

# Relación de *nm23-H1* con las metástasis en el cáncer de recto

Lourdes Sanz<sup>a</sup>, Juan José González<sup>a</sup>, Enrique Martínez<sup>a</sup> y Manuel Florentino Fresno<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Cirugía I. <sup>b</sup>Servicio de Anatomía Patológica I. Hospital Central de Asturias. Oviedo.

## Resumen

**Introducción y objetivos.** El gen *nm23-H1* es un supresor de metástasis estudiado en distintos tipos de tumores humanos. El objeto de este estudio es determinar su prevalencia en el cáncer de recto y su relación con los parámetros clinicopatológicos clásicos y con la supervivencia.

**Pacientes y métodos.** Estudio retrospectivo inmunohistoquímico y clínico con un anticuerpo monoclonal de ratón sobre 54 pacientes con tumores de recto resecados consecutivamente con una mediana de seguimiento de 37 meses.

**Resultados.** La positividad fue de 42 casos (77,8%) en el tumor primario frente a 6 casos (26,1%) en los ganglios metastatizados ( $p = 0,03$ ). La expresión de *nm23-H1* se correlaciona de forma inversa con la existencia de diseminación ganglionar ( $p = 0,05$ ) y de metástasis ( $p = 0,03$ ). No hubo influencia sobre la supervivencia.

**Conclusiones.** Existe una pérdida de la expresión de *nm23-H1* en las metástasis ganglionares de los tumores rectales. La determinación inmunohistoquímica de *nm23-H1* en el tejido tumoral primario puede predecir la existencia de diseminación ganglionar o metástasis a distancia en el cáncer de recto.

**Palabras clave:** Neoplasia. Recto. *nm23-H1*. Pronóstico. Supervivencia. Metástasis.

## RELATIONSHIP BETWEEN *NM23-H1* AND METASTASIS IN CANCER OF THE RECTUM

**Introduction and aims.** Gene *nm23-H1* is a metastasis suppressor, present in various human solid tumors. The aim of the present study was to analyze tumour expression of *nm23-H1* in rectal carcinomas and its relationship with classical clinicopathologic parameters and survival.

**Patients and methods.** We performed a retrospective immunohistochemical and clinical study with a murine monoclonal antibody in 54 consecutive patients who underwent surgery for rectal tumors. The median follow-up was 37 months.

**Results.** Forty-two (77.8%) primary tumors were positive compared with only six (26.1%) metastatic lymph node tumors ( $p = .03$ ). *Nm23-H1* expression inversely correlated with lymph node involvement ( $p = .05$ ) and metastases ( $p = .03$ ). No correlation was found with survival.

**Conclusions.** There is a lack of *nm23-H1* expression in lymph node metastases from rectal cancer. Immunohistochemical detection of *nm23-H1* in primary tumors is useful in predicting lymph node involvement and metastases in rectal neoplasms.

**Key words:** Neoplasia. Rectum. *nm23-H1*. Prognosis. Survival. Metastasis.

## Introducción

El desarrollo de un cáncer es un proceso secuencial que depende de la activación o la inhibición de distintos genes, entre ellos el *nm23-H1*, considerado un supresor de metástasis e identificado en la línea celular de melanoma de ratón altamente metastásica K-1735 donde su

expresión estaba disminuida<sup>1</sup>. Dicho gen está localizado en el cromosoma 17q21.3 y codifica una proteína de 18,5 kDa<sup>2</sup>.

Se ha demostrado expresión disminuida de *nm23* en varios tumores humanos<sup>3</sup> y en el cáncer colorrectal hay indicios de que *nm23-H1* puede estar relacionado con el estadio tumoral<sup>4</sup>. Respecto a la supervivencia, aunque en algunos trabajos se ha demostrado un efecto beneficioso no hay acuerdo unánime sobre su significado y parece no servir como indicador pronóstico independiente<sup>5</sup>.

