

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER  
COLORRECTAL ESPORÁDICO: ANÁLISIS  
DE LA INESTABILIDAD GENÓMICA Y DE  
LAS PÉRDIDAS DE HETEROCIGOSIDAD**

**TESIS DOCTORAL**

**CARMEN LUZ MAILLO OLIVA**

**Madrid, 1995**



**INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS**

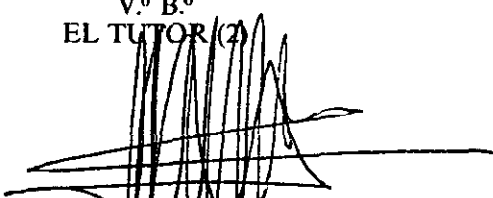
D. MARIANO MORENO AZCOITA, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGIA, JEFE DEL SERVICIO DE CIRUGIA GENERAL Y A. DIGESTIVO DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE GETAFE, Y D. -- JUAN JOSE GONZALEZ AGUILERA, DOCTOR EN BIOLOGIA, PROFESOR TITULAR DE GENETICA - EN LA FACULTAD DE BIOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID,

**C E R T I F I C A N :**

Que el trabajo realizado por D<sup>a</sup> Carmen Luz MAILLO OLIVA, -- "BIOLOGIA MOLECULAR EN CANCER COLORECTAL ESPORADICO. ANALISIS DE LA INESTABILIDAD GENOMICA Y PERDIDA DE HETEROCIGOSIDAD", reúne las características de calidad, rigor científico y metodológico para poder ser defendida por el autor como Tesis Doctoral ante el Tribunal correspondiente.

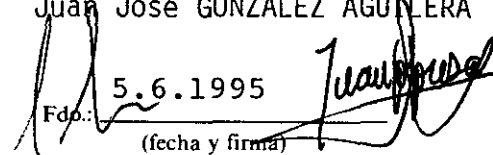
Y para que así conste donde proceda, firmamos el presente - Certificado

V.º B.º  
EL TUTOR (2)

  
Fdo.: Prof. A. J. Torres García  
(fecha y firma)  
D.N.I.: 24836041 C

El Director de la Tesis  
Mariano MORENO AZCOITA

Juan José GONZALEZ AGUILERA

  
Fdo.: 5.6.1995

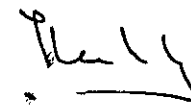
(fecha y firma)  
D.N.I.: 779553Z ; 32011439 Q.

**INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO**

La Tesis Doctoral "BIOLOGIA MOLECULAR EN CANCER COLORECTAL ESPORADICO. ANALISIS DE LA INESTABILIDAD GENOMICA Y PERDIDA DE HETEROCIGOSIDAD", realizada por D<sup>ña</sup>. CARMEN LUZ MAILLO OLIVA, bajo la dirección del DR. MARIANO MORENO AZCOITA, se ha considerado por el Consejo del Departamento, apta para ser presentada ante el Tribunal Calificador.

Fecha reunión  
Consejo Departamento  
8 de Junio 1995

El Director del Departamento

  
Fdo.: Prof. J. L. Balibrea  
(fecha y firma)

A mis padres y hermanas  
por sufrir mi ausencia.

“ Siempre que te pregunten  
si puedes hacer un trabajo,  
contesta que sí y ponte  
enseguida a aprender como  
se hace”

Roosevelt F.D.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Mariano Moreno Azcoita por sus enseñanzas, tanto en el campo profesional, como en el personal, por su constante apoyo y su confianza en mí.

Al Dr. Juan José González Aguilera que ha tenido una paciencia infinita para que llegara a entender el fantástico mundo de la genética y pudiera realizar este trabajo, que sin él no hubiera existido.

A la Dra. M<sup>a</sup> Antonia Fernández Peralta que además de haber sido cómplice en esa difícil tarea, ha sido para mí una amiga.

Al Prof. José Luis Balibrea Cantero por sus, siempre sabios, consejos.

Al Dr. J. Ignacio Landa García que ha participado de una manera importante en mi formación como cirujano.

A Marta por todo, principalmente por su amistad surgida de muchas horas juntas en el laboratorio, pero que ha llegado a extenderse mucho más allá.

Al los demás miembros del laboratorio por enseñarme lo que necesité aprender de una forma tan desinteresada y asequible.

A Pedro y a Paco con los que he compartido el largo camino hasta la realización de esta tesis, gracias a ellos se ha hecho más corto y fácil.

A Jesús, que aunque fue el primero en comenzar, no pudo ver los frutos del trabajo. Sin duda él es también responsable de éste.

A la Sección de Cirugía Colorrectal por su gran interés y ayuda en la recogida de muestras.

Al Dr José M<sup>a</sup> Jover, Tutor de Residentes, por su gran ayuda y apoyo durante mi residencia.

A mis residentes mayores Juan Carlos, Pepe, Jesús, Alberto y Pablo, que me enseñaron gran parte de lo que sé, sobre todo que no hay que rendirse.

A todos y cada uno de los miembros del Servicio de Cirugía, incluyendo a Maribel, que han sido mi familia durante estos años.

Al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Getafe por haber realizado el estudio histológico de los tumores.

A Reyes que hizo un largo viaje sólo para ayudarme.

Y sobre todo, a mis padres.

## **ÍNDICE**



1. Justificación del trabajo.....	1
2. Introducción.....	4
2.1. Incidencia.....	4
2.2. Localización.....	6
2.3. Antecedentes Históricos.....	8
2.4. Clasificación.....	10
2.5. Diagnóstico.....	15
2.6. Tratamiento.....	26
2.7. Seguimiento.....	32
2.8. Factores Etiológicos.....	41
2.9. Genética del Cáncer Colorrectal.....	48
3. Pacientes y Métodos.....	79
3.1. Pacientes Incluidos en el Estudio.....	79
3.2. Aislamiento de ADN genómico.....	80
3.3. Análisis de Inestabilidad.....	83
3.4. Análisis Estadístico.....	90
4. Resultados.....	92
4.1. Localización y Estadio de Dukes.....	97
4.2. Inestabilidad.....	99
4.3. LOH.....	107
4.4. Alteraciones y Estadios de Dukes.....	128
4.5. Asociación de Alteraciones.....	131
5. Discusión.....	133
5.1. Inestabilidad de microsatélites.....	137
5.2. Pérdidas de Heterocigosidad.....	141
5.3. Alteraciones y Estadios de Dukes.....	147
5.4. Valoración Global de Resultados.....	153
6. Conclusiones.....	157
7. Bibliografía.....	158

## **1. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO**

El cáncer colorrectal es una enfermedad con una alta incidencia en nuestro medio, y con una mortalidad elevada, sobre todo en los estadios más avanzados. Los cirujanos tenemos que enfrentarnos a esta patología frecuentemente, tanto en cirugía electiva, como para tratar sus complicaciones agudas que necesitan cirugía urgente. A pesar de todos los esfuerzos para conseguir un diagnóstico en estadios cada vez más precoces con la realización de colonoscopia o enema opaco a todos los enfermos en los que se sospecha una patología colónica, no se ha conseguido, en los últimos años, disminuir la supervivencia a largo plazo de esta patología.

En nuestra práctica quirúrgica hemos intentado conseguir una mayor supervivencia, una disminución de la morbilidad de este tipo de cirugía y un mayor confort del enfermo, lo que ha llevado a los cirujanos a investigar nuevas formas de anastomosis y preparación del colon.

Todos estos avances, sin embargo, no nos parecen suficientes para afrontar una enfermedad que supone la segunda causa de muerte por cáncer. Esto ha hecho que, al desarrollarse y divulgarse los estudios de biología molecular en los tumores, nos hayamos sentido directamente implicados, haciéndonos partícipes de estas investigaciones.

El interés de los cirujanos se ha ido incrementando, estando, en el momento actual, integrados en las investigaciones de biología molecular de los tumores en equipos interdisciplinarios, para una mayor comprensión de la patología, un avance más rápido que conduzca a una mejoría en el tratamiento y consecuentemente una mayor repercusión clínica.

Con los estudios de los genes implicados en la carcinogénesis colorrectal pensamos que podremos determinar aquellos cánceres con mayor potencial de agresividad y que, por tanto, se beneficiarían de un tratamiento adyuvante más agresivo, al mismo tiempo que los enfermos con tumores resecados de forma curativa que no presenten estas características, podrían evitar los efectos secundarios de este tipo de tratamientos.

El descubrimiento del gen o los genes implicados en la etiología de la enfermedad permitiría, a su vez, un diagnóstico más precoz. Aunque el diagnóstico del cáncer esporádico en la población general en el momento de la aparición de la primera mutación genética es hoy en día una utopía, si creemos que, en familias predispuestas, este tipo de diagnóstico tan precoz puede ser posible a medio plazo.

Como clínicos deseamos la curación de todos nuestros enfermos, pero sabemos que esto no es siempre posible. Para ello es importante realizar un diagnóstico precoz, pero los métodos actuales no son totalmente efectivos. Nos hemos dado cuenta que este tipo de investigaciones abre un camino bastante interesante que podrá mejorar ambas cosas, tanto el diagnóstico precoz, como el tratamiento. Por ello decidimos dedicar nuestro esfuerzo a este campo novedoso, y entrar en un área en el que, hasta ahora, habíamos sido meros observadores.

La posibilidad de ofrecer a nuestros enfermos nuevas posibilidades de curación ha motivado nuestro interés por los estudios genéticos en el cáncer colorrectal, y ha hecho que nos sintamos directamente implicados y responsables de contribuir a este tipo de investigaciones, puesto que los cirujanos no podemos ser meramente espectadores en una patología que nos atañe tan directamente. Por este motivo hemos comenzado este estudio de pérdidas de heterocigosidad (LOH) y alteraciones de microsatélites en nuestros enfermos afectados de cáncer colorrectal, como primer paso de una investigación que pensamos desarrollar a más largo plazo, ya que los resultados obtenidos hasta ahora nos abren un campo de impresionantes posibilidades.

## **2. INTRODUCCIÓN**

## 2.1. INCIDENCIA:

El cáncer colorrectal constituye la segunda enfermedad maligna más frecuente en los países occidentales, después del pulmonar. Se estima que en 1992 en EE.UU. se diagnosticaron 156.000 nuevos casos de esta patología, ocurriendo 58.300 muertes por esta causa<sup>(14)</sup>. En la Comunidad Europea la incidencia y mortalidad de esta enfermedad es alta en los países del Norte y Oeste, siendo las tasas más bajas las de los países del Sur, esto es, Italia, España, Portugal y Grecia. La incidencia en los países Europeos es más baja que la de Los Estados Unidos, sin embargo la mortalidad global es más alta. Dentro de los países europeos los de más baja mortalidad son los países mediterráneos. Las tasas de supervivencia se han incrementado en los últimos años, por el uso extendido de la colonoscopia lo que ha permitido un diagnóstico más precoz, siendo la supervivencia a 5 años del 40-52%.

En 1990 el número de nuevos casos de cáncer colorrectal en la Comunidad Europea fue de 169.400 (Fuente Telescan: Telematics Services in Cancer, vía internet). En hombres hubo 80.200 nuevos casos, siendo el segundo en frecuencia tras el cáncer de pulmón, y en mujeres 89.200 tras el cáncer de mama. Fue la segunda causa de muerte por cáncer en hombres (47.000 fallecimientos), tras el de

pulmón, y en mujeres constituyó la tercera tras el cáncer de mama y el de vejiga (51.500 muertes)

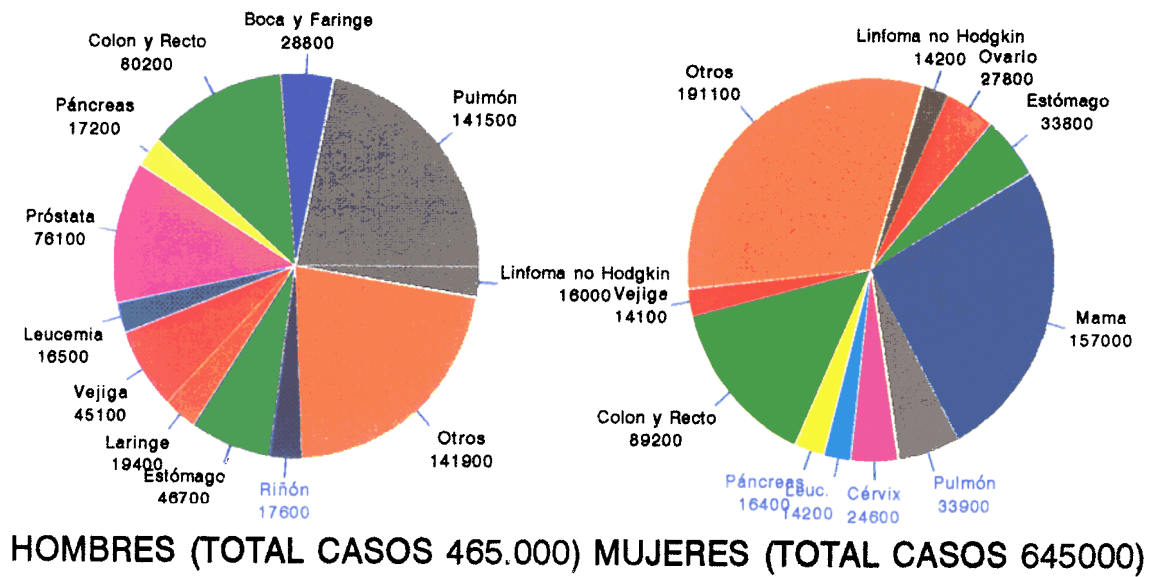


Fig. 1: Número de nuevos casos de cáncer en Europa en 1990.

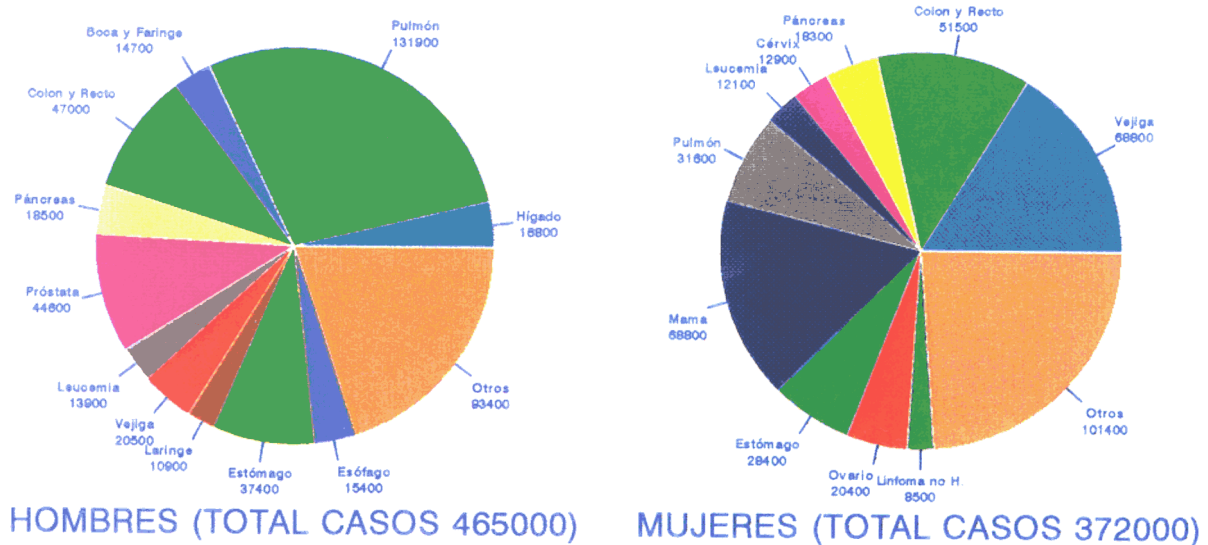


Fig. 2: Número de fallecimientos por cáncer en Europa en 1990.

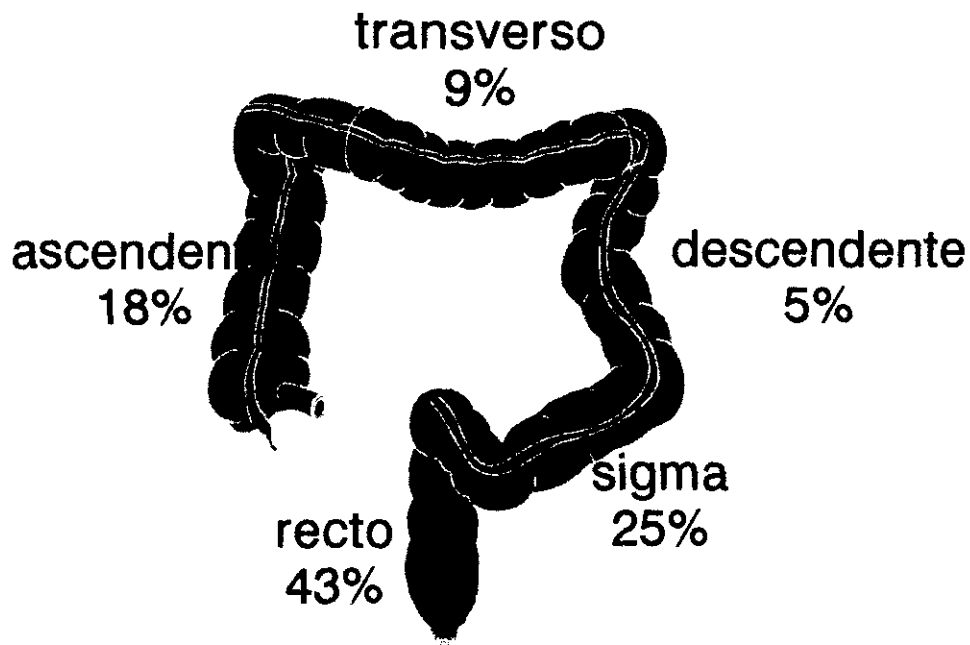


La década de más frecuente aparición, tanto de cáncer de colon como de recto, es la séptima (60-69 años), y la incidencia de la enfermedad tiende a aumentar con la edad <sup>(70,72)</sup>. La descrita para individuos por debajo de los 40 años oscila entre el 2% y el 4% de los tumores colorrectales <sup>(39, 57, 90, 129, 166, 200)</sup>.

La alta prevalencia de esta patología y su incidencia, incluso en edades tempranas, ha supuesto que la Medicina en general, y la Cirugía en particular, dedique gran parte de la investigación al desarrollo de nuevas posibilidades de diagnóstico precoz y tratamiento para aumentar la supervivencia de este tipo de enfermos, así como a intentar conocer la etiología íntima de la enfermedad.

## **2.2. LOCALIZACIÓN:**

La distribución de los cánceres según la localización se representa en la figura 3<sup>(40)</sup>. La mayoría de las lesiones se localizan en rectosigma (68%), siendo los situados en colon derecho y transversal, el 27% de los cánceres.



*Fig.3: Distribución de los carcinomas colorrectales*

Se ha apreciado un incremento en los cánceres de localización proximal, así como una tendencia a la detección de tumores cada vez más pequeños y con menor afectación ganglionar. Esta variación en la localización, puede que corresponda a una mejora en el diagnóstico precoz, aunque no se descarta la posibilidad de que se trate de una distribución diferente de los tumores, con más tendencia a las localizaciones derechas.

En diversos estudios se ha descrito diferente pronóstico de los tumores según la localización, siendo los cánceres colónicos proximales los de mayor supervivencia<sup>(168)</sup>; sin embargo, otros han presentado resultados contradictorios en este sentido. En un estudio de Fielding (1986) del St Mary's Large Bowel Cancer Project se relacionó el pronóstico del cáncer con la localización, evidenciándose una relación entre

el cáncer localizado en la flexura esplénica con un peor pronóstico, no apreciándose otra localización tumoral con una diferente supervivencia.

### **2.3. ANTECEDENTES HISTÓRICOS:**

Faget en 1739 y Lisfranc en 1826<sup>(126)</sup> realizaron una resección de recto mediante excisión perineal, y Reybard de Lyon en 1833 realizó una resección exitosa de una tumoración cólica, por lo que fue criticado por la Academia de Medicina de París<sup>(46)</sup>. Las resecciones y anastomosis tenían una alta mortalidad, por lo que fueron muy extendidas las técnicas descritas por Paul, Mickulicz y Bloch que consistían en exteriorización y resección <sup>(12,139,162)</sup>.

Travers (1812)<sup>(197)</sup> es el pionero en el uso de suturas para realizar anastomosis intestinales. Lembert (1826)<sup>(121)</sup> describió el tipo de anastomosis con la aposición de las serosas, y Billroth fue otro de los líderes en la cirugía con anastomosis intestinales.

En las resecciones de recto, Czerny en 1884 fue el primero en realizar una amputación abdomino-perineal<sup>(45)</sup>. En 1908, Miles<sup>(141)</sup> describió su modificación de la operación de Czerny, haciendo énfasis en una disección meticulosa y la

extirpación de la zona superior al tumor para dejar unos márgenes de seguridad por diseminación del cáncer.

En el siglo XX, la resección de colon y anastomosis primaria no llegó a ser realizada de una forma generalizada hasta la era antibiótica. De hecho, en muchos centros, la resección del colon sigmoide y anastomosis sin colostomía de protección, no fue intentada hasta los años 50. Dixon, entre otros, fue uno de los primeros en defender la anastomosis primaria sin colostomía<sup>(50)</sup>.

Durante gran parte de este siglo la cirugía del cáncer colorrectal se realizaba en 3 tiempos. Durante un primer tiempo se ponía tratamiento al problema obstructivo con una colostomía por encima del tumor. En un segundo tiempo se extirpaba el tumor y en una tercera cirugía se realizaba la anastomosis. Con la mejora de las técnicas anestésicas y los cuidados postoperatorios se ha logrado llevar a cabo la anastomosis en dos tiempos (sobre todo en casos de cirugía urgente con mala preparación o dilatación importante del colon), o en un tiempo (en cirugía programada y en casos de cirugía urgente con lavado intraoperatorio).

Los últimos avances en este tipo de cirugía se han realizado con el desarrollo de las suturas mecánicas. Estas técnicas ya fueron descritas en 1908 por Hlthl y Fischer, pero no es hasta el empleo de la grapadora STPU cuando se generaliza su uso.

En los últimos años la cirugía laparoscópica ha tenido una gran expansión en el tratamiento quirúrgico de muchas patologías, y por supuesto en el cáncer de colon y recto. Sin embargo no es una técnica estandarizada para este tipo de cirugía en el momento actual, sobre todo porque se están describiendo complicaciones como el desarrollo de metástasis en los orificios de colocación de los trócares. La aparición de este tipo de diseminación en la pared abdominal, aunque no es nueva, si se ha incrementado alarmantemente con la utilización de las técnicas laparoscópicas. Los factores predisponentes de este tipo de recurrencia, que aparece muy precozmente tras la cirugía, no está aclarada, aunque se están realizando estudios en este sentido.

#### **2.4. CLASIFICACIÓN:**

La supervivencia está determinada por la extensión tumoral. Desde que, en 1930, Dukes describiera la primera clasificación para el cáncer de recto<sup>(51,52)</sup>, se han establecido otras diferentes siendo la más utilizada actualmente la modificación de Astler-Coller (1954)<sup>(4)</sup>. La clasificación propuesta por Dukes se basa en la relación de la invasión tumoral con el pronóstico de la enfermedad. Así, según la profundidad de la invasión en la pared del colon, él describió 3 estadios:

- \* A: Carcinoma limitado a la pared del recto
- \* B: Invasión por continuidad a tejidos perirrectales, sin invasión linfática.
- \* C: Metástasis en ganglios linfáticos regionales.

La clasificación que Dukes describió no es muy precisa y no incluye todas las posibles presentaciones del cáncer colorrectal, pero a pesar de ello se mantiene su nomenclatura en las modificaciones realizadas posteriormente. La más usada actualmente es la siguiente:

- A:** Tumor que afecta a la pared sin llegar a la muscularis mucosae.
- B1:** Sobrepasa la muscularis mucosae sin llegar a la serosa, sin afectación ganglionar.
- B2:** Afecta a la serosa pudiendo sobrepasarla, sin afectación ganglionar.
- B3:** Afecta a órganos vecinos.
- C1:** B1 con afectación ganglionar.
- C2:** B2 con afectación ganglionar.
- C3:** B3 con afectación ganglionar.
- D:** Metástasis a distancia.

La supervivencia global y corregida descrita por Hawley (1972)<sup>(84)</sup> según el estadio de la enfermedad es para pacientes con tumores colónicos en estadio A de Dukes 82% y 99.3%, B de

Dukes 69% y 84.4%, C1 de Dukes 59.6% y 66.3% y C2 de Dukes 26.3% y 35.1% respectivamente. Estos hallazgos coinciden con los descritos por Shepherd y Jones (1971)<sup>(180)</sup>, Murray y cols (1975)<sup>(152)</sup> y Pihl y cols. (1980)<sup>(165)</sup>.

Tabla I: Correlación entre estadios de Dukes y supervivencia a los 5 años del carcinoma colorrectal.

Estadio	Supervivencia global	Supervivencia corregida
A	82%	99.3%
B	69%	84.4%
C	59.6%	66.3%
D	26.3%	35.1%

La clasificación TNM (T: extensión del tumor; N: presencia de adenopatías positivas y M: presencia de metástasis), también es aplicable en los cánceres colorrectales; sin embargo debido a su mayor complejidad y a que la clasificación de Dukes se correlaciona bien con el pronóstico, es poco utilizada hoy en día para este tipo de tumores. En las siguientes tablas se exponen las definiciones de cada categoría y los estadios de esta clasificación.

Tabla II: Definición de las diferentes categorías de la clasificación TNM.

Evaluación clínico-quirúrgica	Definición	Evaluación postquirúrgica	Definición
T0	No tumor demostrable	pTis	Carcinoma in situ
T1	Clínicamente benigno o limitado a mucosa o submucosa	pT1	Limitado a mucosa o submucosa
T2	Limitado a pared muscular o serosa	pT2	Ídem
T3	Envuelve todas las capas de la pared intestinal con extensión a estructuras adyacentes u órganos sin fistulas.	pT3	Ídem
T4	Presencia de fistulas	pT4	Ídem
T5	T3 o T4 con extensión a otros órganos o estructuras	pT5	Ídem
TX	Profundidad de la penetración no especificada	pTX	Ídem
N0	No infiltración de ganglios linfáticos	pN0	Ídem
N1	Ganglios linfáticos infiltrados	pN1	Ídem
NX	Estado de los ganglios desconocido	pNX	Ídem
M0	No metástasis a distancia o ganglionares más allá de la base del mesocolon	pM0	Ídem
M1	Evidencia de metástasis a distancia	pM1	Ídem



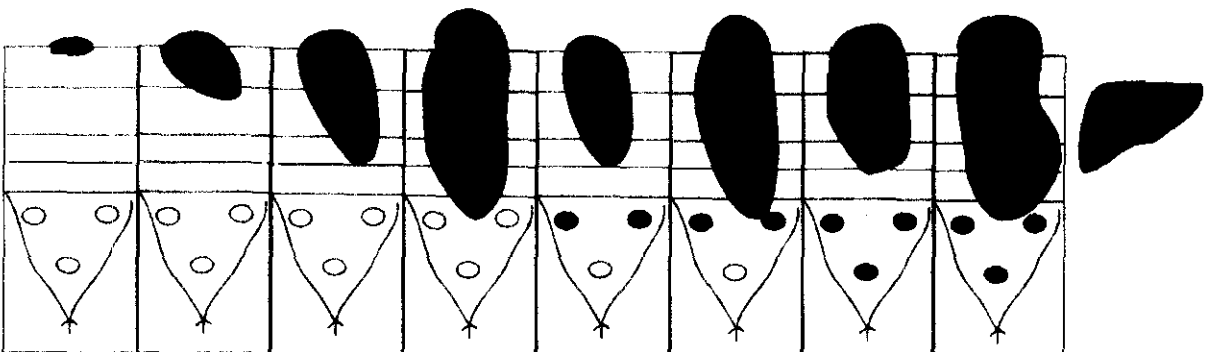
Tabla III: Estadios tumorales según la AJCC (American Join Commitee on Cancer) y la UICC (International Union Against Cancer).

Estadio	Tumor	Ganglios	Metástasis
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
Estadio II	T3	N0	M0
	T4	N0	M0
Estadio III	T*	N1	M0
Estadio IV	T*	N*	M1

\* Cualquier categoría

La correlación de las clasificaciones de Dukes, Astler y Coller y TNM se expone en la siguiente tabla.

Tabla IV: Correlación entre las clasificaciones del cáncer colorrectal.



Dukes	-	A	A	B	C1	C1	C2	C2	D
Astler-Coller	A	A	B1	B2	C1	C2	C1	C2	-
TNM	TisN0	T1N0	T2N0	T3N0	T2N1	T3N1	T2N1	T3N1	M1

En los estudios citados también se observa que el grado de diferenciación del tumor determina la supervivencia, de forma que los tumores pobremente diferenciados tienden a producir invasión más fácilmente que los moderadamente y bien diferenciados<sup>(47)</sup>. La determinación de este grado de diferenciación depende del patólogo, lo que hace que este sea un parámetro subjetivo y, por tanto, susceptible de una considerable variación entre los diferentes observadores. Por este motivo, esta variable se utiliza, sobre todo, de una forma orientativa en la clasificación de los cánceres colorrectales, sin ser un factor determinante que modifique la actitud terapéutica ante este tipo de tumores.

## **2.5 DIAGNÓSTICO:**

Los medios empleados para el diagnóstico de un cáncer colorrectal van a depender de la forma de presentación del mismo. Esta forma de presentación puede ser:

- aguda o urgente
- crónica o electiva

Cuando la presentación es crónica la sintomatología va a depender de la localización del tumor. La forma urgente se presenta cuando ocurre una de las complicaciones del cáncer: perforación, obstrucción o hemorragia. Habitualmente cuando

el enfermo presenta una de estas complicaciones las técnicas de diagnóstico que se emplean son las rutinarias para determinar la presencia de un abdomen agudo y llevar a cabo la laparotomía urgente para su tratamiento, siendo el diagnóstico etiológico confirmado durante la cirugía.

La proporción de pacientes que se presentan al cirujano con una de estas complicaciones dependen del tipo de práctica que cada uno realiza. Aquellos cirujanos que trabajan en una clínica especializada sin departamento de urgencias tendrán pocas ocasiones de intervenir este tipo de pacientes, sin embargo cuando se atiende una comunidad relativamente importante con un servicio de urgencias, una cuarta parte de los enfermos con cáncer de colon se presentarán con este tipo de complicaciones agudas<sup>(71)</sup>.

La presentación crónica de estos tumores ocasiona diferente sintomatología según la localización del tumor, así los más distales presentan clínica fundamentalmente obstructiva, por el calibre más estrecho de esta porción del colon, así como un contenido fecal menos fluido. Los carcinomas del colon derecho tienden a ser más friables y blandos cursando más frecuentemente con hemorragias, aunque estas consideraciones son de tipo general.

### **2.5.1. SINTOMAS:**

Las generalizaciones comentadas anteriormente para la sintomatología de los tumores con respecto a la localización no pueden tomarse de una forma taxativa, pudiendo presentarse estos síntomas en cualquier localización.

- Cambio en el hábito intestinal: es probablemente el síntoma más frecuente, sobre todo en los de localización izquierda. Puede presentarse tanto estreñimiento como diarrea, aunque a veces la presentación es tan insidiosa que el paciente no lo refiere.
  
- Dolor abdominal: puede variar desde un dolor cólico central a un dolor constante en uno de los cuadrantes abdominales. El dolor constante puede indicar la extensión a órganos adyacentes. Si el paciente tiene una extensión retroperitoneal el dolor se irradia a la espalda.
  
