



## ANÁLISIS DE GRADO DE MALIGNIDAD DE BIOPSIAS DE COLON Y RECTO

Citlalli Selene Ruíz-García<sup>1,2</sup>, Marisa Hernández-Barrales<sup>1,2</sup>, Fabiola Trejo-Vázquez<sup>1</sup>, Francisco Javier García-Vázquez<sup>3</sup>, José Eduardo Farfán-Morales, Susana Godina-González<sup>2</sup>, Adrián López-Saucedo<sup>1</sup> y Jorge Luis Ayala-Luján<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Laboratorio de Patología y Diagnóstico Molecular, <sup>2</sup>Unidad Académica de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Zacatecas. [jayala69@uaz.edu.mx](mailto:jayala69@uaz.edu.mx) y [lpdmuaz@hotmail.com](mailto:lpdmuaz@hotmail.com)

<sup>3</sup>Departamento de Anatomía Patológica, Instituto Nacional de Pediatría.

### RESUMEN

El cáncer colorectal (CCR) es el tercer tipo de cáncer diagnosticado en el mundo, y representa el 8% anual del total de muertes por esta causa. Se estima que en el 2014, alrededor de 136,830 personas fueron diagnosticadas con CCR y aproximadamente 50,310 fallecieron por esta neoplasia<sup>[1]</sup>. En la patogénesis del CCR, se encuentran implicadas dos vías de señalización, que tienen un papel importante en la angiogénesis y en la modulación del crecimiento tumoral. En la primera, participa COX-2, enzima responsable del proceso inflamatorio y la conversión de ácido araquidónico en prostaglandina<sup>[2]</sup>. La otra vía implica la participación de receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR y HER-2, receptores tirosin-cinasa de la familia ErbB/Her. La actividad de estos receptores es la regulación de señales del medio externo al interior de las células, participando en procesos de proliferación y diferenciación celular, por lo que alteraciones en las vías de señalización o la expresión de estos marcadores moleculares, pueden llevar a las células a un grado de malignidad<sup>[3]</sup>. En el presente trabajo nos planteamos realizar un análisis retrospectivo de un grupo de biopsias de colon y recto de acuerdo diagnóstico histopatológico para su posterior estudio de la expresión de EGFR, HER-2 y COX-2. Se obtuvieron cortes de 1 a 2 micras de un grupo de biopsias de colon y recto incluidas en parafina del 2009 al 2013, se tiñeron con hematoxilina-eosina y se clasificaron de acuerdo al diagnóstico histopatológico. Los resultados obtenidos se basan en 123 muestras, que de acuerdo al estudio histopatológico, de estas fueron diagnosticadas como adenocarcinomas, un 56.9% se identificaron adenomas 39.83% además de otros tipos de lesiones.

La expresión de EGFR en los adenocarcinomas fue de un 41.38%, de los adenomas mucinosos de un 55.56%, los tubulares con un 62.17%, vellosos con un 33.44% y los túbulo-velloso con un 66.68%. La expresión de HER-2 en los adenocarcinomas fue de un 55.18%, de los adenomas mucinosos de un 55.56%, tubulares con un 70.28%, vellosos con un 66.67% y para los túbulo-velloso con un 100%. La expresión de la enzima COX-2 en los adenocarcinomas fue de un 96.15 %, de los adenomas mucinosos de un 77%, tubulares con un 94.44%, vellosos con un 100% y por último los adenomas túbulo-velloso con un 100%. Los resultados sugieren que estos marcadores son capaces de formar parte del proceso de oncogénesis del CCR, este tipo de estudios son importantes para poder establecer los factores pronósticos y predictivos en el cáncer colorectal.

### INTRODUCCION

El Cáncer Colorectal (CCR) es la tercera neoplasia más común en hombres y mujeres en Estados Unidos, siendo la tercera neoplasia con mayor mortalidad en ambos sexos<sup>[1]</sup>. Este tipo de neoplasia que puede afectar tanto a hombres como a mujeres y en más del 90% de los casos se desarrollan en personas mayores de 50 años, el cáncer es la tercera causa de muerte en México y según estimaciones cada año se suman más de 128,000 nuevos casos de pacientes mexicanos<sup>[4]</sup>.

