

Prognostic significance of the p185 protein in colorectal cancer

M. T. Sanz-Casla, M. Vidaurreta, M. L. Maestro, J. A. López¹, F. Jiménez², C. Fernández³,
C. Maestro⁴, J. L. Balibrea² and F. J. Cerdán²

Service of Clinical Biochemistry. Tumor Biology Section. ¹Department of Pathology. ²Service of General Surgery II. ³Research Unit. Hospital Clínico San Carlos. ⁴Department of Morphological Sciences I. Faculty of Medicine. Universidad Complutense. Madrid, Spain

ABSTRACT

The amplification and/or overexpression of the c-erbB-2/neu oncogene may play a role in tumor development and progression. The aim of this prospective study was to evaluate the prognostic value of p185 protein in colorectal cancer using immunohistochemical techniques. We analyzed 106 colorectal tumor tissue specimens from patients who had been operated on by the same surgeon and subjected to a median follow-up of 3 years. Thirty-three per cent of patients showed p185 overexpression related to an advanced stage of the disease. In patients with adenocarcinoma tumors of the colon without distant metastases, p185 detection was found to be of clinical prognostic relevance ($p = 0.06$).

Key words: c-erbB-2/neu oncogene. p185 protein. Colorectal carcinoma. Prognosis.

Sanz-Casla MT, Vidaurreta M, Maestro ML, López JA, Jiménez F, Fernández C, Maestro C, Balibrea JL, Cerdán FJ. Prognostic significance of the p185 protein in colorectal cancer. *Rev Esp Enferm Dig* 2004; 96: 102-109.

INTRODUCTION

The c-erbB-2/neu proto-oncogene belongs to a family of receptors with tyrosine-kinase activity. Located on chromosome 17q21, this oncogene encodes for a 185 Kda transmembrane glycoprotein that is similar in structure to the epidermal growth factor receptor, which induces cell proliferation and differentiation (1,2).

This study was funded by Project N° 08.1/0012/1999 of Comunidad de Madrid.

Recibido: 23-06-03.
Aceptado: 12-09-03.

Correspondencia: M^ª Luisa Maestro de las Casas. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Clínico San Carlos. C/ Martín Lagos, s/n. 28040 Madrid. Tel.: 91 3303171. Fax: 91 3303179. e-mail: mmaestro@hscs.es

Gene amplification, the most common of all genetic alterations, leads to the overexpression of proteins, although protein overexpression is not always the result of gene amplification (3). The amplification and/or overexpression of c-erbB-2/neu may give rise to uncontrolled cell proliferation causing tumor development and progression (4). This alteration may be evaluated by gene or protein analysis. In most cases, fluorescence in situ hybridization (FISH) is used for genetic studies while investigations on the protein usually involve qualitative techniques such as immunohistochemistry (IHC). *In situ* hybridization and immunohistochemistry show 92% agreement between results (5), enabling an accurate comparison or confirmation of results.

c-erbB-2/neu amplification and/or overexpression has been associated with a worse prognosis in tumors of the breast (6,7), ovary (6), and stomach (8,9). Most studies of the c-erbB-2/neu oncogene in colorectal tumors have involved the detection of the p185 protein using IHC techniques. These studies report protein overexpression rates of 35 to 100% (10-12), and there are many doubts concerning the prognostic significance of this oncogene in this disease (13-16).

The aim of this study was to assess the prognostic value of protein p185 using IHC techniques in patients diagnosed with colorectal carcinoma.

PATIENTS AND METHODS

Patients

This prospective cohort study was performed on 106 patients undergoing surgery for primary colorectal cancer at Surgery Unit II of the "Hospital Clínico San Carlos", Madrid, over the period 1995 to 1998. All the patients were operated on by the same surgeon who undertook a radical oncological resection procedure according to tumor site. Surgery was defined as curative when there were no ma-

croscopical signs of residual tumor after resection. According to this criterion, a curative resection was performed in 84 patients (80%), and in 22 patients (20%) the tumor was resected as palliative treatment. Patients were excluded from our study if they had metachronic carcinoma, familial polyps or intestinal inflammatory disease. No patient received neoadjuvant treatment. An informed consent was obtained from the patients before surgery. The protocol was approved by the hospital ethics and clinical research committee. Patient follow-up was performed according to a protocol developed at our unit (17). Tumors were stratified according to Dukes' classification. Patients with stages B, C or D under 80 years of age were given 5-fluorouracil (5-FU) and leucovorin as adjuvant chemotherapy. These patients accounted for 75% of the study population.

Methods

Specimen processing

Tumor specimens were obtained during surgery and placed in formalin for subsequent embedding in paraffin. The anatomopathological examination was independently conducted by two pathologists especially for this study. It was confirmed that all tumor specimens showed at least 80% tumor cells.

