

FACTORII DE PROGNOSTIC AI CANCERULUI COLORECTAL (II)

M. Bărbulescu
Secția Chirurgie Generală,
Spitalul Orășenesc Lehliu-Gară, Călărași

PROGNOSTIC FACTORS OF COLORECTAL CANCER (II) (Abstract): In addition to clinical and histopathologic prognostic factors of colorectal cancer, biological factors, which include markers of tumor burden, DNA ploidy levels and molecular (genetic) markers, provide very useful information regarding predictive survival, recurrence after surgery, mortality risk and response to adjuvant treatment following diagnosis of these neoplasia. These factors can explain, because of molecular and genetic heterogeneity of colorectal cancer, the marked variability in outcomes that exist in each TNM stage, depends in many cases on tumor genotypes which dictate their behavior and not just on common histopathologic criteria only. The purpose of the second section of this article is to present an overview about the variability of biological prognostic factors in colorectal cancer, discovered by modern molecular biology techniques, and to show the significant role of these factors in predicting not only survival but early recurrence and dissemination risk or, in some cases, the resistance to chemotherapy. The most important component of these factors remains molecular markers of tumors. It is estimated that in the near future, once the molecular biology of colorectal cancer will be fully elucidated, the study of molecular profile of these tumors will dictate next therapeutic decisions.

KEY WORDS: PROGNOSTIC FACTORS, COLORECTAL CANCER, MOLECULAR MARKERS.

Correspondență: Dr. Bărbulescu Marius; e-mail: barbulescu.mar@gmail.com *

INTRODUCERE

Dacă, în prima parte a acestui articol ne-am ocupat de factorii de prognostic clinici și histopatologici ai cancerului colorectal, în această a doua parte a articolului vom aborda factorii biologici de prognostic. Aici am inclus atât markerii de încărcare tumorală și conținutul în ADN al celulelor tumorale, cât și markerii moleculari descoperiți prin tehnici moderne de genetică și biologie moleculară odată cu elucidarea tumorigenezei colorectale. Aceștia din urmă vor fi din ce în ce mai mult de luat în seamă în viitor în ceea ce privește predicția ratei de supraviețuire a pacienților diagnosticați cu cancer colorectal, riscul de recidivă a bolii și rata de răspuns la chimioterapia adjuvantă. S-a putut explica astfel de ce în cadrul aceluiasi stadiu pTNM, stabilit prin încadrare histopatologică, există diferențe importante în ceea ce privește supraviețuirea pacienților, sau, de exemplu, de ce unii pacienți încadrați histopatologic în stadiul II TNM au rate de supraviețuire și risc de recidivă similare cu cele ale pacienților cu limfoganglioni pozitivi, din stadiul III. Motivația ar fi marea variabilitate genotipică a tumorilor canceroase colorectale care le dictează evoluția clinică diferită, variabilitate care ar fi surprinsă de studiul factorilor de prognostic moleculari (genetici).

1. MARKERII TUMORALI (markerii de încărcare tumorală)

Din multitudinea de markeri tumorali studiați în cancerul colorectal vom aborda doar o parte dintre antigenii oncofetalii considerați cei mai importanți pentru prognostic: ACE, CA 19-9, CA-242 și CA-50.

* received date: 29.01.2007
accepted date: 10.03.2007

Antigenul Carcino-Embrionar (ACE)

De când antigenul carcinoembrionar (ACE), o glicoproteină oncofetală, a fost descoperită în 1965 de Gold și Freedman, a devenit cel mai studiat și mai utilizat marker tumoral în cancerul colorectal uman [1]. Inițial s-a vrut a fi un marker serologic specific pentru carcinomul colorectal care să pună precece diagnosticul la pacienții asimptomatici, dar curând s-a demonstrat că niveluri serice ridicate apar și în alte cancere, în afecțiuni non-maligne intestinale și chiar la indivizi normali atunci când își schimbă brusc obiceiurile de fumat sau băut. Mai mult chiar, nivelul seric al ACE este normal la circa 25% din pacienții cu cancer intestinal cunoscut [2]. Titru seric crescut al ACE este detectat la aproximativ 50% din pacienții cu tumori de sân, stomac, plămâni sau alte tumori solide, dar și în ciroze, pancreatite, uremii, ulcere peptice, colită ulcerativă, ș.a [3]. Valorile ACE ridicate la pacienții cu cancer colorectal depind și de prezența vaselor sangvine peritumorale, de reacția inflamatorie imună la celulele tumorale și de starea celulelor Kupfer hepatice care dețin receptori capabili de-a lega această glicoproteină și a-i favoriza clearance-ul din circulație [4].

Lipsa de specificitate și senzitivitate a făcut ca ACE să nu poată fi utilizat ca instrument de screening în depistarea cancerului colorectal, dar s-a stabilit că are un rol în stabilirea prognosticului; astfel, riscul de recidivă în primii doi ani după rezecție este mai mult decât dublu la pacienții care au crescut nivelul seric al ACE preoperator [2]. Majoritatea autorilor americani ca și două instituții de prestigiu (American Society of Clinical Oncology și College of American Pathologist) recomandă ca nivelele serice preoperatorii ale ACE să fie utilizate ca indicatori prognostici, valori peste 5 ng/ml fiind asociate atât cu riscul recidivei cât și cu cel al metastazării, în special hepatice [5]. Unii autori, constatând că nivelul seric al ACE este un factor independent de prognostic, alături de profunzimea invaziei tumorale în peretele intestinal („T”) sau prezența metastazelor ganglionare („N”), au recomandat chiar ca valoarea preoperatorie a ACE să constituie o îmbunătățire a clasificării stadiale Dukes, dar nu au existat dovezi suficiente în acest sens [2,6].

Nivelul seric al ACE scade după rezecția tumorii primare, creșterea acestuia fiind un marker al recidivei sau al metastazei, chiar la pacienții fără simptome. Astfel, studiind mai mult de 500 cazuri de pacienți cu cancer colorectal rezecați, s-a demonstrat că la peste 75% creșterea ACE a fost primul indicator al recidivei neoplazice, ba chiar după unele raportări din anii '70 nivelul crescut al ACE semnală recidiva cu până la 30 de luni înaintea apariției simptomelor [2]. Bergamaschi și Arnaud au constatat că pacienții asimptomatici la care recidiva neoplazică a fost semnalată de titru seric crescut al ACE fiind apoi supuși intervenției chirurgicale au avut 10% supraviețuire la 5 ani comparativ cu 0,8% la pacienții operați pentru recidivă în momentul apariției simptomatologiei [5]. Harrison et al [7], pe un lot de 572 de pacienți rezecați cu ganglioni negativi și aparent fără boală metastatică, a constatat că nivelul seric crescut preoperator al ACE a fost un predictor independent semnificativ pentru o evoluție nefavorabilă.

Există o asocieră, deasemenea, și între nivelul seric preoperator al ACE și prognosticul pacienților cu metastaze hepatice sau pulmonare supuși intervenției chirurgicale, aceștia având un prognostic mai bun atunci când nivelul seric al ACE este scăzut sau normal comparativ cu cei la care nivelul ACE este crescut [5].

Nici un alt marker tumoral, singur sau în combinație, nu și-a dovedit superioritatea față de ACE în a preconiza apariția recidivei cancerului colorectal [2]. S-a tentat și utilizarea nivelului crescut al ACE ca indicație pentru un second-look dar acest lucru a rămas controversat, nedovedindu-și utilitatea.

