% 3.00-7.99) 1000 personas-mes y 6.89 (IC95% 4.71-9.73) 1000 personas-mes respectivamente. El test de log-Rank no sugiere la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de supervivencia de EGFR- y EGFR+ (p-valor=0.9585) (figura 4).

Respuesta parcial

A fecha de progresión 20 pacientes EGFR- y 21 pacientes EGFR+ presentaban respuesta parcial, equivalente a una tasa de incidencia de respuesta parcial de 5.62 (IC95% 3.43-8.68) 1000 personas-mes y 4.52 (IC95% 2.80-6.91)

1000 personas-mes respectivamente. El test de log-Rank no sugiere la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de supervivencia de EGFR- y EGFR+ (p-valor=0.164) (figura 4).

Respuesta completa

A fecha de progresión 9 pacientes EGFR- y 3 pacientes EGFR+ presentaban respuesta completa, equivalente a una tasa de incidencia de respuesta completa de 2.53 (IC95% 1.16-4.80) 1000 personas-mes y 0.65 (IC95% 0.13-1.89) 1000 personas-mes respectivamente. El test de log-Rank no sugiere la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de supervivencia de EGFR- y EGFR+ (p-valor=0.8184) (figura 4).

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

El EGFR está expresado en muchos tumores humanos. El grado de expresión varía dependiendo del tipo de tumor, en nuestra serie analizamos la expresión de EGFR en 103 pacientes con tumor de recto y fue de 54%. Estos resultados son consistentes con los estudios publicados cuya expresión de EGFR en cáncer de recto es de 50-80%^{189, 190, 191, 193}. Este amplio rango de expresión de EGFR se puede explicar por la diferente metodología utilizada para la detección de la expresión²⁰². Los estudios que utilizan técnicas de unión a ligandos, métodos de blotting o métodos moleculares, tienen normalmente niveles de expresión más altos que cuando se utilizan técnicas de inmunohistoquímica. Otro de los motivos puede ser, como definimos EGFR positivo. En nuestro estudio consideramos que la expresión por debajo del 5% de la extensión son negativas. Actualmente el valor más consensuado o más frecuentemente utilizado para definir la expresión positiva es si es mayor del 1%.

La expresión de EGFR no solo varía en función de los tumores de cada órgano o tejido, sino que también pueden variar en tumores del mismo tipo. Las posibles causas de esta situación son:

- En primer lugar, mientras que los tumores sólidos se han clasificado clásicamente según sus características histológicas, las nuevas técnicas moleculares han demostrado que los que considerábamos el mismo tipo histológico son heterogéneas respecto a la citogenética y a los perfiles de expresión proteica.
- En segundo lugar, diferencias debidas a los diferentes métodos utilizados para la medida de la expresión de EGFR.
- En tercer lugar, la determinación del EGFR se realiza sobre una muestra de tumor que en alguna situación podría ser no representativa del tumor.

VALOR PREDICTIVO DE RESPUESTA

Nuestro estudio demuestra que EGFR se expresa más en aquellos tumores que tienen mala respuesta al tratamiento de radioterapia preoperatoria en cáncer de recto. Solo el 4% de los tumores que expresaban EGFR tuvieron respuesta completa patológica frente al 23% de los EGFR negativo y esta diferencia es estadísticamente significativa ($p=0.006$).

En cuanto a la recidiva locorregional los pacientes con tumor EGFR positivo tuvieron un 11% de recidiva frente al 4% de EGFR negativo. El valor predictivo de la expresión de EGFR en la respuesta tumoral y la recurrencia locorregional tras tratamiento preoperatorio de cáncer de recto ha sido por varios autores^{203, 215}. Los estudios demuestran que la expresión de EGFR evaluado por inmunohistoquímica es un factor predictor de respuesta y de recurrencia locorregional tras radioterapia preoperatoria con o sin quimioterapia y cirugía para cáncer de recto.

La falta de respuesta a la radioterapia preoperatoria en aquellos tumores que expresan EGFR podría explicarse ya que el EGFR puede explicar la radioreistencia. El EGFR esta sobreexpresado en mucho tumores humanos y EGFR y otros receptores del familia erbB y la unión a sus ligandos en tumores implica la activación de señales de transcripción que tienen un papel fundamental en la progresión tumoral (proliferación tumoral), es decir la expresión de EGFR puede estar relacionada con la repoblación acelerada la cual es un mecanismo de resistencia a radioterapia. Eriksen y colaboradores²⁰³ demostraron que en tumores de cabeza y cuello con expresión de EGFR alta y moderadamente o bien diferenciados tienen mejor respuesta a la radioterapia cuando se reduce el tiempo total de tratamiento.

Varios estudios han demostrado relación entre el nivel de expresión de EGFR y la resistencia celular a radiación^{105, 106, 107}. El grado de radiorresistencia se correlaciona positivamente con la magnitud de la sobreexpresión de EGFR¹¹¹.

En la tabla 30 se muestran los estudios mas importantes que relacionan EGFR con la predicción de respuesta a tratamiento neadyuvante en cáncer de recto.

Tabla 30. *Expresión de EGFR y predicción de respuesta a tratamiento neadyuvante en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado*

autor	Pts. n.	Métodos	Tratamiento	Endpoint	comentario
Kim ²⁰⁴	183	IHC	50 Gy 5-FU + LV	TRG TNM downstaging	Alta expresión de EGFR menor TNM downstaging
Spindler ¹⁹⁴	77	PCR/DNA	65 Gy UFT + LV	TRG	EGFR se asocia a respuesta tumoral
Spindler ²⁰⁵	60	PCR/DNA	65 Gy UFT + LV	TRG	Combinación EGFR Sp1-216T se asocia con regresión tumoral
Bertolini ²⁰⁶	91	IHC	50 Gy 5-FU	TRG TNM downstaging DFS/OS	No correlación
Toiyama ²⁰⁷	40	PCR/RNA	20 Gy 5-FU + UFT	TNM Grading	Baja expresión EGFR asociado a alta tasa de respuesta
Bengala ²⁰⁸	39	IHC, FISH PCR/DNA	50.4 Gy 5-FU + Cetuximab	TRG	Alta expresión de EGFR y KRAS wild-type asociado a respuesta a tratamiento
Nuestra serie	103	IHC	45-50.4 Gy ± 5-FU + LV or UFT + LV	pCR TRG	Expresión de EGFR asociado a menor pCR No con respuesta parcial

Me planteo la posibilidad de desarrollar determinaciones moleculares de EGFR que permitan seleccionar pacientes más radio-resistentes. Según nuestros resultados serían aquellos pacientes que expresan EGFR medido por técnica de inmunohistoquímica y valorar si se podrían beneficiar de estrategias mas agresivas a nivel local. Existen varios estudios randomizados²⁰³, en otras localizaciones tumorales como es en tumores de cabeza y cuello que demuestran que disminuir el tiempo global de tratamiento de radioterapia con dosis total constante aumenta la probabilidad de control local y supervivencia causa específica, concepto relacionado con la repoblación acelerada. Este efecto es

mas pronunciado en el tumor primario que en áreas ganglionares y se observa en carcinomas bien diferenciados.

Otra de las estrategias que se puede plantear para mejorar el pronóstico de la radioterapia en tumores de recto podría ser añadiendo anticuerpos contra dichos receptores que disminuyan la repoblación tumoral (mecanismos de resistencia a la radioterapia) mejorando la respuesta a la misma.

Algunos estudios clínicos en cáncer colorrectal encuentran una posible asociación entre sobreexpresión de EGFR con menor respuesta *downstaging*, sin embargo en nuestro estudio el control local no parece estar afectado por esta variable.

EGFR Y FACTOR PRONÓSTICO

En nuestro estudio la expresión positiva de EGFR es un factor de mal pronóstico. Los pacientes que expresan EGFR tiene menor supervivencia libre de enfermedad (HR: 2.72, IC95% 1.09- 6.77) y supervivencia libre de metástasis (HR: 2.73, IC95% 1.05- 7.13), y estas diferencias son estadísticamente significativas.

La expresión del EGFR en la biopsia diagnóstica no se asocia con ninguno de los factores pronósticos clásicos: edad, sexo, performance status, grado de diferenciación, estadio tumoral ni estadio ganglionar. Estos resultados son consistentes con la mayoría de estudios publicados^{209, 210, 211,79, 80, 213, 214}. Sin embargo hay estudios que asocian expresión de EGFR y grado de diferenciación tumoral^{212, 213}.

Así como la mayoría de los datos publicados demuestran que la expresión de EGFR es un factor predictor de respuesta a tratamiento preoperatorio en cán-

cer de recto por presentar peor respuesta tumoral y mayor recurrencia en cáncer de recto, el papel del valor pronóstico de la expresión de EGFR en tumores humanos es más controvertido.

Nosotros hemos adoptado la definición de expresión de EGFR teniendo en cuenta la extensión de la expresión en porcentaje (relación entre porcentaje de células positivas respecto del total) y la intensidad en leve, moderado e intenso. En este estudio, cuando el EGFR es positivo, el modelo de regresión cox para tiempo libre de enfermedad es significativo únicamente para la extensión de la expresión de la expresión HR: 1.2 (1.02-1.42), sin embargo no para la intensidad

Al igual que Rokita et al.²¹⁴ los resultados de su estudio prospectivo de valoración de expresión de EGFR por técnica inmunohistoquímica encuentran que el EGFR es un factor independiente de mal pronóstico. Analizan la intensidad de la expresión, la extensión y un score que viene determinado por la suma de la intensidad y la extensión. Tanto en nuestro estudio como en el de Rokita el pronóstico depende de la extensión y no de la intensidad. Estos mismos resultados se obtuvieron también en el estudio de Mayer²¹⁵ que muestran relación con extensión de la expresión de EGFR, fue un valor pronóstico significativo ($P < 0.01$). Azria²¹⁶ publica en el 2005, un estudio que incluye a 136 pacientes y presenta con un seguimiento a 2 años. En el análisis multivariante muestra una correlación significativa entre la tasa de recurrencia locoregional y aquellos tumores que expresaban EGFR con una extensión superior a 25% (hazard ratio = 7.18, CI 95%, 1.17–46, $p = 0.037$).

Los resultados de nuestra serie demuestran que la intensidad no es un factor pronóstico independiente, estos resultados se han repetido en el estudio de Rokita y en el de Mayer.

Estos resultados son inconsistentes con otros estudios que demuestran que la intensidad es pronóstica^{217,80}. Rego demostró que un aumento en la intensidad

se asociaba con peor supervivencia libre de enfermedad (hazard ratio (HR): 1.21 (1.03, 1.41); $P = 0.019$) y con supervivencia global (HR: 1.19 (1.02, 1.39); $P = 0.028$). Hay pocas hipótesis para explicar la falta de correlación entre la intensidad y el pronóstico. Por otra parte, hay que tener en cuenta las variaciones en los métodos técnicos utilizados, por ejemplo, titulaciones inapropiadas de anticuerpos monoclonales o mAb de diferente afinidad pueden afectar la intensidad tinción. También debemos considerar que la evaluación de la intensidad es subjetiva por parte del patólogo que la realiza.

El que el porcentaje de células tumorales que expresan EGFR sea pronóstica e independiente de la intensidad se puede explicar pensando que la expresión se relaciona con más cantidad de células malignas y regiones tumorales más invasivas que afecten la supervivencia. Los mismo resultados en cuanto a la extensión de la expresión que hemos obtenido están en el estudio de Rokita que define que más del 33% de células teñidas en el tumor es un factor pronóstico independiente y en el estudio de Mayer et al. quien encontró un punto de corte de más de 50% de las células tumorales EGFR positivo un factor pronóstico negativo en pacientes con cáncer colorrectal ($p = 0.01$).

Teniendo en cuenta las diferencias descritas hasta ahora sería necesario la realización de una revisión sistemática para definir el papel pronóstico del EGFR, mientras tanto lo que nos da más información pronóstica es si la expresión es positiva o negativa.

En cuanto a la supervivencia libre de control local nuestro estudio no tiene diferencias significativas entre el grupo de EGFR positivo vs negativo. Azria²¹⁶ obtiene una tasa de supervivencia libre de recurrencia de 94% (95%, CI, 92–98%) en los tumores positivos para EGFR y 84% (CI 95%, 58–95%) para los negativos, con una $p = 0.06$, que no llega a ser significativa aunque en el análisis multivariante muestra correlación con la extensión superior a 25% (hazard ratio = 7.18, CI 95%, 1.17–46, $P = 0.037$).

En otros modelos clínicos, como en tumores de cabeza y cuello, el control local disminuiría cuando se sobreexpresa este marcador. Estos hallazgos podrían generar la hipótesis de que la radiorresistencia intrínseca podría ser diferente según el tipo tumoral.

CUAL ES LA MEJOR MANERA DE ANALIZAR EL EGFR

En la discusión de este estudio varios puntos sobre la mejor manera de analizar EGFR:

1. ¿Es EGFR un factor predictivo o factor pronóstico?
2. Consideramos el EGFR como un marcador positivo o negativo, como sería el caso de los receptores hormonales en cáncer de mama que si expresa el 1% lo consideramos positivo o como otros marcadores cuantitativos continuos medidos por inmunohistoquímica como el Ki67, con lo quedaría pendiente definir el punto de corte.
3. De qué manera la heterogeneidad del tumor puede afectar a la interpretación de los resultados del EGFR.
4. Cómo se puede mejorar la variabilidad interobservador.

1. Es EGFR un factor predictivo de respuesta o un factor pronóstico?

La respuesta a esta pregunta es fundamental para entender el papel de EGFR y también para la mejor estrategia para resolver la cuestión de que valor de EGFR es significativo, lo que llamamos punto de corte o cutpoint. En los últimos años, esta cuestión ha sido abordada por varios estudios con resultados distintos, debería plantearse la realización de una revisión sistemática de los estudios clínicos así como las consideraciones metodológicas de los mismos según REMARK²¹⁸.

En nuestro estudio cada aumento del porcentaje de EGFR (extensión) implica peor pronóstico, el riesgo ajustado de no estar libre de enfermedad es un 20% mayor por cada 10% más de extensión. Los efectos van en la misma dirección, una mayor expresión de EGFR está vinculada a peor pronóstico, y peor respuesta a la radioterapia neoadyuvante.

Nuestro resultado nos haría pensar que EGFR es una mezcla de un marcador pronóstico y un marcador predictivo.

2. ¿Consideramos el EGFR como un marcador positivo o negativo, como sería el caso de los receptores hormonales en cáncer de mama que si expresa el 1% lo consideramos positivo o como otros marcadores cuantitativos medidos por inmunohistoquímica como el Ki67, con lo quedaría pendiente definir el punto de corte?.

En los estudio con resultado significativo para EGFR hay algunos que lo consideran como una variable continua, nuestros resultados apoyan esta situación. Sin embargo, si nos planteamos el EGFR como una posible diana terapéutica, con respecto a las decisiones un marcador continuo es menos adecuado. Hay varios puntos de corte publicados en diversos estudios varían entre el 5% (nuestra serie), y el 25% (Azria), 33% (Rokita), 50% (Mayer). Mientras no se defina el cutpoint deberíamos tener en cuenta si el EGFR es positivo o negativo.

3. De qué manera la heterogeneidad del tumor puede afectar a la interpretación de los resultados de EGFR.

EGFR está sujeto a la heterogeneidad intratumoral. Los resultados inmunohistoquímico vienen dado por un solo valor de EGFR, aunque este puede no ser representativo de todo el tumor, puede no reflejar completamente la situación del EGFR en otra zona del tumor.

4. Cómo se puede mejorar la variabilidad interobservador?

Además de la variabilidad biológica del EGFR en el tumor, existe una variabilidad interobservador basadas en diferentes enfoques de evaluación por diferentes patólogos. Esta variabilidad ha llevado a un esfuerzo para estandarizar EGFR¹⁸⁸ y las guías DAKO, en paralelo a otros marcadores histológico.

Debería consensuarse la manera de interpretar el EGFR y varios autores ya han definidos scores, que necesitan ser validados.

Este problema genera dificultad para definir un punto de corte "óptimo", y esta variación deriva en parte de las diferencias interobservador y también de la heterogeneidad intratumoral. Por lo tanto, aunque el problema de las diferencias del observador se resuelvan la heterogeneidad biológica seguirá existiendo.

Una alternativa sería el análisis de imágenes automatizado estandarizado, puede ofrecer una solución, ayuda a estandarizar las decisiones micro de diagnóstico, y el resultado para una imagen histológica dado siempre será idéntica, aunque la selección de un campo de visión particular dentro de la sección también introducirá una cierta variabilidad como se explicó anteriormente.

7. De qué manera la variabilidad interobservador afecta a la validez clínica

En resumen, los datos disponibles en EGFR muestra que, por una parte, este marcador es significativo en algunos de los estudios, mientras que por otro lado es muy difícil de lograr una evaluación estandarizada y una alta precisión entre los patólogos. Esto plantea la pregunta: ¿Cuánta precisión es lo que realmente necesitamos para obtener resultados clínicamente relevantes?