- Sangrado: puede ser franco u oculto. Las lesiones más proximales producen más sangrado y consiguientemente más anemia. En los tumores más distales el sangrado puede aparecer como una pequeña cantidad de sangre roja con la deposición que el paciente a veces achaca a hemorroides.

- Expulsión de moco: mezclado con las heces o independiente de ellas. Rara vez la cantidad de moco es profusa. En grandes tumores vellosos rectales a veces se produce deshidratación e hipocaliemia cuando la secreción es abundante.
  
- Pérdida de peso: la pérdida de 1-2 kilogramos de peso puede ser frecuente, aunque no suele ser el motivo de consulta.
  
- Masa abdominal: suele ser descubierta a la exploración por parte del médico, más que por el paciente. La localización depende del sitio del tumor e indica una extensión local avanzada del tumor.
  
- Síntomas relacionados con las metástasis en tumores primarios "silentes" pueden aparecer en el 5% de los pacientes<sup>(41)</sup>. Los síntomas dependerán del órgano afectado.
  
- Otras formas de presentación menos comunes son los abscesos y las fístulas. Una lesión de descendente o sigma puede producir una comunicación colo-vesical. Los signos y síntomas (fecaluria y pneumaturia) son los mismos que los producidos en las fístulas por enfermedad diverticular. Muy ocasionalmente se produce un trayecto colo-cutáneo. Otras posibles fistulizaciones son con otra zona del tracto digestivo. Cuando la fístula es

gastrocólica aparece una diarrea importante con pérdida de peso intensa.

### **2.5.2. EVALUACIÓN:**

El examen clínico completo es un paso fundamental en la evaluación de cualquier paciente. En los enfermos con cáncer colorrectal no extendido la exploración no suele presentar alteraciones. A pesar de ello, se pueden encontrar ciertos signos, sobre todo abdominales, que pueden hacer sospechar una patología de dicha localización. En los tumores con gran extensión, e incluso metástasis, además de los signos abdominales se detectan otros relacionados con los órganos afectados. La palpación de una masa abdominal, una caquexia severa, ictericia, etc, indican una enfermedad avanzada.

- Tacto rectal: es una de las exploraciones más importantes, sobre todo si el cáncer es de localización rectal. Debe hacerse con el paciente consciente y el colon sin preparar. El 75% de los tumores de los dos tercios inferiores del recto son palpables mediante esta exploración, pudiendo determinarse la localización, forma y afectación del tumor<sup>(216)</sup>. Otros tumores más altos pueden ser palpables por fuera de la pared del recto. Mediante el tacto rectal se pueden obtener signos indirectos de tumores de localización más alta, como el contenido de sangre en las heces, y que nos

deben hacer sospechar la existencia de una patología en el colon.

### **2.5.3. PROCTOCOLONOSCOPIA:**

Cada vez va siendo más aceptada la idea de que esta prueba es la primera que debe ser realizada ante la sospecha de un cáncer colorrectal, habiendo superado al enema baritado como primera exploración. La realización de la colonoscopia permite tanto una visión directa de la lesión, como la toma de biopsia que confirma el diagnóstico. En tumores estenosantes tiene el inconveniente de no permitir la exploración de todo el colon pudiendo pasar desapercibidas lesiones sincrónicas. Asimismo si existen pólipos pequeños en el colon, se pueden extirpar endoscópicamente. La presencia de lesiones cancerosas sincrónicas se han descrito en el 1.5%-8% de los casos<sup>(116,156,174)</sup>, y la incidencia de pólipos benignos sincrónicos en el 12%-62%<sup>(64,174)</sup>.

### **2.5.4. ENEMA OPACO:**

Aunque ha existido una controversia sobre las ventajas del enema simple o con doble contraste, está generalmente aceptado que la técnica de doble contraste es la indicada. La lesión tumoral se aprecia más comúnmente como una estenosis, describiéndose la típica imagen en "corazón de manzana". Las

estenosis carcinomatosas se diferencian de los espasmos del colon por ser lesiones constantes que no se modifican con las contracciones, ocupación de espacio en la luz intestinal (más frecuentes en el colon derecho) o defectos de repleción.

La realización del enema baritado permite valorar toda la extensión del colon, diagnosticando la existencia de lesiones sincrónicas asociadas. Sin embargo, existen una serie de patologías en las que puede ser difícil hacer un diagnóstico diferencial: enfermedad de Crohn, marcada enfermedad diverticular, lesiones isquémicas, lesiones por radiación y otro tipo de estenosis. Asimismo, si el colon no está preparado correctamente pueden producirse falsos positivos. Incluso en las manos más expertas el número de falsos positivos de la prueba es del 0.8% y el de falsos negativos del 6.9% <sup>(114)</sup> .

#### **2.5.5. ESTUDIOS DE FUNCIÓN HEPÁTICA:**

Los estudios de función hepática se realizan habitualmente, pero los resultados anormales no siempre son específicos para enfermedades metastásicas. Puede haber incluso enfermos con función hepática normal y presentar metástasis. La alteración de estas pruebas (transaminasas, fosfatasa alcalina, gammaglutamiltranspeptidasa) es inespecífica puesto que sólo indican que hay una disminución del tejido hepático normal al ser ocupado el hígado por



lesiones ocupantes de espacio, o comprimirse la vía biliar. Tarter y cols. encontraron que menos de la mitad de los pacientes con unos valores de función hepática elevados preoperatoriamente tenían una enfermedad metastásica demostrable en el hígado en la laparotomía.

#### **2.5.6. OTROS ESTUDIOS RADIOLÓGICOS:**

Para demostrar nódulos metastásicos intrabdominales, sobre todo hepáticos, la mejor prueba es la Tomografía Computerizada (CT) abdominal. Es preferible a la ecografía, puesto que no depende del observador, descubre lesiones más pequeñas, valora toda la cavidad abdominal y es fácilmente comparable con otros CT posteriores. La realización de esta prueba no es esencial en el estudio preoperatorio, porque en la mayoría de los pacientes la resección del tumor primario está indicada a pesar de la existencia de metástasis, para prevenir obstrucción o sangrado. No hay que olvidar que, en los tumores tratados con intención paliativa, la resección es la mejor paliación.

- Ecografía endorrectal: La realización de ecografía endo-rectal en los tumores de recto determina la profundidad de la invasión en la pared del colon y las metástasis ganglionares regionales, por lo que se está extendiendo su uso para la valoración preoperatoria de lesiones rectales.

Cuando se detectan tumoraciones limitadas a la mucosa se puede realizar una resección transanal de la lesión.

#### **2.5.7. MARCADORES TUMORALES:**

El marcador tumoral más ampliamente utilizado en el diagnóstico y seguimiento del cáncer colorrectal es el antígeno carcinoembrionario (CEA). Fue descrito por Gold y Freedman en 1965<sup>(68,69)</sup>. Su elevación no es indicativa de enfermedad tumoral puesto que también puede elevarse en pacientes con colelitiasis, hepatitis alcohólica y crónica activa, diverticulitis, pancreatitis, fallo renal, mastopatía fibroquística y en fumadores. Es de gran interés en el seguimiento de los enfermos, porque cuando se realizan resecciones curativas los niveles bajan y una nueva elevación hace sospechar una recidiva tumoral. Una revisión de varias series ha indicado que unos niveles preoperatorios elevados de CEA se correlacionan con una peor supervivencia independientemente del estadio de la enfermedad.

Otros marcadores tumorales como el antígeno carbohidrato 19-9 (CA 19-9), antígeno polipéptido tisular (TPA) y antígeno carbohidrato 50 (CA 50) son de utilidad, sobre todo si se determinan en conjunto, aumentando así la sensibilidad de la determinación.

La determinación de anticuerpos de CA 19-9 es más sensible que otros marcadores, cuando se usan de forma aislada, en todos los estadios de la enfermedad. En un estudio de Alvarez y cols. se vio que sus valores disminuían rápidamente tras 7 días de la resección y se elevaban poco tiempo después de aparecer una recurrencia hasta 535.5 U/ml<sup>(3)</sup>. La determinación monoclonal de CA 19-9 debe ser incluida en el diagnóstico y seguimiento postquirúrgico del adenocarcinoma colorrectal.

Niveles muy elevados de CEA y CA 19-9 parecen indicar que la masa tumoral no es resecable y, en ausencia de metástasis, sugiere irresecabilidad debido a extensión locorregional o carcinomatosis debido a diseminación peritoneal<sup>(49,111)</sup>.

El marcador CA 50 tiene una tasa de falsos positivos mayor que la observada para el CA 19-9, aunque la sensibilidad es similar<sup>(19,111)</sup>. Ambos antígenos son específicos para el cáncer colorrectal<sup>(96)</sup>.

El marcador TPA es muy sensible, pero poco específico. La determinación conjunta de CEA-TPA-CA 19-9 proporciona una sensibilidad de hasta el 78% en estadio B y 91% en estadio C. Sin embargo para alcanzar mejores resultados es necesario añadir la medición de CA 50, llegando así al 83% en estadio B y 93% en estadio C<sup>(3)</sup>.

### 2.5.8. PLOIDÍA TUMORAL:

Los estudios sobre la ploidía tumoral mediante citometría de flujo han determinado que los tumores no diploides tienen un peor pronóstico, así los tumores en estadios precoces de la clasificación de Astler y Collier tienden a ser diploides, mientras que los más tardíos tienden a ser aneuploides. Las primeras publicaciones sobre citometría de flujo en los tumores colorrectales, como la de Gómez Alonso y cols. (1991)<sup>(73)</sup>, indicaron que los tumores aneuploides tienen un peor pronóstico, mayor índice de recidiva y responden peor al tratamiento complementario. Posteriormente otros estudios no han podido confirmar estos hallazgos, probablemente al introducir factores que pueden llevar a confusión por la no uniformidad de las muestras, teniendo los tumores un grado de Dukes más avanzado, predominio de localización rectal, etc. Kokal y cols. demostraron que la aneuploidía es un predictor independiente de enfermedad metastásica<sup>(109)</sup>.

Los estudios mediante citometría de flujo valoran la cantidad global de ADN que tienen las células, sin poderse diferenciar las alteraciones de cada cromosoma, por lo que si existe una monosomía de uno y una trisomía de otro, el resultado global será un tumor diploide, lo que puede conllevar una infravaloración del resultado.

El papel exacto de estos resultados está todavía por determinar, una vez que se avance en el conocimiento de las alteraciones genéticas en el cáncer de colon.

## **2.6. TRATAMIENTO:**

El tratamiento curativo de esta enfermedad sigue siendo exclusivamente quirúrgico a pesar de los avances conseguidos en otro tipo de terapias. Se realiza colectomía derecha, transversa, izquierda, resecciones anteriores y amputaciones abdominoperineales, según la parte afectada; con linfadenectomía regional.

El objetivo del tratamiento quirúrgico del carcinoma de colon es la resección del tumor con un margen amplio, realizando una excisión de la zona tumoral, así como de los ganglios linfáticos regionales, con atención a la vascularización del segmento, y con la realización de una anastomosis sin tensión. Determinar la distancia que hay que dejar en el margen de resección puede ser problemática. Dependiendo del tiempo de la medición un margen de 5 cm. medido "in situ", puede ser reducido a 2 cm. en la pieza de resección<sup>(214)</sup>. En los tumores rectales en los que se pretende la conservación de esfínteres se permite que la extirpación sea a 2-2.5 cm. del tumor para poder realizar este tipo de cirugía con la misma garantía que la amputación abdomino-

perineal<sup>(41)</sup>. Si este margen no puede ser respetado será necesario realizar una amputación abdomino-perineal, lo que es más frecuente en tumores situados en la parte distal del tercio medio o en los de tercio distal (8 cm. del margen anal).

La utilización de sustancias tumorocidas tópicas para evitar las recidivas locales parece ser efectiva.

El tratamiento quirúrgico de los cánceres de colon operados por alguna complicación aguda debe seguir los mismos criterios oncológicos para la resección que si se operaran de forma programada. La diferencia fundamental en la cirugía de estos tumores depende de la posibilidad de hacer anastomosis primaria, con o sin colostomía de protección. La tendencia actual es realizar lavado intraoperatorio o utilizar mecanismos de protección interna de la sutura que eviten la necesidad de colostomía de protección.

Actualmente se están realizando colectomías por vía laparoscópica pura o asistida por una minilaparotomía. El inconveniente que plantea este tipo de tratamiento es la posibilidad de realizar una linfadenectomía amplia, aunque sus defensores insisten en la posibilidad de su realización, siguiendo por lo tanto los principios clásicos de resección oncológica, aunque este punto es bastante discutido.

Las metástasis hepáticas del carcinoma colorrectal deben ser tratadas quirúrgicamente. Su tratamiento puede ser realizado en el momento de la primera intervención, aunque en cirugía de urgencia, cuando no se ha podido evaluar preoperatoriamente un estudio de la extensión tumoral, es preferible llevarlo a cabo en un segundo tiempo.

En general si se detecta un pequeño foco tumoral en un margen hepático y no se palpa ninguna otra lesión, debe ser resecado. Cuando existen múltiples metástasis bilobares no está indicada la extirpación. Aunque la valoración de la indicación según el número de metástasis no puede ser estricta, está aceptado que hasta un número de 4-5 lesiones pueden ser resecaadas con un porcentaje de supervivencia a largo plazo similar<sup>(29,54,95)</sup>. Si las lesiones aparecen como un nódulo principal y varios satélites alrededor de éste, se considera como única a efectos de resección y supervivencia<sup>(115)</sup>.

Si se diagnostica una enfermedad unilobar o un nódulo solitario es preceptivo realizar una angiografía hepática, o más recientemente una TAC portografía, para valorar la presencia de otras lesiones hepáticas y la relación de éstas con la vascularización (sobre todo venosa; porta y suprahepáticas). Es aconsejable hacer una ecografía intraoperatoria porque permite una mayor resolución de las imágenes, los márgenes del parénquima pueden ser determinados fácilmente y se pueden tomar biopsias de lesiones dudosas.

El margen de seguridad que hay que resear alrededor de la lesión está relacionado con la supervivencia a largo plazo. Para conseguir los mejores resultados hay que dejar un margen de al menos 1 cm.<sup>(71,186)</sup>. Distancias menores conllevan una menor supervivencia.

La tasa de supervivencia a los 5 años después de su resección es del 25%-33%, sin embargo sin resección es del 0%  
(1,91,175,217).

Cuando el tumor se extiende a órganos de vecindad éstos deben ser resecados. La resección de intestino delgado o grueso, pared vesical, útero, trompas y ovarios, estómago, bazo, cola de páncreas, duodeno, hígado y partes de la pared abdominal infiltradas, puede ser realizada para tratamiento con intención curativa o para ofrecer una mejor paliación. Debido a las diferencias en la naturaleza biológica de las neoplasias, ocasionalmente un tumor invadirá localmente y no metatastizará hasta las últimas fases del desarrollo tumoral. Si este tumor locamente invasivo no se reseca, el paciente puede cursar con sintomatología durante largo tiempo, y aparecer complicaciones como obstrucción intestinal, sangrado, protrusión visible del tumor o dolor muy intenso. Todas estas situaciones pueden ser prevenidas por una actuación más agresiva en la extirpación en el momento de la



operación inicial, sin aumentar de una forma considerable la mortalidad operatoria.

Los nódulos pulmonares solitarios deben ser resecaados. La mitad de los nódulos pulmonares solitarios de los pacientes con historia de cáncer de colon son metastásicos de ese tumor primario<sup>(30)</sup>. No hay que olvidar que el cáncer de pulmón es la primera causa de cáncer en el hombre y que en un paciente pueden aparecer los dos tipos de tumores, sin ser esta asociación una contraindicación para la resección. En la experiencia de McCormack y Attiyeh la supervivencia a los 5 años es del 22% y ésta es mayor en los estadios A y B<sup>(136)</sup>, por lo que un nódulo solitario pulmonar, como única lesión metastásica de un cáncer de colon, debe ser resecaado.

Los cánceres en estadio B2 o C deben recibir además tratamiento coadyuvante, así como los tumores resecaados de forma paliativa<sup>(75)</sup>. Actualmente el tratamiento adyuvante quimioterápico se compone de levamisol y 5-Fluoruracilo, puesto que esta asociación se ha mostrado más efectiva que el uso de levamisol de forma aislada<sup>(187)</sup>.

El tratamiento de las metástasis hepáticas, como ya se ha indicado, es, siempre que sea posible, quirúrgico. Cuando las lesiones hepáticas no pueden ser extirpadas se pueden tratar para intentar su control y su reducción. Además de la quimioterapia sistémica, en estos enfermos se puede emplear la quimioterapia intraarterial para un tratamiento más

directo de la lesión. Actualmente se están intentando otros procedimientos como el empleo de inmunoestimuladores previo al tratamiento quimioterápico, para mejorar la respuesta.

En los tumores con infiltración linfática, con el tratamiento quimioterápico, se consigue un aumento tanto del tiempo libre de enfermedad, como de la supervivencia. Sin embargo, en aquellos en los que sólo existe invasión de la pared intestinal no se consigue un aumento sobre la supervivencia global, aunque sí se incrementa el intervalo libre de enfermedad<sup>(75,87)</sup>. Estos resultados en cánceres de estadio B hacen pensar que dentro de este grupo existen determinados tumores asociados a un mayor riesgo.

El poder detectar un marcador del riesgo en estos tumores podría determinar aquellos que se beneficiarían de una terapia más agresiva, en contra de esos otros que por su mejor pronóstico no necesitarían de estos tratamientos, con lo cual se evitarían sus efectos secundarios.

En los cánceres de recto se puede asociar al tratamiento anterior la radioterapia local intraoperatoria para disminuir la incidencia de recidiva local. En el resto de tumores de colon la radioterapia es un tratamiento que se está abandonando, puesto que sólo intenta conseguir una disminución de las recidivas locales, sobre todo, en tumores cuyo margen de reseccabilidad no ha podido ser suficientemente amplio.

## 2.7. SEGUIMIENTO:

De todos los pacientes con carcinoma colorrectal un tercio tendrán una enfermedad irresecable en el momento del diagnóstico, y dos terceras partes serán resecadas con intención curativa. El 40% de aquellos enfermos que son resecados de forma curativa desarrollarán una recidiva de la enfermedad<sup>(119,143)</sup>. Con los nuevos tratamientos adyuvantes el número de pacientes con enfermedad recurrente puede disminuir, pero siempre existirá un número de pacientes en los que la enfermedad recurrirá. La identificación precoz de la recidiva puede detectar más pacientes que pueden ser tratados mediante intervención quirúrgica de intención curativa.

La función del seguimiento postoperatorio en los enfermos resecados con intención curativa es la detección de la recurrencia tumoral en un estadio precoz, cuando todavía pueda ser curable, y la detección y posible prevención del carcinoma metacrónico. Después de la resección por carcinoma colorrectal, casi todas las recidivas aparecen en los primeros cinco años. De los tumores que recurren, el 85% lo hacen en los primeros 30 meses, y el resto en los siguientes<sup>(190)</sup>. Por ello la vigilancia de los enfermos debe extremarse en estos primeros años tras la resección. Los

riesgos de aparición de recidiva de enfermedad tumoral es mayor cuando el tumor está en un estadio avanzado en el momento del diagnóstico; los tumores con estadio B ó C, con mayor grado de anaplasia, ploidía anormal e invasión de estructuras adyacentes, tienen más riesgo de recurrencia.

#### **2.7.1. MÉTODOS DE SEGUIMIENTO:**

**A.** Historia y examen físico: Síntomas tales como pérdida de peso, fatiga, rectorragia, dolor abdominal o pélvico, cambios en el tránsito intestinal, etc, pueden indicar la aparición de una recidiva.

**B.** CEA: Una elevación del CEA después de una resección con intención curativa suele significar recurrencia. La tasa de incremento de la concentración de CEA puede ser de mayor importancia que el valor absoluto. Sin embargo, al ser una prueba inespecífica, sólo una elevación confirmada mediante otro test, será significativa. Si la repetición revela unos valores normales no está indicado incrementar el seguimiento y se podrán realizar los controles rutinarios.

Otros marcadores que han sido empleados en un intento de aumentar la sensibilidad para detectar recidivas tumorales incluyen varias proteínas reactantes de fase aguda, transferrina y ceruloplasmina. Actualmente se determinan otros antígenos tumorales para el seguimiento del cáncer de

colon, como el CA 19-9, CA 50 y el TPA. La determinación seriada de varios marcadores tumorales aumenta la sensibilidad de la determinación.

**C. Proctosigmoidoscopia y colonoscopia:** Es necesario evaluar tanto la aparición de tumor en la línea de sutura, como en el remanente cólico. Se han demostrado lesiones malignas metacrónicas en el 8% de los enfermos. Se aconseja realizar una colonoscopia anualmente durante los primeros cuatro años tras la intervención.

Esta técnica es preferida al enema opaco durante el seguimiento, excepto para la valoración de compresiones extrínsecas del colon que pueden ser determinadas mejor por el enema baritado.

**D. Estudios por imagen:**

- Ecografía abdominal: Es una técnica rápida, que no radia al enfermo y que permite una visualización aceptable del hígado, por lo que es de gran uso para el control de las metástasis hepáticas. El inconveniente de la técnica es que su fiabilidad depende del observador y de que no valora el resto de la cavidad abdominal, sobre todo cuando existe una cirugía previa. Su uso combinado con la TAC permite no someter al enfermo a una radiación excesiva al mismo tiempo que se controla la aparición de nuevas lesiones hepáticas.

En las intervenciones por metástasis hepáticas la ecografía intraoperatoria determina si existen lesiones intrahepáticas que no se hayan podido diagnosticar preoperatoriamente, así como su relación con las venas porta y suprahepáticas, con lo que la decisión de resección puede ser variada. Por este motivo se está haciendo habitual y necesario la realización de esta prueba en todas las resecciones hepáticas por tumor.

- Tomografía Computerizada: Es usada para detectar metástasis hepáticas, pulmonares y pélvicas, así como valorar la extensión de la enfermedad hepática para reseccionar las metástasis. Los cambios en la pelvis son más difíciles de detectar por CT puesto que en los enfermos operados se aprecian cambios postquirúrgicos que alteran la anatomía de la región. Por ello es importante realizar una TAC en el postoperatorio que sirva de control.

Cuando se aprecia una lesión hepática, o en otra localización en la cavidad abdominal, la punción-aspiración guiada con CT es una técnica muy útil para obtener una muestra para el diagnóstico citológico. La combinación de CT con angioportografía es una técnica de imagen que está ganando una gran aceptación. Mediante esta prueba se resalta una lesión más vascularizada, pudiendo apreciarse lesiones pequeñas que pueden haber pasado desapercibidas en la TAC sin

contraste portal, además de verse la relación de los nódulos con los vasos hepáticos.

- Resonancia Magnética Nuclear: El papel de esta prueba es similar al dla TAC. En las recidivas pélvicas se suponía mejor para su diagnóstico, sin embargo no está totalmente probado.

- Radiografía de Tórax: Las metástasis pulmonares ocurren en el 10% de los pacientes. Cuando son únicas pueden ser reseçadas con una supervivencia a los 5 años del 15% al 35%<sup>(30,136,150)</sup>.

- Ecografía Endorrectal: Aunque se utiliza principalmente en el estadiaje de las lesiones primarias es bastante útil para el seguimiento de las recidivas locales de los cánceres de recto en las resecciones en las que se realiza anastomosis.

E. "Second-Look": Cuando se detecta una recidiva, la resección quirúrgica ofrece los mejores resultados de curación. Wangenstein propuso en 1949 la laparotomía exploradora, en un intento de aumentar la tasa de curación en enfermos con metástasis ganglionares en el momento de la primera intervención<sup>(209)</sup>. A estos enfermos se les realizaba una segunda laparotomía a los 6 meses y al año de la operación. Obviamente el número de enfermos reoperados sin demostrar recidiva era alto. Sólo el 15% de los enfermos

intervenidos por Wangensteen tenían recurrencia de la enfermedad en el momento de la relaparotomía. Por ello esta idea se abandonó hasta la determinación del CEA. Cuando la laparotomía "second-look" se realiza al detectarse niveles altos de CEA, la tasa de encontrar recurrencia es alta.

Actualmente existen técnicas por imagen que ofrecen una valoración del abdomen suficientemente buena como para que se haya abandonado esta práctica. Sólo en casos muy concretos, sobre todo en recidivas pélvicas, donde no se pueda determinar si los hallazgos corresponden a una recidiva o a cambios postquirúrgicos, y el diagnóstico citológico no sea concluyente, estaría indicada la relaparotomía. En nuestro Servicio somos partidarios de intervenir a todos los enfermos con sospecha de recidiva y realizar su resección siempre que sea posible, tanto para ofrecer una posibilidad de curación, como una mejor paliación de la enfermedad.

#### **2.7.2. PROTOCOLOS DE SEGUIMIENTO:**

Los fines del seguimiento son la detección precoz de neoplasias sincrónicas (si no se ha realizado colonoscopia previamente a la cirugía), detección de enfermedad metacrónica, identificación de recurrencia local o diseminada



del tumor original y la evaluación general del paciente y sus familiares en los casos conocidos de tumor hereditario.

Cuando se reseca un tumor con intención curativa el paciente puede ser observado según varios modelos de seguimiento, incluyendo no realizarlo; hacer estudios según protocolos establecidos o seguimiento particularizado según el médico que trata al paciente.

No existe consenso sobre la frecuencia con la que se debe realizar, las técnicas que deben ser empleadas para detectar la recurrencia o, incluso, el beneficio derivado de un diagnóstico precoz de la recidiva. Cuando el enfermo no es seguido de forma sistemática debe ser avisado de la posibilidad de aparición de síntomas y la necesidad de consultar cuando éstos ocurran. Para poder diagnosticar una posible recidiva en un estadio potencialmente tratable lo indicado es seguir protocolos de seguimiento. A causa de que la recurrencia suele aparecer en los primeros dos años tras la resección, la vigilancia debe ser más estrecha en ese periodo de tiempo.

En la siguiente tabla se expone el protocolo de seguimiento realizado en nuestro Servicio para los enfermos operados de carcinoma colorrectal con intención curativa.

Tabla V: Protocolo de seguimiento del cáncer colorrectal

	Análítica Marcadores T.*	Ecografía	CT	Colonosco- pia	Rx Tórax
1 mes	X		Xr	X*	
3 meses	X	X			
6 meses	X		X	X	X
9 meses	X				
12 meses	X		X	X	X
18 meses	X	X			
24 meses	X		X	X	X
30 meses	X	X			
36 meses	X		X	X	X
42 meses	X	X			
48 meses	X		X	X	X
54 meses	X	X			
60 meses	X		X	X	X

\*: CEA, CA 19-9, CA 50 y TPA.

Xr: en tumores rectales.

X\*: si no se realizó preoperatoriamente.

A partir del quinto año se realiza exploración, analítica, determinación de marcadores y ecografía abdominal anualmente y cada dos años CT abdominal, colonoscopia y Rx de tórax.

El mayor incremento en la supervivencia se consigue con la detección precoz de la enfermedad primaria. Para ello es importante estudiar la enfermedad en los familiares de primer

grado puesto que está descrito que tienen una incidencia mayor de padecer la enfermedad. Así mismo se describen alteraciones genéticas que pueden ser transmitidas de forma familiar y que pueden ser causa del cáncer colorrectal.

Con las técnicas de biología molecular se pueden identificar los individuos portadores de una enfermedad hereditaria, como la poliposis familiar adenomatosa y el síndrome de Lynch, y se pueden tratar de forma profiláctica realizándose colectomías cuando comienza a desarrollarse la enfermedad, y antes de que aparezca el carcinoma.

El paso futuro será detectar aquellas alteraciones genéticas que ocasionan el cáncer de colon esporádico y aquellas que hacen que un tumor sea más agresivo y con mayor capacidad de metastatizar, de forma que los enfermos en los que se detecten estas alteraciones serán seguidos de una forma más estrecha y recibirán un tratamiento coadyuvante más intenso, con el fin de prolongar su intervalo libre de enfermedad y su supervivencia global.

## **2.8. FACTORES ETIOLÓGICOS:**

La diferente distribución del cáncer colorrectal en los diferentes países se supone debida a una serie de factores ambientales, puesto que cuando emigran de poblaciones de baja

incidencia a otras de alta, se ven afectados por un mayor riesgo de padecer la enfermedad.

### **2.8.1. FACTORES DIETÉTICOS:**

-- Fibra: La baja ingesta de fibra en la dieta se relaciona con mayor riesgo de padecer cáncer colorrectal en los países desarrollados. Una alta ingesta produce una reducción del tiempo del tránsito intestinal, por lo que se reduce la exposición de la mucosa a potenciales carcinógenos. Asimismo, la posibilidad de que las bacterias intestinales produzcan carcinomas está disminuida, por un efecto de dilución de las mismas al ser la heces de mayor volumen<sup>(25)</sup>. Sin embargo, cuando se estudia el factor de protección de la fibra sobre cáncer inducido experimentalmente, no se demuestra este efecto<sup>(44)</sup>. La ingesta de fibra es una idea atractiva y está apoyada por ciertas evidencias, pero hay pocas pruebas científicas para demostrar estos hallazgos.

-- Grasas Animales: La alta ingesta de este tipo de nutrientes se correlaciona con una mayor incidencia de cáncer colorrectal. La implicación de la grasa parece debida a que favorece el desarrollo de una flora bacteriana con microorganismos capaces de degradar las sales biliares a carcinógenos. Asimismo esta dieta produce una mayor excreción de sales biliares<sup>(169-171)</sup>.

-- Otros Factores Dietéticos: relacionados con mayor riesgo son una ingesta baja de vegetales, exceso de alcohol, alta toma de azúcar, dieta depleccionada de potasio y baja toma de calcio.

### **2.8.2. ÁCIDOS BILIARES:**

Estos ácidos pueden tener un efecto tóxico directo sobre la mucosa. El ácido deoxicólico y el litocólico se han demostrado carcinogénicos. Se han encontrado receptores para el ácido deoxicólico en un tercio de los tumores colorrectales<sup>(191)</sup>, así como receptores para el ácido litocólico<sup>(199)</sup>. Su efecto sobre la mucosa parece depender de la cantidad de calcio presente en la dieta. Los ácidos biliares y las grasas pueden ser tóxicos por ser secuestradores del calcio. Las dietas pobres en calcio producen una descamación y proliferación celular y en estas circunstancias los ácidos biliares que no se hayan unidos al calcio están libres para causar una alteración en el ADN celular, pudiendo provocar cambios neoplásicos<sup>(9,10,79)</sup>.

### **2.8.3. COLECISTECTOMÍA PREVIA:**

Aunque no existen datos concluyentes, la cirugía biliar puede aumentar el riesgo de padecer cáncer colorrectal, más frecuentemente del colon derecho, en aquellos pacientes

mayores de 60 años, con un periodo de latencia tras la cirugía de al menos diez años.

#### **2.8.4. ENFERMEDADES INFLAMATORIAS:**

Los enfermos con colitis ulcerosa tienen un mayor riesgo de padecer cáncer colorrectal. Este riesgo difiere según los estudios. Se ha estimado que la incidencia acumulada de cáncer colorrectal en estos enfermos es de hasta el 35% a los 25 años de aparecer los síntomas y aumenta hasta un 45% cuando la enfermedad debuta antes de los 25 años<sup>(104)</sup>.

La incidencia de cáncer colorrectal en pacientes con enfermedad de Crohn no es tan conocida, aunque se estima que tienen un riesgo de padecer cáncer colorrectal 4 a 6 veces más elevado que en la población general.