Immunohistochemical determination of the p185 protein

The specimens used for IHC were 7 mm-thick tissue sections embedded in paraffin. Once deparaffinated in xylene and dehydrated in alcohol, the sections were stained using the peroxidase-antiperoxidase conjugate method. We used a rabbit monoclonal antibody against the p185 protein (DAKO K5206). After incubating for 30 minutes at room temperature with the primary antibody, the sections were incubated with a biotinylated secondary antibody and the peroxidase-antiperoxidase complex. Labelling was visualized by further incubation with 0.02% hydrogen peroxide and 0.6 mmol/L diaminobenzidine in methanol for 10 minutes at room temperature. As a positive control, we used a breast tumor tissue section showing p185 overexpression. A glass slide bearing PBS buffer was used as the negative control.

To establish the prognostic value of the p185 protein, the percentages of cells showing staining in the cytoplasm and/or cell membrane were distributed as percentiles. Then, using Cox's proportional hazards model, we established the value that best discriminated the risk of death for patients with colorectal cancer. A determination was taken as being positive when over 20% of the cells showed cytoplasmic and/or membrane staining.

Statistical analysis

Qualitative variables are provided with their frequency distributions. Quantitative variables are expressed as mean, standard deviation (SD) and range. The Chi-squared test was used to evaluate associations between qualitative variables. When more than 25% of the expected associations were under 5, Fisher's exact test was used. Overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) rates were determined by the Kaplan-Meier method. Breslow's exact test was used to compare survival functions among groups. The event in OS was defined as deaths produced as a consequence of the tumor, excluding patients alive and those dying from another cause. Overall survival was calculated as the time between the day of surgery and that of death or last follow-up. The event in DFS was defined as the diagnosis of local or distant recession in patients previously free of disease, that is, all those undergoing curative surgery. Disease-free survival was calculated as the time from surgery to diagnosis of the first recession. A Cox's proportional hazards regression model was fitted to relate the prognostic factors in the univariate and multivariate analyses. In each contrast, the null hypothesis was rejected for a type I error below 0.05. All statistical tests were performed using the SSPS version 11.5 software.

RESULTS

Of the 106 patients included in our study, 50.9% were males and 49.1% were females. Mean patient age was 69 years (SD \pm 12), ranging from 35 to 91 years. Table I shows the clinical-pathological features of the population. In all, 52.8% of tumors were located in the colon and 47.2% in the rectum; 5.7% were mucinous adenocarcinomas.

Thirty-three per cent of patients (35/106) showed overexpression of the p185 protein. This protein was found to be related to tumor presence, with percentage p185 positivity being lower at early stages than at more advanced stages ($p < 0.001$) (Table I).

Postoperative course. Overall survival

The median length of follow-up was 37 months (3 years), with an interquartile range of 8 to 69 months.

The overall survival rate of our patient series was 67% at 3 years. All survival analyses are referred to our median follow-up time. During follow-up, 43 patients died as a consequence of the neoplasm. One patient was lost to follow-up.

OS were 72% for patients showing negative p185, and 51% for those showing a positive result ($p = 0.08$) (Fig. 1). When rates were stratified according to tumor site, OS was greater (82%) for patients with rectal tumors and positive p185 than for those with negative p185 (62%) ($p = 0.05$). According to histological type, patients with adenocarcinomas showed an OS rate of 76% if their p185

Table I. Clinical pathological features of 106 patients with colorectal cancer according to p185 protein determined immunohistochemically

Variable	n (%)	p185 + (%)	p185 - (%)	p
Gender	Men: 54 (50.9)	20 (37)	34 (63)	0.4
	Women: 52 (49.1)	15 (28.8)	37 (71.2)	
Dukes' class	A+B: 49 (46.2)	7 (14.3)	42 (85.7)	<0.001
	C: 26 (24.5)	14 (53.8)	12 (46.2)	
	D: 31 (29.2)	14 (45.2)	17 (54.8)	
Tumor site	Colon : 56 (52.8)	19 (33.9)	37 (66.1)	1.0
	Rectum: 50 (47.2)	16 (32)	34 (68)	
Grade	I: 81 (77.9)	23 (28.4)	58 (71.6)	0.2
	II+III: 23 (22.1)	10 (43.5)	13 (56.5)	
Histological type	Adenocarcinoma: 100 (94,3)	32 (32)	68 (68)	0.3
	Mucoid: 6 (5.7)	3 (50)	3 (50)	

was negative, and one of 53% when they showed positivity for this protein (p = 0.09).