Studii ulterioare au sprijinit ipoteza că nivelul seric crescut al ACE peste 5 ng/ml preoperator, la momentul prezentării, este un indicator independent de prognostic negativ atât pentru recidiva tumorală cât și implicit pentru supraviețuire, pentru pacienții cu cancer colorectal non-metastatic [5,6,8,9]. În majoritatea studiilor pacienții care au avut preoperator

un titru seric al ACE sub 5 ng/ml au avut o supraviețuire semnificativ mai lungă, dar conform unor autori valoarea limită pentru predicție ar fi de 10 ng/ml și nu de 5 ng/ml. Există controverse mari dacă valoarea prognostică a ACE își pierde semnificația în cazul prezenței metastazelor ganglionare în 1-3 sau peste 4 limfonoduli, adică dacă depinde de stadiul Dukes, pentru unii cea mai fiabilă valoare predictivă fiind în stadiul Dukes C [6]. Conform unor studii, nivelul preoperator al ACE are valoare prognostică doar în stadiul Dukes C când sunt implicați mai mult de 4 limfonoduli (N2- stadiul Dukes C2), ACE neavând nicio semnificație prognostică asupra supraviețuirii în stadiile Dukes A și Dukes B când sunt implicați mai puțin de 4 limfonoduli regionali [10]

ACE este un instrument foarte util în follow-up-ul pacienților cu rezecții pentru cancer colorectal, creșterea nivelului seric fiind un indicator al recidivei neoplazice locale sau metastatice, utilitatea acestuia derivând și din faptul că raportul cost-beneficiu este financiar favorabil pentru dozarea ACE comparativ cu celelalte metode de urmărire postoperatorie.

În pofida descoperirii și a altor markeri tumorali cu rol prognostic în cancerul colorectal, ACE rămâne standardul de comparație la care se raportează aceștia, însă asocierea ACE cu alți markeri de tipul CA19-9 sau CA 242, sau alte variabile crește valoarea de predicție a supraviețuirii inclusiv în stadiile avansate cu metastaze prezente. Dixon MR et al [11] pe un lot de 105 pacienții cu cancer colorectal stadiul IV a constatat că pacienții care au prezentat la momentul internării un nivel seric al ACE < 275 ng/ml asociat cu o valoare a albuminei serice mai mare sau egal cu 2,7 g/dl au avut orată mediană de supraviețuire semnificativ mai mare (287 zile) decât a celor la care valoarea ACE era mai mare sau egală cu 275 ng/ml și aveau titrul albuminei serice mai mic de 2,7 g/dl (39 de zile).

CA 19-9

Antigenii Lewis modificați reprezintă un grup de antigeni oncofetali asociați cancerului colorectal care sunt detectați în sângele pacientului cu ajutorul anticorpilor monoclonali. Din numărul mare de antigeni definiți în cancerul colorectal, cel mai studiat a fost antigenul carbohidrat al suprafeței celulare desemnat 19-9. Acest antigen (cancer antigen - CA) este o lacto-N-fucopectoză sialilată care este asociată substanței grupei sanguine Lewis. CA 19-9 este eliberat în sângele purtătorilor de cancer și detectat prin metode specifice de laborator. CA 19-9 nu este specific nici măcar pentru cancer, fiind detectat și în țesuturi normale, mai ales în mucoasa colecistului, gastrică și în pancreas. Deasemenea, CA 19-9 nu este un marker specific pentru cancerul colorectal, valori crescute ale sale întâlnindu-se și în alte cancere digestive, în special în cele pancreatice.

Deși CA 19-9 nu este creditat cu o la fel de importantă valoare prognostică în cancerul colorectal ca și ACE, creșterea valorilor serice ale sale este specifică unui subset de pacienți cu ganglioni pozitivi caracterizați printr-un interval asimptomatic mai scurt [12]. Există însă și studii care acordă CA 19-9 o importanță prognostică chiar mai mare decât a ACE; astfel, Reiter et al pe un studiu larg, retrospectiv, de 495 pacienți a constatat că CA 19-9 este alături de ACE un factor independent de prognostic negativ, valorile crescute ale acestui antigen asociindu-se cu creșterea riscului de 2,3 ori (comparativ cu 1,4 ori pentru ACE) de a deceda datorită cancerului colorectal [5].

CA 242

Ca și CA 50, CA 242 este un marker recent descoperit aflat în strânsă legătură cu componenta mucinoasă a tumorilor colorectale maligne, care recunoaște antigenele mucinei exprimate de derivații sialilați ai substanței Lewis a grupei sanguine (S Le). CA 242, un nou epitop carbohidrat care este exprimat de mucinele S Le, a fost desemnat ca având o înaltă sensibilitate în cancerul colorectal în comparație cu CA 19-9 sau CA 50, aducând informații clinice prognostice adiționale comparativ cu cele date de folosirea doar a ACE [13].

Astfel, folosirea concomitentă a ACE și CA 242 a crescut sensibilitatea pentru detectarea cancerelor colorectale incipiente, iar creșterea concomitentă a valorilor preoperatorii ale acestor două antigene (peste 5 ng/ml respectiv peste 20 U/ml) a constituit un factor independent semnificativ de prognostic negativ al supraviețuirii, mai ales pentru stadiile Dukes B și C [8]. Într-unele studii, s-a demonstrat chiar că CA 242 singur are o mai mare importanță prognostică decât ACE [13]. Un studiu efectuat pe 259 de pacienți a arătat că valorile preoperatorii crescute peste 20 U/mL ale CA 242 ar fi un factor de prognostic independent nefavorabil, pacienții cu aceste valori având o supraviețuire mediană de 1,5 ani comparativ cu cei la care CA 242 a avut titru sub 20 U/ml și care au avut supraviețuirea mediană de 5 ani [8].

CA 50

Este un antigen oncofetal carbohidrat aflat în strânsă legătură cu componenta mucinoasă tumorală, ace căruți valori crescute preoperatorii au o oarecare influență prognostică în cancerul colorectal, dar cu o mai mică sensibilitate decât CA 242 sau ACE. Împreună cu acești markeri, CA 50 s-a tentat a se utiliza în follow-up-ul după chirurgia neoplasmului colorectal, valorile acestuia (ca și ale ACE sau CA 242) scăzând după chirurgia curativă. Însă, dacă ACE și CA 242 au un rol demonstrat în semnalarea recidivei postoperatorii, fluctuațiile mari ale nivelului seric al CA 50 determinând valori crescute nejustificat la circa 24% din pacienți, fac ca folosirea acestui marker în urmărirea postoperatorie să fie pusă sub semnul întrebării [13].

2. CONȚINUTUL DE ADN

În cancerul colorectal există o pierdere a progresivă a diploidiei, pe măsură ce celulele avansează de la premalignitate la malignitate. Există, de asemenea, și o creștere semnificativă a nivelelor de ACE în tumorile aneuploide comparativ cu cele diploide. Aneuploidia este întâlnită frecvent în carcinoamele colorectale incidența variind între 46% și 93% . Rata de frecvență a aneuploidiei crește odată cu stadiul tumoral (88% pentru tumorile din stadiul Dukes B față de doar 33% pentru cele din stadiul Dukes A) [9]. Unele studii au concluzionat că aneuploidia ADN este un factor de prognostic negativ independent, în timp ce alte studii au infirmat acest lucru, datele fiind contradictorii. Contradicțiile se pot datora însă factorilor tehnici, fiind necesare pentru aprecierea corectă a ploidiei fragmente de țesuturi tumorale proaspăt recoltate, ceea ce nu este posibil mereu; de asemenea, există și o mare varietate de tehnici utilizate în determinarea conținutului de ADN tumoral, majoritatea folosind citometria de flux care nu este însă standardizată. Tumorile aneuploide au o rată mai mare de creștere comparativ cu cele diploide, fiind asociate adesea cu alți factori de prognostic nefavorabil [12]. Conform unui studiu al lui Visscher [14], există o corelație între aneuploidie, riscul recurenței neoplazice și speranța scăzută de supraviețuire, în special în cazul tumorilor rectale. AJCC a concluzionat totuși că ploidia ADN este cel mult doar un factor de prognostic secundar, în parte datorită variațiilor factorilor tehnici [9].

