

11262



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
DIRECCIÓN REGIONAL SIGLO XXI
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

**“ASOCIACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD DE MMP-2 Y MMP-9
Y LA RESPUESTA A LA RADIOTERAPIA PREOPERATORIA
EN PACIENTES CON ADENOCARCINOMA RECTAL
EN ETAPAS II Y III”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

DR. EFRÉN FLORES ÁLVAREZ

TUTOR:

DR. PEDRO LUNA PÉREZ



SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

MÉXICO, D. F.

SEPTIEMBRE 2005



0352040



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

IA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

COTUTORES:

DRA. RAQUEL TREJO ALBARRAN
INVESTIGADORA ADSCRITA A LA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES
ONCOLÓGICAS
HOSPITAL DE ONCOLOGÍA, CMN SXXI

DRA. MARIA DEL CARMEN MARTINEZ GARCIA
JEFA DEL AREA DE APOYO METODOLÓGICO
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN, CMN SXXI

SITIO DE REALIZACIÓN DEL PROYECTO:

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES
ONCOLÓGICAS
HOSPITAL DE ONCOLOGIA
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Esperanza Flores Alvarez
FECHA: 24 / sep / 2005
FIRMA: [Firma]

Con agradecimiento y amor
a mi esposa, Laura Lorena
y a mis hijos, Laura Lorena, Efrén y Ramiro Yaél

Un agradecimiento especial al
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)
por su apoyo para la realización del proyecto

Colaboradores:

Dr. Saúl Enrique Rodríguez Ramírez (Servicio de Colon y Recto)

Dr. Javier Herrera Torres (Servicio de Colonoscopias)

Dra. Alma Delia Díaz Popoca (Servicio de Imagenología)

Dr. Antonio Polanco Saldívar (Residente de Cirugía Oncológica)

INDICE

I.	Introducción.	5
1.1	Cáncer colorrectal.	5
1.1.1	Epidemiología.	5
1.1.2	Clasificación	6
1.1.3	Diagnóstico.	7
1.1.4	Tratamiento.	8
1.1.4.1	Cirugía.	8
1.1.4.2	Terapias adyuvantes.	9
1.2	Mecanismos moleculares de diseminación y metástasis	11
1.3	Metaloproteinasas.	12
1.3.1	Familia de las metaloproteinasas	12
1.3.2	Metaloproteinasas y cáncer colorrectal	15
1.3.3	Radiación y metaloproteinasas	19
II.	JUSTIFICACIÓN	21
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
IV.	HIPÓTESIS	22
V.	OBJETIVOS	23
VI.	MATERIAL Y METODOS	23
6.1	Diseño del estudio	23
6.2	Criterios de inclusión	23
6.3	Criterios de exclusión	24
6.4	Criterios de eliminación	24
6.5	Variable independiente	25

6.6	Variable dependiente	26
6.7	Metodología	27
6.7.1.	Etapificación clínica	27
6.7.2.	Ultrasonido endorrectal	27
6.7.3.	Colonoscopia y obtención de la muestra	28
6.7.4.	Manejo de la muestra	29
6.7.5.	Homogeneización del tejido congelado	29
6.7.6.	Determinación de proteínas totales	30
6.8.	Zimogramas	30
6.8.1	Preparación de geles	30
6.8.2	Electroforesis	31
6.8.3	Incubación y revelado	32
6.8.4	Medición de la actividad de MMP-2 y MMP-9	32
6.9	Bio-ensayos de actividad de MMPs	32
6.10	Radioterapia	33
6.11	Cirugía	33
6.12	Medición de la respuesta histopatológica a la RT	34
6.13	Análisis estadístico	35
6.14	Tamaño de la muestra	36
6.15	Consideraciones éticas	36
6.16	Financiamiento	37
6.17	Recursos humanos	37
VII.	RESULTADOS	38
7.1	Características generales de los pacientes	38

7.2	Proteínas totales	40
7.3	Resultados de los zimogramas	41
7.4	Actividad de las MMPs	45
7.5	Correlación entre la actividad de las MMPs y la respuesta histopatológica a la radioterapia en la pieza quirúrgica	46
VIII.	DISCUSIÓN	50
IX.	CONCLUSIONES	57
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	58

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer colorrectal

1.1.1 Epidemiología

El cáncer representa un problema de salud pública en países desarrollados ya que es la segunda causa en frecuencia de neoplasias malignas y la primera en mortalidad por cáncer. En México, en el año de 1996 se notificaron 84,615 casos nuevos de neoplasias malignas, de éstas el 1.5% correspondieron a tumores de localización en colon, recto y ano, ocupando el décimo octavo lugar en frecuencia general, el segundo lugar como causa de mortalidad y fue responsable del 11.4% del total de muertes ocurridas en ese año.¹

En el cuatrienio 1993-1996, el IMSS notificó un total de 106,086 casos nuevos de neoplasias malignas correspondiendo al colon, recto y ano 1,630 casos. En el Hospital de Oncología del CMN Siglo XXI, IMSS, se concentró el 5.3% (5,669) del total de pacientes con tumores malignos durante este periodo de estudio. Los tumores rectales representaron el 2.6 % del total con 146 casos.²

El cáncer colorrectal puede presentarse a cualquier edad, aunque generalmente ocurre entre los 50 y 80 años de edad con un pico de incidencia máximo entre la sexta y séptima décadas de la vida, con la misma frecuencia en hombres y mujeres.³ El tipo histológico más frecuente es el adenocarcinoma que constituye

entre el 95 y 98% del total. Los tipos macroscópicos de cáncer colorrectal incluyen el proliferativo, el anular, el ulcerativo y la linitis plastica; el tipo proliferativo es el más frecuentemente encontrado en ciego, colon ascendente y recto.^{3,4}

1.1.2 Clasificación

Se han empleado varios sistemas para clasificar al cáncer colorrectal según su grado de evolución, el más utilizado actualmente es el sistema TNM propuesto por el American Joint Committee on Cancer (AJCC), basado en la profundidad de invasión del tumor en la pared intestinal, la extensión a estructuras adyacentes, el número de ganglios linfáticos involucrados y la presencia o ausencia de metástasis a distancia. El sistema TNM aplica tanto para la estadificación clínica como histopatológica y proporciona información más detallada que otros sistemas.⁵

T = Tumor

Tis Carcinoma in situ

T1 Tumor localizado en la submucosa

T2 Tumor que invade la capa muscular propia

T3 Tumor que infiltra la pared intestinal hasta la subserosa

T4 Tumor que invade órganos adyacentes

N = Ganglios

N0 Sin ganglios regionales metastásicos

N1 Metástasis en 1-3 ganglios regionales

N2 Metástasis en 4 o más ganglios regionales

M = Metástasis a distancia

M0 Sin metástasis a distancia

M1 Con metástasis a distancia

1.1.3 Diagnóstico

La evaluación de la invasión local en cáncer rectal por medios clínicos puede ser muy precisa en manos expertas pero es subjetivo, el mejor método paraclínico actual para determinar la invasión local y la presencia de metástasis ganglionares es el ultrasonido endorrectal o transrectal (USER). Se ha reportado un alto grado de correlación entre la estadificación preoperatoria y la histopatológica en el espécimen quirúrgico. La sensibilidad del USER como indicador de invasión local en cáncer rectal reportada en varios estudios es de cercana al 95 %, con una especificidad de alrededor del 90 %.^{6,7}

Métodos de diagnóstico más comunes en cáncer del recto

Método	Sensibilidad	Especificidad	Valor predictivo positivo (VPP)	Valor predictivo negativo (VPN)
Exploración digital	68%	83%	100%	46%
Tomografía computada	86%	62%	91%	46%
Ultrasonido endorrectal	97%	90%	98%	90%

1.1.4 Tratamiento

1.1.4.1 Cirugía

Los procedimientos quirúrgicos utilizados para la resección del cáncer del recto pueden ser divididos en resecciones locales y resecciones radicales. Los procedimientos locales son empleados en el tratamiento de lesiones incipientes (T_{is} y T1). Para el tratamiento de lesiones avanzadas (T2-T4) es necesario realizar cirugías radicales, procedimientos resectivos con estoma permanente (resección abdomino-perineal y técnica de Hartmann) y resecciones con preservación del esfínter anal (resección anterior baja y resección completa del recto con colo-ano-anastomosis). La resección abdomino-perineal remueve completamente el recto, el canal anal y sus esfínteres, porciones considerables del músculo elevador del ano, la grasa isquiorrectal, prácticamente todo el colon sigmoides y el mesocolon

incluyendo los vasos mesentéricos inferiores y hemorroidales superiores y una porción del peritoneo pélvico adyacente al recto. El procedimiento de Hartmann inicia como la porción abdominal de la resección abdomino-perineal, sin embargo la resección rectal termina en un punto localizado a 1-3 cm. del margen distal del tumor, el cual es suturado o engrapado y se realiza una colostomía definitiva. En la resección anterior baja, la movilización del recto y estructuras adyacentes es idéntica al procedimiento de Hartmann, pero la técnica implica además una anastomosis entre el segmento colónico distal y la porción de recto residual. En la resección completa del recto con conservación del esfínter anal el corte distal de la pieza quirúrgica se realiza justo arriba del nivel del anillo ano-rectal y la mucosa anal es anastomosada al segmento distal del colon, generalmente con un reservorio colónico de 6-8 cm.^{3,4,8}

1.1.4.2 Terapias adyuvantes

La alta frecuencia de recurrencia del tumor y el pobre pronóstico global de la enfermedad en etapas II y III después del tratamiento quirúrgico han llevado a buscar nuevos métodos que aumenten las posibilidades de curación ó un mayor tiempo libre de enfermedad. La radioterapia antes o después de la cirugía, sola o en combinación con quimioterapia es empleada con esta finalidad. Una gran cantidad de estudios han demostrado una reducción significativa en la recurrencia local de la enfermedad en comparación con la que se observa si sólo se realiza cirugía. Las ventajas de administrar la radiación preoperatoriamente incluyen la exposición a una menor dosis de radiación total, una efectividad mayor debido a la

mejor oxigenación de los tejidos, menor morbilidad intestinal y permitir una resección completa del cáncer rectal con un procedimiento preservador del esfínter anal.^{9,10}