Los datos clinicopatológicos actuales fallan a la hora de predecir con exactitud el pronóstico de un tumor, por lo que los métodos bioquímicos y moleculares pueden ser útiles en el proceso de estadificación y evaluación pronóstica. Además, existen ciertas consideraciones es-

Correspondencia: Dra. L. Sanz Álvarez.  
Avda. del Mar, 82, 4.º C. 33011 Oviedo.  
Correo electrónico: lousanz@hotmail.com

Aceptado para su publicación en mayo de 2002.

peciales en el cáncer de recto que atañen al tipo de cirugía que puede realizarse si se pudiera contar con un sistema fiable que permitiera detectar la existencia de metástasis o micrometástasis ganglionares en el estudio preoperatorio. La resección local está indicada en tumores que invaden solamente la capa mucosa y con parámetros histológicos favorables, pero hasta un 20% de éstos ya tienen metástasis ganglionares<sup>6</sup>.

En este trabajo intentamos relacionar la expresión de la proteína *nm23-H1* con parámetros epidemiológicos, clinicopatológicos y supervivencia de una serie de tumores rectales.

## Pacientes y métodos

El estudio incluye a un total de 54 pacientes con adenocarcinomas rectales reseçados de forma consecutiva entre enero de 1990 y diciembre de 1992 en el servicio de Cirugía I del Hospital Central de Asturias. Las características clinicopatológicas de los pacientes y los tumores se exponen en la tabla 1. La estadificación se realizó de acuerdo con la clasificación de la AJCC y para la determinación del grado histológico se usó la clasificación de Broders.

La resección tumoral fue completa ( $R_0$ ) en 40 pacientes. En el momento de la cirugía, 11 pacientes tenían metástasis a distancia no reseçables y en 3 casos fue imposible conseguir el control local de la enfermedad.

En la serie global la mediana de ganglios aislados en la pieza quirúrgica fue de 6 (rango, 0-25). En el grupo  $R_0$  la mediana de ganglios aislados fue de 10 (rango, 7-25).

El seguimiento se realizó mediante revisiones semestrales durante los primeros 2 años y posteriormente anuales; la mediana de seguimiento fue de 37 meses (rango, 0-102).

Revisamos los bloques parafinados de las piezas quirúrgicas, y obtuvimos muestras del tumor y de las adenopatías en forma de cortes pa-

rafinados de 4  $\mu$ m. Obtuvimos una media de cuatro cortes de cada tumor provenientes tanto del centro como de la interfase con la mucosa normal. Usamos un anticuerpo monoclonal de ratón NCL-*nm23* (clon 37.6) desarrollado por Novocastra Laboratories Ltd. Los cortes de material parafinado de 4  $\mu$ m se colocaron sobre placa calefactora a 37-40 °C; una vez secas las secciones se eliminó el exceso de parafina, se rehidrataron con etanol y se lavaron con PBS (pH, 7,2) (DIFCO). El bloqueo de la peroxidasa endógena se realizó con metanol y  $H_2O_2$ . Tras lavar con PBS se aplicaron 0,2 ml de suero normal de caballo (Vector S-2000) y tras 15 min se añadieron 0,150 ml de NCL-*nm23* diluido a 1/200. Se viraron con la técnica de avidina-biotina-diaminobencidina y se tiñeron con hematoxilina de Harris.

Las muestras se evaluaron por medio de una escala semicuantitativa de cuatro puntos (negativo, débilmente positivo, positivo, fuertemente positivo), que se redujeron posteriormente a dos: negativo y positivo (que agrupa los positivos y fuertemente positivos).

La relación entre la inmunoadaptación de *nm23-H1* y los parámetros estudiados se determinó mediante los test de la  $\chi^2$  (con aplicación de la prueba exacta de Fisher cuando fue necesario) y la U de Mann-Whitney. La correlación entre la expresión tumoral y ganglionar del gen se evaluó con el test de Spearman.

El análisis de la supervivencia se realizó mediante el método de Kaplan-Meier, y las curvas se compararon mediante el test de rangos logarítmicos. Se consideró significación estadística una  $p \leq 0,05$ .