En el desarrollo del CCR intervienen diversos factores que van desde la predisposición genética de cada individuo hasta factores ambientales como carcinogénicos químicos o sustancias presentes en la dieta que pueden favorecer o inhibir su aparición. No se ha encontrado una causa específica para desarrollar este tipo de cáncer, pero la expresión de biomarcadores en tejido tumoral resulta útil como indicador de un proceso patológico, llegando a tener importancia tanto en el pronóstico y diagnóstico para cierto tipo de neoplasias.



## TEORIA

Existen dos enzimas ciclooxigenasa (COX) diferentes, COX-1 una enzima constitutiva que tiene niveles constantes de expresión y COX-2 que es inducible. Ambas catalizan la formación de prostaglandinas desde el ácido araquidónico. COX-2 es una enzima inducida en respuesta a factores de crecimiento, promotores de tumor y ciertas citocinas que también se ha encontrado que responde a varios oncogenes entre los que incluyen RAS/RAF/ERK, HER-2 y a la familia de genes Wnt [2]. La proteína COX-2 se le ha considerado como un biomarcador potencial de cáncer, existen reportes de una serie de tumores intestinales, específicamente de estómago, donde la expresión de COX-1 es normal, sin embargo los niveles de expresión de COX-2 se presentaron elevados en adenocarcinomas, aun cuando los niveles de este gen son indetectables normalmente en este tipo de tejido [5]. COX-2 se sobreexpresado aproximadamente en un 85% en CCR, un 61% en adenomas tubulares, 62% en adenomas vellosos y 55% en adenomas túbulo-vellosos [6]. En respuesta a citoquinas pro-inflamatorias el ácido araquidónico se convierte en diversos eicosanoides por la acción de enzimas del citocromo P450, lipoxigenasas, y las ciclooxigenasas, estos eicosanoides tienen impacto a nivel de motilidad celular, invasión, vascularidad, y metástasis [6].

Otras vías de interés incluyen al Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) y el Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico (HER-2), ambos receptores tirosina cinasa de la familia ErbB/Her. La actividad de estos receptores se centra en la regulación de señales del medio externo al interior de las células, ya que principalmente se encuentran en la membrana plasmática. La sobreexpresión de EGFR puede promover la proliferación, migración, invasión y la supervivencia celular, así como la inhibición de la apoptosis; mientras que HER-2 activa las vías de proliferación celular, supervivencia, diferenciación, angiogénesis e invasión, además HER-2 también es capaz de actuar como promotor de los genes COX-2 y metaloproteasa-16 (MMP-16), el aumento de estas proteínas está implicado en la aparición de algunos tipos de neoplasias [7], como en carcinomas de mama HER-2 positivos que resultan ser más agresivos [3].

## PARTE EXPERIMENTAL

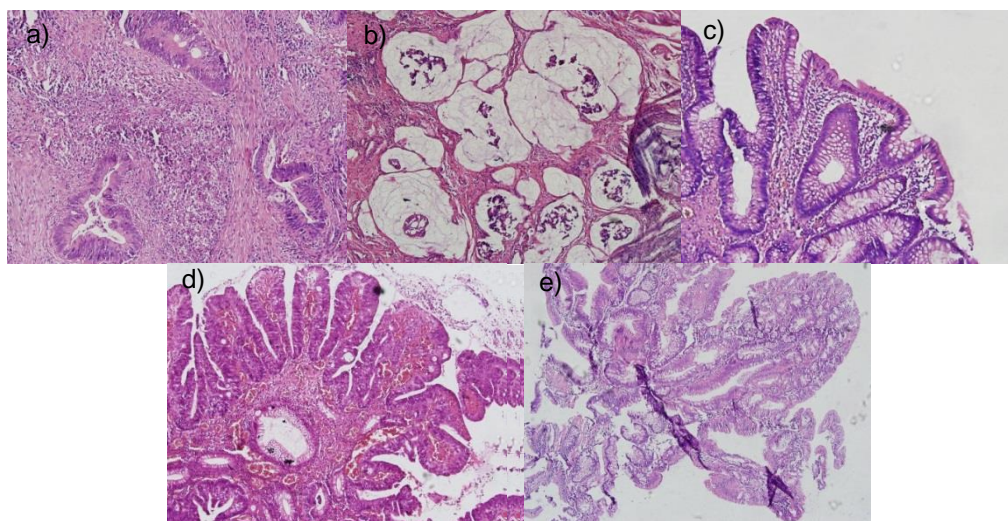
Este estudio de tipo retrospectivo de biopsias de colon y recto incluidas en parafina correspondiente al periodo 2009-2013 donadas del "Centro Medico la Alameda" de Zacatecas, Zac. Se recopilaron un total de 123 muestras de las cuales solo 81 cumplieron con los requisitos para ser procesadas por la técnica de inmunohistoquímica. A partir de cada biopsia incluida en parafina, se obtuvieron cuatro cortes de 1-2 micras, un corte fue usado para tinción de hematoxilina-eosina y tres cortes más fueron usados para realizar la técnica de IHQ utilizando un sistema de estraptavidina conjugada con peroxidasa y reveladas con diamino bencidina. Se utilizaron anticuerpos monoclonales en ratón para EGFR, HER-2 y anticuerpos policlonales en conejo para COX-2.