Empleando quimioterapia y radioterapia preoperatoria se ha observado una reducción en el tamaño y en la actividad proliferativa de los tumores rectales. En un reporte reciente, con el uso de quimioterapia y radioterapia preoperatoria en 117 pacientes, con radiación a dosis de 45 Gy en 25 fracciones, administradas en 5 semanas y quimioterapia con 5-fluouracilo, se observó una reducción objetiva del tumor que permitió la preservación del esfínter anal en más del 40% de los pacientes.¹¹ Otros investigadores utilizaron un esquema de quimio-radiación preoperatoria con radiación de 50.4 Gy y bolos de 5-Fluouracilo en pacientes con tumores rectales localmente avanzados (etapas II y III) y reportaron una resección con márgenes negativos en 97% de los casos y una respuesta patológica completa en el 11% de los casos.¹² El Swedish Rectal Cancer Trail demostró mejoría en la sobrevida a largo plazo con el uso de la radioterapia preoperatorio en relación a la disminución en la recurrencia pélvica.¹³

Luna y cols.⁹ estudiaron la evolución de 412 pacientes con adenocarcinoma rectal primario y compararon los resultados del tratamiento con radioterapia preoperatoria (259 pacientes) y de la cirugía radical sola (153 pacientes). Los pacientes fueron atendidos en el Hospital de Oncología CMN Siglo XXI y recibieron una radiación total de 45 Gy dividida en 20 fracciones. Después de cuatro a ocho semanas se practicó la resección radical del tumor. La media de

seguimiento de los pacientes fue de 7 años y cinco meses (89 meses). El 12.9% de los pacientes tratados con radioterapia preoperatoria y el 36.2% de los pacientes que solo fueron operados presentaron reactivación local de la enfermedad en un tiempo promedio después de la cirugía de 18 y 22 meses, respectivamente. La supervivencia a 7 años fue del 62% y del 57% en los pacientes con y sin radioterapia preoperatoria. Estos resultados indican una disminución importante en la reaparición local de la enfermedad en los pacientes tratados con radioterapia preoperatoria, aunque la supervivencia a largo plazo fue similar. Los mismos autores en una serie actualizada de pacientes y con un mayor seguimiento, analizando los hallazgos histológicos del espécimen quirúrgico han demostrado que una respuesta pobre o parcial a la RT preoperatoria se relaciona con un mal pronóstico a largo plazo.¹⁴

La supervivencia reportada a cinco años de acuerdo con la clasificación de Astler y Coller es: etapa A, >95%; etapa B1, 75-100%; etapa B2-3, 50-75%; etapa C1-2-3, 30-50% y; etapa D, <10%.³

1.2 Mecanismos moleculares de invasividad y metástasis

La diseminación de los cánceres colorrectales puede ocurrir por invasión directa a partir de la pared intestinal, por implantes peritoneales, por invasión de nervios y ganglios linfáticos y por vía hematológica, éstas últimas dos son las responsables de las metástasis a distancia.³ Para que ocurra la diseminación de los tumores es indispensable la realización exitosa de varias etapas a nivel molecular: a) ruptura

de los contactos membranales entre células vecinas, b) desprendimiento de células del tumor primario, c) desplazamiento de las células cancerosas entre las células vecinas invadiendo la matriz extracelular y tejido conectivo local, d) ruptura y paso a través de la membrana basal, e) paso a vasos sanguíneos y linfáticos (intravasación), f) supervivencia durante su transporte en el torrente sanguíneo o linfático, g) salida de los vasos (extravasación) y adhesión en órganos específicos y h) proliferación de las células cancerosas invasoras en un nuevo medio ambiente (metástasis).¹⁵⁻¹⁷

1.3 Metaloproteinasas (MMPs)

1.3.1 Familia de las MMPs

Las MMPs son enzimas que degradan los componentes de la matriz extracelular, dependen del zinc para su actividad por lo que son inhibidas por agentes quelantes, son secretadas en forma latente como pro-enzimas y deben perder parte de su secuencia de aminoácidos para pasar a la forma activa, pueden ser inhibidas por proteínas tisulares específicas (TIMPs) y presentan homología ya que algunas secuencias de aminoácidos son comunes para varias MMP. Las MMPs pueden ser divididas en cinco grupos principales de acuerdo al sustrato específico: gelatinasas, colagenasas, estromelinas, metaloproteinasas de tipo membrana y otras MMPs.¹⁵

El contenido de las MMPs es regulado por: 1) la expresión de los genes que las codifican; diversos factores de crecimiento, citocinas y oncogenes pueden inducir su expresión, 2) la estabilización del RNA mensajero; la actividad de las MMPs puede ser regulada por la estabilidad de la forma latente y por la aceleración del procesamiento de la pro-enzima para producir la forma activa de la enzima y 3) el nivel de las proteínas tisulares inhibitoras (TIMPs).¹⁵⁻¹⁸

Clasificación y nomenclatura de las MMPs humanas

Subfamilia	Tipo	Nombre
Colagenasas	1	Colagenasa intersticial
	8	Colagenaza de neutrofilos
	13	Colagenaza-3
Gelatinasas	2	Gelatinasa tipo IV de 92 kDa
	9	Gelatinasa tipo Iv de 72 kDa
Estromielisinas	3	Estromielisina-1
	10	Estromielisina-2
	11	Estromielisina-3
	18	MMP putativa (similar a estromielisina)
MMPs de tipo membrana	14	MT1-MMP
	15	MT2-MMP
	16	MT3-MMP
	17	MT4-MMP
	24	MT5-MMP
	25	MT6-MMP
Otras MMPs	7	Matrilisina (PUMP-1)
	12	Elastasa de macrofagos
	19	MMP asociada a AR
	20	Enamelisina
	21	MMP recientemente clonada
	22	MMP recientemente clonada
	23	MMP recientemente clonada

Pesos moleculares de las MMPs

MMP	Forma inactiva	Forma activa
MMP-1	57 KDa	52 KDa
MMP-2	72 KDa	62 KDa
MMP-3	57 KDa	48 KDa
MMP-7	28 KDa	19 KDa
MMP-9	92 KDa	82 KDa
MMP-10	57 KDa	47 KDa
MMP-11	55 KDa	44 KDa
MMP-13	60 KDa	48 KDa
MMP-23	42 KDa	
MMP-14 (MT1-MMP)	66 KDa	60 KDa
MMP-15 (MT2-MMP)	68 KDa	62 KDa
MMP-16 (MT3-MMP)	60 KDa	
MMP-17 (MT4-MMP)	24 Kda	

La infiltración de las células neoplásicas hacia el tejido conectivo local requiere de la hidrólisis de la colágena tipo I, II, III, IV, V y XI. Para atravesar la membrana basal debe hidrolizarse la colágena tipo IV, VI, VIII y X. La degradación de la colágena tipo IV (la más abundante) es efectuada por dos colagenasas-gelatinasas específicas conocidas como gelatinasa A (MMP-2 ó MMP de 72-kDa) y Gelatinasa B (MMP-9 ó MMP de 92-kDa).¹⁸

1.3.2 Metaloproteinasas y cáncer colorrectal

Las primeras observaciones que sugirieron que las MMPs estaban incrementadas en los tumores colorrectales fueron las de Dresden y cols. (1972)¹⁹ quienes demostraron que fragmentos de tumores colónicos liberaban al medio de cultivo mayor cantidad de enzimas colagenolíticas que los fragmentos de intestino con mucosa normal. A partir de estas observaciones y con distintos enfoques experimentales se ha tratado de definir si la expresión de los genes que codifican a las MMPs, el nivel de la actividad colagenolítica o el nivel de los inhibidores podrían ser usados como indicadores de la evolución de la enfermedad, hasta ahora los resultados son contradictorios.

Más de una década después, Irimura y cols.²⁰ utilizando homogeneizados de tumor y de mucosa normal y sustratos sintéticos fluorescentes para determinar la actividad enzimática de la catepsina B, H y de la colagenasa demostraron un incremento estadísticamente significativo en los niveles de la catepsina B y de la colagenasa en los especímenes de carcinomas colorrectales en comparación con el colon normal. En el mismo estudio los autores observaron además, que no existía correlación entre la actividad colagenolítica total con el estadio de la enfermedad según la clasificación de Dukes, ni con el grado de diferenciación histológica del tumor. Otro grupo de investigadores utilizando métodos inmunohistoquímicos encontraron un mayor contenido de colagenasa a nivel de la mucosa en tumores del colon comparado con el de la mucosa normal del mismo paciente.²¹

Un estudio posterior en el cual se empleó colágena radioactiva tipo I y tipo IV como sustratos, demostró que tanto la mucosa normal como el tumor poseían y secretaban colagenasas tipo I y IV. No se observó una asociación entre la actividad de estas enzimas con el estadio clínico de la enfermedad de acuerdo con la clasificación de Dukes.²²

Re-examinando la relación entre la actividad colagenolítica que permite la degradación de la matriz extracelular local y el estadio de la enfermedad, otro grupo de investigadores determinaron la actividad enzimática usando un extracto membranal obtenido con urea a partir de tejido tumoral y de tejido normal del colon y como sustratos colágena radioactiva tipo I y tipo III, en forma soluble y en agregados fibrilares. En estas condiciones sí se observó una correlación significativa entre la actividad colagenolítica que permite la diseminación local con el grado de diferenciación histológica del tumor y con el estadio de la enfermedad.²³

Otro estudio señaló que las células cancerosas no son las que expresan a estas enzimas. Mediante técnicas de hibridación *in situ* se demostró que los genes que codifican a las colagenasas intersticiales en adenocarcinomas y adenomas de colon se expresan en los eosinófilos, los fibroblastos y el endotelio vascular pero no en las células cancerosas. Este trabajo demostró que la actividad colagenolítica del tejido intersticial está asociada con la diseminación del tumor.²⁴

Se ha estudiado y reportado la expresión del gene que codifica a la colagenasa A (MMP-2) y su relación con la invasividad de las células cancerosas del colon. El nivel del RNA mensajero (RNAm) de la colagenasa tipo IV del tejido canceroso fue mayor al del tejido normal adyacente en la mayoría de los especímenes de adenocarcinomas estudiados. Utilizando anticuerpos contra la colagenasa tipo IV se demostró que los fibroblastos y no las células neoplásicas expresaban esta proteína. La expresión de la proteína pero no de su RNAm, sí mostró una correlación estadísticamente significativa con la evolución de la enfermedad según los criterios de Dukes y se le propuso como marcador de la invasividad de los tumores colorrectales humanos.²⁵

Hewitt y cols.²⁶ han descartado la posibilidad de que la mayor actividad de las MMPs en los adenocarcinomas colorrectales se debiera a una disminución en el nivel de las proteínas inhibitoras específicas, su estudio indicó la presencia de los inhibidores y de la colagenasa en un nivel mucho mayor en el tejido conectivo estromal que el detectado en las células neoplásicas. Mediante técnicas de hibridación *in situ*, Poulson y cols.²⁷ determinaron la expresión de la colagenasa tipo IV y de TIMP2 y confirmaron las observaciones anteriores. Se demostró que el RNAm de MMP-2 y de TIMP-2 era mayor en las células mesenquimatosas del estroma desmoplásico que en las células neoplásicas. Liabakk y cols.²⁸ utilizando también hibridación *in situ* demostraron que el RNAm para las dos colagenasas tipo IV, la MMP-2 (72 kD) y la MMP-9 (92 kD) están presentes en los fibroblastos del estroma alrededor del tejido neoplásico invasor y no se identificaron en las células cancerosas.