NUEVO ENDPOINT SUBROGADO

En este trabajo en primer lugar se ha analizado el EGFR como factor predictor de respuesta. Cuando publicamos los primeros datos en 2002 nuestro estudio fue el primero que analizó la expresión de EGFR, tanto antes como después de la irradiación y comparar los resultados con las variables clínicas y patológicas. Esta claro que los endpoints mas importantes en investigación en tumores de colorrectal son la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global. El inconveniente que presentan es que requieren seguimientos largos lo que contribuye a que los avances científicos en la investigación clínica sean lentos. Hoy en día se esta intentando identificar endpoints a corto plazo que sirvan como sustitutos de DFS y OS. Estos permitirían más rápida determinación del éxito o el fracaso de una intervención experimental y así facilitar el descubrimiento científico y el progreso que conduce a mejoras de práctica clínica. Los datos de nuestro estudio a 10 años, hasta ahora los únicos resultados existentes con este seguimiento podrían aportar algo.

En los ensayos clínicos sobre el cáncer de recto, uno de los endpoints subrogado de supervivencia ha sido la la respuesta patológica completa (ypCR) a tratamiento neadyuvante. El porcentaje de respuestas completas patológica es de 11,6% y de respuesta parcial de 40 %. Hay publicados dos metaanálisis que concluyen que no solo la respuesta completa patológica si no que también el descenso de estadificación (downstaging) son factores pronósticos independientes de SG en cáncer de recto^{219, 220}. Además, hay datos en la bibliografía que confirma que, no sólo la RC, sino también la tasa de respuesta patológica es un indicador de pronóstico favorable para SG, SLE y SLRL (Supervivencia Libre de Recaída Local). En nuestro estudio hemos visto que los pacientes que expresan EGFR tienen menor probabilidad de presentar respuesta completa y una supervivencia libre de enfermedad y de metástasis dos veces menor que si es EGFR negativo. El EGFR expresado en tumores de

recto implica el no conseguir RCp y realmente al analizar la supervivencia se ha confirmado un peor pronóstico.

Sin embargo, no ocurre lo mismo si analizamos la respuesta parcial, que el 62 % de los pacientes con EGFR positivo no responden frente al 37% de las EGFR positivos que responden y las diferencias no son significativas ($p=0.7491$).

La capacidad de predecir la radiosensibilidad de un tumor es un avance importante en el tratamiento de pacientes con cáncer rectal.

Nuestros resultados sugieren que el status de EGFR puede ser un indicador de la respuesta a la radioterapia. Cuando la expresión de EGFR medida por inmunohistoquímica es positiva esto se correlaciona con la falta de respuesta patológica completa, y por lo tanto puede ser útil en la selección de un grupo de pacientes de alto riesgo que requiere terapia más personalizada.

CAMBIO DE LA EXPRESIÓN

Nuestro estudio muestra un acuerdo significativo entre el estatus inicial y post tratamiento del EGFR. El 76% de los tumores que eran positivos persisten positivos tras radioterapia preoperatoria frente al 28% de los que eran positivos se negativizan y el 53% de los negativos permanecen como tal frente al 19 % que se positivizan. El grado de acuerdo estadístico por debajo de 30 es irrelevante.

Cuando comparamos los grupos de paciente con EGFR que se negativiza con los que se positivizan, las curvas de supervivencia global, no son significativas. No tiene valor pronóstico. Lo que nos marca el pronóstico en nuestros resultados es el estatus inicial del EGFR.

Este resultado es el opuesto al de Richter²²¹ que obtiene que un aumento de la expresión de EGFR durante la radio- quimioterapia puede asociarse con supervivencia libre de enfermedad ($p = 0.003$) y supervivencia global más

cortas ($p = 0.005$). Los datos que obtienen son supervivencia libre de enfermedad a 5 años del 61 % en pacientes sin aumento de la expresión frente 29% con aumento de la expresión. Similares resultados obtienen en al supervivencia global a 5 años 66% vs 29%. Resultados dispares con los nuestros aunque el estudio de Richter tiene tamaño de muestra de 50 pacientes que es pequeña y lo que están valorando no es el incremento de la expresión del EGFR si no la intensidad que no consideramos en nuestro estudio como predictor pronóstico.

PROPUESTAS DE FUTURO

Cáncer de recto y sus diferencias con el cáncer de colon

Tras la realización de este estudio me ha surgido la inquietud de que el tumor de recto es una entidad propia totalmente diferente a los tumores de colon. Los expertos en el tema concluyen que para control de la enfermedad a distancia el tratamiento adyuvante del recto se realiza de forma similar al colon. Sin embargo, tras la realización de la resección total del mesorrecto y la realización de radioterapia neoadyuvante esquema corto o quimiorradioterapia esquema largo han mejorado los resultados de control local.

Los resultados de nuestro estudio muestran una tasa de fallo locorregional a 10 años de 7.8 % y una tasa de enfermedad metastásica a distancia de el 23.3 %, datos comparables con los resultados del ensayo alemán CAO/ ARO/ AIO-94²²². Los pacientes afectos de carcinoma rectal, estadio II o III tratados con radioterapia neoadyuvante e infusión de 5-fluorouracilo (5-FU), cirugía y 4 ciclos 5-FU en bolus adyuvante, proporciona un punto de referencia importante para estos los pacientes: La tasa de fallo locorregional a 10 años fue de 7,1% y el 30% de los pacientes tratados con la tratamiento neoadyuvante presenta enfermedad metastásica a distancia en 10 años.

Tanto en nuestro estudio como el CAO /ARO/ AIO-94 la enfermedad a distancia es la causa más frecuente de fracaso del tratamiento que lleva a la reducción de DFS. Los indicadores más fiables de riesgo de metástasis son margen de resección circunferencial positivo, el grado de invasión de la pared intestinal (estadio T), y el estado de los ganglios linfáticos. Sin embargo, nos encontramos con pacientes con el mismo estadio tumoral y márgenes libres con resultados diferentes. Los resultados obtenidos indican que el EGFR es un factor pronóstico independiente que puede proporcionar información pronóstica adicional para los pacientes sometidos a quimiorradioterapia adyuvante para el cáncer de recto localmente avanzado.

Teniendo en cuenta los resultados de los ensayos de la utilización de quimioterapia adyuvante en cáncer de colon demostraron la superioridad del tratamiento adyuvante 5-FU y leucovorin (LV)²²³ en relación con la cirugía sola, y posteriormente el valor de la adición de oxaliplatino a 5-FU / LV²²⁴ cabría esperar los mismos resultados en cáncer de recto.

Sin embargo, varios ensayos clínicos que han abordado el uso de quimioterapia adyuvante en pacientes con adenocarcinoma recto tratados con terapia neoadyuvante no han demostrado un claro beneficio para su uso. Un metaanálisis reciente ha evaluado a casi 1.200 pacientes de 4 ensayos aleatorios que estudiaron el papel de la quimioterapia adyuvante en pacientes con cáncer de recto que se habían sometido a radiación preoperatoria o quimiorradioterapia²²⁵. Sólo 1 de los estudios, lo que contribuyó el menor número de pacientes para el análisis, incorporó oxaliplatino en el régimen de quimioterapia adyuvante. La quimioterapia adyuvante no produjo ninguna mejoría estadísticamente significativa en el control de la enfermedad a distancia o libre de enfermedad o la supervivencia general. Hubo una tendencia de mejora en la supervivencia libre de enfermedad con el uso de la quimioterapia adyuvante sólo en los más altos tumores rectales (tumores de 10 a 15 cm del margen anal). Mientras los investigadores continúan extrapolando de los datos en el

cáncer de colon, las diferentes guías de consenso tienen diferentes recomendaciones sobre el papel de la quimioterapia adyuvante en pacientes con cáncer de recto (por ejemplo, las directrices de la Red Nacional Integral del Cáncer y el segundo informe europeo rectal Conferencia de Consenso de cáncer).

Las posibles causas de esto son varias y bien descritas en la bibliografía:

1. Una posible causa puede ser el tipo de quimioterapia adyuvante utilizada. En 3 de los 4 estudios antes mencionados, sólo se utilizó el 5-FU / LV o capecitabina como quimioterapia adyuvante, en comparación con el 5-FU concomitante con oxaliplatino que se utiliza comúnmente en el tratamiento adyuvante del cáncer de colon. El ensayo ADORE demuestra un beneficio en supervivencia libre de enfermedad con 5-FU/ LV más oxaliplatino adyuvante vs 5-FU / sola en pacientes con cáncer de recto resecado estadio patológico II o III de LV después de la quimiorradioterapia preoperatoria²²⁶. Es de destacar que el cumplimiento de la quimioterapia adyuvante fue muy alto en ambos brazos del estudio.
2. Otra respuesta puede estar en esta cuestión del cumplimiento. Por ejemplo, en la EORTC, sólo el 43% de los pacientes asignados a recibir quimioterapia postoperatoria recibió el curso previsto de tratamiento adyuvante²²⁷. Los pacientes sometidos a cirugía de cáncer de recto pueden tener retrasos en el inicio de la quimioterapia adyuvante secundarios a heridas y otras complicaciones postoperatorias que conducen a estancias hospitalarias prolongadas y períodos de recuperación. Los retrasos significativos en iniciar la quimioterapia están asociados con peores resultados de supervivencia en cáncer de recto²²⁸. Para solucionar este problema, los investigadores han comenzado a estudiar el valor de secuenciación "terapia sistémica completa" antes de la cirugía²²⁹.
3. Por último, pueden existir diferencias fundamentales en la tumorigénesis y quimiosensibilidad entre colon y tumores rectales, aunque los datos recientes sugieren que estas estructuras en continuidad comparten muchas similitudes en el desarrollo del tumor²³⁰.

Park et²³¹ ha demostrado que los pacientes que realizan tratamiento neoadyuvante y que presentan una respuesta completa tienen altas tasas de supervivencia libre de enfermedad y pocas probabilidades de desarrollar enfermedad metastásica independiente de la realización del uso de la quimioterapia adyuvante²³². En una actualización del ensayo CAO/ ARO/ AIO-94, los pacientes con una respuesta completa patológica al tratamiento neoadyuvante tienen una incidencia del 10,5% de desarrollar de metástasis a distancia, en comparación con 39,6% en pacientes con mala respuesta histológica (utilizando los criterios Dworak)²³³. Además cuestiona el papel de la quimioterapia adyuvante y concluye que la quimioterapia adyuvante no influye en la supervivencia de los pacientes con cáncer de recto tras tratamiento neoadyuvante y resección cuando son ypT0-2N0. En esta situación, añadir quimioterapia adyuvante necesita un balance de riesgo beneficio.

Con las limitaciones de los análisis de datos retrospectiva a tener en cuenta, nuestros resultados invitan a la reflexión. Una hipótesis generada a partir de nuestro estudio es que podemos utilizar los resultados de la expresión del EGFR y el tipo de respuesta a la terapia neoadyuvante para seleccionar un grupo de pacientes en los que el riesgo de la progresión de la enfermedad a distancia es baja y para los que la adición de la quimioterapia adyuvante puede llevar a más riesgos que beneficios. Dado que nuestros resultados no ofrecen diferencias respecto al EGFR y respuesta parcial la definición de pacientes de bajo riesgo serian aquellos que no expresen EGFR y tiene una respuesta completa.

El manejo del cáncer rectal está en un estado de evolución. La progresión de la enfermedad a distancia sigue siendo un reto importante para los pacientes y los oncólogos y debe ser un foco de investigación preclínica y clínica continua.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

RESULTADOS VARIABLES

Tomando en conjunto, estos datos deben ser interpretados con precaución cuando se utiliza como justificación para futuros ensayos prospectivos. El siguiente paso en oncología es identificar marcadores que podrían tener un papel similar en el pronóstico y predicción de respuesta a las terapias dirigidas. Estamos convencidos de que la expresión de EGFR cuantificada por inmunohistoquímica podría ser un buen candidato. Cabe señalar que los estudios con cetuximab no encontraron ninguna asociación entre la extensión de la tinción de EGFR tumor y la probabilidad de una respuesta.

TÉCNICA INMUNOHISTOQUIMICA. ANTICUERPO MONOCLONAL UTILIZADO

La inmunohistoquímica tiene limitaciones relacionadas con la reproducibilidad y la capacidad de proporcionar información cuantitativa. La determinación de la expresión de EGFR en el tumor es variable, así como las definiciones de lo que significa sobreexpresión alta. Es necesaria una estandarización de cómo valorar la expresión del EGFR

CONCLUSIONES

1. EGFR está expresado en un 54% de nuestra serie de pacientes con cáncer de recto tratados con radioterapia preoperatoria
2. EGFR no está asociado a otros factores clínicos patológicos clásicos.
3. La expresión de EGFR evaluado por inmunohistoquímica es un factor predictor de respuesta tras radioterapia preoperatoria con o sin quimioterapia y cirugía para cáncer de recto.
4. La determinación de EGFR mediante inmunohistoquímica es un factor pronóstico, es predictor de peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia libre de metástasis de forma significativa y una tendencia a peor supervivencia global.
5. La determinación de EGFR postoperatoria mediante inmunohistoquímica de la muestra a diferencia de lo que ocurre en la determinación preoperatoria no tiene valor pronóstico. Ni tampoco el cambio en la expresión tras la realización de radioterapia.

ANEXOS

CLINICAL INVESTIGATION

Rectum

EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR IS A PREDICTOR OF TUMOR RESPONSE IN LOCALLY ADVANCED RECTAL CANCER PATIENTS TREATED WITH PREOPERATIVE RADIOTHERAPY

JORDI GIRALT, M.D., PH.D.,* ARANZASU ERASO, M.D.,* MANEL ARMENGOL, M.D., PH.D.,†
JOSE ROSSELLÓ, M.D., PH.D.,‡ JOAQUIN MAJÓ, M.D.,§ CARMEN ARES, M.D.,* ELOI ESPIN, M.D.,†
SERGIO BENAVENTE, M.D.,* AND INES DE TORRES, M.D., PH.D.§

Departments of *Radiation Oncology, †Surgery, ‡Preventive Medicine, and §Pathology,
Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Purpose: Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression is observed in 50%–70% of colorectal carcinomas and is associated with poor prognosis. The aim of this study was to determine the EGFR expression rate in locally advanced rectal cancer and to analyze whether EGFR expression predicts tumor response to preoperative radiotherapy.

Methods and Materials: Between December 1997 and October 2000, 45 patients were included. Treatment consisted of preoperative pelvic radiotherapy and, in 21 patients, 2 courses of 5-fluorouracil leucovorin. Surgical resection was performed 4–8 weeks later. Immunohistochemistry for EGFR was determined at the preradiation diagnostic biopsy and in the resected specimens. Immunostaining was performed using EGFR monoclonal antibody (Biogenex, MU 207-UC). Immunohistochemical staining was evaluated according to extension and intensity. We defined positive staining (EGFR+) as extension of 5% or more.

Results: Preoperative treatment resulted in pathologic complete remission in 7 patients (15%), downstaging in 13 patients (29%), and no response in 25 patients (56%). EGFR+ was observed in 29 of 45 tumors (64%) and was associated with neither clinical tumor stage nor clinical nodal stage. The overall response rate was 34% in EGFR+ patients vs. 62% in those who were EGFR– ($p = 0.07$). Only 1 of the 7 pathologic complete remission patients was EGFR+ ($p = 0.003$).

Conclusions: EGFR is expressed in a significant number of locally advanced rectal tumors. EGFR expression is an indicator for poor response to preoperative radiotherapy in advanced rectal carcinoma. © 2002 Elsevier Science Inc.

EGFR, Rectal cancer, Radiotherapy, Prognosis.

INTRODUCTION

Colorectal cancer is one of the most common malignant diseases, with a death rate second only to lung cancer (1). Rectal cancer represents 35% of all colorectal carcinomas. In Stage III–IV rectal cancer, local recurrence occurs in 20%–70% of patients treated with surgery alone. Several trials have shown that preoperative radiotherapy improves tumor control and survival rate in selected patients (2, 3). Pathologic complete response to preoperative radiotherapy is observed in 4%–30% of patients, and downstaging occurs in 30%–60% (4–10). Response to preoperative radiotherapy varies, depending on clinical factors such as tumor stage, total dose, fractionation schedules, concomitant chemotherapy treatment, or time between radiation and surgery. Janjan *et al.* (4, 8) treated 117 patients with preoperative chemoradiotherapy and found that pretreatment tumor

size was the only factor predictive of complete pathologic response. Multivariate analyses confirmed that response to preoperative chemoradiotherapy was predictive of improvement in overall survival among patients with locally advanced rectal cancer. Mohiuddin *et al.* (9) reported tumor downstaging after preoperative chemoradiotherapy to be a significant prognostic factor for local control. Berger *et al.* (10) evaluated residual tumor cell density after preoperative radiotherapy and found higher preoperative dose as the most favorable predictive marker for tumor downstaging. However, no factor predictive of complete pathologic response was reported. There is, therefore, a need to define additional factors that may help to select therapy.