Variables included in the multivariate analysis were: p185 protein, gender, degree of differentiation, stage A, B or C, and histological type of adenocarcinoma. Patients with stage D tumors were excluded since prognostic information is of scarce value. Those with mucoid adenocarcinomas were also excluded since they accounted for 5% of the tumors and disease progression is more aggressive. This analysis was independently performed on patients with tumors of the colon or rectum, since OS significantly differs between these groups. In patients with tumors of the rectum, the p185 protein was of no prognostic value independently of the remaining variables. In those with tumors of the colon, p185 proved to be of clinical significance: the relative risk of death shown by patients overexpressing the pro-

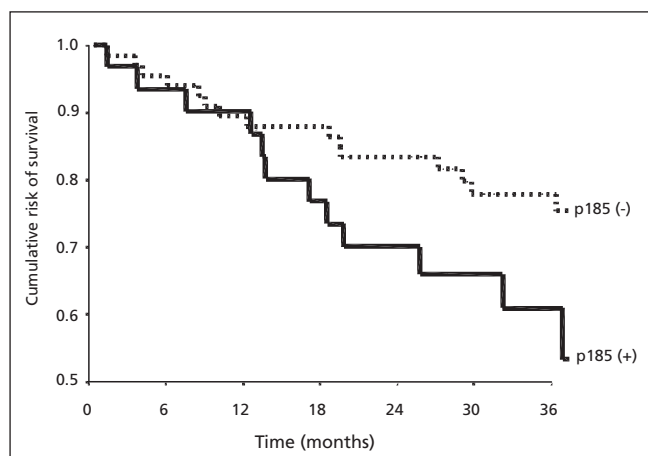


Fig. 1.- Overall survival according to p185 protein
Supervivencia global acumulada según la proteína p185.

tein was 3.9 times greater than those with a negative p185 result (p = 0.06) (95% CI = 0.9-16.4).

Postoperative course. Disease-free survival

DFS rate in our patient series was 75%. During follow-up, tumor recurrence occurred in 19 patients, including 8 patients with stage D tumors in whom it was possible to perform curative surgery. Recurrences were local in 5 patients (26.3%) and distant in 14 patients (73.7%).

DFS rates of patients showing negative p185 (82%) were higher than those with positive p185 (58%) (p = 0.02); the relative risk of recurrence was 3.3 times greater in patients overexpressing the protein (p=0.03) (95%CI=1.2-10.0) (Fig. 2). When results were stratified according to tumor site, patients with tumors of the colon with negative p185 showed higher DFS (83%) than those with a positive p185 result (54%) (p = 0.08). When stratified by histological type, the OS of patients with adenocarcinomas and negative p185 was 82%, higher than for those expressing p185 (56%) (p = 0.01).

In the multivariate analysis of patients with adenocarcinomas of the colon staged as A, B or C, the p185 result was clinically relevant yet not significant: the relative risk of recurrence in patients overexpressing p185 was 3.3 times higher than in those with a negative p185 result (p = 0.09) (95% CI = 0.8-13.6).

DISCUSSION

Most studies on the c-erbB-2/neu oncogene in colorectal cancer have determined protein overexpression using IHC techniques. However, different authors do not seem to have a standard criterion for defining overexpression of the oncogene. Thus, published rates of p185 overexpression in patients with colorectal tumors range from 35 to 100% (10-12).

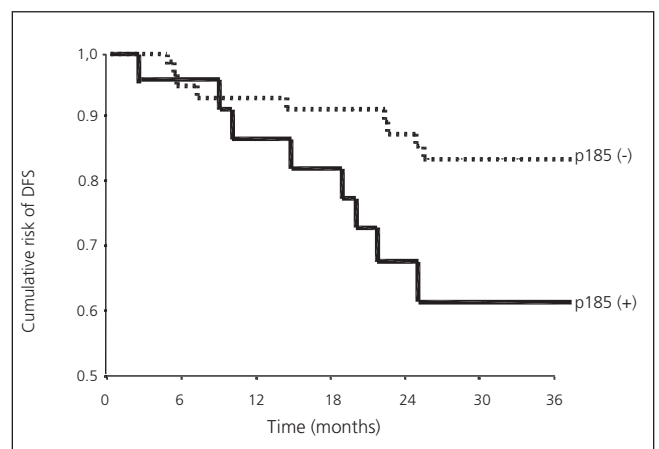


Fig. 2.- Disease-free survival (DFS) according to p185 protein
Supervivencia libre de enfermedad según la proteína p185.

