

**ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATELITES MEDIANTE EL
MARCADOR BAT-26 EN UNA MUESTRA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS
CON CÁNCER GÁSTRICO O COLORRECTAL EN EL HOSPITAL
UNIVERSITARIO DE SANTANDER**

WILMER ARTURO CÁRDENAS CUADROS

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2006**

**ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATELITES MEDIANTE EL
MARCADOR BAT-26 EN UNA MUESTRA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS
CON CÁNCER GÁSTRICO O COLORRECTAL EN EL HOSPITAL
UNIVERSITARIO DE SANTANDER**

WILMER ARTURO CÁRDENAS CUADROS

Trabajo de grado para optar al título de Biólogo

**Directora
ADRIANA CASTILLO PICO
Bacterióloga, MSc Genética**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2006**

*A mi madre, a mi padre y a mi hermana:
Mientras muchos te abandonan, siempre hay alguien que
incondicionalmente se mantiene contigo hasta el final, a ellos por su
paciencia, por su amor y sus sacrificios.*

*“La amistad es como las gotas de agua: de repente se ven, pero
rápidamente se evaporan”.*

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, por la paciencia, sus enseñanzas y por permitirme la oportunidad de trabajar en este proyecto.

A las Bacteriólogas Adriana Gil y Adriana Pico, por su colaboración en el laboratorio, a Olga Maria Moreno, a Clara Inés Vargas y en general a todas las personas que de una u otra manera hicieron parte de este proyecto.

Al departamento de Patología de la UIS A los Doctores; Jorge H. Echeverri, Olga Mercedes Álvarez.

Al Doctor Jesús Solier Insuasty en la unidad de oncología del Hospital Universitario de Santander.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. OBJETIVOS	6
2. JUSTIFICACIÓN	7
3. MARCO TEÓRICO	13
3.1. Vías de Formación de cáncer	15
3.1.1. Vía de Inestabilidad Cromosómica	15
3.1.2 Vía de Inestabilidad de Microsatélites	16
3.2 Inestabilidad de Microsatélites	20
3.3. Cáncer de Vías Digestivas	24
3.3.1 Cáncer Colorrectal	24
3.3.2 Cáncer Gástrico	29
3.4 Relación del fenotipo de inestabilidad de microsatélites y el grado de diferenciación histopatológica	34
4. METODOLOGÍA	36
4.1. Criterios de inclusión del paciente	36
4.2. Recolección de muestras	36
4.3. Genotipificación	37
4.3.1. Extracción de ADN	37
4.3.2. Montaje de PCR	39

4.3.3. Electroforesis capilar	40
4.3.4. Análisis de resultados del marcador BAT-26	41
4.3.5. Análisis estadístico	43
5. RESULTADOS	44
5.1. Características Demográficas del grupo	44
5.2. Resultados del análisis del ADN	46
5.3. Resultados del análisis Histopatológico	51
5.3.1. Cáncer Colorrectal	51
5.3.2. Cáncer Gástrico	53
6. DISCUSIÓN	54
7. CONCLUSIONES	59
8. RECOMENDACIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXOS	75

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Marcador Interno TAMRA 500	41
Fig. 2. Control negativo y positivo de amplificación para el marcador BAT-26	42
Fig. 3. Distribución de los pacientes según la edad y diagnóstico patológico	45
Fig. 4. Distribución de los pacientes según el sexo y el diagnóstico patológico	46
Fig. 5. Inestabilidad de microsatélites en el marcador BAT-26	48
Fig. 6. Fenotipo estable de microsatélites (IMI-)	48
Fig. 7. Fenotipo de inestabilidad de microsatélites (IMI+)	48
Fig. 8. Fenotipo de inestabilidad de microsatélites en cáncer gástrico y colorrectal segunda edad de los pacientes	49
Fig. 9. Fenotipo de inestabilidad de microsatélites según el diagnóstico Patológico	50
Fig. 10. Fenotipo de inestabilidad de microsatélites en cáncer gástrico y Colorrectal según el género	51
Fig. 11. Fenotipo de inestabilidad de microsatélites en cáncer colorrectal según el grado de diferenciación histopatológica del tumor	52
Fig. 12. Fenotipo de inestabilidad de microsatélites en cáncer gástrico según el grado de diferenciación histopatológica del tumor	53

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Resultados del análisis de la inestabilidad de microsatélites mediante el marcador microsatélite BAT-26	47
Tabla 2. Distribución de casos según el grado de diferenciación histopatológica y el fenotipo de inestabilidad de microsatélites	52

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

	Pág.
Fotografía 1. Adenocarcinoma de colon de variedad clásica bien diferenciado	25
Fotografía 2. Adenocarcinoma de colon de variedad clásica moderadamente diferenciado	26
Fotografía 3. Adenocarcinoma de colon de variedad clásica mal diferenciado	26
Fotografía 4. Adenocarcinoma de colon de variedad mucinoso	27
Fotografía 5. Adenocarcinoma gástrico de variedad intestinal bien diferenciado	31
Fotografía 6. Adenocarcinoma gástrico de variedad intestinal moderadamente diferenciado	31
Fotografía 7. Adenocarcinoma gástrico de variedad intestinal pobremente diferenciado	32
Fotografía 8. Adenocarcinoma gástrico de variedad difuso	33

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Información para pacientes participantes en el proyecto	75
ANEXO B. Hoja de consentimiento informado	77

RESUMEN

TITULO* : ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATELITES MEDIANTE EL MARCADOR BAT-26 EN UNA MUESTRA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON CÁNCER GÁSTRICO O COLORRECTAL EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SANTANDER

Autor: Wilmer Arturo Cárdenas Cuadros**

Palabras Clave: Cáncer Gástrico, Cáncer Colorrectal, Inestabilidad de Microsatélites, BAT-26, Diferenciación Histopatológica.

El cáncer puede ser producido por dos vías de formación: la vía de inestabilidad cromosómica (IC) y la vía de inestabilidad de microsatélites (IMI). La vía de inestabilidad de microsatélites puede ser derivada por la inactivación de los genes del sistema de reparación de mismatch (hMsh2 y hMLH1), por anomalías entre el apareamiento entre las hebras de ADN. La inestabilidad de microsatélites esta asociada con cáncer colorrectal (CCR) y cáncer gástrico (CG) y ocurre en 90% de pacientes con Cáncer Colorrectal no Ploiposicoi Hereditario HNPCC y en un 15% de cáncer esporádicos. Los pacientes con CG o CCR e IMI presentan un fenotipo diferente de pacientes con IC. El fenotipo de inestabilidad de microsatélites puede ser detectado con análisis de STR's (secuencias repetidas en tandem). En estas secuencias es mas probable que la ADN polimerasa se equivoque por causa de un deslizamiento. El cáncer colorectal y el cáncer gástrico son muy comunes en el mundo, pero nuestro conocimiento de la biología del desarrollo de esta patología es poca. El propósito de esta investigación fue evaluar el fenotipo de la inestabilidad de microsatélites (IMI) junto con la diferenciación histopatológica, debido a que algunos rasgos particulares de la patología mas el fenotipo IMI, han sido asociados con un mejor pronostico y una mejor respuesta al tratamiento por parte del paciente. El microsatélite mononucleotidico BAT-26 fue empleado; ya que su sensibilidad para detectar el fenotipo alcanza un 95%. 23 pacientes fueron remitidos del departamento de oncología del Hospital Universitario de Santander. BAT-26 fue tipificado en todos los pacientes, 4 (17%) presentaron inestabilidad de microsatélites: 3 con cáncer colorectal y uno con cáncer gástrico, pero ninguna asociación fue encontrada entre el fenotipo IMI y la diferenciación histopatológica. La fijación de tejidos y las técnicas de parafinacion dificultan la digestión de la proteinasa k y la amplificación por PCR.

*Trabajo de grado

**Facultad de Ciencias

Programa de Biología

Directora: Adriana Castillo Pico

ABSTRACT

TITLE *: MICROSATELLITE INSTABILITY ANALYSIS USING BAT-26 MARKER IN PATIENTS WITH GASTRIC OR COLORECTAL CANCER DIAGNOSED IN THE HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SANTANDER.

Author: Wilmer Arturo Cárdenas Cuadros**

Key words: Gastric Cancer, Colorectal Cancer, Microsatellite Instability, BAT-26, Histopathology Differentiation.

The cancer could be produced by either chromosomal instability or, micro satellite instability. Micro satellite instability is due to inactivation of the genes responsible of the mismatch repair system (ex. hMSH2 or hMLH1) which result in anomalies in the base-pairing of the DNA strands. Micro-satellite instability is associated with colorectal and gastric cancer (CG) and occurs in 90% of colorectal cancer (CRC) from HNPCC patients and 15% of sporadic CRC. Patients with CRC or CG and MSI have distinct phenotype. The microsatellite instability phenotype (IMI) may be detected by STR's (Short Tandem Repeat sequences) analysis. These sequences are more prone to DNA polymerase slippage. Both colorectal and gastric cancers are very frequent in the world, but our knowledge about the development biology of these pathologies is limited. The purpose of this research was to evaluate the association between the micro-satellite instability phenotype (IMI) and histopathology differentiation, because some of the histopathology particular traits and the IMI, have been associated with a better prognostic and treatment response. The mononucleotide micro-satellite marker BAT-26 was used because its sensitivity is over 95% when detecting this phenotype. 23 patients from the Oncology Department of the Hospital Universitario de Santander were included in this study. BAT-26 was genotyped in all patients and only 4 of them (17%) presented IMI. 3 out of these 4 had diagnosed colorectal cancer, and 1 of them had a diagnosed gastric cancer. No association was found between IMI and the histopathology differentiation. One of the causes for the lack of association might have been wrong information provided by the patients, and the techniques used to fix the tissues, which difficult proteinase k digestion and PCR amplification

*Degree work

**Faculty of Health

Biology program

Director: Adriana Castillo Pico

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. Hoy en día es entendido como una enfermedad genética de las células, producto de la alteración molecular de los genes encargados de regular el ciclo celular o de aquellos que están involucrados en el mantenimiento de la integridad del ADN como los del sistema de reparación de errores posteriores a la replicación. Se conocen de esta enfermedad más de 100 tipos, dentro de los cuales el cáncer colorrectal (CCR) y el cáncer gástrico (CG) están entre los de mayor mortalidad en la población, encontrándose con una alta frecuencia en países desarrollados como Japón y China. En algunos países como Ecuador, Chile, Perú, Costa Rica y Colombia también son importantes causas de muerte (Henderson *et al.* 1991, Solomon *et al.* 1991, Panduro *et al.* 1993, Touma *et al.* 1993, Camacho *et al.* 1995, Weinberg 1996, Liu 1999, Robert *et al.* 2000, Jemal *et al.* 2004).

Se han descrito varias causas que inducen la carcinogénesis, las cuales llevan a mutaciones en genes esenciales para el mantenimiento de la fidelidad genética y el control del ciclo celular. La mayor causa de mutación en estos genes, está involucrada con el estilo de vida de los individuos como alimentación, consumo de tabaco y alcohol entre otros, que en edades avanzadas pueden llegar a alterar el comportamiento hormonal e influir en la proliferación cancerígena de algunos tipos de cáncer. También se han encontrado involucrados factores genéticos primarios (hereditarios), por los cuales se da rápidamente la transformación de pequeños a grandes adenomas, mientras que en algunos tipos de cáncer de tipo esporádico la transformación puede ocurrir en periodos de años o décadas. Sumado a esto, se han visto relaciones más estrechas de unos genes, dependientes de las

respuestas metabólicas y del control en la fidelidad del ADN con los diferentes tipos de razas o étnias. Otro factor no menos importante en la transformación celular es la hipermetilación, en donde posiblemente está implicada la ADN metiltransferasa que se encarga de metilar las citosinas en la región promotora de los genes. Se ha considerado que esta hipermetilación participa en la condensación de los cromosomas formando regiones subcondensadas en la fase mitótica, las cuales pueden posteriormente unirse unas con otras provocando aneuploidia. La hipermetilación se ha encontrado más relacionada con los tipos de cáncer esporádico de ahí que el conocimiento de estos factores de susceptibilidad puede ser considerado de alto beneficio en la prevención del cáncer (Henderson *et al.* 1991, Panduro *et al.* 1993, Keller *et al.* 1995, Vasen *et al.* 1996, Perera F. 1997, Keller *et al.* 1998, Narod 1998, Lynch and De la Chapelle 1999, Lichtenstein *et al.* 2000, Cunningham *et al.* 2001, Castillo *et al.* 2002).