Research in molecular biology has facilitated the study of molecular markers as prognostic factors. There are several reports suggesting that epidermal growth factor receptor

Reprint requests to: Jordi Giralt, Department of Radiation Oncology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Tel: 93 274 60 86; Fax: 93 274 60 59; E-mail: giralt@hg.vhebron.es

This work was presented at the 43rd ASTRO meeting in San Francisco, November 4–8, 2001.

Received Mar 4, 2002, and in revised form Jul 3, 2002. Accepted for publication Jul 10, 2002.

Table 1. Patient characteristics

	No.	%
Number of patients	45	100
Age (years)	63.8 (38–85)	
Gender (male/female)	32/13	
Tumor stage		
T2	4	9
T3	35	78
T4	6	13
Nodal stage		
N0	20	44
N1–2	25	56
Histopathologic grade		
G1	6	14
G2	34	74
G3	5	12

(EGFR) expression may be associated with a reduction in survival in primary colorectal cancer (11–13). EGFR is a member of the tyrosine kinase family. It is a glycoprotein membrane composed of an extracellular ligand-binding domain, a transmembrane lipophilic segment, and an intracellular protein kinase domain with a regulatory segment (14). After ligand binding, EGFR dimerization occurs, which produces activation of the intrinsic protein tyrosine kinase activity. This leads to the activation of a cascade of biochemical and physiologic responses involved in the mitogenic signal transduction of cells that regulate cell division, proliferation, and differentiation (15, 16). EGFR is often expressed at high levels in human cancer and has been associated with more aggressive tumors (17–20). In colorectal cancer, EGFR is expressed in 50%–70% of cases and is associated with poor prognosis. There are no data on the effect of EGFR expression on response to pelvic radiotherapy in the preoperative setting.

The aim of this study was to determine EGFR expression rate in locally advanced rectal cancer and to analyze whether EGFR expression predicts tumor response in patients treated with preoperative radiotherapy.

METHODS AND MATERIALS

From September 1997 to December 1999, 45 patients with locally advanced rectal adenocarcinoma were treated with preoperative radiotherapy in our institution. There were 32 males and 13 females with a median age of 64 years (range: 38–85 years). Patient characteristics are listed in Table 1. Locally advanced rectal cancer was defined as tumor extension through the bowel wall or with lymph node involvement. All patients were distant metastases-free at diagnosis. Local extension assessment was based on clinical and/or radiographic evaluations. Diagnostic studies consisted of colorectal endoscopy, presurgical CEA value, pelvic CT scan, chest X-ray, and routine laboratory studies. Patients had histologically confirmed adenocarcinoma of the rectum, and the inferior margin of the tumor had to be located no farther than 15 cm from the anal verge. Patients

were staged according to the American Joint Committee on Cancer Staging.

Preoperative radiotherapy was delivered to the pelvis with 18-MV photons. Clinical target volume included the tumor and the entire rectum, the anterior wall of the sacrum and the posterior wall of the prostate or vagina, and the following lymph nodes: perirectal, presacral, hypogastric, obturator, and iliac lymph. The planning target volume included the clinical target volume plus a 1–1.5-cm margin. The standard 3 conformal fields, PA and 2 opposed laterals with wedges, were used. All patients received conventional fractionation, 1.80 Gy/day, 5 fractions per week to a total dose of 45 Gy. In 5 patients, a 5.4-Gy boost to the tumor was given. Twenty-one patients received simultaneous chemotherapy: 5-fluorouracil (5-FU), 350 mg/square meter i.v. bolus 1 h before radiotherapy on Days 1–5 and Days 29–33; and leucovorin calcium, 20 mg/square meter i.v. bolus immediately before each dose of 5-FU. Patients were restaged by physical examination, pelvic CT, chest X-ray, and blood chemistries between 4 and 6 weeks later. Subsequently, all patients underwent surgery with 26 having low anterior resection (58%) and 19 abdominoperineal removal (42%). In all cases, a total mesorectal resection was performed. A pathologic study of the surgical specimen was performed, and tumor was pathologically staged according to UICC criteria. The median time between radiotherapy and surgery was 33 days.

Immunohistochemical assay

Paraffin-embedded blocks of diagnostic biopsies and surgical specimens were cut in 5- μ m sections. Sections of the tissue blocks were deparaffined with xylene and rehydrated. Endogenous peroxidase activity was blocked with 0.2% hydrogen peroxidase solution, and nonspecific labeling was blocked in serum blocking solution. Sections were incubated in complete medium for 1 h at room temperature with EGFR rabbit monoclonal antibody (MU 207-UC; Biogenex, San Ramon, CA) at a dilution of 1:20 (v/v). As a negative control, the primary antibody was omitted and replaced with phosphate-buffered saline. The reaction was revealed by the avidin-biotin complex peroxidase method (ABC Elite kit, Vector Burlingame, CA) followed by staining with the peroxidase substrate 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (DAB; Sigma GmbH, Deisenhofen, Germany). The slides were counterstained with 50% hematoxylin. Human skin tissue was used as a positive control for EGFR expression.

Specimens were examined by light microscopy. All slides were assessed for EGFR expression by two trained histopathologists masked to tumor response to pelvic radiotherapy. Immunohistochemical results were evaluated according to extension and intensity. Extension was defined as the positive tumor cell percentage. A score of 1 to 5 was assigned according to the percentage of positively stained tumor cells: 1 = positive staining less than 5%, 2 = 5%–25%, 3 = 25%–50%, 4 = 50%–75%, and 5 = >75%. Staining intensity was graded qualitatively as 0 = not detectable, 1 = weak, 2 = moderate, 3 = intense. EGFR

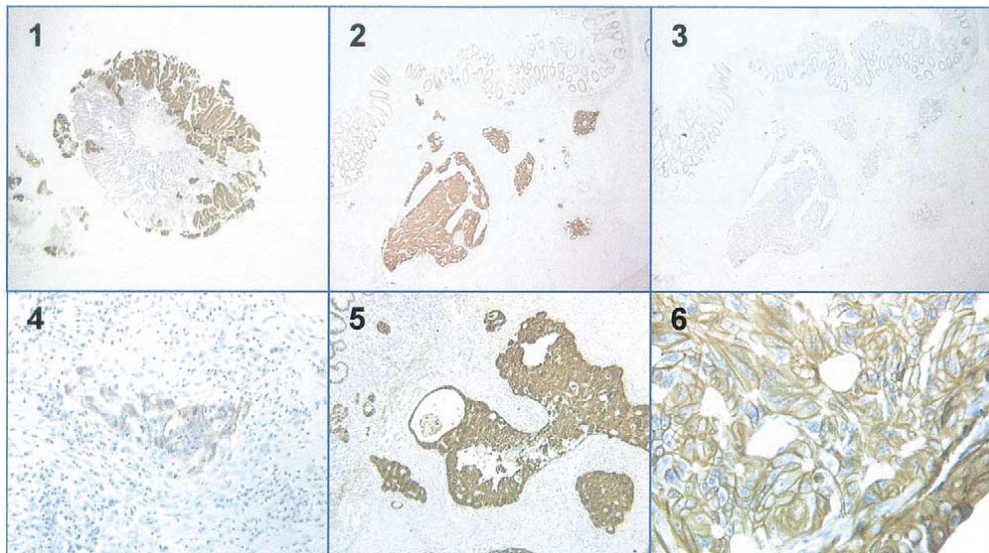


Fig. 1. Immunohistochemistry for EGFR in colorectal cancer: (1) Strong positivity of tumor cells in endoscopic biopsy ($\times 20$). (2) Positive immunoreactivity in residual tumor postradiotherapy, and (3) Its negative control ($\times 20$). (4) Weak positive immunoreactivity in isolated tumor cells postradiotherapy ($\times 250$). (5) Higher immunoreactivity in residual tumor nest ($\times 100$). (6) Membrane-positive immunoreactivity for EPGF in tumor cells ($\times 400$).

was said to have positive staining (EGFR+) when extension was 5% or more (score 2–4). When the extension was less than 5% (score 1), staining was considered negative (EGFR–). Figure 1 shows some examples of immunohistochemical staining and evaluation. The interobserver variability between the two pathologists was 95%.

Statistical analyses

Possible associations between EGFR immunoreactivity and clinical/histopathologic characteristics were determined using the chi-square test. Fisher's exact test was used in a four-field table when the number of cases was fewer than 10. To study whether gender, tumor location, tumor stage, lymph node stage, tumor differentiation, and EGFR status were independent predictors of pathologic complete response, a multivariate stepwise logistic regression model was constructed. Data analyses were performed with the SPSS statistical software package (SPSS, Inc., Chicago, IL). The significance level (α level) was $p = 0.05$ in all statistical analyses used in this study.

RESULTS

Twenty patients responded to pelvic preoperative radiotherapy. Seven patients achieved pathologic complete response with no residual tumor in the resected specimen, and 13 patients were downstaged. No residual tumor was found in the lymph nodes of 11 of the 25 patients with initial node involvement. In our series, EGFR proved to be positive in 29 biopsies, so the EGFR expression rate was 64%. In 18 biopsies, EGFR extension was greater than 75%; in 6 cases, it was between 25% and 75%; and in 4 cases, it was between 5% and 25%. Intensity was Grade 1 in 13 biopsies, Grade 2 in 7, and Grade 3 in 9.

Table 2 shows the association between EGFR expression at biopsy and clinical characteristics. No significant differences were found in gender, tumor location, tumor stage, lymph node stage, tumor differentiation, or treatment with chemotherapy. However, differences were found when we looked at the response rate. Response to pelvic radiotherapy was observed in 62% of the EGFR– patients and in 44% of those with EGFR+ ($p = 0.07$). This association is of borderline significance. Only 1 of the 29 EGFR+ patients achieved pathologic complete response (3%), in comparison with 38% (6/16) of the EGFR– patients ($p = 0.003$). The multivariate analysis found the only significant predictor of pathologic complete remission to be EGFR status, with an odds ratio (95% CI) of 0.06 (range: 0.006–0.557), $p = 0.013$. There is a clear link between positive EGFR expression and lack of pathologic complete response. At 29.4 months of follow-up, 13 patients have relapsed: 9 of the 29 EGFR+ patients (31%) and 4 of the 16 who were EGFR– (25%). Longer follow-up is required to determine whether EGFR expression is a prognostic factor for either recurrence and/or survival.

EGFR expression was evaluated also in the surgical specimens of 38 patients. The remaining 7 patients achieved complete response and were therefore not assessed for EGFR expression. Of the 38 specimens studied, 31 were found to be positive and 7 negative. On comparing expression in the biopsy samples with that of the surgical specimens, we found that 25 EGFR+ biopsy samples remained positive in the surgical specimens, and only 3 became negative; in 1 sample, no tumor was found. Of the 14 EGFR– biopsy samples we examined, only 4 remained negative, whereas 6 became positive; in 6 samples, no tumor was found (Table 3).

Table 2. EGFR expression vs. clinical variables

	No	EGFR+		EGFR-		<i>p</i> value
		No.	Rate	No.	Rate	
Total	45	29	64%	16	36%	
Gender						
Male	32	22	75%	10	62%	0.494
Female	13	7	25%	6	38%	
Tumor stage						
T2-T3	39	25	86%	14	87%	0.903
T4	6	4	14%	2	13%	
Nodal stage						
N0	20	13	45%	7	43%	0.944
N1-N2	25	16	55%	9	57%	
Chemotherapy						
Yes	21	13	45%	8	50%	0.739
No	24	16	55%	8	50%	
Clinical response						
Yes	20	10	34%	10	62%	0.07
No	25	19	66%	6	38%	
Pathologic response						
Yes	7	1	3%	6	38%	0.003
No	38	28	97%	10	62%	

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study to address EGFR expression both before and after irradiation and to compare the findings with clinical and pathologic variables. The ability to predict which patients are likely to respond to radiotherapy is a major advance in the management of rectal cancer patients. Our results suggest that EGFR status may well be an indicator of response to radiotherapy. Positive EGFR staining correlates with a lack of pathologic complete response, and may therefore be useful in selecting a group of high-risk patients requiring more tailored therapy.

EGFR expression has been implicated in a wide variety of human carcinomas. In breast cancer, EGFR protein expression has been correlated with poor prognosis (17) and nonresponse to endocrine therapy (18). Grandis *et al.* (19) quantified EGFR levels in head-and-neck squamous cell carcinomas and found that they predicted disease-free and cause-specific survival. EGFR amplification was found also to be an independent predictor of prolonged survival in patients older than 60 years with glioblastoma multiforme

(20). Other investigators evaluated EGFR expression in resected colorectal cancer. Steele *et al.* (11) assessed EGFR expression in 50 cases of invasive colorectal cancer using immunohistochemistry. Positive staining was confined to the neoplastic cells in all cases, although in 5, it was barely discernible to the eye. Furthermore, Dukes' C tumors were found to exhibit significantly higher EGFR levels than Dukes' A or B, and it was concluded that high EGFR expression is associated with poor prognosis. Yasui *et al.* (12) examined 8 colonic carcinoma specimens using Western blotting and observed EGFR expression in 7 tumors. Mayer *et al.* (13) found 72 cases of EGFR-positive expression in 82 resected colorectal adenocarcinomas (88%). The extent of EGFR expression revealed significant differences in survival times: Patients with more than 50% stained tumor cells had poorer prognosis than those with less than 50% staining ($p < 0.01$). Radinsky *et al.* found that increased tumor EGFR mRNA levels were associated with a higher incidence of liver metastases (21). Although we have been unable to correlate EGFR expression with survival parameters, we have found a clear association with treatment response, which is itself an important prognostic factor (8, 9). However, longer follow-up may be instrumental in clarifying whether EGFR expression is predictive of survival.

Tumor radiosensitivity detection has long interested both clinical and basic researchers as a selection tool. However, to date most investigators have found little relationship between clinical features such as tumor size or stage and tumor radiosensitivity. *In vitro* studies have suggested that p53 and p21 status may play an important role in determining the radiosensitivity of tumors through the apoptosis pathway (22–24). There is also evidence that radiation stimulates proliferation by release of TGF- α (25). Schmidtr-

Table 3. Modification of EGFR expression by preoperative radiotherapy

Biopsy	No.	Surgical specimen	No.	%
EGFR+	29	EGFR+	25	86
		EGFR-	3	10
		pCR	1	4
EGFR-	16	EGFR-	4	24
		EGFR+	6	38
		pCR	6	38

Abbreviation: pCR = pathologic complete remission.

Ullrich *et al.* (26) have reported that cell survival and repopulation may be regulated by the activation and expression of EGFR/TGF- α that is induced after radiation. The ability of EGFR expression to predict tumor response to radiotherapy has also been proven in clinical studies. Hickey *et al.* (27) analyzed EGFR expression in 14 chemoradiotherapy-treated esophageal squamous cell carcinomas and found a statistically significant relationship between EGFR expression and lack of response to chemoradiotherapy. Bensadoun *et al.* (28) evaluated 92 unresectable pharyngeal carcinoma patients treated with b.i.d. radiotherapy and concomitant chemotherapy (3 courses of cisplatin 5-FU). The EGFR expression at pretreatment biopsy was a significant prognostic factor for response, disease-free survival, and overall survival, suggesting that EGFR expression may be an important marker for tumor radiosensitivity. Our results agree with these findings.

We believe this is the first study to determine EGFR expression both at pretreatment biopsy and in the surgical specimen. In our study, most of the EGFR+ biopsies continued to be positive in the surgical specimen, and only 11% became negative. When we examined the 14 EGFR biopsy samples, only 4 remained negative, whereas 6 became positive; in 6 samples, no tumor was found. Exposure of human

cancer cells to ionizing radiation activates EGFR, which, in turn, mediates a cytoprotective response that reduces the cells' sensitivity to radiation. Lammering *et al.* (29) concluded that radiation-induced EGFR activation contributes, at least in part, to the mechanism of accelerated proliferation. This cellular proliferation response during repeated radiation leads to increased renewal of tumor clonogens. Thus, preoperative radiotherapy may be able to eradicate EGFR- tumor cells, whereas EGFR+ tumor cells may remain active, because of their radioresistance. This may explain why expression became positive in 6 of the 16 EGFR- surgical specimens.

In summary, our study indicates that EGFR expression at the diagnostic biopsy of locally advanced rectal cancer treated with radiotherapy may serve as an important predictor of pathologic complete response to preoperative treatment. In the present study, EGFR+ expression was observed in a significant number of cases and was associated with a lack of pathologic complete response. Therefore, we considered that analysis of EGFR expression might be helpful in determining a subgroup of high-risk patients requiring more customized therapeutic modalities against this receptor, such as monoclonal antibodies or tyrosine kinase inhibitors.