La infección por *Schistosoma japonicum* puede dar lugar a carcinoma de colon en aquellos países donde es endémico<sup>(38)</sup>. Otras enfermedades como diverticulosis o granulomas amebianos, tuberculosos o sifilíticos no se han relacionado con mayor incidencia de cáncer.

#### **2.8.5. RADIACIÓN:**

Aquellos pacientes que han sufrido radiación pélvica tienen de una a ocho veces mayor riesgo de padecer cáncer

colorrectal<sup>(178)</sup>. El 58% de estos tumores eran carcinomas coloides, y este es un porcentaje significativamente mayor que en los no irradiados. El periodo de latencia entre la radioterapia y la aparición del tumor es al menos de diez años<sup>(33)</sup>.

#### **2.8.6. SECUENCIA ADENOMA-CARCINOMA:**

La relación entre la presencia de adenomas y la posibilidad de desarrollarse un carcinoma en el colon está demostrada en la clínica y se aprecia de una forma clara en las enfermedades polipósicas hereditarias.

La nomenclatura en relación con los adenomas ha sido confusa en el pasado, principalmente porque los patólogos y los cirujanos los han clasificado de forma diferente. Para eliminar esta confusión terminológica la OMS recomendó una basada en la histología<sup>(146)</sup>:

1. Adenoma tubular: Macroscópicamente es pequeño, esférico y pediculado. Su tamaño oscila entre 1mm. y 5 cm. de diámetro. Menos frecuentemente son pólipos sésiles. Su color es ligeramente más oscuro que el de la mucosa que los circunda debido a pequeñas hemorragias que frecuentemente ocurren por pequeños traumas. Microscópicamente consisten en túbulos epiteliales

separados por lámina propia normal con crecimiento y ramas horizontales a la muscularis mucosae<sup>(48)</sup>.

2. Adenoma vellosos: Su tamaño suele ser grande y de aspecto sésil. Su consistencia es blanda y sus bordes mal definidos. Frecuentemente se extienden sobre una considerable área de pared intestinal. Su color es más oscuro que la mucosa de alrededor por las mismas razones que los adenomas tubulares. Histológicamente consiste en un corazón central de tejido conectivo que forma numerosas ramas de vellosidades. Las células epiteliales que cubren las vellosidades y constituyen su superficie crecen verticalmente hacia la luz del intestino.
3. Adenomas túbulo-vellosos: Es una forma intermedia de adenoma que tiene elementos del patrón tubular y del vellosos en diferentes grados.

Los adenomas neoplásicos verdaderos del colon suelen malignizar con una frecuencia variables según se describan series de adenomas resecados endoscópicamente, quirúrgicamente o sean series de autopsias. Esta diferencia está determinada por el tamaño del pólipo<sup>(55, 76, 149)</sup>. Los pólipos menores de 1 cm. de diámetro no suelen tener focos de degeneración neoplásica.



En una serie de 1856 pólipos descrita en 1958 se encontró un porcentaje de cáncer de 6.3%<sup>(76)</sup>. En una serie de Muto y cols. de 1985 el porcentaje es de 8%<sup>(153)</sup>.

La posibilidad de degeneración es la misma para los tres tipos de adenomas. Clásicamente se ha descrito que los adenomas vellosos malignizan con mayor frecuencia, sin embargo esto es debido a que alcanzan un mayor tamaño. La formación del cáncer depende, pues, del tamaño del pólipo, no del tipo histológico. En la tabla VI se representa la relación de la degeneración tumoral con respecto al tamaño y al tipo histológico.

Tabla VI: Relación entre la degeneración carcinomatosa y el tamaño y el tipo histológico de los pólipos.

	< 1 cm. (%)	1-2 cm. (%)	> 2 cm. (%)
<b>Pólipo Tubular</b>	76.6	19	3.7
Cáncer	1	10	34.7
<b>Pólipo Túb.velloso</b>	24.7	46.8	28.5
Cáncer	3.9	7.4	45
<b>Pólipo Velloso</b>	14	25	60
Cáncer	9.5	10.3	52

Aunque se resequen los pólipos cuando el foco de degeneración es muy pequeño, siempre existe riesgo de extensión tumoral en el momento de la extirpación. El 10% de los pólipos resecados por endoscopia tienen extensión linfática en el momento de la resección. En los vellosos malignizados y resecados quirúrgicamente este porcentaje asciende al 25%.

#### **2.8.7. OTROS FACTORES:**

\* Cuando se realiza una derivación urinaria al colon puede aparecer un cáncer en el segmento de colon utilizado. La localización es invariablemente alrededor de la anastomosis y el tiempo de latencia es no menor de veinte años<sup>(83,105,144,195,202,215)</sup>.

\* Cirugía gástrica: Diversos estudios retrospectivos han identificado un aumento de la mortalidad por cáncer de colon después de cirugía por úlcera péptica, aunque esta asociación es controvertida<sup>(24,212)</sup>. El riesgo general tras cirugía gástrica se dobla con respecto a sanos, pero difiere según el tipo de técnica quirúrgica. Un análisis realizado en este sentido refleja un riesgo 9.5 veces mayor en las mujeres tratadas con gastrectomía Billroth I y una mortalidad 8 veces mayor en mujeres con úlcera duodenal tratadas con vagotomía y piloroplastia<sup>(35)</sup>. Este riesgo puede ser debido a un cambio en el metabolismo de los ácidos biliares. Los enfermos

vagotomizados desarrollan significativamente más adenomas y carcinomas colorrectales que la población control, y esto parece debido a un aumento de los ácidos deoxicólico y litocólico en la bilis de estos pacientes<sup>(151)</sup>.

\* Factores genéticos: existen unas enfermedades hereditarias que en su evolución desencadenan la aparición del cáncer colorrectal. Asimismo se están realizando estudios de biología molecular en cáncer de colon y recto esporádicos que están permitiendo conocer una serie de genes implicados en la aparición de este tipo de tumoraciones.

## **2.9. GENÉTICA DEL CÁNCER COLORRECTAL:**

### **2.9.1. PREDISPOSICIÓN HEREDITARIA:**

El cáncer colorrectal sigue siendo un enigma en su etiología. Durante años se ha postulado su relación con la edad, la dieta y una predisposición genética. Se estima que el 5 y el 10% de todos los cánceres colorrectales tienen una predisposición hereditaria<sup>(205)</sup>, habiéndose descrito varios síndromes polipósicos hereditarios. La clasificación de estos síndromes realizada por Morson en 1962<sup>(147)</sup> se encuentra resumida en la tabla VII.

Tabla VII

<b>Clasificación de los Síndromes Polipósicos</b>	
<b>Neoplásicos</b>	Poliposis Familiar Adenomatosa Síndrome de Gardner Síndrome de Turcot Pólipos Linfosarcomatosos Pólipos Leucémicos
<b>Inflamatorios</b>	Colitis Ulcerosa Enfermedad de Crohn Otros
<b>Hamartomatosos</b>	Poliposis Colónica Juvenil Síndrome de Peutz-Jeghers Pólipos Neurofibromatosos Síndrome de Rubalcaba-Myrthe-Smith Pólipos Lipomatosos Síndrome Cronkhite-Canadá Enfermedad de Cowden
<b>Inclasificados</b>	Pólipos Metaplásicos Neumatosis Quística Intestinal

Además de las enfermedades que cursan con pólipos se han descrito otras patologías hereditarias en cuyo curso se desarrolla el cáncer colorrectal.

Los cánceres de colon hereditarios con más incidencia se encuentran englobados principalmente en:

- Poliposis Familiar Adenomatosa (FAP)
- Síndrome de Lynch o cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC). En este síndrome se describen dos formas de presentación:

\* Síndrome de Lynch I

\* Síndrome de Lynch II

La **FAP** y sus variantes, el síndrome de Gardner y el síndrome de Turcot, son las enfermedades polipósicas más importantes desde el punto de vista del cirujano, puesto que una intervención quirúrgica temprana es crucial para prevenir la transformación maligna.

La FAP es una enfermedad hereditaria con transmisión autosómica dominante, que presenta una penetrancia casi completa y ocurre con una frecuencia de 1:7000 a 1:10.000 nacimientos<sup>(2,173)</sup>. Se caracteriza por la presencia de abundantes pólipos (más de cien) en el colon y recto que, en su evolución, invariablemente malignizan y desarrollan un cáncer colorrectal normalmente antes de los 40 años de edad si no se ha realizado la colectomía. Dos casos clínicos comunicados a mediados del siglo XIX son probablemente las primeras descripciones de este síndrome (Corvisart, 1847; Chargelaigue, 1859)<sup>(36,42)</sup>.

La etiología de la poliposis familiar adenomatosa actualmente se encuentra bien determinada. Se origina por una alteración genética en un gen supresor de tumoración (gen APC) localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q21)<sup>(13,123)</sup>. Hasta el 40% de los casos son nuevas mutaciones<sup>(23)</sup>. La

presencia de esta alteración puede determinar aquellos individuos que en el futuro desarrollarán la enfermedad, así como su ausencia caracteriza a los familiares sanos. La detección de esta alteración permite un seguimiento, un diagnóstico y un tratamiento precoz de la enfermedad, mejorando por tanto su supervivencia.

Aunque el número de pólipos debe ser mayor de cien para poder diagnosticar clínicamente la enfermedad, puede haber una considerable variación de caso a caso. Bussey encontró un rango de 157 a 3673 con una media de 981<sup>(27)</sup>. Los pólipos también varían en tamaño, pero sólo el 1% de ellos sobrepasa el centímetro de diámetro. El tipo de pólipo es tanto sesil como pediculado, y también se encuentra variación en la edad de aparición.

La distribución de los pólipos suele afectar a todo el colon; sin embargo, existe una predilección por la afectación izquierda. Histológicamente los pólipos adenomatosos descritos en este síndrome son iguales a aquellos vistos en los pacientes sin poliposis. Frecuentemente el desarrollo de síntomas sugiere que la transformación maligna se ha producido. Esta transformación puede ser única o múltiple. En un análisis de 151 piezas quirúrgicas el 47.5% de ellas tenían múltiples cánceres, hallándose un paciente con siete focos<sup>(27)</sup>.

La presencia de otros pólipos en el resto del tracto digestivo es menos frecuente. En el estómago se han descrito adenomas en el 8.4% de los enfermos<sup>(21,26,97)</sup>, sin embargo estudios realizados en Japón elevan la cifra al 36%<sup>(158,201,210)</sup>. Los adenomas duodenales parecen ser más frecuentes que los gástricos y distribuidos de una forma más uniforme según los diferentes estudios realizados en diversas partes del mundo. La incidencia descrita según las series es del 61% al 100%<sup>(26,97,158,159,203)</sup>. La transformación maligna de estos pólipos, sin embargo, es desconocida, aunque existen evidencias, sobre todo en el duodeno, de que puede ocurrir malignización. Pueden presentarse pólipos en yeyuno e íleon, pero su incidencia por el momento no es conocida.

El **síndrome de Gardner** actualmente no es considerado como una entidad independiente, sino como un grupo de pacientes dentro del espectro de la poliposis familiar adenomatosa. Este síndrome se describe cuando, además de las lesiones intestinales, aparecen asociadas lesiones cutáneas, osteomas o tumores desmoides. Las lesiones cutáneas son quistes epidermoides que se localizan fundamentalmente en cabeza, cuello y brazos, pero pueden aparecer en el resto del cuerpo<sup>(122)</sup>. La localización clásica de los osteomas es en mandíbula y maxilar<sup>(211)</sup>. El hallazgo más común es un engrosamiento de la corteza ósea. Los tumores desmoides ocurren más frecuentemente en la pared abdominal, pero pueden ser encontrados dentro del abdomen y la pelvis. Estos tumores

se desarrollan con frecuencia antes de la enfermedad polipósica. Se ha descrito que la incidencia de tumores desmoides en FAP oscila entre el 4% y el 12%<sup>(22,28,182)</sup>. Desde que se conoce la asociación entre estos tumores y la aparición de pólipos, todo enfermo en el que se diagnostiquen tumores desmoides deben ser investigados para FAP.

El **síndrome de Turcot** fue descrito por Turcot en 1959<sup>(198)</sup> y describe a la poliposis familiar asociada a tumores del sistema nervioso central. Parece ser una identidad independiente, incluso los patrones de herencia difieren de los de la FAP. Frecuentemente, puede ser saltada una generación. Algunos autores han descrito la aparición de síntomas neurológicos antes del desarrollo de los pólipos<sup>(176)</sup>.

Se han referido otras patologías asociadas a FAP, tales como: enfermedades malignas periampulares, cáncer de vía biliar, carcinoma tiroideo, anormalidades dentales, hipertrofia congénita del epitelio pigmentado de la retina y otras.

En el **síndrome de Lynch** la aparición del cáncer se produce en un colon que no presenta poliposis y su diagnóstico se basa en la incidencia familiar de la enfermedad<sup>(130-132)</sup>; los criterios clínicos establecidos por el Grupo Colaborativo Internacional en HNPCC (Criterios de Amsterdam, 1991)<sup>(206,207)</sup> son los siguientes:



- Al menos tres familiares deben haber padecido un cáncer colorrectal.
- Dos de ellos deben ser de primer grado.
- Deben estar afectadas dos generaciones sucesivas.
- Al menos en un individuo de la familia, la aparición del cáncer debe haber sucedido antes de los 50 años de edad.
- No debe tratarse de una FAP.
- La presencia de otros adenocarcinomas define el síndrome de Lynch II. Los tumores asociados suelen ser endometriales, ováricos y gástricos.

La localización de estos tumores es frecuentemente proximal y se asocian a un mejor pronóstico, lo que establece un comportamiento diferente del síndrome de Lynch con respecto a los cánceres colorrectales esporádicos.

La existencia de formas hereditarias de cáncer colorrectal, así como una mayor incidencia de historia familiar en estos enfermos, ha hecho suponer que existe un defecto genético causante del mismo, por lo que desde que se desarrolló la biología molecular en la década de los 70 se ha dedicado un gran esfuerzo a la investigación a este tipo de tumores. Asimismo la presentación del cáncer esporádico se ha supuesto relacionada con la presencia previa de adenomas, de forma que en la mucosa normal del colon se producen adenomas que crecen hacia la luz. De estos no todos progresan hacia

carcinoma, pero se piensa que todos los tumores provienen de adenomas preexistentes que malignizan.

La alta prevalencia, la variación de incidencia entre poblaciones, la presencia de enfermedades genéticas que cursan con esta enfermedad, la secuencia adenoma-carcinoma y el fácil acceso al estudio del colon, han hecho de esta patología un buen modelo para el análisis genético, habiéndose producido importantes avances en estos últimos 10 años sobre las alteraciones genéticas que presentan. Así, se han analizado oncogenes, genes supresores de tumoración, y últimamente genes implicados en la corrección de errores replicativos del ADN que presentan alteraciones en esta enfermedad.

### **2.9.2. GENES TUMORALES:**

#### 2.9.2.1 ONCOGENES:

Una característica fundamental de las células cancerosas es que cuando se dividen ambas células hijas resultantes son cancerosas. Incluso muchos tumores pueden ser clonados a partir de una sola célula que se divide indefinidamente para producir un tumor. Esta relación genética sugiere que el fenotipo de la enfermedad está determinado genéticamente y está codificado por el ADN de la célula tumoral. Todos aquellos agentes que producen tumores en animales de

experimentación son mutágenos y actúan dañando el ADN celular.

El descubrimiento de que ciertos virus, cuando se inoculan a animales producen tumores, simplificó las ideas sobre el cáncer, puesto que en algún lugar del genoma viral debería estar la instrucción genética que diera a la célula normal capacidades multiplicativas, características de las células tumorales.

Los virus tumorales pueden ser de dos tipos según sea su genoma ADN o ARN. Invariablemente, la transformación está asociada con la integración del genoma viral en la célula del huésped. Los virus tumorales transportan unos elementos genéticos llamados **oncogenes**, que son responsables de su capacidad para transformar las células.

Las investigaciones sobre los virus ARN, o retrovirus, produjeron el importante descubrimiento de que sus oncogenes provenían de células cuyo material genético es ADN. Durante sus ciclos de infección estos virus capturaban genes celulares del huésped que les proporcionaban propiedades de transformación celular. La demostración de que los oncogenes retrovirales en su origen proceden de células eucariotas, proviene de los estudios del virus originalmente descubierto por Peyton Rous (virus del sarcoma de Rous). El virus

transporta un locus genético específico llamado src, responsable de su habilidad para transformar células<sup>(134)</sup>.

El oncogén src integrado en el virus del sarcoma de Rous se deriva de un gen celular normal, capturado e incorporado al genoma vírico. Sorprendentemente la mayoría de los oncogenes virales tienen una contrapartida celular (proto-oncogenes), es decir aparecen en las células de los organismos superiores desempeñando funciones normales de la célula. En determinadas condiciones el proto-oncogén sufre una alteración y origina un oncogén, es lo que se denomina activación oncogénica. La generación de un oncogén representa la ganancia de una función, por expresarse una célula en la que no lo hacía o por sobreexpresarse.

Más de 25 proto-oncogenes, han sido incorporados por retrovirus y empleados como oncogenes. Se ha establecido una nomenclatura por convenio para determinar los oncogenes. La forma viral es denominada con el prefijo "v" y el gen celular con el prefijo "c". Aunque los retrovirus de esta clase no parecen estar implicados en los cánceres humanos, estudios sobre estos virus han puesto de manifiesto una familia de genes en el genoma humano que probablemente juegan un papel directo en el desarrollo de la enfermedad.

En el contexto normal, los proto-oncogenes tienen una función importante en el control de la proliferación celular.

La mayoría de estos genes codifican proteínas que participan en la transferencia de señales del crecimiento celular. Algunos proto-oncogenes codifican factores de crecimiento<sup>(43)</sup>. La activación oncogénica produce en las células una estimulación autocrina para la multiplicación indiscriminada. Otros proto-oncogenes producen los receptores de factores de crecimiento y su activación mantiene a la célula constantemente activada para la replicación.

Una de la familias más conocida de oncogenes es la de las kinasas, encontradas en la superficie de la membrana celular. La gran cantidad de proteína kinasa oncogénica indica que la fosforilación residuos aminoacídicos (tirosina, serina, treonina) son sucesos críticos en el control del crecimiento celular. La activación de estos oncogenes se manifiesta por una combinación de mecanismos, incluyendo sobreexpresión del producto del oncogén, mutaciones que incrementan su actividad enzimática y cambios en su localización celular<sup>(32,34)</sup>.

Una segunda clase de oncogenes con una función similar es la familia ras. Codifican G-proteínas que regulan una variedad de vías de la señal de transducción.

Varias proteínas de oncogenes actúan directamente en el núcleo celular (proteínas nucleares), donde controlan la expresión de genes celulares requeridos para la

proliferación. La visión más actual es que estas proteínas son señales celulares de transducción o terceros mensajeros, que actúan transformando señales para producir la respuesta celular.

Las principales familias de oncogenes y sus mecanismos de actuación en el control del crecimiento celular se encuentran representados en la tabla VIII

Tabla VIII: Familias de oncogenes.

Oncogen	Localización	Función
sis	Secretada	Factor de crecimiento (PDGF)
erbE	Membrana	Receptor factor crecimiento epidérmico (EGF)
trk	Membrana	Receptor factor crecimiento nervioso (NGF)
src	Citoplasma	Proteín tirosín kinasa
abr	Citoplasma	Proteín tirosín kinasa
gsp	Citoplasma	Subunidad $\alpha$ de proteína G
ras	Citoplasma	GTP-GDP-binding protein
jun	Núcleo	Factor de transcripción (AP-1)
tos	Núcleo	Factor de transcripción (AP-1)
myc	Núcleo	DNA-binding protein
erbB	Núcleo	Miembro de la familia de receptores esteroides

Los modelos experimentales han demostrado que el cáncer es un fenómeno de múltiples pasos. El tumor resulta de varios sucesos independientes que ocurren secuencialmente en una sola célula. Un simple oncogén no puede, por si solo, transformar células normales. La transformación celular requiere de la actuación de, al menos, dos oncogenes: un oncogén nuclear y otro citoplasmático<sup>(92,112)</sup>.

#### 2.9.2.2. GENES SUPRESORES DE TUMORACIÓN:

Ciertos tumores se producen por un mecanismo diferente: pérdida de la función de un gen, que se denomina gen supresor de tumoración. Con el reconocimiento de que el gen responsable del retinoblastoma (Rb) era un miembro de la familia de los genes supresores, empezó otra carrera para clonar nuevos genes. El gen Rb manifiesta su efecto tumorogénico cuando se pierde su función. Esta es una característica diferencial de estos genes supresores respecto a los oncogenes anteriormente expuestos.

El gen Rb fue localizado en el cromosoma 13<sup>(65)</sup>. En la mayoría de los retinoblastomas el gen estaba ausente completa o parcialmente. En otros casos el gen estaba presente, pero los análisis moleculares revelaron mutaciones puntuales que hacían que se produjera una proteína aberrante. Introduciendo una copia del gen normal mediante un vector en el interior de

una célula transformada se pueden revertir las propiedades de crecimiento, volviendo la célula a la normalidad, evidenciando que el gen clonado tiene actividad de gen supresor de tumoración.

El descubrimiento del gen p53<sup>(124)</sup> reveló que existen genes con una función opuesta a los oncogenes, inhibir el crecimiento celular. La inactivación del gen p53 es el defecto genético más comúnmente detectado en los tumores. El gen es inactivado por delección o mutaciones puntuales en ciertas regiones de la secuencia. Algunas de estas mutaciones actúan como dominantes al inactivar la "wild-type" p53, lo que produjo una confusión inicial sobre el mecanismo de actuación del gen. Estas proteínas mutantes son estables, se acumulan con niveles altos y secuestran la proteína "wild-type" en el citoplasma, donde no puede cumplir su función supresora.

Actualmente se sabe que los genes supresores de tumoración son aquellos que, en su estado natural, controlan negativamente la proliferación celular de forma que, cuando están mutados o ausentes, el mecanismo de multiplicación celular escapa de su control, produciéndose divisiones celulares incontroladas, dando paso al fenómeno tumoral. La pérdida de función supresora de tumoración requiere la inactivación de ambos alelos, usualmente por delección del cromosoma, mutación puntual, o ambos; puesto que si existe un



alelo normal, en general, se produce suficiente proteína para cumplir su función reguladora.

### 2.9.2.3 GENES IMPLICADOS EN LA REPARACIÓN DE LOS ERRORES

#### REPLICATIVOS DEL ADN:

Durante la replicación del ADN se pueden producir errores. Existen unos genes encargados de mantener la fidelidad de este proceso reparando las alteraciones producidas durante el mismo. Estos genes son los genes implicados en la reparación del ADN que se conservan desde las bacterias hasta los humanos.

En bacterias los errores en la replicación son reconocidos por la proteína mutS en un primer paso, dirigiendo una reacción reparadora hacia la nueva cadena de ADN sintetizada. Esta reparación reduce la tasa de mutaciones espontáneas. El homólogo humano del mutS, hMSH2 (localizado en el brazo corto del cromosoma 2), es el que se ha propuesto como realizador de funciones similares de reconocimiento de errores replicativos. La pérdida de la función de hMSH2 puede resultar en la ausencia de reconocimiento de las alteraciones, permitiendo un incremento generalizado de mutaciones espontáneas, que pueden visualizarse en las expansiones y contracciones de secuencias de ADN repetido interdisperso (microsatélites), regiones muy proclives a errores durante la replicación, por deslizamiento de las hélices. El mantenimiento de los errores replicativos en las

células tumorales se produce como consecuencia de una función inadecuada de hMSH2 y hMLH1 (homólogo de mutL, situado en el cromosoma 3). Recientemente, se han descubierto otros genes también implicados en la reparación postreplicativa de errores: hPMS1 y hPMS2 <sup>(18,120,154,160,161)</sup>.

### **2.9.3. ESTRATEGIAS DE ANÁLISIS GENÉTICO:**

Los distintos tipos de genes implicados en la carcinogénesis, producen diferentes alteraciones en el genoma. La investigación de cada una de ellas requiere diferentes estrategias. Para la mejor comprensión de los mecanismos genéticos de producción del cáncer se exponen los métodos utilizados para la identificación de los genes implicados en el cáncer colorrectal.

#### 2.9.3.1. ANÁLISIS DE LIGAMIENTO Y ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN:

En las enfermedades hereditarias se pueden realizar estudios de ligamiento genético. Se basan en la medida del grado de cosegregación entre determinados marcadores genéticos y la enfermedad en familias informativas.

En los casos en que aparece un marcador con clara asociación con la aparición de la enfermedad, éste está muy próximo o en el sitio del gen causante de la enfermedad. Para

aumentar la eficacia de la técnica suelen utilizarse varios marcadores de localización conocida para cada gen<sup>(117)</sup>.

Por los análisis de ligamiento han podido determinarse algunos genes responsables de cánceres colorrectales hereditarios:

- gen causante de la FAP: gen APC
- genes implicados en la reparación post-replicativa de errores en el ADN: hMSH2 y hMLH1.

#### 2.9.3.2. ANÁLISIS DE PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD:

Knudson en 1971<sup>(108)</sup> postuló un modelo para explicar las mutaciones que se dan en un mismo gen, tanto en las formas esporádicas, como hereditarias de cáncer. Según él deben darse dos sucesos independientes: primero las células tumorales deben perder un alelo y posteriormente sufrir una mutación en el otro o perderlo. Los loci donde se dan estos procesos codifican probablemente genes supresores, ya que la mayoría de los loci que codifican para estos genes sufren pérdidas somáticas durante la tumorigénesis<sup>(184)</sup>.

En los carcinomas hereditarios la primera mutación se da en la línea germinal y la segunda en el tejido somático. En los cánceres esporádicos ambas alteraciones se dan en células somáticas. Esta característica ha proporcionado otro método para determinar la localización de genes cuya función debe

perderse para que se desarrolle el tumor: el estudio de la pérdida de material genético específica del carcinoma. Los estudios de pérdidas de alelos requieren la identificación de marcadores polimórficos específicos del locus en el ADN de células constitutivas. La detección de un sola variante del tumor (homocigoto o heterocigoto) cuando están presentes las dos formas en las células constitutivas (heterocigotas), es indicativa de una pérdida de material genético.

Los estudios de pérdidas de heterocigosidad específicas de determinados cromosomas en las células tumorales, que afectan a determinada región genómica, han permitido confirmar la implicación en el cáncer colorrectal de genes que se habían localizado por análisis de ligamiento. La pérdida de heterocigosidad (LOH) se ha usado para detectar la presencia de genes supresores de tumoración en una gran variedad de tumores<sup>(59)</sup>.

### 2.9.3.3. ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES:

Se han descrito unos genes implicados en la reparación postreplicativa del ADN. Las mutaciones de estos genes producen una inestabilidad generalizada del genoma.

Dentro del genoma humano existen unas cortas secuencias de bases repetidas, que se heredan de forma mendeliana y que se denominan microsátélites. El genoma humano contiene aproximadamente 50-100.000 copias con la secuencia (dT-dG/dA-dC) $n$ , siendo  $n$  de 10 a 60<sup>(127)</sup>. Por su herencia de tipo mendeliana forman parte de lo que se conoce como "huella dactilar genética" de todos los individuos; esto ha hecho que se puedan emplear con fines de identificación de personas a través de una muestra biológica<sup>(67)</sup>, para pruebas de paternidad<sup>(98,99)</sup>, en Medicina Forense, etc.

Estas secuencias se mantienen constantes en población normal y son infrecuentes las alteraciones en el tamaño de sus alelos. Son especialmente sensibles a deslizamientos de la ADN-polimerasa durante la replicación, originándose en el ADN bucles de inserción y/o deleción (IDL) que contienen un número de múltiplos variable de la unidad de repetición<sup>(110)</sup>. En ausencia de estos mecanismos de reparación, los nucleótidos mal apareados que contienen los IDL pueden fijarse al genoma en la siguiente ronda replicativa produciendo el fenómeno de inestabilidad de microsátélites

(inserciones y deleciones que alteran el patrón de bandas del ADN microsatelitífero correspondiente entre tejidos sanos y afectados de un mismo individuo). Este tipo de alteraciones fue descrito por primera vez por Peinado y cols. en 1992<sup>(163)</sup> y pueden ser utilizadas para poner de manifiesto alteraciones en los genes implicados en los mecanismos de reparación postreplicativas (hMSH2, hMLH1, hPMS1 y hPMS2).

Por otro lado, se han identificado una serie de genes que contienen microsatélites como un componente integral de su estructura, como el DCC, p53 y el gen del receptor de tipo II del TGF- $\beta$ .

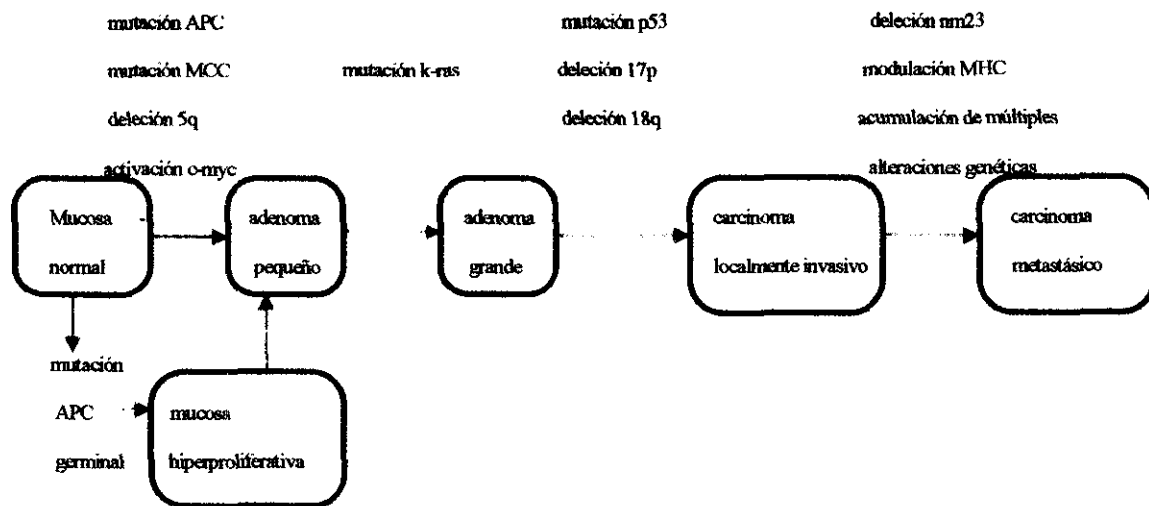
#### **2.9.4 GENES IMPLICADOS EN LA POLIPOSIS FAMILIAR ADENOMATOSA:**

En los enfermos con FAP se han detectado diferentes alteraciones genéticas que pueden ser responsables de la enfermedad. Para intentar explicar la secuencia en que ocurren estas alteraciones genéticas en el desarrollo de la enfermedad, Volgestein y cols. en 1988 propusieron un modelo de carcinogénesis colorrectal mediante el cual se deben producir una serie de alteraciones genéticas sucesivas e independientes para desencadenar el cáncer colorrectal<sup>(208)</sup>. La acumulación e interacción de las múltiples alteraciones genéticas determinan el fenotipo y comportamiento clínico de las células tumorales, de forma que con las primeras

alteraciones se forma el adenoma y a medida que se van sucediendo otras alteraciones aparece el carcinoma, con diferente grado de agresividad según sus características genéticas. Este modelo surgió tras la observación de que el 90% de los carcinomas colorrectales contienen dos o más alteraciones genéticas, siendo menor del 10% aquellos tumores que sólo contienen una<sup>(78)</sup>.