La alta prevalencia de cáncer a nivel mundial, ha generado que una gran cantidad de investigaciones se orienten a tratar de dilucidar su origen, y como producto de estas se ha logrado diferenciar dos vías de formación del cáncer conocidas como la vía de inestabilidad cromosómica o supresora (IC) a la cual pertenecen entre el 80-85% de los cánceres conocidos; en esta vía los genes implicados son los protooncogenes y genes supresores de tumor encargados de regular el crecimiento y proliferación celular y en donde es característica una marcada pérdida de heterocigosidad (LOH), aneuploidia y una gran asociación con un comportamiento bastante agresivo del tumor, reduciendo la expectativa de vida del paciente a menos de un 74-80%. El grupo restante 15-20% de los tumores malignos pertenecen a la segunda vía, denominada de inestabilidad de microsatélites o mutadora (IMI); allí por el contrario se encuentran implicados aquellos genes que hacen parte del sistema de reparación de errores de la replicación producto de deslizamientos de la ADN polimerasa y está asociada a un mejor pronóstico por el aumento de la expectativa de vida del paciente a un 94 a

100% en el mejor de los casos, gracias a la respuesta más efectiva al tratamiento dado. La alteración de las enzimas implicadas en la reparación de errores posteriores a la replicación produce alteración en las secuencias de ADN altamente repetitivo llamadas microsatélites, lo cual origina su nombre (Vía de inestabilidad de microsatélites) (Solomon *et al.* 1991, Powel *et al.* 1992, Aaltonen *et al.* 1993, Panduro *et al.* 1993, Bodmer *et al.* 1994, Bronner *et al.* 1994, Nicolaidis *et al.* 1994, Modrich Paul 1994, Shibata *et al.* 1994, Froggatt *et al.* 1995, Dos Santos *et al.* 1996, Fishel Richard 1996, Sherr Charles 1996. Togo *et al.* 1996, Bocker *et al.* 1997, Caldas *et al.* 1997, Hoang *et al.* 1997 Morin *et al.* 1997, Rodríguez-Bigas *et al.* 1997, Parsons R. 1997, Narod 1998, Perucho 1998, Heinimann *et al.* 1999, Liu Edison T. 1999, Smyrk *et al.* 1999, Gryfe *et al.* 2000, Hemminki *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2001, Castillo *et al.* 2002, Robbins and Itzkowitz 2002, Young *et al.* 2003)

En nuestro país como en muchos, todavía se hace el diagnóstico dependiendo de las características histopatológicas que tenga el tumor, sin tener en cuenta las características moleculares del mismo. Aunque el análisis microscópico no permite diferenciar la vía genética que originó el cáncer y que es importante conocerla, para prever el pronóstico del paciente, éste diagnóstico se podría realizar mediante la evaluación de la inestabilidad de microsatélites o STRs (secuencias repetidas en tandem). Los STR's se encuentran distribuidos a través del genoma y es posible identificar la presencia del fenotipo mutador de microsatélites (MMP) o fenotipo de error de la replicación (RER) ya que los microsatélites por su carácter repetitivo son más propensos a los errores de la ADN polimerasa o "Polymerase slippage" y es más fácil identificar un cambio en uno de los alelos correspondientes para el marcador. Se ha visto que aquellos microsatélites cuya repetición es de simplemente un nucleótido son indicadores más sensibles en la identificación de este fenotipo, por tal motivo, se seleccionó el microsatélite BAT-26 para ser evaluado, además de su carácter cuasimonomorfo (su variación de tamaño en una población y de un alelo a otro es de solamente unos pares de

nucleótidos) que lo hace más sensible que otros para identificar este fenotipo (Mao *et al.* 1994, Shibata *et al.* 1994, Parsons *et al.* 1995, Eshleman *et al.* 1996, Bocker *et al.* 1997, Caldas *et al.* 1997, Hoang *et al.* 1997, Halling *et al.* 1999, Lamberti *et al.* 1999, Samowitz 1999, Gryfe *et al.* 2000, Lynch y Kaul 2000, Laukola 2001, Morifuji *et al.* 2003, Chai *et al.* 2004).

Desde el punto de vista metodológico en primer lugar se estandarizaron las técnicas de extracción de ADN a partir de las biopsias de tumor y de las muestras de sangre tomadas a los pacientes previo consentimiento informado para la participación en el proyecto (Anexos a y b). Posteriormente la presencia del fenotipo IMI se detectó en los amplificadores por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) del microsatélite BAT-26 evaluando los electroferogramas en el equipo ABI PRISM 310 mediante el programa Gene Scan (Applied Biosystems). Mediante una prueba de Fisher se realizaron los análisis estadísticos. Los resultados obtenidos de la evaluación de BAT-26 se correlacionaron con los rasgos histopatológicos. Estos últimos se definieron con base en la diferenciación del tejido tumoral con el tejido normal tanto en cáncer gástrico como en cáncer colorrectal. En cáncer colorrectal encontramos: el de variedad clásica subclasificado en bien diferenciado, mal diferenciado y pobremente diferenciado y el de variedad mucinosa. En cáncer gástrico encontramos los de variedad intestinal subdivididos en: bien diferenciados, mal diferenciados y pobremente diferenciados, y el de variedad difusa. En cánceres con inestabilidad de microsatélites con el grado bien diferenciados se han visto mejores pronósticos y mejor respuesta al tratamiento en pacientes con CG y CCR. De ahí la importancia de conocer la relación entre el fenotipo de inestabilidad de microsatélites con el grado de diferenciación histopatológica (Hamilton *et al.* 2000).

Se encontró el fenotipo de inestabilidad de microsatélites con una frecuencia de 0.17 (17%) en las muestras estudiadas (n=23). Pertenecieron a cáncer colorrectal

12 (52.2%) de los pacientes, 3 individuos (27.3%) con el fenotipo de inestabilidad de microsatélites que correspondían a tumores de la variedad clásica. Los 11 (47.8%) pacientes restantes pertenecieron a cáncer gástrico, solamente uno de ellos (8.3%) con fenotipo de inestabilidad de microsatélites correspondiente a un tumor de variedad intestinal pobremente diferenciado. No se observó ninguna asociación entre el diagnóstico patológico la edad y el género de los pacientes; del mismo modo ninguna asociación entre el fenotipo de inestabilidad de microsatélites con el género, la edad, el diagnóstico de los pacientes y el grado de diferenciación histopatológica fue encontrada, no obstante, estos resultados se deben al reducido número de muestras utilizadas en el análisis el cual se presentó por dificultades en los procedimientos de recolección de las muestras y también a la inhibición de los procesos de digestión y amplificación de ADN de las mismas debido a los tratamientos de fijación utilizados y al efecto de autólisis encontrado en algunas de ellas, que afectan directamente a los ácidos nucleicos.

1. OBJETIVOS

1.1 GENERAL:

IDENTIFICAR LA PRESENCIA DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN CÁNCER GÁSTRICO Y COLORRECTAL

1.2 ESPECÍFICOS:

- 1.2.1 Establecer la frecuencia de la inestabilidad de microsatélites en las muestras analizadas.
- 1.2.2 Correlacionar los hallazgos del análisis genético-molecular con el grado de diferenciación histopatológica de la biopsia analizada

2. JUSTIFICACIÓN

Una de Las principales causas de mortalidad en todo el mundo es el cáncer, y puede afectar a cualquier persona independientemente de la edad, razón social o sexo. La mayoría de los tejidos son susceptibles de desarrollar cáncer, sin embargo, entre los más comunes y con mayor número de mortalidad están el CG y el CCR los cuales tienen una tasa alta de prevalencia en Japón, China y algunos países suramericanos como Ecuador, Chile y Colombia. Por ejemplo, para el cáncer gástrico producido por inestabilidad de microsatélites la frecuencia más alta encontrada ha sido de 64% en Japón; otros países de la región occidental de Europa presentan una frecuencia más baja de 25%. En cuanto al sexo, el masculino presenta, una mayor incidencia de CG según la organización mundial de la Salud. Es así como en 1977 Japón tuvo una incidencia de CG en 55 hombres y 28 mujeres por cada 100000 habitantes, lo que representa una relación de 1.96/1; en Chile es de 2.04/1 y en Costa Rica es de 2.07/1; también en países con un bajo riesgo existe una mayor incidencia en el sexo masculino: Estados Unidos 2.06/1 y Canadá 2.32/1. En Colombia en los hombres el cáncer gástrico es el segundo de mayor incidencia¹ (36.0) después del cáncer de próstata (45.8) y la primera causa de mortalidad¹ (27.7) por cáncer. En las mujeres también se encuentra entre los de mayor incidencia (20.7) antecedido por el cáncer de cuello uterino (36.8) y el cáncer de mama (30.0) y es la segunda causa de mortalidad por cáncer (15.9) después del cáncer de cuello uterino (18.4). El cáncer colorrectal también se ubica entre los principales causantes de muerte por esta patología. Tanto en hombres como en mujeres ocupa la cuarta posición en incidencia (11.4 y 13.9 respectivamente) y la quinta causa de mortalidad por cáncer (7.1 y 7.2 respectivamente). Pocos estudios se han realizado en Colombia sobre la vía de inestabilidad de microsatélites y se prevé que anualmente aparezcan más de

100000 casos de cáncer producidos por esta vía en todo el mundo (Touma *et al.* 1993, Camacho *et al.* 1995, Hayden *et al.* 1997, Perucho M. 1998, Robert *et al.* 2000, Jemal *et al.* 2004, Piñeros *et al.* 2005).

Después del cáncer de próstata el cáncer gástrico es el de mayor incidencia¹ en el sexo masculino en Santander con una tasa de 35.5 y el cáncer colorrectal se ubica en la cuarta posición después del cáncer de pulmón con una incidencia de 10, para el sexo femenino del mismo modo el cáncer gástrico y el colorrectal se encuentran dentro de los más frecuentes después de los cánceres: de mama, y de cuello del útero; las incidencias son de 19.3 para cáncer gástrico y 12.7 para el cáncer de colon, además de esto son los de más alta tasa de mortalidad por cáncer debido a la falta de información que existe sobre la vía de formación de estos tipos de patología. Por ello es importante establecer la prevalencia del fenotipo de inestabilidad de microsatélites para determinar con que frecuencia se presenta y desarrollar una metodología molecular que permita sentar las bases para posteriores investigaciones que puedan desarrollar estrategias de prevención y tratamientos más adecuados para estos tipos de cáncer (Piñeros M. *et al.* 2005).

El cáncer es producido desde el punto de vista genético mediante dos vías diferentes de formación: la vía supresora donde están implicados los genes que regulan el comportamiento celular y la vía de inestabilidad de microsatélites o mutadora (IMI) donde mutan los genes que codifican para las enzimas reparadoras de los errores de replicación del ADN y determinan el fenotipo RER (Replication Error Phenotype) o MMP (Mismatch Mutator Phenotype). Se ha determinado que el cáncer colorrectal puede ser producido en un 10 al 20% por la vía de inestabilidad de microsatélites y alrededor del 90% de los cánceres colorrectales heredados son provocados por esta misma vía. La presencia de

¹ TAE=Tasa estimada por edades, por cada 100000 personas-riesgo/año. Instituto Nacional de Cancerología.

inestabilidad de microsatélites en cáncer gástrico se encuentra poco en pacientes jóvenes < 40 años de edad; a diferencia de lo que ocurre en el HNPCC y en algunos pacientes de cáncer colorrectal esporádico en los cuales se han detectado casos muy tempranos, estos pacientes se han visto favorecidos por un mejor pronóstico por tener un índice de daño menor que los cánceres producidos por la vía de inestabilidad cromosómica. De acuerdo con la forma de presentación se pueden identificar dos tipos de cáncer: el esporádico en el cual las mutaciones se van acumulando en el transcurso de la vida del individuo; el heredado donde la mutación de uno de los dos alelos del gen es transmitida de padre a hijo y el otro alelo muta durante la vida del individuo, un ejemplo de cáncer heredado es el cáncer colorrectal no polipósico heredado conocido como síndrome de Lynch (HNPCC). Un cáncer producido por IMI puede presentarse por tanto de forma esporádica o heredada (Aaltonen *et al.* 1993, Dos Santos *et al.* 1996, Hayden *et al.* 1997, Hoang *et al.* 1997, Serrucha *et al.* 1997, Perucho 1998, Smyrk *et al.* 1999, Hemminki *et al.* 2000, Castillo *et al.* 2002).