Las observaciones anteriores fueron corroboradas en otro estudio por hibridación *in situ* y por técnicas de PCR identificando los genes que codifican para MMP-2 y MMP-9. La actividad colagenolítica de ambas enzimas fue determinada en geles de poliacrilamida polimerizados con colágena. La fuente enzimática la constituyeron cortes de 5 μ del tumor y del tejido normal solubilizados con SDS. En este mismo estudio se demostró que las células estromales producen estas enzimas y que los cambios en la composición del estroma en las diversas etapas del tumor podrían ser los responsables de las diferencias en la actividad de las enzimas. Los autores proponen que la relación entre las células cancerosas y el tejido intersticial es muy importante para la formación de metástasis.²⁹

La demostración de que las células del estroma más que las células cancerosas son responsables de la elevación en la producción de las enzimas relacionadas con la formación de metástasis ha llevado a diferentes autores a analizar los factores que regulan la relación entre estos dos tipos de células utilizando sistemas de co-cultivo y líneas celulares derivadas de tumores malignos de diverso origen. Utilizando sistemas de co-cultivos de células neoplásicas y de fibroblastos normales de colon humano en contacto y separadas por una membrana que sólo permite la difusión de sustancias solubles para simular el tipo de interacciones que estas células podrían tener en el tumor, se demostró que las células neoplásicas secretaban un factor que estimulaba la activación de la MMP-2 en los fibroblastos y que no se requería del contacto físico entre los dos tipos celulares.³⁰

La observación anterior es apoyada por resultados previos que señalan que los fibroblastos son activados a través de factores secretados por células neoplásicas de diferentes tumores. Por ejemplo, el factor extracelular estimulador de la actividad de las MMPs (EMMPRIN) previamente llamado factor estimulador de colagenasa derivado de células neoplásicas activa a MMP-2.³¹ También se ha demostrado que el factor transformante β (TGF β), el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y la interleucina 1(IL-1) inducen la expresión de los genes que codifican a las MMPs.³² Se ha reportado que la MMP-9 es inducida por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) e IL-1 α en fibroblastos de pulmón humano.³³ Otros autores reportaron que TNF α induce y estimula a la MMP-9 en líneas celulares de osteosarcoma y fibrosarcoma.³⁴ Otro mecanismo mediante el cual las células cancerosas modulan la actividad colagenolítica de los fibroblastos es el procesamiento de una proenzima.³⁵

1.3.3 MMPs y radioterapia.

Poco se conoce sobre la relación de las gelatinasas con la radioterapia. Observaciones in vitro con líneas celulares de ratón demuestran que la radiación ionizante induce la elevación de la actividad de la colagenasa tipo IV y sugieren que este aumento se debe a un incremento en el activador del plasminógeno, enzima que podría acelerar el procesamiento de la pro-MMP inactiva en la MMP activa.³⁶

Un estudio reciente ha demostrado que la radioterapia preoperatoria, utilizando una dosis total de 2500 cGy y administrada en 500 cGy/día, induce un aumento de dos a tres veces en los niveles de actividad de MMP-2 y en el nivel de pro-MMP-9 en los tumores malignos del recto. Las formas precursoras de MMP-9 y de MMP-2 de la mucosa normal no fueron afectadas por la radioterapia.³⁷

II. JUSTIFICACION

La mayor proporción de pacientes con cáncer de recto se diagnostican en una fase avanzada de la enfermedad. El tratamiento preoperatorio con RT reduce la frecuencia de recurrencia a nivel local además de permitir una cirugía preservadora del esfínter anal que mejora la calidad de vida de los pacientes ya que evita una colostomía definitiva. Además, el uso de la RT preoperatoria se ha asociado en algunos estudios con mejoría en la sobrevida. Se ha demostrado también que una respuesta histopatológica completa a la radioterapia preoperatoria se asocia a una excelente sobrevida a largo plazo. Existe sin embargo, un grupo de pacientes que no responden a la radiación preoperatoria o aún presentan progresión con el tratamiento neoadyuvante. La identificación temprana de los pacientes que no responderán favorablemente a la RT permitirá intentar oportunamente nuevos esquemas de tratamiento.

Las MMPs juegan un papel central en los procesos de invasión y metástasis ocasionando degradación de las membranas basales y de la matriz extracelular, además de participar directamente en la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) en el medio tumoral. Estudios recientes han asociado el nivel de MMP-2 y MMP-9 con la etapa clínica y el grado de diferenciación celular. Ahora, resulta muy importante conocer su papel como factor pronóstico de respuesta a tratamiento.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la asociación entre la actividad de MMP-2 y MMP-9 y la respuesta a la radioterapia preoperatorio en pacientes con adenocarcinomas de recto en etapas II y III?

IV. HIPOTESIS

La actividad de MMP-2 y MMP-9 se asocia a la respuesta a la radioterapia preoperatorio en pacientes con adenocarcinomas de recto en etapas II y III.

V. OBJETIVO

Determinar la asociación entre la actividad de MMP-2 y MMP-9 y la respuesta a radioterapia preoperatorio en pacientes con adenocarcinomas de recto en etapas II y III.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño del estudio

Estudio observacional, prospectivo, longitudinal y analítico.

6.2 Criterios de inclusión

Pacientes de cualquier sexo, mayores de 18 años, con tumores primarios de recto, en etapas clínicas II y III de la clasificación de AJCC por ultrasonido endorrectal, con histología de adenocarcinoma, candidatos a recibir tratamiento neo-adyuvante con radioterapia y resección quirúrgica con finalidad curativa, tratados en el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

6.3 Criterios de exclusión

Pacientes con cáncer hereditario, aquellos tratados previamente con quimioterapia o radioterapia y pacientes que no acepten tratamiento completo con radioterapia preoperatoria y cirugía.

6.4 Criterios de eliminación

Pacientes con muestras histológicas deficientes o insuficientes para determinar los niveles de MMPs y pacientes con tratamientos incompletos de radioterapia.

6.5 Variable independiente

VARIABLE: Actividad de MMP-2 y MMP-9

DEFINICION CENCEPTUAL: Capacidad funcional enzimática de MMP-2 y MMP-9 presente en el tumor primario rectal antes de iniciar el tratamiento con radioterapia preoperatoria.

DEFINICION OPERATIVA: Por medio de zimografía en geles se determina la positividad y por los bio-ensayos de actividad específica se mide en forma cuantitativa la actividad de MMP-2 y MMP-9 en muestras de tejido tumoral del recto obtenidas antes de iniciar el tratamiento con radiación.

ESCALA DE MEDICION: Cuantitativa.

CATEGORIA: De razón.

6.6 Variable dependiente

VARIABLE: Respuesta a la radioterapia preoperatoria

DEFINICION CONCEPTUAL: La respuesta a la radioterapia preoperatoria se mide en el espécimen quirúrgico. El patólogo establece microscópicamente la presencia o ausencia de células neoplásicas en el sitio del tumor primario. En caso de persistir el tumor identifica el grado de invasión a través de la pared rectal.

DEFINICION OPERATIVA: Se establecieron 3 grupos de acuerdo a la proporción de pared rectal con presencia de células neoplásicas residuales:

Grupo 1, espécimen negativo o focos microscópicos (buena respuesta = T0)

Grupo 2, tumor limitado a la pared rectal (respuesta parcial = T1-2)

Grupo 3, tumor que infiltra hasta la grasa perirrectal o estructuras adyacentes
(mala respuesta = T3-4).

ESCALA DE MEDICION: Cualitativa

CATEGORIA: Ordinal

6.7 Metodología

6.7.1 Estadificación clínica

La evaluación clínica consistió en una historia clínica con exploración física completa que incluyó una exploración rectal digital para evaluar las características del tumor incluyendo la localización, el tamaño, la consistencia y la movilidad o el grado de fijación a las estructuras adyacentes permitiendo realizar una estadificación clínica, que en cirujanos expertos tiene una alta sensibilidad. Se decidió en este momento si los pacientes eran candidatos a tratamiento neoadyuvante con radioterapia y fueron enviados a los servicios correspondientes para realizar los estudios de extensión necesarios, una radiografía de tórax, una tomografía axial computada abdomino-pelvica, un ultrasonido endorrectal y una colonoscopia.

6.7.2 Ultrasonido endorrectal (USER)

Todos los pacientes fueron sometidos a un ultrasonido endorrectal por un solo médico ultrasonografista experto, quien evaluó en detalle las paredes del recto y la profundidad de penetración del tumor. Se utilizó un equipo de ultrasonido HDI 3000 con un transductor endocavitario en-fire de banda ancha de 5-9 MHz.

6.7.3 Colonoscopia y obtención de la muestra

Todos los pacientes fueron sometidos a una colonoscopia completa como parte de su protocolo de estudio convencional para descartar lesiones sincrónicas en el resto del colon.

El colon debe ser bien preparado antes de realizar el procedimiento por medio de laxantes o enemas. Para el estudio se utilizó una preparación rápida que consiste en la ingesta de 3 ó 4 litros de una solución osmótica balanceada de electrolitos y polietilenglicol. Inmediatamente antes del procedimiento se administró de 2-4 mg de midazolam para sedar al paciente. El estudio es generalmente iniciado con el paciente en posición de decúbito lateral izquierdo, aunque puede ser cambiado durante el curso del procedimiento. La punta del instrumento es perfectamente lubricada y gentilmente introducida en el ano. Por una combinación de insuflación de aire y manipulación el colonoscopio es avanzado bajo visión directa hasta el ciego. Las biopsias de polipos, tumores o lesiones inflamatorias son tomadas conforme se va retirando el colonoscopio.

Para propósitos del proyecto de investigación se resecaron tres fragmentos del tumor rectal, para la confirmación histopatológica de la lesión y para la determinación de proteínas y de la actividad de las MMPs.

6.7.4 Manejo de la muestra

Inmediatamente después de la biopsia, un médico Patólogo corroboró que el tejido obtenido correspondiera a neoplasia realizando cortes en tejido congelado y tinción de hematoxilina y eosina. Se seleccionaron fragmentos representativos del tumor para los estudios bioquímicos. Los fragmentos seleccionados, se recibieron en una solución salina amortiguada estéril previamente enfriada a 4°C y se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -76°C.