El modelo propuesto implica tanto alteraciones de oncogenes como de genes supresores de tumoración, pudiendo tratarse de mutaciones, deleciones o metilaciones, mediante las cuales se produce una ausencia de la regulación de la división celular.

El esquema propuesto para la carcinogénesis colorrectal según la progresión de mucosa sana a carcinoma comienza por una mutación de los genes supresores de tumoración APC y/o MCC, dando lugar a la formación de un adenoma. Cuando esta alteración se produce en la línea germinal la heredan los descendientes que desarrollarán una mucosa hiperproliferativa produciéndose la poliposis familiar. Tras la formación del adenoma se produce otra alteración de un oncogén (k-ras), que contribuye a la progresión del adenoma. Alteraciones en genes localizados en los cromosomas 17 y 18 confieren características más invasivas produciéndose el carcinoma. Otras alteraciones genéticas posteriores aumentan la agresividad tumoral apareciendo el carcinoma metastásico.



*Fig. 4: Esquema de la secuencia adenoma-carcinoma*

-- El primer gen descubierto implicado en el cáncer colorrectal fue el **APC**<sup>(77,155)</sup>, llamado así por ser el responsable de la poliposis adenomatosa del colon. Herrera y cols. al estudiar los miembros de familias con poliposis familiar adenomatosa identificaron deleción intersticial en 5q, afectando la banda 5q21<sup>(86)</sup>. En 1991 se identificó el gen APC, que fue localizado en esta posición por Bodmer y cols.<sup>(13)</sup> en Gran Bretaña y Leppert y cols.<sup>(123)</sup> en Estados Unidos. Este gen codifica una proteína de 2845 aminoácidos<sup>(60)</sup> que interactúa con una beta y probablemente una alfa-catenina que residen bajo la placa de unión adherencial<sup>(177,189)</sup>. Ambas interactúan con una E-cadherina, una proteína integral de membrana que se ha implicado en la progresión tumoral. La proteína APC está en la región basolateral del enterocito, y su concentración aumenta a medida que las células migran del fondo de la cripta a la luz intestinal.



Se han detectado mutaciones del gen APC en el 67-80% de las poliposis familiares adenomatosas<sup>(142,194)</sup>.

-- En la misma posición 5q21, muy cercano al gen APC se ha localizado el gen supresor **MCC** (mutated in colorectal cancer)<sup>(106,137)</sup>. El MCC es bastante semejante al APC, sin embargo, existe una diferencia clave: los individuos con una mutación hereditaria en las células germinales en APC desarrollan cientos de pólipos colónicos a una edad temprana, y posteriormente pueden desencadenar un cáncer colorrectal, mientras que no se ha encontrado ninguna mutación del gen MCC en la línea germinal de enfermos con poliposis familiar<sup>(17)</sup>.

El gen MCC no parece ser el causante del FAP, pero una posibilidad intrigante es que las proteínas del MCC y del APC interactúen para formar un complejo biológicamente activo, de manera que la mutación de un gen o de los genes pudiera ser suficiente para inactivar el complejo<sup>(155)</sup>.

-- Los oncogenes de la familia **ras** se han relacionado con el cáncer colorrectal, habiéndose descrito activación de los mismos en el 39-71% de los carcinomas y en el 42% de los adenomas<sup>(11,66)</sup>, relacionándose con una alteración temprana en la formación de los carcinomas y en la secuencia adenoma-carcinoma. Esta activación de K-ras y N-ras en los codones 12, 13 o 61 fue descubierta en 1987 en relación con CCR y adenomas avanzados<sup>(82)</sup>. Una elevada expresión de ras ha sido

relacionada con un comportamiento más agresivo del tumor y peor pronóstico<sup>(140)</sup>.

\* **K- ras**<sup>(7)</sup>, uno de los miembros de la familia de los oncogenes ras, situado en el brazo corto del cromosoma 12 (12p)<sup>(80)</sup>, codifica una G-proteína de 21kD implicada en la transmisión de las señales a través de la membrana celular. La alteración en el gen da lugar a una imposibilidad de la proteína de hidrolizar GTP a GDP<sup>(196)</sup>, y, como GTP-ras es la forma activa de la proteína, esto produce una estimulación continua de la replicación celular. La mutación en K-ras aparece como una simple sustitución de un aminoácido en los codones 12, 13 o 61 del gen<sup>(37,172)</sup>. Las mutaciones en el codón 13 se han relacionado con mutaciones más débilmente transformantes<sup>(15)</sup>, y las producidas en el 12 como más agresivas<sup>(61,179)</sup>. Sin embargo en un estudio realizado para determinar la supervivencia tras resecciones de metástasis hepáticas, no se ha podido demostrar esta relación, viéndose que ni la presencia de mutación K-ras, ni el cambio preciso de un nucleótido son predictivos de menor agresividad tumoral, no pudiendo, por tanto, ser utilizado como factor pronóstico<sup>(100)</sup>.

\* Dentro de la familia ras existe otro oncogén relacionado con la génesis del cáncer colorrectal, es el **N-ras** situado en el brazo corto del cromosoma 1 (1p)<sup>(16)</sup>.

\* En el cáncer colorrectal también parece estar alterado el oncogén **c-myc** situado en el cromosoma 8<sup>(145)</sup>, que codifica una fosfoproteína celular de 62 kd<sup>(53,101,188)</sup> que es inducida durante la proliferación celular. Varios grupos han descrito una elevación en los valores de RNA de c-myc en el 60-70% de los carcinomas<sup>(56,62)</sup>. Niveles similares han sido descritos en los adenomas y se ha propuesto que puede ser uno de los pasos de la secuencia adenoma-carcinoma<sup>(93)</sup>. Aunque en algunos casos esto sólo podría ser un indicio del sobrecrecimiento celular en comparación con la mucosa normal, la sobreexpresión genuina del gen parece ocurrir en una proporción de los casos.

\* Menos frecuentemente se han observado alterados: **c-src** (62%), **c-myb** (9%) y **c-erbB-2** (4%)<sup>(138,191)</sup>.

-- El gen **p53** está situado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13p12). En 1989 Barker y cols.<sup>(5)</sup> demostraron que deleciones en el brazo corto de un cromosoma 17 se relacionaban con mutaciones en el alelo p53 en el cromosoma homólogo. El gen p53 codifica una fosfoproteína celular de 53.000 Daltons<sup>(82)</sup>. El 95% de los cánceres colorrectales con pérdida de heterocigosidad en 17p contiene una mutación puntual. El WTP53 (wild type) forma un homodímero<sup>(82)</sup> que se une a secuencias de ADN específicas y parece actuar por inhibición de la progresión del ciclo celular. Este efecto se pierde con una simple mutación puntual en regiones altamente

conservadas del gen p53 y el efecto es tipo-celular específico<sup>(6)</sup>.

Las mutaciones producen un aumento de la vida media de la proteína, que puede ser detectada inmunohistoquímicamente en el núcleo de las células tumorales, observándose una sobreexpresión de la proteína nuclear p53 en el 42-67% de los cánceres colorrectales, mientras que no se detecta en la mucosa normal<sup>(31,204)</sup>.

Recientes investigaciones parecen demostrar que este gen presenta características diferenciales con respecto a otros genes supresores de tumoración. Es probable que la proteína p53 mutada se una al tipo WTp53 secuestrándola en un oligomero biológicamente inactivo<sup>(113)</sup>. Consecuentemente, para producir el efecto fenotípico sólo es necesaria la mutación de uno de los alelos del gen. Se ha relacionado la pérdida de heterocigosidad del brazo corto del cromosoma 17 con una menor supervivencia<sup>(118)</sup>.

-- **DCC** (deleted in colorectal cancer): Este gen situado en el brazo largo del cromosoma 18 (18q21) fue identificado en 1989. Codifica una proteína de aproximadamente 190.000 Daltons<sup>(195)</sup> con una secuencia de aminoácidos homóloga a una molécula de adhesión de las células neurales<sup>(58)</sup>, lo que sugiere que el gen DCC tiene un papel en la interacción

célula-célula. Las alteraciones producidas a este nivel pueden desencadenar una pérdida del control del crecimiento celular y puede ser, por tanto, responsable de la alteración en la adhesión celular, invasión, motilidad y capacidad metastásica observadas en las células de los últimos estadios de la tumorigénesis colorrectal. En estudios realizados en líneas celulares epiteliales de rata se ha observado que el transforming growth factor B (TGF- $\beta$ ) produce una inhibición del crecimiento<sup>(8)</sup>, sin embargo las células tumorales son resistentes a esta inhibición<sup>(89)</sup>. Este efecto inhibitorio puede estar mediado por moléculas DCC<sup>(133)</sup>. La reintroducción del cromosoma 18 en estas líneas celulares produce un aumento del efecto inhibitorio del crecimiento en las células de cáncer de colon<sup>(74)</sup>. La disminución de la inhibición es un suceso importante en la pérdida de control del crecimiento celular.

La presencia de deleciones en las fases avanzadas de la carcinogénesis y el hecho de que el gen DCC esté relacionado con la codificación de una proteína de adhesión celular, hacen suponer que su alteración conlleva una mayor agresividad del cáncer colorrectal con la producción de metástasis a distancia<sup>(94,157)</sup>.

### 2.9.5. GENES IMPLICADOS EN LOS SÍNDROMES DE CÁNCER COLORRECTAL NO POLIPÓSICOS (HNPCC)

Se han identificado cuatro genes cuya alteración parece ser responsable del desarrollo del HNPCC. Estos encargados de la reparación del ADN aparecen implicados en, al menos, la mitad de las series descritas de esta enfermedad. Las estimaciones actuales sugieren que el gen hMSH2 (2p16) está afectado en el 50% de los cánceres, hMLH1 (3p21-23) en el 30%, hPMS1 (2q31-33) en el 5% y el hPMS2 (7p) en el 5% (18,63,154,160).

Estas mutaciones se relacionan con el fenotipo de la enfermedad en familias afectadas produciendo una herencia dominante con alta penetrancia. Aunque la existencia de una mutación puntual es un prerrequisito en estos individuos, la gran variabilidad en la edad de aparición y la aparición de tumores en diferentes órganos sugieren que la mutación en la línea germinal no es suficiente para la iniciación del tumor.

Las alteraciones de estos genes se detectan por la aparición de errores en la replicación (RER) en el genoma de las células tumorales, apareciendo el fenotipo RER+ en estos cánceres.

No se han detectado LOH del gen hMSH2, sin embargo la LOH de los marcadores del cromosoma 3 es un suceso común en

los tumores derivados de familias en las que la susceptibilidad al cáncer es producida por mutaciones en hMLH1, localizado en el cromosoma 3, por lo que este gen se comporta en cuanto a su modo de acción como los genes supresores de tumoración<sup>(85)</sup>.

#### **2.9.6. GENES IMPLICADOS EN EL CÁNCER COLORRECTAL ESPORÁDICO:**

Los genes que se saben implicados en cánceres colorrectales hereditarios han sido analizados en algunas series de tumores esporádicos. Así se han demostrado alteraciones de todos los genes expuestos anteriormente en estos cánceres, con una frecuencia variable.

La implicación real de cada gen en la aparición de los tumores esporádicos no es bien conocida, no existiendo pruebas claras que hayan identificado la causa genética del cáncer no hereditario, de la forma indiscutible que se ha conseguido para los de incidencia familiar.

El cáncer de colon esporádico es definido como el que aparece en un individuo sin historia de enfermedad en familiares de primer grado y sin evidencia de cáncer hereditario. Este grupo incluye aquellos con factores de susceptibilidad hereditaria, tales como nuevas mutaciones, aquellos con una historia familiar falsamente negativa, y

aquellos donde sucesos (como una muerte precoz) han prevenido el desarrollo del cáncer en sus familiares. Por ello este grupo de cáncer esporádico es muy heterogéneo haciendo difícil sacar conclusiones claras de los estudios genéticos, realizados hasta el momento.

Los genes que se han detectado alterados en estos tumores son:

**1. APC:** Se han detectado LOH en el 20-40% de los cánceres esporádicos<sup>(183)</sup> y mutaciones hasta en el 60% de los mismos<sup>(106)</sup>.

**2. ras:** Existe una activación del oncogén ki-ras en el 40-50% de los tumores<sup>(185)</sup>. Otros oncogenes implicados son c-myc, c-src, c-myb y c-erbB-2.

**3. MCC:** El 50% de los cánceres tienen deleciones envolviendo este gen.

**4. p53:** Se han detectado deleciones de 17p en 6-25% de los adenomas colónicos y en 75% de los carcinomas<sup>(5,6,208)</sup>. El tipo de mutación de p53 en algunos tumores humanos ha sido asociado con factores ambientales (88,167). A favor de esta relación en el cáncer colorrectal se encuentra el hecho de que las deleciones del gen son casi universales en los



cánceres situados en el colon izquierdo<sup>(102)</sup>, que es la localización más influenciada por ellos<sup>(20)</sup>.

**5. DCC:** Se han observado deleciones en el 73% de los cánceres y en el 11% de los adenomas<sup>(208)</sup>.

**6. Fenotipo RER+:** Inestabilidad genómica está presente en el 16.5-28% de los tumores colorrectales estudiados y se asocia más frecuentemente a los de localización proximal<sup>(128,193)</sup>. Así mismo parecen estar relacionados con una mayor supervivencia, aunque por los tamaños de las muestras no se consigue una significación estadística. Los errores en la replicación se han demostrado que ocurren en estadios tempranos de la oncogénesis colorrectal, tanto en estudios "in vitro", como "in vivo"<sup>(181)</sup>. Los fenotipos RER+ indican una alteración de los genes hMSH2<sup>(63,120,161,163)</sup> y hMLH1<sup>(18,125,160)</sup> implicados en la reparación de ADN.

### **3. PACIENTES Y MÉTODO**

### 3.1. PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

En este estudio se han analizado un total de 100 tumores colorrectales esporádicos. Todos ellos corresponden a enfermos con adenocarcinomas colorrectales diagnosticados y tratados de forma correlativa en el Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Universitario de Getafe desde Febrero 1992 hasta Diciembre 1993, tanto de forma electiva, como urgente. Los criterios de exclusión han sido los siguientes:

#### CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Tumores colorrectales no adenomatosos.
- Poliposis Familiar Adenomatosa.
- Tratamiento adyuvante previo.
- Pacientes con otro tipo de tumoración previa o sincrónica.

Tras el estudio anátomo-patológico se han excluido 2 de ellos por no tratarse de adenocarcinomas, correspondiendo a una Enfermedad Crohn y una Diverticulitis. Otros dos se han excluido por problemas con la técnica de extracción del ADN tumoral. Por todo ello, por lo que el estudio de inestabilidad (RER) y pérdida de

heterocigosidad (LOH) de microsatélites y su análisis estadístico se ha realizado a 96 pacientes.

El ADN analizado se obtuvo de tumores de pacientes afectados (T) usando como control ADN de mucosa colónica normal (N) y leucocitos de sangre periférica (S). La muestra tumoral se tomó de la pieza quirúrgica en el mismo quirófano inmediatamente de la extracción de la pieza. La mucosa normal fue sacada de la misma pieza quirúrgica en el extremo más distal a la tumoración y con material quirúrgico diferente. Ambas piezas se introdujeron en una solución antibiótica para su conservación durante el transporte. La sangre se extrajo en la inducción anestésica (paciente no transfundido) y se conservó en tubos de ensayo con heparina de litio.

### **3.2. AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO**

#### **3.2.1. AISLAMIENTO DE ADN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA**

La obtención de ADN genómico humano se realizó a partir de muestras de 10-20 ml de sangre heparinizada. Para la extracción de suero sanguíneo se hizo una centrifugación a 1700g durante 15 minutos a 4°C. A continuación se añadió suero fisiológico y se volvió a centrifugar con las mismas condiciones.

Posteriormente se realizó la rotura y eliminación de hematíes y la recogida de glóbulos blancos, para lo cual se llevó a cabo una agitación y lavados con agua bidestilada seguidos de posteriores centrifugaciones.

A continuación se procedió a la extracción de proteínas. Se incubaron los leucocitos aislados en tampón de extracción de ADN I (Tris 20 mM pH 8,0 /  $MgCl_2$  5 mM) en hielo durante 10 minutos y se volvió a centrifugar a 3000g. Se incubaron los leucocitos con tampón de extracción de ADN II (10mM de Tris-ClH (pH 8,0) / 100mM EDTA (pH 8,0) / 20  $\mu$ g/ml RNasa libre de DNasa / 0.5% SDS) durante 1 hora a 37°C. Se añadió Proteinasa K (100  $\mu$ g/ml) y se incubaron durante 12-16 horas.

A continuación se realizó la extracción fenólica con sucesivos lavados con fenol, fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y cloroformo-isoamílico (24:1). El ADN extraído se precipitó con 0.2 volúmenes de acetato amónico 10M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Tras dos lavados con etanol al 70% se resuspendió en T.E. pH 8.0.

Las estimaciones de la concentración y pureza el ADN obtenido se han realizado mediante espectrofotometría.

### **3.2.2. AISLAMIENTO DE ADN A PARTIR DE TEJIDO**

Se cortó el tejido finamente con bisturí y a continuación se procedió a su total disgregación añadiendo nitrógeno líquido y macerando hasta pulverizar el tejido. Se añadió a continuación 10 volúmenes de Tampón de extracción de ADN II.

A partir de aquí el protocolo es común al seguido para el aislamiento a partir de sangre periférica.

### **3.3. ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES**

#### **3.3.1. AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR DE LOS MICROSATÉLITES**

En este trabajo hemos analizado cinco loci no relacionados que contienen secuencias de dinucleótidos repetidos (microsatélites) que representan diferentes cromosomas para detectar inestabilidad genómica en los individuos analizados.

Los microsatélites estudiados han sido:

- AFM093xh3 localizado en el cromosoma 2 (D2S123)
- Mfd27 localizado en el cromosoma 5 (D5S107)
- p53 localizado en el cromosoma 17 (TP53)
- Mfd152 localizado en el cromosoma 17 (D17S578)
- SE289 localizado en el cromosoma 18 (D18S74E)

La unidad de repetición de estos microsatélites es el dinucleótido CA.

En todos los casos la amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl que contenía:

-para AFM093xh3, SE289, y Mfd27: 200 ng de ADN de tumor y mucosa colónica normal y 400 ng de ADN de sangre.

-para TP53 y Mfd152: 100 ng de ADN en todos los casos.

La mezcla de reacción tenía:

1 mM de cada cebador,  
20 mM de Tris-HCl pH 8,55,  
16 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>,  
150 mg/ml BSA,  
200 M de dATP, dTTP, dCTP y dGTP;  
1 unidad de Taq polimerasa (BioTaq).

Cada mezcla de reacción fue cubierta con 50 µl de aceite mineral (Mineral Oil, Molecular SIGMA Biology).

Para todas las amplificaciones se han utilizado un termociclador Perkin Elmer Cetus 480.0.

### **Amplificación del microsatélite AFM093xh3**

La secuencia AFM093xh3 (GDB Id: G00-161-681) se encuentra localizada en el cromosoma 2p16, en el locus D2S123. Presenta 8 alelos entre 0.197 y 0.227 Kb.

Los cebadores utilizados y sus secuencias son:

AFM093xh3a: AAACAGGATGCCTGGCCTTTA

AFM093xh3m: GGACTTTCCACCTATGGGAC



La amplificación consta de 27 ciclos, cada uno de los cuales con tres pasos:

desnaturalización: a 94°C durante 30 segundos;  
reasociación: a 55°C durante 90 segundos y,  
extensión a 72°C durante 15 segundos.

Al final de estos 27 ciclos, se realizó una extensión adicional de 6 minutos a 72°C.

### **Amplificación del microsatélite SE289**

La secuencia SE289 (GDB Id: G00-188-776) se encuentra localizada en el cromosoma 18q12.2-q12.3, en el locus D18S74E. El tamaño del producto amplificado varía entre 0.122-0.140 Kb.

Los cebadores utilizados y sus secuencias son:

SE289: AGTAATGGTCCAGGCCCTGG

SE290: GACCGGAATATCTGATTATC

La amplificación consta de 27 ciclos, cada uno de los cuales con tres pasos:

desnaturalización: a 94°C durante 30 segundos;  
reasociación, a 55°C durante 90 segundos y,  
extensión a 72°C durante 15 segundos.

Al final de estos 27 ciclos, se realizó una extensión adicional de 6 minutos a 72°C.

### **Amplificación del microsatélite Mfd27**

La secuencia Mfd27 (GBB Id: G00-177-304) se encuentra localizada en el cromosoma 5q11.2-q13.3, en el locus D5S107. Presenta 10 alelos con un tamaño entre 0.133 y 0.155 Kb).

Los cebadores utilizados y sus secuencias son:

Mfd27GT: GGCATCAACTTGAACAGCAT

Mfd27AC: GATCCACTTTAACCCTAAATA

La amplificación consta de una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos. A continuación se llevaron a cabo 30 ciclos, cada uno de los cuales con dos pasos:

desnaturalización a 94°C durante 50 segundos y reasociación y extensión a 58°C durante 40 segundos.

### **Amplificación del microsatélite TP-53**

La secuencia TP53 (GDB Id: G00-156-786) se encuentra localizada en el cromosoma 17p13.1 en el locus TP53. El tamaño del producto amplificado varía entre 0.103 y 0.135 Kb.

Los cebadores utilizados y sus secuencias son:

TP53.PCR15.2 (TP1): ACTGCCATCCCTTGCCCAATTC

TP53.PCR15.1 (TP2): AGGGATACTATTCAGCCCCGAGGTG

La amplificación consta de una desnaturalización inicial a 94°C durante 10 minutos, y a continuación 27 ciclos, cada uno de los cuales con tres pasos:

desnaturalización a 94°C durante 30 segundos,  
reasociación a 65°C durante 20 segundos y,  
extensión a 72°C durante 15 segundos.

Al final de estos 27 ciclos , se realizó una extensión adicional a 72°C durante 6 minutos.

### **Amplificación del microsatélite Mfd152**

La secuencia Mfd152 (GDB Id: G00-128-654 se encuentra localizada en el cromosoma 17pter-p13.1, en el locus

D17S578. Presenta 11 alelos con un tamaño entre 0.148 y 0.174Kb.

Los cebadores utilizados y sus secuencias son:

559: CTGGAGTTGAGACTAGCCT

560: CTATCAATAAGCATTGGCCT

La amplificación consta de una desnaturalización inicial a 94°C durante 10 minutos y luego 27 ciclos, cada uno de los cuales con tres pasos:

desnaturalización a 94°C durante 50 segundos,  
reasociación a 55°C durante 90 segundos y,  
extensión a 72°C durante 25 segundos.

Al final de estos 27 ciclos, se realizó una extensión adicional a 72°C a 6 minutos.

### 3.3.2 DETECCIÓN DE LA INESTABILIDAD DE LOS MICROSATÉLITES MEDIANTE ELECTROFORESIS VERTICAL EN GELES DE ACRILAMIDA

Los productos resultantes de la amplificación mediante PCR fueron separados en geles de poliacrilamida, no desnaturalizantes, continuos y verticales. El tampón de recorrido estaba compuesto por Tris 90mM, Ácido bórico 90 mM y EDTA 2mM, a un pH final de 8,2. Dependiendo del microsatélite se cargaron entre 1 y 5  $\mu$ l de producto amplificado con la cantidad necesaria de BC5X (Bromofenol blue 0,25%, Xilen cianol 0,25%, glicerol 30% y EDTA 30 mM).

En el caso de AFM093xh3 y SE289 las dimensiones de los geles fueron 25x20x0.1 cm. La proporción de acrilamida fue del 8%. Las electroforesis se hicieron a 300 V constantes, durante 5 horas. En cada carril del gel de electroforesis se cargaron 5  $\mu$ l de producto amplificado y 1  $\mu$ l de BC5X.

En el caso de Mfd27 las dimensiones de los geles fueron 12x15x0.1 cm. La proporción de acrilamida fue del 7%. Las electroforesis se hicieron a 200 V constantes, durante 2 horas. En cada carril de electroforesis se cargaron 3  $\mu$ l de producto amplificado y 0.6  $\mu$ l de BC5X

Para el microsatélite TP53 las dimensiones de los geles fueron 25x20x0,1 cm. La proporción de acrilamida fue al 6%. Las electroforesis se hicieron a 250 V constantes

durante 3 horas. En cada carril de electroforesis se cargaron 5  $\mu$ l de producto amplificado y 1  $\mu$ l de BC5X.

En al caso de Mfd152, las dimensiones de los geles fueron 12x15x0.1 cm. La proporción de acrilamida fue al 7%. las electroforesis se hicieron a 200 V constantes durante 2 horas y media. El cada carril de electroforesis se cargaron 5  $\mu$ l de producto amplificado y 1  $\mu$ l de BC5X.

La detección de los fragmentos, una vez terminada la separación, se realizó mediante tinción con plata (Bio-Rad Silver Stain Kit, BIO-RAD). El tamaño de los fragmentos fue estimado utilizando como marcador el pBR322 digerido con la enzima de restricción MspI, que presenta 16 fragmentos con un tamaño entre 67 y 622 Kb.

#### **3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La significación estadística de la hipótesis nula de no asociación entre las distintas variables de los aspectos evaluados y la alteración de los patrones de los distintos alelos analizados, fue estimada con un análisis de chi-cuadrado.

Utilizando este estadístico para tablas de contingencia, se ha comparado la distribución de

frecuencias de aparición de inestabilidad o pérdidas de heterocigosidad entre los distintos tipos de tumores.

#### **4. RESULTADOS**



En este trabajo se han incluido 96 enfermos consecutivos con cáncer colorrectal esporádico: 53 de ellos varones y 43 hembras, en los que se han analizado tanto la inestabilidad, como la pérdida de heterocigosidad para cada uno de los microsatélites especificados.

En primer lugar se exponen los resultados generales de la muestra y posteriormente se especifican los resultados para cada microsatélite y cromosoma analizados, teniendo en cuenta diferentes aspectos:

- Sexo
- Edad
- Grado de diferenciación
- Localización
- Estadio de Dukes

La relación de los casos, sus características clínicas y los resultados del análisis genético se expone en la siguiente tabla.

Tabla IX

N° Reg.	Sexo	Edad	Clasificac. histopat.	Dif.	Localización	Estad. Dukes	RER <sup>+</sup>					LOH					
							Cr. 2p	Cr. 5q	Cr. 17p		Cr. 18q	Cr. 2p	Cr. 5q	Cr. 17p		Cr. 18q	
							AFM 093xh3	Mfd27	TP53	Mfd152	SE289	AFM 093xh3	Mfd27	TP53	Mfd152	SE289	
4	M	75	Carcinoma	B	Recto	B2											
5	H	72	Carcinoma	M	Recto-Sigma	C		X									
7	H	54	Carcinoma	B	Recto-Sigma	C											
8	M	48	Carcinoma	B	Recto	C											
9	H	78	Carcinoma	B	Sigma	A											
13	M	47	Carcinoma	B	Ciego	A		X									
16	M	72	Carcinoma	B	Sigma	D										X	
17	H	81	Carcinoma	B	Ciego	C				X							
18	H	68	Carcinoma	B	Sigma	B											
19	M	56	Carcinoma	B	Sigma	D		X									
20	M	62	Carcinoma	B	Colon ascen.	B											
21	H	69	Carcinoma	B	Sigma	C		X								X	
22	M	62	Carcinoma	B	Sigma	C										X	
23	H	58	Carcinoma	B	Colon ascen.	C										X	
24	H	64	Carcinoma	M	Recto	C					X					X	
25	M	41	Carcinoma	B	Recto	A		X									
26	H	73	Carcinoma	B	Recto	B1											
28	H	80	Carcinoma	B	Sigma	B											
29	M	64	Carcinoma	M	Recto	A											
30	H	80	Carcinoma	M	Sigma	A										X	
31	M	58	Carcinoma	B	Ciego	C											
32	H	59	Carcinoma	M	Recto	B2											
33	M	47	Carcinoma	B	Recto	B										X	
34	M	66	Carcinoma	M	Sigma	B2				X							

Tabla IX (cont.)

Nº Reg.	Sexo	Edad	Clasificac. histopat.	Dif.	Localización	Estad. Dukes	RER <sup>+</sup>				LOH					
							Cr. 2p	Cr. 5q	Cr. 17p		Cr. 18q	Cr. 2p	Cr. 5q	Cr. 17p		Cr. 18q
							AFM 093xh3	Mfd27	TP53	Mfd152	SE289	AFM 093xh3	Mfd27	TP53	Mfd152	SE289
35	H	39	Carcinoma	B	Recto	A				X						
36	H	65	Carcinoma	B	Ciego	B2								X	X	
37	M	80	Carcinoma	B	Sigma	D					X		X		X	
38	M	59	Carcinoma	B	Colon trans.	B		X	X	X	X					
40	H	16	Carcinoma	B	Sigma	D		X					X			
41	H	66	Carcinoma	B	Recto	A								X		
42	M	50	Carcinoma	M	Sigma	B2								X	X	
43	H	55	Carcinoma	M	Sigma	C				X						
44	M	63	Carcinoma	B	Recto	A										
45	H	82	Carcinoma	B	Recto	B							X			
46	H	87	Carcinoma	B	Recto	D						X	X			
47	M	84	Carcinoma	M	Colon ascen.	B2			X							
49	H	69	Carcinoma	?	Colon trans.	?							X	X		
50	H	76	Carcinoma	M	Sigma	B1		X								
51	M	58	Carcinoma	M	Colon trans.	C				X						
52	M	82	Carcinoma	M	Sigma	C										
53	H	82	Carcinoma	M	Sigma	B2	X	X	X		X				X	
54	H	59	Carcinoma	B	Recto	C										
55	M	79	Carcinoma	B	Recto-Sigma	B2							X			X
56	M	90	Carcinoma	M	Sigma	B								X		
57	M	?	Carcinoma	?	Recto	?										
58	M	70	Carcinoma	B	Sigma	C							X	X	X	
59	M	78	Carcinoma	M	Ciego	C								X		
60	H	56	Carcinoma	B	Recto	C				X			X			X

Tabla IX (cont.)

N° Reg.	Sexo	Edad	Clasificac. histopat.	Dif.	Localización	Estad. Dukes	RER <sup>+</sup>				LOH					
							Cr. 2p	Cr. 5q	Cr. 17p		Cr. 18q	Cr. 2p	Cr. 5q	Cr. 17p		Cr. 18q
							AFM 093xh3	Mfd27	TP53	Mfd152	SE289	AFM 093xh3	Mfd27	TP53	Mfd152	SE289
61	M	72	Carcinoma	B	Ciego	B2						X	X	X	X	
62	H	?	Carcinoma	?	?	?							X			
63	M	62	Carcinoma	M	Sigma	B2								X		
64	M	79	Carcinoma	B	Sigma	B			X		X			X		
65	H	49	Carcinoma	B	Recto	C2	X		X					X	X	
66	H	?	Carcinoma	M	Colon trans.	D			X						X	
67	H	89	Carcinoma	?	Sigma	D							X	X		
68	H	83	Carcinoma	M	Sigma	B			X		X					
69	H	74	Carcinoma	M	Sigma	D		X					X	X	X	
70	M	84	Carcinoma	B	Ang. hepát.	B2		X								
71	H	67	Carcinoma	M	Colon ascen.	B2				X		X	X		X	
72	H	82	Carcinoma	M	Recto	B2									X	
73	H	63	Carcinoma	B	Recto-Sigma	B2										
74	H	77	Carcinoma	B	Sigma	B2						X				
75	H	93	Carcinoma	P	Colon trans.	C	X		X	X	X		X	X		
76	H	69	Carcinoma	B	Recto	C		X						X		
78	H	69	Carcinoma	B	Sigma	B										
79	H	91	Carcinoma	B	Sigma	C										
80	M	63	Carcinoma	B	Sigma	C										
81	M	90	Carcinoma	B	Sigma	A							X	X		
82	H	55	Carcinoma	B	Recto-Sigma	C1		X								
83	H	63	Carcinoma	M	Sigma	B								X	X	
84	M	82	Carcinoma	P	Recto-Sigma	C					X			X	X	
85	H	72	Carcinoma	M	Sigma	C								X	X	

Tabla IX (cont.)