3. FACTORI DE PROGNOSTIC MOLECULARI (GENETICI)

Există o multitudine de aspecte genetice/moleculare cu implicație prognostică studiate în cancerul colorectal, mai mult ca în orice alt cancer uman.

Markerii moleculari sunt molecule exprimate de către tumori și/sau organismul gazdă a căror prezență este asociată cu apariția recurenței bolii și alterarea supraviețuirii. Identificarea markerilor moleculari cu valoare de prognostic al supraviețuirii devine de aceea foarte importantă. Unii markeri moleculari pot prezice rata de răspuns favorabil la citostatice, în viitor ajungându-se până acolo încât stabilirea profilului molecular al carcinomului colorectal să dicteze deciziile terapeutice.

Vom aborda în cele ce urmează date din literatură despre genele de supresie tumorală, oncogene, apoptoză și angiogeneză subliniind rolul lor prognostic în cancerul colorectal în privința supraviețuirii și al răspunsului la chimioterapie.

3.1. GENELE DE SUPRESIE TUMORALĂ

Reprezintă un grup de gene cu rol important în inhibarea tumorigenezei colorectale. Spre deosebire de alți markeri moleculari studiați, semnificația prognostică și rolul genelor de supresie tumorală în carcinogeneza colorectală a necesitat numeroase studii științifice pe mai multe serii retrospective, datorita rolului important jucat de acestea și a complexității lor (Tabelul I)

p53

Este o genă de supresie tumorală care facilitează carcinogeneza, fiind una dintre cele mai afectate gene în cadrul tumorile solide umane („gardianul genomic”); mutațiile p53 localizate pe cromozomul 17 sunt prezente în peste 50% din carcinoamele sporadice colorectale, reprezentând o etapă tardivă în tumorigeneză în legătură cu replicarea ADN-ului alterat și progresia spre cancer a adenoamelor [5]. S-au făcut studii numeroase pentru stabilirea relației dintre statusul genei p53 și supraviețuire, studii care au inclus peste 3000 de pacienți, folosindu-se tehnici speciale de imunohistochimie cu anticorpi monoclonali multipli sau analize PCR (polymerase chain reaction). Unele studii au concluzionat că p53 are un rol prognostic independent nefavorabil supraviețuirii și un rol în apariția recidivei, în timp ce altele, nu au constatat existența vreunui rol prognostic notabil [5]. Un studiu retrospectiv efectuat pe 56 de pacienți cu o perioadă de urmărire de 45 luni, a arătat că mutația p53 determinată prin analize genomice este un marker al recidivei și previzionează un trend descendent al supraviețuirii globale [15].

În privința rolului statusului p53 în răspunsul la terapie, studierea unor linii celulare homozigote pentru mutația p53 a demonstrat un grad înalt de rezistență la radioterapie și unele chimioterapice incluzând 5-FU (fluoro-uracil) [16]. Alte patru trialuri în acest sens au constatat că tumorile cu încărcătură p53 pozitivă determinată imunohistochimic nu au răspuns la terapia cu 5-FU / metotrexat sau administrarea intrahepatică 5-FU în cazul metastazelor hepatice [17]. În plus, fragmentele biopsice ale tumorilor p53 pozitive care au fost tratate chimioradioterapic preoperator au arătat o lipsă de răspuns la această terapie și o probabilitate ridicată de persistență a metastazelor ganglionare reziduale pe speciemenle rezecate [18].

p27

Gena p27, un inhibitor al ciclului celular care reglează progresia celulară din faza G1 în faza S; este o presupusă genă de supresie tumorală. Loda et al [19] au demonstrat, folosind metode imunohistochimice, că există expresii variabile ale genei p27 în peste 90% din cancerle colorectale, deși, în stadiul IV al acestei neoplazii, peste 70% dintre tumori nu au nicio expresie a p27. Pierderea expresiei tumorale a p27 este găsită a fi un factor independent de prognostic semnificativ asociat cu creșterea de 2,53 ori a riscului de deces datorat cancerului, iar absența p27 în tumorile colorectale stadiile I-II face ca acestea să aibe același risc ca tumorile din stadiul III [20].

Instabilitatea microsateliților (microsatellite instability-MSI)

Instabilitatea microsateliților (MSI) se referă la defectarea sistemului de „reparare a împerecherilor greșite” (mismatch repair - MMR) rezultând modificarea numărului de nucleotide mono-, bi-, tri-, și tetraploide care se repetă în mod normal în genomul ADN (microsateliți) sau în transcripția proteinelor.

„Genele împerecherilor greșite” se găsesc în circa 80% din cancerule coloretale nonpolipozice ereditare (HNPCC), dar și în 15% din cancerule coloretale sporadice [21]. HNPCC este rezultatul mutațiilor genelor sistemului MMR (MSH2, MLH1, PMS1 sau PMS2), care codifică repararea ADN și MSI, dar acestea se găsesc și în cancerul coloretal sporadic. Deși s-a constatat asocierea MSI cu tumorile mucinoase slab diferențiate, tumorile MSI pozitive au un prognostic mai bun, în corelație cu stadiul tumoral, în ceea ce privește supraviețuirea globală și alungirea perioadei disease-free, prezența MSI fiind considerat un factor independent de prognostic favorabil de către unii autori [22]. În opoziție cu aceste studii, altele nu găsesc nicio diferență statistic semnificativă în supraviețuire în funcție de statusul MSI al tumorilor din cancerul coloretal sporadic, ceea ce face ca rolul prognostic al instabilității microsateleților să rămână încă controversat [23].

Tabelul IV
Genele de supresie tumorală și rolul lor prognostic în cancerul coloretal
 (adaptat după Kahlenberg MS et al [5])

MARKERUL	FUNCȚIA	SEMIFICAȚIA PROGNOSTICĂ
p53	-gena produce promotorii ciclului celular care induce sau oprește apoptoza.	- mutațiile p53 sunt asociate cu recurențele și trendul descendent al supraviețuirii.
p27	- reglează progresia fazei G1-S	- crește de 2,5 ori riscul de deces datorat cancerului; - absența p27 pentru tumorile din stadiul I și II face ca acestea să aibă același prognostic ca cele din stadiul III; studii insuficiente, însă.
MSI microsatellite instability	- sistemul de reparare a defectelor ADN.	- pentru HNPCC, tumorile MSI+ au o creștere demonstrată a perioadei asimptomatice (“disease-free”) ca și a supraviețuirii globale; - rol în răspunsul la chimioterapie - totuși, rol prognostic general incert
18q LOH loss of heterozigozity	-heterozigozitatea genei 18q inhibă creșterea tumorală printr-un mecanism necunoscut	- stadiul II cu deleția 18q are un prognostic similar cu std. III având crescut de 3-7 ori riscul de deces datorat cancerului; - nu s-a observat niciun rol prognostic în cazul pacienților cu rezecții hepatice curative pentru metastaze coloretale
Deleția alelei 5q	- ? supresie tumorală	- datele inițiale sugerează o îmbunătățire a supraviețuirii în cazul unei exprimări normale.
Hipermetilarea ADN	- metilarea promotorilor CpG inhibă exprimarea genelor și a unităților genice repetitive; - poate inhiba genele de supresie tumorală.	- nesemnificativ ca factor independent de prognostic; - poate avea un rol complementar împreună cu alți markeri moleculari, ca de ex. MSI.