Se obtuvieron 123 biopsias que se tiñeron con H y E (Fig. 1) estas fueron clasificadas histopatológicamente y agrupadas según su diagnóstico.

Los resultados obtenidos son los siguientes: un 32.52% (40) correspondieron a adenomas tubulares, 30.89% (38) adenocarcinomas mucinosos, 26.01% (32) adenocarcinomas, 4.06% (5) adenomas túbulo-vellosos. 3.25% (4) adenomas vellosos y 3.25% (4) por displasias leves (Tabla 1)

**Tabla 1.- Clasificación histopatológica ( 2009-2013)**

Diagnósticos	Porcentaje
Adenocarcinoma	26.01%
Adenocarcinoma Mucinoso	30.89%
Adenoma Tubular	32.52%
Adenoma Velloso	3.25%
Adenoma Túbulo-velloso	4.06%
Displasias	3.25%



**Figura 1.- Cortes histológicos de biopsias y tinción con H y E.** Cortes representativos de los diferentes diagnósticos realizados. a) adenocarcinoma diferenciado, b) adenocarcinoma mucinoso, c) adenoma tubular, d) adenoma vellosos y e) adenoma túbulo-vellosos. Imágenes 10x tomadas con microscopio Olympus IX71

En la Tabla 2 se representa la distribución del periodo de 2009-2013 y su agrupación por sexo de las biopsias analizadas en este trabajo. A lo largo del periodo en estudio el sexo masculino presenta mayor número casos diagnosticados, la distribución es de un 61.81% (68) del sexo masculino, mientras que un 38.18% (42) del sexo femenino considerando una n=110 por los datos recuperados del archivo, además el año con mayor número de casos y diagnósticos de nuestro interés fue el 2011. Las muestras que no formaron parte del estudio epidemiológico es que no contaban con los datos necesarios para este estudio.

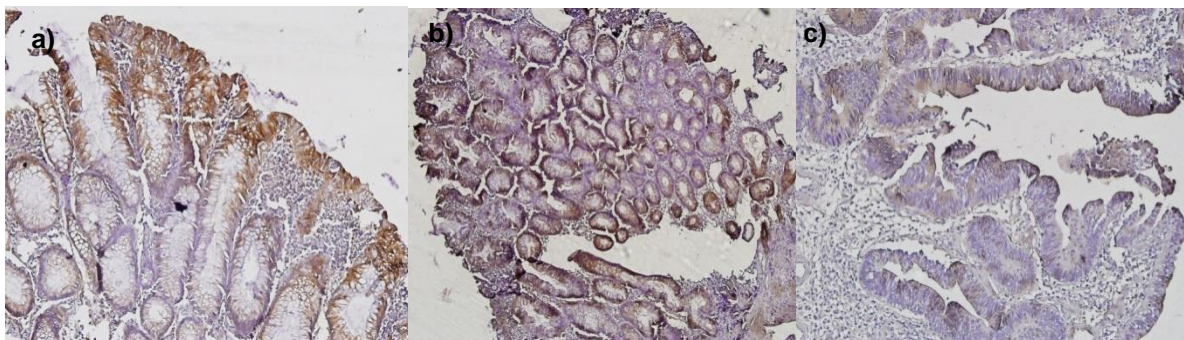
**Tabla 2.-Clasificación por género y Distribución por año**