Most authors would agree that there is no significant relationship between p185 overexpression and the age or gender of the patient, nor the site or histological type of the tumor (10-12). Several authors have reported that overexpression of c-erbB-2/neu can predict the course of several human cancers such as stomach (8,9) and breast (6,7). However, there are many doubts about the prognostic significance of this oncogene in colorectal tumors (13-16). While authors such as McKay et al. (18) or Webb et al. (19) found that c-erbB-2/neu was of no prognostic value, others including Kay et al. (10), Kapitanovic et al. (11), and Osako et al. (12) described this oncogene as an independent prognostic factor in this disease. These authors argue that overall survival is significantly lower in patients who show c-erbB-2/neu overexpression compared to those who do not express this protein. Further, it seems that p185 overexpression is related to Dukes' classification, in such a way that patients with tumors staged as A or B show significantly lower overexpression ($p < 0.05$) than those with stage C or D tumors (11).

In the present study, we adopted the criterion of 20% of cells showing cytoplasmic and/or membrane staining as indicative of p185 protein overexpression. This assumption is consistent with most investigations performed in this and other tumor types (7,10,15). Although p185 is a transmembrane receptor, we were able to detect this protein in the cytoplasm as well as on the cell membrane, since it is at the level of the cytoplasm that the post-transcriptional alteration occurs (20).

In all, 33% of our patient population overexpressed p185 and the incidence of overexpression was significantly higher for stage C and D tumors when compared to the earlier stages A and B, likely pointing to a significant role for the c-erbB-2/neu oncogene in the progression of colorectal tumor genesis. In colon adenocarcinomas with no evidence of distant metastasis at the time of diagnosis, p185 overexpression increases the risk of death by four times, though this association was clinically relevant yet not significant.

In the search for new biological prognostic factors, it should be borne in mind that the prognosis of colorectal cancer not only depends on clinical factors such as tumor stage, but is also affected by factors as specific as the surgeon's experience (21). This undermines the results emerging from many series that might not represent ideal management of the disease. We tried to eliminate this type of bias by only including patients operated on by the same surgeon. Nevertheless, our study design and population size precludes any conclusions of further clinical significance.

Despite the fact that the p185 protein was related to clinical prognosis, this link was not statistically significant. To date, evaluating the overexpression of the c-erbB-2/neu oncogene in colorectal cancer has only served to improve our understanding of tumor biology and to open a new path in the search for treatment options in experimental models.

REFERENCES

1. Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, et al. Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 1986; 319: 230-4.
2. Hung MC, Lau YK. Basic science of HER-2/neu: a review. *Semin Oncol* 1999; 26: 51-9.
3. Lemoine LR, Jain S, Silvestre F, Lopes C, Hughes CM, McLelland E, et al. Amplification and overexpression of the EGF receptor and c-erbB-2 proto-oncogenes in human stomach cancer. *Br J Cancer* 1991; 64: 79-83.
4. Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y. Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signalling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Res* 2000; 77: 25-79.
5. Bozzeti C, Nizzoli R, Guazzi A, Flora M, Bassano C, Crafa P, et al. HER-2/neu amplification detected by fluorescence in situ hybridization in fine needle aspirates from primary breast. *Ann Oncol*, 2002; 13: 1398-403.
6. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707-12.
7. Gusteson BA, Price KN, Gelber RD, Goldhirsch A, Sève-Söderborgh AR, Styles J, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1049-56.
8. Amadori D, Maltoni M, Volpi A, Nanni O, Scarpi E, Renault B, et al. Gene amplification and proliferative kinetics in relation to prognosis of patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1997; 79: 226-32.
9. Yonemura Y, Ninomiya I, Tsugawa K, Fushida S, Fujimura T, Miyazaki I, et al. Prognostic significance of c-erbB-2 gene expression in the poorly differentiated type of adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Detect Prev* 1998; 22: 139-46.
10. Kay EW, Mulcahy H, Walsh CB, Leader M, O'Donoghue D. Cytoplasmic c-erbB-2 protein expression correlates with survival in Dukes' B colorectal carcinoma. *Histopathology* 1994; 25: 455-61.
11. Kapitanovic S, Radosevic S, Kapitanovic M, Andelinovic S, Ferencic Z, Tavassolo M, et al. The expression of p185 HER-2/neu correlates with the stage of disease and survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1997; 112: 1103-13.
12. Osako T, Miyahara M, Uchino S, Inomata M, Kitano S, Kobayashi M. Immunohistochemical Study of c-erbB-2 protein in colorectal cancer and the correlation with patient survival. *Oncology* 1998; 55: 548-55.
13. Yokota J, Yamamoto T, Toyoshima K, Terada M, Sugimura T, Battifora H, et al. Amplification of c-erbB-2 oncogene in human adenocarcinomas in vivo. *Lancet* 1986; i: 765-6.
14. McCann A, Dervan PA, Johnston PA, Gullick WJ, Carney DN. c-erbB-2 oncoprotein expression in primary human tumors. *Cancer* 1990; 65: 88-92.
15. D'Emilia J, Bulovas K, D'Ercole B, Wolf B, Steele G Jr, Summerhayes IC. Expression of the c-erbB-2 gene product (p185) at different stages of neoplastic progression in the colon. *Oncogene* 1989; 4: 1233-9.
16. Ohmori K, Uchino J, Kondou Y, et al. Prediction of hepatic metastasis after resection of colorectal carcinoma-From the viewpoint of pathologic features. C-erbB-2 expression and nuclear DNA content. *Jpn J Gastroenterol Surg* 1991; 24: 2963-9.
17. Cerdán FJ. Seguimiento de los pacientes intervenidos por cáncer colorrectal. *Rev Cancer* 1997; 11: 32-41.
18. McKay JA, Loane JF, Ross VG, Ameyaw MM, Murray GI, Cassidy J. c-erbB-2 is not a major factor in the development of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2002; 86: 568-73.
19. Webb A, Scott-Mackie P, Cunningham D, Norman A, Andreyev J, O'Brien M. The prognostic value of CEA, beta HCG, AFP, CA125, CA19-9 and C-erb B-2, beta HCG immunohistochemistry in advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 1995; 6: 581-7.
20. Corbett IP, Henry JA, Angus B, Watchorn CJ, Wilkinson L, Hennessy C, et al. NCLA-CB11, a new monoclonal antibody recognizing the internal domain of the c-erbB-2 oncogene protein effective for use on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Pathol* 1990; 161: 15-25.
21. Cerdán J. Recidiva locoregional en el cáncer de recto. *Cir Esp* 2003; 73: 63-7.