Gena DCC și 18q LOH (loss of heterozigozity)

Gena deleției cancerului colonic (DCC - deleted in colon cancer) este o genă de supresie tumorală situată pe cromozomul 18q21.2. Vogelstein [24] a recunoscut semnificația pierderii unei părți a cromozomului 18q incluzând regiunea DCC, iar Jen et al. [25] au arătat că rata de supraviețuire a pacienților din stadiul II care nu aveau deleția alelei cromozomului 18q a fost de 93% comparativ cu doar 54% pentru cei cu această deleție, aceștia din urmă având o rată de supraviețuire similară cu cei din stadiul III TNM. Aceiași autori au constatat

că deleția 18q (pierderea heterozigozității – loss of heterozigosity, LOH) este un marker independent de prognostic negativ, crescând riscul de deces datorat cancerului cu 2,5-3 ori, alți autori constatând chiar creșterea acestui risc de deces de 4,4-7,13 ori [5,26]. Saito et al au stabilit că expresia tumorală a produsului genei DCC a fost un marker independent de prognostic asociat cu un risc de deces datorat cancerului mai mic cu un sfert decât al pacienților ale căror tumori colorectale nu aveau exprimată gena DCC [27]. Totuși, nu s-a putut confirma această asociere pe alte trialuri; într-un alt studiu, analizându-se ADN-ul tumoral provenit de la un lot de 1000 tumori colorectale aflate în stadiul Dukes B și C, și comparându-l cu ADN normal, nu s-a găsit nicio relație între pierderea heterozigozității (LOH) genei DCC și supraviețuirea pe termen scurt [28].

Alte deleții alelice

Delețiile alelelor nu sunt unice doar pentru cromozomul 18q și regiunea DCC, instabilitatea alelică fiind un eveniment comun în cancerul colorectal, dar rolul lor prognostic rămâne să fie elucidat în continuare. S-au raportat concluzii ale unor studii ce au stabilit că și deleția alelică a cromozomului 5q, 17 p sau 1p ar fi posibili factori independenți de prognostic [5].

Hipermetilarea ADN-ului

Rolul hipermetilării ADN ca potențial factor prognostic pentru cancerul colorectal, deși nu este un marker specific, a stârnit un mare interes. Insulele CpG sunt porțiuni scurte ale ADN care sunt găsite în 50-60% din promotorii genelor umane. Metilarea ADN-ului din interiorul insulelor 5'-CpG poate inhiba expresia genică și exprimarea unităților endogene repetitive. Se crede că metilarea crescută a promotorilor CpG a unor gene constituie un mecanism patogenic în cancerul uman [5]. Scăderea metilării conduce la creșterea șanselor de rearanjamente, mutații genice și instabilitatea cromozomială [29]. Hipometilarea genică este întâlnită atât în carcinoame cât și în adenoamele colorectale, fiind una dintre cele mai timpurii anomalii în cadrul carcinogenezei colorectale [30].

Proximitatea promotorilor CpG metilați pe genele de supresie tumorală face ca acestea să poată fi identificate mai ușor, hipermetilarea ADN ducând la inhibarea funcției acestor gene de supresie tumorală [5]. S-a descris chiar un „fenotip metilator” la un subset de cancer colorectal (dar și în cazul unor neoplasme de sân, vezică și prostată) care se asociază și cu instabilitatea microsateleților (MSI), dar, deși studiul hipermetilării ADN și MSI deschid noi orizonturi genetice, inclusiv în prognosticul cancerelor colorectale, este nevoie de studii suplimentare pentru a confirma rolul acestor markeri moleculari.

3.2. ONCOGENELE

Mutațiile oncogenelor sunt considerate de către unii cercetători ca fiind principalul mecanism facilitator al transformării maligne. Mai multe oncogene au fost găsite ca fiind asociate cu dezvoltarea tumorilor canceroase colorectale, unele având și un rol prognostic dovedit (Tabelul V).

Ras

Mutațiile genei Ras s-au remarcat în 40-50% din totalul cancerelor colorectale [31]. Familia Ras a oncogenelor (K-ras, H-ras, N-ras) codifică proteinele membranei plasmice la suprafața internă a acesteia, care leagă nucleotidele guaninei și are activitate GTP-azică. Ca și o proteină-G, oncogenele Ras produc semnale declanșatoare pentru proliferarea celulară, fiind intim implicate în ciclul celular, ceea ce se crede că este un eveniment incipient în tumorigeneza colorectală [32]. Semnificația prognostică pentru Ras rămâne controversată datorită datelor contradictorii existente. Câteva studii au constatat existența unui prognostic

prost la pacienții cu mutații asociate ale Ras și p53, deși fiecare mutație luată în parte nu era un predictor independent al supraviețuirii [33,34]. Mutațiile Ras la fiecare din codonii 12 sau 13 au fost asociate cu un prognostic nefavorabil, independent de stadiu [33-35]. În contradicție cu acestea, numeroase alte studii au eșuat în a stabili vreo semnificație prognostică a mutațiilor Ras, dar acestea din urmă nu au ținut cont de toate stadiile tumorale TNM [36,37]. Se crede totuși că mutații specifice ale genei Ras au un rol prognostic nefast independent de stadiul histopatologic, dar nu sunt date suficiente de elocvente pentru a susține cu certitudine acest lucru.

Mutațiile Ras au fost studiate și pentru a determina rolul lor în predictibilitatea răspunsului la terapia chimioterapică; astfel, pe un lot de 108 pacienți cu tumori colorectale având mutații Ras, s-a constatat o rată de răspuns la chimioterapia cu 5-FU de 39%, dar rezultatele nu au fost semnificative statistic astfel încât nu s-a putut stabili un rol în chimiosensibilitate acestor mutații [5,37].

Tabelul V
Oncogenele și rolul lor în cancerul colorectal
(adaptat după Kahlenberg MS et al [5])

MARKER TUMORAL	FUNCȚIA	SEMNIIFICAȚIA PROGNOSTICĂ
Ras	ca și o G-proteină, dă semnalul proliferării celulare	-mutațiile genei pot / nu pot fi un predictor al unui prognostic prost (studii contradictorii). -Nu poate prezice răspunsul la chimioterapia cu 5-fluoruracil.
EGFR(Erb-B1)	activitate tirozin-kinazică	- fără un rol prognostic constatat. - inhibitorii și anticorpii antiEGFR sunt studiați ca posibili agenți terapeutici
Erb-B2	proliferarea celulelor stimulate de tirozin-kinază	-creșterea expresiei poate fi un predictor al unei scăderii supraviețuirii. - Nu s-a studiat rolul în răspunsul la chimioterapie
TGFα	conlucrează împreună cu EGFR ca promotori ai creșterii	- tumorile cu < 25% celule pozitive pt. TGF α au un progn. mai prost decât cele cu > 25% celule pozitive (datele globale sunt totuși neclare).
TGF β-1	inhibă creșterea tumorală dar stimulează proliferarea și migrația celulară mezenchimală	- creșterea expresiei TGF β -1 se asociază cu tumorile din stadii avansate (studii limitate).