Nº Reg.	Sexo	Edad	Clasificac. histopat.	Dif.	Localización	Estad. Dukes	RER <sup>+</sup>					LOH				
							Cr. 2p	Cr. 5q	Cr. 17p		Cr. 18q	Cr. 2p	Cr. 5q	Cr. 17p		Cr. 18q
							AFM 093xh3	Mfd27	TP53	Mfd152	SE289	AFM 093xh3	Mfd27	TP53	Mfd152	SE289
86	M	54	Carcinoma	M	Recto-Sigma	C2			X							
87	H	66	Carcinoma	B	Sigma	B2							X			
88	H	67	Carcinoma	B	Recto-Sigma	C										
89	M	75	Carcinoma	M	Sigma	B2			X							
90	M	75	Carcinoma	B	Recto	B1						X	X			
91	H	73	Carcinoma	M	Recto	C									X	
92	M	64	Carcinoma	B	Recto	C										
93	H	57	Carcinoma	B	Ang. hepát.	D										
94	H	50	Carcinoma	B	Recto	D										
95	M	71	Carcinoma	M	Sigma	B2										
96	H	69	Carcinoma	B	Col. descen.	B			X							
97	H	64	Carcinoma	?	Recto	B1									X	
98	M	48	Carcinoma	M	Ciego	C									X	
99	M	87	Carcinoma	M	Recto	C									X	
100	M	71	Carcinoma	B	Colon trans.	D				X	X			X		
101	H	74	Carcinoma	M	Ang. hepát.	D		X								
102	H	66	Carcinoma	M	Ciego	D			X				X			
103	M	77	Carcinoma	M	Recto	B3						X			X	
104	M	?	Carcinoma	?	?	?										
105	H	63	Carcinoma	M	Recto	C										
106	H	49	Carcinoma	B	Sigma	C2									X	
108	H	49	Carcinoma	M	Colon ascen.	B2	X	X		X	X			X		
109	M	78	Carcinoma	B	Recto	B			X		X				X	
110	M	85	Carcinoma	?	Ang. esplén.	C			X							

#### 4.1. RELACIÓN ENTRE LA LOCALIZACIÓN Y EL ESTADIO DE

##### DUKES

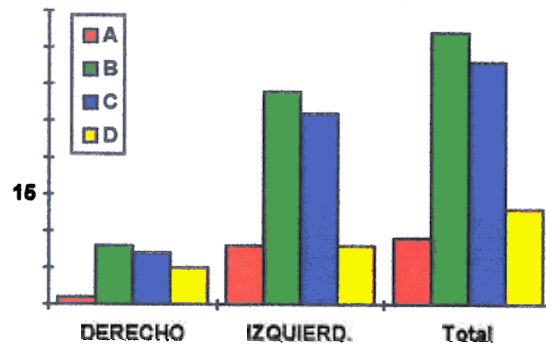
Se ha analizado la posible relación entre la localización y el estadio de Dukes de los tumores analizados. Los resultados obtenidos se exponen en las Tablas X y XI Fig. 5:

**Tabla X**

Localización		Estadio de Dukes				Total
		A	B	C	D	
<b>Derecho</b>	Ciego	1	2	4	1	<b>8</b>
	Colon ascendente	0	4	1	0	<b>5</b>
	Ángulo hepático	0	1	0	2	<b>3</b>
	Transverso	0	1	2	2	<b>5</b>
	<b>Total derecho</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>21</b>
<b>Izquierdo</b>	Ángulo esplénico	0	0	1	0	<b>1</b>
	Colon descendente	0	1	0	0	<b>1</b>
	Sigma	3	16	9	6	<b>34</b>
	Recto-Sigma	0	2	6	0	<b>8</b>
	Recto	5	10	10	2	<b>27</b>
	<b>Total izquierdo</b>	<b>8</b>	<b>29</b>	<b>26</b>	<b>8</b>	<b>71</b>
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>37</b>	<b>33</b>	<b>13</b>	<b>92</b>	

**Tabla XI**

Localización	Estadio de Dukes				Total
	A	B	C	D	
<b>DERECHO</b>	1	8	7	5	<b>21</b>
<b>IZQUIERDO</b>	8	29	26	8	<b>71</b>
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>37</b>	<b>33</b>	<b>13</b>	<b>92</b>

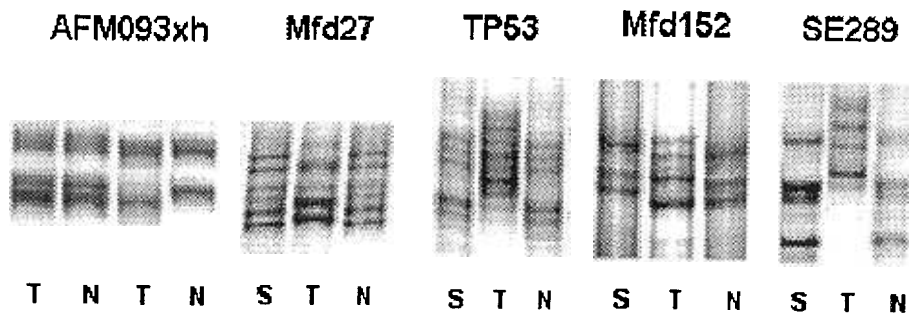


*Fig. 5: Distribución de los estadios de Dukes en relación con la localización de los tumores.*

El análisis estadístico de los datos no muestra significación ( $\chi^2=2,58$ ;  $gl=3$ ;  $P=0.46$ ). Si hacemos un análisis más detallado teniendo en cuenta las distintas localizaciones que puede tener el tumor dentro del colon derecho e izquierdo, tampoco encontramos diferencias significativas ( $\chi^2=2.82$ ;  $gl=24$ ;  $P=1$ ). No obstante, entre los adenocarcinomas localizados en sigma encontramos un alto porcentaje en estadio B de Dukes (46,875%).

## 4.2. ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

Un 38,54% de los pacientes muestran cambios en el patrón de microsatélites (fenotipo RER+ . En la figura 6 se muestran geles en los que se aprecia inestabilidad en cada uno de los microsatélites estudiados.



*Fig.6: Geles de electroforesis donde se muestra inestabilidad en cada uno de los microsatélites*

En estos pacientes hemos analizado la posible relación entre la aparición de inestabilidad y las diferentes variables determinadas.

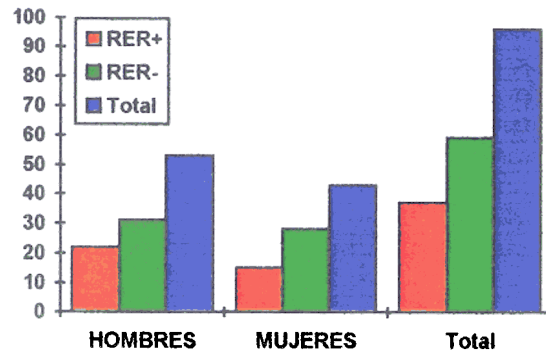
### 4.2.1. Sexo

La Tabla XII y la Fig. 7 muestran la distribución según el sexo de los individuos RER+ y RER-



**Tabla XII**

	RER+	RER-	Total
<b>HOMBRES</b>	22	31	<b>53</b>
<b>MUJERES</b>	15	28	<b>43</b>
<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>59</b>	<b>96</b>



*Fig. 7: Distribución de los fenotipos RER+ respecto al sexo*

No existe relación estadísticamente significativa entre el sexo y el fenotipo RER+ ( $\chi^2=11,12$ ;  $gl=1$ ;  $P=0.2899$ )

#### 4.2.2. Edad

Los resultados de las medias de edad de los pacientes RER+ con respecto a los RER-, se exponen en la Tabla XIII

**Tabla XIII**

	RER+	RER-	Total
<b>HOMBRES</b>	67,1	69,1	<b>68,3</b>
<b>MUJERES</b>	67,8	68,9	<b>68,5</b>
<b>Total</b>	<b>67,4</b>	<b>69,0</b>	<b>68,4</b>

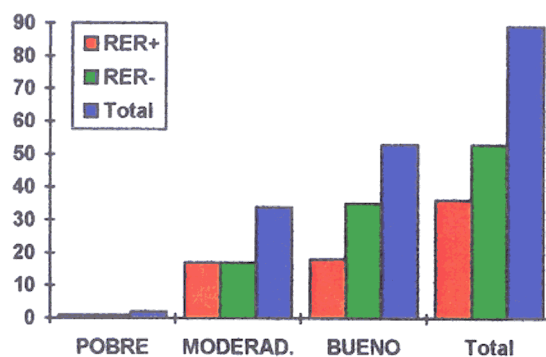
El análisis de la muestra pone de manifiesto que no existe relación estadísticamente significativa entre la edad de los pacientes y la aparición de inestabilidad de los microsatélites ( $t=0,58$ ;  $gl=89$ ;  $P=0,56$ ). Sin embargo, todos los pacientes menores de 47 años presentan fenotipo RER+.

#### 4.2.3. Grado de diferenciación

El grado de diferenciación de los tumores analizados respecto al fenotipo RER+ se especifica en la Tabla XIV y la Fig. 8:

**Tabla XIV**

	<b>RER+</b>	<b>RER-</b>	<b>Total</b>
<b>POBRE</b>	1	1	2
<b>MODERADO</b>	17	17	34
<b>BUENO</b>	18	35	53
<b>Total</b>	36	53	89



*Fig. 8: Distribución de los fenotipos RER respecto al grado de diferenciación tumoral*

El fenotipo RER+ no se asocia significativamente a ningún grado de diferenciación específico ( $\chi^2=,29$ ; gl=2; P=0,31).

#### 4.2.4. Localización

Los datos de la localización de los adenocarcinomas que presentan inestabilidad en microsatélites se exponen en las Tablas XV y XVI y la Fig. 9:

**Tabla XV**

		<b>RER<sup>+</sup></b>	<b>RER<sup>-</sup></b>	<b>Total</b>
<b>Derecho</b>	Ciego	3	5	8
	Colon ascendente	3	2	5
	Ángulo hepático	2	1	3
	Transverso	5	1	6
	<b>Total derecho</b>	<b>13</b>	<b>9</b>	<b>22</b>
	<b>Izquierdo</b>	Ángulo esplénico	1	0
Colon descendente		1	0	1
Sigma		12	22	34
Recto-Sigma		2	6	8
Recto		8	20	28
<b>Total izquierdo</b>		<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>
<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>57</b>	<b>94</b>	

**Tabla XVI**

	<b>RER<sup>+</sup></b>	<b>RER<sup>-</sup></b>	<b>Total</b>
<b>DERECHO</b>	13	9	22
<b>IZQUIERDO</b>	24	48	72
<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>57</b>	<b>94</b>

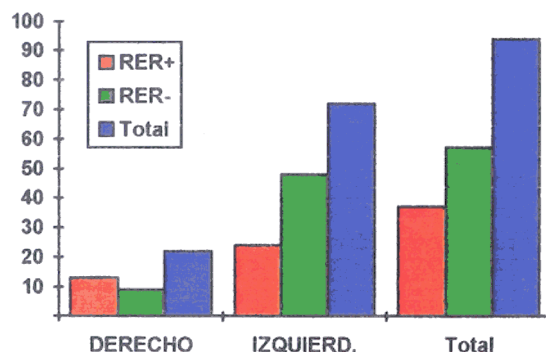


Fig. 9: Distribución de los fenotipos RER respecto a la localización del tumor

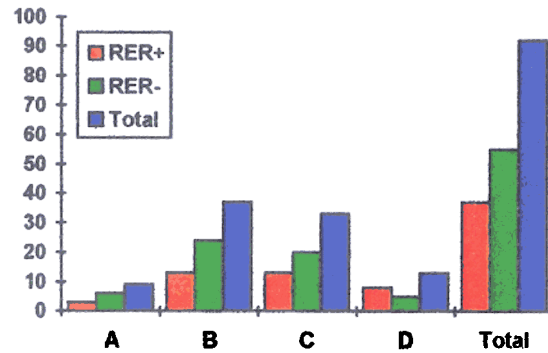
El 61,90% de los adenocarcinomas localizados en el colon derecho presentan inestabilidad, mientras que solamente un 31,28% de los localizados en el colon izquierdo tienen esta característica. Los tumores localizados en el colon derecho muestran fenotipo RER<sup>+</sup> más frecuentemente que los localizados en el colon izquierdo ( $\chi^2=3,66$ ; gl=1; P=0,05). En cuanto a la localización específica dentro del colon derecho o izquierdo no se encuentra ninguna tendencia significativa ( $\chi^2=12$ ; gl=8; P=0,14).

#### 4.2.5. Estadio de Dukes

Se ha analizado el número de tumores con inestabilidad en microsatélites en relación con el estadio de Dukes (A, B, C y D). Los resultados se exponen en la Tabla XVII y la Fig. 10:

**Tabla XVII**

	RER <sup>+</sup>	RER <sup>-</sup>	Total
<b>A</b>	3	6	9
<b>B</b>	13	24	37
<b>C</b>	13	20	33
<b>D</b>	8	5	13
<b>Total</b>	37	55	92

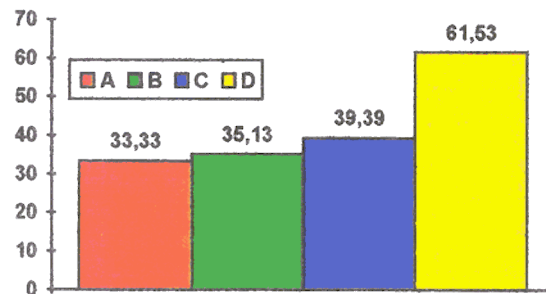


*Fig. 10: Distribución de los fenotipos RER respecto al estadio de Dukes*

De esta forma, el porcentaje de tumores en los distintos estadios de Dukes que presentan inestabilidad en microsatélites es el siguiente (Tabla XVIII y Fig. 11

**Tabla XVIII**

	%
<b>A</b>	33,33
<b>B</b>	35,13
<b>C</b>	39,39
<b>D</b>	61,53



*Fig. 11: Porcentajes de tumores con fenotipo RER<sup>+</sup> en los distintos estadios de Dukes*

En los estadios A, B y C el porcentaje de tumores RER+ es muy similar, aunque va ascendiendo ligeramente. Un gran porcentaje de los tumores en el estadio D presenta inestabilidad en microsatélites. Sin embargo, este porcentaje, aunque es elevado, no alcanza la significación ( $\chi^2=3,04$ ;  $gl=3$ ;  $P=0.38$ ).

#### 4.2.6. Localización y estadio de Dukes

Se ha realizado un análisis conjunto de la localización y el estadio de Dukes de los adenocarcinomas que presentaban fenotipo RER+ (Tablas XIX y XX. Fig. 12):

Tabla XIX

Localización		Estadio de Dukes				Total
		A	B	C	D	
<b>Derecho</b>	Ciego	1	0	1	1	3
	Colon ascendente	0	3	0	0	3
	Ángulo hepático	0	1	0	1	2
	Transverso	0	1	2	2	5
	<b>Total derecho</b>	1	5	3	4	13
<b>Izquierdo</b>	Ángulo esplénico	0	0	1	0	1
	Colon descendente	0	1	0	0	1
	Sigma	0	6	2	4	12
	Recto-Sigma	0	0	3	0	3
	Recto	2	1	4	0	7
	<b>Total izquierdo</b>	2	8	10	4	24
<b>Total</b>		3	13	13	8	37

Tabla XX

Localización	Estadio de Dukes				Total
	A	B	C	D	
<b>DERECHO</b>	1	5	3	4	<b>13</b>
<b>IZQUIERDO</b>	2	8	10	4	<b>24</b>
<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>8</b>	<b>37</b>

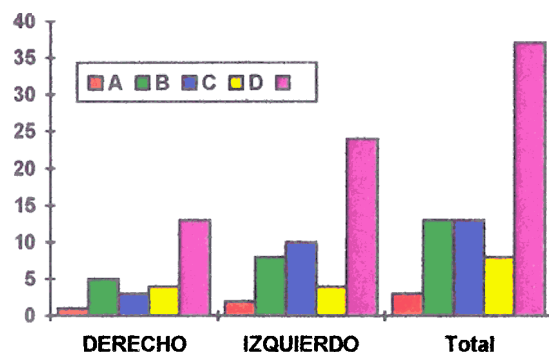
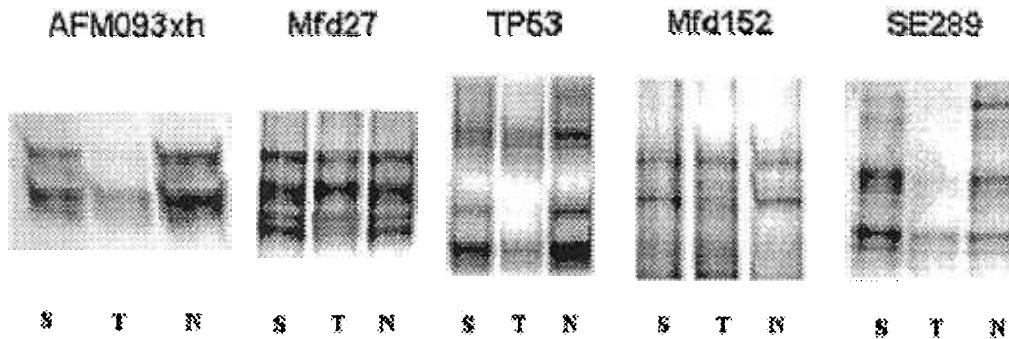


Fig. 12: Distribución de los tumores con fenotipo RER<sup>+</sup> respecto a la localización y el estadio del tumor.

El análisis estadístico de estos resultados no pone de manifiesto ninguna tendencia significativa que relacione el fenotipo RER<sup>+</sup> con una localización del tumor y un estadio de Dukes determinado. Este resultado se mantiene tanto si tomamos los datos generales ( $\chi^2=1,44$ ; gl=2; P=0.48), como si analizamos la localización concreta del tumor ( $\chi^2=32,27$ ; gl=24; P=0.11).

#### 4.3. ANÁLISIS DE LA PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD (LOH)

En la figura 13 se muestran geles en los que se aprecia LOH en cada uno de los microsatélites analizados.



*Fig. 13: Geles de electroforesis donde se muestran pérdidas de heterocigosidad.*

##### 4.3.1. CROMOSOMA 2: Microsatélite AFM093xh

Sólo existe un caso de LOH en una paciente de 82 años con un adenocarcinoma localizado en recto-sigma, pobremente diferenciado y en estadio C de Dukes. Este caso supone un porcentaje de un 1,04% de LOH para el microsatélite AFM093xh localizado en una zona próxima al gen hMSH2.

##### 4.3.2. CROMOSOMA 5q: Microsatélite Mfd27

Se han identificado 9 tumores con pérdida de heterocigosidad (LOH) en el microsatélite Mfd27 localizado



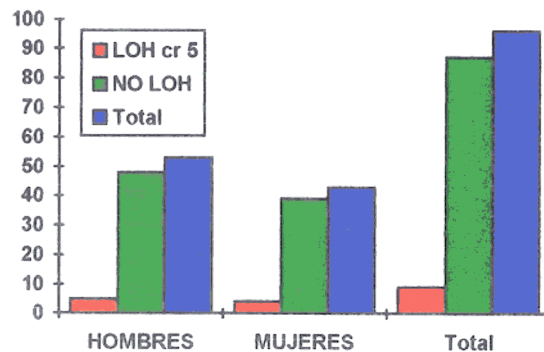
en el cromosoma 5q. Este valor supone el 9,37% de los individuos analizados.

#### 4.3.2.1 Sexo

En la Tabla XXI y la Fig. 14 se muestran los datos observados de las pérdidas de heterocigosidad para el microsatélite Mfd27 en relación con el sexo del paciente:

**Tabla XXI**

	<b>LOH cr 5</b>	<b>NO LOH</b>	<b>Total</b>
<b>HOMBRES</b>	5	48	<b>53</b>
<b>MUJERES</b>	4	39	<b>43</b>
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>87</b>	<b>96</b>



*Fig. 14: Distribución de la LOH en el cromosoma 5q con respecto al sexo*

Estos datos muestran que no existe relación entre el sexo y la LOH en el cromosoma 5q ( $\chi^2=0,01$ ;  $gl=1$ ;  $P=0,920$ )

#### 4.3.2.2. Edad

Se puede observar que la media de edad de los pacientes con LOH del cromosoma 5q es significativamente superior a la de los individuos que conservan ambas copias ( $t= 3,20$ ;  $gl=89$ ;  $P=0,02$ ) (Tabla XXII).

**Tabla XXII**

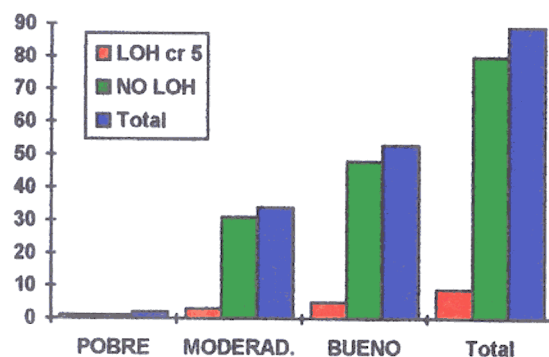
	<b>LOH cr 5</b>	<b>NO LOH</b>	<b>Total</b>
<b>HOMBRES</b>	78,0	67,2	<b>68,3</b>
<b>MUJERES</b>	76,0	67,7	<b>68,5</b>
<b>Total</b>	<b>77,1</b>	<b>67,4</b>	<b>68,4</b>

#### 4.3.2.3 Grado de diferenciación

Los niveles de diferenciación de los tumores con LOH para el cromosoma 5q se muestran en la Tabla XXIII y en la Fig. 15:

**Tabla XXIII**

	<b>LOH cr 5</b>	<b>NO LOH</b>	<b>Total</b>
<b>POBRE</b>	1	1	<b>2</b>
<b>MODERADO</b>	3	31	<b>34</b>
<b>BUENO</b>	5	48	<b>53</b>
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>80</b>	<b>89</b>



*Fig. 15: Distribución de los tumores con LOH en el cromosoma 5q respecto al grado de diferenciación*

El análisis estadístico de los datos pone de manifiesto que no hay ninguna relación entre el grado de diferenciación y la LOH en el cromosoma 5q ( $\chi^2=3,59$ ;  $gl=2$ ;  $P=0,16$ ).

#### 4.3.2.4. Localización

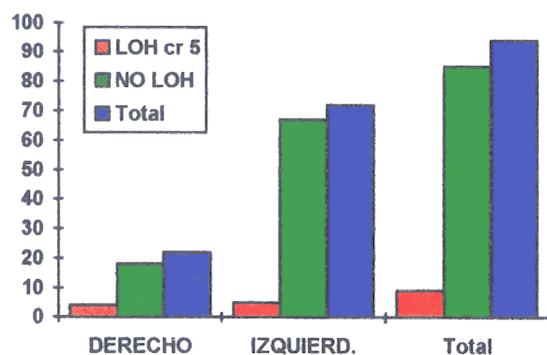
La localización de los carcinomas que presentan LOH para el cromosoma 5q se muestran en la Tablas XXIV y XXV y en la Fig. 16:

**Tabla XXIV**

		<b>LOH cr 5</b>	<b>NO LOH</b>	<b>Total</b>
<b>Derecho</b>	Ciego	2	6	8
	Colon ascendente	1	4	5
	Ángulo hepático	0	3	3
	Transverso	1	5	6
	<b>Total derecho</b>	<b>4</b>	<b>18</b>	<b>22</b>
<b>Izquierdo</b>	Ángulo esplénico	0	1	1
	Colon descendente	0	1	1
	Sigma	2	32	34
	Recto-Sigma	0	8	8
	Recto	3	25	28
	<b>Total izquierdo</b>	<b>5</b>	<b>67</b>	<b>72</b>
<b>Total</b>		<b>9</b>	<b>85</b>	<b>94</b>

**Tabla XXV**

	<b>LOH cr 5</b>	<b>NO LOH</b>	<b>Total</b>
<b>DERECHO</b>	4	18	22
<b>IZQUIERDO</b>	5	67	72
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>85</b>	<b>94</b>



*Fig. 16: Distribución de la LOH para el cromosoma 5q respecto a la localización del tumor*

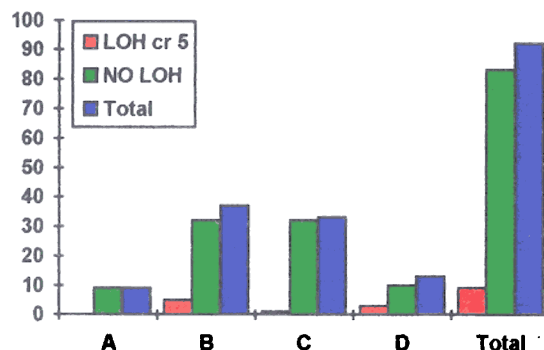
Un 18,18% de los tumores de colon derecho presenta LOH para el cromosoma 5q, mientras que solamente un 6,94% de los tumores de colon izquierdo han sufrido esta alteración. Este resultado demuestra una tendencia diferencial entre el colon derecho e izquierdo aunque la diferencia no alcanza la significación ( $\chi^2=1,33$ ;  $gl=1$ ;  $P=0,25$ ), debido probablemente al tamaño muestral. De manera análoga cuando se considera la localización exacta del tumor las diferencias no resultan estadísticamente significativas ( $\chi^2=5,13$ ;  $gl=8$ ;  $P=0,74$ ).

#### 4.3.2.5. Estadio de Dukes

Se ha analizado la posible relación entre el estadio de Dukes y la pérdida de heterocigosidad para el cromosoma 5q. Los resultados se muestran en la Tabla XXVI y en la Fig. 17:

**Tabla XXVI**

	<b>LOH cr 5</b>	<b>NO LOH</b>	<b>Total</b>
<b>A</b>	0	9	<b>9</b>
<b>B</b>	5	32	<b>37</b>
<b>C</b>	1	32	<b>33</b>
<b>D</b>	3	10	<b>13</b>
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>83</b>	<b>92</b>



*Fig. 17: Distribución de la LOH en el cromosoma 5q respecto al estadio de Dukes tumoral*

El porcentaje de tumores en los distintos estadios de Dukes que presentan LOH en el cromosoma 5q es el siguiente (Tabla XXVII)

**Tabla XXVII**

	<b>%</b>
<b>A</b>	0
<b>B</b>	13,51
<b>C</b>	3,03
<b>D</b>	23,07

El análisis de los datos pone de manifiesto que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la distribución de las pérdidas de heterocigosidad en los distintos estadios de Dukes ( $\chi^2=5,87$ ;  $gl=3$ ;  $P=0,11$ )

#### 4.3.2.6. Localización y estadio de Dukes

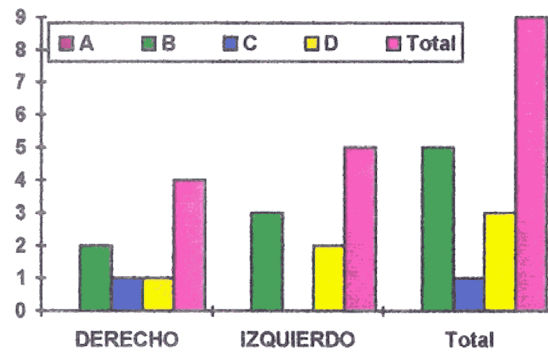
Cuando se analizan conjuntamente la localización y el estadio de Dukes de los adenocarcinomas que presentan LOH para el cromosoma 5q se obtienen los resultados que se resumen en las Tablas XXVIII y XXIX y en la Fig. 18:

**Tabla XXVIII**

Localización		Estadio de Dukes				Total
		A	B	C	D	
<b>Derecho</b>	Ciego	0	1	0	1	2
	Colon ascendente	0	1	0	0	1
	Ángulo hepático	0	0	0	0	0
	Transverso	0	0	1	0	1
	<b>Total derecho</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>4</b>
<b>Izquierdo</b>	Ángulo esplénico	0	0	0	0	0
	Colon descendente	0	0	0	0	0
	Sigma	0	1	0	1	2
	Recto-Sigma	0	0	0	0	0
	Recto	0	2	0	1	3
	<b>Total izquierdo</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>5</b>
<b>Total</b>		<b>0</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>9</b>

**Tabla XXIX**

Localización	Estadio de Dukes				Total
	A	B	C	D	
<b>DERECHO</b>	0	2	1	1	<b>4</b>
<b>IZQUIERDO</b>	0	3	0	2	<b>5</b>
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>9</b>



*Fig. 18: Distribución de los tumores con LOH en el cromosoma 5q respecto al estadio de Dukes y la localización del tumor.*

De este análisis no se desprende ningún estadísticamente significativo. Se ha considerado tanto la localización general (colon izquierdo y derecho) ( $\chi^2=1,44$ ;  $gl=2$ ;  $P=0,49$ ), como la localización específica del tumor ( $\chi^2=10,0$ ;  $gl=8$ ;  $P=0,26$ ).

#### 4.3.3. CROMOSOMA 17p: Microsatélites TP53 y Mfd152

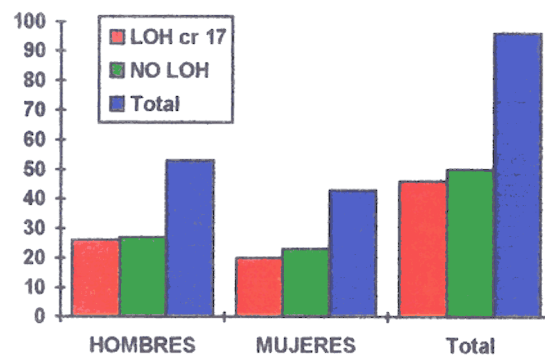
Se han identificado 19 pacientes que muestran pérdida de heterocigosidad en el microsatélite TP53 -localizado en una secuencia intrónica del gen TP53- y 33 pacientes LOH para el microsatélite Mfd152 -situado en una región adyacente a dicho gen-. Hay 6 adenocarcinomas que presentan LOH para ambos microsatélites. Un 47,92% de los pacientes analizados presentan LOH para el cromosoma 17p

#### 4.3.3.1. Sexo

En la Tabla XXX y en la Fig. 19 se muestran los datos de pérdida de heterocigosidad observados para los microsatélites TP53 y Mfd152 en relación con el sexo:

**Tabla XXX**

	<b>LOH cr 17</b>	<b>NO LOH</b>	<b>Total</b>
<b>HOMBRES</b>	26	27	<b>53</b>
<b>MUJERES</b>	20	23	<b>43</b>
<b>Total</b>	<b>46</b>	<b>50</b>	<b>96</b>



*Fig. 19: Distribución de los tumores con LOH en 17p respecto al sexo del paciente*

Estos datos demuestran que no hay relación entre la LOH del cromosoma 17p y el sexo de los pacientes analizados ( $\chi^2=1,83$ ;  $gl=1$ ;  $P=0,96$ ).