REFERENCES

- Garfinkel L. Cancer statistics and trends. In: Holleb AI, Fink DJ, Murphy GP, editors. American Cancer Society textbook of clinical oncology. 1st ed. Atlanta: The American Cancer Society; 1991. p. 1-6.
- Swedish Rectal Cancer Trial. Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. *N Engl J Med* 1997;336:980-987.
- Kapiteijn E, Marijnen CAM, Nagtegaal ID, *et al.* Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med* 2001;345: 638-646.
- Janjan NA, Khoo VS, Abbruzzese J, *et al.* Tumor downstaging and sphincter preservation with preoperative chemoradiation in locally advanced rectal cancer: The M.D. Anderson Cancer Center experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;44: 1027-1038.
- de la Torre A, Ramos S, Valcarcel FJ, *et al.* Phase II study of radiochemotherapy with UFT and low-dose oral leucovorin in patients with unresectable rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;45:629-634.
- Calvo FA, Gomez-Espi M, Diaz-Gonzalez JA, *et al.* Pathologic downstaging of rectal cancer after chemoradiation: 5-fluorouracil vs. tegafur. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51: 1264-1270.
- Minsky BD, Cohen AM, Enker WE, *et al.* Preoperative 5FU, low-dose leucovorin and radiation therapy for locally advanced and unresectable rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;37:289-295.
- Janjan NA, Crane C, Feig BW, *et al.* Improved overall survival among responders to preoperative chemoradiation for locally advanced rectal cancer. *J Am J Clin Oncol* 2001;24: 107-112.
- Mohiuddin M, Hayne M, Regine WF, *et al.* Prognostic significance of postchemoradiation stage following preoperative chemotherapy and radiation for advanced/recurrent rectal cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:1075-1080.
- Berger C, de Muret A, Garaud P, *et al.* Preoperative radiotherapy for rectal cancer: Predictive factors of tumor downstaging and residual tumor cell density: Prognostic implications. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;37:619-627.
- Steele RJC, Kelly P, Ellul B, *et al.* Epidermal growth factor receptor expression in colorectal cancer. *Br J Surg* 1990;77: 1352-1354.
- Yasui W, Sumiyoshi H, Hata J, *et al.* Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas. *Cancer Res* 1988;48:137-141.
- Mayer A, Takimoto M, Fritz E, *et al.* The prognostic significance of proliferation cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdr gene expression in colorectal cancer. *Cancer* 1993;71:2454-2460.
- Carperter G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu Rev Biochem* 1987;56:881-914.
- Di Marco E, Pierce JH, Fleming TP, *et al.* Autocrine interaction between TGF- α and the EGF-receptor: Quantitative requirements for induction of the malignant phenotype. *Oncogene* 1992;4:831-838.
- Albanell J, Codony-Servat J, Rojo F, *et al.* Activated extracellular signal-regulated kinases. Association with epidermal growth factor receptor/transforming growth factor α expression in head-and-neck squamous cell carcinoma and inhibition by anti-epidermal growth factor receptor treatments. *Cancer Res* 2001;61:1-11.
- Sainsbury JR, Farndon JR, Needham GK, *et al.* Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence and death from breast cancer. *Lancet* 1987;1:1398-1402.
- Nicholson S, Halcrow P, Sainsbury JR, *et al.* Epidermal growth factor receptor status associated with failure of primary endocrine therapy in elderly postmenopausal patients with breast cancer. *Br J Cancer* 1988;58:810-814.
- Grandis JR, Melhem MF, Gooding WE, *et al.* Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell

- carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:824–832.
20. Smith J, Tachibana I, Passe SM, *et al.* PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1246–1256.
 21. Radinsky R, Risin S, Fan D, *et al.* Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1995;1:19–31.
 22. Fan S, El-Deiry S, Boe I, *et al.* p53 gene mutations are associated with decreased sensitivity of human lymphoma cells to DNA damaging agents. *Cancer Res* 1994;54:5824–5830.
 23. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 1995;55:5187–5190.
 24. Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordor JI, *et al.* Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 1995;377:552–557.
 25. Brown JM. Therapeutic targets in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;49:319–326.
 26. Schmidr-Ullrich RK, Mikkelsen RB, Dent P, *et al.* Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. *Oncogene* 1997;15:1191–1199.
 27. Hickey K, Grehan D, Reid I, *et al.* Expression of epidermal growth factor receptor and proliferating cell nuclear antigen predicts response of esophageal squamous cell carcinomas to chemotherapy. *Cancer* 1994;74:1693–1698.
 28. Bensadoun RJ, Magne N, Marcy PY, *et al.* B.i.d. radiotherapy and chemotherapy with CDDP/5-FU in unresectable pharyngeal carcinoma: 10 years experience at the Centre Antoine-Lacassagne. Impact of tumoral EGFR level in response and survival. Proceedings of the 43rd American Society for Therapeutic Radiation Oncology (ASTRO) meeting. Abstract 66. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 51(Suppl.):39–40.
 29. Lammering G, Hewit TH, Hawkins WT, *et al.* Epidermal growth factor receptor as a genetic therapy target for carcinoma cell radiosensitization. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:921–929.

The expression of epidermal growth factor receptor results in a worse prognosis for patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy: a multicenter, retrospective analysis

Jordi Giralt^{a,*}, Manuel de las Heras^b, Laura Cerezo^c, Aranzazu Eraso^a, Eduardo Herмосilla^d, Dolores Velez^e, Juan Lujan^f, Eloi Espin^g, Jose Rossello^d, Joaquin Majó^h, Sergi Benavente^a, Manel Armengol^g, I. de Torres^h, On behalf of the Grupo Español de Investigación Clínica en Oncología Radioterápica (GICOR)

^aDepartment of Radiation Oncology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain

^bDepartment of Radiation Oncology, Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain

^cDepartment of Radiation Oncology, Hospital de la Princesa, Madrid, Spain

^dDepartment of Preventive Medicine, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

^eDepartment of Pathology, Hospital de la Princesa, Madrid, Spain

^fDepartment of Surgery, Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain

^gDepartment of Surgery, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

^hDepartment of Pathology, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Received 16 June 2004; received in revised form 28 December 2004; accepted 29 December 2004

Abstract

Background and purpose: Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) is observed in 50–70% of colorectal carcinoma and is associated with poor prognosis. The aim of this study was to determine the prognostic value of EGFR status before radiotherapy in a group of patients with locally advanced rectal cancer treated with preoperative radiotherapy.

Patients and methods: Eighty-seven patients were studied retrospectively. Treatment consisted of pelvic radiotherapy, in 50 patients with concomitant chemotherapy and surgical resection. Immunohistochemistry for EGFR was determined at the preradiation biopsy and in the resected specimens. Immunohistochemical analysis for EGFR expression was evaluated according to extension and staining intensity. We defined positive staining (EGFR positive), when extension was 5% or more.

Results: A total of 52 of 87 tumors showed EGFR positive status at biopsy (60%) and EGFR expression was associated neither with clinical tumor stage nor with clinical nodal stage. EGFR positive expression was linked to a lack of pathologic complete response to preoperative radiotherapy ($P=0.006$). Disease-free survival was lower among patients with EGFR positive status before radiotherapy ($P=0.003$). In a multivariate analysis EGFR expression at biopsy was a statistically significant predictor of disease-free survival, $RR=2.88$ (1.1–7.8), $P=0.036$.

Conclusions: EGFR is expressed in a significant number of rectal tumors. EGFR-positive expression before radiotherapy is an indicator for poor response and low disease-free survival.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: EGFR; Rectal cancer; Radiotherapy; Prognosis

1. Introduction

Colorectal cancer is the second cause of cancer death, rectal cancer accounting for 35% of all colorectal

carcinomas [8]. In stage locally-advanced rectal cancer treated with surgery alone local recurrence occurs in 20–60% of patients. In this group of patients adjuvant chemo-radiotherapy improves local control and survival [23]. Several research groups have studied the benefits of preoperative radiotherapy with or without chemotherapy.

* Corresponding author.

When comparing the benefits of neoadjuvant treatment versus adjuvant, neoadjuvant approaches decrease tumor bulk, enhance sphincter preservation and reduce acute toxicity [21]. Preoperative pelvic radiotherapy produces 4–30% pathologic complete response and downstaging in 30–60% of cases [3,5,14,15,22,28]. Response to preoperative radiotherapy varies depending on clinical factors such as tumor stage, total dose, fractionation schedules, concomitant chemotherapy treatment or time between radiation and surgery. Tumor size and pathologic complete response are well-established prognostic factors for local control and disease-free survival [3,14,28]. Downstaging and tumor cell density after preoperative radiotherapy have been correlated with complete pathologic response, although these results have to be confirmed in prospective trials [3,22]. There is, therefore, a need to define additional factors that may help to select therapy.

In the recent years, biological prognostic factors have been incorporated into clinical practice. Identifying a biological marker of aggressive disease would help not only to select high-risk patients, but also to develop novel strategies in the management of advanced rectal cancer. Some of the biological factors most studied are *p53* and *K-ras* gene mutations, microsatellite instability, cell proliferation-related markers and epidermal growth factor receptor (EGFR). Several reports have suggested that EGFR expression may be associated with shorter survival in primary colorectal cancer [10,16,19,27,32]. EGFR is a member of the type I tyrosine kinase family that is often expressed at high levels in human cancer and has been associated with more aggressive tumors [7]. In colorectal cancer, EGFR is expressed in 50–70% of cases and is associated with poor prognosis. In a previous study we reported that 64% of locally advanced rectal cancer patients expressed EGFR at the diagnostic biopsy and EGFR positive expression was associated with a statistically significant reduction in the rate of pathologic complete response to preoperative radiotherapy [9]. The aim of the present study is to assess the prognostic value of EGFR expression in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative radiotherapy.

2. Patients and methods

2.1. Patients

This is a retrospective study composed of 87 patients treated between January 1998 and August 2001, in three Spanish Institutions. Criteria for patient inclusion were as follows: (1) histologically confirmed diagnosis of adenocarcinoma of the rectum, with the inferior margin of the tumor being no farther than 15 cm from the anal verge, (2) clinically staged locally advanced rectal cancer, (3) treatment with preoperative radiotherapy with or without simultaneous chemotherapy followed by surgical resection,

and (4) availability of tissue samples of the diagnostic biopsy and tumor specimen for review and immunostaining. Locally advanced rectal cancer was defined as tumor extension through the bowel wall or with lymph node involvement. All patients were distant metastases-free at diagnosis. Local extension assessment was based on clinical, and/or radiographic evaluations. Diagnostic studies consisted of colorectal endoscopy, presurgical carcinoembryonic antigen value, endorectal ultrasound, pelvic CT scan, chest X-ray and routine laboratory studies. There were 64 males and 23 females with a median age of 66 ± 11.4 years (range 34–92). Patients' characteristics are listed in Table 1. Archival tissue samples from the tumors were obtained from the local pathology departments, with the approval of the Hospital Vall d'Hebron Ethical Committee.

Preoperative radiotherapy was delivered to the pelvis with 18 MV photons. Clinical target volume included the tumor and the rectum, the anterior wall of the sacrum and the posterior wall of the prostate or vagina as well as the following lymph nodes: perirectal, presacral, hypogastric, obturator and iliac. The standard three conformal fields, PA and two opposed laterals with wedges were used. All patients received conventional fractionation, 1.80 Gy/day, 5 fractions per week to a total dose of 45 Gy. In 8 patients, a 5.4 Gy boost to the tumor was given. Fifty patients received simultaneous chemotherapy. Two schedules were used: in 33 patients, 2 courses of 5-FU (350 mg/m^2 iv bolus 1 h prior to radiotherapy on days 1 through 5 and on days 29 through 33) and leucovorin calcium (20 mg/m^2 iv bolus immediately before each dose of 5-FU). Seventeen were treated with oral fluoropyrimidines UFT 500 mg/day and leucovorin 60 mg/day , daily during radiotherapy. Patients were restaged by physical examination, pelvic CT, chest X-ray and blood chemistries, between 4 and 8 weeks later. Subsequently, all patients underwent surgery; 51 having low anterior resection (58%) and 36-abdominoperineal removal (42%). In all cases, a total mesorectal resection was performed. Pathologic study of the surgical specimen was performed and tumor was pathologically staged according to UICC criteria. The median time between radiotherapy and surgery was 52 days (range 34–68 days).

2.2. Immunohistochemical assay for the presence of EGFR

Paraffin-embedded blocks of diagnostic biopsies and primary tumor of the surgical specimens were cut in $5 \mu\text{m}$ sections. Sections of the tissue blocks were deparaffined with xylene and rehydrated. Endogenous peroxidase activity was blocked with 0.2% hydrogen peroxidase solution and non-specific labeling was blocked in serum blocking solution. Sections were incubated in complete medium for 1 h at room temperature with EGFR rabbit monoclonal antibody (MU 207-UC; Biogenex, San Ramon, CA) at a dilution of 1:20 (v/v). As a negative control the primary antibody was omitted and replaced with phosphate-buffered saline. The reaction was revealed by the avidin-biotin complex peroxidase

Table 1
Patient's characteristics and EGFR status before radiotherapy by clinical variables

	Total		EGFR-		EGFR+		P
	No.	%	No.	%	No.	%	
Total	87	100	35	40	52	60	
Gender							
Male	64	74	28	44	36	56	0.26
Female	23	26	7	30	16	70	
Age							
<60 years	25	29	10	40	15	60	0.98
≥60 years	62	71	25	40	37	60	
Performance status							
0	42	48	19	45	23	55	0.36
1–2	45	52	16	35	29	65	
Tumor stage							
T2	6	7	3	50	3	50	0.47
T3	69	79	29	42	40	58	
T4	12	14	3	25	9	75	
Differentiation grade							
Grade 1	16	21	7	44	9	56	0.91
Grade 2	53	67	20	38	33	62	
Grade 3	10	12	4	40	6	60	
Not evaluable	8	–					
Nodal stage							
N0	50	58	30	60	20	40	0.96
N1–2	37	42	22	59	15	41	
Pathologic response							
Yes	10	11	8	80	2	20	0.006
No	77	89	27	35	50	65	
Pathologic lymph nodes							
Yes	25	29	19	76	6	24	0.059
No	62	71	33	53	29	47	

method (ABC Elite kit, Vector Burlingame, CA) followed by staining with the peroxidase substrate 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (DAB; Sigma GmbH, Deisenhofen, Germany). The slides were counterstained with 50% hematoxylin. Human skin tissue was used as a positive control for EGFR expression.

Specimens were examined by light microscopy. All slides were assessed for EGFR expression by two trained histopathologists masked to tumor response to pelvic radiotherapy. Immunohistochemical results were evaluated according to extension and intensity. Extension was defined as the positive tumor cell percentage. A score of one to five was assigned according to the percentage of positively stained tumor cells: 1 = positive staining less than 5%; 2 = 5–25%; 3 = 25–50%; 4 = 50–75%; 5 = >75%. Staining intensity was graded qualitatively as 0 = not detectable, 1 = weak; 2 = moderate; 3 = intense. EGFR was said to have positive staining (EGFR positive) when extension was 5% or more [4]. When the extension was less than 5% (score 1) it was considered as negative staining (EGFR negative). We defined highly positive expression when extension was >50% and/or grade 3 intensity (EGFR > 50). Fig. 1 shows some examples of immunohistochemical staining and evaluation. All immunohistochemical assays were performed in the same department of pathology.

2.3. Statistical analysis

Possible associations between EGFR immunorexpression and clinical/histopathologic characteristics were determined using the Fisher's exact test. Follow-up time and time to recurrence were calculated from the date of starting treatment to the date of relevant outcome or last control. Disease-free survival (DFS) was calculated as the interval between the date of starting treatment and the date of the first recurrence of disease (local relapse or distant metastases) or last follow-up. Local control and metastases-free survival were defined as the interval between the date of starting treatment and the date of local relapse or distant metastases respectively. Overall survival (OS), DFS, local control, and metastases-free survival were calculated according to Kaplan–Meier method. Analyses for the association between variables and local failure, distant metastases, DFS and overall OS were conducted using Cox regression. To determine whether EGFR expression was an independent factor for DFS, the Cox proportional hazards regression model was used. EGFR expression and relevant co variables were assembled in a database and analyzed using the SPSS statistical software package (SPSS V.11.0, Inc., Chicago, IL). All tests of statistical significance used in this study were two-sided and the significance level (α level) was $P = 0.05$.