## Resultados

La expresión de *nm23* es citoplásmica, predominantemente perinuclear, con un patrón de tinción homogéneo en todo el tumor. La mucosa normal peritumoral evidencia una positividad débil.

Según la escala semicuantitativa utilizada, respecto a la expresión de la proteína *nm23-H1* en el tumor, los casos se clasificaron en: negativo (12 casos; 22,2%) y positivo (42 casos; 77,8%). La expresión de *nm23-H1* en los

TABLA 1. Expresión de *nm23-H1* en 54 tumores rectales reseçados y correlación con parámetros clinicopatológicos y metástasis en el seguimiento

|                            | Pacientes | <i>nm23-H1</i> (negativo/ positivo) | Porcentaje negativo | p    |
|----------------------------|-----------|-------------------------------------|---------------------|------|
| Total                      | 54        | 12/42                               | 22,2                |      |
| Edad (años)                |           |                                     |                     |      |
| Mediana                    |           | 62/69                               |                     | 0,08 |
| Amplitud                   |           | 54-77/37-84                         |                     |      |
| Sexo                       |           |                                     |                     |      |
| Varón                      | 33        | 7/26                                | 21,2                | 0,09 |
| Mujer                      | 21        | 5/16                                | 23,8                |      |
| Diferenciación tumoral     |           |                                     |                     |      |
| Bien diferenciado          | 39        | 8/31                                | 20,5                | 0,1  |
| Moderadamente diferenciado | 14        | 3/11                                | 27,3                |      |
| Pobremente diferenciado    | 1         | 1/-                                 | 100                 |      |
| Tumor                      |           |                                     |                     |      |
| $T_2$                      | 11        | 1/10                                | 9                   | 0,4  |
| $T_3$                      | 33        | 9/24                                | 27,3                |      |
| $T_4$                      | 10        | 2/8                                 | 25                  |      |
| Ganglios                   |           |                                     |                     |      |
| Negativos                  | 31        | 4/27                                | 12,9                | 0,05 |
| Positivos                  | 23        | 8/15                                | 34,8                |      |
| Metástasis                 |           |                                     |                     |      |
| $M_0$                      | 43        | 7/36                                | 16,3                | 0,03 |
| $M_1$                      | 11        | 5/6                                 | 45,5                |      |
| Estadio TNM                |           |                                     |                     |      |
| I                          | 9         | 1/8                                 | 11,1                | 0,1  |
| II                         | 20        | 3/17                                | 15                  |      |
| III                        | 14        | 3/11                                | 21,4                |      |
| IV                         | 11        | 5/6                                 | 45,5                |      |
| Recidiva metastásica*      |           |                                     |                     |      |
| No                         | 26        | 4/22                                | 15,4                | 0,2  |
| Sí                         | 14        | 3/11                                | 21,4                |      |

\*En los 40 pacientes con resecciones  $R_0$ .

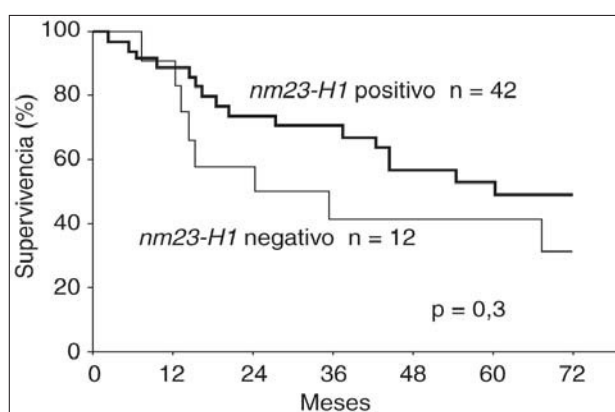


Fig. 1. Supervivencia actuarial según el método de Kaplan-Meier de los 54 pacientes con cáncer de recto resecaados, distribuidos de acuerdo con la expresión de *nm23-H1*.

ganglios metastásicos de los 23 pacientes con afección ganglionar fue negativa en 17 casos (73,9%) y positiva en seis (26,1%). Los datos anteriores desvelan la existencia de una correlación significativa ( $p = 0,03$ ) entre la expresión de la proteína *nm23-H1* en el tejido tumoral y su expresión ganglionar.