#### 4.3.3.2. Edad

No se ha registrado ninguna diferencia significativa entre las edades de los pacientes con adenocarcinomas con LOH en el cromosoma 17p y los que conservan ambas copias ( $t=1,60$ ;  $gl=89$ ;  $P=0.11$ ) (Tabla XXXI)

**Tabla XXXI**

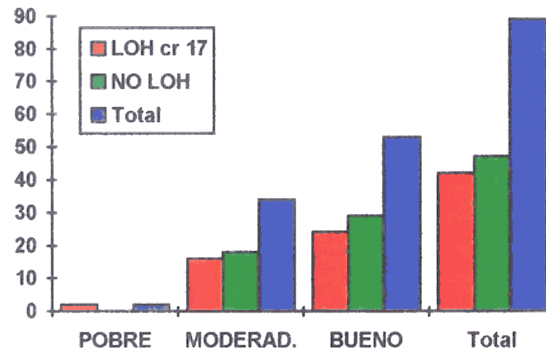
	<b>LOH cr 17</b>	<b>NO LOH</b>	<b>Total</b>
<b>HOMBRES</b>	69,0	27	<b>68,3</b>
<b>MUJERES</b>	72,4	23	<b>68,5</b>
<b>Total</b>	<b>70,5</b>	<b>50</b>	<b>68,4</b>

#### 4.3.3.3. Grado de diferenciación

En la Tabla XXXII y en la Fig. 20 se muestran los grados de diferenciación de los tumores de los pacientes con LOH del cromosoma 17p y de aquéllos que conservan las dos copias:

**Tabla XXXII**

	<b>LOH cr 17</b>	<b>NO LOH</b>	<b>Total</b>
<b>POBRE</b>	2	0	2
<b>MODERADO</b>	16	18	34
<b>BUENO</b>	24	29	53
<b>Total</b>	<b>42</b>	<b>47</b>	<b>89</b>



*Fig. 20: Distribución de los LOH del cromosoma 17p respecto al grado de diferenciación del tumor*

No hay relación entre la LOH del cromosoma 17p y un grado de diferenciación determinado ( $\chi^2=2,32$ ;  $gl=2$ ;  $P=0,31$ ).

#### 4.3.3.4. Localización

Los datos de la localización de los adenocarcinomas que presentan LOH para el cromosoma 17p se encuentran en las Tablas XXXIII y XXXIV y en la Fig.

**Tabla XXXIII**

		LOH cr 17	NO LOH	Total
<b>Derecho</b>	Ciego	4	4	8
	Colon ascendente	3	2	5
	Ángulo hepático	0	3	3
	Transverso	3	3	6
	<b>Total derecho</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>22</b>
<b>Izquierdo</b>	Ángulo esplénico	0	1	1
	Colon descendente	0	1	1
	Sigma	19	15	34
	Recto-Sigma	2	6	8
	Recto	14	14	28
	<b>Total izquierdo</b>	<b>35</b>	<b>37</b>	<b>72</b>
<b>Total</b>		<b>45</b>	<b>49</b>	<b>94</b>

Tabla XXXIV

	LOH cr 17	NO LOH	Total
<b>DERECHO</b>	10	12	<b>22</b>
<b>IZQUIERDO</b>	35	37	<b>72</b>
<b>Total</b>	<b>45</b>	<b>49</b>	<b>94</b>

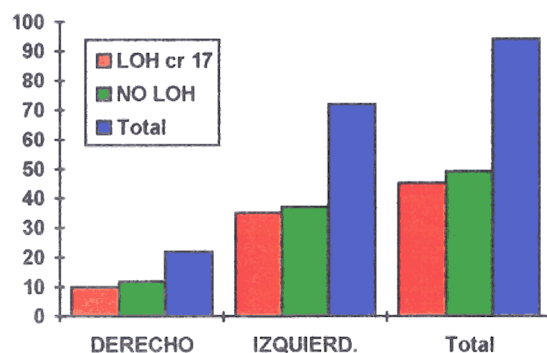


Fig. 21: Distribución de la LOH en 17p respecto a la localización del tumor

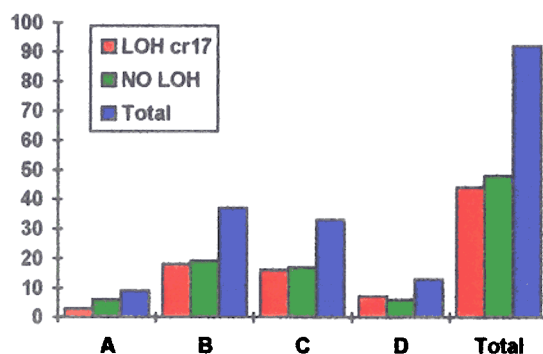
Se ha analizado las LOH con respecto a la localización concreta del tumor ( $\chi^2=7,51$ ;  $gl=8$ ;  $P=0,48$ ) y con respecto a la localización general en el colon derecho o izquierdo ( $\chi^2=0,01$ ;  $gl=1$ ;  $P=0,97$ ), no encontrándose diferencias significativas en ninguno de los casos.

#### 4.3.3.5. Estadio de Dukes

Los resultados de los tumores con LOH para el cromosoma 17p en relación con el estadio de Dukes se resumen en la Tabla XXXV y en la Fig. 22:

**Tabla XXXV**

	LOH cr 17	NO LOH	Total
<b>A</b>	3	6	9
<b>B</b>	18	19	37
<b>C</b>	16	17	33
<b>D</b>	7	6	13
<b>Total</b>	44	48	92



*Fig. 22: Distribución de las LOH en 17p respecto al estadio de Dukes del tumor*

El porcentaje de tumores en los distintos estadios de Dukes que presentan LOH en el cromosoma 17p es el siguiente (Tabla XXXVI)

**Tabla XXXVI**

	%
<b>A</b>	33,33
<b>B</b>	48,64
<b>C</b>	48,48
<b>D</b>	53,84

No puede establecerse relación entre la pérdida de una copia del cromosoma 17p y el estadio de Dukes en el que se encuentran el tumor ( $\chi^2=0,96$ ;  $gl=3$ ;  $P=0,81$ )

#### 4.3.3.6. Localización y estadio de Dukes

ha realizado un análisis conjunto de la localización y el estadio de Dukes de los adenocarcinomas que presentan LOH en el cromosoma 17p. (Tabla XXXVII y XXXVIII y Fig. 23):

Tabla XXXVII

Localización		Estadio de Dukes				Total
		A	B	C	D	
<b>Derecho</b>	Ciego	0	2	2	0	4
	Colon ascendente	0	2	1	0	3
	Ángulo hepático	0	0	0	0	0
	Transverso	0	0	1	1	2
	<b>Total derecho</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>9</b>
<b>Izquierdo</b>	Ángulo esplénico	0	0	0	0	0
	Colon descendente	0	0	0	0	0
	Sigma	2	7	5	5	19
	Recto-Sigma	0	0	1	0	1
	Recto	1	6	6	1	14
	<b>Total izquierdo</b>	<b>3</b>	<b>14</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>35</b>
<b>Total</b>		<b>3</b>	<b>18</b>	<b>16</b>	<b>7</b>	<b>44</b>

Tabla XXXVIII

Localización	Estadio de Dukes				Total
	A	B	C	D	
<b>DERECHO</b>	0	4	4	1	9
<b>IZQUIERDO</b>	3	14	12	5	35
<b>Total</b>	3	18	16	7	44

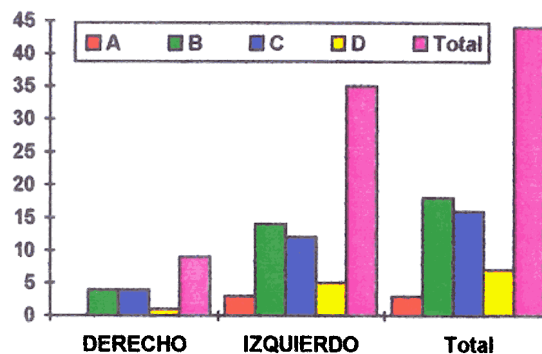


Fig. 23: Distribución de la LOH en 17p respecto a la localización y estadio tumoral

Teniendo en cuenta las dos variables no se obtiene ninguna tendencia de los tumores con una determinada localización y estadio de Dukes a sufrir pérdidas en este cromosoma ( $\chi^2=1,04$ ; gl=3; P=0,79).

#### 4.3.4. CROMOSOMA 18q: Microsatélite SE289

Hemos encontrado 17 pacientes que muestran pérdida de heterocigosidad (LOH) en el microsatélite SE289 localizado en el cromosoma 18q. Este valor supone el 17,71% de los individuos analizados.

##### 4.3.4.1. Sexo

En la Tabla XXXIX y en la Fig. 24 se muestra el sexo de los pacientes con tumores que han sufrido pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 18q:

**Tabla XXXIX**

	<b>LOH cr 18</b>	<b>NO LOH</b>	<b>Total</b>
<b>HOMBRES</b>	11	42	<b>53</b>
<b>MUJERES</b>	6	37	<b>43</b>
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>79</b>	<b>96</b>

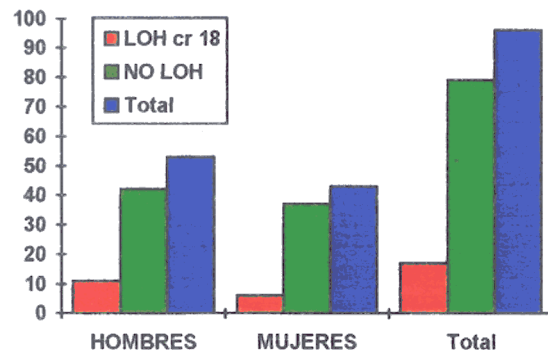


Fig.: 24: Distribución de los tumores con LOH en 18q respecto al sexo del paciente.

Estos datos demuestran que no hay correlación entre el sexo del paciente y la pérdida de una copia de este cromosoma ( $\chi^2=0,36$ ;  $gl=1$ ;  $P=0,540$ ).

#### 4.3.4.2. Edad

No se ha registrado ninguna diferencia significativa entre las edades de los pacientes con adenocarcinomas con LOH en el cromosoma 18q y los que conservan ambas copias ( $t=0,41$ ;  $gl=89$ ;  $P=0,68$ ) Tabla XL):

Tabla XL

	LOH cr 18	NO LOH	Total
<b>HOMBRES</b>	65,1	69,1	<b>68,3</b>
<b>MUJERES</b>	71,3	68,0	<b>68,5</b>
<b>Total</b>	<b>67,4</b>	<b>68,6</b>	<b>68,4</b>

#### 4.3.4.3. Grado de diferenciación

En la Tabla XLI y la Fig. 25 se muestran los grados de diferenciación de los tumores en relación con las LOH de este cromosoma:

Tabla XLI

	LOH cr 18	NO LOH	Total
<b>POBRE</b>	1	1	2
<b>MODERADO</b>	8	26	34
<b>BUENO</b>	8	45	53
<b>Total</b>	17	72	89

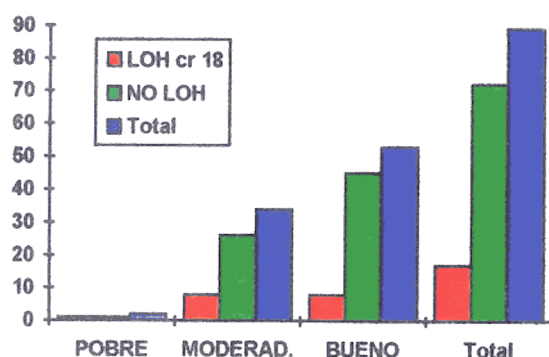


Fig. 25: Distribución de la LOH en 18q respecto al nivel de diferenciación tumoral

No se puede observar ninguna relación entre la pérdida de material en este cromosoma y el grado de diferenciación que tiene el tumor ( $\chi^2=2,22$ ;  $gl=2$ ;  $P=0,32$ ). No obstante, se constata el porcentaje de tumores con LOH aumenta cuanto menos diferenciadas están las células del adenocarcinoma, pero, como ya se ha indicado, no de forma estadísticamente significativa.



#### 4.3.4.4. Localización

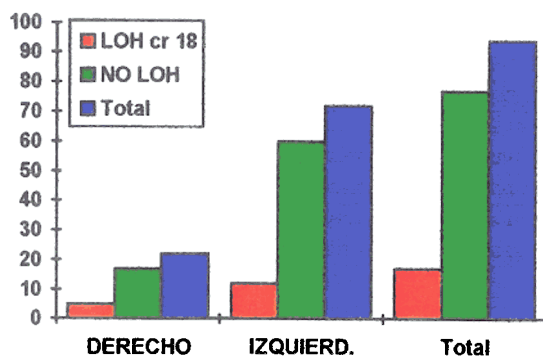
En las Tablas XLII y XLIII y la Fig. 26 se muestran las diferentes localizaciones de los tumores con LOH en el cromosoma 18q y de los tumores que no presentan esta alteración:

**Tabla XLII**

		LOH cr 18	NO LOH	Total
<b>Derecho</b>	Ciego	2	6	8
	Colon ascendente	1	4	5
	Ángulo hepático	1	2	3
	Transverso	1	5	6
	<b>Total derecho</b>	<b>5</b>	<b>17</b>	<b>22</b>
<b>Izquierdo</b>	Ángulo esplénico	0	1	1
	Colon descendente	1	0	1
	Sigma	6	28	34
	Recto-Sigma	2	6	8
	<b>Total izquierdo</b>	<b>12</b>	<b>60</b>	<b>72</b>
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>77</b>	<b>94</b>	

**Tabla XLIII**

	LOH cr 18	NO LOH	Total
<b>DERECHO</b>	5	17	22
<b>IZQUIERDO</b>	12	60	72
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>77</b>	<b>94</b>



*Fig. 26: Distribución de la LOH en 18q respecto a la localización del tumor.*

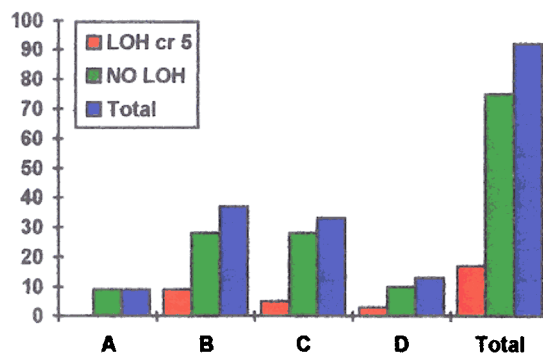
Un 22,72% de los tumores de colon derecho presenta para el cromosoma 18q, mientras que un 16,66% de tumores de colon izquierdo muestra esta alteración. No existen diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de la LOH del cromosoma 18q entre el colon derecho y el izquierdo ( $\chi^2=0,11$ ;  $gl=1$ ;  $P=0,740$ ).

#### 4.3.4.5. Estadio de Dukes

Se ha analizado el estadio de Dukes en relación las LOH del cromosoma 18q. Los resultados se muestran en la Tabla XLIV y en la Fig. 27:

**Tabla XLIV**

	<b>LOH cr 5</b>	<b>NO LOH</b>	<b>Total</b>
<b>A</b>	0	9	9
<b>B</b>	9	28	37
<b>C</b>	5	28	33
<b>D</b>	3	10	13
<b>Total</b>	17	75	92



*Fig. 27: Distribución de la LOH en 18q respecto al estadio tumoral.*

De esta forma, el porcentaje de tumores en los distintos estadios de Dukes que presentan LOH en el cromosoma 18q es el siguiente (Tabla XLV):

**Tabla XLV**

	%
<b>A</b>	0
<b>B</b>	24,32
<b>C</b>	15,15
<b>D</b>	23,07

Como se puede observar la LOH en el cromosoma 18q no puede relacionarse con un estadio determinado. Esto se confirma con el análisis de chi-cuadrado ( $\chi^2=3,3$ ;  $gl=3$ ;  $P=0,34$ ).

#### 4.3.4.6. Localización y estadio de Dukes

Por último se ha hecho un análisis conjunto de la localización y el estadio de Dukes de los adenocarcinomas que presentan LOH para el cromosoma 18q (Tablas XLVI y XLVII y Fig. 28:

Tabla XLVI

		A	B	C	D	Total
<b>Derecho</b>	Ciego	0	1	0	0	1
	Colon ascendente	0	1	0	0	1
	Ángulo hepático	0	0	0	1	1
	Transverso	0	0	0	1	1
	<b>Total derecho</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
<b>Izquierdo</b>	Ángulo esplénico	0	0	0	0	0
	Colon descendente	0	0	1	0	1
	Sigma	0	4	1	1	6
	Recto-Sigma	0	1	1	0	2
	Recto	0	1	3	0	4
	<b>Total izquierdo</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>13</b>
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>17</b>	

Tabla XLVII

	A	B	C	D	Total
<b>DERECHO</b>	0	2	0	2	4
<b>IZQUIERDO</b>	0	6	6	1	13
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>17</b>

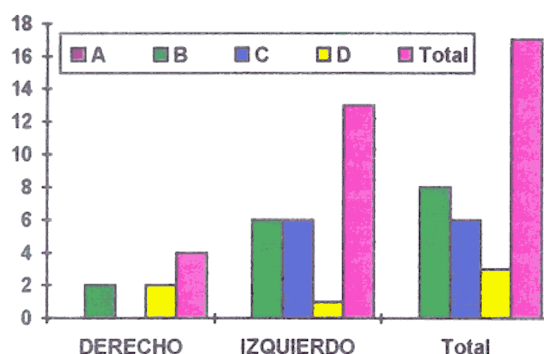


Fig. 28: Distribución de la LOH en 18q respecto al estadio y la localización del tumor.

El tratamiento estadístico indica que aunque no se alcanza la significación, probablemente por el tamaño muestral, los valores son muy cercanos a la significación ( $\chi^2=4,96$ ;  $gl=2$ ;  $P=0,08$ ). Los tumores con LOH en el cromosoma 18q en estadio C de Dukes se acumulan en el colon izquierdo.

**4.4. ANÁLISIS DEL TIPO Y NÚMERO DE ALTERACIONES EN LOS  
DISTINTOS ESTADIO DE DUKES**

Se han analizado las alteraciones presentes en los distintos estadios de Dukes. Un 74% de los tumores presentan algún tipo de alteración (inestabilidad de microsatélites, LOH en los cromosomas 2, 5, 17 y 18 o ambas cosas), mientras que el 26% restante no muestra ninguna alteración de las descritas.

Es interesante analizar el número de alteraciones que presentan los tumores en los distintos estadios de Dukes. El resultado de este análisis se muestra en la Tabla XLVIII:

**Tabla XLVIII**

Est. Dukes	Nº ind.	Nº de alteraciones (%)			
		0	I	>1	Total
A	9	3 (33,33)	6 (66,66)	0 (0)	6 (66,66)
B	37	9 (24,32)	15 (40,54)	13 (35,13)	28 (75,67)
C	32	9 (28,12)	13 (40,62)	10 (31,25)	23 (71,88)
D	13	1 (7,69)	5 (38,46)	7 (53,84)	12 (92,3)
Total	91	22	39	30	69

Es difícil analizar el papel de las alteraciones en la evolución de los tumores en los estadios B y C. El análisis va a centrarse, por tanto, en los estadios A y D.

#### 4.4.1. ANÁLISIS DE LOS TUMORES EN ESTADIO A

Un 33,33% de los tumores en estadio A muestra fenotipo RER<sup>+</sup>, un 33,33% LOH en el cromosoma 17 y el 33,33% restante no presenta ninguna alteración de las analizadas.

Un aspecto interesante es la media de edad de los pacientes que presentan una u otra alteración (Tabla XLIX):

Tabla XLIX

Alteración	Media de edad
RER <sup>+</sup>	42,3
LOH cr.17	78,6
Ninguna	68,3

El pequeño tamaño muestral puede quitar valor a la significación del resultado, pero se muestra una clara tendencia a que la edad de aparición del tumor sea más temprana en los pacientes con tumores RER<sup>+</sup>.

Se han analizado el resto de las variables y no se han detectado otros datos de interés. Un 77% de los tumores estaban bien diferenciados y el resto moderadamente. Esto se corresponde con la relativa poca agresividad de los tumores en estadio A de Dukes.

En cuanto a la localización, todos los tumores menos uno se encontraban en el colon izquierdo. El tumor localizado en el colon derecho presenta fenotipo RER+.

#### 4.4.2. ANÁLISIS DE LOS TUMORES EN ESTADIO D

En este estadio se produce una gran acumulación de mutaciones, de forma que se pueden encontrar tumores que presentan inestabilidad en unos loci y pérdidas de heterocigosidad en otros. Se ha realizado el análisis con respecto a la extensión local del tumor, denominándola según estadios de Dukes. En la Tabla L se especifican los estadios locales del tumor, las metástasis que ha producido y el tipo de alteraciones presentes.

Tabla L

Est.local	Metástasis	RER <sup>+</sup>	LOH
A	Hepática	+	cr. 5 y 17
B2	Hepática	-	cr.17
B2	Hepática	+	-
B2	Hepática	+	cr. 5
C2	Hepát./Periton.	+	cr.17
C2	Hepática	-	cr. 5 y 17
C2	Hepática	+	cr.18
C2	Hepática	+	cr.17 y 18
C2	Hepática	-	cr. 18
C2	Hepática	-	-
C2	Hepática	+	cr.17
C2	Hepática	+	-
C2	Hepática	-	cr.17

#### 4.5. ASOCIACIÓN DE ALTERACIONES

Se ha estudiado la relación entre los distintos estadios de Dukes y la presencia de las distintas alteraciones en los tumores, representándola en la tabla LI.

Tabla LI

Estadio	Pacientes	Número de alteraciones (%)			
		Total	Ninguna	<1	>1
A	9	6 (66.6)	3 (33.3)	6 (66.6)	0 (0)
B	37	28 (75.67)	9 (24.32)	15 (40.54)	13 (35.13)
C	32	23 (71.87)	9 (28.12)	13 (40.62)	10 (31.25)
D	13	12 (92.3)	1 (7.96)	5 (38.46)	7 (53.84)
Total	96	71 (73.95)	25 (26.04)	40 (41.66)	31 (32.29)



La frecuencia con que las distintas alteraciones genéticas se relacionan entre sí está representada en la tabla LII.

Tabla LII

Pacientes	Alteraciones asociadas
10	RER+, LOH 17
8	LOH 17 y 18
2	LOH 17 y 5
2	RER+, LOH 17 y 5
2	RER+, LOH 17 y 18
1	LOH 17, 18 y 5
1	RER+, LOH 5
1	RER+, LOH 17, 18 y 5

En la siguiente tabla se representa la frecuencia de aparición de cada alteración, según sea única o múltiple asociada a otras.

Tabla LIII

Alteración	Única (%)	Múltiple (%)
RER+	19 (51.35)	18 (48.64)
LOH Cr 17	20 (43.47)	26 (56.52)
LOH Cr 18	6 (33.3)	12 (66.6)
LOH Cr 5	2 (22.2)	7 (77.7)

## **5. DISCUSIÓN**

En este estudio se han determinado tanto la inestabilidad de los microsatélites AFM093, (cromosoma 2), Mfd27 (cromosoma 5), TP53 y Mfd152 (cromosoma 17) y SE289 (cromosoma 18), como la pérdida de heterocigosidad de los mismos. Se han elegido estos microsatélites por su localización próxima a genes implicados en cánceres colorrectales de origen hereditario. El microsatélite AFM093xh3 localizado en 2p16 se encuentra próximo al gen hMSH2 (gen implicado en la reparación postreplicativa del ADN) y localizado en 2p21. Peltomaki y cols. en 1993 (164) demostraron que el marcador D2S123 estaba ligado a un locus HNPCC, donde posteriormente se identificó el gen MSH2. El microsatélite Mfd27 (5q11.2-13.3) se encuentra localizado próximo al gen APC (5q21). Este locus fue descrito por Weber y cols. en 1990<sup>(213)</sup>. El microsatélite PT53 (17p13.1) y Mfd152 (17pter-p13.1) se encuentran uno en el interior del gen p53 (17p12-p13.3) y otro adyacente a dicho gen. El microsatélite SE289 (18q12.2-q12.3) está próximo al gen DCC (18q21-qter).

La existencia de LOH en estos microsatélites implica una alta probabilidad de LOH de los genes situados en su proximidad, puesto que la deleción en general suele implicar una secuencia larga y no un solo gen. Estos microsatélites pueden ser utilizados como marcadores de pérdidas de heterocigosidad en genes próximos.

La inestabilidad de microsatélites es un concepto que implica la alteración de los mecanismos reparadores del

ADN. Cuando existe una alteración en el ADN durante la replicación, actúan los mecanismos reparadores encargados de mantener la fidelidad del proceso. Si estos mecanismos están alterados, los errores se perpetuarán. Cuando se producen este tipo de fallos pueden ser detectados fácilmente a nivel de los microsatélites. Estos son cortas secuencias de pares de bases repetidas con un tamaño determinado en cada individuo. Durante la replicación pueden formarse bucles de inserción que modifican su longitud. Si los mecanismos reparadores están intactos, estos fallos son corregidos, si, por el contrario, están alterados se detecta un patrón de microsatélites diferente entre el tejido normal y el tumoral (fenotipo RER+). Los genes que se han implicado en este mecanismo reparador postreplicativo hMSH2, hMLH1, hPMS1 y hPMS2<sup>(18,120,160,161)</sup>.

En los individuos estudiados no existía ninguno con poliposis familiar adenomatosa o síndrome de Lynch diagnosticado clínicamente. La evaluación a la que ha sido sometida la serie intentando descubrir la posible relación de la aparición del cáncer colorrectal con alguna de las variables biológicas y clínico-patológicas analizadas (tabla IX) ha puesto de manifiesto que:

- La edad media de la muestra 68.4 años (rango 16-93) no difiere con la estimada para esta enfermedad<sup>(70,72)</sup>, siendo el 2.08% de los individuos menores de 40 años y el 10.41% menores de 50, poniendo de manifiesto que este tipo

de tumores se manifiesta con una mayor frecuencia a partir de la séptima década de la vida.

- No existe correlación entre el cáncer colorrectal esporádico y el sexo del paciente, aunque ha sido ligeramente superior el número de varones afectados. Es decir, no hay una incidencia diferencial entre hombres y mujeres.

- La distribución de los tumores a lo largo del colon tampoco difiere de otras series<sup>(40)</sup>:

- Colon derecho: 22.82%
- Colon izquierdo: 39.13%
- Recto: 38.04%

- Los tumores de la muestra se distribuyen de forma desigual respecto al estadio de Dukes, con bajas tasas en los estadios A y D.

- Un aspecto interesante ha resultado del análisis del estadio de Dukes del tumor respecto a su localización (tablas X y XI y fig.7). Aunque los análisis estadísticos no arrojan un resultado significativo, se observa una mayor frecuencia de tumores en estadio B entre los localizados en sigma (47.06%). La explicación de este alto porcentaje puede ser una cuestión meramente clínica, ya que los tumores localizados en sigma presentan sintomatología antes

que los de otras localizaciones, con lo que el enfermo consulta antes al especialista.

### 5.1. INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

En nuestra serie se han detectado 37 tumores con inestabilidad de microsatélites, es decir, fenotipo RER+. Esto representa el 38.54% de los casos, porcentaje mayor a lo encontrado en otras series descritas anteriormente en las que la inestabilidad oscila entre el 8% y el 28% de los tumores<sup>(128,193,218)</sup>. No obstante, es necesario tener en cuenta que las series de tumores colorrectales esporádicos previamente analizadas eran cortas, y algunas incluían líneas celulares.

En estos tumores con fenotipo RER+ se han analizado las relaciones entre inestabilidad con respecto las diferentes variables biológicas y clínico-patológicas incluidas en el estudio.

#### **Sexo**

En relación con el sexo no existen diferencias significativas con respecto a la inestabilidad, a pesar de que hay un porcentaje ligeramente menor de mujeres que presentan fenotipo RER+.

## **Edad**

No hemos detectado en este estudio relación entre la inestabilidad y la edad de aparición del tumor, siendo la media de los inestables 67.4 años y la de los estables 69 años. Sin embargo, llama la atención que el 60% de los pacientes menores de 50 años y el 100% de los menores de 40 presentan fenotipo RER+. Sería por tanto deseable realizar una vigilancia más estrecha de estos individuos, ya que entre ellos pudiera encontrarse algún HNPCC, puesto que entre las características de estos se encuentra la edad temprana de aparición<sup>(131,132)</sup>.

## **Estadio de Dukes**

En el síndrome de Lynch se ha descrito que la inestabilidad de microsátélites (fenotipo RER+) se observa en estadios tempranos de la enfermedad<sup>(181)</sup>. Los datos de nuestro estudio en base al estadiaje parecen confirmarlo, puesto que el 33.33% de los tumores de estadio A son RER+ y este porcentaje se mantiene los estadios B y C, incrementándose en los tumores D hasta el 61.53%, aunque las diferencias observadas entre ellos no son significativas. Esto hace suponer que la alteración de los mecanismos de reparación del ADN puede ser una vía de iniciación de estos tumores colorrectales esporádicos. El alto porcentaje de tumores en estadio D que presentan



inestabilidad puede tener su explicación en el hecho de que éstos están muy modificados genéticamente y en ellos se acumulan muchas más alteraciones que en los demás.

### **Grado de diferenciación**

Aunque no se ha detectado relación estadísticamente significativa en cuanto a la aparición de fenotipo RER+ y el grado de diferenciación, puede observarse que entre los tumores moderadamente diferenciados hay una alta incidencia de tumores con esta característica (tabla XIV y fig. 9). En general, los tumores RER+ de nuestra serie tienden a tener un bajo grado de diferenciación. Esto coincide con los datos publicados para los tumores HNPCC con fenotipo RER+<sup>(137)</sup>.

### **Localización**

Existe una relación clara entre la presencia de errores de replicación (fenotipo RER+) y la localización del tumor: Hay un número mayor de tumores con inestabilidad de microsatélites localizados en el colon proximal que en localizaciones distales. Así el 61.90% de los cánceres de colon derecho presentan fenotipo RER+, cifra significativamente diferente de la que muestran los tumores de colon izquierdo que muestran este fenotipo (34.28%)

( $p=0.05$ ). Esto puede suponer que la génesis de ciertos tipos de cáncer esporádico de colon derecho está relacionada con la alteración de los mecanismos reparadores de errores replicativos.

El análisis de la localización específica del tumor dentro del colon derecho e izquierdo no establece ninguna tendencia diferencial (tabla XVI). En el colon derecho la mayoría de los tumores de esta serie con fenotipo RER+ se localizan en el colon transversal, mientras que en el colon izquierdo los tumores con inestabilidad se acumulan en el colon sigmoide. Estos resultados son coincidentes con las localizaciones más frecuentes de los tumores en cada porción del colon.

## 5.2. PÉRDIDAS DE HETEROCIGOSIDAD:

Se han analizado las pérdidas de heterocigosidad en los loci interiores o cercanos a genes que han sido implicados en los síndromes hereditarios, detectándose pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 2p en el 1.04% de los casos, 9.37% en el cromosoma 5q, 47.91% en el cromosoma 17p y 17.7% en el cromosoma 18q.

El interés de este análisis es el estudio de las frecuencias de pérdidas de estos alelos en el cáncer colorrectal esporádico. Fearon y cols. establecieron un modelo de tumorigénesis para la FAP y el HNPCC<sup>(59)</sup>, y se ha supuesto que en el cáncer esporádico los sucesos eran coincidentes, sin embargo en esta serie se han hallado diferencias con el modelo, sobre todo en el orden de aparición de las pérdidas de heterocigosidad en la evolución del tumor.

### **Cromosoma 2: hMSH2**

La pérdida de heterocigosidad en la región del cromosoma 2p donde se encuentra localizado el gen MSH2 no se había descrito hasta ahora. Aunque la LOH para el marcador utilizado es muy baja (1.04%), el interés de reseñarla aquí es debido a que, en otras series analizadas en nuestro laboratorio, se han encontrado también pérdidas

de heterocigosidad de este locus. Este hecho, aunque se produzca con baja frecuencia, sugiere que el gen MSH2 puede seguir un comportamiento análogo al de los genes supresores en su forma de herencia, como se ha descrito para el gen hMLH1 del cromosoma 3<sup>(85)</sup>.