6.7.5 Homogeneización del tejido congelado

Los fragmentos del tejido canceroso congelados se mantuvieron a -70°C utilizando hielo seco y fueron pulverizados utilizando un mortero y pistilo de porcelana previamente esterilizado, dando baños constantes con nitrógeno líquido. Se preparó un homogeneizado total al 10% utilizando un detergente no iónico Nonidet P-40, para solubilizar las MMPs unidas a la membrana. El homogeneizado se sometió a un proceso de sonicación a una frecuencia de 20 mA durante 20 segundos. Después se centrifugó a 13,000 revoluciones por minuto durante 60 minutos a una temperatura de 4°C, con el sobrenadante se formaron alícuotas de 50 y 100 µl para la determinación de las proteínas totales y la medición de la actividad enzimática de MMP-2 y MMP-9.

6.7.6 Determinación de proteínas totales

Se determinó la concentración de proteínas totales por medio del método de Hartree.³⁸ La alícuota del sobrenadante después de un tratamiento con detergente no iónico NP-40 y sonicación, se utilizó NaOH 0.5 N, Na₂CO₃ al 10% y tartrato doble de Na y K para hidrolizar las proteínas y obtener aminoácidos libres, predominantemente los aminoácidos con radicales aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptofano), los cuales forman un complejo con el CuSO₄ que fueron después teñidos con el reactivo de Folin-Ciocalteu y detectados en absorción de luz a 730 nm y comparados con una curva estándar de proteínas efectuada con albúmina bovina.

6.8 Zimogramas

6.8.1 Preparación de los geles de poliacrilamida

Para la elaboración de los zimogramas preparamos inicialmente un gel de poliacrilamida al 10%. La poliacrilamida es el producto de la polimerización de la acrilamida y la N,N'-metileno bisacrilamida. Los geles se prepararon mediante la mezcla de una solución de acrilamida y N,N'-metileno bisacrilamida 30:8% con una solución amortiguadora (TRIS 1.5 M, pH 8.8), un agente solubilizante (dodecil

sulfato de sodio, SDS), un sistema catalizador (persulfato de amonio, APS) y gelatina pura, esta última es el sustrato de degradación de las MMPs.

6.8.2 Electroforesis

La separación de las proteínas se realizó por medio de electroforesis en los geles de poliacrilamida al 10%, cada carril del gel se cargó con 80 μg de proteínas de la muestra. Para identificar el peso molecular de las proteínas separadas se usó una solución estándar de pesos moleculares en el primer carril de cada gel. Los geles se corrieron a temperatura ambiente a 62v para concentrar las muestras, lo cual se logró aproximadamente en 2 horas, después la cámara con los geles se pasó al cuarto frío (4°C), el voltaje se disminuyó a 48v y se mantuvo la electroforesis por 14 horas más permitiendo una buena separación de las proteínas.³⁹

Una vez terminada la electroforesis se midió la distancia de la corrida (Rf), desde donde inicia el gel al 10% hasta donde se encuentra la marca del colorante. De la misma forma se midió la distancia de los pesos moleculares de la solución estándar. Con estos datos se grafica una curva estándar de pesos moleculares contra el Rf.

6.8.3 Incubación y revelado de los geles

El SDS fue eliminado por incubación con Triton X-100 al 2.5% durante 30 minutos, posteriormente los geles fueron incubados a 37°C por 4 horas usando una solución constituida por Tris 50 mM, pH 7.6, NaCl 0.2 M, CaCl₂ 5 mM, Brij-35 al 0.02% y ZnCl 1 μM. Después, los geles fueron teñidos usando azul brillante de Coomassie G-250. La actividad de gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 fue identificada por la degradación de la gelatina del gel en la posición correspondiente a las proteínas de 92, 82, 72 y 62 kD.

6.9 Bio-ensayos de actividad de MMP-2 y MMP-9

El sistema de bio-ensayo de actividad Bio-track™ específico para MMP-2 y MMP-9, proporciona una determinación cuantitativa de la proteína en su forma latente y total. El sistema emplea una placa de 96 pozos recubiertos por anti-MMP específica. Se colocaron 80 μl del blanco, el estándar y la muestra problema en cada pozo y se incubó durante toda la noche a 4°C. La proteína específica se fija a la superficie del pozo y los componentes restantes fueron removidos por medio de lavado con agua en tres ocasiones. Se realizó la activación con APMA (acetato de p-aminofenilmercurio) y se incubó por 90 minutos a 37°C. Luego, se agregó la enzima de detección que consistió en una solución de urokinasa modificada en un buffer Tris HCl 50mM pH 7.6. Se realizaron las mediciones a 405 nm, inmediatamente y después de incubar la placa por 60 y 90 minutos para MMP-9 y

MMP-2, respectivamente obteniendo la actividad correspondiente a la forma inactiva y a la forma total de la proteína.^{40,41}

6.10 Radioterapia

Los pacientes recibieron una dosis total de 4500 cGy administrados en 25 fracciones (180 cGy diarios) con un acelerador lineal de 8 MV. La radiación incluyó dos campos paralelos opuestos, anterior y posterior. El margen superior se localizó en un punto medio del cuerpo de la quinta vertebra lumbar y el margen inferior en un punto imaginario localizado a 2 cm. por abajo del margen anal, los márgenes laterales se marcaron a 1 cm. lateral a cada lado de la cara medial del iliaco, estos limites fueron seleccionados y marcados en una radiografía de la pelvis. Con este esquema se intenta proporcionar una dosis alta al tumor mientras se evita la irradiación a estructuras vecinas normales.

6.11 Cirugía

Los procedimientos quirúrgicos para el cáncer de recto pueden ser divididos en resecciones locales y resecciones radicales. Los procedimientos locales son utilizados en lesiones incipientes. Para el tratamiento de lesiones avanzadas como las incluidas en este estudio es necesario realizar cirugías radicales, las cuales pueden ser divididas en resecciones con estoma permanente (resección abdomino-perineal y procedimiento de Hartmann) y resecciones con conservación del esfínter anal (resección anterior baja y resección completa del recto con colo-

ano-anastomosis). La resección abdomino-perineal remueve completamente el recto, el canal anal y sus esfínteres, porciones considerables del músculo elevador del ano, la grasa isquiorrectal, prácticamente todo el colon sigmoides y el mesocolon incluyendo los vasos mesentéricos inferiores y hemorroidales superiores y una porción del peritoneo pélvico adyacente al recto. El procedimiento de Hartmann inicia como la porción abdominal de la resección abdomino-perineal, sin embargo la resección rectal termina en un punto localizado a 1-3 cm. del margen distal del tumor, el cual es suturado o engrapado y se realiza una colostomia definitiva. En la resección anterior baja la movilización del recto y estructuras adyacentes es idéntica al procedimiento de Hartmann, pero el procedimiento implica una anastomosis entre el segmento colónico distal y la porción de recto residual. En la resección completa del recto con conservación del esfínter anal el corte distal de la pieza quirúrgica se realiza justo arriba del nivel del anillo ano-rectal y la mucosa anal es anastomosada al segmento distal del colon, generalmente con un reservorio colónico de 6-8 cm.⁴²

Todos los procedimientos quirúrgicos realizados incluyeron la escisión del mesorrecto. El tipo de procedimiento fue variable de acuerdo al sitio del tumor primario a criterio del cirujano durante la cirugía.

6.12 Medición de la respuesta histopatológica en la pieza quirúrgica

La primera evaluación del espécimen quirúrgico consiste en la inspección de la superficie mesorrectal que indica la calidad de la cirugía. Después de la inspección

y documentación fotográfica del espécimen el recto es abierto en su cara anterior hasta 2 cm. por arriba y debajo del tumor. El tamaño del tumor y los márgenes proximal, distal y circunferencial son medidos. Los ganglios linfáticos son identificados y aislados de la grasa perirrectal usando una combinación de inspección visual, palpación y disección. Los ganglios linfáticos son examinados microscópicamente usando tinción de hematoxilina y eosina, generalmente un corte de cada bloque tisular. El espécimen debe ser fijado por al menos 48 horas, después de este tiempo las superficies no peritonizadas son marcadas con tinta. El área del tumor, la cual no fue abierta es seccionada transversalmente en cortes delgados, entre 0.3 y 0.5 cm. Los cortes transversales son empleados para evaluar microscópicamente la profundidad del tumor en la pared rectal y el margen circunferencial. El margen distal es examinado rutinariamente y el margen proximal solo si el tumor se encuentra cercano en la inspección macroscópica. Debe además evaluarse el grado de diferenciación celular y el tipo histológico del tumor de acuerdo a la clasificación histológica internacionalmente aceptada de carcinomas colorrectales de la Organización Mundial de Salud.⁴³

6.13 Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las características generales del grupo y de las variables de interés de los tres subgrupos de pacientes. Se aplicaron pruebas de normalidad a los tres subgrupos. Las diferencias entre los grupos fueron calculadas usando la prueba de chi-cuadrada para k muestras, la prueba de Kruskal-Wallis o ANOVA de 1 factor de acuerdo al tipo y distribución de las

variables. Para evaluar las diferencias en los niveles de actividad de las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) se uso la prueba de ANOVA o la prueba de Kruskal-Wallis de acuerdo a la distribución de los datos. La correlación entre el nivel de actividad de las gelatinasas y el grado de respuesta a la radioterapia preoperatoria se realizó usando la prueba de Spearman. Un valor de p menor de 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

6.14 Tamaño de la muestra

Considerando: α bilateral = 0.05
 β = 0.20
 r = 0.80

para establecer la correlación entre el nivel de actividad de las gelatinasas y el grado de respuesta a la radioterapia preoperatorio se necesitaban 9 pacientes por grupo: un total de 27 pacientes.⁴⁴

6.15 Consideraciones éticas

De acuerdo a lo que norman la ley general de salud y la declaración de Helsinki, se solicitó autorización al comité local de investigación del hospital siendo aceptado, folio 13H001. Se solicitó consentimiento informado a todos los pacientes incluidos en el estudio.

6.16 Financiamiento

Se emplearon recursos propios de la unidad en el tratamiento de los pacientes en el hospital de oncología del centro médico nacional siglo XXI. En el laboratorio de bioquímica de la unidad de investigación médica en enfermedades oncológicas del mismo hospital se cuenta con el equipo necesario para el fraccionamiento de las muestras y para su separación por electroforesis.

Se contó con un financiamiento por parte del I.M.S.S. de 75,000.00 con el cual se adquirió el material de laboratorio y los reactivos necesarios para la realización del estudio.

6.17 Recursos humanos

Los autores del estudio y colaboradores, médicos del servicio de colon y recto, de colonoscopías, de radioterapia y de la unidad de investigación en enfermedades oncológicas del hospital de oncología del centro médico nacional siglo XXI.