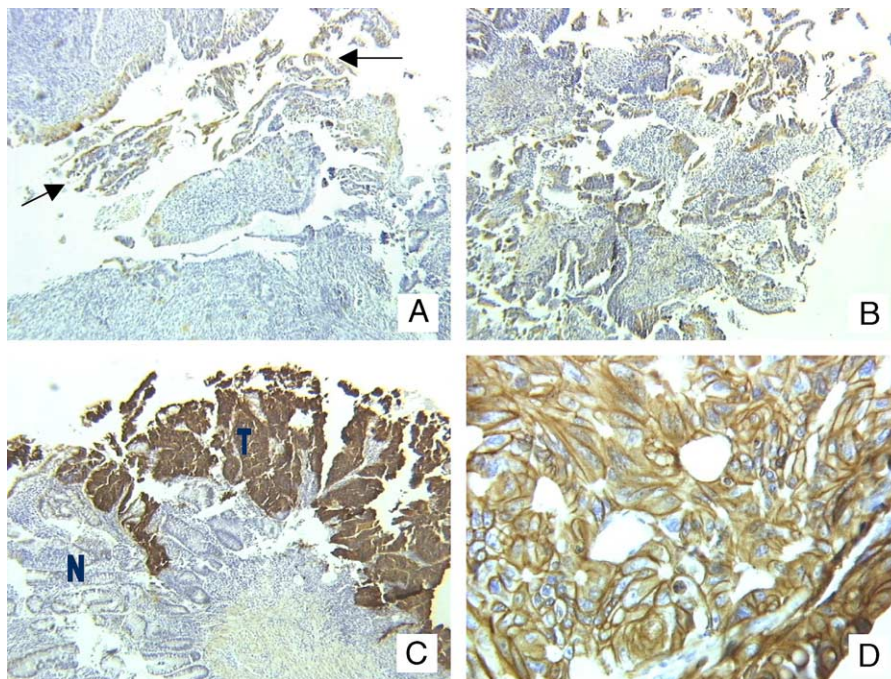


Fig. 1. Immunohistochemistry for EGFR in rectal cancer: (A) Slight positivity in 50% of tumor cells (see arrows) (DAB100X). (B) Mild positivity in 80–90% (DAB100X). (C) Strong EGFR tumor immunorexpression in 100% (T). No immunohistochemical expression in adjacent normal mucosa (N) (DAB100X). (D) EGFR expression with characteristic membrane immunostaining (DAB400X).

3. Results

3.1. Descriptive analyses

Thirty-seven patients responded to preoperative radiotherapy and 10 patients achieved pathologic complete response. At surgery, 25 patients presented positive lymph's nodes, the mean number of involved nodes being 3.2. A total of nine patients experienced loco regional recurrence; one in the anastomosis, four presacral and four in the pelvis. Twenty-four patients presented distant metastases; 10 in the liver, nine in the lungs, three in liver and lungs, one in bone and one in the retroperitoneal lymph's nodes. Fifty-seven patients remained disease-free. Nineteen patients died during the follow-up period; 15 for tumor progression, one in the post-operative period and three for other causes; one pneumonia, one natural and one unknown. The median follow-up time was 36 months.

In our series, EGFR proved to be positive in 52 diagnostic biopsies giving an EGFR positive expression rate of 60%. In 28 biopsies EGFR extension was greater than 75%, in 13 cases it was between 25 and 75% and in 11 cases lower than 25%. Intensity was: grade 1 in 25 biopsies, grade 2 in 15 and grade 3 in 12. Thirty-eight had patients highly positive staining. Table 1 shows the link between EGFR expression at biopsy and clinical characteristics. EGFR positive expression was not associated with any of the following variables: gender, age, performance status, tumor stage, lymph node stage or lymph node status at surgery.

EGFR expression was also analyzed in the surgical specimens of 77 patients. The remaining 10 patients achieved complete response and were therefore not assessable. Of the 77 specimens studied, 53 were found to be positive (61%) and 23 negative. On comparing expression in the biopsy samples with that of the surgical specimens, we found that of the 54 EGFR positive biopsies, 43 samples remained positive in the surgical specimens (82%) and 8 became negative (15%); no tumor was found in 2 samples. When we examined the 42 EGFR negative biopsy samples, only 15 remained negative (36%), while 11 became positive (26%) and no tumor was found in 8 samples.

3.2. Predictors for treatment response

None of the following factors were found to predict treatment response: age, gender, tumor location, tumor stage, lymph node stage or lymph node status at surgery. Only EGFR expression at biopsy showed a statistically significant association with treatment response. Two of the 52 EGFR-positive patients achieved pathologic complete response (4%), in comparison with 23% (8/35) of the EGFR negative patients ($P=0.006$). There is therefore a clear link between positive EGFR expression and lack of pathologic complete response.

3.3. Outcome

EGFR expression at biopsy had a strong association with DFS. Patients with EGFR positive expression had

significantly shorter DFS than those with EGFR negative expression ($P=0.003$), however, no differences were found in overall survival. Results of the log-rank test for associations between clinico-pathologic variables and DFS are listed in Table 2 and survival curves are shown in Fig. 2. Log-rank statistics for local control show no significant association with EGFR positivity ($P=0.19$). Seven of the 54 EGFR positive tumors relapsed locally (13%) in comparison with the 5% relapse rate in the EGFR negative tumors (2 of 42). However, EGFR positive tumors were more likely to recur distantly, with 14% of EGFR negative tumors (six of 42) recurring distantly versus 43% (22 of 54) of EGFR positive tumors ($P=0.002$). We also have analyzed the prognostic value of EGFR >50, positive expression was associated with a shorter DFS; $P<0.001$.

On examining EGFR status in the surgical specimen DFS of EGFR positive patients was found to be shorter than that of EGFR negative patients, although differences were not statistically significant ($P=0.17$).

The Cox proportional hazards model for DFS included all 87 patients. EGFR expression, tumor stage, treatment and gender were entered into the model. EGFR status was found to be an independent predictor for DFS with a $RR=2.88$; 95% CI, 1.07–7.75; $P=0.036$ (Table 3).

4. Discussion

This study addresses whether EGFR status before radiotherapy by immunohistochemical staining in rectal cancer patients treated with preoperative radiotherapy is a prognostic factor for survival. EGFR expression was also compared with the established prognostic factors in this group of patients. The ability to predict which patients are likely to respond to treatment is a major advance in the management of cancer patients. In this study, to our knowledge the first of this kind, a uniform cohort of patients with locally advanced rectal adenocarcinoma treated with neoadjuvant radiotherapy was analyzed. This is a retrospective study in which different preoperative treatments were used, but the cohort is homogenous in the participating three hospitals and the clinical findings are consistent with results published in the literature [3,5,14,15,28]. Treatment consisted of preoperative radiotherapy, with concurrent chemotherapy in many cases, and surgical resection. EGFR positive tumors were found to have more likely a lack of response to neoadjuvant treatment, but more importantly, EGFR positive expression was associated with a shorter disease-free survival. In our series, the comparison of EGFR status with the standard clinical pathologic prognostic factors showed that EGFR status was a strong predictor of

Table 2
Bivariate analysis of various clinical factors predicting treatment outcome

	Total		Recurrence		Risk ratio	95%	CI	P*
	No.	%	No.	%				
Sex								
Male	64	74	15	34	1			
Female	23	26	11	48	2.65	1.21	5.80	0.019
Tumor Stage								
T2–T3	75	86	20	27	1			
T4	12	14	6	50	2.39	0.96	5.96	0.08
Differentiation grade								
Grade 1	16	19	5	31	1			0.93
Grade 2	53	57	16	30	0.83	0.30	2.26	
Grade 3	10	14	3	33	0.93	0.22	3.88	
Nodal stage								
N0	50	58	13	26	1			
N1–2	37	42	13	35	1.19	0.55	2.57	0.66
Treatment								
Radiother-	37	42	17	46	1			
apy								
RT-CT	50	58	9	19	0.30	0.13	0.68	0.003
Pathologic Response								
Yes	10	11	1	10	1			
No	77	89	25	34	0.98	0.04	2.20	0.149
Pathologic nodes								
Negative	25	29	11	46	1			
Positive	62	71	15	24	2.26	1.04	4.92	0.047
EGFR at biopsy								
Positive	52	60	21	41	3.73	1.40	9.92	0.003
Negative	35	40	5	14	1			
EGFR > 50								
Positive	38	44	12	41	10.86	1.40	84.22	<0.001
Negative	49	56	1	5	1			

*Univariate Cox regression.

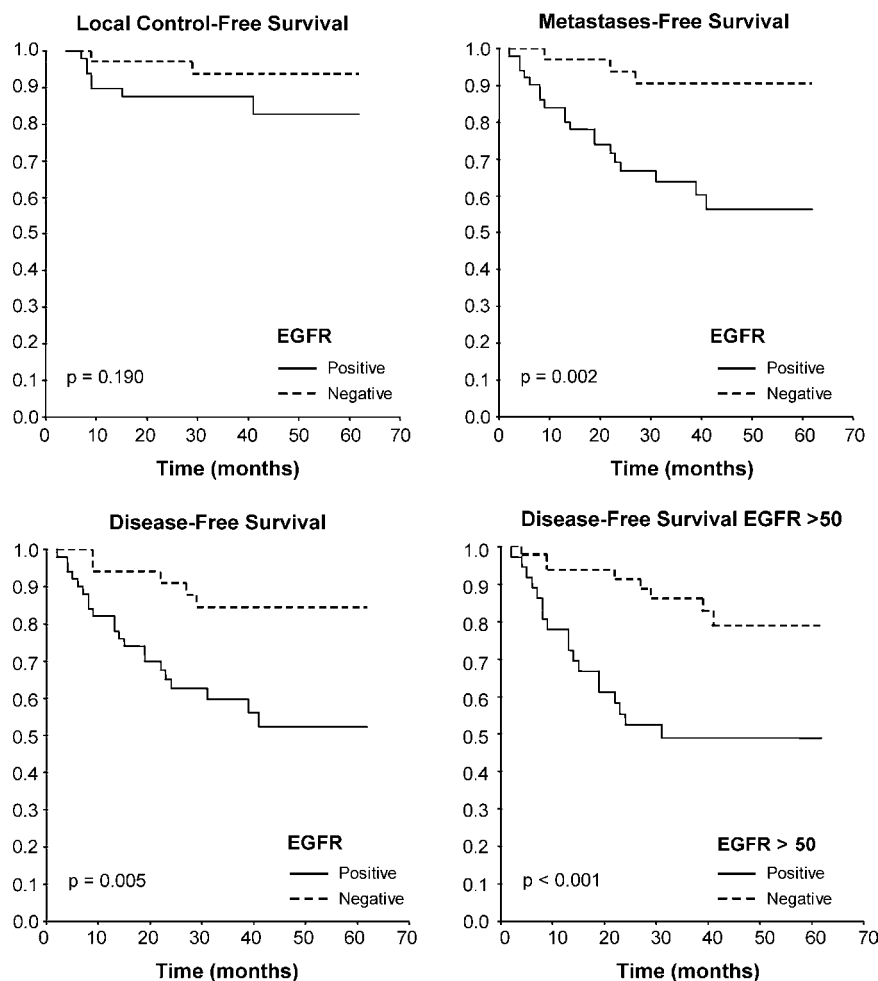


Fig. 2. Kaplan–Meier survival curves for disease-free, local control, metastases-free and with respect to EGFR status before radiotherapy and DFS in EGFR > 50.

outcome and may therefore be useful in selecting a group of high-risk patients requiring more tailored therapy.

EGFR is now recognized as an important target for investigation because of the prognostic significance of its expression in a wide variety of tumors and its possible implication for selective therapies. A positive correlation of EGFR status determined by immunohistochemical staining has been implicated in many human carcinomas. In breast cancer, EGFR protein expression has been associated with poor prognosis [29] and non-response to endocrine therapy [24]. Grandis et al. [11] quantified EGFR levels in head and neck squamous cell carcinomas and found that they predicted disease-free and cause-specific survival. Ang et al. [2] studied EGFR expression in 155 patients enrolled in a phase III randomized trial, who were treated with conventional radiotherapy. EGFR expression was a robust predictor of survival and local control. EGFR amplification was also found to be an independent predictor of prolonged survival in patients older than 60 years with glioblastoma multiforme [31]. In prostate cancer, EGFR expression correlates with disease relapse and progression to androgen-independence [6].

So far, the available data support a role for EGFR expression in the development of colorectal carcinoma. Although some negative results were reported, most investigators have shown that EGFR levels correlate with more aggressive disease and a poorer prognosis. Steele et al. [32] assessed EGFR expression in 50 cases of invasive colorectal cancer using immunohistochemistry. Dukes' C tumors were found to exhibit significantly higher EGFR levels than Dukes' A or B and it was concluded that high EGFR expression is associated with poor prognosis. Mayer et al. [19] found 72 cases of EGFR positive expression in 82 resected colorectal adenocarcinomas (88%). The extent of

Table 3
Multivariate analyses for disease-free survival

	Risk ratio	95% CI	CI	P
Treatment	0.35	0.15	0.79	0.012
Gender	2.41	1.10	5.31	0.029
EGFR expression at biopsy	2.88	1.07	7.75	0.036

Basal category: radiochemotherapy; male; EGFR negative.

EGFR expression revealed significant differences in survival times; patients with more than 50% stained tumor cells had poorer prognosis than those with less than 50% staining ($P < 0.01$). Radinsky et al. [27] found that increased tumor EGFR mRNA levels were associated with a higher incidence of liver metastases. Goldstein et al. [10] analyzed EGFR status in 102 patients with metastatic colon adenocarcinoma and found EGFR reactivity in 75% of cases. EGFR reactivity appeared to have the strongest correlation in the deep regions of colon adenocarcinoma and closer correlation with survival length. Not all investigators reported a significant link between EGFR status and outcome. McKay et al. [20] found EGFR expression did not influence prognosis in a cohort of 249 colorectal adenocarcinomas patients. Khorama et al. [16] analyzed EGFR expression in 131 consecutive stage II–III colon carcinoma patients treated with surgical resection. High grades of EGFR expression were found to be associated with a non-statistically significant trend toward worsen survival.

There are no data regarding EGFR expression in a study population composed exclusively of rectal cancer patients. When comparing patterns of relapse between colon and rectal tumors, the latter has a higher incidence of local failure. In our series, the local relapse rate was 9%. EGFR positive expression was not associated with greater local relapse rate. We are not aware whether this lack of association was due to the small number of local relapses that could have masked this association or whether EGFR expression really does not predict local relapse. Ang analyzed EGFR expression in advanced head and neck cancer patients treated with radiotherapy alone and found EGFR to be a robust predictor for local relapse but not for distant metastases [2]. Contrary to Ang, our data suggest that EGFR expression is a predictor for distant metastases. A possible explanation is that EGFR expression may identify resistance to radiochemotherapy. This resistance could be expressed in some tumors as local failure and in others as distant failure. Experimental data show EGFR expression to be the strongest indicator of cellular radioresistance *in vitro* [30]. This association has also been shown *in vivo*, Akimoto et al. reported an inverse relationship between EGFR expression and radiocurability of murine carcinomas [1]. The ability of EGFR expression to predict tumor response to radiochemotherapy has also been proven in clinical studies. Hickey [13] analyzed EGFR expression in 14 chemoradiotherapy-treated esophageal squamous cell carcinomas and found a statistically significant relationship between EGFR expression and lack of response to chemoradiotherapy. Magne et al. [18] evaluated 77 unresectable pharyngeal carcinoma patients treated with radiotherapy, two fractions per day, and concomitant chemotherapy (three courses of cisplatin-5FU). The EGFR expression at pretreatment biopsy was a significant prognostic factor for response suggesting that EGFR expression may be an important marker for tumor radio sensitivity.

We have determined EGFR expression both at pretreatment biopsy and in the surgical specimen. In our study, most of the EGFR positive biopsies continued to be positive in the surgical specimen. When we examined the 42 EGFR negative biopsy samples, only 23 remained negative, while 11 became positive and no tumor was found in 8. Our hypothesis is that EGFR expression was changed by treatment selection. Exposure of human cancer cells to radiation activates EGFR, which, mediates a cytoprotective response reducing the cells' sensitivity to radiation [17]. EGFR activation mediates clonogen repopulation. A temporary coincidence of increasing EGFR expression and clonogenic repopulation has been shown in experimental tumors [25]. Interestingly EGFR expression analyzed in surgical specimens does not predict disease-free survival, suggesting that treatment may modify the predictive value of EGFR expression. Others investigators had evaluated EGFR expression after treatment. Hermes et al. [12] studied EGFR expression before and during androgen-independence in 106 prostate carcinoma patients. Changes in the EGFR expression occurred in the two opposite directions: negativity changed to positivity and vice versa. Expression of cell cycle regulatory proteins (p21^{Waf1}, p27^{Kip1}, p53, cyclin D3 and Ki-67) in breast carcinomas before and after preoperative chemotherapy were evaluated by Pohl [26]. All proteins presented changes in the expression after treatment. Treatment can modify EGFR expression and the significance of this change should be evaluated in futures studies.