En la tabla 1 se expone la inestadificación de *nm23-H1* respecto a distintos parámetros clínicos y patológicos; no existen diferencias respecto al sexo, el grado histológico, la profundidad de la invasión parietal (T) o el estadio tumoral. Sin embargo, la expresión del gen se correlaciona de forma inversa con la existencia de diseminación ganglionar ( $p = 0,05$ ) y la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico ( $p = 0,03$ ). Sobre 40 pacientes con resecciones completas ( $R_0$ ) se estudió la recidiva durante el seguimiento y el tipo (local o metastásica), y no se ha encontrado que *nm23-H1* sea capaz de predecir qué pacientes desarrollarán metástasis a lo largo del seguimiento. Asimismo, en este grupo de pacientes con resección tumoral completa no se detectaron diferencias dependientes de la inestadificación de *nm23-H1* respecto a ninguno de los parámetros clínico-patológicos analizados.

En la figura 1 se exponen las curvas de supervivencia de los pacientes con cáncer de recto respecto a la expresión de *nm23-H1*, y a pesar de existir importantes diferencias en la mediana de supervivencia, de 55,5 meses para los pacientes que sobreexpresaban *nm23-H1* frente

a 25,1 meses en los que evidenciaban expresión reducida de *nm23-H1*, dichas diferencias no alcanzaron la significación estadística ( $p = 0,3$ ).

El análisis de la supervivencia en el grupo de pacientes con resección tumoral completa no presenta ninguna influencia pronóstica de *nm23-H1*.

## Discusión

La determinación de *nm23-H1* en el cáncer colorrectal, bien directamente, bien a través de su producto proteico, como en el presente estudio, no tiene aún una significación clara, aunque se sabe con certeza que la expresión de *nm23-H1* es superior en el tejido tumoral que en la mucosa adyacente. En tumores de colon y recto los resultados son controvertidos (tabla 2), y hay series en las que la sobreexpresión se asocia con estadios tumorales tempranos y pronóstico favorable y otras en las que aparece un aumento de la diseminación metastásica en tumores con elevada expresión de este gen<sup>7-10</sup>.

Los porcentajes de positividad varían ampliamente, lo que puede deberse a los diferentes métodos de análisis utilizados; en estudios inmunohistoquímicos las positividades varían entre el 39 y el 70%<sup>4,7</sup>; en nuestra serie éstas son del 77,2% en el tumor primario y de sólo el 26,1% en las metástasis ganglionares, de manera que muchos tumores con sobreexpresión la perdieron en su tránsito hacia la metastatización ganglionar, lo que está de acuerdo con la teoría de que las metástasis se producen por la especialización de determinados grupos celulares del tumor primario, capaces de migrar y colonizar órganos y tejidos distintos del de su origen<sup>11</sup>.

Se ha descrito correlación inversa entre la expresión inmunohistoquímica de *nm23-H1* y la profundidad de la invasión tumoral (T), no detectada en nuestra serie<sup>12</sup>.

La determinación de *nm23-H1* en el tumor primario puede predecir la existencia de metástasis ganglionares en el cáncer colorrectal<sup>13</sup>, como queda patente en nuestros resultados sobre cáncer de recto exclusivamente, aunque estos resultados pueden estar sesgados por el tamaño muestral, lo que tendría utilidad en el estudio preoperatorio para ayudar en la decisión de realizar exéresis local a pacientes con características histopatológicas favorables.