Colaboradores:

Dr. Saúl Enrique Rodríguez Ramírez (Servicio de colon y recto)

Dr. Javier Herrera Torres (Servicio de colonoscopias)

Dra. Alma Delia Díaz Popoca (Servicio de radiodiagnóstico)

Dr. Antonio Polanco Saldívar (Residente de cirugía oncológica)

VII. RESULTADOS

7.1 Características generales de los pacientes

Fueron incluidos 27 pacientes, 12 mujeres y 15 hombres, los cuales tuvieron un promedio de edad de 57.37 ± 11.79 años. La edad promedio de los pacientes fue de 55.11 ± 13.11 años en el subgrupo 1, de 57.44 ± 9.07 años en el subgrupo 2 y de 59.55 ± 13.66 años en el subgrupo 3. La distancia media del borde distal del tumor a la margen del ano fue de 4.07 ± 2.58 cm. en el grupo total de pacientes, siendo de 4.1 ± 3.4 cm. en el subgrupo 1, de 3.8 ± 1.61 cm. en los del subgrupo 2 y de 4.2 ± 2.7 cm. en los del subgrupo 3. La mayoría de los tumores fueron moderadamente diferenciados, 26 de los 29 tumores fueron clasificados en esa categoría; solo dos tumores del grupo 1 y uno del grupo 2 fueron tumores bien diferenciados. La hemorragia fue el dato clínico más importante presentándose en 21 pacientes; fue observado en 8 pacientes del subgrupo 1, en 7 del subgrupo 2 y en 6 del subgrupo 3. No se obtuvieron diferencias significativas entre los tres grupos respecto a la edad ($p=0.72$), el género ($p=0.63$), el grado histológico ($p=0.325$), la localización ($p=0.96$) y la presentación clínica ($p=0.52$).

Características generales de los pacientes

	No.	%
Número de pacientes	27	100
Edad (años)	57 (34-82)	
Género		
Hombre	15	56
Mujer	12	44
Grado histológico		
G1	3	11
G2	24	89
Distancia del margen anal (cm)	4.07 (0-10)	
Presentación clínica		
Obstrucción	6	22
Sangrado	21	78

Características generales de los pacientes por subgrupo

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	<i>p</i>
Número de pacientes	9	9	9	
Edad (años)	55	57	59	.724
Género (hombre/mujer)	4/5	5/4	6/3	.352
Grado histopatológico				
G1	2	1	0	
G2	7	8	9	.325
Distancia del margen anal (cm)	4.1	3.8	4.2	.964
Presentación clínica				
Obstrucción	1	2	3	
Sangrado	8	7	6	.266

7.2 Proteínas totales

La muestra para obtener el tejido tumoral para los estudios bioquímicos fue obtenida por medio de biopsia durante la colonoscopia. Los fragmentos representativos del tumor se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -76°C . Una vez que se tenía un número suficiente de muestras (más de 20), se realizó el homogeneizado y se formaron alícuotas de 50 y 100 μl . Inmediatamente después se determinó la concentración de proteínas totales por medio del método de Hartree, obteniendo los siguientes valores:

MMP	Concentración de proteínas (μg proteína/0.1 ml)
MMP-3	239.02
MMP-5	389.38
MMP-7	166.06
MMP-8	127.18
MMP-9	132.38
MMP-16	177.24
MMP-17	143.48
MMP-19	208.18
MMP-20	111.12
MMP-23	433.40
MMP-25	213.82
MMP-28	173.24
MMP-31	214.34
MMP-40	309.46
MMP-41	723.90
MMP-42	450.30
MMP-44	167.52
MMP-51	400.40
MMP-53	125.44
MMP-57	487.30
MMP-65	486.92
MMP-67	201.46
MMP-68	249.52
MMP-69	239.08
MMP-72	221.20
MMP-73	264.24
MMP-74	406.20

7.3 Actividad de las MMPs en el zimograma

Utilizamos la zimografía en geles para evaluar la positividad de los tumores a MMP-2 y MMP-9. Todos los tumores mostraron actividad de la MMP-9 y la mayoría de ellos lo hicieron para la MMP-2. Sin embargo consideramos que es muy difícil y hasta cierto punto subjetivo hacer la distinción entre los pesos moleculares de 92 y 82 kDa y de 72 y 62 kDa, que representan las formas inactiva y activa para la MMP-9 y la MMP-2, respectivamente, además de que no consideramos una medición precisa por el analizador de imágenes debido a la subjetividad al seleccionar el área de degradación.

Resultados del zimograma de los pacientes del subgrupo de buena respuesta a la radioterapia

MMP	Peso molecular de las bandas de degradación (KDa)											
	190	170	140	120	110	92	84	78	68	62	50	35
MMP-3	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg
MMP-5	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
MMP-23	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos
MMP-31	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg
MMP-41	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg
MMP-51	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg
MMP-65	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg
MMP-69	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg
MMP-74	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg

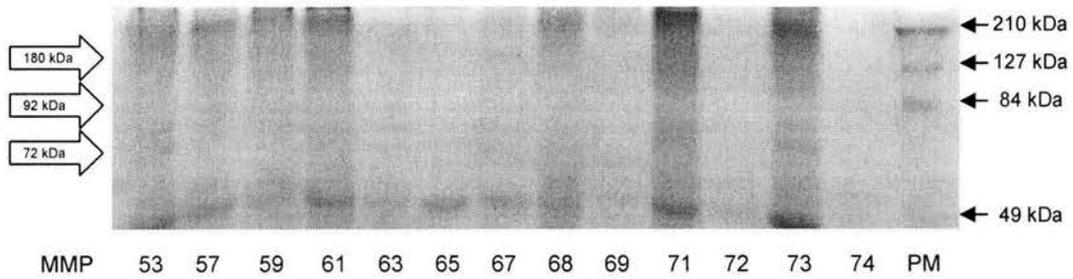
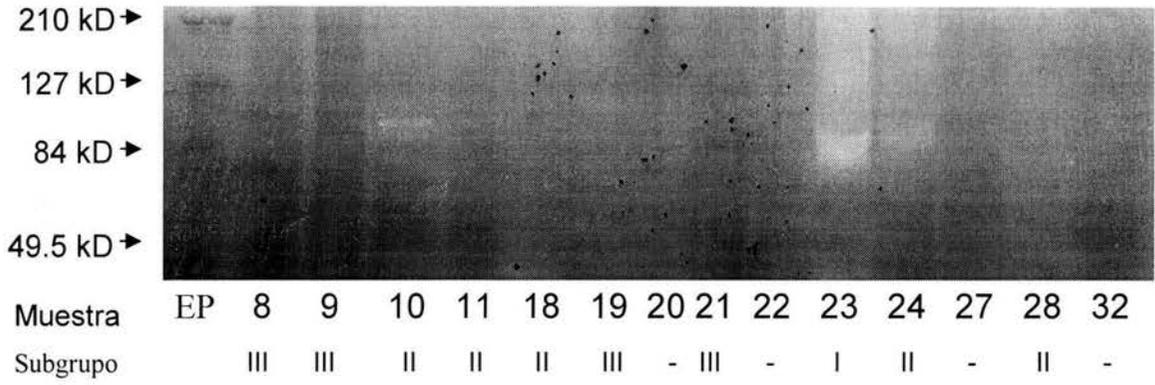
Resultados del zimograma de los pacientes del subgrupo de respuesta parcial a la radioterapia

MMP	Peso molecular de las bandas de degradación (KDa)											
	190	170	140	120	110	92	84	78	68	62	50	35
MMP-16	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos
MMP-17	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos
MMP-19	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg
MMP-25	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg
MMP-28	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg
MMP-44	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos
MMP-67	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg
MMP-68	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg
MMP-73	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

Resultados del zimograma de los pacientes del subgrupo de mala respuesta a la radioterapia

MMP	Peso molecular de las bandas de degradación (KDa)											
	190	170	140	120	110	92	84	78	68	62	50	35
MMP-7	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg
MMP-8	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos
MMP-9	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg
MMP-20	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos
MMP-40	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg
MMP-42	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg
MMP-53	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos
MMP-57	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg
MMP-72	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg

Zimogramas



7.3 Actividad de las gelatinasas en los bio-ensayos de actividad (Bio-traks)

MMP-9 Total. El nivel de actividad de MMP-9 total en el grupo 1 fue de 440.91 ± 278.31 ng/mg de proteína (IC 95%, 226.98-654.84), en el grupo 2 de 237.91 ± 167.29 ng/mg de proteína (IC95%, 109.31-366.51) y en el grupo 3 de 145.28 ± 144.77 ng/mg de proteína (IC 95%, 34.00-256.57).

Pro-MMP-9. En la mayoría de las muestras no se detectó actividad de la pro-MMP-9 o esta fue < 0.5 ng/mg de proteína.

MMP-2 Total. La actividad de MMP-2 total en el grupo uno fue de 365.54 ± 309 ng/mg de proteína (IC 95%, 127.37-603.06), en el grupo 2 de 225.06 ± 162.09 ng/mg de proteína (IC 95%, 100.46-349.66) y en el grupo 3 de 184.61 ± 168.73 ng/mg de proteína (IC 95%, 54.9-314.31).

Pro-MMP-2. El nivel de actividad de la pro-MMP-2 en el grupo 1 fue de 176.34 ± 194.68 ng/mg de proteína (IC 95%, 26.69-325.98), en el grupo 2 de 53.13 ± 75.57 ng/mg de proteína (IC 95%, -4.9-111.22) y en el grupo 3, 204.61 ± 153.48 ng/mg de proteína (IC 95%, 86.63-322.58).