La expectativa de vida de un paciente después de diagnosticado el cáncer es de mas o menos 5 años dependiendo de la agresividad del tumor y la respuesta que tenga el individuo al tratamiento administrado. La expectativa de vida se relaciona con el tipo de vía que conduce a la formación de la malignidad. Por lo general los cánceres producidos por la alteración de los genes implicados en el control del ciclo celular (vía supresora) son mucho más agresivos: por ejemplo en la adenomatosis familiar polipósica (FAP) el paciente no alcanza a sobrevivir por más de 4 años después de diagnosticado el cáncer, debido a que responden menos al tratamiento y su expectativa de vida se calcula en un 74 a 80% o menos. Por el contrario, las personas con tumores en donde se involucran los genes encargados de la fidelidad de la replicación del ADN (vía mutadora) poseen una expectativa de vida más alta de 90 a 100% y pueden sobrevivir hasta 5 o más

años (Aaltonen *et al.* 1993, Perucho 1998, Heinimann *et al.* 1999, Lynch & La Chapelle 1999, Smyrk and Lynch 1999, Gryfe *et al.* 2000, Castillo *et al.* 2002).

Cuando el cáncer es detectado a tiempo; las tasas de supervivencia pueden ser más altas de las que se conoce llegando a un 92 % en aquellos pacientes que son tratados oportunamente antes que ocurra el mecanismo de invasión (metástasis), por ejemplo, cuando órganos adyacentes o nodos linfáticos son afectados el 64% de los pacientes alcanzan a sobrevivir 5 años mientras que cuando el cáncer se propaga a otros órganos solamente sobreviven el 7% (Castillo *et al.* 2002).

Actualmente el diagnóstico del cáncer, se realiza a partir del estudio histopatológico y por lo tanto independiente al tipo de vía genética por la cual se produce, recibe el mismo tratamiento. Esto es debido a la falta de tipificación molecular entre los tumores producidos por las diferentes vías de formación, hoy día, las investigaciones se centran en caracterizar los cambios moleculares y sus correlaciones con los resultados histopatológicos, con el fin de ver cuales fueron los procesos involucrados en el desarrollo de un tipo específico de cáncer como el de CCR y CG. Con el advenimiento de los análisis moleculares se puede llevar a cabo la evaluación de varios marcadores genéticos que permiten conocer la vía involucrada en la formación de un cáncer. Por otra parte, la mayoría de investigaciones se centran en las cascadas de proteínas aberrantes que inducen la proliferación celular en un tumor (vía supresora), tratando de desarrollar nuevas terapias contra el cáncer. Un test de microsatélites puede tener una utilidad clínica como un marcador de pronóstico favorable por lo que es importante evaluar el nuevo fenotipo mutador de microsatélites como un método de examen molecular para determinar con qué frecuencia se presenta este tipo de inestabilidad en Santander (Weinberg 1996, Perucho 1998, Smyrk *et al.* 1999, Halling *et al.* 1999, Gryfe *et al.* 2000, Alexander *et al.* 2001, Wu *et al.* 2001).

La detección del fenotipo de error de la replicación del DNA de un tumor puede ser importante en el futuro para determinar factores de pronóstico biológicos e investigar estrategias terapéuticas mediante la evaluación de alteraciones en el número de repeticiones de microsatélites (secuencias repetidas en tandem) (presentes en CCR y CG) usando pocos marcadores de repeticiones. Entre los marcadores microsatélites evaluados que han mostrado una alta correlación entre la aparición de la transformación celular y la inestabilidad de microsatélites están: D8S199, D1S158, D2S123, D5S346 y D17S250 entre otros, los cuales son de repeticiones dinucleotídicas; y BAT-13, BAT-40, BAT-10A, BAT-10B, BAT-25 y BAT-26 los cuales son de repeticiones mononucleotídicas; este último fue descubierto casualmente mientras se secuenciaba el intron 5 del gen hMSH2 ubicado en el brazo p del cromosoma 2 y consta de una repetición de 26 desoxiadenosinas. El análisis de repeticiones mononucleotídicas y dinucleotídicas ha revelado una inestabilidad de microsatélites significativa. BAT-26 ha mostrado ser altamente específico para detectar el fenotipo IMI y está asociado con la pérdida de la expresión de los genes hMLH1 o hMSH2 en tumores con fenotipo de error de la replicación (RER+), definido por la presencia de inestabilidad en más de dos marcadores microsatélites. Además, tiene muchas ventajas sobre otros marcadores en análisis de IMI porque presenta una inestabilidad en más de 95% de los tumores relacionados con este. Sumado a esto, tiene una amplia correlación con la pérdida de la expresión de las proteínas reparadoras de errores del ADN en adenomas y carcinomas de CG y CCR con IMI (Mao *et al.* 1994, Shibata *et al.* 1994, Parsons *et al.* 1995, Eshleman *et al.* 1996, Bocker *et al.* 1997, Caldas *et al.* 1997, Hoang *et al.* 1997, Halling *et al.* 1999, Lamberti *et al.* 1999, Samowitz 1999, Gryfe *et al.* 2000, Lynch y Kaul 2000, Laukola 2001, Morifuji *et al.* 2003, Chai *et al.* 2004).

Nuestra investigación está encaminada a la búsqueda del fenotipo mutador de microsatélites mediante el análisis del marcador BAT-26, para determinar las

frecuencias de inestabilidad en este microsatélite, y correlacionar la detección del fenotipo IMI con el patrón histopatológico mostrado en las biopsias de estos pacientes.

3. MARCO TEORICO

La organización celular normalmente se mantiene mediante un estricto control ejercido en parte por el núcleo de las células y para ello necesita de señales específicas mediante un sistema de proteínas codificadas por diferentes genes que activan o inhiben el crecimiento celular. Entre los genes que controlan el comportamiento celular, están principalmente los protooncogenes implicados en la transmisión de señales proliferativas “que inducen el crecimiento celular” y pueden ser activados a oncogenes por una gran variedad de eventos moleculares como las mutaciones puntuales (deleciones e inserciones) o por la yuxtaposición de otras secuencias cromosómicas lo que induce la sobre-expresión o la hiperexpresión de las proteínas producto de estos genes. Otros, genes implicados en el crecimiento celular, son los genes supresores de tumor también llamados guardianes celulares “que inhiben el crecimiento” cuando el material genético (ADN) se encuentra dañado. Ellos mutan pero al contrario de los oncogenes estas mutaciones provocan la pérdida de la función o la disminución en la actividad de las proteínas. El cáncer surge como consecuencia de un estado de inestabilidad genética celular, producido por la combinación de alteraciones en estos genes, originadas por exposiciones prolongadas a agentes físicos y químicos de carácter mutagénico, que provocan la acumulación de mutaciones alterando así el sistema de control e induciendo a una de las células a iniciar el desarrollo de un comportamiento maligno, con el incremento en la tasa de división celular y la aparición posterior de cáncer, por el aumento de errores genéticos de varias clases que inducen la célula a transformarse (Henderson *et al.* 1991, Solomon *et al.* 1991, Panduro *et al.* 1993, Weinberg 1996, Liu 1999).

Las mayores causas de mutación en estos genes que llevan a un tejido a formar cáncer, están involucradas con el estilo de vida de los individuos, el consumo de tabaco que libera aminas aromáticas en el humo, alcohol, grasa animal, obesidad y la amplia exposición a los rayos ultravioleta, son los factores más importantes a tener en cuenta. Estos factores pueden llegar a alterar el comportamiento hormonal en edades avanzadas e influir en la proliferación de algunos de los más de 100 tipos de cáncer conocidos. También se han encontrado involucrados factores genéticos primarios (hereditarios) para algunos tipos de cáncer tal como el HNPCC en donde el origen a través de múltiples etapas, se da más rápido en la transformación de adenomas pequeños a grandes adenomas, a diferencia de los cánceres de tipo esporádico en donde la malformación puede ocurrir en periodos de años a décadas. Sumado a esto, se han visto relaciones más estrechas de unos genes con otros en los diferentes tipos de razas o étnias, el conocimiento de estos factores de susceptibilidad pueden ser considerados de un alto beneficio en la prevención de desarrollar cáncer. Otro factor no menos importante en la malformación celular es la hipermetilación, en donde posiblemente esta implicada la ADN metiltransferasa que se encarga de la metilación de las citosinas en la región promotora de los genes. Se ha considerado que esta hipermetilación participa en la condensación de los cromosomas formando regiones subcondensadas en la fase mitótica, las cuales pueden posteriormente unirse unas con otras provocando aneuploidia, uno de los rasgos típicos de la vía de inestabilidad cromosómica en la formación de tumores; sin embargo recientemente se ha pensado que el 85% de cáncer de colon esporádico con IMI es provocado por el silenciamiento de MLH1 por esta vía (Henderson *et al.* 1991, Panduro *et al.* 1993, Keller *et al.* 1995, Vasen *et al.* 1996, Perera F. 1997, Keller *et al.* 1998, Narod 1998, Lynch y De la Chapelle 1999, Lichtenstein *et al.* 2000, Cunningham *et al.* 2001, Castillo *et al.* 2002)

3.1 Vías de formación de cáncer.

Anteriores investigaciones han logrado identificar dos vías de formación del cáncer dependiendo de los genes inactivados por las mutaciones y gracias a los avances en los análisis de biología molecular y las técnicas genómicas actualmente utilizadas. Estas son: la vía de inestabilidad cromosómica (Supresora) y la vía de inestabilidad de microsatélites (Mutadora).

No todos los tipos de cáncer son producidos por cualquiera de las dos vías, existen especificidades con algunos síndromes familiares como el caso del HNPCC que es producido exclusivamente por la vía de inestabilidad de microsatélites, el cual hasta hace algunos años se diagnosticaba de igual forma que un cáncer con inestabilidad cromosómica.

3.1.1 Vía supresora o de inestabilidad cromosómica

La vía supresora en la cual los genes que se alteran son los protooncogenes y los genes supresores de tumor, implicados en conjunto en la regulación del crecimiento celular, la reparación del ADN, la apoptosis, la estabilidad cromosómica, la adhesión celular, y la transcripción entre otras funciones; se caracteriza por una pérdida frecuente de heterocigosidad (LOH) en múltiples *loci*. Alrededor del 80-85% de los tumores presentan esta vía de formación donde es marcada una inestabilidad del número y estructura cromosómica que genera aneuploidia. Entre los genes más afectados y más estudiados han sido APC, p53 y K-Ras. En estos casos, la expectativa de vida para el paciente es bastante reducida (entre un 74-80% o menos), debido a su comportamiento bastante agresivo. Se han detectado mutaciones del gen APC en adenomas tempranos en más del 60% de cánceres colorrectales, el cual junto con el gen Rb juega un papel

importante en la iniciación de la carcinogenesis y esta asociado a la LOH. Aunque se piensa que el gen Rb esta más implicado en el aumento de la proliferación de células afectadas, para incrementar la posibilidad de subsecuentes eventos de transformaciones. Además del gen APC, el gen K-RAS también se ve afectado en los estadios tempranos de la tumorigenesis promoviendo las lesiones displásicas más rápido que en los adenomas que no poseen mutado este mismo gen. La función de p53 se pierde por mutaciones en cerca de la mitad de los canceres, aunque hay otros mecanismos indirectos que también contribuyen con la inactivación del gen, el cual induce la detención del ciclo en G1 y la apoptosis. Algunos tipos de cáncer donde p53 se ve alterado son los: sarcomas leucemias, tumores de cerebro frecuentemente en niños y algunas veces con cáncer de mama. N-myc, L-myc se encuentran involucrados pero se ha visto la pérdida de sus funciones en estadios mas tardíos de la progresión del tumor, no obstante se ha determinando que para la malformación genética de los tumores deben ocurrir mutaciones en por lo menos 4 o 5 genes (Powel *et al.* 1992, Aaltonen *et al.* 1993, Panduro *et al.* 1993, Bodmer *et al.* 1994, Fishel Richard 1996, Sherr Charles 1996, Bocker *et al.* 1997, Caldas *et al.* 1997, Hoang *et al.* 1997, Morin *et al.* 1997, Rodríguez-Bigas *et al.* 1997, Narod 1998, Perucho 1998, Liu Edison T. 1999, Smyrk *et al.* 1999, Castillo *et al.* 2002).