Los tumores con metástasis en el momento de la cirugía son, en casi la mitad de los casos, negativos para

TABLA 2. Resumen de varios trabajos publicados sobre determinación de *nm23-H1* en cáncer colorrectal

| Autor     | N   | R                 | Método   | <i>nm23H1</i> +/- (% positivo) | Resultados  | Supervivencia                                  |
|-----------|-----|-------------------|----------|--------------------------------|---|--|
| Berney    | 58* | R <sub>0</sub> -2 | IH, CVIA | -                              | Correlación directa con: T y M <sub>1</sub> hepáticas | Peor los pacientes <i>nm23-H1</i> <sup>+</sup> |
| Martínez  | 35  | R <sub>0</sub> -2 | IH, PCR  | 16/19 (54%)                    | Correlación inversa con profundidad T                 | No analizada                                   |
| Royds     | 46  | R <sub>0</sub> -2 | IH       | -                              | No analizado  | Mejor <i>nm23-H1</i> <sup>+</sup>              |
| Tannapfel | 100 | R <sub>0</sub>    | IH       | 41/59 (59%)                    | Correlación inversa con N y estadios avanzados        | No analizada                                   |
| Cheah     | 141 | R <sub>0</sub> -2 | IH       | 86/55 (39%)                    | Correlación inversa con M <sub>1</sub>                | Sin relación significativa                     |
| Lindmark  | 202 | R <sub>0</sub> -2 | IH       | 60/142 (70%)                   | Sin correlación con estadio                           | Sin relación significativa                     |
| Zeng      | 59  | R <sub>0</sub> -2 | ARN-NB   | -                              | Sin correlación con N ni M <sub>1</sub>               | No analizada                                   |
| Cohn      | 21  | R <sub>0</sub>    | ADN-SB   | 11/10 (47%)                    | Correlación inversa con M <sub>1</sub>                | No analizada                                   |
| Günter    | 102 | R <sub>0</sub>    | IH       | 30/82 (80%)                    | Sin correlación con metástasis                        | No analizada                                   |

\*Cincuenta y ocho casos que incluyen adenomas, pólipos y tumores no metastásicos y con metástasis. IH: inmunohistoquímica; CVIA: análisis de imagen por vídeo color; PCR: análisis de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa; NB: análisis de ARN-Northern blot; SB: análisis de ADN-Southern blot.

*nm23-H1*, lo que concuerda con los hallazgos de otros estudios que demuestran que la expresión de *nm23-H1* es superior en los tumores no metastásicos<sup>14</sup>, aunque, por otro lado, el hallazgo opuesto también se ha puesto en evidencia<sup>8</sup>. Sin embargo, no encontramos que existiera correlación entre la expresión de *nm23-H1* y el estadio tumoral ni tampoco con el desarrollo de recidiva metastásica. En el estudio de Günther et al<sup>15</sup> realizado sobre 128 resecciones rectales R<sub>0</sub>, tampoco se aprecia influencia de *nm23-H1* sobre el desarrollo de metástasis durante el seguimiento.

Respecto a la supervivencia, en nuestra serie existen diferencias importantes en la mediana de supervivencia, aunque sin llegar a la significación estadística: en la bibliografía existen resultados controvertidos<sup>5,8,10,16</sup> muy diferentes según el tipo de tumor estudiado, aunque en tumores colorrectales no parece que *nm23-H1* sea un factor pronóstico independiente.

Estudios sobre la sensibilidad aumentada a quimioterápicos en determinados tipos de tumores *nm23-H1* positivos<sup>17,18</sup> parecen prometedores para poder usar *nm23-H1* como un predictor de la respuesta o incluso como terapia génica coadyuvante a la quimioterapia.

En resumen, en nuestro estudio sobre un limitado número de pacientes con cáncer de recto, encontramos que la expresión proteica de *nm23-H1* se correlaciona inversamente con la existencia de diseminación metastásica en el momento del diagnóstico, como metástasis ganglionares u orgánicas. Creemos que son necesarios nuevos análisis sobre poblaciones más amplias para poder llegar a conclusiones definitivas.