Significado pronóstico de la proteína p185 en cáncer colorrectal

M. T. Sanz-Casla, M. Vidaurreta, M. L. Maestro, J. A. López¹, F. Jiménez², C. Fernández³, C. Maestro⁴, J. L. Balibrea² y F. J. Cerdán²

Servicio de Análisis Clínicos. Sección Biología Tumoral. ¹Servicio de Anatomía Patológica. ²Servicio de Cirugía General II. ³Unidad de Investigación. Hospital Clínico San Carlos. ⁴Departamento de Ciencias Morfológicas I. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid

RESUMEN

La amplificación y/o sobre-expresión del oncogén c-erbB2/neu puede contribuir al desarrollo y progresión tumoral. El objetivo de este trabajo es el estudio del valor pronóstico de la proteína p185 mediante técnicas de inmunohistoquímica en el carcinoma colorrectal. Se trata de un estudio de cohortes prospectivo en 106 muestras de tejido tumoral colorrectal de pacientes intervenidos quirúrgicamente por un mismo cirujano y con una mediana de tiempo de seguimiento de 3 años. El 33% de los pacientes presenta sobre-expresión de p185, que se relaciona con estadios avanzados de la enfermedad. En los pacientes con tumores adenocarcinoma localizados en colon y sin metástasis a distancia, la determinación de p185 muestra valor pronóstico clínicamente relevante ($p=0,06$).

Palabras clave: Oncogén c-erbB2/neu. Proteína p185. Carcinoma colorrectal. Pronóstico.

INTRODUCCIÓN

El protooncogén c-erbB-2/neu es miembro de una familia de receptores con actividad tirosín-kinasa. Se encuentra localizado en el cromosoma 17q21 y codifica una glicoproteína transmembrana de 185 kDa, de estructura similar al receptor del factor de crecimiento epidérmico, que induce la proliferación y diferenciación celular (1,2).

La alteración genética más frecuente es la amplificación, que conduce a una sobre-expresión proteica, aunque no siempre la sobre-expresión proteica se debe a la amplificación génica (3). La amplificación y/o sobre-expresión de c-erbB-2 puede contribuir a una proliferación celular descontrolada y al desarrollo y progresión tumoral (4). El estudio de esta alteración puede hacerse mediante análisis genético o el estudio de la proteína. El análisis del gen se realiza, en la mayoría de los casos, mediante técnicas de hibridación *in situ* (FISH) y el estudio de la proteína frecuentemente mediante técnicas cualitativas como la inmunohistoquímica (IHQ). Se estudió la relación entre los resultados obtenidos por hibridación *in*

situ y por inmunohistoquímica y se observó un porcentaje de concordancia del 92% (5). Esto permite comparar y confirmar los resultados obtenidos por ambas técnicas.