Receptorii factorului epidermal de creștere (EGFR)(Erb-B1)

Receptorul pentru factorul epidermal de creștere (EGFR – epidermal growth factor receptor, Erb-B1) are o activitate tirozin-kinazică, prin localizarea sa transmembranară traducând semnale către citoplasmă atunci când spațiul extracelular este ocupat de EGF sau alți liganzi.

Expresia EGFR a fost observată și în cancerul colorectal, dar datele cu privire la procentajul tumorilor care dețin acest receptor sunt foarte variabile [5]. Deși este un indicator prognostic semnificativ în cazul cancerelor de sân și de ovar, nu s-a demonstrat a fi un factor prognostic independent în cazul cancerului de colon și rect [5,38].

Referitor la rolul jucat de Her-2-neu și EGFR, studiile actuale sunt focalizate pe posibilitatea folosirii în scop terapeutic a unor mici molecule inhibitoare și anticorpi specifici pentru acești receptori existenți în unele tumori colorectale.

Erb-B2 (Her-2/neu)

Protooncogenă erb-B2 (Her-2/neu) este tot un receptor tirozin kinază asociat membranei celulare a cărei supraexprimare conduce la proliferarea celulară. Are un rol stabilit în prognosticul cancerului de sân, anticorpul lui monoclonal, Herceptin[®], având efecte favorabile asupra supraviețuirii pacientelor cu tumori canceroase mamare pozitive pentru receptori erb-B2 [39].

În privința rolului său în cancerul colorectal, erb-B2 a fost prima oară detectat prin imunohistochimie la 76% dintr-un lot de 293 adenocarcinoame primare de colon și rect, iar supraexprimarea sa la 23% din cancerele primare, fără a se putea strânge date semnificative prognostic pentru stadiile I-III [40]. Un alt studiu pe 151 de adenocarcinoame a identificat, însă, o importanță semnificativă prognostică a acestei protooncogene în cazul tumorilor din stadiile Dukes A, B și C, la care s-a determinat gradul de exprimare a erb-B2 [41]. Exprimarea erb-B2 a fost pozitivă în toate tumorile dar intens pozitivă în 43% dintre ele, cu o rată de supraviețuire mediană de 275 săptămâni pentru tumorile cu grad scăzut de exprimare, 120 săptămâni pentru gradul moderat și doar 28 săptămâni pentru tumorile intens colorate pentru erb-B2 (grad ridicat de exprimare). Această relație a erb-B2 cu prognosticul supraviețuirii s-a corelat cu stadiul tumoral, dar a constituit un factor independent de prognostic nefavorabil. Cu privire la rolul erb-B2 în răspunsul la chimioterapie, se fac încă studii în acest sens.

TGF α și TGF β -1

Factorii de transformare a creșterii (transforming growth factors) α și β sunt membrii unei superfamilii TGF, care promovează mitogeneza având totodată și efecte inhibitorii asupra celulelor epiteliale și mezenchimale. TGF α interacționează in vitro cu EGFR în manieră autocrină determinând creșterea celulelor canceroase colonice, pe când TGF β inhibă creșterea celulelor epiteliale, dar stimulează proliferarea celulelor mezenchimale și migrația [5].

Studiind un lot de 105 pacienți rezecați chirurgical dar fără a urma vreun tratament chimioterapic adjuvant, Younes et al [42] au constatat că tumorile cu < 25% celule pozitive pentru TGF α au avut un prognostic mai prost decât acelea cu > 25% celule pozitive ($p=0,03$). Nu s-a evaluat TGF α ca posibil marker prognostic independent dar diferențele semnificative în supraviețuire a celor două subloturi încurajează cercetări ulterioare în acest sens.

TGF β -1 inhibă creșterea celulelor epiteliale dar stimulează proliferarea celulelor mezenchimale. S-a observat că tumorile canceroase colorectale pozitive pentru TGF β -1 se raportează la stadiul tumoral, creșterea expresiei celulare a acestui factor de creștere asociindu-se cu un stadiu avansat. Nu s-a stabilit încă un rol prognostic pentru TGF β -1 [5].

3.3. APOPTOZA

Apoptoza sau *moartea celulară programată* reprezintă un amestec de numeroase evenimente simultane atent regizate care conduc în final spre distrugere fiecărei celule. Fiecare celulă conține proteine specific destinate să cauzeze spargerea membranei celulare, condensarea nucleului și în final moartea celulară fără un răspuns inflamator. Proteinele sau combinațiile de proteine care au un rol specific în acest sens, afectează în mod cert longevitatea fiecărei celule individuale și rata de creștere a masei celulare având implicații evidente în biologia tumorală, deci și a tumorigenezei colorectale (Tabel VI).

Bcl-2

Este o proto-oncogenă care codifică proteinele stabilizatoare ale funcției membranei mitocondriale în pofida căii apoptozei care ar duce la distrugerea acestei membrane. Supraexprimarea Bcl-2 implică o mutație care diminuează sau anulează acest rol în stabilizarea

membranei mitocondriale și conduce celulele tumorale pe calea apoptozei. Deja, pentru cancerul de sân, plămân și tiroidă, s-a stabilit că supraexpresia Bcl-2 se manifestă într-o evoluție mai favorabilă [5]. Deși unele studii mai largi au eșuat în a demonstra o asociere semnificativă între supraexpresia tumorală a Bcl-2 și supraviețuirea pacienților cu cancer colorectal, Manne et al au constatat într-un studiu [43], folosind o analiză multivariată care includea și prezența p53 și statusul limfoganglionilor, creșterea riscului de deces datorat cancerului în cazul pierderii genei Bcl-2. Și alte studii au demonstrat o corelație similară între expresia tumorală pozitivă pentru Bcl-2 și un prognostic mai bun ale acestor tumori [44,45]; s-a constatat, în plus, și că asocierea Bcl-2 + cu absența p53 îmbunătățește semnificativ prognosticul [43].

Tabelul VI
Apoptoza și enzimele radicalilor de oxigen în prognosticul cancerului colorectal
(adaptat după Kahlenberg MS et al [5])

MARKERUL	FUNCȚIA	SEMNIFICAȚIA PROGNOSTICĂ
Bcl-2	Stabilizează funcția membranei mitocondriale în detrimentul apoptozei	- posibil prognostic favorabil pentru Bcl-2 +/p53 -;
SOD <i>superoxid dismutaza</i>	Convertește anionul superoxid în H ₂ O ₂ (antioxidant).	- Creșterea nivelului de MnSOD corespunde unei creșteri a riscului de deces datorat cancerului de 1,9 ori. (Necesită studii suplimentare.)
GST-π <i>glutathion S-transferaza</i>	Antioxidant	- Creșterea activității acestui antioxidant implică o creștere a riscului de deces prin cancer de 3 ori. (Studii prea puține în acest sens)

Antioxidanții

Reprezintă un alt set de molecule care combat apoptoza prin anularea efectului anionului superoxid sau peroxidului de hidrogen de a peroxida ADN, lipide sau proteine. SOD („superoxide dismutase”) convertește anionul superoxid într-un peroxid de hidrogen mai puțin dăunător, dar dovedirea SOD ca un veritabil susținător al vieții este dificilă. Nivelul SOD la nivelul țesuturilor adenocarcinomatoase colorectale a fost găsit semnificativ diminuat comparativ cu cel ale mucoasei colonice adiacente normale [5]. Au fost evaluate ca posibil rol prognostic în cancerul colorectal două mari forme ale SOD: cea care încorporează cupru și zinc- Cu/Zn SOD și cea care are în componență mangan – Mn SOD. Numai nivelurile crescute ale Mn SOD, determinate prin teste Elisa din fragmentele tumorale, au fost găsite ca asociate cu creșterea de 1,9 ori a riscului de deces datorat cancerului, independent de stadiul tumoral [46].