Por estar presente la pérdida de heterocigosidad en un solo individuo de la serie no se pueden extraer conclusiones en relación con las variables analizadas.

#### **Cromosoma 5: APC**

Las pérdidas de heterocigosidad detectadas en el cromosoma 5q se relacionan con el gen supresor de tumoración APC. Este gen se ha demostrado que está implicado en la etiología de los cánceres colorrectales polipósicos hereditarios<sup>(77,155)</sup>, de forma que, mediante la detección de alteraciones en este gen, se pueden identificar los individuos portadores de la enfermedad.

En este estudio sobre cáncer colorrectal esporádico ha aparecido un 9.37% de pérdida de heterocigosidad, cifra muy alejada de la reseñada por Kinzler que detectó mutaciones en el 60% de los carcinomas colorrectales esporádicos<sup>(106)</sup> y por Solomon que describió LOH en el 20-40% de estos tumores<sup>(103,183)</sup>. A pesar de la infravaloración de resultados

que se puede producir debido a la distancia existente entre el marcador y el gen, estos datos no permiten considerar al gen APC como causa determinante del origen del cáncer colorrectal esporádico con este porcentaje de tumores afectados.

Las pérdidas de heterocigosidad del cromosoma 5q no muestran relación con el sexo del paciente ni con la localización y el grado de diferenciación tumoral (tablas XXI, XXIII, XXIV y XXV).

Por el contrario, al analizar la relación entre la LOH en el cromosoma 5 y la edad, hemos encontrado que la media de edad de los pacientes con LOH en 5q es superior (77.11 años, rango 66-93) a la de los pacientes que no muestran pérdidas en ese cromosoma. Además, parece existir una tendencia diferencial en los tumores localizados en el colon derecho a perder más frecuentemente una copia del cromosoma 5q (en un 18.18% de los casos) que los situados en colon izquierdo, donde se producen las pérdidas en un 6,94% de los casos.

Al distribuir los tumores por estadios de Dukes las diferencias en pérdidas de heterocigosidad para 5q no son estadísticamente significativas. No obstante, la ausencia de LOH en tumores en estadios A apoya la idea de que las alteraciones en esta región cercana al gen APC no son las responsables de la aparición del cáncer colorrectal

esporádico. En los tumores estadio D de la serie aparecen LOH de 5q en el 23.07%. La ausencia de LOH en estadio A y la presencia de ellas en el estadio D indica que este evento puede estar implicado en la adquisición de características de agresividad tumoral. Llama la atención la distribución de las LOH del cromosoma 5q en los estadios B y C (tabla XXVI). La menor presencia de éstas en los tumores C indica que la evolución del tumor no es una progresión continua del estadio B al C y posteriormente al D, puesto que no se aprecia una acumulación de alteraciones. Más bien parece que aquellos tumores en los que aparece una pérdida de 5q adquieren la posibilidad de producir metástasis a distancia.

### **Cromosoma 17: p53**

Se ha detectado un 47.91% de LOH del cromosoma 17p en los tumores de la muestra. Las LOH de este cromosoma son independientes del sexo, la edad y el grado de diferenciación del tumor (tablas XXX, XXXI y XXXII).

El porcentaje de tumores con LOH en el cromosoma 17 es similar a lo largo de todo el colon, sin existir diferencias en relación con la localización tumoral. Aunque existe mayor número de tumores con LOH en 17p en el colon izquierdo, este resultado no es significativo, puesto que

hay un mayor número global de tumores de esta localización. Se ha descrito una distribución de las deleciones casi universal en el colon izquierdo<sup>(103)</sup>, por lo que se piensa que este gen está influenciado por carcinógenos exógenos (20). El resultado de este estudio no contradice la posible influencia de factores exógenos en las alteraciones génicas en esta localización, puesto que nuestra muestra es de un área geográfica con menor incidencia de cáncer de colon que otros países desarrollados y una dieta diferente.

Es de destacar la distribución de las pérdidas de heterocigosidad en 17p según los estadios de Dukes. En todos los estadios se encuentra un porcentaje de LOH alto, que va del 33.3% en estadio A a 53.84% en el estadio D. Esta distribución indica que, aunque existen pérdidas alélicas en los distintos estadios, una parte importante de tumores presenta esta alteración desde las primeras etapas, lo que implica que la pérdida de 17p no parece relacionarse con la adquisición del potencial invasivo, sino que incide en el proceso mismo de la tumorigénesis.

#### **Cromosoma 18: DCC**

En el cromosoma 18 se observa un 17.7% de pérdidas de heterocigosidad en esta serie. Estas LOH no parecen mostrar relación con el sexo del paciente (tabla XXXIX). La media

de edad de los individuos con LOH es de 67.43 años, distribuyéndose las LOH de una forma similar a lo largo de todo el colon (tabla XL). Por otra parte, las LOH de este cromosoma no parecen guardar relación con el grado de diferenciación tumoral (tabla XLI).

En enfermos con tumores estadio A de esta serie no se han detectado LOH en 18q. Aunque no existen diferencias estadísticamente significativas en las LOH de los tumores en los distintos estadios de Dukes, la ausencia de LOH en los tumores en estadio A puede indicar que esta alteración aparece de forma tardía en la carcinogénesis, como han apuntado diversos estudios<sup>(102,157)</sup>, donde la pérdida de función en el gen DCC confiere al tumor características de agresividad con la posibilidad de producir metástasis.

En el resto de estadios de Dukes ocurre algo similar a lo comentado con las LOH en 5q. El 23.07% de los tumores estadio D presentan LOH en 18q. En los estadios B y C las LOH son más altas para el primero, pudiendo indicar que éste subgrupo de tumores con LOH en cualquiera de los estadios es el que se comporta de forma más agresiva.



### 5.3. ALTERACIONES GENÉTICAS Y ESTADIOS DE DUKES

Después de comentar los resultados de errores de replicación y pérdida de heterocigosidad de cada cromosoma de forma independiente es necesario realizar una serie de consideraciones globales sobre lo hallado en los diferentes estadios de Dukes.

#### **Estadio A:**

Un 9.37% de los tumores de la serie se encuentran en estadio A. En base a las diferentes variables analizadas los tumores en este estadio se caracterizan, de modo general, por su baja agresividad relativa, buen grado de diferenciación y localización mayoritaria en colon izquierdo. En los enfermos estadio A de Dukes se pueden distinguir tres grupos en función de las alteraciones genéticas que presentan:

- Sin alteraciones genéticas: 3 enfermos
- Con fenotipo RER+: 3 enfermos
- Con LOH en 17p: 3 enfermos

No se ha demostrado ninguna otra alteración en los tumores de estadio A y ningún individuo presenta más de una alteración. En los tres casos en los que no se ha detectado ninguna anomalía, no debe descartarse la posibilidad de que

presenten otras mutaciones en genes que no se han investigado en este trabajo.

Estos resultados refuerzan la idea de que existen dos diferentes vías en el origen del cáncer colorrectal esporádico. Una vía estaría representada por los tumores RER+, con alteración de genes implicados en la reparación del ADN, lo que llevaría a una inestabilidad genética generalizada que, finalmente, afectaría a genes (oncogenes y/o genes supresores) implicados en la regulación del ciclo de división celular, con la consiguiente progresión tumoral.

Por otra parte, se encontrarían los cánceres colorrectales esporádicos que presentan, en su origen, pérdidas de heterocigosidad para 17p. A partir de este suceso, la acumulación de otras alteraciones secundarias irán asociadas a la progresión tumoral.

Como ya se indicó al hablar de la inestabilidad de los microsatélites, la media de edad de los enfermos RER+ tiende a ser más baja que el resto y los resultados en los individuos de estadio A lo confirman. En este sentido, cabe destacar que la media de edad de los enfermos con tumores RER+ (42.33 años) de este estadio es sensiblemente inferior a la de los enfermos con LOH del cromosoma 17p (78.66 años).

La localización de los tumores de estadio A es fundamentalmente en el colon izquierdo. Esto probablemente se debe a la dificultad de diagnosticar tumores poco avanzados en el colon derecho. El único enfermo en este estadio con localización proximal tiene fenotipo RER+, lo que apoya la tendencia de esta localización en los tumores inestables.

### **Estadio D**

La serie analizada presenta 13 individuos que en el momento del diagnóstico y extirpación del tumor se encontraban en estadio D de Dukes. En estos enfermos se ha investigado la extensión local del tumor (clasificándola en estadios de Dukes), la localización de las metástasis y las alteraciones genéticas que presentan (tabla L).

De estos tumores, el 92.3% presentan alguna de las alteraciones genéticas analizadas en este trabajo. Es importante destacar que 7 de ellos se presentan más de una alteración genética. En 11 aparecen o inestabilidad de microsatélites o LOH del cromosoma 17p, alteraciones que según los resultados expuestos anteriormente parecen estar en el origen del desarrollo del tumor.

Los tumores en estadio A presentan una alteración, como ya se ha expuesto, sin embargo la mayoría de los D tienen más de una. Las alteraciones diferenciales son las que deben conferir al tumor características de mayor agresividad y el desarrollo de metástasis. Estas características parecen estar relacionadas con los cromosomas 18q y 5q.

El gen DCC (localizado en el cromosoma 18q) se sabe que codifica una proteína de adhesión celular<sup>(58)</sup>. Las alteraciones de este gen pueden desencadenar una pérdida del control del crecimiento celular y puede ser, en parte, responsable de la alteración en la adhesión celular, invasión, motilidad y metástasis.

La función de la proteína codificada por el gen APC (mapeado en 5q) no es bien conocida. Sin embargo, se sabe que interactúa con cateninas que residen bajo la placa adherencial<sup>(177,189)</sup> y, a su vez, éstas actúan con una proteína integral de membrana que se ha implicado en la progresión tumoral. La existencia de alteraciones en los cromosomas 5q y 18q en los enfermos de estadio D, hecho que no se ha encontrado en ningún tumor A de la serie, parece apoyar la hipótesis de que ambos genes actúan en el mecanismo de progresión tumoral.

Otro dato que apoya estos hallazgos son los cambios hallados en el enfermo con un tumor estadio D cuya invasión

local sólo afecta hasta la muscularis mucosae (localmente considerado como A). En este tumor aparecen 3 alteraciones genéticas diferentes (tabla L). La presencia de alguna de estas alteraciones parece haberle conferido capacidades metastatizantes, independientemente de la progresión local del tumor.

Cuando se analiza el número de alteraciones de los tumores en relación con el estadio de Dukes llama la atención la existencia de una progresión de dichos cambios del estadio A al D (tabla LI). Como ya se ha expuesto los cambios en el estadio A son únicos y en el D tienden a ser múltiples.

### **Estadios B y C**

Los estadios B y C aparecen como un grupo único en cuanto a porcentaje de alteraciones (tabla LI). Esta agrupación puede deberse a la heterogeneidad de ambos grupos, en los que existen tumores con diferentes grados de agresividad. Efectivamente en la clínica, se observa que tumores de menor estadio pueden comportarse como más agresivos y viceversa, sin que se hayan podido detectar las causas determinantes del mejor o peor comportamiento de estos tumores.

En los tumores de esta serie en estos estadios se mantienen el fenotipo RER+ y la LOH de 17p como alteraciones más frecuentes, tanto únicas como asociadas a otras. Cuando aparece más de una alteración, en ambos estadios, se encuentra LOH en 18q y en 5q acompañando a la alteración fundamental.

Según los hallazgos en los estadios tumorales más extremos, la mayor agresividad tumoral puede venir dada por una acumulación de alteraciones genéticas de los tumores aunque, como ya se ha discutido, es posible que alguna alteración concreta determinante de agresividad tumoral (LOH en 5q y 18q). Para confirmar estas hipótesis será necesario realizar un seguimiento más prolongado de los enfermos, de manera que los datos de supervivencia diferencial, recidivas, etc, delimiten qué tipo de variable genética guarda relación con el peor pronóstico de los tumores. Si esto llega a ser demostrado proporcionará un marcador de agresividad tumoral para discriminar aquellos tumores que requieren un tratamiento adyuvante más agresivo.

#### 5.4. VALORACIÓN GLOBAL DE RESULTADOS

Un 73.95% de los tumores de la muestra presentan algún tipo de alteración genética en los marcadores analizados, confirmándose la idea de que la etiología del cáncer colorrectal esporádico es genética.

Según los resultados de este trabajo existen dos formas alternativas, genéticamente diferentes, de producirse el cáncer colorrectal esporádico.

Por un lado, un porcentaje de individuos de la serie parecen desarrollar la enfermedad debido a una inestabilidad de su genoma, probablemente por alteración de los genes implicados en la reparación postreplicativa del ADN. Estos son los pacientes RER+ que, en general, se corresponden con individuos más jóvenes y cánceres de localización proximal. Estos datos se corroboran con los hallazgos descritos en otras series<sup>(128,193)</sup>. Llama la atención que las características de localización del tumor, edad del paciente y fenotipo RER+, coinciden en gran medida con las que presentan los enfermos con síndrome de Lynch.

La temprana edad de aparición del tumor en algunos individuos hace pensar que en ellos la predisposición genética es muy importante. Estos enfermos pueden

corresponder en algún caso, a pacientes con síndrome de Lynch no diagnosticado en la familia por tener una historia falsamente negativa de cáncer colorrectal hereditario, o ser portadores de mutaciones "de novo". Aún así, los datos de prevalencia de este síndrome no permiten suponer, que un número significativo de tumores RER+ de esta serie pertenezcan enmascaradamente, a portadores de tal enfermedad hereditaria. Por ello hay que suponer que la vía de alteraciones en genes de reparación está implicada directamente en la etiología del cáncer colorrectal esporádico.

La otra vía de aparición del cáncer colorrectal esporádico es la LOH del cromosoma 17, que implica al gen p53. El hecho de que los individuos en estadio A con esta alteración tengan una edad media más alta apoya la teoría de que este gen está relacionado con carcinógenos ambientales, por lo que el tiempo necesario para la aparición del tumor es más prolongado.

La localización proximal de los tumores RER+ se debe a que en el colon derecho por sus características, como heces más líquidas y tránsito más elevado, es menos susceptible a la acción de los carcinógenos ambientales que el izquierdo. Por ello, los tumores que aparecen en esta localización se deben fundamentalmente a características intrínsecas del paciente (inestabilidad genómica, mutaciones en línea germinal, etc.), más que a una acción exógena.



Según se representa en la tabla LIII de resultados, las alteraciones que aparecen más frecuentemente asociadas son las LOH del cromosoma 18q y 5q. Esta característica, unida a que no aparecen en ningún tumor en estadio A apoyan la teoría de que son alteraciones que aparecen durante la progresión del cáncer, confiriendo mayor agresividad al tumor. Cuando se alcance un mayor tiempo de seguimiento de los tumores con estas alteraciones se podrá confirmar lo que ahora se apunta como una fuerte posibilidad. Estos hallazgos pueden transformarse en los marcadores de mayor agresividad de los tumores y se podrá diferenciar aquellos enfermos que necesitarán una terapia adyuvante más agresiva, así como los que no la requerirán, pudiendo evitarse efectos secundarios.

La existencia de alteraciones genéticas diferentes en el origen de los cánceres colorrectales esporádicos, junto a la presencia de alteraciones secundarias que pueden determinar un comportamiento diferencial de agresividad tumoral, podrían estar reflejando que este cáncer es un conjunto de enfermedades que en su desarrollo producen un tumor colorrectal.

En poco tiempo se requerirá estudio genético de todos los tumores, tanto para valorar su pronóstico, como su etiología. Así, en las formas que pueden ser familiares se estudiará de una manera más directa a todos los pacientes

pudiéndose hacer un diagnóstico diferencial y un tratamiento profiláctico de la enfermedad.

## **6. CONCLUSIONES**

## **PRIMERA**

El 73.95% de los tumores de la serie presentan alteraciones genéticas en alguno de los marcadores analizados, haciendo patente que la etiología del cáncer colorrectal es genética.

## **SEGUNDA**

Parecen existir dos vías genéticas alternativas en la génesis del cáncer colorrectal esporádico: inestabilidad genómica y alteración de genes supresores (como el p53).

## **TERCERA**

El fenotipo RER+ se asocia en el cáncer colorrectal esporádico a tumores de localización proximal e individuos jóvenes.

## **CUARTA**

Determinadas alteraciones genéticas, sobre todo la pérdida de 5q y 18q, parecen conferir al tumor características de agresividad, por lo que pueden ser marcadores de mal pronóstico.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

1. **Adson M.A., van Heerden J.A., Adson M.H. y cols.** Resection of Hepatic Metastases from Colorectal Cancer. Arch. Surg. 1984; **119**:647-651.
2. **Alm T. y Licznerski G.** The Intestinal Polyposis. Clin. Gastroenterol. 1973; **2**:577-584.
3. **Alvarez J.A., Marín F.J., Jover J.M., Fernández R., Fradejas J.M. y Moreno M.** Sensivity of Monoclonal Antibodies to Carcinoembriogenic Antigen, Tissue Polypeptide Antigen, Alpha-fetoprotein, Carbohidrate Antigen 50 and Carbohidrate Antigen 19-9 in the Diagnosis of Colorectal Adenocarcinoma. Dis Colon Rectum. 1995; **38**:535-542.
4. **Astler V.B. y Collier F.A.** Prognostic Significance of Direct Extension of Carcinoma of Colon and Rectum. Ann Surg. 1954; **139**:846. Citado en Corman M.L. Referencia 41.
5. **Baker S.J., Fearon E.R., Nigro J.M., Hamilton S.R., Preisinger A.C., Jessup J.M., vanTuinen P., Ledbetter D.H., Barker D.F., Nakamura Y., White R. y Volgestein B.** Chromosome 17p Deletions and p53 Gene Mutations in Colorectal Carcinomas. Science. 1989; **244**:217-221.
6. **Baker S.J., Beisinger A.C., Jessup J.M. y cols.** p53 Gene Mutations Occur in Combination with 17p Allelic Deletions as Late Events in Colorectal Tumorigenesis. Cancer Res. 1990; **50**:7717-7722.
7. **Barbacid M.** Ras Genes. Ann. Rev. Biochem. 1987; **56**:779-827.
8. **Barnard J.A., Beauchamp R.D., Coffey R.J. y Moses H.L.** Regulation of Intestinal Epithelial Cell Growth by Transforming Growth Factor Type  $\beta$ . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989; **86**:1578-1582.
9. **Barsoum A.L. y Bhavanandan V.P.** Detection of Glycophorin A-like Glycoprotein on the Surface of Cultured Human Cells. Int. J. Biochem. 1989; **21**:635-643.
10. **Barsoum G.H., Hendrickse C., Winslet M.C. y cols.** Reduction of Mucosal Crypt Cell Proliferation in Patients with Colorectal Adenomatous Polyps by Dietary Calcium Supplementation. Br. J. Surg. 1992; **79**:481-483.

11. **Benhatar J., Losi L., Roncucci L., Ponz de Leon M. y Costa J.** Stability of K-ras Mutations Throughout the Natural History of Human Colorectal Cancer. *Eur. J. Cancer.* 1992; **28**:1115-1120.
12. **Bloch O.T.** Om Extra-abdominal Behandlung af Cancer Intestinalis (Rectum derfra Undtaget) Med en frem Stilling af de for Denne Sygdom Foretagne Operationer og Deres Resultater. *Nord. Med. Ark.* 1892; **24**:1. Citado en Corman M.L. Referencia 41.
13. **Bodmer W.F., Bailey C.J., Bodmer J., Bussey H.J.R., Ellis A., Gorman P., Lucibello F.C., Murday V.A., Rider S.H., Scambler P., Sheer D., Solomon E. y Spurr N.K.** Localization of the APC Gene for Familial Adenomatous Polyposis on Chromosome 5. *Nature.* 1987; **328**:614-616.
14. **Boring C.C., Squires T.S. y Tong T.** Cancer Statistics, 1992. *CA. Cancer J. Clin.* 1992; **42**:19-38.
15. **Bos J.L., Toskoz D., Marshall C.J. y cols.** Amino-acid Substitution at Codon 13 of the N-ras Oncogene in Human Acute Myeloid Leukaemia. *Nature.* 1985; **315**:726-730.
16. **Bos J.L., Fearon E.R., Hamilton S.R., Verlaan-de Vries M., van Boom J.H., van der Eb A.J. y cols.** Prevalence of ras Gene Mutations in Human Colorectal Cancers. *Nature.* 1987; **327**:293-297.
17. **Bourne J.** Suppression with a Difference. *Nature.* 1991; **353**:696-698.
18. **Bronner C.E., Baker S.M., Morrison P.T. y cols.** Mutation in the DNA Mismatch Repair Gene Homolog hMLH1 Is Associated with Hereditary Non-polyposis Colon Cancer. *Nature.* 1994; **368**:258-261.
19. **Bruhn H.D., Everding A., Joos B. y Hedderich J.** Clinical Experience with the Carbohydrate Antigen CA 50 in the Serum of Carcinoma Patients. In: *Holmgren J. de. Tumor Marker Antigens.* Lund: Studentlitteratur. 1985; 92-103.
20. **Buffil J.A.** Colorectal Cancer: Evidence for Distinct Genetic Categories Based on Proximal or Distal Tumor Location. *Ann. Intern. Med.* 1990; **113**:779-788.
21. **Büllow S., Wanrsten D.K.B., Johansen A. y cols.** Gastroduodenal Polyps in Familial Polyposis Coli. *Dis. Colon Rectum.* 1985; **28**:90-93.

22. **Büllow S, Holm N.V., Sondergaard J.D. y cols.** Mandibular Osteomas in Unaffected Sibs and Children of Patients with Familial Polyposis Coli. *Scand. J. Gastroenterol.* 1986; **21**:744-748.
23. **Bullow S.** Familial Polyposis Coli. *Dan. Med. Bull.* 1987; **34**:1-15.
24. **Bundred N.J., Whitfield B.C.S., Stanton E., Prescott R.J., Davies G.C. y Kingsnorth A.N.** Gastric Surgery and the Risk of Subsequent Colorectal Cancer. *B. J. Surg.* 1985; **72**:618-619.
25. **Burkitt D.P.** Epidemiology of Cancer of the Colon and Rectum. *Cancer.* 1971; **28**:313-319.
26. **Burt R.W., Berenson M.H., Lee R.G., Tolman K.G. y cols.** Upper Gastrointestinal Polyps in Gardner's Syndrome. *Gastroenterology.* 1984; **86**:295-301.
27. **Bussey H.J.R.** Familial Polyposis Coli. Baltimore: John Hopkins University Press. 1975.
28. **Bussey H.J.R.** Extra Colonic Lesions Associated with Polyposis Coli. *Proc. R. Soc. Med.* 1975; **2**:577-602.
29. **Cady B. y MacDermott W.V.** Major Hepatic Resection for Metachronous Metastases from Colon Cancer. *Ann. Surg.* 1985; **201**:204-209.
30. **Cahan WG., Castro El B. y Hadju S.I.** The Significance of a Solitary Lung Shadow in Patients with Colon Carcinoma. *Cancer.* 1974; **33**:414-421.
31. **Campo E. Cella-Martín O., Miguel R. y cols.** Loss of Heterocigosity of p53 Gene and p53 Protein Expression in Human Colorectal Carcinomas. *Cancer Res.* 1990; **51**:4436-4441.
32. **Cantley L.C., Anger K.Z., Carpenter C. y cols.** Oncogenes and Signal Transduction. *Cell.* 1991; **64**:281-302.
33. **Castro E.B., Rowen P.P. y Quan S.A.Q.** Carcinoma of Large Intestine in Patients Irradiated for Cancer of Cervix and Uterus. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1973; **31**:45-52.
34. **Cavenee y R.L. White.** Bases Genéticas del Cáncer. *Investigación y Ciencia.* 1995; **Mayo**:44-51.



35. **Caygill C.P.J., Hill M.J. Kirkham J.S. y Northfield T.C.** Mortality from Colorectal and Breast Cancer in Gastric Surgery Patients. *Int. J. Colorectal Dis.* 1988; **3**:144-148.
36. **Chargelaigue A.** Des Polyps du Rectum. Thesis. 1859. Paris.
37. **Chastre A., Empereur S., Di Gioia Y., El Mahdani N., Mareel M., Vleminckx K., Van Roy F., Bex V., Emami S., Spandidos D.A. y Gespach C.** Neoplastic Progression of Human and Rat Intestinal Cell Lines After Transfer of the *ras* and Polyoma Middle T Oncogenes. *Gastroenterology.* 1993; **105**:1776-1789.
38. **Cheng M.C., Chuang C.Y., Chan P.Y. y cols.** Evolution of Colorectal Cancer in Schistosomiasis. Transitional Mucosal Changes Adjacental to Larger Intestinal Carcinoma in Coloectomy Specimen. *Cancer.* 1980; **46**:1661-1670.
39. **Coffey R.J. y Cárdenas F.** Cancer of the Bowel in the Young Adult. *Dis Colon Rectum.* 1964; **7**:491-492.
40. **Corman M.L., Veidenheimer M.C. y Collier J.A.** Colorectal Carcinoma: A Decade of Experience at the Lahey Clinic. *Dis Colon Rectum.* 1979; **22**:477-485.
41. **Corman M.L.** Colon and Rectum Surgery. 1984. London: Lippincot.
42. **Corvisat L.** Hypertrophie Partielle de la Muqueuse Intestinal. *Bull. Soc. Anat.* 1847; **22**:400. Citado en Corman M.L. Referencia 41.
43. **Cross M. y Dexter T.M.** Growth Factor in Development Transformation and Tumorigenesis. *Cell.* 1991; **64**:271-280.
44. **Cruse J.P., Lewin M.R. y Clark C.G.** Failure of Bran to Protect against Experimental Colon Cancer in Rats. *Lancet.* 1978; **ii**:1278-1279.
45. **Czerny V.** Casuistische Mittheilungen aus der Chirurg. Klin zu Heidelberg. *Munch Med Wchnschr.* 1894; **11**. Citado en Corman M.L. Referencia 41.
46. **d'Allaines F. Morgan C.N. y Lloyd-Davies O.V.** Discussion on Conservative Resection in Carcinoma. *Proc. R. Soc. Med.* 1950; **43**:697.

47. **Daneker G.W., Piazza A.J., Steele G.D. Jr y Mercurio A.M.** Interactions of Human Colorectal Carcinoma Cells with Basement membranes. Analysis and Correlations with Differentiation. *Arch. Surg.* 1989; **124**:183-187.
48. **Day D.W. y Morson B.D.** Pathology of Adenomas. In Morson B.D. (ed) *The Pathogenesis of Colorectal Cancer.* 1978 pp 43-57. Philadelphia. W.B. Saunders.
49. **Díez M., Cerdán F.J., Pollán M. y cols.** Prognostic Significance of Preoperative Serum CA 19-9 Assay in Patients with Colorectal Carcinoma. *Anticancer Res.* 1994; **14**(6B):2819-2825.
50. **Dixon C.F.** Anterior Resection for Malignant Lesions of the Upper Part of the Rectum and Lower Part of the Sigmoid. *Ann. Surg.* 1948; **18**:425-432.
51. **Dukes C.E.** The Spread of Cancer of the Rectum. *Br. J. Surg.* 1930; **17**:643. Citado en Corman M.L. Referencia 41.
52. **Dukes C.E.** The Classification of Cancer of the Rectum. *J. Pathol. Bacteriol.* 1932; **35**:323. Citado en Corman M.L. Referencia 41.
53. **Eisenman R.N. y Thompson C.B.** Oncogenes with Potential Nuclear Function. *Cancer Surveys.* 1986, **5**:309-327.
54. **Ekberg H., Tranberg K.G., Andersson R. y cols.** Patterns of Recurrence in Liver Resection for Colorectal Secondaries. *World J. Surg.* 1987; **11**:541-547.
55. **Enterline H.T., Evans G.W., Mercado-Lugo R. y cols.** Malignant Potential of Adenomas of the Colon and Rectum. *JAMA.* 1962; **179**:322-330.
56. **Erisman M.D., Rothberg P.G., Diehl R.E. y cols.** Deregulation of c-myc Gene Expression in Human Colon Carcinoma Is Not Accompanied by Amplification or Rearrangement of the Gene. *Mol. Cell Biol.* 1985; **5**:1969-1976.
57. **Fatelman K.W., Hill C.B., Markey J.C. y cols.** Cancer of the Colon, Rectum and Anus. A Review of 2313 Cases. *Cancer.* 1974; **34**:951-959.
58. **Fearon E.R., Cho K.R., Nigro J.M., y cols.** Identification of a Chromosome 18q Gene which Is Altered in Colorectal Cancers. *Science.* 1990; **247**:49-56.
59. **Fearon E.R. y Vogelstein B.** A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell.* 1990; **61**:759-767.

60. **Fearon E.R.** Molecular Genetic Studies of the Adenoma-Carcinoma Sequence. *Adv. In. Med.* 1994; **39**:123-147.
61. **Finkelstein S.D., Sayegh R., Bakker A. y Swalsky P.** Determination of Tumor Aggressiveness in Colorectal Cancer by k-ras Analysis. *Arch. Surg.* 1993; **128**:526-532.
62. **Finley G.G., Schulz N.T., Hill S.A. y cols.** Expression of the c-myc Gene Family in Different Stages in Human Colorectal Cancers. *Oncogene.* 1989; **4**:963-971.
63. **Fishel R., Lescoe M.K., Rao M.R.S. y cols.** The Human Mutator Gene Homolog MSH2 and its Association with Human Non-polyposis Colorectal Cancer. *Cell.* 1993; **75**:1027-1038.
64. **Floyd C.E., Stirling C.T. y Cohn I.Jr.** Cancer of the Colon, Rectum and Anus. Review of 1687 Cases. *Ann. Surg.* 1966; **163**:829-837.
65. **Friend S.H., Beinards R., Rogeli S. y cols.** A Human DNA Segment with Properties of the Gene That Predisposes to Retinoblastoma and Osteosarcoma. *Nature,* 1986; **323**:643-646.
66. **Forrester K., Almoguera C., Han K., Grizzle W.F. y Perucho M.** Detection of High Incidence of K-ras Oncogenes during Human Colon Tumorigenesis. *Nature.* 1987; **327**:298-303.
67. **Gill P., Jeffreys A.J. y Werret D.J.** Forensic Applications of DNA "Fingerprints". *Nature.* 1985; **318**:577-579.
68. **Gold P y Freedman S.D.** Demonstration of Tumor-specific Antigens in Human Colonic Carcinomata by Immunological Tolerance and Absortion Techniques. *J. Exp. Med.* 1965; **121**:439-442.
69. **Gold P. y Freedman S.D.** Specific Carcinoembriogenic Antigens of the Human Digestive System. *J. Exp. Med.* 1965; **122**:467-471.
70. **Goligher J.C.** The Operability of Carcinoma of the Rectum. *Br. Med. J.* 1941; **2**:393.
71. **Goligher J.C. y Smiddy F.G.** The Treatmen of Acute Obstruction or Perforation with Carcinoma of the Colon and Rectum. *Br. J. Surg.* 1957; **45**:270.