3.1.2 Vía mutadora o de inestabilidad de microsatélites

La segunda vía de generación del cáncer es la vía mutadora con un 15-20% de los casos de cáncer, en la cual es característica una gran inestabilidad de microsatélites (IMI). En esta vía los genes que codifican las enzimas que reparan los errores de la replicación estan directamente implicadas en mantener la fidelidad del ADN. El papel del sistema de reparación de errores de la replicación es estabilizar el genoma humano, reconociendo aberraciones estructurales como inserciones, deleciones, translocaciones, inversiones y amplificaciones que

afecten la normal estructura del ADN. Además, se sugiere que el sistema es capaz de reconocer otras lesiones diferentes a estas y esta implicado en la vía de muerte celular cuando la célula sufre cambios inaceptables por agentes que puedan alterar el ADN como los químicos y la radiación ultravioleta. Recientemente se han encontrado evidencias que sugieren que el sistema de reparación de mismatch esta implicado en la inducción de la apoptosis y la supresión de la mutagénesis cuando las células se exponen a la luz ultravioleta (Solomon *et al.* 1991, Modrich Paul 1994, Togo *et al.* 1996, Parsons R. 1997, Perucho 1998, Young *et al.* 2003). Aquellas células con defectos en los genes del MMR son incapaces de corregir los errores de replicación producidos por la ADN polimerasa, lo que lleva a la acumulación masiva de mutaciones en las regiones microsatélites o de repeticiones en tandem de las células tumorales. Esta acumulación de mutaciones producidos por esta vía de formación pueden proveer alteraciones genómicas funcionales requeridas para la manifestación del fenotipo maligno, en el cual algunas de las propiedades celulares de crecimiento y de invasión territorial de la célula correspondiente a las células colindantes en el epitelio no se ven alteradas, gracias a la ausencia de los grandes cambios asociados con aneuploidia característicos de la vía supresora (Shibata *et al.* 1994, Perucho 1998, Zhang *et al.* 2001). Debido a su estructura repetitiva lo cual favorece el deslizamiento de la polimerasa o “slippage”, los microsatélites son particularmente propensos a estos errores y la inestabilidad de los mismos es una marca de la deficiencia del sistema de reparación de errores de la replicación (Hoang *et al.* 1997).

Alrededor del 40% al 50% de tumores gastrointestinales con el fenotipo mutador de microsatélites (MMP) presentan deleciones e inserciones inactivantes respectivamente. Dichas mutaciones se producen por la alteración del marco de lectura de aminoácidos (Frameshifts) en las secuencias repetitivas de estos genes. El MMP actúa sobre las secuencias de los genes reparadores del ADN, y tales mutaciones se generan de un fenotipo mutador previo, desencadenándose

en etapas sucesivas, por lo cual la inactivación permanente o transitoria de uno de los genes desencadena un evento de mutaciones que inducen a mas mutaciones (mutaciones mutadoras) en otros de los genes implicados en la reparación, por esta razón la inestabilidad genómica se incrementa al aumentar la frecuencia de mutaciones en una proporción de diez-veces a más de mil-veces que posteriormente impulsaran la tumorigenesis y cientos de cambios en el ADN, lo que implica la presencia del fenotipo mutador de microsatélites (IMI) o de error de la replicación (RER) el cual puede afectar genes que son esenciales para el normal funcionamiento y crecimiento celular contribuyendo a la iniciación y progresión del tumor (Shibata *et al.* 1994, Keller *et al.* 1995, Eshleman *et al.* 1996, Fishel Richard 1996, Parsons R. 1997, Rodríguez-Bigas *et al.* 1997, Narod 1998, Perucho 1998). En los seres humanos inicialmente se observó la presencia de regiones de ADN inestables en HNPCC, por la ausencia de la función de una de las proteínas de unión al mismach; el gen receptor TGF- β y el gen BAX que tienen un efecto negativo en el crecimiento celular y la sobrevivencia. Similar a la inestabilidad observada en el ADN de *Escherichia coli* con defectos en el gen mutS y en *Saccharomyces cerevisiae* en el homólogo MSH2 (Bodmer *et al.* 1994, Rodríguez-Bigas *et al.* 1997, Smyrk *et al.* 1999). Actualmente se conoce que dentro del sistema de reparación de en humanos hay seis genes particularmente importantes involucrados en diferentes etapas del desarrollo del tumor. Entre los usualmente más alterados se encuentran hMLH1, hMSH2, hPMS1, hPMS2, hMSH6 y hMLH3. Los complejos proteicos formados por los productos de estos genes son los encargados de identificar mutaciones específicas como inserciones, deleciones o desapareamiento de bases que son corregidos posteriormente a la finalización de la replicación. La mutación de cualquiera de estos genes se relaciona con la deficiencia en el sistema de reparación, se cree sin embargo que más de 10 genes homólogos de la levadura hacen parte del sistema de replicación de microsatélites aunque no todos ellos estén implicados en el fenotipo mutador de microsatélites. Adicionalmente los cánceres producidos por esta vía poseen un mejor pronóstico y su expectativa de vida es más prolongada, esto se asocia con

una ventaja de supervivencia significativa de un 90-100%, porque el comportamiento del tumor es menos agresivo y responden mejor a un tratamiento adecuado como se ha visto al realizar quimioterapia con 5-fluorouracil (Bronner *et al.* 1994, Nicolaidis *et al.* 1994, Froggatt *et al.* 1995, Dos Santos *et al.* 1996, Hoang *et al.* 1997, Parsons R. 1997, Perucho 1998, Heinimann *et al.* 1999, Liu Edison 1999, Smyrk 1999, Hemminki *et al.* 2000, Gryfe *et al.* 2000, Robbins and Itzkowitz 2002).

Se han encontrado pocas relaciones entre algunos de los genes implicados en la vía de inestabilidad cromosómica como el gen supresor p53 y el oncogen K-ras y la inestabilidad de microsatélites, sin embargo, si se han encontrado asociaciones entre el tamaño del tumor en pacientes con carcinoma derecho de colon esporádico y la inestabilidad de microsatélites, y estas alteraciones genéticas son desarrolladas durante el progreso del tumor; mientras que algunos genes de la vía de inestabilidad cromosómica como p53 están involucrados con nódulos linfáticos metastáticos en pacientes con carcinoma derecho de colon (Fishel Richard 1996, Lleonart *et al.* 1998, Perucho 1998). Otras investigaciones indican que existe una relación entre los desbalances cromosómicos asociados al gen hRAD50 en un conjunto de tumores con inestabilidad de microsatélites de grado alto, en últimas y producto del incremento de las tasas de mutación, al final de los eventos carcinogénicos por la alteración de los genes reparadores del ADN se verán afectados los genes implicados en la regulación del ciclo celular (Li *et al.* 2003).

Varios autores han definido o clasificado el tipo de inestabilidad de acuerdo con el número de marcadores que se ven alterados sin existir un consenso claro para ello, generalmente se determina que si un tumor tiene alterados 2 o lo que corresponde a el 30% de los marcadores analizados pertenece al fenotipo RER de alta frecuencia mientras que si es solamente un marcador el alterado se le

adjudica el fenotipo RER de baja frecuencia y este último se incrementa cuando el número de marcadores analizados aumenta. Se ha podido determinar que no hay una distinción clínico patológica entre los tumores estables para los microsatélites y los de inestabilidad de baja frecuencia, estos a la vez no presentan ninguna pérdida en la expresión de las proteínas involucradas en el sistema de reparación MLH1 o MSH2, a diferencia de aquellos clasificados como de alta frecuencia (Kim HS *et al.* 2001).

3.2 Inestabilidad de Microsatélites

El código genético humano esta constituido por 3000 millones de pares de bases de las cuales solamente un 10 a 15% forman parte de los genes; a otras secuencias les competen funciones como la inactivación y activación de los genes, mantener unidos los cromosomas, entre otras y muchas otras no poseen una función obvia y las han denominado como secuencias “chatarra”. Entre estas últimas secuencias se encuentran agrupadas aquellas denominadas ADN satélite. El ADN satélite esta formado por secuencias repetidas de las cuatro bases del ADN: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T), en diversas combinaciones y en una suerte de tartamudeo. Diferente a lo que se podría pensar los microsatélites de menor tamaño encierran un interés muy superior y realizan funciones múltiples y sorprendentes. Los microsatélites tienen la capacidad de crecer y disminuir en longitud y estos cambios pueden traer consecuencias buenas o malas para los organismos portadores. A diferencia de las bacterias en eucariotas los microsatélites se encuentran ubicados en regiones fuera de los genes salvo un 10% que cae en su interior; de ese 10% casi todos pertenecen a tripletes repetidos que al mutar por lo general no alteran el marco de lectura del gen codificante. Dentro de los microsatélites estudiados el perteneciente al gen de la huntingtina consta de repeticiones de glutaminas cerca del extremo inicial de la proteína, correspondiente a unas 10 a 30 glutaminas. En la enfermedad de

Huntington las personas codifican una ristra de glutaminas excesivamente largas de más de 36 unidades, y basta solo con la herencia de una copia defectuosa para dictaminar la enfermedad. Otros microsatélites que se encuentran fuera de los genes pueden llegar a regular la función de estos (Moxon *et al.* 1999).

La inestabilidad que afecta a los microsatélites permite que estas secuencias también llamadas STR's (secuencias repetidas en tandem una detrás de otra) cuyo tamaño es de 1pb a 7pb modifiquen en el tejido tumoral el número de repeticiones observadas en el tejido normal ya sea con ganancia o con pérdida del número de repeticiones. Este tipo de mutaciones es común en algunos tipos de cáncer en humanos como el cáncer gástrico y el cáncer de colon y pueden ser detectadas evaluando unos pocos microsatélites siempre y cuando estos se encuentren modificados en una alta fracción del mismo. La pérdida de la estabilidad de los microsatélites puede ser un evento temprano en la tumorigenesis del CG y CCR que persiste a través del desarrollo del tumor. La acumulación de mutaciones microsatélites es debida a eventos consecutivos de slippage con pérdida o ganancia de una simple o unas pocas unidades de repetición (Shibata *et al.* 1994, Keller *et al.* 1995, Eshleman *et al.* 1996, Togo *et al.* 1996). Se cree además que la tasas de mutación de los microsatélites (deleciones e inserciones de unidades repetidas) aumenta con la longitud de los alelos y con la longitud de la unidad que se repite ya que estas tasas son más altas en microsatélites mononucleotidos y dinucleotidos que en microsatélites trinucleotidos o pentanucleotidos y están ampliamente asociadas con los canceres colorrectales heredados y esporádicos (Shibata *et al.* 1994, Parsons *et al.* 1995, Rampino *et al.* 1997, Samowitz and Slattery 1997, Perucho 1998, Robbins and Itzkowitz 2002). Halling y sus colaboradores observaron que unos tipos de microsatélites son más sensibles que otros, al examinar que en un panel de repeticiones dinucleotidicas algunos solamente presentaban inestabilidad en un solo paciente de los 9 que poseían el genotipo.

Alteraciones de numerosas secuencias de poli A (mononucleotídicas) y las secuencias dinucleotídicas distribuidas ampliamente y al azar a través del genoma, son las más usadas para definir tumores con inestabilidad de microsatélites derivada de mutaciones somáticas difusas en estas secuencias, debidas a la perdida o ganancia de una o más unidades de repetición y donde la maquinaria de replicación o reparación de las células, se encuentra ampliamente averiada por la mutación de genes esenciales para mantener la fidelidad de la replicación (Keller *et al.* 1995, Perucho 1998). Este fenotipo originado por IMI actualmente se conoce como fenotipo mutador de microsatélites (MMP), donde se exhibe un incremento en la tasa de mutaciones en genes que se expresan endógenamente, como los genes hMLH1 y hMSH2, la mutación del producto de este último es mutagénica y existe una relación causal entre estas mutaciones inductoras de posteriores mutaciones, la aparición de inestabilidad genómica en secuencias de repeticiones simples y finalmente el desarrollo de unas clases de tumores colorrectales del fenotipo mutador de microsatélites (Broner *et al.* 1994, Mao *et al.* 1994, Shibata *et al.* 1994, Froggatt *et al.* 1995, James *et al.* 1996, Hoang *et al.* 1997, Perucho 1998).