GST- π (glutathion S-transferaza π)

Este un alt antioxidant, a cărui activitate sporită în carcinoamele colorectale a fost demonstrată ca ducând la creșterea de 3 ori a riscului de deces datorat cancerului, luând în considerare și variabilele corelate cu stadiul tumoral [47].

3.4. ANGIOGENEZA TUMORALĂ

În procesul de tumorigeneză, pasul următor după replicarea ADN și proliferarea clonelor de celule tumorale, este de a crește peste dimensiunea critică de 2-3 mm diametru necesară invaziei și metastazării, ceea ce reclamă existența unor vase sangvine peritumorale. De aceea, angiogeneza tumorală joacă un rol cheie în posibilitatea metastazării celulelor

neoplazice. Factorii implicați în angiogeneza tumorală sunt sintetizați în tabelul de mai jos (Tabelul VII).

Identificarea prin tehnici de imunohistochimie pe secțiuni tumorale a nivelului antigenelor endoteliale de la nivelul neovaselor, a constituit un factor important de prognostic în cazul mai multor cancere umane [48]. În cazul cancerelor colorectale, deși asociația dintre cantitatea și densitatea de microvase tumorale (care este mai mare decât în mucoasa colică normală sau adenoame) și prognostic pare inevitabilă, studiile efectuate au avut rezultate contradictorii [49]. Takebayashi et al, pe un lot de 166 carcinoame colorectale, au demonstrat că densitatea crescută de microvase neoformate este un puternic factor de prognostic negativ, corelat cu stadiul tumoral [50]. Densitatea microvaselor sangvine a fost asociată și cu invazia limfatică și vasculară, gradul histologic tumoral și prezența metastazelor ganglionare și limfatice, crescând de 3 ori riscul de deces datorat cancerului [51].

VEGF

Factorul de creștere a endoteliului vascular („vascular endothelial growth factor”), un factor angiogenetic important, este o glicoproteină produsă atât de tumoră cât și de organismul gazdă. S-au făcut cercetări asupra modului în care influențează prognosticul cancerelor colorectale concentrația serică a VEGF sau exprimarea intratumorală a acestui marker. Kumar et al [52] comparând nivelurile serice preoperatorii ale unui lot de 108 pacienți cu carcinom colorectal în toate stadiile cu valorile serice a 136 indivizi sănătoși, a găsit că nivelurile de VEGF ale pacienților din primul lot erau semnificativ mai mari decât a celor din lotul martor; în cadrul primului lot, nivelurile VEGF au fost mai crescute la pacienții cu metastaze față de cei cu tumori dezvoltate local, nemetastazante. Expresia intratumorală crescută a VEGF a fost asociată cu creșterea de 2 ori a riscului de deces datorat cancerului, corelându-se cu creșterea stadiului tumoral, scăderea supraviețuirii globale și scăderea perioadei disease-free [53]. Amaya et al au demonstrat într-un alt studiu [54] că tumorile VEGF pozitive au un prognostic mult mai prost decât tumorile VEGF negative, fapt confirmat și de alți autori.

Tabelul VII
Markerii moleculari cu rol în angiogeneza tumorală a metastazelor
cancerului colorectal și semnificația lor prognostică
 (adaptat după Kahlenberg MS et al [5])

MARKERUL	FUNCȚIA	SEMNIFICAȚIA PROGNOSTICĂ
VEGF	promovează angiogeneza.	- crește de 2 ori riscul de deces datorat cancerului. Evidențe puternice în literatură.
PD-ECGF <i>platelet derived-endothelial cell growth factor</i>	este o enzimă (fosforilază) care fosforilează reversibil timidina și deoxiuridina; convertește deoxifluorouridina la fluorouracil.	- creșterea de 8 ori a riscului de deces prin cancer, deși ar scădea incidența invaziei limfonodurilor și metastazării. De aceea, rol prognostic incert.
CAMs <i>cell adhesion molecules</i>	glicoproteină care facilitează adeziunea și interacțiunile intercelulare.	- Scăderea numărului CAMs de pe suprafața celulelor tumorale este asociată cu creșterea numărului de metastaze ganglionare și hepatice dar și cu diminuarea perioadei de supraviețuire fără simptome. Rol încă incert.

PD-ECGF (platelet derived-endothelial cell growth factor)

Factorul de creștere a celulelor endoteliale derivate din trombocite (platelet derived-endothelial cell growth factor) este o enzimă, timidin-fosforilază, care asigură fosforilarea reversibilă a timidinei și deoxiuridinei la compușii de bază și convertește, deasemenea, deoxifluorouridina la fluorouracil [5]. Într-un studiu pe un lot de 163 pacienți cu carcinom colorectal, exprimarea intratumorală a PD-ECGF s-a demonstrat a crește de aproape 8 ori decesele prin cancer, independent de densitatea microvaselor neoformate sau chiar de stadiul tumorii [55]. Cum alte cercetări [56] au găsit că, din contră, la tumorile colorectale stadializate ca T2 sau T3, nivelele crescute al PD-ECGF se corelează cu o incidență scăzută a diseminării limfatice și a metastazelor la distanță, rolul PD-ECGF ca factor de prognostic rămâne incert.

CAMs - Moleculele de adeziune celulară

Sunt niște glicoproteine de la nivelul suprafeței celulare care sunt indispensabile interacțiunilor celulă-celulă. Rupturi ale interconectivității celulare au fost semnalate în proliferarea neoplasică celulară dar și-n biologia metastazelor tumorale, efectele CAMs asupra răspunsului imun de apărare putând declanșa tumorigeneza [5]. Markerii CAM au fost semnalati si-n cancerule colorectale, dar rolul lor prognostic rămâne să fie mai mult studiat. Dintre componentele familiei CAM (VCAM-1, ICAM-1, ELAM-1), cel mai important rol prognostic l-a avut markerul ICAM-1. Astfel, într-un studiu pe 96 pacienți cu cancer colorectal [57] tumorile ICAM-1 negative s-au asociat cu prezența metastazelor ganglionare și hepatice; un alt studiu, efectuat pe 41 pacienți din stadiile II-III, nivelul scăzut de celule ICAM-1 pozitive s-a asociat cu o perioadă disease-free mai scurtă [58].

CONCLUZII

Ca o concluzie finală, după ce am trecut în revistă principalii factori cu influență prognostic în cancerul colorectal, ținem să precizăm că este dificil să apreciezi exact speranța de viață a unui pacient cu cancer colorectal, chiar și atunci când ai la îndemână toate datele histopatologice sau de laborator, însă putem încadra, fără teama de a greși, prognosticul acestor pacienți în categorii de tipul foarte bun, bun, rezervat sau nefavorabil. Printre cei mai importanți factorii de prognostic independenți, histopatologici și clinici, ar fi: invazia ganglionilor limfatici regionali, invazia seroasei peritoneale, invazia venoasă, invazia vaselor limfatice, invazia perineurală, grading-ul histopatologic al tumorii, tipul histopatologic tumoral, prezența complicațiilor de tipul obstrucției și/sau perforației.