72. **Goligher J.C.** Surgery of the Anus Rectum and Colon. 1984. p. 468. London: Bailliére Tindall.
73. **Gomez Alonso A., García García J. y Orfao de Matos A.** El Análisis de DNA Mediante Citometría de Flujo en la Patología Colorrectal Maligna. Cir. Esp. 1991; 50:132-136.
74. **Goyette M.C., Cho K., Fashind C.L., Levy D.B., Kinzler K.W., Paraskeva C., Volgestein B. y Stanbridge E.J.** Progression of Colorectal Cancer is Associated with Multiple Tumour Supression Gene Deffects but Inhibition of Tumorigenicity is Acomplished by Correction of any Single Deffect via Chromosome Transfer. Moll. Cell. Biol. 1992; 12:1387-1395.
75. **Grage T.B. y Moss S.E.** Adjuvant Chemotherapy in Cancer of the Colon and Rectum. Demonstration of Effectiveness of Prolonged 5-FU Chemotherapy in a prospective Controlled, Randomized Trial. Surg. Clin. N.A. 1981; 61:1321-1329.
76. **Grinnell R.S. y Lane N.** Benign and Malignant Adenomatous Polyps and Papillary Adenomas of Colon and Rectum. An Analysis of 1856 Tumours in 1335 Patients. Int. Abstr. Surg. 1958; 106:519-538.
77. **Groden J., Thlireris A., Samonitz W., Carlson M., Gelbert L., Albertsen H., Joslyn G., Stevens J., Spirio L., Robertson M., Sargeant L., Krapcho K., Wolff E., Burt R., Hughes J.P., Warrington J., McPherson J., Wasmuth J.L., Pashier D., Abderrahim H., Cohen D., Leppert M. y White R.** Identification and Characterization of the Familial Adenomatous Polyposis Coli Gene. Cell. 1991; 66:589-600.
78. **Hackford A.W.** Biochemical Markers for Colorectal Cancer. Diagnostic and Therapeutic Implications. Surg. Clin. N.A. 1993; 73:85-102.
79. **Hall C., Youngs D. y Keighley M.R.D.** Crypt Cell Production Rates at Various Sites Around the Colon in Wistar Rats and Humans. Gut. 1992; 33:1528-1531.
80. **Hamilton S.R.** Molecular Genetic Alterations as Potential Prognosis Indicators in Colorectal Carcinoma. Cancer Supplement. 1992; 69:1589-1591.
81. **Hamilton S.R.** Molecular Genetics of Colorectal Carcinoma. Cancer Supl. 1992; 1:1216-1221.

82. **Hamilton S.R.** The Molecular Genetics of Colorectal Neoplasia. *Gastroenterology*. 1993; **105**:3-7.
83. **Hardford F.J., Fazio V.W., Eptein L.M. y Hewitt C.B.** Rectosigmoid Carcinoma Occurring After Ureterosigmoidostomy. *Dis. Colon Rectum*. 1984; **27**:321-324.
84. **Hawley P.R.** (1972) Citado en Goligher J.C. *Surgery of the Anus, Rectum and Colon*, 4th edn., (1984) p.549. London: Bailliére Tindall.
85. **Hemmink A., Peltomäki P., Mecklin J.P., Järvinen H., Salovaara R., Nyström-Lahti M., De la Chapelle A. y Daltonen L.A.** Loss of the Wild Type MLH1 Gene is a Feature of Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer. *Nature Genetics*. 1994; **8**:405-410.
86. **Herrera L., Kakati S., Gibas L., cols.** Brief Clinical Report: Gardner Syndrome in a Man with an Interstitial Deletion of 5q. *Am. J. Med. Genet.* 1986; **25**:473-476.
87. **Higgins G.A.** Current Status of Adjuvant Therapy in the Treatment of Large Bowel Cancer. *Surg. Clin. N.A.* 1983; **63**:137-151.
88. **Hollstein M., Sidransky D., Volgestein B. y Harris C.C.** p53 Mutations in Human Cancers. *Science*. 1991; **253**:49-53.
89. **Hoosein N.M., McKnight M.K., Levine A.E. y Mulder K.M.** Differential Sensitivity of Subclasses of Human Colon Carcinoma Cell Lines to the Growth Inhibitory Effects of Transforming Growth Factor  $\beta$ 1. *Esp. Cell. Res.* 1989; **181**:442-453.
90. **Hsu Y-H y Guzman L.G.** Carcinoma of the Colon, Rectum and Canal Anal in Young Adults. *Am. J. Proctol. Gastroenterol. Col. Rect. Surg.* 1982; **33**(4):7-12.
91. **Hughes K., Scheele J. y Sugarbaker P.H.** Surgery for Colorectal Cancer Metastatic to the Liver: Optimizing the Results of Treatment. *Surg. Clin. North Am.* 1989; **69**:339-359.
92. **Hunter T.** Cooperation among Oncogenes. *Cell*. 1991; **64**:249-270.
93. **Imaseki, H. Hayashi, M. Taira, Y. Ito, Y. Tabata, S. Onoda, K. Isono y M. Tatibana.** Expression of c-myc Oncogene in Colorectal Polyps as a Biological Marker for Monitoring Malignant Potential. *Cancer*: 1989; **64**:704-709.

94. Itoh, Hinoda Y., Ohe M., Ban T., Endo T., Imai K. y Yachi A. Decreased Expression of DCC mRNA in Human Colorectal Cancers. *Int. J. Cancer.* 1993; **53**:260-263.
95. Iwatsuki S., Esquivel C.O., Gordon R.D. y Starzl T.E. Liver Resection for Metastatic Colorectal Cancer. *Surgery* (in press)
96. Jalanko H., McGlund C., Roberts P.J., Kuusela P. Tumor Markers in Gastrointestinal Cancer. In: Holgrem J. de. *Tumor Marker Antigens.* Lund: Studentlitteratur. 1985; 112-121.
97. Jarvinen H., Nyberg M. y Peltokallio P. Gastrointestinal Tract Polyps in Familial Adenomatous Coli. *Gut.* 1983; **24**:333-339.
98. Jeffreys A.J., Brookfield J.F.Y. y Semeonoff R. Positive Identification of an Immigration Test-case Using Human DNA Fingerprints. *Nature.* 1985; **317**:818-819.
99. Jeffreys A.J., Turner M. y Debenham P. The Efficiency of Multilocus DNA Fingerprints Probes for Individualization and Establishment of Family Relationships, Determined from Extensive Casework. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; **48**:824-840.
100. Kastrinakis M., Ramchurren N., Maggard M., Steele G. y Summerhayes Y. K-ras Status Does Not Predict Successful Hepatic Resection of Colorectal Cancer Metastasis. *Arch. Surg.* 1995; **130**:9-14.
101. Kelly K. y Siebenlist V. The Role of c-myc in the Proliferation of normal and Neoplastic cells. *J. Clin. Immunol.* 1985; **5**:65-77.
102. Kern S.E., Fearon E.R., Tersmette K.W.F., y cols. Clinical and Pathological Associations with Allelic Loss in Colorectal Carcinoma. *J. Am. Med. Assoc.* 1989; **261**:3099-3103.
103. Kerr I.B., Murday V.A., Hiorus L.R., Bussey H.J.R. y Bodmer W.F. Prevalence of Ki-ras Mutation and Chromosome 5 Allelic Loss in Colorectal Carcinomas Arising in Cases of FAP. *Cold Spring Harbor Cancer Cells.* 1989; **7**:241-244.
104. Kewenter J., Ahlman H. y Hulten L. Cancer Risk in Extensive Ulcerative Colitis. *Ann. Surg.* 1978; **188**:824-828.

105. Kille J.N. y Glick S. Neoplasia Complicating Uterosigmoidostomy. Br. Med. J. 1967; 3:783-786.
106. Kinzler K.W., Nilbert M.C., Volgestein B., Bryan T.M., Levy D.B., Smith K.J., Preisinger A.C., Hamilton S.R., Hedge P., Markham A. y cols. Identification of a Gene Located at the Chromosome 5q21 that is Mutated in Esporadic Colorectal Cancers. Science. 1991; 251:1366-1370.
107. Kinzler K.W., Nilbert M.C., Su L.K., Volgestein B., Bryan T.M., Levy D.B., Smith K.J., Preisinger A.C., Hedge P, McKechnie D., Finniar R., Markham A., Groffen J., Boguski M.S., Altschul S.F., Horii, A., Ando H., Miyoshi Y., Miki Y., Nishisho Y. y Nakamura Y. Identification of FAP Locus Genes from Chromosome 5q21. Science. 1991; 253:661-664.
108. Knudson A.G. Jr. Mutation and Cancer: Stadistical Study of Retinoblastoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1971; 68:820-823.
109. Kokal N., Sheibani K., Terz J. y Harada R. Tumor DNA Content in the Prognosis of Colorectal Carcinoma. JAMA. 1986; 13:3123-3127.
110. Kunkel T.A. Slippery DNA and Diseases. Nature; 1993; 365:207-208.
111. Lamiquiz A., Loizaite A. y Dominguez M.J. Elevación Preoperatoria de CEA, CA 19-9 y CA 50 en los Estadios Irresecables del Cáncer Colorrectal. Rev. Esp. Enfer. Dig. 1988; 73:323-324.
112. Land H., Parada L.F., y Weinberg R.A. Cellular Oncogenes and Multistep Carcinogenesis. Science. 1983; 222:771-778.
113. Lane D.P. y Benchimol S. p53: Oncogene or Antioncogene? Gene Dev. 1990; 1-8.
114. Laner J.D., Carlson H.L. y Wollaeger E.E. Accuracy of Roentgenologic Examination in Detecting Carcinoma of the Colon. Dis. Colon Rectum. 1965; 8:190.
115. Langer B., Cobourn C.S., Makowka L., Taylor B.R., Falk R.E. y Ambus U. Hepatic Resection for Matastatic Disease. Examination of Patient Selection and Outcome. Abstract in HPB Surgery. First World Congress. 1986. Lund, Sweden.

116. **Langevin J.M. y Nivatongs S.** The True Incidence of Synchronous Cancer of the Large Bowel. *Am. J. Surg.* 1984; **147**:330-334.
117. **Lathrop G.M., Lalovel J.C., Julier C y Ott J.** Strategies for Multilocus Linkage analysis in Humans. *Nat. acad. Sci.* 1984; **81**:3443-3446.
118. **Laurent-puig, Olschwang S., Delattre O. y cols.** Survival and Adcquired Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Gastroenterol.* 1992; **102**:1136-1141.
119. **Laurie J.A., Moertel C.G., Fleming T.R. y cols.** Surgical Adjuvant Therapy of Large Bowel Carcinoma. An Evaluation of Levamisole and the Combination of Levamisole and Fluorouracil: the North Central Cancer Treatment Group and the Mayo Clinic. *J.Clin. Oncol.* 1989; **7**:1447-1456.
120. **Leach F.S., Nicolaides N.C., Papadopoulos N. cols.** Mutations of a mutS Homolog in Human Non-polyposis Colorectal Cancer. *Cell.* 1993; **75**:1215-1225.
121. **Lembert A.** Memoire sur l'enterorrhaphie avec la Description d'un Procede Nouveau poue le Practiquer cette Operation Chirurcale. *Rep. Gen. Anat. Physio. Path.* 1826; **2**:100. Citado en Corman M.L. Referncia 41.
122. **Leppard B.** Epidermoid Cysts and Polyposis Coli. *Proc. R. Med.* 1974; **67**:1036-1037.
123. **Leppert, M. Dobbs, P. Scambler, P. O'Connell, Y. Nakamura, D. Stauffer, S. Woodward, R. Burt, J. Hughes, E. Gardner, M. Lathrop, J. Wasmuth, J-M. Lalouel y R. White.** The Gene for Familial Polyposis Coli Maps to the Long Arm Of Chromosome 5. *Science.* 1987; **238**:1411-1413.
124. **Levine A.J., Momand J. y Finlay C.A.** The p53 Tumour Supressor Gene. *Nature.* 1991; **351**:453-456.
125. **Lindblom A., Tannegard P., Werelius B. y Nordenskjold M.** Genetic Mapping of a Second Locus Predisposing to Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer. *Nature Genet.* 1993; **5**:279-282.
126. **Lisfranc J.** Mémoire sur l'excision de la Partie Interieure du Rectum Devenue Carcinomatouse. *Rev. Med. Franç.* 1826; **2**:380. Citado en Corman M.L. Referencia 41.



127. **Litt M. y Luty J.** A Hipervariable Microsatellite Revealed by in Vitro Amplification of Dinucleotide Repeat Within the Cardiac Muscle Actin Gene. *Am. J. Hum. Genet.* 1989; **44**:397-401.
128. **Lothe, P. Peltomäki, G.I. Meling, L.A. Aaltonen, M. Nyström-Lahti, . Pylkkänen, K. Heimdal, T.I. Andersen, P. Moler, T.O. Rognum, S.D. Fossa, T. Haldorsen, F. Langmark, A. Brogger, A. de la Chapelle y A.L. Borresen.** Genomic Instability in Colorectal Cancer: Relationship to Clinicopathological Variables and Family History. *Cancer Research.* 1993; **53**:5849-5852.
129. **Lundy S., Welch J.P. y Berman M.** Colo-rectal Cancer in Patients under 40 Years of Age. *J. Surg. Oncol.* 1983; **24**:11-14.
130. **Lynch H.T. y Lynch P.M.** The cancer Family Syndrome and cancer Control. A Pragmatic Basis for Syndrome Identification. *Dis. Colon Rectum.* 1979; **22**:106-111.
131. **Lynch H.T., Smyrk T.C., Watson P., Lanspa S.J., Lynch J.F., Lynch P.M., Cavalliery R.J. y Boland C.R.** Genetics Natural History, Tumor Spectrum and Pathology of Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer: an Updated Review. *Gastroenterology.* 1993; **104**:1535-1549.
132. **Lynch H.T. y Lynch J.F.** The Lynch Syndromes. *Curr. Opin. Oncol.* 1993; **5**:687-696.
133. **Manning A.M., Williams A.C., Game S.M. y Paraskeva C.** Differential Sensitivity of human Colonic Adenoma and Carcinoma Cells to Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ): Conversion of an Adenoma Cell Line to a Tumorigenic Phenotype Is Accompanied by a reduced Response to the Inhibitory Effects of TGF $\beta$ . *Oncogene.* 1991; **6**:1471-1476.
134. **Martin G.S.** Rous Sarcoma Virus: a Function Required for the Maintenance of the Transformed State. *Nature.* 1970; **227**:1021-1023.
135. **McCormack P.M., Bains M.S., Beattie E.J.Jr y cols.** Pulmonary Resection in Metastatic Carcinoma. *Chest.* 1978; **73**:163-166.
136. **McCormack P.M. y Attiyeh F.F.** Resected Pulmonary Metastases from Colorectal Cancer. *Dis Colon Rectum.* 1979; **22**:553.

137. **Mecklin J.P. y Järvinen H.J.** Clinical Features of Colorectal Carcinoma in Cancer Family Syndrome. Dis. Colon Rectum. 1986; **29**:160-164.
138. **Meltzer S.J., Ahnen D.J., Battifora H., Yokota J. y Cline M.J.** Proto-oncogene Abnormalities in Colon Cancers and Adenomatous Polyps. Gastroenterology. 1987; **92**:1174-1180.
139. **Mickulicz J. von.** Chirurgische Erfahrung über das Darmcarcinom. Arch. Klin. Chir. Berl. 1903; **69**:28. Citado en Corman M.L. Referencia 41.
140. **Mikelassi F., Grad G., Erroi F., Roncella M., Romagnoli J. y Handcock M.** Relationship Between ras Oncogene Expression and Clinical and Pathological Features of Colonic Carcinoma. Hepatogastroenterology. 1990; **17**:513-516.
141. **Miles W.E.** A Method of Performing Abdominoperineal Resection Excision for Carcinoma of The Rectum and the Terminal Portion of the Pelvic Colon. Lancet. 1908; **2**:1812. Citado en Corman M.L. Referencia 41.
142. **Miyoshi Y., Ando H., Nagase H. y cols.** Germ Line Mutations of the APC Gene in 53 Familial Adenomatous Polyposis Patients. P N A S. 1992; **89**:4452-4456.
143. **Moertel C.G., Fleming T.R., Macdonald J.S. y cols.** Levamisole and Fluorouracil for Adjuvant Therapy of Resected Colon Carcinoma. N. Engl. J. Med. 1990; **322**:352-358.
144. **Mogg R.A.** Neoplasms at the Site of Ureterocolic Anastomoses. Br. J. Surg. 1977; **64**:778.
145. **Moore, D.J. Jones, P.F. Schofield y D.G. Harnden.** Current Status of Tumor Markers in Large Bowel Cancer. World J. Surg. 1989; **13**:52-59.
146. **Moreno E.** Actualización en Cirugía del Aparato Digestivo (Volumen III). Jarpyo de. 1986. pp. 315. Madrid.
147. **Morson B.C.** Precancerous Lesions of the Colon and Rectum. JAMA. 1962; **179**:316-321.
148. **Morson B.C. y Sobin L.H.** International Histological Classification of Tumours. 1976. Geneva. WHO.
149. **Morson B.C. y Dawson M.P.** Gastrointestinal Pathology. 3rd ed. 1990. Oxford. Blackwell Scientific.

150. Mountain C.F., Khalil K.G., Hermes K.E. y cols. The Contribution of Surgery to the Managment of Carcinomatous Pulmonary Metastases. *Cancer*. 1978; 41:833-840.
151. Mullan F.J., Wilson H.K. y Majury C.W. Bile Acids and the Increased Risk of Colorectal Tumours after Truncal Vagotomy. *Br. J. Surg.* 1990; 77:1085-1090.
152. Murray D., Hreno A., Dutton J. y cols. Prognosis in Colon Cancer. A Pathologic Reassessment. *Arch. Surg.* 1975; 110:908-913.
153. Muto T., Kamija J., Sawada T. y cols. Small "Flat Adenoma" of the Large Bowel with Special Reference to Clinico-Pathological Features. *Dis Colon Rectum*. 1985; 28:849-851.
154. Nicolaides N.C. y cols. Mutations of Two PMS Homologues in Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer. *Nature*. 1994; 371:75-80.
155. Nishisho Y, Nakamura Y., Miyoshi Y., Miki Y., Ando H., Horii A., Koyama K., Utsonomiya J., Baba S., Hedge P., Markham A., Krush A.J., Petersen G., Hamilton S.R., Nilbert M.C., Levy D.B., Bryan T.M., Preisinger A.C., Smith K.J., Su L-K., Kinzler K.W. y Volgestein B. Mutations of Chromosome 5q21 Genes in FAP and Colorectal Cancer Patients. *Science*. 1991; 253:665-669.
156. Nottle P.D., Polgrase A.L., Hughes E.S.N., McDermott F.T. Pihl E.A. y Price A.B. Synchronous Carcinoma of the Large Intestine. *Aust. NZ. J. Surg.* 1983; 53:329-332.
157. Ookawa P., Sakamoto M., Hirohashi S., Yoshida Y., Sugimura T., Terada M. y Yokota J. Concordant p53 and DCC Alterations and Allelic Losses on Chromosomes 13q and 14q Associated with Liver Metastases of Colorectal Carcinoma. *Int. J. Cancer*. 1993; 53:382-387.
158. Ohsato K., Yao T., Watanabe H. y cols. Small Intestinal Involvement in Familial Polyposis Diagnosed by Operative Intestinal Fiberoscopy: a Report of Four Cases. *Dis Colon Rectum*. 1977; 20:414-420.
159. Ojerskog B., Myrlyvold L.O., Philipson B.M. y Ahren C. Gastroduodenal and Ileal Polyps in Patients Treated Surgically for Familial Polyposis Coli with Proctocolectomy and Continental Ileostomy. *Acta Chir. Scand*. 1987; 153:681-686.

160. **Papadopoulos N., Nicolaides N.C., Wei Y-f. y cols.** Mutation of MutL Homolog in Hereditary Colon Cancer. Science. 1994; **263**:1625-1629.
161. **Parsons R., Li G.M., Longley M.J. y cols.** Hypermutability and Mismatch Repair Deficiency in RER + Tumor cells. Cell. 1993; **75**:1227-1236.
162. **Paul F.T.** Colectomy. Br. Med. J. 1895; **1**:1136. Citado en Corman M.L. Referencia 41.
163. **Peinado M.A., Malkosyan S., Velaquez A. y Perucho M.** Isolation and Characterization of Allelic Losses and Gains in Colorectal Tumours by Arbitrary Primed Polimerase Chain Reaction. Proc. Acad. Sci. 1992; **89**:10065-10069.
164. **Peltomaki P. y cols.** Genetic Mapping of a Locus Predisposing to Human Colorectal Cancer. Science. 1993; **260**:810-812.
165. **Pihl E., Hughes E.S.R., McDermott F.T., Milne B.J., Korner J.M.N. y Price A.B.** Carcinoma of the Colon. Cancer Specific Long Term Survival. A Series of 615 Patients Treated by One Surgeon. Ann. Surg. 1980; **192**:114-117.
166. **Pitluck H. y Poticha S.M.** Carcinoma of the Colon and Rectum in Patients Less than 40 Years of Age. Surg. Ginecol. Obstet. 1983; **157**:335-337.
167. **Puisieux A., Lim S., Groopman J. y Ozturk M.** Selective Targeting of p53 Gene Mutational Hot Spots in Human Cancer by Etiologically Defined Carcinogens. Cancer Res. 1991; **51**:6185-6189.
168. **Rankin F.W.** Curability of Cancer of the Colon, Rectosigmoid and Rectum. JAMA. 1933; **101**:491.
169. **Reddy B.S. y Wynder E.L.** Large Bowel Carcingenesis. Faecal Constituents of Populations with Diverse Incidence Rates of Colon cancer. J. Nat. Cancer Inst. 1973; **50**:1437-1442.
170. **Reddy B.S., Weisburger J.H. y Winder E.L.** Faecal Bacterial B-Glucuronidase. Control by Diet. Science. 1974; **183**:416-417.
171. **Reddy B.S. y Winder E.L.** Metabolic Epidemiology of Colon Cancer. Faecal Bile Acids and Neutral Steroids in Colon Cancer Patients and Patients with Adenomatous Polyps. Cancer. 1977; **39**:2533-2539.

172. **Reddy E.P., Reynolds R.K., Santos E., y cols.** A Point Mutation Is Responsible for the Acquisition of Transforming Properties by the t-24 Human Bladder Carcinoma Oncogene. *Nature*. 1982; **300**:149-152.
173. **Reed T.E. y Neale J.V.** A Genetic Study of Multiple polyposis of the Colon. *Am. J. Hum. Genet.* 1955; **7**:236-263.
174. **Reilly J.C., Ruvin L.C. y Theuerkauf F.J.Jr.** Colonoscopy: its Role in Cancer of the Colon and Rectum. *Dis. Colon Rectum*. 1982; **25**:532-538.
175. **Registry of Hepatic Metastases.** Resection of the Liver for Colorectal Carcinoma Metastases: a Multi-Institutional Study of Indications for Resection. *Surgery*. 1988; **103**:278-288.
176. **Rothman D., Su C.P. y Kendall A.B.** Dilemma in a case of Turcot's (Glioma Polyposis) Syndrome. Report of a Case. *Dis. Colon Rectum*. 1975; **18**:514-515.
177. **Rubinfeld B., Souza B., Albert Y., Muller O., Chamberlain S.H., Masiarz F.R., Munemitsu S. y Polakis P.** Association of the APC Gene Product with  $\beta$ -catenin. *Science*. 1993; **262**:1731-1734.
178. **Sandler R.S. y Sandler D.P.** Radiation Induced Cancers of the Colon and Rectum: Assesing the Risk. *Gastroenterology*. 1983; **84**:51-57.
179. **Seeburg P.H., Colby W.W., Capon D.J., Goeddel D.V. y Levinson A.D.** Biological Properties of Human C-Ha-ras-1 Genes Mutated at Codon 12. *Nature*. 1984; **312**:71-75.
180. **Shepherd J.M. y Jones J.S.P.** Adenocarcinoma of the Large Bowel. *Br. J. Cancer*. 1971; **25**:680.
181. **Shibata D., Peinado M.A., Ionov Y., Malkhosyan S. y Perucho M.** Genomic Instability in Repeated Sequences Is an Early Somatic Event in Colorectal Tumorigenesis that Persists after Transformation. *Nat. Genet.* 1994; **6**:273-281.
182. **Smith W.G.** Desmoid Tumours in Familial Multiple Polyposis. *Mayo Clin. Proc.* 1959; **34**:31.
183. **Solomon, R. Voss, V. Hall, W.F. Bodmer, J.R. Jass, A.J. Jeffreys, F.C. Lucibello, Y. Patel y S.H. Rider.** Chromosome 5 Allele Loss in Human Colorectal Carcinomas. *Nature*. 1987; **328**:616-619.

184. **Stanbridge E.J.** Human Tumor Suppressor Genes. *Ann. Rev. Genes.* 1990; **24**:615-617.
185. **Stanbridge E.J.** Identifying Tumor Suppressor Genes in Human Colorectal Cancer. *Science.* 1990; **247**:12-13.
186. **Steele G.Jr. y Ravikumar T.S.** What's New in General Surgery: Resection of Hepatic Metastases from Colorectal Cancer. *Ann. Surg.* 1989; **210**:127-138.
187. **Steele G. Jr.** Adjuvant Therapy for Patients with Colorectal Cancer. *World J. Surg.* 1995; **19**:241-245.
188. **Studzinski G.P., Brelvi Z.S., Feldman S.C. y Watt R.A.** Participation of c-myc Protein in DNA Synthesis of Human Cells. *Science.* 1986; **234**:467-469.
189. **Su L.K., Volgestein B. y Kinler K.W.** Association of the APC Tumor Suppression Protein with Catenins. *Science.* 1993; **262**:1734-1737.
190. **Sugarbaker P.H., Gianola F.J., Dwyer A. y cols.** A Simplified Plan for Follow-up of Patients with Colon and Rectal Cancer Supported by Prospective Studies of Laboratory and Radiologic Tests Results. *Surgery.* 1987; **102**:79-87.
191. **Summerton J., Flynn M., Cooke T. y Taylor Y.** Bile Acid Receptors in Colorectal Cancer. *Br. J. Surg.* 1983; **70**:549-551.
192. **Tal M., Wetzler M., Josefberg Z. y cols.** Sporadic Amplification of the HER 2/neu Proto-oncogene in Adenomas of Various Tissues. *Cancer Res.* 1988; **48**:1517-1520.
193. **Thibodeau S.N., Bren G. y Schaid D.** Microsatellite Instability in Cancer of the Proximal Colon. *Science.* 1993; **260**:816-819.
194. **Thomas G..** Advances in the Genetics and Molecular Biology of Colorectal Tumors. *Current Opinion in Oncology.* 1994; **6**:406-412.
195. **Thompson P.M., Hill J.T. y Packham D.A.** Colonic Carcinoma at the Site of Ureterosigmoidostomy: What Is the Risk. *Br. J. Surg.* 1979; **66**:65.
196. **Trahey M. y McCormick F.** A Cytoplasmic Protein Stimulates Normal N-ras p21 GTPase but Doesn't Affect Oncogenic Mutants. *Science.* 1987; **238**:542-545.

197. **Travers B.** An Inquiry into the Process of Nature in Repairing Injuries of the Intestine. 1812. London: Logmans, Green and Co, Ltd.
198. **Turcot J., Depres J.P. y St Pierre Y.** Malignant Tumours of the Central Venous System Associated with Familial Polyposis of the Colon. *Dis. Colon Rectum*. 1959; **2**:465-466.
199. **Turiman N., Guidry C., Jaegar B. y Wair P.P.** Faecal Bile Acids and Neutral Steroids in Seventh Day Adventist and the General Population of California. In Kaspar H & Goebell H. (de) *Colon and Nutrition*. pp. 291-298. Lancaster: MTP Press.
200. **Umpleby H.C., Fernor B., Symes M.O. y Williamson R.C.N.** Viability of Exfoliated Colorectal Carcinoma Cells. *Br. J. Surg.* 1984; **71**:659-663.
201. **Utsonomiya J., Maki T., Iwama T. y cols.** Gastric Lesions of Familial Polyposis Coli. *Cancer*. 1974; **34**:745-754.
202. **Urdaneta L.F., Duffell D., Creevy C.D. y Aust J.B.** Late Development of Primary Carcinoma Following Ureterosigmoidostomy: Report of Three Cases and Literature Review. *Ann. Surg.* 1966; **164**:503.
203. **Ushio K., Sasagawa M., Doi H. y cols.** Lesions Associated with Familial Polyposis Coli. *Studies of Lesions of the Stomach, Duodenum, Bones and Teeth. Gastrointestinal Radiol.* 1976; **1**:67-68.
204. **Van Den Berg F.M., Tigges A.J., Schipper M.E.I., y cols.** Expression of the Nuclear Oncogene p53 in Colon Tumours. *J. Pathol.* 1989; **157**:193-199.
205. **Vasen H.F.A., Johan G., Offerhans A. y cols.** The Tumor Spectrum in Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer: a Study of 24 Kindreds in the Netherlands. *Int. J. Cancer*. 1990; **46**:31-34.
206. **Vasen H.F., Mecklin J.P., Khan M.P. y Lynch H.T.** The International Collaborative Group on Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer. *Dis. Colon Rectum*. 1991; **34**:425-5.
207. **Vasen H.F., Mecklin J.P., Khan M.P. y Lynch H.T.** Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer. *Lancet*. 1991; **338**:877.

208. **Volgestein B., Fearon E.R., Hamilton S.R., Kern S.E., Preisinger A.C., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smits A.M.M. y Bos J.L.** Genetic Alterations During Colorectal Tumor Development. *N. Eng. J. Med.* 1988; **319**:525-532.
209. **Wagensteen O.H.** Cancer of the Colon and Rectum with Special Reference to (1) Earlier Recognition of Alimentary Tract Malignancy; (2) Secondary Delayed Re-entry of the Abdomen in Patients Exhibiting Lymph Node Involvement; (3) Sustotal Primary Excision of the Colon; (4) Operation in Obstruction. *Wis. Med. J.* 1949; **48**:591.
210. **Watanabe H., Enjoji M., Yao T. y Ohasato K.** Gastric Lesions in Familial Adenomatous Coli, Their Incidence and Histological Analysis. *Hum. Pathol.* 1978; **9**:269-283.
211. **Watre A.L., Core S,K, y Carrier J.M.** Gardner's Syndrome. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1975; **141**:53.
212. **Watt P.C.H., Patterson C.C. y Kennedy T.I.** Late Mortality After Vagotomy and Drainage for Duodenal Ulcer. *Br. Med. J.* 1984; **228**:1335-1338.
213. **Weber J.C., Kwilek A.E. y May P.E.** Dinucleotid repeat polymorphisms at the D5S107, D5S108, D5S111, D5S117 and D5S118 loci. *Nucleic. Acids. Res.* 1990; **18**:4035.
214. **Weese J.L., O'Grady M.G. y Ottery F.D.** How Long is the Five Centimeter Margin?. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1986; **163**:101-103
215. **Whitaker R.H., Puch R.C.B. y Dow D.** Colonic Tumours Following Ureterosigmoidostomy. *Br. J. Urol.* 1971; **43**:562.
216. **Williams N.S., Durdey P., Quirke P y cols.** Pre-operative Staging of Rectal Neoplasm and its Impact on Clinical Managment. *Br. J. Surg.* 1985; **72**:868-874.
217. **Woodington G.F. y Waugh J.N.** Results of Resection of Metastatic Tumors of the Liver. *Am. J. Surg.* 1963; **105**:24
218. **Wooster , Clenton-Jansen A.M., Collins N., Mangion J., Cornelis R.S., Cooper C.S., Gusterson B.A., Ponder B.A.J., von Deimling A., Wiestler O.D., Cornelisse C.D., Deville P y Stratton M.R.** Instability of Short Tandem Repeats (Microsatellites) in Human Cancers. *Nature Genetics.* 1994; **6**:152-156.