En canceres esporádicos la inestabilidad de microsatélites se encuentra en una proporción de cerca al 15%, en su mayoría son diploides o pseudo-diploides, mientras que para canceres heredados como el HNPCC (predisposición temprana de carcinoma de colon y un patrón de herencia autosómico dominante) esta se hace mas alta, además, los pacientes con este fenotipo pueden tener un mayor riesgo de contraer cáncer de colon y de otros órganos (Aaltonen *et al.* 1993, Bodmer *et al.* 1994, Rodríguez-Bigas *et al.* 1997, Parsons R. 1997, Perucho 1998). BAT-26 es un marcador de 26 repeticiones de Adenina localizado en el intron 5 del gen hMSH2, justamente hacia abajo del sitio GT donador del empalme para la excisión, lo que indica que la conservación de su tamaño puede estar implicado en

una secuencia importante para la expresión del gen. Es ampliamente utilizado por ser cuasimonomorfo lo que indica que la variación de una línea celular a otra es mínima; de 2 bp únicamente, mientras que la variación entre células normales y tumorales es bastante amplia y se puede identificar con tan solo la electroforesis convencional con acrilamida y bromuro de etidio. BAT-26 provee resultados sobresalientes en la evaluación de la inestabilidad y muestra una eficiencia del 99.4% de los casos de el Fenotipo RER+ ya que se ha observado inestable en la mayoría de tumores de grado de inestabilidad alta, además, de una amplia concordancia con la presencia de este fenotipo y la pérdida de expresión de los genes hMLH1 o hMSH2 (97.6%) (Parsons *et al.* 1995, Bocker *et al.* 1997, Hoang *et al.* 1997, Morifuji *et al.* 2003, Chai *et al.* 2004).

La evaluación de marcadores microsatélites se ha hecho gracias a su pequeño tamaño que oscila entre 100-200pb lo que ha facilitado su amplificación. BAT-26 es un microsatélite que tiene un tamaño de 120pb como se ha estipulado por algunos autores; se escogió precisamente por su margen de polimorfismos tan pequeño, además que en tejidos fijados y embebidos en parafina se ha observado que los productos de amplificación de marcadores de hasta 150pb son excelentes para cantidades tan pequeñas de células presentes para la extracción de ADN, mientras que cuando el tamaño es de 400pb por ejemplo no hay amplificado, o es imperceptible por los métodos convencionales de visualización (electroforesis), sin embargo el incremento en la cantidad de muestra es benéfico para la cantidad de ADN obtenido (Bocker *et al.* 1997, Moskaluk and Kern 1997).

Hasta ahora se conoce que todos los tipos de cáncer conocidos pueden ser desarrollados por la vía de inestabilidad cromosómica o supresora pero no todos pueden derivarse de la vía de inestabilidad de microsatélites, hay pocos que se han visto derivados por esta vía, dentro de ellos se encuentran el cáncer gástrico y

el cáncer colorrectal en los cuales se observan características particulares dependiendo de la vía de formación y otros factores como el tipo de tratamiento dado y el grado de diferenciación que posee.

3.3. Cáncer de vías digestivas

3.3.1 Cáncer colorrectal

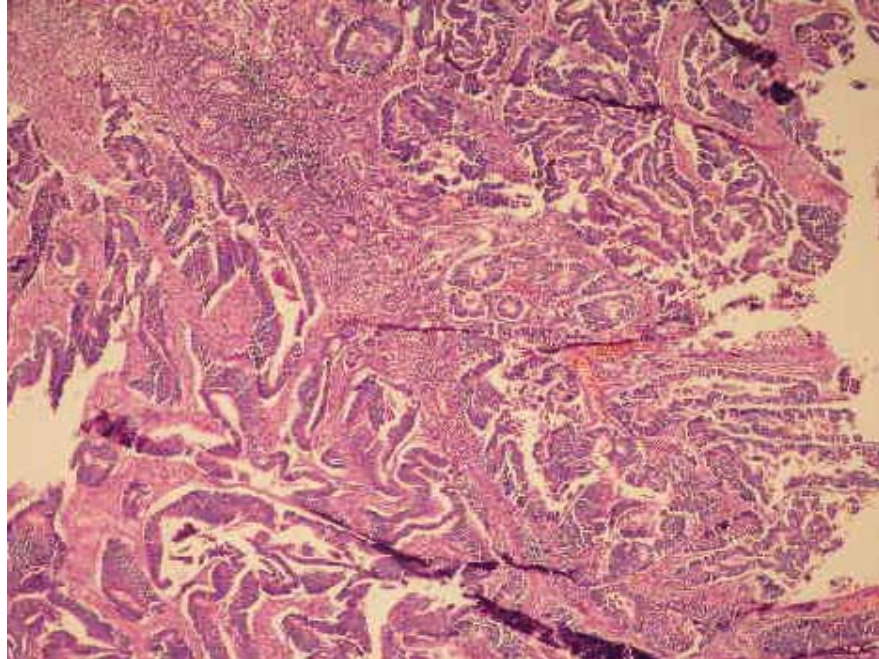
Muchos de los cánceres de colon son localizados en el colon sigmoide y el recto, sin embargo esta evidencia ha cambiado en años recientes con un incremento de carcinomas más proximales. La patología molecular también muestra diferencias en los sitios de presentación: tumores con alta inestabilidad de microsatélites o mutaciones en el protooncogen ras son más frecuentes en el cecum, colon ascendente y colon transversal. Los rasgos microscópicos están influenciados dependiendo del estado en el cual fue descubierta la lesión. De acuerdo al grado de diferenciación del tumor o el porcentaje del tumor mostrando la formación de estructuras parecidas a glándulas el cáncer de colon se puede clasificar en dos grupos:

a. Variedad clásica.

Este a su vez según el grado de diferenciación entre el tejido normal y el tejido tumoral (que tan parecido es el tejido tumoral con el tejido normal) se divide en:

- Bien diferenciado: la lesión exhibe estructuras glandulares en más de un 95% del tumor sin perder la estructura básica del tejido. Fotografía 1.
- Moderadamente diferenciado: en el cual la formación de glándulas se encuentra en un 50-95% y podemos observar mezclas entre un tejido

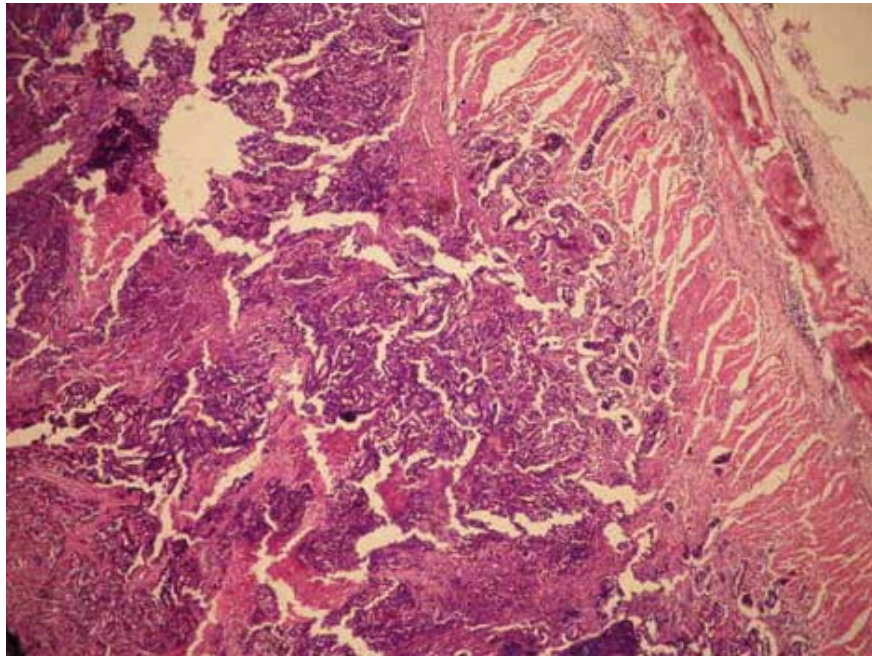
estructuralmente definido y otro deforme y sin organización celular
Fotografía 2.



Fotografía 1. Adenocarcinoma de colon de variedad clásica bien diferenciado.

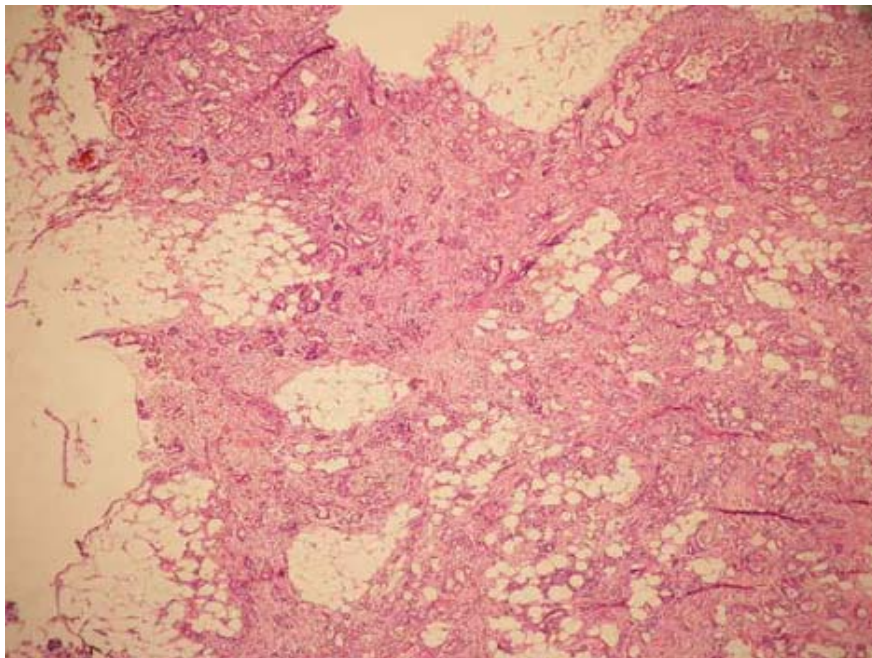
Fuente: Wilmer A. Cárdenas

Mal o pobremente diferenciado, con menos del 50% de formación de glándulas, este es de un peor pronóstico que los dos anteriores, y generalmente es invasivo e infiltrante a los tejidos adyacentes del epitelio, se pueden observar células en anillo de sello caracterizadas por la presencia de un núcleo altamente hipercromático en forma de medialuna y dirigido hacia la periferia de la célula, el citoplasma se encuentra relleno de mucina y en algunas ocasiones algunos lagos de la misma pueden ser observados, se puede ver también la formación de pequeñas glándulas y producción de moco Fotografía 3.



Fotografía 2. Adenocarcinoma de colon de variedad clásica moderadamente diferenciado.

Fuente: Wilmer A. Cárdenas

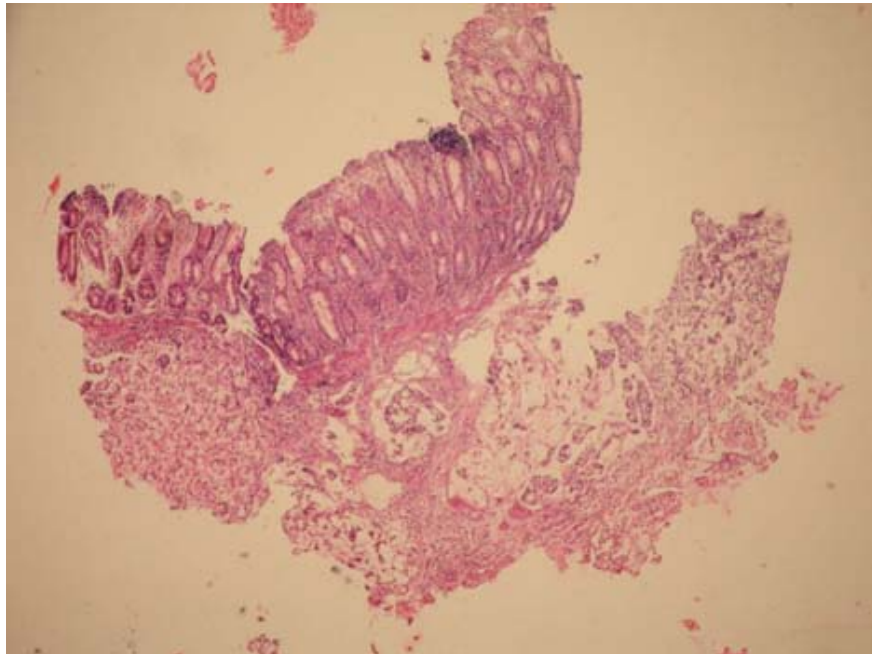


Fotografía 3. Adenocarcinoma de colon de variedad clásica mal diferenciado.