	Total	2009	2010	2011	2012	2013
<b>Femenino</b>	42	5	3	13	10	11
<b>Masculino</b>	66	11	8	16	15	18

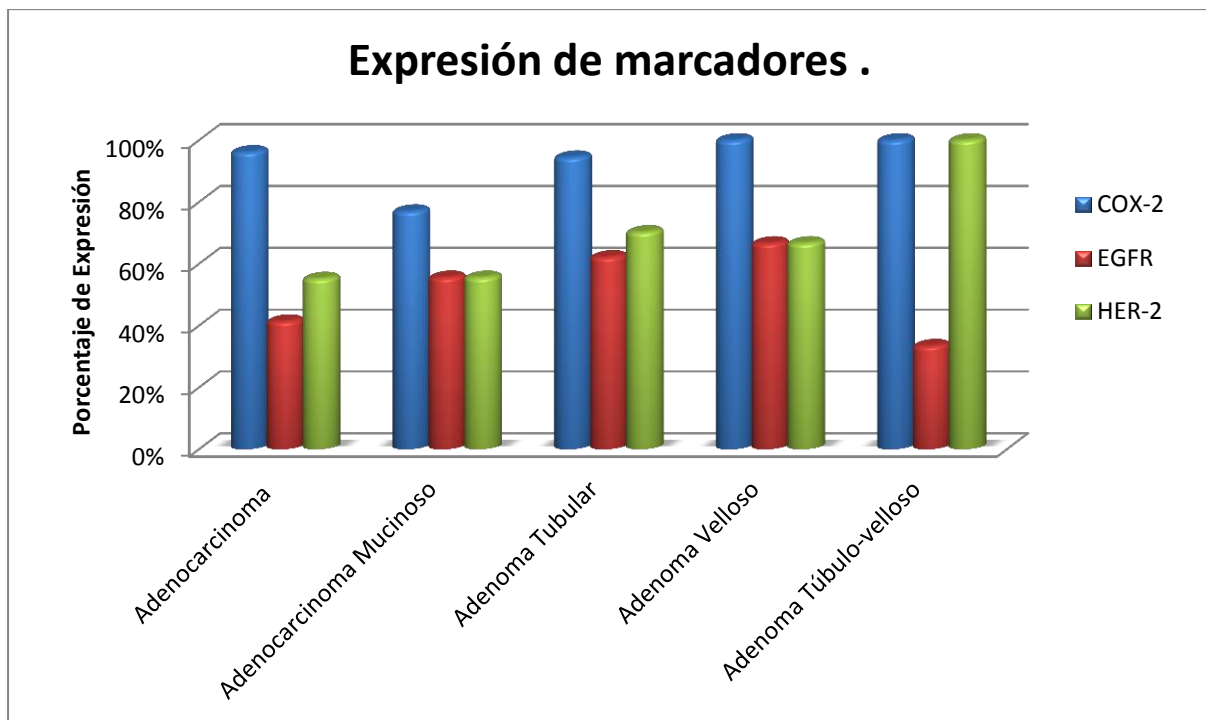
### **Expresión de marcadores en Biopsias de colon y recto.**

La expresión de COX-2 fue positiva en un 95%, los diagnósticos con mayor sobreexpresión fueron los adenomas vellosos con un 100% (3) y los túbulo-vellosos con un 100% (3), seguidos de los adenocarcinomas con un 96.15% (25), los adenomas tubulares con 94.44% (34) y adenocarcinomas mucinoso con un 77% (7). El receptor EGFR se expresó en un 53.08%, este porcentaje considera todos los diagnósticos que forman parte del estudio. El diagnóstico con mayor expresión de EGFR es el adenoma túbulo-vellosos con un 66.66% (3), seguido del adenoma tubular con un 62.17% (23), después el adenocarcinoma mucinoso con un 55.56% (5), el adenocarcinoma con un 41.38% (12) y por último el adenoma vellosos con un 33.34% (1). HER-2 se expresó en un 64.19%, porcentaje ya mencionado incluye todos los diagnósticos que forman parte del estudio.