In summary, our study indicates that EGFR expression at the diagnostic biopsy of locally advanced rectal cancer treated with radiotherapy may serve as an important predictor of disease-free survival. In the present study, EGFR positive expression was observed in a significant number of cases and was associated with a lack of pathologic complete response and a shortened disease-free survival time. Therefore, analysis of EGFR expression may be helpful in determining a subgroup of high-risk patients requiring more customized therapeutic modalities against this receptor.

References

- [1] Akimoto T, Hunter NR, Buchmiller L, Mason K, Ang KK, Milas L. Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas. *Clin Cancer Res* 1999;5:437–43.
- [2] Ang KK, Berkey BA, Tu X, et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinomas. *Cancer Res* 2002;62:7350–6.
- [3] Berger C, de Muret A, Garaud P, et al. Preoperative radiotherapy for rectal cancer: predictive factors of tumor downstaging and residual tumor cell density: prognostic implications. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;37:619–27.
- [4] Bredel M, Pollack IF, Hamilton RL, James CD. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in high-grade non-brainstem gliomas of childhood. *Clin Cancer Res* 1999;5:1786–92.

- [5] Calvo FA, Gomez-Espi M, Diaz-Gonzalez JA, et al. Pathologic downstaging of rectal cancer after chemoradiation: 5-fluorouracil vs. tegafur. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:1264–70.
- [6] Di Lorenzo G, Tortora G, D'Armiento FP, et al. Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:3438–44.
- [7] Di Marco E, Pierce JH, Fleming TP, et al. Autocrine interaction between TGF- α and the EGF-receptor: quantitative requirements for induction of the malignant phenotype. *Oncogene* 1992;4: 831–8.
- [8] Garfinkel L. Cancer statistics and trends. In: Holleb AI, Fink DJ, Murphy GP, editors. *American cancer society textbook of clinical oncology*. 1st ed. Atlanta: American Cancer Society; 1991. p. 1–6.
- [9] Giralt J, Eraso A, Armengol M, et al. Epidermal growth factor receptor is a predictor of tumor response in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;54:1460–5.
- [10] Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with american joint committee on cancer stage IV colon adenocarcinoma. *Cancer* 2001; 92:1331–46.
- [11] Grandis JR, Melhem MF, Gooding WE, et al. Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:824–32.
- [12] Hernes E, Fossa SD, Berner A, Otnes B, Nesland JM. Expression of the epidermal growth factor receptor family in prostate carcinoma before and during androgen-independence. *Br J Cancer* 2004;90: 449–54.
- [13] Hickey K, Grehan D, Reid I, O'Briain S, Walsh TN, Hennessy TP. Expression of epidermal growth factor receptor and proliferating cell nuclear antigen predicts response of esophageal squamous cell carcinomas to chemotherapy. *Cancer* 1994;74:1693–8.
- [14] Janjan NA, Abbruzzese J, Pazdur R, et al. Prognostic implications of response to preoperative infusional chemoradiation in locally advanced rectal cancer. *Radiother Oncol* 1999;51:153–60.
- [15] Janjan NA, Crane C, Feig BW, et al. Improved overall survival among responders to preoperative chemoradiation for locally advanced rectal cancer. *J Am J Clin Oncol* 2000;47:713–8.
- [16] Khorana AA, Ryan CK, Cox C, Eberly S, Sahasrabudhe DM. Vascular endothelial growth factor, CD68, and epidermal growth factor receptor expression and survival in patients with stage II and stage III colon carcinoma: a role for the host response in prognosis. *Cancer* 2003;97:960–8.
- [17] Lammering G, Hewit TH, Hawkins WT, et al. Epidermal growth factor receptor as a genetic therapy target for carcinoma cell radiosensitization. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:921–9.
- [18] Magne N, Pivot X, Bensadoun RJ, et al. The relationship of epidermal growth factor receptor levels to the prognosis of unresectable pharyngeal cancer patients treated by chemo-radiotherapy. *Eur J Cancer* 2001;37:2169–77.
- [19] Mayer A, Takimoto M, Fritz E, Schellander G, Kofler K, Ludwig H. The prognostic significance of proliferation cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and *mdr* gene expression in colorectal cancer. *Cancer* 1993;71:2454–60.
- [20] McKay JA, Murray LJ, Curran S, et al. Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. *Eur J Cancer* 2002;38:2258–64.
- [21] Minsky B, Cohen A, Kemeny N, et al. Enhancement of radiation-induced downstaging of rectal cancer by fluorouracil and high-dose leucovorin chemotherapy. *J Clin Oncol* 1992;10:79–84.
- [22] Mohiuddin M, Hayne M, Regine WF, et al. Prognostic significance of postchemoradiation stage following preoperative chemotherapy and radiation for advanced/recurrent rectal cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:1075–80.
- [23] National Institutes' of Health Consensus Conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. *JAMA* 1990;264: 1444–50.
- [24] Nicholson S, Halcrow P, Sainsbury JR, et al. Epidermal growth factor receptor status associated with failure of primary endocrine therapy in elderly postmenopausal patients with breast cancer. *Br J Cancer* 1988; 58:810–4.
- [25] Petersen C, Eicheler W, Frommel A, et al. Proliferation and microclimate during fractionated irradiation of human FaDu squamous cell carcinoma in nude mice. *Int J Radiat Biol*. 2003;79:469–77.
- [26] Pohl G, Rudas M, Taucher S, et al. Expression of cell cycle regulatory proteins in breast carcinomas before and after preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2003;78:97–103.
- [27] Radinsky R, Risin, Fan, et al. Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1995;1:19–31.
- [28] Ruo L, Tickoo S, Klimstra DS, et al. Long-term prognostic significance of extent of rectal cancer response to preoperative radiation and chemotherapy. *Ann Surg* 2002;236:75–81.
- [29] Sainsbury JR, Farndon JR, Needham GK, Malcolm AJ, Harris AL. Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence and death from breast cancer. *Lancet* 1987;1:1398–402.
- [30] Sheridan MT, O'Dwyer T, Seymour CB, Mothersill CE. Potential indicators of radiosensitivity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiat Oncol Investig* 1997;5:180–6.
- [31] Smith J, Tachibana I, Passe SM, et al. PTEN Mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1246–56.
- [32] Steele RJ, Kelly P, Ellul B, Eremin O. Epidermal growth factor receptor expression in colorectal cancer. *Br J Surg* 1990;77:1352–4.

BIBLIOGRAFÍA

¹ Kane JM, Petrelli NJ. Controversies in the surgical management of rectal cancer. *Semin Radiat Oncol.* 2003; 13:403–418

² Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T, Rutten HJ, Pahlman L, Glimelius B, van Krieken JH, Leer JW, van de Velde CJ. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med.* 2001; 345:638–646.

³ Colorectal Cancer Collaborative Group. Adjuvant radiotherapy for rectal cancer: a systematic overview of 8,507 patients from 22 randomised trials. *Lancet.* 2001; 358:1291–1304.

⁴ Hunter, T. (1998). The Croonian lecture, 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 353, 583–605.

⁵ G. Manning, D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298 (2002) 1912–1934.

⁶ Dhanasekaran N, Premkumar Reddy E (September 1998). "Signaling by dual specificity kinases". *Oncogene* 17 (11 Reviews): 1447–55.

⁷ www.genome.ad.jp Retrieved on 2007-04-05

⁸ Hubbard SR, Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog Biophys Mol Biol.* 1999;71(3-4):343-58.

⁹ Tzahar E, Pinkas-Kramarski R, Moyer JD, et al. 1997. Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *EMBO J.* 16:4938–50

-
- ¹⁰ Cohen S, Carpenter G. 1975. Human epi-dermal growth factor: isolation and chemical and biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:1317–21
- ¹¹ Shelly M, Pinkas-Kramarski R, Guarino BC, et al. 1998. Epiregulin is a potent pan-ErbB ligand that preferentially activates heterodimeric receptor complexes. *J. Biol. Chem.* 273:10496–505
- ¹² Derynck R. 1998. Transforming growth factor alpha. *Cell* 54:593–95
- ¹³ Simon MA. 2000. Receptor tyrosine ki-nases: specific outcomes from general sig-nals. *Cell* 103:13–15
- ¹⁴ Linggi, B. and Carpenter, G. (2006). "ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology". *Trends Cell Biol.* 16 (12): 649–656
- ¹⁵ Walker RA. 1998. The erbB/HER type 1 tyrosine kinase receptor family. *J. Pathol.* 185:234–35
- ¹⁶ Yarden Y, Sliwkowski MX. 2001. Untan-glingthe ErbB signaling network. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2:127–37
- ¹⁷ Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y. Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Res.* 2000;77:25-79.
- ¹⁸ Cohen Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 46, 302 (1960)
- ¹⁹ Cohen . Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem* 237 (5): 1555-62; 1962
- ²⁰ Cohen, S, Elliott, GA. The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse. *J Invest Dermatol* 1963 40:1–5

-
- ²¹ Cohen, S: The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Dev Biol* 1965 12: 394–407
- ²² Cohen. Recent progress in hormona Research. Volumen 30, p. 551-574 (1974).
- ²³ Savage, C. R., and Cohen, S. (1972) Epidermal growth factor and a new derivative. Rapid isolation procedures and biological and chemical characterization. *J. Biol. Chem.* 247, 7609–7611
- ²⁴ Taylor JM, Mitchell WM, Cohen S. Epidermal growth factor. Physical and chemical properties. *J Biol Chem.* 1972 Sep 25;247(18):5928–5934
- ²⁵ Savage CR, Jr, Inagami T, Cohen S. The primary structure of epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 1972 Dec 10;247(23):7612–7621
- ²⁶ Savage CR, Jr, Hash JH, Cohen S. Epidermal growth factor. Location of disulfide bonds. *J Biol Chem.* 1973 Nov 25;248(22):7669–7672
- ²⁷ Taylor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67,164 (1970)
- ²⁸ Armelin HA. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973 Sep;70(9):2702–2706
- ²⁹ Hollenberg (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2.964-2.968
- ³⁰ Carpenter G, Cohen S. Human epidermal growth factor and the proliferation of human fibroblasts. *J Cell Physiol.* 1976 Jun;88(2):227–237
- ³¹ Starkey RH, Cohen S, Orth DN. Epidermal growth factor: identification of a new hormone in human urine. *Science.* 1975 Sep 5;189(4205):800–802.
- ³² Cohen (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1.317-1.321
- ³³ H. Gregory. Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature* 257, 325 - 327 (25 September 1975
- ³⁴ Cohen S, Carpenter G, King L. Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-

enhanced phosphorylation activity. *J Biol. Chem* 255 (10);4834-42,1980.

³⁵ Ushiro *JBC* 255, 8363-65 (1980)

³⁶ Carpenter *J Biol. Chem* 254, 4884-91; 1979

³⁷ Carpenter, Jr. and Cohen, S. (1978) *Nature(London)* 276, 408-410.

³⁸ *Nature* 1984 Feb 9-15; 307(5951):521-7 Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P, Ullrich A, Schlessinger J, Waterfield MD.

³⁹ Lax, I., Burgess, W.H., Bellot, F., Ullrich, A., Schlessinger, J., and Givol, D. (1988a). Localization of a major receptor-binding domain for epidermal growth factor by affinity labeling. *Mol. Cell. Biol.* 8, 1831–1834.

⁴⁰ Lax, I., Johnson, A., Howk, R., Sap, J., Bellot, F., Winkler, M., Ullrich, A., Vennstrom, B., Schlessinger, J., and Givol, D. (1988b). Chicken epidermal growth factor (EGF) receptor: cDNA cloning, expression in mouse cells, and differential binding of EGF and transforming growth factor . *Mol. Cell. Biol.* 8, 1970–1978.

⁴¹ Bajaj, M., Waterfield, M.D., Schlessinger, J., Taylor, W.R., and Blundell, T. (1987). On the tertiary structure of the extracellular domains of the epidermal growth factor and insulin receptors. *Biochim. Bio- phys. Acta* 916, 220–226.

⁴² Ward, C.W., Garrett, T.P., McKern, N.M., Lou, M., Cosgrove, L.J., Sparrow, L.G., Frenkel, M.J., Hoyne, P.A., Elleman, T.C., Adams, T.E., et al. (2001). The three dimensional structure of the type I insulin-like growth factor receptor. *Mol. Pathol.* 54, 125–132.

⁴³ Ward, C.W., Hoyne, P.A., and Flegg, R.H. (1995). Insulin and epidermal growth factor receptors contain the cysteine repeat motif found in the tumor necrosis factor receptor. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 22, 141–153.

-
- ⁴⁴ Lax, I., Burgess, W.H., Bellot, F., Ullrich, A., Schlessinger, J., and Givol, D. (1988a). Localization of a major receptor-binding domain for epidermal growth factor by affinity labeling. *Mol. Cell. Biol.* 8, 1831–1834.
- ⁴⁵ Lax et al Lax, I., Johnson, A., Howk, R., Sap, J., Bellot, F., Winkler, M., Ullrich, A., Vennstrom, B., Schlessinger, J., and Givol, D. (1988b). Chicken epidermal growth factor (EGF) receptor: cDNA cloning, expression in mouse cells, and differential binding of EGF and transforming growth factor. *Mol. Cell. Biol.* 8, 1970–1978.
- ⁴⁶ Bajaj, M., Waterfield, M.D., Schlessinger, J., Taylor, W.R., and Blunordell, T. (1987). On the tertiary structure of the extracellular domains of the epidermal growth factor and insulin receptors. *Biochim. Bio-phys. Acta* 916, 220–226.
- ⁴⁷ Ferguson, EGF Activates Its Receptor by Removing Interactions that Autoinhibit Ectodomain Dimerization. *Molecular Cell*, Vol. 11, 507–517, February, 2003.
- ⁴⁸, Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, et al. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains, *Cell* vol 110 pp 775-787
- ⁴⁹Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 2002; 110: 669–672.
- ⁵⁰ Derynck R. 1998. Transforming growth factor alpha. *Cell* 54:593–95
- ⁵¹ Simon MA. 2000. Receptor tyrosine kinases: specific outcomes from general signals. *Cell* 103:13–15
- ⁵² Weiss A, Schlessinger Switching signals on or off by receptor dimerization. *J.Cell.* 1998 Aug 7;94(3):277-80.

-
- ⁵³ Van der Geer P, Pawson T. A conserved amino-terminal Shc domain binds to phosphotyrosine motifs in activated receptors and phosphopeptides. *Curr Biol.* 1995 Apr 1;5(4):404-12.
- ⁵⁴ Van der Geer P, Pawson T. The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem Sci.* 1995 Jul;20(7):277-80.
- ⁵⁵ Roskoski Jr R. RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 399:313–7.
- ⁵⁶ Roskoski Jr R. MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 417:5–10.
- ⁵⁷ Roskoski Jr R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 2012; 66:105–43.
- ⁵⁸ Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, et al. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 1992; 70:431–42.
- ⁵⁹ McCormick, F. Signal transduction. How receptors turn Ras on. *Nature* 363, 15–16 (1993).
- ⁶⁰ Marshall, C. J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179–185 (1995).
- ⁶¹ Matuoka, K., Shibata, M., Yamakawa, A. & Takenawa, T. Cloning of ASH, a ubiquitous protein composed of one Src homology region (SH) 2 and two SH3 domains, from human and rat cDNA libraries. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89, 9015–9019 (1992).
- ⁶² Matuoka, K., Shibasaki, F., Shibata, M. & Takenawa, T. Ash/Grb-2, a SH2/SH3-containing protein, couples to signaling for mitogenesis and cytoskeletal reorganization by EGF and PDGF. *EMBO J.* 12, 3467–3473 (1993).

⁶³ Lowenstein, E. J. *et al.* The SH2 and SH3 domain- containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70, 431–442 (1992).

⁶⁴ Selva E, Raden DL, Davis RJ. Mitogen-activated protein kinase stimulation by a tyrosine kinase-negative epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 1993 Jan 25;268(3):2250-4.

⁶⁵ Bjorge, J. D., Chan, T. O., Antczak, M., Kung, H. J. & Fujita, D. J. Activated type I phosphatidylinositol kinase is associated with the epidermal growth factor (EGF) receptor following EGF stimulation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87, 3816–3820 (1990).

⁶⁶ Franke, T. F. *et al.* The protein kinase encoded by the *Akt* proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 81, 727–736 (1995).

⁶⁷ Zhong, Z., Wen, Z. & Darnell, J. E. Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 264, 95–98 (1994).

⁶⁸ Chattopadhyay A, Vecchi M, Ji QS, Mernaugh R, Carpenter G. The role of individual SH2 domains in mediating association of phospholipase C-gamma1 with the activated EGF receptor. *J Biol Chem.* 1999;274: 26091–26097.

⁶⁹ Dutil EM1, Toker A, Newton AC Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr Biol.* 1998 Dec 17-31;8(25):1366-75.