Fuente: Wilmer A. Cárdenas

b. Variedad mucinosa.

Esta caracterizada por la presencia de lagos de mucina en los cuales más del 50% de la lesión se compone de ellos. La mucina es excretada por la célula al exterior formando estos lagos con la presencia de células resuspendidas en ellos. No se observa una estructura definida de tejido y es el de peor pronóstico, altamente metastático debido a la presencia de células sueltas que han perdido completamente su capacidad de adhesión. Muchos de los tumores con alta inestabilidad de microsátélites se asocian a este tipo histopatológico Fotografía 4. (Hamilton *et al.* 2000)



Fotografía 4. Adenocarcinoma de colon de variedad mucinoso.

Fuente: Wilmer A. Cárdenas

Dentro del CCR 12-15% poseen IMI y podemos encontrar dos diferentes casos definidos por la forma de aparición de las mutaciones en los genes reparadores del ADN; estos son: el cáncer hereditario (HNPCC o cáncer no poliposico heredado) y el cáncer esporádico (Perucho 1998, Lynch y De la Chapelle 1999). El

cáncer de colon es ampliamente distribuido entre los países desarrollados; en un estudio realizado en 1999 Corea presentaba la más alta frecuencia (50%) comparado con otros países como Colombia (15%) y Estados Unidos (7%) (Sepúlveda AR *et al.* 1999).

Según la forma de aparición de las mutaciones este cáncer se puede dividir en:

a. Cáncer Hereditario

HNPCC cáncer colorrectal no poliposico hereditario o síndrome de Lynch

Este es el síndrome más común de cáncer hereditario en la población mundial (15% de todos los cánceres colorrectales) y en países desarrollados es la principal causa de mortalidad por neoplasia (Perucho 1998, Laukola *et al.* 1999). Tiene una tendencia a ocurrir en pacientes de edades jóvenes, frecuentemente en la parte derecha del colon acompañado por la producción de mucina y se asocia con malignidad en otros órganos tales como: el útero, el ovario, el estómago y el tracto urinario (Masubuchi *et al.* 1999). Es netamente derivado de la inestabilidad de microsatélites y se asocia a la pérdida de la expresión de algunos de los genes del sistema de reparación (MLH1, MSH2, PMS1, PMS2, MSH6-GTBP o MLH3), comúnmente el MSH2, con una mutación heredada de forma autosómica dominante de este gen o el gen MLH1. Muchas de estas mutaciones (81%) ocurren en principio en los exones de los genes de ahí que cambien los marcos de lectura y se presente la alteración de las proteínas; por ejemplo, se han descrito mutaciones en los codones 322 (Gly965Asp) y 388 (Pro1165Leu) del gen MSH2; en otros casos el gen MLH1 en los codones g18 (Glu1853Asp) (Brieguer *et al.* 1999, Laukola *et al.* 1999). En la mayoría sin embargo la deficiencia del sistema de reparación es causada por el nocaút bialelico de MLH1 por hipermetilación somática en su promotor. El criterio de Ámsterdam determina que para vincular a una persona con el síndrome de Lynch, se requiere que todos los miembros

afectados lo sean por cáncer colorrectal, ignorando con esto los otros miembros familiares afectados por otros tipos de HNPCC, en particular el de endometrio. Lynch y De la Chapelle proponen definir una persona o un grupo familiar como aquellos que tienen mutaciones positivas o mutaciones negativas en algunos de los genes de reparación de mismatch con HNPCC. Es necesario estudiar la frecuencia de HNPCC en diferentes poblaciones, por diferentes métodos de diagnóstico; ya que es posible, y por lo general estas incidencias pueden variar dependiendo de otros factores; entre ellos un efecto fundador puede mostrar gran incremento para algunas poblaciones a diferencia de aquellas poblaciones panmicticas en las cuales puede no influir. Se han visto pocas proporciones de nuevas mutaciones en HNPCC porque no han sido bien documentadas. Otro factor puede provenir de factores ambientales; mejor aun, pueden existir diferencias entre la presentación de cáncer esporádico y HNPCC.

b. Cáncer esporádico

La frecuencia de IMI en este tipo de cáncer es de 15 a 20% (Arzimznoglou *et al.* 1998, Robbins & Itzkowitz 2002), aunque sea clasificado como esporádico la única diferencia que se puede observar entre este y el cáncer hereditario simplemente es que la aparición de las mutaciones se da en el transcurso de la vida y no de forma heredada y las características fenotípicas y genotípicas no se dan de manifiesto (Perucho 1998). La principal causa observada para la formación de cáncer de colon por la vía de inestabilidad de microsatélites es la hipermetilación de la región promotora del gen hMLH1 (Leung *et al.* 1999).

3.3.2. Cáncer gástrico

El adenocarcinoma gástrico puede formar glándulas malignas compuestas por estructuras tubulares, acinares o papilares, o aquellas consistentes de una mezcla

compleja discohesiva, células aisladas con morfologías variables, algunas veces en combinación con estructuras glandulares, trabeculares o alveolares sólidas. Varios sistemas de clasificación han sido propuestos, entre ellos: Ming, Carneiro, y Goseky, pero los más usados comúnmente son los de WHO (Organización Mundial de la Salud) y Laurén.

La clasificación de WHO se basa en el patrón histopatológico predominante. Para esta se ha diferenciado cuatro clases: Los adenocarcinomas tubulares, los adenocarcinomas papilares, adenocarcinomas mucinosos y los carcinomas de células en anillo de sello.

La clasificación de Lauren ha demostrado un uso poderoso en evaluar la historia natural del carcinoma gástrico especialmente en lo que respecta a la asociación con factores ambientales, la tendencia a la incidencia y sus precursores.

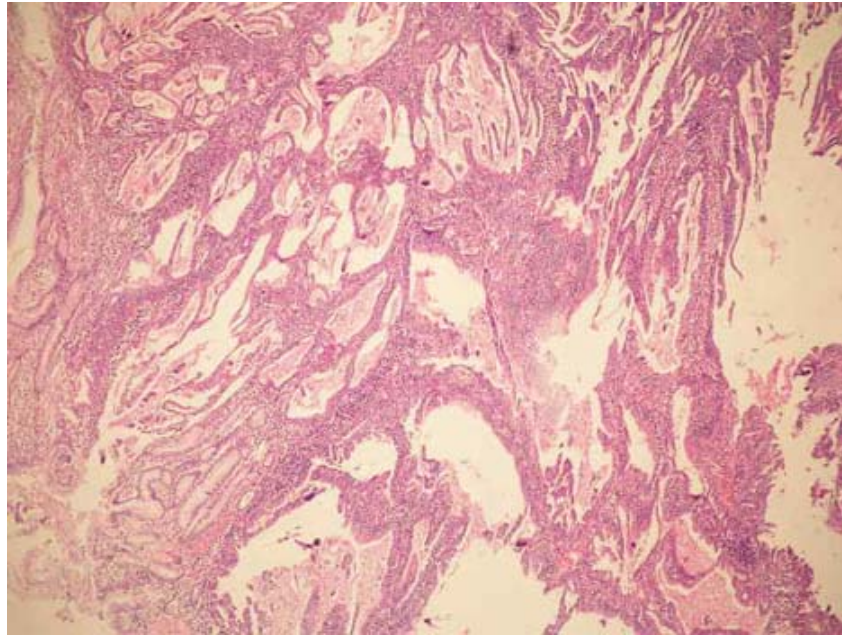
Las lesiones son clasificadas en dos grupos:

a. Variedad intestinal

Éste forma glándulas y por su parecido con el tejido normal se clasifican en:

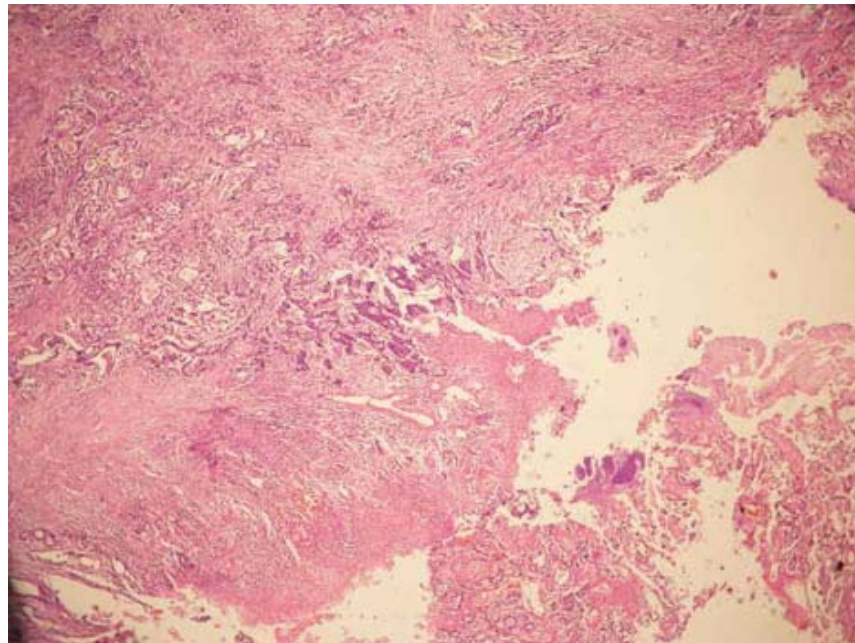
- Bien diferenciado, en el cual el parecido con el tejido normal es marcado, pues no se pierde la estructura general del mismo Fotografía 5.
- Moderadamente diferenciado, en este caso hay una mezcla de glándulas completamente formadas con algunas que son deformes e incompletas, sin

embargo su observación es muy subjetiva dependiendo la destreza del observador Fotografía 6.



Fotografía 5. Adenocarcinoma gástrico de variedad intestinal bien diferenciado.

Fuente: Wilmer A. Cárdenas



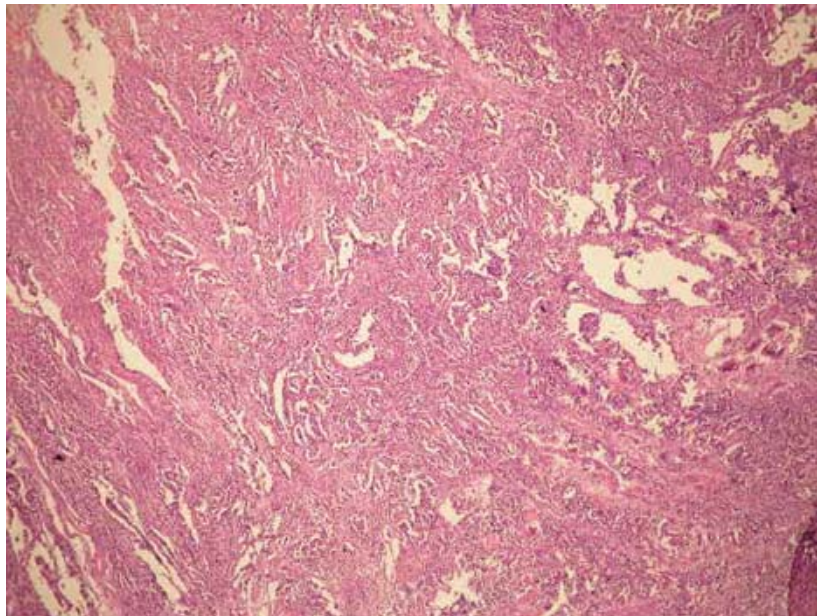
Fotografía 6. Adenocarcinoma gástrico de variedad intestinal moderadamente diferenciado.