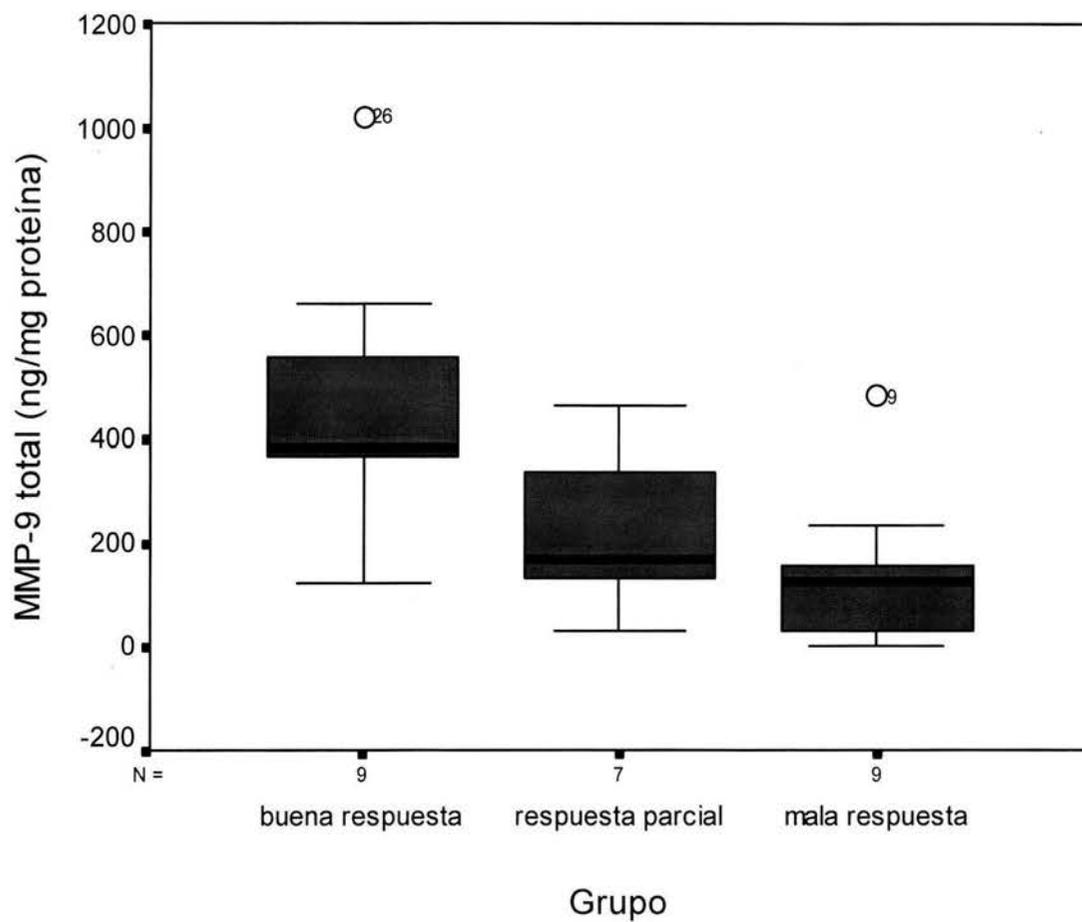
7.5 Correlación entre la actividad de las gelatinasas y la respuesta histopatológica a la radioterapia en la pieza quirúrgica

Se observó una asociación estadísticamente significativa entre el nivel de actividad de la MMP-9 y la respuesta a la RT preoperatoria. Los tres subgrupos mostraron niveles de actividad significativamente diferentes ($p=0.03$), siendo progresivamente mayor al aumentar el grado de respuesta a la RT. La diferencia más importante en la actividad de MMP-9 total se obtuvo al comparar los grupo de buena y mala respuesta a la RT ($p=0.01$). La actividad de pro-MMP-2 y MMP-2 total no tuvo asociación con la respuesta a la RT. La prueba de Spearman demostró una correlación significativa entre el nivel de actividad de la MM-P total y la respuesta histopatológica en el espécimen quirúrgico ($p=0.01$).

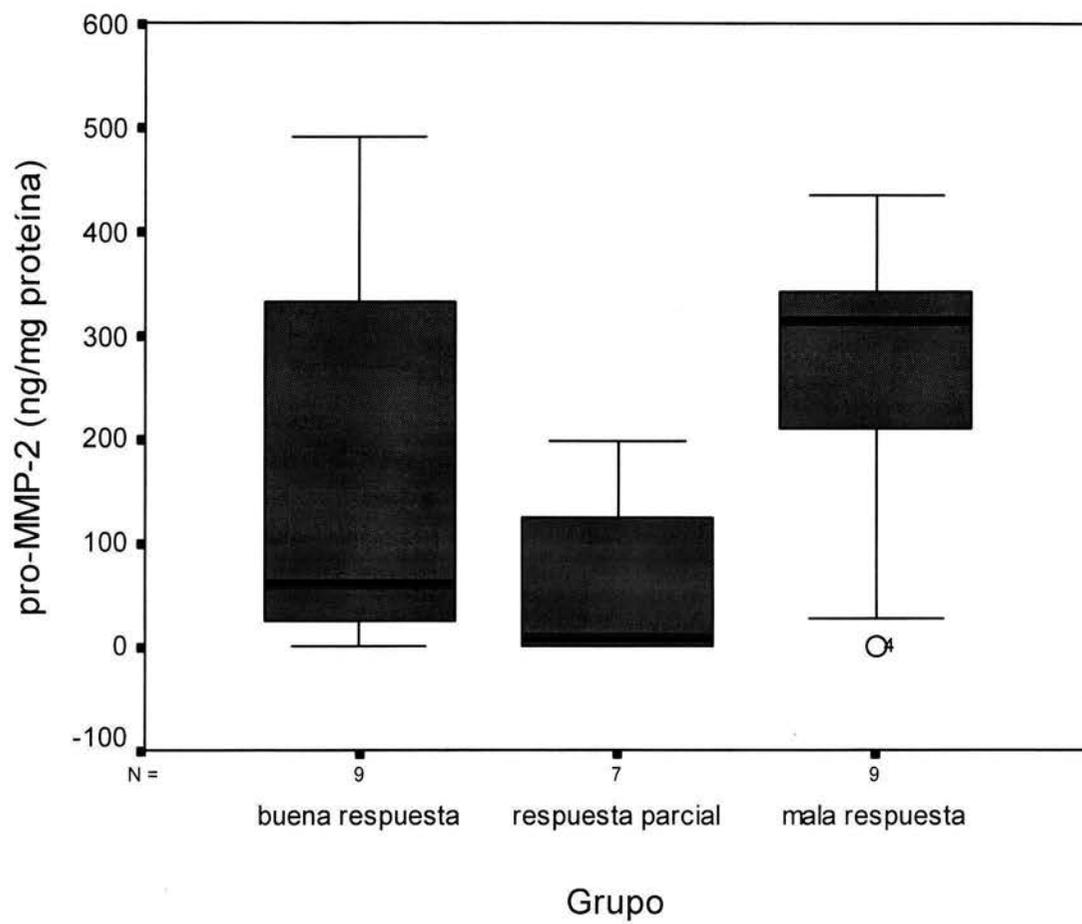
Niveles de actividad de las gelatinasas (ng/mg protein)

	Subgrupo	Subgrupo	Subgrupo	Grupo	
	1	2	3	total	p
Pro-MMP-2	17.63	5.31	20.46	14.46	0.08
MMP-2 total	36.54	22.50	18.46	25.84	0.29
Pro-MMP-9	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	
MMP-9 total	44.09	23.79	14.52	27.47	0.03

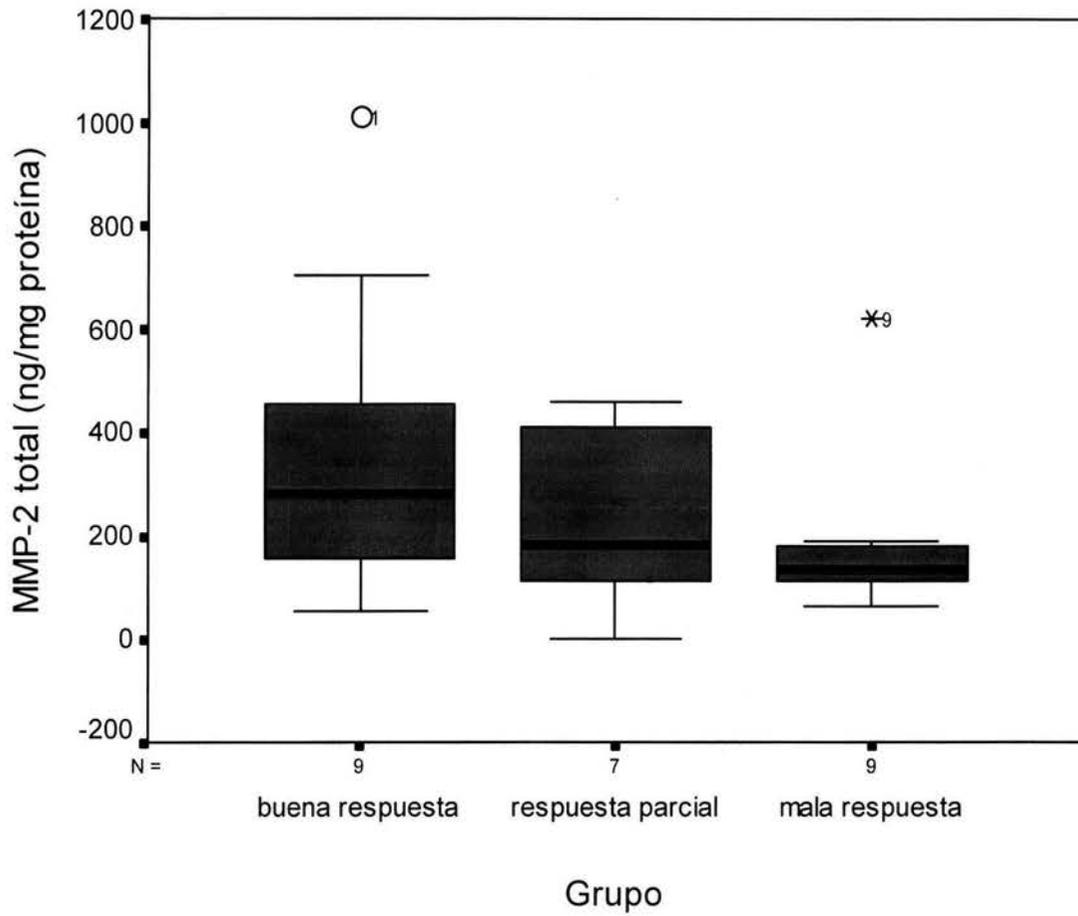
Niveles de actividad de MMP-9 total



Niveles de actividad de pro-MMP-2



Niveles de actividad de MMP-2 total



VIII. DISCUSIÓN

El cáncer de recto es una de las neoplasias malignas en la cual ha sido posible demostrar el beneficio del tratamiento multidisciplinario, los beneficios obtenidos con el uso de la radioterapia preoperatoria están ahora plenamente demostrados. Las indicaciones primarias para el empleo de la radioterapia es la prevención de la recurrencia local y el intento de mejorar la supervivencia a largo plazo. Una segunda indicación para el uso de la radioterapia preoperatoria es producir un "descenso en la etapa" del tumor facilitando la resección quirúrgica e incrementar la seguridad de un procedimiento preservador del esfínter anal.⁸

La eficacia de la radioterapia es limitada en casos de tumores voluminosos debido a que solo una proporción limitada de células es destruida por cada fracción de radioterapia. Se necesitan dosis elevadas de radiación a fin de reducir el número de células en tumores grandes.⁴⁵ Nuestros pacientes recibieron un esquema convencional completo de radioterapia, 4,500 cGy en 25 fracciones administrados en 5 semanas y fueron operados al menos 5 semanas después de la última fracción de radioterapia; los pacientes recibieron todos los potenciales beneficios de la radiación.