La amplificación y/o sobre-expresión de c-erbB-2 ha sido asociada con un peor pronóstico en tumores de mama (6,7), ovario (6) y estómago (8,9). La mayoría de los estudios del oncogén c-erbB2/neu en los tumores colorrectales se han realizado determinando la proteína p185 mediante técnicas inmunohistoquímicas, detectándose un porcentaje de sobre-expresión proteica entre un 35 y un 100% (10-12). En el carcinoma colorrectal existen muchas dudas acerca del significado pronóstico de este oncogén (13-16).

El objetivo de nuestro trabajo es realizar un estudio del valor pronóstico de la proteína p185 mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) en pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal.

PACIENTES Y MÉTODO

Pacientes

La población objeto de nuestro estudio comprende un total de 106 pacientes intervenidos quirúrgicamente por carcinoma colorrectal primario en el Servicio de Cirugía II del Hospital Clínico San Carlos de Madrid entre 1995 y 1998. Se trata de un estudio de cohortes prospectivo. Todos los pacientes fueron intervenidos por el mismo cirujano, realizándose una cirugía radical oncológica en función de la localización del tumor. La cirugía se definió como curativa cuando tras la resección no existía evidencia de tumor macroscópico residual. Según este criterio, en 84 pacientes (80%) se efectuó una resección curativa y en 22 pacientes (20%) se reseccó el tumor primario con intención paliativa. Fueron excluidos de nuestro estudio los casos de carcinomas metacrónicos, las poliposis familiares y la enfermedad inflamatoria intestinal. Ninguno de los pacientes había recibido tratamiento neoadyuvante. Se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes previo a la investigación, este proyecto fue valorado favorablemente por el comité de ética e investigación clíni-

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto n.º 08.1/0012/1999 de la Comunidad de Madrid.

ca de este hospital. El seguimiento clínico de los pacientes se realizó según el protocolo diseñado en nuestro servicio (17). Los tumores fueron estadificados según la clasificación de Dukes. Los pacientes con estadios B,C y D menores de 80 años recibieron quimioterapia adyuvante con 5-fluoracilo (5-FU) y leucovorín, lo que representa el 75% de la población estudiada.

Métodos

Procesamiento de las muestras

Durante el acto quirúrgico se recogió una muestra del tumor que se introdujo en formol para su posterior inclusión en parafina. El estudio anatomopatológico lo realizaron dos patólogos de forma independiente y especialmente para este estudio. Se comprobó que todas las muestras tumorales tenían más del 80% de células tumorales.

Determinación de la proteína p185 por inmunohistoquímica

La técnica de inmunohistoquímica se ha realizado en cortes de 7 mm de tejido incluido en parafina. En el análisis inmunohistoquímico se emplea el conjugado peroxidasa-antiperoxidasa. Las secciones de tejido son desparafinadas en xileno y, posteriormente, deshidratadas en etanol. En la recuperación antigénica se ha empleado un anticuerpo monoclonal de conejo frente a la proteína p185 de DAKO (K5206). Después de la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo primario se procede a la incubación con el anticuerpo secundario biotilado y el complejo peroxidasa-antiperoxidasa. Los resultados del marcaje son visualizados después de incubar las secciones con hidrógeno peroxidasa al 0,02% y 0,6 mmol/l de diaminobenzidina en metanol durante 10 minutos a temperatura ambiente. Como control positivo se utilizó una sección de tejido tumoral de mama con sobre-expresión de p185 y como control negativo se incubó uno de los portas con PBS.

Para evaluar el valor pronóstico de la proteína p185 se distribuyó la determinación del porcentaje de células teñidas en citoplasma y/o membrana en percentiles y, mediante el modelo estadístico de riesgos proporcionales de Cox, se estableció el valor que mejor discriminaba en cuanto al riesgo de fallecer de los pacientes con cáncer colorrectal. Se consideró la determinación positiva cuando más del 20% de las células estaban teñidas en citoplasma y/o membrana.

Análisis estadístico

Las variables cualitativas se presentan con su distribución de frecuencias. Las variables cuantitativas se resumen en su media, desviación estándar (DE) y rango. Se evaluó la

asociación entre cualitativas con el test de χ^2 y, en el caso que más de un 25% de los esperados fuera menor de 5, por la prueba exacta de Fisher. Se estimaron las funciones de supervivencia global (SG) y de la supervivencia libre de enfermedad (SLE) por el método de Kaplan-Meier, y se compararon las funciones de supervivencia de los distintos grupos mediante el test exacto de Breslow. Se incluye como definición del evento en la SG aquellos fallecimientos producidos como consecuencia del tumor y quedando censurados los pacientes vivos y fallecidos por otra causa. La SG fue calculada como el tiempo transcurrido entre la fecha de la cirugía y la del éxitus o última revisión. En la SLE se define el evento como el diagnóstico de una recidiva local, regional o a distancia en pacientes previamente libres de enfermedad, es decir, en todos aquellos en los que se realiza cirugía curativa. La SLE fue calculada como el tiempo transcurrido entre la fecha de la cirugía y la del diagnóstico de la primera recidiva. Se ajustó un modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox para realizar la asociación de los factores pronóstico en el análisis univariante y multivariante. En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error de tipo I menor a 0,05.