⁷⁰ Villalobo A. The human epidermal growth factor receptor contains a juxtamembrane calmodulin-binding site. *Biochemistry.* 1998 Jan 6;37(1):227-36.

-
- ⁷¹ Chin YE, Kitagawa M, Su WC, You ZH, Iwamoto Y, Fu X. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science*. 1996 May 3;272(5262):719-22.
- ⁷² Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:553–63
- ⁷³ Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, Jain M, Ganti AK, Batra SK. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2012;16:15–31
- ⁷⁴ Harari PM, Allen GW, Bonner JA (2007) Biology of interactions: anti-epidermal growth factor receptor agents. *J Clin Oncol* 25:4057–4065. EGFR-induced signaling pathways control gene transcription, cell cycle progression, cell proliferation and survival, adhesion, angiogenesis, migration, and invasion.
- ⁷⁵ Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004, 351(4), 337–345.
- ⁷⁶ Kersemaekers AM, Fleuren GJ, Kenter GG, et al. Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res* 1999, 5(3), 577–586.
- ⁷⁷ Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn Jr PA, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* 2003, 21(20), 3798–3807.
- ⁷⁸ Scartozzi M, Bearzi I, Berardi R, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors does not correlate with EGFR

expression in related metastatic sites: implications for treatment with EGFR-targeted monoclonal antibodies. *J Clin Oncol* 2004, 22(23), 4720–4726.

⁷⁹ Spano JP, Lagorce C, Atlan D, et al. Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol* 2005, 16(1), 102–108.

⁸⁰ Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer* 2001; 92:1331

⁸¹ Spano et al. Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Annals of Oncology* 16: 102–108, 2005

⁸² Nicholson et al. EGFR and cancer prognosis. *European Journal of Cancer* 37 (2001) S9–S15

⁸³ Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70, 2000

⁸⁴ Mendelsohn J, Anti-EGF Receptor family Tyrosine Kinase Inhibitors: *JCO* 20(18s):1s-13s, 2002

⁸⁵ Hanahan D, Weinberg R. *Hallmarks of cancer: the next generation. Cell* 144: 646- 674, 2011.

⁸⁶ Fedi, P., Tronick, S.R., and Aaronson, S.A. (1997). Growth factors. In *Cancer Medicine*, J.F. Holland, R.C. Bast, D.L. Morton, E. Frei, D.W. Kufe, and R.R. Weichselbaum, eds. (Baltimore, MD: Williams and Wilkins), pp. 41–64.

⁸⁷ Huang SM, Li J, Armstrong EA, et al: Modulation of radiation response and tumor-induced angiogenesis after epidermal growth factor receptor inhibition by ZD1839 (Iressa). *Cancer Res* 62:4300- 4306, 2002

⁸⁸ Peng D, Fan Z, Lu Y, et al: Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 up-regulates p27kip1 and induces G1 arrest in prostatic cancer cell line DU145. *Cancer Res* 56:3666- 3669, 1996

-
- ⁸⁹ Wu X, Rubin M, Fan Z, et al: Involvement of p27kip1 in G1 arrest mediated by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *Oncogene* 12:1397-1403, 1996
- ⁹⁰ Huang SM, Bock JM, Harari PM: Epidermal growth factor receptor blockade with c225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 59:1935-1940, 1999
- ⁹¹ Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.
- ⁹² Silvestri F, Ribatti D, Nico B, Silvestri N, Romito A, Dammacco F. Apoptosis or programmata cell death: regulatory and pathophysiological mechanisms (editorial). *Ann Ital Med Int* 1995.
- ⁹³ Cohen J. Apoptosis. *Immunol. Today* 1993;14:126.
- ⁹⁴ Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin Cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 1984; 142:67.
- ⁹⁵ Gibson S, Tu S, Oyer R, et al: Epidermal growth factor protects epithelial cells against fas-induced apoptosis: Requirement for akt activation. *J Biol Chem* 274:17612-17618, 1999
- ⁹⁶ Takeuchi K, Ito F: Suppression of adriamycin- induced apoptosis by sustained activation of the phosphatidylinositol-3 -OH kinase-akt pathway. *J Biol Chem* 279:892-900, 2004
- ⁹⁷ Wu X, Fan Z, Masui H, et al: Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. *J Clin Invest* 95:1897-1905, 1995

⁹⁸ Folkman J: Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182-1186, 1991

⁹⁹ Petit AM, Rak J, Hung MC, et al: Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and erbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: Angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 151:1523-1530, 1997

¹⁰⁰ Schreiber AB, Winkler ME, Derynck R: Transforming growth factor- α : A more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* 232:1250-1253, 1986

¹⁰¹ Bancroft CC, Chen Z, Yeh J, et al: Effects of pharmacologic antagonists of epidermal growth factor receptor, PI3K and MEK signal kinases on NF- κ B and AP-1 activation and IL-8 and VEGF expression in human head and neck squamous cell carcinoma lines. *Int J Cancer* 99:538-548, 2002

¹⁰² Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, et al: Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cells by ZD1839 (Iressa), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 7:1459-1465, 2001

¹⁰³ Huang SM, Harari PM: Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: Inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 6:2166-2174, 2000

¹⁰⁴ Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg. HALLMARKS OF CANCER: THE NEXT GENERATION. *Cell* 2011; 144: 646-74

¹⁰⁵ Contessa JN, Reardon DB, Todd D, et al: The inducible expression of dominant-negative epidermal growth factor receptor-CD533 results in radiosensitization of human mammary carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 5:405-411, 1999

-
- ¹⁰⁶ Sheridan MT, O'Dwyer T, Seymour CB, et al: Potential indicators of radiosensitivity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiat Oncol Investig* 5:180-186, 1997
- ¹⁰⁷ Zhu A, Shaeffer J, Leslie S, et al: Epidermal growth factor receptor: An independent predictor of survival in astrocytic tumors given definitive irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 34:809-815, 1996
- ¹⁰⁸ Bonner JA, Buchsbaum DJ, Rogers BE, et al: Adenoviral vector-mediated augmentation of epidermal growth factor receptor (EGFR) enhances the radiosensitization properties of anti-EGFR treatment in prostate cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58:950-958, 2004
- ¹⁰⁹ Bonner JA, Buchsbaum DJ, Russo SM, et al: Anti-EGFR-mediated radiosensitization as a result of augmented EGFR expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59:2-10, 2004
- ¹¹⁰ Liang K, Milas L, et al: The epidermal growth factor receptor mediates radioresistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57:246-254, 2003
- ¹¹¹ Akimoto T, Hunter NR, Buchmiller L, et al: Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas. *Clin Cancer Res* 5:2884-2890, 1999
- ¹¹² Kavanagh BD, Lin PS, Chen P, et al: Radiation-induced enhanced proliferation of human squamous cancer cells in vitro: A release from inhibition by epidermal growth factor. *Clin Cancer Res* 1:1557-1562, 1995
- ¹¹³ Schmidt-Ullrich RK, Mikkelsen RB, Dent P, et al: Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. *Oncogene* 15:1191-1197, 1997
- ¹¹⁴ Lammering G, Hewitt TH, Valerie K, et al: EGFRviii-mediated radioresistance through a strong cytoprotective response. *Oncogene* 22:5545-5553, 2003

-
- ¹¹⁵ Dent P, Yacoub A, Contessa J et al. Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways. *Radiat Res* 2003; 159: 283–300.
- ¹¹⁶ I. Szumiel. Epidermal growth factor receptor and DNA double strand break repair: The cell's self-defence. *Cell Signal*, 18 (2006), pp. 1537–1548
- ¹¹⁷ Toulany M, Rodemann HP. Membrane receptor signaling and control of DNA repair after exposure to ionizing radiation. *Nuklearmedizin* 2010; 49: S26–30.
- ¹¹⁸ Hawkins AJ, Golding SE, Khalil A, Valerie K. DNA double-strand break – induced pro-survival signaling. *Radiother Oncol* 2011; 101: 13–7.
- ¹¹⁹ Kasten-Pisula U, Saker J, Eicheler W, et al. Cellular and tumor radiosensitivity is correlated to epidermal growth factor receptor protein expression level in tumors without EGFR amplification. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 80: 1181–8.
- ¹²⁰ U. Kasten-Pisula, H. Tastan, E. Dikomey Huge differences in cellular radiosensitivity due to only very small variations in double-strand break repair capacity. *Int J Radiat Biol*, 81 (2005), pp. 409–419
- ¹²¹ E. Dikomey, I. Brammer. Relationship between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied for different growth states, dose rates and plating conditions in a normal human fibroblast line. *Int J Radiat Biol*, 76 (2000), pp. 773–781
- ¹²² Huang SM, Harari PM: Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: Inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 6:2166-2174, 2000
- ¹²³ Bonner JA, Maihle NJ, Folven BR, et al: The interaction of epidermal growth factor and radiation in human head and neck squamous cell carcinoma

cell lines with vastly different radiosensitivities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 29:243-247, 1994

¹²⁴ Huang SM, Bock JM, Harari PM: Epidermal growth factor receptor blockade with c225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 59:1935-1940, 1999

¹²⁵ Huang SM, Harari PM: Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: Inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 6:2166-2174, 2000

¹²⁶ Zhou H, Kim YS, Peletier A, et al: Effects of the EGFR/her2 kinase inhibitor GW572016 on EGFR- and HER2-overexpressing breast cancer cell line proliferation, radiosensitization, and resistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58:344-352, 2004

¹²⁷ Saleh MN, Raisch KP, Stackhouse MA, et al: Combined modality therapy of A431 human epidermoid cancer using anti-EGFR antibody C225 and radiation. *Cancer Biother Radiopharm* 14:451-463, 1999

¹²⁸ Bonner JA, Raisch KP, Trummell HQ, et al: Enhanced apoptosis with combination C225/radiation treatment serves as the impetus for clinical investigation in head and neck cancers. *J Clin Oncol* 18:47S-53S, 2000

¹²⁹ Milas L, Mason K, Hunter N, et al: In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 antiepidermal growth factor receptor antibody. *Clin Cancer Res* 6:701-708, 2000

¹³⁰ Nakata E, Hunter N, Mason K, et al: C225 antiepidermal growth factor receptor antibody enhances the efficacy of docetaxel chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59:1163-1173, 2004

-
- ¹³¹ She Y, Lee F, Chen J, et al: The epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 selectively potentiates radiation response of human tumors in nude mice, with a marked improvement in therapeutic index. *Clin Cancer Res* 9:3773-3778, 2003
- ¹³² Williams KJ, Telfer BA, Stratford IJ, et al: ZD1839 ('Iressa'), a specific oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, potentiates radiotherapy in a human colorectal cancer xenograft model. *Br J Cancer* 86:1157-1161, 2002
- ¹³³ Chinnaiyan P, Huang S, Vallabhaneni G, et al: Mechanisms of enhanced radiation response following epidermal growth factor receptor signaling inhibition by erlotinib (Tarceva). *Cancer Res* 65:3328-3335, 2005
- ¹³⁴ <http://globocan.iarc.fr>
- ¹³⁵ www.seom.org
- ¹³⁶ Vincenzo Valentini. Multidisciplinary Rectal Cancer Management: 2nd European Rectal Cancer Consensus Conference (EURECA-CC2). *Radiotherapy and Oncology* 92 (2009) 148–163
- ¹³⁷ Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Color Dis.* 1997;12(1):19–23.
- ¹³⁸ Mace AG, Pai RK, Stocchi L, Kalady MF. American Joint Committee on Cancer and College of American Pathologists regression grade: a new prognostic factor in rectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 2015;58(1):32–44.
- ¹³⁹ Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, Marnay J, Henry-Amar M, Petiot JF, et al. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. *Clinico-Pathologic Correlations Cancer.* 1994; 73: 2680–6.

¹⁴⁰ Quah HM, Chou JF, Gonen M, Shia J, Schrag D, Saltz LB, et al. Pathologic stage is most prognostic of disease-free survival in locally advanced rectal cancer patients after preoperative chemoradiation. *Cancer*. 2008;113(1):57–64.

¹⁴¹ Rödel C, Martus P, Papadopoulos T, Füzesi L, Klimpfing M, Fietkau R, Liersch T, Hohenberger W, Raab R, Sauer R, Wittekind C. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(34):8688.

¹⁴² Fokas E, , Rödel C. Tumor regression grading after preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal carcinoma revisited: updated results of the CAO/ARO/AIO-94 trial. *J Clin Oncol*. 2014;32(15):1554.

¹⁴³ Washington MK, Berlin J, Branton P, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133: 1539-1551

¹⁴⁴ Gavioli M, Luppi G, Losi L, et al. Incidence and clinical impact of sterilized disease and minimal residual disease after preoperative radiochemotherapy for rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2005;48:1851- 1857.

¹⁴⁵ Rodel C, Martus P, Papadopoulos T, et al. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8688-8696

¹⁴⁶ Minsky BD, Rodel C. Identifying the most predictive post-chemoradiation TRG system for rectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2014 Oct;106(10)

¹⁴⁷ Huebner M, Wolff BG, Smyrk TC, Aakre J, Larson DW. Partial pathologic response and nodal status as most significant prognostic factors for advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *World J Surg*. 2012 Mar;36(3):675-83.

-
- ¹⁴⁸ M. J. Stamos and Z. Murrell, "Management of early rectal T1 and T2 cancers," *Clinical Cancer Research*, vol. 13, no. 22, 2007
- ¹⁴⁹ Guillem JG, Diaz-Gonzalez JA, Minsky BD, et al. cT3N0 rectal cancer: potential overtreatment with preoperative chemoradiotherapy is warranted. *J Clin Oncol* 2008; 26: 368-373.
- ¹⁵⁰ I. Chau, G. Brown, D. Cunningham et al., "Neoadjuvant capecitabine and oxaliplatin followed by synchronous chemoradiation and total mesorectal excision in magnetic resonance imaging-defined poor-risk rectal cancer," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 24, no. 4, pp. 668–674, 2006.
- ¹⁵¹ G. Brown, "Diagnostic accuracy of preoperative magnetic resonance imaging in predicting curative resection of rectal cancer: prospective observational study," *British Medical Journal*, vol. 333, no. 7572, pp. 779–782, 2006.
- ¹⁵² R. Sauer, H. Becker, W. Hohenberger et al., "Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer," *The New England Journal of Medicine*, vol. 351, no. 17, pp. 1731–1810, 2004
- ¹⁵³ F. Bosset, G. Calais, L. Mineur et al., "Enhanced tumorocidal effect of chemotherapy with preoperative radiotherapy for rectal cancer: preliminary results - EORTC 22921," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23, no. 24, pp. 5620–5627, 2005.
- ¹⁵⁴ J. H. Lee, S. H. Kim, J. G. Kim, H. M. Cho, and B. Y. Shim, "preoperative chemoradiotherapy (CRT) followed by laparoscopic surgery for rectal cancer: predictors of the tumor response and the long-term oncologic outcomes," *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2010.
- ¹⁵⁵ N. A. Janjan, C. Crane, B. W. Feig et al., "Improved overall survival among responders to preoperative chemoradiation for locally advanced rectal cancer," *American Journal of Clinical Oncology*, vol. 24, no. 2, pp. 107–112, 2001.

-
- ¹⁵⁶ J. P. Gérard, Y. Rostom, J. Gal et al., “Can we increase the chance of sphincter saving surgery in rectal cancer with neoadjuvant treatments: lessons from a systematic review of recent randomized trials,” *Critical Reviews in Oncology/ Hematology*, 2012 Jan;81(1):21-8.
- ¹⁵⁷ Valentini V, Beets-Tan R, Borras JM, Krivokapic´ Z, Leer JW, Pahlman L, et al. Evidence and research in rectal cancer. *Radiother Oncol* 2008; 87:449–74.
- ¹⁵⁸ Camma C, Giunta M, Fiorica F, Pagliaro L, Craxi A, Cottone M. Preoperative radiotherapy for resectable rectal cancer: A metaanalysis. *JAMA* 2000; 284:1008–15.
- ¹⁵⁹ Colorectal Cancer Collaborative Group. Adjuvant radiotherapy for rectal cancer: A systematic overview of 8,507 patients from 22 randomised trials. *Lancet* 2001; 358: 1291–304.
- ¹⁶⁰ Munro AJ, Bentley A. Adjuvant radiotherapy in operable rectal cancer: A systematic review. *Semin Colon Rectal Surg* 2002; 13:31–42.
- ¹⁶¹ Glimelius B, Gronberg H, Jarhult J, Wallgren A, Cavallin- Ståhl E. A systematic overview of radiation therapy effects in rectal cancer. *Acta Oncol* 2003; 42:476–92.
- ¹⁶² H. G. Moore, A. E. Gittleman, B. D. Minsky et al., “Rate of pathologic complete response with increased interval between preoperative combined modality therapy and rectal cancer resection,” *Diseases of the Colon and Rectum*, vol. 47, no. 3, pp. 279–286, 2004.
- ¹⁶³ Dhadda AS, Zaitoun AM, Bessell EM. Regression of rectal cancer with radiotherapy with or without concurrent capecitabine--optimising the timing of surgical resection. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2009 Feb;21(1):23-31. Epub 2008 Nov 21.