Factorii biologici de prognostic dețin de asemenea, un rol major în aprecierea ratei de supraviețuire, a riscului de recidivă și a răspunsului la chimioterapie. Dintre markerii de încărcare tumorală nivelul seric preoperator crescut al ACE semnifică creșterea riscului de recidivă neoplazică și reducerea speranței de supraviețuire. Aneuploidia celulelor tumorale ar avea aceeași semnificație. Deși pentru studierea lor sunt necesare tehnici moderne și costisitoare, markerii moleculari tumoralii au un rol din ce în ce mai apreciat de către cercetători atât în estimarea riscului de recidivă și diseminare neoplazică cât și a ratei de răspuns la tratamentul adjuvant. Se estimează că studierea profilului molecular/genetic al tumorilor colorectale va dicta în viitor deciziile terapeutice de urmat.

ACKNOWLEDGEMENTS

Acest material face parte parțial din referatul 2 din cadrul tezei de doctorat *Valoarea laparoscopiei în diagnosticul și tratamentul neoplasmului colorectal* (îndrumător Prof. Dr. E. Târcoveanu).

BIBLIOGRAFIE

1. Gold P, Freedman S. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med.* 1965; 121: 439-462.
2. Northover J. The Use of Prognostic Markers in Surgery for Colorectal Cancer. *Eur J Cancer.* 1995; 31A(7-8): 1207-1209.
3. Corman ML. Carcinoma of the Colon. In: Corman ML, editors. *Colon and Rectal Surgery.* 5-th edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2005. p. 767-920.
4. Roselli M, Guadagni F, Martini F, Spila A, Mariotti S, D'Alessandro R, Aloe S, Gazzaniga PP, Basili S, Cosimelli M, Ferroni P. Association between serum carcinoembryonic antigen and endothelial cell adhesion molecules in colorectal cancer. *Oncology.* 2003; 65(2): 132-138.
5. Kahlenberg MS, Sullivan JM, Witmer DD, Petrelli NJ. Molecular prognostics in colorectal cancer. *Surg Oncol.* 2003; 12(3): 173-186.
6. Wang WS, Lin JK, Chiou TJ, Liu JH, Fan FS, Yen CC, Lin TC, Jiang JK, Yang SH, Wang HS, Chen PM. Preoperative carcinoembryonic antigen level as an independent prognostic factor: Taiwan experience. *Jpn J Clin Oncol.* 2000; 30(1): 12-16.
7. Harrison LE, Guillem JG, Paty P, Cohen AM. Preoperative carcinoembryonic antigen predicts outcomes in node-negative colon cancer patients: a multivariate analysis of 572 patients. *J Am Col Surg.* 1997; 185(1): 55-59.
8. Carpelan-Holmstrom M, Haglund C, Lundin J, Jarvinen H, Roberts P. Preoperative serum levels of CA 242 and CEA predict outcome in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 1996; 32A(7): 1156-1161.
9. Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE: Pathology of Colorectal Cancer. In: Rustgi AK, Crawford J.M. editors. *Gastrointestinal Cancer.* Saunders; 2003. p. 429-444.
10. Bresalier R. Malignant neoplasms of the large intestine. In: Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH, editors. *Gastrointestinal and Liver Disease (Pathology, Diagnosis, Management).* Philadelphia, London, New York: Saunders; 2002. p. 2215-2263.
11. Dixon MR, Haukoos JS, Udani SM, Naghi JJ, Arnell TD, Kumar RR, Stamos MJ. Carcinoembryonic antigen and albumin predict survival in patients with advanced colon and rectal cancer. *Arch Surg.* 2003; 138(9): 962-966.
12. Mogoş D, Păun M. Prognosticul cancerului de colon. In: Mogoş D, Vasile I, editors. *Cancerul de colon.* Craiova, Romania: Editura Aius; 2000. p. 503-519.
13. Engaras B, Kewenter J, Nilsson O, Wedel H, Hafstrom L. CEA, CA 50 and CA 242 in patients surviving colorectal cancer without recurrent disease. *Eur J Surg Oncol.* 2001; 27(1): 43-48.
14. Visscher DW, Zarbo RJ, Ma CK, Sakr WA, Chrissman JD. Flow cytometric DNA and clinicopathologic analysis of Dukes' A & B colonic adenocarcinomas. A retrospective study. *Mod Pathol.* 1990; 3(6): 709-712.
15. Kahlenberg M, Stoler D, Rodriguez-Bigas MA, Weber TK, Driscoll DL, Anderson GR, Petrelli NJ: P53 tumor suppressor gene mutations predict decreased survival of patients with sporadic colorectal carcinoma. *Cancer.* 2000; 88(8): 1814-1819.
16. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. P53-dependent apoptosis modulate the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell.* 1993; 74(6): 957-967.
17. Paradiso A, Rabinovich M, Vallejo C, Machiavelli M, Romero A, Perez J, Lacava J, Cuevas MA, Rodriguez R, Leone B, Sapia MG, Simone G, De Lena M. P53 and PCNA expression in advanced colorectal cancer: response to chemotherapy and longterm prognosis. *Int J Cancer.* 1996; 69(6): 437-441.
18. Spitz FR, Giacco GG, Hess K, Larry L, Rich TA, Janjan N, Cleary KR, Skibber JM. P53 immunohistochemical staining predicts residual disease after chemoradiation in patients with high-risk rectal cancer. *Clin Cancer Res.* 1997; 3(10): 1658-1690.
19. Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med.* 1997; 3(2): 152-154.
20. Belluco C, Esposito G, Bertorelle R, Del Mistro A, Fassina A, Vieceli G, Chieco-Bianchi L, Nitti D, Lise M. Absence of the cell cycle inhibitor p27Kip1 protein predicts poor outcome in patients with stage I-III colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 1999; 6(1): 19-25.
21. Voiosu R. Cancerul de colon si rect. In: Ciurea T, Pascu O, Stanciu C, editors. *Gastroenterologie si Hepatologie. Actualitati 2003.* Bucureşti: Edit. Medicală; 2003. p.239-296.
22. Chen WS, Chen JY, Liu JM, King KL, Whang-Peng J, Yang WK. Microsatellite instability in sporadic-colon-cancer patients with and without liver metastases. *Int J Cancer.* 1997; 74(4): 470-474.
23. Salahshor S, Kressner U, Fischer H, Lindmark G, Glimelius B, Pahlman L, Lindblom A. Microsatellite instability in sporadic colorectal cancer is not an independent prognostic factor. *Br J Cancer.* 1999; 81(2): 190-193.

24. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alteration during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988; 319(9): 525-532.
25. Jen J, Kim HG, Piantadosi S, Liu ZF, Levitt RC, Sistonen P, Kinzler KW, Vogelstein B, Hamilton SR. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 1994; 331(4): 213-221.
26. Lanza G, Matteuzzi M, Gafa R, Orvieto E, Maestri I, Santini A, Del Senno L. Chromosome 18q allelic loss and prognosis in stage II and III colon cancer. *Int J Cancer.* 1998; 79(4): 390-395.
27. Saito M, Yamaguchi A, Goi T, Tsuchiyama T, Nakagawara G, Urano T, Shiku H, Furukawa K. Expression of DCC protein in colorectal tumors and its relationship to tumor progression and metastasis. *Oncology.* 1999; 56(2): 134-141.
28. Dix BR, Robbins P, Soong R, Jenner D, House AK, Iacopetta BJ. The common molecular genetic alteration in Dukes' B and C colorectal carcinomas are not short-term prognostic indicators of survival. *Int J Cancer.* 1994; 59(6): 747-751.
29. Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature.* 1998; 395(6697): 89-93.
30. Gheorghe L, Gheorghe C, Cazacu M. Cancerul colorectal. In: Grigorescu M editor. *Tratat de Gastroenterologie.* București: Editura Medicală Națională; 2001. p. 139-173.
31. Elnatan J, Goh H-S, Smith DR. C-KI-RAS activation and the biological behavior of proximal and distal colonic adenocarcinomas. *Eur J Cancer.* 1996; 32A(3): 491-497.
32. Fearon ER, Vogelstein B. The genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990; 61(5): 759-767.
33. Bell SM, Scott N, Cross D, Sagar P, Lewis FA, Blair GE, Taylor GR, Dixon MF, Quirke P. Prognostic value of p53 overexpression and c-Ki-ras gene mutations in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 1993; 104(1): 57-64.
34. Smith DR, Goh H-S. Overexpression of the c-myc protooncogene in colorectal carcinoma is associated with a reduced mortality that is abrogated by point mutation of the p53 tumor suppressor gene. *Clin Cancer Res.* 1996; 2(6): 1049-1053.
35. Elnatan J, Goh H-S, Smith DR: C-KI-RAS activation and the biological behavior of proximal and distal colonic adenocarcinomas. *Eur J Cancer.* 1996; 32A(3): 491-497.
36. Pricolo VE, Finkelstein SD, Wu TT, Keller G, Bakker A, Swalsky PA, Bland KI. Prognostic value of TP53 and K-ras-2 mutational analysis in stage III carcinoma of the colon. *Am J Surg.* 1996; 171(1): 41-46.
37. Wadler S, Bajaj R, Neuberger D, Agarwall V, Haynes H, Benson AB. Prognostic implications of the c-Ki-ras2 mutations in patients with advanced colorectal cancer treated with 5-fluorouracil and interferon: a study of the Eastern Cooperative Oncology group (EST 2292). *Cancer J Sci Am.* 1997; 3(5): 284-288.
38. Linden MD, Nathanson DS, Jacobson G. Lack of prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in Dukes' B colorectal carcinomas. *Laboratory Investigation.* 1996; 74(61A): 343-345.
39. Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, Baselga JM, Tripathy D, Baly D, Baughman SA, Twaddell T, Glaspy JA, Slamon DJ: Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neuoverexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol.* 1998; 16(8): 2659-2671.
40. Sun XF, Carstensen JM, Stal O, Zhang H, Nordenskjold B. c-erbB-2 oncoprotein in relation to DNA ploidy and prognosis in colorectal adenocarcinoma. *APMIS.* 1995; 103(4): 309-315.
41. Kapitanovic S, Radosevic S, Kapitanovic M, Andelinović S, Ferencić Z, Tavassoli M, Primorać D, Sonicki Z, Spaventi S, Pavelic K, Spaventi R. The expression of p185 Her-2/neu correlates with the stage of disease and survival in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 1997; 112(4): 1103-1113.
42. Younes M, Fernandez L, Lechago J. Transforming growth factor alpha (TGF-a) expression in biopsies of colorectal carcinoma is a significant prognostic indicator. *Anticancer Res.* 1996; 16(4A): 1999-2003.
43. Manne U, Myers RB, Moron C, Poczatek RB, Dillard S, Weiss H, Brown D, Srivastava S, Grizzle WE. Prognostic significance of Bcl-2 expression and p53 nuclear accumulation in colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 1997; 74(3): 346-358.
44. Baretton GB, Diebold J, Christoforis G, Vogt M, Müller C, Dopfer K, Schneiderbanger K, Schmidt M, Löhns U. Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance. *Cancer.* 1996; 77(2): 255-264.
45. Ofner D, Riehemann K, Maier H, Riedmann B, Nehoda H, Tötsch M, Böcker W, Jasani B, Schmid KW. Immunohistochemically detectable Bcl-2 expression in colorectal carcinoma: correlation with tumor stage and patient survival. *Br J Cancer.* 1995; 72(4): 981-985.

46. Janssen AM, Bosman CB, Sier CF, Griffioen G, Kubben FJ, Lamers CB, van Krieken JH, van de Velde CJ, Verspaget HW. Superoxide dismutases in relation to the overall survival of colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 1998; 78(8): 1051-1077.
47. Mulder TP, Verspaget HW, Sier CF, Roelofs HM, Ganesh S, Griffioen G, Peters WH. Glutathion S-transferase pi in colorectal tumors is predictive for overall survival. *Cancer Res*. 1995; 55(12): 2696-2702.
48. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast cancer. *N Engl J Med*. 1991; 324(1): 1-8.
49. Bossi P, Viale G, Lee AK, Alfano R, Coggi G, Bosari S. Angiogenesis in colorectal tumors: microvessel quantitation in adenomas and carcinomas with clinicopathological correlations. *Cancer Res*. 1995; 55(21): 49-53.
50. Takebayashi Y, Akiyama S, Yamada K. Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. *Cancer*. 1996; 78(2): 226-231.
51. Choi HJ, Hyun MS, Jung GJ, Kim SS, Hong SH. Tumor angiogenesis as a prognostic predictor in colorectal carcinoma with special reference to mode of metastasis and recurrence. *Oncology*. 1998; 55(6): 575-581.
52. Kumar H, Heer K, Lee PW, Duthie GS, MacDonald AW, Greenman J, Kerin MJ, Monson JR. Preoperative serum vascular endothelial growth factor can predict stage in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 1998; 4(5): 1279-1285.
53. Ishigami SI, Arai S, Furutani M, Niwano M, Harada T, Mizumoto M, Mori A, Onodera H, Imamura M: Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Cancer*. 1998; 78(10): 1379-1384.
54. Amaya H, Tanigawa N, Lu C, Matsumura M, Shimomatsuya T, Horiuchi T, Muraoka R. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis, survival and thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor expression in human colorectal cancer. *Cancer Lett*. 1997; 119(2): 227-235.
55. Takebayashi Y, Akiyama S, Akiba S, Yamada K, Miyadera K, Sumizawa T, Yamada Y, Murata F, Aikou T. Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1996; 88(16): 1110-1117.
56. Saito S, Tsuno N, Nagawa H, Sunami E, Zhengxi J, Osada T, Kitayama J, Shibata Y, Tsuruo T, Muto T. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor correlates with good prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*. 2000; 88(1): 42-49.
57. Maeda K, Kang SM, Sawada T, Nishiguchi Y, Yashiro M, Ogawa Y, Ohira M, Ishikawa T, Hirakawa YS, Chung K. Expression of intercellular adhesion molecule-1 and prognosis in colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2002; 9(3): 511-514.
58. Mulder W, Stern PL, Sukart MJ, de Windt E, Butzelaar RM, Meijer S, Adér HJ, Claessen AM, Vermorken JB, Meijer CJ, Wagstaff J, Scheper RJ, Bloemena E. Low intercellular adhesion molecule 1 and high 5T4 expression on tumor cells correlate with reduced disease-free survival in colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res*. 1997; 3(11): 1923-1930.