Fuente: Wilmer A. Cárdenas

- Mal o pobremente diferenciado, en este último es característica la presencia de células en anillo de sello con el núcleo altamente hipercromático, y el citoplasma lleno de mucina. Además de la pérdida casi completa de la diferenciación con el tejido normal Fotografía 7.

b. Variedad difusa

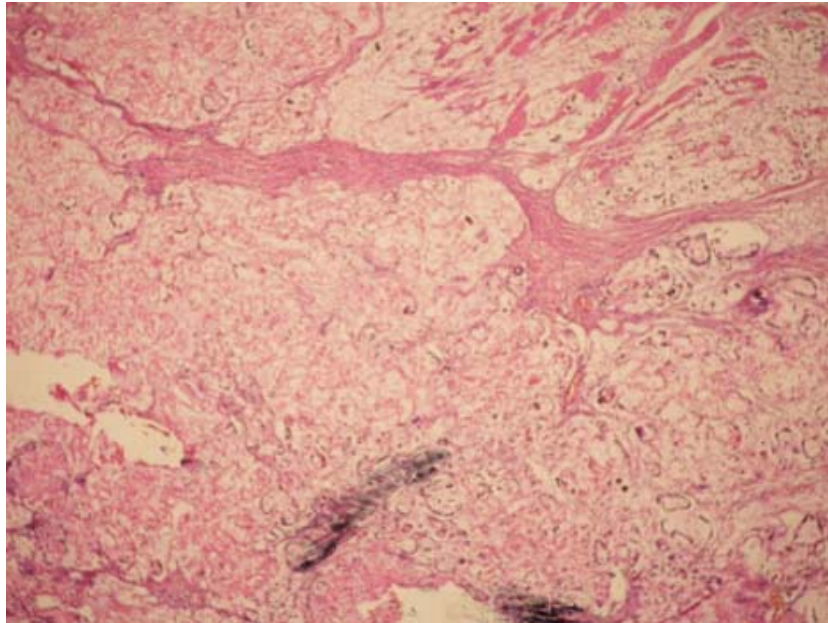
No presenta ninguna diferenciación estructural y es el de peor pronóstico. Son células de poca cohesividad infiltrando difusamente la pared gástrica con muy poca formación de glándulas. Las células usualmente son redondeadas y pequeñas, pueden estar como células individuales, en clusters o en arreglos reticulares. En esta variedad la tasa mitótica es mas baja que en los carcinomas de tipo intestinal, pueden estar presentes pequeñas cantidades de mucina, la desmoplasia es más pronunciada y asociaciones inflamatorias son menos evidentes que en el otro tipo de diferenciación Fotografía 8 (Carneiro 1997, Hamilton *et al.* 2000).



Fotografía 7. Adenocarcinoma gástrico de variedad intestinal pobremente diferenciado.

Fuente: Wilmer A. Cárdenas

Es considerado como una de las principales causas de mortalidad por cáncer en el mundo, las más altas frecuencias se han visto en países como China y Japón (64%); se ha observado en Chile, Perú, Ecuador y Colombia como la primera causa de muerte por cáncer (Touma *et al.* 1993, Camacho *et al.* 1995, Hayden *et al.* 1997, Perucho 1998).



Fotografía 8. Adenocarcinoma gástrico de variedad difuso

Fuente: Wilmer A. Cárdenas

Las causas de formación son diversas dentro de ellas se encuentran el tipo de alimentación donde juega un papel importante el consumo de altos contenidos de sales, grasas y alimentos condimentados, por otro lado las infecciones bacterianas también se han visto involucradas en este proceso (Henderson *et al.* 1991, Keller *et al.* 1998). Aunque se conocen pocas relaciones con factores hereditarios, algunos autores han encontrado algunas predisposiciones en este tipo de cáncer, sin embargo se cree que independientemente de la historia familiar de cáncer gástrico diferentes vías genéticas están involucradas en la patogénesis (Keller *et al.* 1995, Vasen *et al.* 1996, Keller *et al.* 1998, Lych and De La Chapelle 1999, Lichtenstein *et al.* 2000). El cáncer gástrico comúnmente afecta a personas mayores de 50 años y pocas veces se ha visto en pacientes menores, la relación de esos pacientes de

edades jóvenes con la inestabilidad de microsatélites indica que no es una vía de formación importante en estos pacientes (Hayden *et al.* 1997). Otro factor altamente relacionado con la inestabilidad de microsatélites en cáncer gástrico es la metilación de la región promotora de hMLH1 (Fleisher *et al.* 1999).

La inestabilidad de microsatélites ha sido la principal causa en 32.1% de carcinomas gástricos, 13.7% por el fenotipo de grado alto (mas de dos loci alterados o el 30%) y 18.9% por inestabilidad de grado bajo (1 o 2 o menos del 30% de loci alterados) con una asociación del 25% en el cáncer de variedad intestinal y un 3.7% en el de variedad difusa (Fang *et al.* 1999). El fenotipo de grado alto se ha visto relacionado con casos recurrentes de cáncer después de la resección del tejido tumoral lo que sugiere según los autores que puede haber diferentes vías de carcinogenesis en tumores recurrentes y no recurrentes; y en tumores con inestabilidad de microsatélites de grado alto y de grado bajo (Kawamura *et al.* 2000, Wu *et al.* 2001).

El cáncer gástrico también tiene un carácter hereditario dentro de ellos el HNPCC juega un papel importante y es característico que pertenezca a canceres de tipo intestinal, sin la asociación de infección con *H. pylori* muchos exhiben inestabilidad de microsatélites con una tendencia opuesta a la que se encuentra en tumores tempranos en pacientes jóvenes.

3.4 Relación del fenotipo de inestabilidad de microsatélites y el grado de diferenciación histopatológica.

Hasta hace algunos años no se conocían diferencias entre la histopatología de los tumores producidos por la vía supresora y la vía mutadora; hoy día algunas pautas

son analizadas con el fin de establecer un patrón histopatológico que nos pueda ayudar en el advenimiento de nuevas estrategias de prevención y diagnóstico. En el transcurso de las investigaciones de las dos vías de formación de los cánceres colorrectales y gástricos se han podido definir algunas características histopatológicas que podrían llegar a diferenciarlos unos a otros, dentro de las cuales podemos enumerar la presencia de tumores grandes, pobremente diferenciados y ubicados en el colon proximal y en la región distal y media del estómago para aquellos cuya vía de formación es la IMI, aunque han sido amplias las investigaciones no todas han podido tener un consenso sobre los rasgos histopatológicos del tumor con IMI, muchos autores han encontrado asociaciones positivas entre un 23-38% en tumores con un grado de diferenciación pobre y de tipo mucinoso por lo general en cáncer colorrectal, y otros han encontrado una asociación con tumores de tipo bien diferenciado y de variedad difusa en pacientes con cáncer gástrico. Algunos por el contrario no han encontrado ninguna asociación. De todos modos son necesarios los análisis moleculares para un correcto diagnóstico del fenotipo (Keller *et al.* 1995, Dos Santos *et al.* 1996, Togo *et al.* 1996, Carneiro 1997, Semba *et al.* 1997, Perucho 1998, Halling *et al.* 1999, Smyrk *et al.* 1999, Gryfe *et al.* 2000, Alexander *et al.* 2001, Ricciardiello *et al.* 2003, Mori *et al.* 2003, Morifuji *et al.* 2003, Musulén *et al.* 2004, Tang *et al.* 2004, Shi *et al.* 2006, Chang *et al.* 2006,).

4. METODOLOGÍA

4.1. Criterios de inclusión del paciente:

Durante un periodo de tres años (De Enero de 2003 a Enero de 2006) la Unidad de Oncología del Hospital Universitario de Santander, remitió al Laboratorio de Genética de la Facultad de Salud UIS 86 pacientes con diagnóstico de cáncer gástrico y cáncer colorrectal. Los pacientes fueron informados del proyecto que se estaba realizando y se les entregó un resumen del mismo (ANEXO A) y por medio de un consentimiento firmado (ANEXO B) accedieron a donar una muestra de sangre y parte de las biopsias de tumor que fueron utilizadas para el diagnóstico histopatológico.

4.2 Recolección de muestras:

Los pacientes que accedieron a participar en el proyecto se sangraron para obtener una muestra que sirvió de control o células normales, ésta, fue tomada en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander (UIS) en un tubo vacutainer con anticoagulante EDTA. Un total de 86 muestras de sangre fueron procesadas para la genotipificación del marcador microsatélite BAT-26. Después de la autorización de los pacientes las muestras de biopsias de tumor o células tumorales se solicitaron en el departamento de Patología de la UIS y otros laboratorios de patología asociados, solamente 43 biopsias de tumor fueron procesadas para su análisis.

4.3 Genotipificación:

4.3.1 Extracción de ADN

- Extracción de ADN de biopsias de tumor:
 - A las muestras de tumor embebidas en parafina se les retiró mecánicamente la mayor parte de ésta y se realizaron cortes de 8 μm , que luego se fijaron en placas de vidrio para su desparafinación; ésta se llevó a cabo siguiendo el protocolo utilizado en el Departamento de Patología de la UIS con la ayuda de los técnicos del mismo: Se inició con el calentamiento de las placas en un horno a una temperatura de 75 °C por 25 min. Posteriormente se hicieron 3 lavados en xilol durante tres minutos cada uno. Luego se realizaron tres lavados consecutivos en etanol del 60, 80 y 100 % respectivamente, Finalmente se lavó el exceso de etanol con agua destilada.
 - El tejido fijado en las placas fue raspado y depositado en tubos eppendorff de 1.5 ml, las muestras a las que no se les pudo extraer ADN del tejido de los cortes histológicos se les realizaron extracciones a porciones mayores de tejido obtenido por disección de los bloques, se desparafinaron siguiendo el mismo procedimiento y se picaron con un bisturí dejándolas del menor tamaño posible, luego se maceraron para facilitar el trabajo de la proteinasa K en el momento de la digestión. 2 protocolos de extracción fueron utilizados (El método de Chelex-100 siguiendo los procedimientos técnicos estandarizados en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Salud UIS y el método de Fenol/Cloroformo/Alcohol-isoamilico estandarizado en la Universidad de Santiago de Compostela-España, para este tipo de muestras) en las muestras de tumor con poca cantidad de tejido embebido en parafina (15 muestras), la cantidad de ADN extraído por

cada uno de los métodos se verificó mediante la cuantificación de este en un espectrofotómetro Spectronic Genesys II (Se tomaron 10µl de ADN y se mezcló con 990µl de agua bidestilada, se hizo la lectura de la absorbancia a 260 nm y este resultado se multiplicó por 5 para obtener la concentración de ADN en µg/µl). Finalmente, la extracción de ADN en todas las 43 biopsias se llevó a cabo siguiendo el método Fenol/cloroformo/alcohol-isoamilico, ya que con este método se obtuvieron concentraciones de ADN levemente mayores al método de Chelex-100. Al raspado de las placas y al triturado de muestras se adicionaron 500µl de buffer DBL (10 ml Tris/HCl 1M pH 7.4, 2 ml NaCl 5M, 20 ml EDTA 0.5M pH 8.0 y 968 ml de H₂O destilada), 50µl de SDS al 10% y 5µl de Proteinasa K (20mg/ml), para el caso de los raspados de las biopsias se dejaron en digestión por un periodo de 12 a 18 horas; a las muestras trituradas que contenían mayor cantidad de tejido se adicionaron 10µl de proteinasa K y se dejaron entre 24 a 36 horas, en un baño maría a 56°C con agitación suave. Después de este periodo se sacaron las muestras y se adicionaron 20µl de NaCl 5M, más 585µl de fenol/cloroformo/alcohol-isoamilico (25:24:1) se mezclaron bien por inmersión y se centrifugaron por 3 minutos a 6000rpm. Se recuperó el sobrenadante en un tubo de eppendorff nuevo de 1.5 ml y se adicionó 585 µl de cloroformo/alcohol-isoamilico (24:1). Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se le adicionó etanol al 96% frío, se mezcló suavemente y se refrigeraron por un periodo de dos horas a -20°C. Se centrifugaron por 30 minutos y se descartó el exceso de alcohol hasta que el precipitado (ADN) quedara bien seco. Se resuspendió el ADN en un volumen de 25µl de Buffer TE y se almacenó a 4°C para su posterior análisis. El gen de la beta-globina, se utilizó como control de amplificación posterior a la extracción. Para aquellas muestras cuyo amplificado fue negativo, se hizo una nueva extracción de ADN siguiendo el procedimiento de Chelex-100.