Estudios recientes han reportado una respuesta clínica completa en 30-60% de los pacientes⁴⁶⁻⁴⁷ y una respuesta patológica completa en 3-30% de los casos.⁴⁸⁻⁵¹ Sin embargo, estos alentadores resultados ocurren en un grupo selecto de pacientes. Una gran proporción de los pacientes sufren los efectos tóxicos de la radiación sin

un beneficio real y peor aún, algunos pueden resultar afectados adversamente debido al retraso en el tratamiento quirúrgico o un tratamiento sistémico efectivo.

Actualmente una parte importante de la investigación en Oncología esta dirigida a la identificación de factores pronósticos bio-moleculares que permitan la selección temprana de los pacientes que se benefician de las terapias neo-adyuvantes, de la radioterapia preoperatoria en el caso del cáncer de recto. Hasta ahora se ha reportado que la expresión de p21,⁵² la expresión de Ki-67⁵³ y la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico⁵⁴ se asocian con la respuesta a la radioterapia preoperatoria. Estos resultados derivan de estudios iniciales realizados en forma retrospectiva por lo que su valor en la clínica no ha sido considerado en forma definitiva.

Las MMPs son una familia de enzimas proteolíticas dependientes de zinc que degradan los componentes de las membranas basales y de la matriz extracelular. Son muy importantes en muchos aspectos de la biología tumoral incluyendo la proliferación celular, la diferenciación celular, la remodelación de la matriz extracelular, la vascularización de los tumores (angiogénesis) y la migración celular. Estos eventos ocurren algunas veces durante la organogénesis en el desarrollo normal del organismo y durante la progresión de los tumores.⁵⁵

Las MMPs fueron originalmente implicadas en la invasión y metástasis durante la progresión tumoral, sin embargo estudios recientes han demostrado un amplio papel de las MMPs en múltiples etapas durante la progresión tumoral incluyendo

funciones como el crecimiento celular, la angiogenesis y la migración celular.⁵⁶ Las MMPs pueden ser divididas en cinco tipos de acuerdo al sustrato específico: gelatinasas, colagenasas, estromelisin, MMPs de tipo membrana y recientes MMPs no tipificadas. Las MMPs más extensamente estudiadas en cáncer colorrectal son las gelatinasas, la gelatinasa A (MMP-2 ó MMP de 72 kDa) y la gelatinasa B (MMP-9 ó MMP de 92 kDa), las cuales son capaces de degradar la colágena desnaturalizada o la gelatina de la membrana basal.⁵⁷

La actividad colagenolítica de los tumores colorrectales fue observada primero por Dresden y cols.,¹⁹ quienes reportaron una actividad colagenolítica incrementada en cultivos celulares de tumores colorrectales comparado con la mucosa intestinal normal en el mismo paciente. Varios años después, Irimura y cols.²⁰ usando homogenizados de tumores y sustratos sintéticos fluorescentes identificaron un incremento en los niveles de B-catepsina y colagenasa en tumores colorrectales respecto al intestino normal. La presencia de MMP-2 y MMP-9 ha sido demostrada en tumores colorrectales empleando diferentes métodos incluyendo inmunohistoquímica,²¹ técnicas radioactivas,^{22,23} hibridación *in-situ*,^{24,28} reacción en cadena de la polimerasa,²⁹ análisis de actividad fluorométricos⁵⁸ y ELISA.⁵⁹⁻⁶¹ Como consecuencia de los resultados de estos estudios y con diferentes enfoques experimentales se ha intentado probar que la expresión genética de las MMPs, la relación entre las MMPs y los inhibidores tisulares de las MMPs (TIMP) o los niveles de actividad colagenolítica pueden ser empleados como indicadores de la evolución de los tumores, los resultados hasta la actualidad no son concluyentes.

El método más común para la determinación de la actividad de las MMPs en tejidos tumorales es la zimografía en geles. Sin embargo, recientemente han sido desarrollados los bio-ensayos específicos de actividad de las MMPs, por medio de los cuales es posible medir en forma directa y cuantitativa los niveles enzimáticos endógenos y totales de MMP-2 y MMP-9. Se han reportado discrepancias en la determinación de la actividad entre el zimograma y los bio-ensayos de actividad. Al parecer el zimograma produce una determinación más subjetiva debido a que involucra un área determinada en los geles marcada por el investigador, además la zimografía en geles no permite distinguir entre las formas libres y los complejos gelatinasa-TIMP, el proceso electroforético puede causar disociación de los complejos MMP-TIMP resultando en niveles incrementados de la MMP y la presencia de bandas líticas falsos positivos o mal definidas.⁵⁷ Para nuestro estudio decidimos emplear inicialmente el zimograma para determinar la positividad de la actividad colagenolítica de los tumores y los bio-ensayos de actividad específicos para MMP-2 y MMP-9 para hacer la medición cuantitativa para el análisis estadístico.

Los niveles de actividad de MMP-9 total en nuestros pacientes son similares a los reportados por Baker y Leaper⁵⁷ en tumores colorrectales en etapas B y C de la clasificación de Dukes. Dichos autores reportaron niveles de actividad de 14.7 y 22.3 ng/mg de proteína en etapas B y C, respectivamente. El promedio del nivel de actividad de los tumores de nuestros pacientes, que corresponden específicamente a las mismas etapas fue de 27.06 ng/mg de proteína.

Nuestros resultados demuestran una correlación significativa entre la actividad de la MMP-9 total y la respuesta a la radioterapia preoperatoria. Aunque el mecanismo molecular y de interacción celular de las MMPs en la invasión tumoral y metástasis es complejo y no completamente conocido, existe cada vez mayor evidencia que sugiere un papel crucial de las MMPs en el proceso de angiogénesis tumoral indicando una ruta complementaria por medio de la cual las gelatinasas interactúan en el crecimiento y el comportamiento de las células neoplásicas.⁶² La angiogénesis es necesaria para mantener un crecimiento tumoral persistente debido a que los capilares reclutados son conductos para el intercambio de gases y el aporte de nutrientes.⁶³ Qiu y cols.⁵² reportaron una asociación entre una mayor recurrencia del cáncer rectal tratado con radioterapia y cirugía con una menor respuesta a la radiación y una menor cuenta de microvasos sanguíneos. Utilizando un bio-ensayo de angiogénesis *in vivo*, Johnson y cols.⁶⁴ observaron que las células endoteliales que responden a factores de angiogénesis, al factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y en un medio condicionado con adipocitos fueron bloqueadas por un inhibidor de la actividad de las MMPs, el TIMP-1. Además, Vu y cols.⁶⁵ observaron que ratones homocigotos con una mutación en el gen que codifica a la MMP-9 presentaron un patrón anormal en la vascularización y osificación en los centros de crecimiento esquelético; la apoptosis, la vascularización y la osificación resultaron retardados con un acortamiento progresivo de los centros de crecimiento de cerca de ocho veces y el trasplante de médula ósea de tipo salvaje rescató la vascularización y la osificación indicando que estos procesos son mediados por células originadas en la médula ósea que expresan MMP-9. Un estudio reciente ha demostrado que

el “switch” de la quiescencia vascular a la angiogénesis involucra a la MMP-9, la cual es regulada en las isletas vasculares y los tumores por medio de la liberación del factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGF-A) de un reservorio extracelular.⁶⁶

Por otra parte, la relación entre la angiogénesis y la actividad colagenolítica ha sido reportada en algunos estudios. Ribatti y cols.⁶⁷ demostraron que la angiogénesis y la expresión de RNA mensajero de MMP-2 y MMP-9 ocurren simultáneamente en la progresión tumoral del neuroblastoma humano. Park y cols.⁶⁸ observaron una relación significativa entre la expresión del VEGF y la expresión de la MMP-9 en células neoplásicas de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Además, está bien establecido que el regulador más importante del efecto biológico de las radiaciones ionizantes es el oxígeno molecular. Existe evidencia contundente de la correlación entre la oxigenación y vascularidad de los tumores y la sensibilidad de estos a la radioterapia, entre mayor oxigenación de la neoplasia existe un mayor índice de respuesta objetiva a la radiación.^{69,70}

En base a los estudios comentados, consideramos que los tumores rectales con una mayor actividad de MMP-9 están mejor vascularizados y por lo tanto tendrán una mayor susceptibilidad a los efectos de la radiación, son entonces este grupo de tumores los que presentaran una respuesta completa o casi completa en el estudio histopatológico del espécimen quirúrgico y una evolución clínica favorable.

Nuestro estudio presenta la primera evidencia de la correlación entre la actividad de la MMP-9 y el grado de regresión con la radioterapia preoperatoria. La determinación de la actividad de la MMP-9 podría en un futuro ser utilizada en la práctica clínica como marcador predictor de la respuesta a la radioterapia en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado (etapas II y III).