## Bibliografía

1. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirson UP, Talmadge E, Liotta LA, et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Nat Cancer Inst* 1988;80:200-4.
2. Rosengard AM, Krutzsch HC, Shearn A, Biggs JR, Barker E, Margulies IMK, et al. Reduced nm23/ Awd protein in tumor metastasis and aberrant *Drosophila* development. *Nature* 1989;342:177-80.
3. Freije JMP, MacDonald MJ, Steeg PS. Differential gene expression in tumor metastasis: *nm23*. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;213: 215-32.
4. Cheah PY, Cao X, Eu KW, Seow-Choen F. *Nm23-H1* immunostaining is inversely associated with tumour staging but not overall survival or disease recurrence in colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 1998;77:1164-8.
5. Campo E, Miquel R, Jares P, Bosch F, Juan M, Leone A, et al. Prognostic significance of the loss of heterozygosity of *nm23-H1* and *p53* genes in human colorectal carcinomas. *Cancer* 1994;73: 2913-21.
6. Blumberg D, Paty PB, Guillem JG, Picon AI, Minsky BD, Wong WD, et al. All patients with small intramural rectal cancers are at risk for lymph node metastasis. *Dis Colon Rectum* 1999;42:881-5.
7. Martínez JA, Prevot S, Nordlinger B, Nguyen TMA, Lacarriere Y, Munier A, et al. Overexpression of *nm23-H1* and *nm23-H2* genes in colorectal carcinomas and loss of *nm23-H1* expression in advanced tumour stages. *Gut* 1995;37:712-20.
8. Berney CR, Yang JL, Fisher RJ, Russell PJ, Crowe PJ. Overexpression of nm23 protein assessed by color video image analysis in metastatic colorectal cancer: correlation with reduced patient survival. *World J Surg* 1998;22:484-90.
9. Indinimeo M, Giarnieri E, Stazi A, Cicchini C, Brozzetti S, Valli C, et al. Early stage human colorectal cancer: prognostic value of nm23-H1 protein overexpression. *Cancer Letters* 1997;111:1-5.
10. Royds JA, Cross SS, Silcocks PB, Scholefield JH, Rees RC, Stephenson TJ. *Nm23* "anti-metastatic" gene product expression in colorectal carcinoma. *J Pathol* 1994;172:261-6.
11. Mendelson J, Liotta L, Howley PM, Israel MA. The molecular basis of cancer. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994.
12. Zeng ZS, Hsu S, Zhang ZF, Cohen AM, Enker WE, Turnbull AA, et al. High level of *nm23-H1* gene expression is associated with local colorectal cancer progression not with metastases. *Br J Cancer* 1994;70:1025-30.
13. Tannapfel A, Katalinic A, Köckerling F, Wittekind C. The prediction of lymph node metastases in colorectal cancer by expression of the nucleoside diphosphate kinase/*nm23-H1* and histopathological variables. *AJG* 1997;92:1182-6.
14. Yamaguchi A, Urano T, Fushida S, Furukawa K, Nishimura G, Yone-mura Y, et al. Inverse association of *nm23-H1* expression by colorectal cancer with liver metastasis. *Br J Cancer* 1993;68:1020-4.
15. Günther K, Dworak O, Remke S, Pflüger R, Merkel S, Hohenberger W, et al. Prediction of distant metastases after curative surgery for rectal cancer. *J Surg Res* 2002;103:68-78.
16. Cohn KH, Ornstein D, Wang F, DeSoto F, Phipps K, Edelsberg C, et al. The significance of allelic deletions and aneuploidy in colorectal carcinoma. *Cancer* 1997;79:233-44.
17. Freije JM, MacDonald NJ, Steeg PS. *Nm23* and tumour metastasis: basic and translational advances. *Biochem Soc Symp* 1998;63: 261-71.
18. Lizuka N, Miyamoto K, Tangoku A, Hayashi H, Hazama S, Yoshino S, et al. Downregulation of intracellular *nm23-H1* prevents cisplatin-induced DNA damage in oesophageal cancer cells: possible association with Na(+), K(+)-ATPase. *Br J Cancer* 2000;83:1209-15.