El paquete informático utilizado para el análisis fue SSPS para Windows versión 11.5.

RESULTADOS

De los 106 pacientes del estudio el 50,9% son varones y el 49,1% mujeres. La edad media es de 69 años con un rango comprendido entre 35 y 91 años y una desviación estándar de 12. Las variables clínico-patológicas de la población se muestran en la tabla I. El 52,8% de los tumores estaban localizados en colon y el 47,2% en recto. El 5,7% son adenocarcinomas mucinosos.

El 33% de los pacientes (35/106) presentaban sobre-expresión de p185. La proteína se relaciona con el estadio tumoral; en estadios precoces el porcentaje de positividad de p185 es menor que en estadios avanzados ($p < 0,001$) (Tabla I).

Evolución postoperatoria. Estudio de la supervivencia global

La mediana del tiempo de seguimiento de nuestro estudio fue de 37 meses (3 años), con un rango intercuartílico entre 8 y 69 meses.

En nuestra población de pacientes la SG a los 3 años fue del 67%. Todos los análisis de supervivencia quedan referidos a nuestra mediana de seguimiento. Durante el seguimiento fallecieron 43 pacientes, 33 de los cuales como consecuencia de la neoplasia. En un paciente no se pudo determinar su evolución.

La SG de los pacientes con p185 negativa fue del 72% y con p185 positiva del 51% ($p=0,08$) (Fig. 1). En el análisis estratificado según la localización del tumor,

Tabla I. Variables clínico-patológicas de los 106 pacientes con carcinoma colorrectal. Relación con la proteína p185 determinada por IHQ

Variable	n (%)	p185 + (%)	p185 - (%)	p
Sexo	Hombres: 54 (50,9) Mujeres: 52 (49,1)	20 (37) 15 (28,8)	34 (63) 37 (71,2)	0,4
Dukes	A+B: 49 (46,2) C: 26 (24,5) D: 31 (29,2)	7 (14,3) 14 (53,8) 14 (45,2)	42 (85,7) 12 (46,2) 17 (54,8)	<0,001
Localización	Colon: 56 (52,8) Recto: 50 (47,2)	19 (33,9) 16 (32)	37 (66,1) 34 (68)	1,0
Grado	I: 81 (77,9) II+III: 23 (22,1)	23 (28,4) 10 (43,5)	58 (71,6) 13 (56,5)	0,2
Tipo histológico	Adenocarcinoma: 100 (94,3) Mucoide: 6 (5,7)	32 (32) 3 (50)	68 (68) 3 (50)	0,3

en los tumores de recto con neu negativo la SG fue mayor (82%) que con neu positivo (62%) ($p=0,05$). Según el tipo histológico, en los tumores adenocarcinomas con p185 negativa la SG fue del 76%, mayor que con p185 positiva (53%) ($p=0,09$).

En el análisis multivariante se incluyeron las variables proteína p185, sexo, grado de diferenciación, estadios A, B y C y tipo histológico adenocarcinoma, excluyendo a los pacientes en estadio D en los cuales la información pronóstica tiene poco valor clínico, o con adenocarcinomas mucoides por representar el 5% de los tumores y tener una evolución más agresiva. Este análisis se ha realizado en los pacientes con tumores localizados en colon y en recto independientemente, ya que la SG es significativamente diferente en ambos grupos. En los tumores de recto, la proteína p185 no presentaba valor pronóstico independiente del resto de las variables. En los tumores localizados en colon, la determinación de p185 muestra importancia clínicamente relevante: el riesgo relativo de fallecer en los pacientes con sobre-expresión de la proteína es 3,9 veces mayor ($p=0,06$) (IC95%=0,9-16,4).

Evolución postoperatoria. Estudio de la supervivencia libre de enfermedad

En nuestra población de pacientes la SLE es del 75%. Durante el seguimiento se objetivó recidiva en 19 pacientes, incluyendo a los 8 pacientes con estadio D en los cuales se pudo realizar cirugía curativa. La localización de la recurrencia fue locorregional en 5 pacientes (26,3%) y a distancia en 14 pacientes (73,7%).