IX. CONCLUSIONES

La actividad de la MMP-9 se asocia al grado de respuesta a la radioterapia preoperatoria en pacientes con adenocarcinomas de recto en etapas II y III.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Compendio del Registro Histopatológico de Neoplasias en México. Dir. Gral. de Epidemiología, Secretaria de Salud. Primera edición.
2. Rodríguez-Cuevas S, Labastida Almendro S, Tapia Conyer R, Kuri Morales P, Macias Martinez CG. Registro Histopatológico de Neoplasias en México, Población derechohabiente del IMSS 1993-1996. Ciencia y Cultura Latinoamericana. Primera edición 1999
3. De Vita VC, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer Principles and practice of Oncology. 5th edition. Lippincott-Raven 1997
4. Schwartz SI, Ellis H. Maingot's abdominal operations. Ninth edition. Appleton and Lange 1990
5. AJCC Staging Manual 6th edition; Philadelphia: Lippincott-Raven 1999
6. Glaser F, Schlag P, Herfarth Ch. Endorectal ultrasonography for the assessment of invasion of rectal tumours and lymph node involvement. Br J Surg 1990;77:883-887
7. Beynon J, Mortensen NJM, Foy DMA, Channer JL, Virjee J, Goddard P. Br J Surg 1986;73:1015-1017
8. Van Cutsem E, Dicato M, Wils J. Recent advances in the management of colorectal cancer. Eur J Cancer 2001;37:2302-2309
9. Luna-Perez P, Trejo-Valdivia B, Labastida S, García-Alvarado S, Rodriguez DF, Delgado S. Prognostic factors in patients with locally advanced rectal adenocarcinoma treated with preoperative radiotherapy and surgery. World J Surg 1999;23(10):1069-1074

10. Marsh PJ, James RD, Schofield PF. Adjuvant preoperative radiotherapy for locally advanced rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1994;37:1205-1214
11. Janjan NA, Khoo VS, Abbruzzese J, Pazdur R, Dubrow R, Cleary KR, Allen PK, Lynch PM, Guber G, Wolff R, Rich TA, Skibber J. Tumor downstaging and sphincter preservation with preoperative chemoradiation in locally advanced rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;44:1027-1038
12. Minsky BD, Cohen AM, Enker WE, Saltz L, Guillem JG, Paty PB, Kelsen DP, Kemeny N, Ilson D, Conti J. Preoperative 5-FU, low-dose leucovorin, and radiation therapy for locally advanced and unresectable rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;37:289-295
13. Swedish Rectal Cancer Trial. Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. *N Engl J Med* 1997;336:980
14. Luna PP, Rodriguez RS, Gonzalez MJ, Rodriguez CDF, Delgado S, Lopez MJ. The influence of preoperative radiation therapy on the patterns of recurrence in rectal adenocarcinoma. *Sem Surg Oncol* 1997;17:199-205
15. Parsons SL, Watson SA, Brown PD, Collins HM, Steele RJC. Matrix metalloproteinases. *Br J Surg* 1997;84:160-166.
16. Woessner JF. The family of matrix metalloproteinases. *Ann NY Acad Sci* 1994; 732: 1-9
17. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(17):1260-1270.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

18. MacDougall JR, Matrisian LM. Contribution of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis. *Cancer metastasis Rev* 1995;14:351-362
19. Dresden MH, Heilman SA, Schmidt JD. Collagenolytic enzymes in human neoplasms. *Cancer Res* 1972;32:993-996
20. Irimura T, Yamori T, Bennett SC, Ota DM, Cleary KR. The relationship of collagenolytic activity to stage of human colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 1987;40:24-31
21. Durdley P, Cooper JC, Switala S, King RFGJ, Williams NS. The role of peptidases in cancer of the rectum and sigmoid colon. *Br J Surg* 1985;72:378-381
22. Horowitz IK, Wellisch G, Levy N, Cohen E. Collagenase activity in colonic mucosa during inflammatory bowel disease. *Clin Biochem* 1987;20:79-80
23. van der Stappen JWJ, Hendriks T, Wobbes T. Correlation between collagenolytic activity and grade of histological differentiation in colorectal tumors. *Int J Cancer* 1990;45:1071-1078.
24. Gray ST, Yun K, Motoori T, Kuys YM. Interstitial collagenase gene expression in colonic neoplasia. *Am J Pathol* 1993;143:663-671
25. Levy AT, Cioce V, Sobel ME, Garbisa S, Grigioni WF, Liotta LA, Stetler-Stevenson G. Increased expression of the M_r 72,000 type IV collagenase in human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1991;51:439-444.
26. Hewitt RE, Leach IH, Powe DG, Clark IM, Cawston TE, Turner DR. Distribution of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in colorectal tumors. *Int J Cancer* 1991;49:666-672.

27. Poulson R, Pignatelli M, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Wright PA, Jeffery RE, Longcroft LG, Stamp GWH. Stromal expression of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 1992;141:389-396
28. Pyke C, Ralfkiaer E, Tryggvason K, Dano K. Messenger RNA for two type IV collagenases is located in stromal cells in human colon cancer. *Am J Pathol* 1993;142:359-365
29. Liabakk NB, Talbot I, Smith RA, Wilkinson K, Balkwill F. Matrix metalloprotease 2 (MMP-2) and matrix metalloprotease 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Cancer Res* 1996;56:190-196.
30. Ko K, Yazumi S, Yoshikawa K, Konda Y, Nakajima M, Chiba T, Takahashi R. Activation of fibroblast-derived matrix metalloproteinase-2 by colon cancer cells in non-contact co-cultures. *Int J Cancer* 2000;87:165-71
31. Kataoka H, Decastro R, Zucker S, Biswas C. Tumor-cell-derived collagenase-stimulatory factor increase expression of intestinal collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase. *Cancer Res* 1993;53:3154-3158
32. Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem* 1993;53:288-295
33. Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI. *J Biol Chem* 1989;264:17213-21
34. Okada Y, Tsuchiya H, Shimizu H, Tomita K, Nakanishi I, Sato H, Seiki M, Yamashita K, Hayakawa T. Induction and stimulation of 92 kDa gelatinase / type IV collagenase production in osteosarcoma and fibrosarcoma cell lines by tumor necrosis factor α . *Bioch Biophys Res Comm* 1990;171:610-617

35. Korugi T, Nabeshima K, Kataoka H, Okada Y, Kono M. Stimulation of gelatinase B and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP) production in co-culture of human osteosarcoma cells and human fibroblasts: gelatinase-B production was stimulated via up-regulation of fibroblast growth factor (FGF) receptor. *Int J Cancer* 1996;66:82-90
36. Sawaya R, Tofilon PJ, Mohanam S, Ali-Osman F, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG, Rao JS. Induction of tissue-type plasminogen activator and 72-kDa type-IV collagenase by ionizing radiation in rat astrocytes. *Int J Cancer* 1994;56:214-218
37. Kumar A, Collins HM, Scholefield JH, Watson SA. Increased type-IV collagenase (MMP-2 and MMP-9) activity following preoperative radiotherapy in rectal cancer. *Br J Cancer* 2000;82(4):960-5.
38. Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 1972;48:422-427
39. Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem* 1980;102:196-202
40. Biotrak. Cellular communication assays. Matriz metalloproteinase-9 (MMP-9) activity assay system. Amersham Pharmacia Biotech UK limited 2001
41. Biotrak. Cellular communication assays. Matriz metalloproteinase-2 (MMP-2) activity assay system. Amersham Pharmacia Biotech UK limited 2001
42. Wanebo HJ. Surgery for gastrointestinal cancer. 1st edition. Lippincott-Raven 1997.

43. Nagtegaal ID, van Krieken JHJM. The role of pathologists in the quality control of diagnosis and treatment of rectal cancer —an overview. *Eu J Cancer* 2002;38:964-972
44. Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Gradyyy D, Hearst N, Newman TB. *Designing Clinical Research. An Epidemiologic Approach*. 2nd ed. 2001, Lippincott Williams and Wilkins
45. Marijnen CAM, Glimelius B. The role of radiotherapy in rectal cancer. *Eur J Cancer* 2002;38:943-952
46. Chari RS, Tyler DS, Anscher MS. Preoperative radiation and chemotherapy in the treatment of adenocarcinoma of the rectum. *Ann Surg* 1995;221:778-787
47. Habr-Gama A, de Souza PMS, Ribeiro U Jr, Nadalin W, Gansl R, Sousa AH, Campos FG, Gama-Rodriguez J. Low rectal cancer: impact of radiation and chemotherapy on surgical treatment. *Dis Colon Rectum* 1998;41:1087-1096
48. Luna PP, Rodríguez RS, Rodríguez CDF, Fernández A, Labastida S, Silva A, López MJ. Preoperative chemoradiation therapy and anal sphincter preservation with locally advanced rectal adenocarcinoma. *World J Surg* 2001;25:1006-1011
49. Hyams Dm, Mamounas EP, Petrelli N. A clinical trial to evaluate the worth of preoperative multimodality therapy in patients with operable carcinoma of the rectum: a progress report of National Surgical Breast and Bowel Project Protocol R-03. *Dis Colon Rectum* 1997;40:131-139

50. Berger C, de Muret A, Garaud P. Preoperative radiotherapy (RT) for rectal cancer: predictive factors of tumor downstaging and residual tumor cell density (RTCD): prognostic implications. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;41:619-627
51. Hiotis SP, Weber SM, Cohen AM, Minsky BD, Paty PB, Guillem JG, Wagman R, Saltz LB, Wong WD. Assessing the predictive value of clinical complete response to neoadjuvant therapy for rectal cancer: an analysis of 488 patients. *J Am Coll Surg* 2002;194:131-136
52. Qui H, Sirivongs P, Rothenberger M, Rothenberger DA, García AJ. Molecular prognostic factors in rectal cancer treated by radiation and surgery. *Dis Colon Rectum* 2000;43:451-459
53. Rodel C, Grabenbauer GG, Papadopoulos T, Bigalke M, Gunther K, Schick C, Peters A, Sauer R, Rodel F. Apoptosis as a cellular predictor for histopathologic response to neoadjuvant radiochemotherapy in patients with rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;52:294-303
54. Giralt J, Aranzazu E, Armengol M, Rosselló J, Majó J, Ares C, Espin E, Benavente S, de Torres I. Epidermal growth factor receptor is a predictor of tumor response in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;54:1460-1465
55. Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteinases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 2001;11:S37-S43
56. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today* 2000;6:149-156

57. Baker EA, Leaper DJ. Measuring gelatinase activity in colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 2002;28:24-29
58. Waas ET, Lomme RMLM, DeGroot J, Wobbes Th, Hendriks T. Tissue levels of active matrix metalloproteinase-2 and -9 in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2002;86:1876-1883
59. Zucker S, Lysik RM, Zarrabi MH, Moll U. Mr 92,000 type IV collagenase is increased in plasma of patients with colon cancer and breast cancer. *Cancer Res* 1993;53:140-146
60. Oberg A, Hoyhtya M, Travelin B, Stenling R, Lindmark G. Limited value of preoperative serum analyses of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2000;20:1085-1092
61. Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ. Matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and colorectal cancer staging. *Br J Surg* 2000;87:1215-1221
62. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Inter J Biochem Cell Biol* 2001;33:960-970
63. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-257
64. Johnson MD, Kim HC, Chesler L. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J Cell Phys* 1994;160:194-202
65. Vu TH, Shipley JM, Bergers JE et al. MMP-9/Gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 1998;93:411-422

66. Bergers G, Brekken R, Mc Mahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;2:737-744
67. Ribatti D, Surico G, Vacca A, De Leonardis F, Lastilla G, Montaldo PG, Rigillo N, Ponzoni M. *Life Sciences* 2001;68:1161-1168
68. Park T, Park J, Jung T, Park I. Relationship between angiogenesis and expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2000;29, supp. 1:196)
69. Henk JM, Kindler PB and Smith CW. Radiotherapy and head and neck cancer: final report on the first clinical trial. *Lancet* 1977;2:101-106
70. Watson ER, Halman KE, Dische S et al. Hyperbaric oxygen and radiotherapy: a medical research council trial in carcinoma of the cervix. *Br J Radiol* 1978;51:879