-
- ¹⁶⁴ Petrelli F, Sgroi G, Sarti E, Barni S. Increasing the Interval Between Neoadjuvant Chemoradiotherapy and Surgery in Rectal Cancer: A Meta-Analysis of Published Studies. *Ann Surg.* 2013 Nov;
- ¹⁶⁵ Y. Francois, C. J. Nemoz, J. Baulieux et al., “Influence of the interval between preoperative radiation therapy and surgery on downstaging and on the rate of sphincter-sparing surgery for rectal cancer: the Lyon R90-01 randomized trial,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 17, no. 8, pp. 2396–2402, 1999.
- ¹⁶⁶ D. Pettersson, B. Cederniark, T. Holm et al., “Interim analysis of the Stockholm III trial of preoperative radiotherapy regimens for rectal cancer,” *British Journal of Surgery*, vol. 97, no. 4, pp. 580–587, 2010.
- ¹⁶⁷ O. Glehen, O. Chapet, M. Adham, J. C. Nemoz, and J. P. Gerard, “Long-term results of the Lyons R90-01 randomized trial of preoperative radiotherapy with delayed surgery and its effect on sphincter-saving surgery in rectal cancer,” *British Journal of Surgery*, vol. 90, no. 8, pp. 996–998, 2003.
- ¹⁶⁸ Birgisson H, Pahlman L, Gunnarsson U, Glimelius B, Swedish Rectal Cancer Trial Group. Adverse effects of preoperative radiation therapy for rectal cancer: long-term follow-up of the Swedish Rectal Cancer Trial. *J Clin Oncol.* 2005;23(34):8697.
- ¹⁶⁹ Sebag-Montefiore D. et al. Preoperative radiotherapy versus selective postoperative chemoradiotherapy in patients with rectal cancer (MRC CR07 and NCIC-CTG C016): a multicentre, randomised trial. *Lancet.* 2009; 373(9666):811.
- ¹⁷⁰ Quirke P, Steele R, Monson J, Grieve R, Khanna S, Couture J, O’Callaghan C, Myint AS, Bessell E, Thompson LC, Parmar M, Stephens RJ, Sebag-Montefiore D, MRC CR07/NCIC-CTG CO16 Trial Investigators, NCRI Colorectal Cancer Study Group. Effect of the plane of surgery achieved on local recurrence in patients with operable rectal cancer: a prospective study using

data from the MRC CR07 and NCIC-CTG CO16 randomised clinical trial. *Lancet*. 2009;373(9666):821.

¹⁷¹ Stephens RJ, Thompson LC, Quirke P, Steele R, Grieve R, Couture J, Griffiths GO, Sebag-Montefiore D. Impact of short-course preoperative radiotherapy for rectal cancer on patients' quality of life: data from the Medical Research Council CR07/National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group C016 randomized clinical trial. *J Clin Oncol*. 2010;28(27):4233.

¹⁷² Peeters KC, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Kranenbarg EK, Putter H, Wiggers T, Rutten H, Pahlman L, Glimelius B, Leer JW, van de Velde CJ, Dutch Colorectal Cancer Group. The TME trial after a median follow-up of 6 years: increased local control but no survival benefit in irradiated patients with resectable rectal carcinoma. *Ann Surg*. 2007;246(5):693.

¹⁷³ Marijnen CA, Kapiteijn E, van de Velde CJ, Martijn H, Steup WH, Wiggers T, Kranenbarg EK, Leer JW, Cooperative Investigators of the Dutch Colorectal Cancer Group. Acute side effects and complications after short-term preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision in primary rectal cancer: report of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol*. 2002;20(3):817.

¹⁷⁴ Peeters KC, van de Velde CJ, Leer JW, Martijn H, Junggeburst JM, Kranenbarg EK, Steup WH, Wiggers T, Rutten HJ, Marijnen CA. Late side effects of short-course preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for rectal cancer: increased bowel dysfunction in irradiated patients--a Dutch colorectal cancer group study. *J Clin Oncol*. 2005;23(25):6199.

¹⁷⁵ V. Valentini, B. Glimelius. Rectal cancer radiotherapy: Towards European consensus. *Acta Oncologica*, 2010; 49: 1206–1216

¹⁷⁶ Peeters KC, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Kranenbarg EK, Putter H, Wiggers T, et al. Dutch Colorectal Cancer Group The TME trial after a median

follow-up of 6 years: Increased local control but no survival benefit in irradiated patients with resectable rectal carcinoma. *Ann Surg* 2007; 246:693–701.

¹⁷⁷ Pählman L, Bohe M, Cedermark B, Dahlberg M, Lindmark G, Sjö Dahl R, et al. The Swedish rectal cancer registry. *Br J Surg* 2007; 94:1285–92.

¹⁷⁸ K. Bujko, M. P. Nowacki, A. Nasierowska-Guttmejer et al., “Sphincter preservation following preoperative radiotherapy for rectal cancer: report of a randomised trial comparing short-term radiotherapy vs. conventionally fractionated radiochemotherapy,” *Radiotherapy and Oncology*, vol. 72, no. 1, pp. 15–24, 2004

¹⁷⁹ K. Bujko, M. P. Nowacki, A. Nasierowska-Guttmejer, W. Michalski, M. Bebenek, and M. Kryj, “Long-term results of a randomized trial comparing preoperative short-course radiotherapy with preoperative conventionally fractionated chemoradiation for rectal cancer,” *British Journal of Surgery*, vol. 93, no. 10, pp. 1215–1223, 2006

¹⁸⁰ Ngan SY, Burmeister B, Fisher RJ, Solomon M, Goldstein D, Joseph D, Ackland SP, Schache D, McClure B, McLachlan SA, McKendrick J, Leong T, Hartoepanu C, Zalcborg J, Mackay J. Randomized trial of short-course radiotherapy versus long-course chemoradiation comparing rates of local recurrence in patients with T3 rectal cancer: Trans-Tasman Radiation Oncology Group trial 01.04. *J Clin Oncol*. 2012;30(31):3827.

¹⁸¹ Bujko K, Nowacki MP, Nasierowska-Guttmejer A, Michalski W, Bebenek M, Kryj M. Long-term results of a randomized trial comparing preoperative short-course radiotherapy with preoperative conventionally fractionated chemoradiation for rectal cancer. *Br J Surg* 2006; 93:1215–23.

¹⁸² Ngan S, Fisher R, Godstein D, Solomon M, Burmeister B, Ackland SP, et al. A randomized trial comparing local recurrence (LR) rates between short-course (LC) preoperative radiotherapy (RT) for clinical T3 rectal cancer: An

intergroup trial (TROG, AGITG, CSSANZ, RACS). *J Clin Oncol* 2010 (Suppl abstr 3509);28:7s.

¹⁸³<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00904813?term=Stockholm+III+trial&rank=1>

¹⁸⁴ Pettersson D, Glimelius B, Iversen H, Johansson H, Holm T, Martling A. Impaired postoperative leucocyte counts after preoperative radiotherapy for rectal cancer in the Stockholm III Trial. *Br J Surg*. 2013 Jun;100(7):969-75.

¹⁸⁵ Breugom AJ, Swets M, Bosset JF, et al. Adjuvant chemotherapy after preoperative (chemo)radiotherapy and surgery for patients with rectal cancer: A systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2015;16:200-207.

¹⁸⁶ Van Krieken JH. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch* (2008) 453:417–431

¹⁸⁷ Lockhart AC, Berlin JD (2005) The epidermal growth factor receptor as a target for colorectal cancer therapy. *Semin Oncol* 32:52–60

¹⁸⁸ Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer* 2001; 92: 1331–46

¹⁸⁹ Koretz K, Schlag P, Möller P. Expression of epidermal growth factor receptor in normal colorectal mucosa, adenoma, and carcinoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1990;416(4): 343–349

¹⁹⁰ Kaklamanis L, Gatter KC, Mortensen N, et al. *Br J Cancer* 1992; 66: 712–16

¹⁹¹ Karameris A, Kanavaros P, Aninos D, et al. Expression of epidermal growth factor (EGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in gastric

and colorectal carcinomas. An immunohistological study of 63 cases. *Pathol Res Pract* 1993; 189: 133–7

¹⁹² Nakae S, Shimada E, Urakawa T. *J Surg Oncol* 1993 ; 54: 246–51

¹⁹³ Saeki T, Salomon DS, Johnson GR, et al. *Jpn J Clin Oncol* 1995 ; 25: 240–9

¹⁹⁴ Spindler KL, Lindebjerg J, Nielsen JN, Olsen DA, Bisgard C, Brandslund I, Jakobsen A (2006) Epidermal growth factor receptor analyses in colorectal cancer: a comparison of methods. *Int J Oncol* 29:1159–1165

¹⁹⁵ Klufftinger AM, Robinson BW, Quenville NF, Finley RJ, Davis NL (1992) Correlation of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 oncogene product to known prognostic indicators of colorectal cancer. *Surg Oncol* 1:97–105

¹⁹⁶ Radinsky R, Risin S, Fan D, Dong Z, Bielenberg D, Bucana CD, Fidler IJ (1995) Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1:19–31

¹⁹⁷ Spano JP, Lagorce C, Atlan D, Milano G, Domont J, Benamouzig R, Attar A, Benichou J, Martin A, Morere JF, Raphael M, Penault-Llorca F, Breau JL, Fagard R, Khayat D, Wind P (2005) Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol* 16:102–108

¹⁹⁸ Klufftinger AM, Robinson BW, Quenville NF, et al. *Surg Oncol* 1992; 1: 97–105

¹⁹⁹ Hayashi Y, Widjono YW, Ohta K, et al. *Pathol Int* 1994; 44: 124–30

²⁰⁰ Moorghen M, Ince P, Finney KJ, et al. *Anticancer Res* 1990 ; 10: 605–11

²⁰¹ International Union Against Cancer (UICC). In Hermaek P, Hutter RVP, Sobin LH et al. (eds): *TNM Classification of Malignant Tumors*, 4th edition. Berlin: Springer-Verlag 1998.

²⁰² Krasinskas AM. EGFR Signaling in colorectal carcinoma. *Patholog Res Int*. 2011;2011:932932.

-
- ²⁰³ Eriksen et al. The prognostic value of epidermal growth factor receptor is related to tumor differentiation and the overall treatment time of radiotherapy in squamous cell carcinomas of the head and neck *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, Vol. 58, No. 2, pp. 561–566, 2004
- ²⁰⁴ Kim J.S., Kim J.M., Li S., Yoon W.H., Song K.S., Kim K.H., Yeo S.G., Nam J.S., Cho M.J. Epidermal growth factor receptor as a predictor of tumor downstaging in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2006;66:195–200
- ²⁰⁵ Spindler K.L., Nielsen J.N., Lindebjerg J., Jakobsen A. Germline polymorphisms may act as predictors of response to preoperative chemoradiation in locally advanced T3 rectal tumors. *Dis. Colon Rectum.* 2007;50:1363–1369.
- ²⁰⁶ Bertolini F., Bengala C., Losi L., Pagano M., Iachetta F., Dealis C., Jovic G., Depenni R., Zironi S., Falchi A.M., et al. Prognostic and predictive value of baseline and posttreatment molecular marker expression in locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2007;68:1455–1461.
- ²⁰⁷ Toiyama Y., Inoue Y., Saigusa S., Okugawa Y., Yokoe T., Tanaka K., Miki C., Kusunoki M. Gene expression profiles of epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 with special reference to local responsiveness to neoadjuvant chemoradiotherapy and disease recurrence after rectal cancer surgery. *Clin. Oncol.* 2010;22:272–280
- ²⁰⁸ Bengala C., Bettelli S., Bertolini F., Salvi S., Chiara S., Sonaglio C., Losi L., Bigiani N., Sartori G., Dealis C., et al. Epidermal growth factor receptor gene copy number, K-ras mutation and pathological response to preoperative cetuximab, 5-FU and radiation therapy in locally advanced rectal cancer. *Ann. Oncol.* 2009;20:469–474

-
- ²⁰⁹ Mohammadi G, _Expression of membranous epidermal growth factor receptor in colorectal adenocarcinoma and its correlation with clinicopathological features_ Pak J Biol Sci. 2011 Mar 1;14(5):357-62.
- ²¹⁰ Steele RJ, Kelly P, Ellul B, Eremin O. Immunohistochemical detection of epidermal growth factor receptors on human colonic carcinomas. *Br J Cancer*. 1990;61(2):325–326.
- ²¹¹ Moorghen M, Ince P, Finney KJ, Watson AJ, Harris AL. Epidermal growth factor receptors in colorectal carcinoma. *Anticancer Res*. 1990;10(3):605–611.
- ²¹² McKay JA, Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. *Eur J Cancer*. 2002 Nov;38(17):2258-64.
- ²¹³ Karameris A, Kanavaros P, Aninos D, et al. Expression of epidermal growth factor (EGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in gastric and colorectal carcinomas. An immunohistological study of 63 cases. *Pathol Res Pract*. 1993;189(2):133–137.
- ²¹⁴ Rokita et al. Overexpression of epidermal growth factor receptor as a prognostic factor in colorectal cancer on the basis of the Allred scoring system. *Onco Targets Ther*. 2013 Jul 24;6:967-76.
- ²¹⁵ Astrid Mayer M.D. The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and *mdr* gene expression in colorectal cancer. *Cancer* Volume 71, Issue 8, pages 2454–2460, 15 April 1993.
- ²¹⁶ David Azria et al. Prognostic impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression on loco-regional recurrence after preoperative radiotherapy in rectal cancer. *BMC Cancer* 2005, 5:62
- ²¹⁷ Rego RL, Foster NR, Smyrk TC, et al. Prognostic effect of activated EGFR expression in human colon carcinomas: comparison with EGFR status. *Br J Cancer*. 2010;102(1):165–172.

-
- ²¹⁸ Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. Statistics subcommittee of the NCI-EORTC working group on cancer diagnostics. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J Natl Cancer Inst* 2005 Aug 17;97(16):1180e4)
- ²¹⁹ Kuo, L.-J., et al., Is Final TNM Staging a Predictor for Survival in Locally Advanced Rectal Cancer after Preoperative Chemoradiation Therapy? *Annals of Surgical Oncology*, 2007. 14(10): p. 2766-2772.
- ²²⁰ Caprici, C., et al., Prognostic Value of Pathologic Complete Response After Neoadjuvant Therapy in Locally Advanced Rectal Cancer: Long-Term Analysis of 566 ypCR Patients. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 2008. 72(1): p. 99- 107.
- ²²¹ Richter. The prognostic significance of tumor epidermal growth factor receptor (EGFR) expression change after neoadjuvant chemoradiation in patients with rectal adenocarcinoma *J Contemp Oncol (Pozn)* 2015
- ²²² Sauer R, Liersch T, Merkel S, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: Results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years. *J Clin Oncol* 2012;30:1926-1933.
- ²²³ International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. *Lancet* 1995;345:939-944.
- ²²⁴ Andre T, Boni C, Navarro M, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage I or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol* 2009;27: 3109-3116
- ²²⁵ Breugom AJ, Swets M, Bosset JF, et al. Adjuvant chemotherapy after preoperative (chemo)radiotherapy and surgery for patients with rectal cancer: A systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2015;16:200-207.

-
- ²²⁶ Hong YS, Nam BH, Kim KP, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin versus fluorouracil and leucovorin as adjuvant chemotherapy for locally advanced rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy (ADORE): An open-label, multicenter, phase 2, randomized controlled trial. *Lancet Oncol* 2014;15:1245-1253.
- ²²⁷ Bosset JF, Collette L, Calais G, et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med* 2006;11:1114-1123.
- ²²⁸ Cheung WY, Neville BA, Earle CC. Etiology of delays in the initiation of adjuvant chemotherapy and their impact on outcomes for stage II and III rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2009;52:1054-1063.
- ²²⁹ Perez K, Safran H, Sikov W, et al. Complete neoadjuvant treatment for rectal cancer: The Brown University Oncology Group CONTRE study. *Am J Clin Oncol* 2014.
- ²³⁰ Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012;487:330-337.
- ²³¹ Park IJ, Kim DY, Kim HC, et al. Role of adjuvant chemotherapy in ypT0-2N0 patients treated with preoperative chemoradiotherapy and radical resection for rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2015; 534-541.
- ²³² Capirci C, Valentini V, Cionini L, et al. Prognostic value of pathologic complete response after neoadjuvant therapy in locally advanced rectal cancer: Long-term analysis of 566 ypCR patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;72:99-107.
- ²³³ Fokas E, Liersch T, Fietkay R, et al. Tumor regression grading after preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal carcinoma revisited: Updated results of the CAO/ARO/AIO-94 trial. *J Clin Oncol* 2014;32:1554-1562.