El diagnóstico con mayor expresión de HER-2 es el adenoma túbulo-velloso con un 100% (3), seguido del adenoma tubular con 70.28% (26) continuando con el adenoma vellosos con 66.67% (2), el adenocarcinoma mucinoso mostró un 55.56% (5) y por último el adenocarcinoma con un porcentaje del 55.18% (16). La expresión de los diferentes marcadores estudiados, se puede observar una expresión de COX-2 en todos los diagnósticos, siendo el marcador con más altos niveles de expresión. HER-2 se expresa en todos los diagnósticos pero en menor cantidad que COX-2, por último EGFR es el marcador con menos expresión en cualquier clasificación. En la figura 2 se muestra una serie de fotografías representativas de la expresión de los marcadores analizados COX-2, EGFR y HER-2. Así también la comparación de la expresión de COX-2, EGFR y HER-2 en los diagnósticos obtenidos, se observan en la figura 3



**Figura 2** Expresión de biomarcadores en tejidos de colon y recto. Imágenes representativas de la expresión de los biomarcadores analizados. a) expresión de COX-2 en adenoma tubular, objetivo 20x, b) expresión de EGFR en adenoma tubular, objetivo 10x y c) expresión de HER-2 en adenocarcinoma, objetivo 20x. Imágenes tomadas con microscopio Olympus I71X.



**Figura 3** Expresión de marcadores en Biopsias con diferentes diagnósticos. Patrones de Expresión de COX-2 seguido de HER-2 y por último de EGFR y su relación con los diagnósticos de las biopsias en el estudio.



## CONCLUSIONES

Durante todos los años del periodo de estudio, se presentó un ligero aumento en el porcentaje de casos de hombres con respecto a mujeres y en el año 2011 se presentó el mayor número de casos de acuerdo a los diferentes años estudiados. Un dato interesante en este estudio es que más del 56% de los casos fueron adenocarcinomas y aproximadamente un 10 % de los casos de adenomas los cuales pudieran ser una condición para desarrollar cáncer colorectal. Esto nos indica la importancia que tiene un buen diagnóstico para una detección temprana de esta neoplasia. Por consiguiente, este estudio también incluyó biomarcadores que son utilizados para el diagnóstico y pronóstico como COX2, donde el 95 % de los casos sobreexpresaron esta enzima. Otros dos biomarcadores estudiados en este trabajo son HER-2 y EGFR que son utilizados para tratamiento con anticuerpos dirigidos contra estos receptores, por lo que hace candidato al tratamiento a los pacientes que expresan estos dos biomarcadores.

## BIBLIOGRAFIA

1. Faraz Bishehsari, M., Michele Vacca, Reza Malekzadeh, Renato Mariani-Costantini, *Epidemiological transition of colorectal cancer in developing countries: Environmental factors, molecular pathways, and opportunities for prevention*. . World Journal of Gastroenterology, 2014. **20(20)**: p. 6055-6072.
2. Herrera González, N.E.H.G., Yocimar, *Inmunomodulación de COX-2 en cáncer de mama*. Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas, 2012. **17(4)**: p. 5.
3. Khelwatty, S.A., et al., *Co-expression of HER family members in patients with Dukes' C and D colon cancer and their impacts on patient prognosis and survival*. PLoS One, 2013. **9(3)**: p. e91139.
4. SPPS, S.d.P.y.P.d.I.S. *Los 5 tipos de cáncer que afectan mas afectan a los mexicanos*. . 2014 [cited; Available from: <http://www.spps.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>].
5. Samaka, R.M., et al., *Cyclooxygenase-2 expression in chronic gastritis and gastric carcinoma, correlation with prognostic parameters*. J Egypt Natl Canc Inst, 2006. **18(4)**: p. 363-74.
6. Stasinopoulos, I., et al., *COX-2 in cancer: Gordian knot or Achilles heel?* Front Pharmacol, 2013. **4**: p. 34.
7. Lo, H.W. and M.C. Hung, *Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival*. Br J Cancer, 2007. **96 Suppl**: p. R16-20.