La SLE de los pacientes con p185 negativa es mayor

(82%) que con p185 positiva (58%) ($p = 0,02$); el riesgo relativo de recidivar es 3,3 veces mayor en pacientes con sobre-expresión del neu ($p = 0,03$) (IC95%=1,2-10,0) (Fig. 2). En el análisis estratificado según la localización del tumor, en los tumores de colon con p185 negativa la SLE es mayor (83%) que con p185 positiva (54%) ($p = 0,08$). Según el tipo histológico, en los tumores adenocarcinoma con p185 negativa la SG es del 82%, mayor que con p185 positiva (56%) ($p=0,01$).

En el análisis multivariante de los pacientes con adenocarcinoma localizados en colon y con estadio A, B y C, la determinación de p185 presenta importancia clínica pero no es estadísticamente significativa: el riesgo relativo de recidivar en los pacientes con sobre-expresión de p185 es 3,3 veces mayor que con p185 negativa ($p = 0,09$) (IC95%=0,8-13,6).

DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios del oncogén c-erbB2/neu en tumores colorrectales se han realizado determinando la sobre-expresión proteica mediante técnicas inmunohistoquímicas. Respecto a los criterios para considerar la positividad de la sobre-expresión del oncogén, parece que no existe un criterio unificado entre los autores. Esto hace que el porcentaje de la sobre-expresión de p185 en tumores colorrectales varíe entre un 35 y un 100% (10-12).

En relación con los factores pronóstico clásicos, la mayoría de los autores están de acuerdo en que no existe relación significativa entre la sobre-expresión de p185 y la edad y sexo del paciente, ni con la localización y tipo histológico del tumor (10-12). Numerosos estudios han mostrado que la sobre-expresión de c-erbB-2 puede predecir la evolución en distintos tumores humanos, como el cáncer de estómago (8,9) y el de mama (6,7). En el caso del cáncer colorrectal existen muchas dudas acerca del significado pronóstico de este oncogén (13-16). Mientras que autores como McKay y cols. (18), o Webb y cols. (19) indican que c-erbB2 no tiene significado pronóstico, otros como Kay y cols. (10), Kapitanovic y cols. (11), y Osako y cols. (12) describen a este oncogén como un factor pronóstico independiente en el cáncer colorrectal: la supervivencia global es significativamente menor en pacientes con sobre-expresión de c-erbB2/neu que en aquellos que no la presentan. Además parece que la sobre-expresión de p185 se relaciona con el estadio Dukes, de modo que pacientes en estadio Dukes A o B muestran una sobre-expresión significativamente menor ($p<0,05$) que los que se encuentran en estadio C o D (11).

En nuestro estudio consideramos que existía sobre-expresión de p185 cuando presentaban tinción en más del 20% de las células en citoplasma y/o membrana. Estos resultados están de acuerdo con la mayoría de los estudios en este y otros tumores (7,10,15). Aunque, p185 es un receptor transmembrana, detectamos esta proteína no sólo en la membrana celular, sino también en el citoplas-

ma, debido a que es en este lugar donde se produce la modificación post-transcripcional (20).

El 33% de la población presentaba sobre-expresión de p185 y la frecuencia de esta sobre-expresión proteica es significativamente mayor en los estadios C y D, con respecto a estadios precoces, A y B, lo cual podría indicar que el oncogén c-erbB2 juega un papel importante en la progresión de la tumorigénesis colorrectal. En los adenocarcinomas de colon sin evidencia de metástasis a distancia en el momento del diagnóstico, la sobre-expresión de p185 aumenta cuatro veces el riesgo de fallecer; sin embargo, aunque esta asociación presenta importancia clínica, no es estadísticamente significativa.

Hay que tener en cuenta en la búsqueda de nuevos factores pronóstico biológicos que el pronóstico del cáncer colorrectal no sólo depende de factores clínicos, como el

estadio, sino de aspectos tan puntuales como la experiencia del cirujano (21). Esto resta importancia a muchas series que, probablemente, no son representativas del tratamiento idóneo de la enfermedad. En este estudio se ha intentado eliminar dicho sesgo al incluir únicamente pacientes intervenidos por un mismo cirujano. Sin embargo, el diseño del estudio y el tamaño de la muestra hacen imposible extraer conclusiones de mayor significado clínico.

A pesar de que en nuestra serie de pacientes la proteína p185 presenta significado pronóstico clínico, este no llega a ser estadísticamente significativo. El estudio de la sobre-expresión del oncogén c-erbB2 neu en el cáncer colorrectal no tiene, hasta la actualidad, ninguna utilidad diferente que la de comprender mejor la biología tumoral y que la de abrir un camino en la búsqueda de opciones terapéuticas en modelos de experimentación.