- Extracción de ADN de muestra de sangre:
 - Para las muestras de sangre se llevó a cabo el método de extracción por salting out descrito por Miller en 1988. Se tomaron 3 ml de sangre anticoagulada con EDTA en un tubo de 15 ml y se le agregó 12 ml de buffer de lisis I a 4°C el cual contiene sucrosa 0.3 M, Tris HCl 10 mM pH 7.5, MgCl 5mM y Tritón X 100), se resuspendió varias veces (20) por inversión y se centrifugó a 3000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se lavó con 3ml de buffer de lisis I, y se resuspendió y centrifugó como en el paso anterior. Se eliminó el sobrenadante y al botón celular se le añadió 1.4 ml de buffer de lisis II (EDTA-Na 0.024M pH 8.0), 37 μ l de SDS al 10% y 330 μ l de Perclorato de sodio 5M, se mezcló en vortex fuerte 10seg y se adicionó 0.6 ml de NaCl 6M, se agitó nuevamente en vortex y se centrifugó a 2400 rpm por 5min a 4°C. Se pasó el sobrenadante a otro tubo y se le adicionó suavemente 2.1ml de isopropanol conservado en el congelador, se resuspendió por inversión del tubo varias veces hasta obtener el ADN precipitado. El ADN precipitado se pescó con una punta de 100 μ l. Se removió la punta con el ADN y se lavó con 450 μ l de etanol al 70% frío y se resuspendió finalmente en 300 μ l de buffer TE para conservarlo a -20°C hasta su uso en la PCR.

4.3.2 Montaje de PCR

Se probaron 4 protocolos de amplificación (Hoang *et al.* 1997, Samowitz *et al.* 1999, Gonzáles-García *et al.* 2000 y Morifuji *et al.* 2003) finalmente el protocolo descrito por Morifuji *et al.* en el 2003 se llevó a cabo con una modificación en la cantidad de *Taq* polimerasa y la utilización de buffer 10X, en vez de la adición de KCL y Tris-HCl pH 8.3 por separado como lo describe el protocolo. Se montó una PCR con un volumen final de 15 μ l que contenían: 1.5 μ l de Buffer 10X, 250 μ M de

cada uno de los deoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs), 0.5 μ M de cada primer (5'–**6FAM**TGACTACTTTTGGACTTCAGCC--3' 3'–AACCATTC AACATTTTAAACC--5'), 2.5 mM MgCl₂ y 1 unidad de *Taq polimerasa* (PROMEGA), se adicionaron 50-100 ng de ADN genómico. La amplificación por PCR se llevó a cabo en un termociclador PERKIN-ELMER 2400 siguiendo las siguientes condiciones: Un paso inicial de 95°C por 12 min. 10 ciclos (94°C 15 seg., 55°C 15 seg., y 72°C 30 seg.) y 20 ciclos (89°C 15 seg., 55°C 15 seg. y 72°C 30 seg.) seguido por una extensión final de 72°C 10 min. Los amplificados se refrigeraron a 4°C hasta el momento de montar las muestras en la electroforesis capilar.

4.3.3 Electroforesis Capilar

Los métodos actuales basados en la fluorescencia para visualizar amplificados de ADN utilizando primers marcados con fluorocromos y equipos automatizados (secuenciadores automáticos de ADN) permiten tipificar varios microsatélites (STR's) a la vez y facilitan el análisis de los productos amplificados mediante un software que determina el perfil genético de un individuo.

Los amplificados se corrieron en una electroforesis capilar en el equipo ABI-PRISM 310 de PERKIN-ELMER, en ella los fragmentos se separaron de acuerdo con su carga y tamaño en pares de bases (bp).

Los electroferogramas se analizaron con el software Genesacn en el cual se observan cada uno de los alelos tipificados de la muestra así como el marcador interno de peso molecular (GS TAMRA 500).

4.3.4 Análisis de resultados del marcador BAT-26

Las muestras de los 43 pacientes de los cuales se pudo obtener una muestra normal (sanguínea) como la muestra de tumor (biopsia), se analizaron para obtener el perfil genético del microsatélite BAT-26 para cada uno de los individuos tanto en sangre como en tumor, e identificar la presencia del fenotipo de inestabilidad de microsatélites (IMI). El fenotipo IMI se determinó cuando la modificación del alelo en la muestra tumoral (Biopsia) con respecto a la muestra normal (sangre), presentó una variación en tamaño de más de 4 pares de bases. Previo a esto se tuvieron en cuenta ciertos criterios, entre los cuales estuvo la verificación del marcador interno y de los dos controles (positivo y negativo).

El marcador de peso molecular Interno (Figura 1) está compuesto por varios fragmentos de ADN de diferente tamaño en pares de bases, este tamaño es conocido y permite comparar el tamaño del marcador con el tamaño de la muestra.

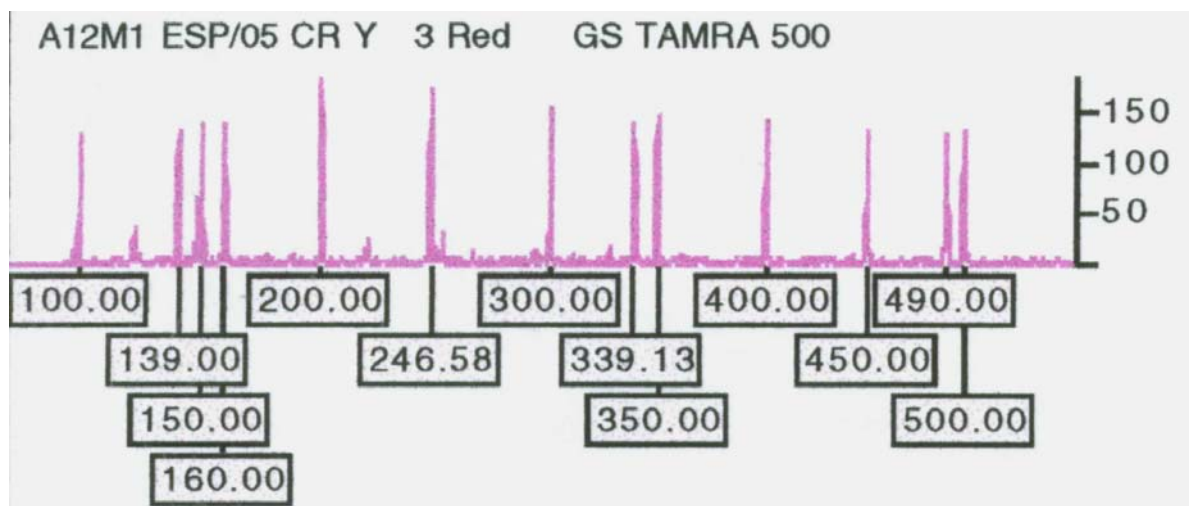


Fig. 1. Marcador Interno GS TAMRA 500

El control negativo (Figura 2) corresponde al control negativo de extracción, que no contiene ADN y que además ha sido amplificado y por lo tanto no debe registrar ningún pico en el electroferograma, solamente se deben observar los picos del marcador interno.

El control positivo (Figura 2) es el perfil genético de un individuo tipificado, este permite corroborar que la corrida este correcta

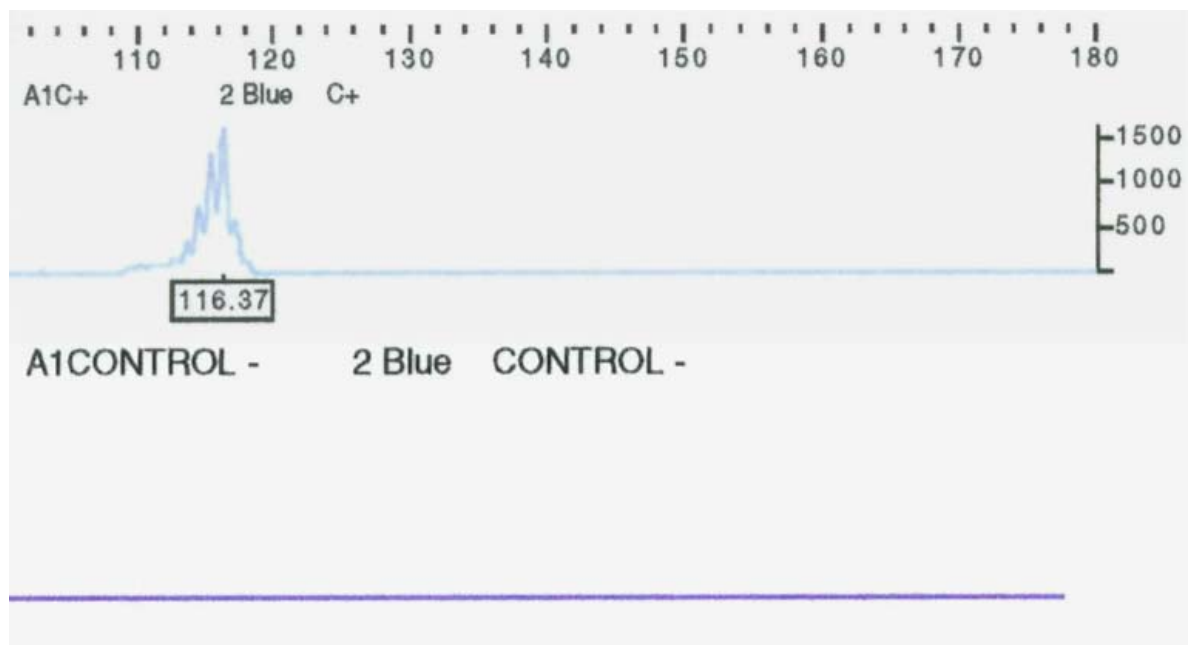


Fig 2. Control negativo y positivo de amplificación para el marcador BAT-26

- Primer análisis.

El análisis se realizó en el programa Genescan. Con este análisis se verificó que las muestras y los controles hayan corrido correctamente y los picos registrados en los electroferogramas. Se observó la ausencia de picos en el control negativo, para corroborar la ausencia de contaminación en los procesos de montaje. Se

verificó el resultado del control positivo, el número de picos, la altura, la alineación y el tamaño en pares de bases del marcador interno de cada uno de los controles y de las muestras.

4.3.5 Análisis estadístico.

En el programa Excel se realizó la base de datos. Se tuvieron en cuenta las siguientes variables: la edad de acuerdo a rangos cada 10 años para identificar aquellos pacientes diagnosticados en edades jóvenes (menores a 40 años), el diagnóstico patológico, el género de los pacientes, el grado de diferenciación histopatológica del tumor y la presencia o ausencia del fenotipo de inestabilidad de microsatélites. Posteriormente se llevó al programa SPSS 10 (SPSS Inc, Chicago, IL), por medio del cual se llevaron a cabo los análisis estadísticos. El test exacto de Fisher fue utilizado para la hipótesis nula de no asociación entre la edad y el sexo del paciente con el diagnóstico patológico. Se utilizó el mismo test, para evaluar la hipótesis nula de no asociación entre el fenotipo de inestabilidad de microsatélites con el sexo, y la edad del paciente y el grado de diferenciación histopatológica en cada uno de los tipos de cáncer.

5. RESULTADOS

5.1 Características Demográficas del grupo.

De los 86 pacientes referenciados por la Unidad de Oncológica del Hospital Universitario de Santander, 43 casos fueron incluidos para el análisis genético-molecular de inestabilidad de microsatélites, no se logro encontrar la muestra tumoral (biopsias de tumor) dentro de los archivos de los diferentes laboratorios de patología, a los restantes 43 pacientes para sus análisis pertinentes, por lo que la muestra se redujo en un 50%. De las muestras sanguíneas se obtuvieron mayores concentraciones de ADN (de 0.63 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 1.32 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y la amplificación de BAT-26 se logro en el 100% de las muestras, mientras que, la cantidad de ADN en las muestras de tumor fue menor (de 0.58 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 1.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y la amplificación se logro solamente en 23 casos (53%), se intentó hacer nuevas extracciones por el método de Chelex a las muestras cuya amplificación fue negativa, obteniendo del mismo modo resultados negativos. De estos 23 casos 11 casos (47.8%) fueron diagnosticados con cáncer colorrectal por medio del análisis patológico de la biopsia, y el diagnóstico de los 12 casos restantes (52.2%) fue cáncer gástrico.

La distribución de los pacientes de acuerdo a su edad y su diagnóstico patológico se puede observar en la Figura 3. Los 4 casos de cáncer que fueron diagnosticados en los grupos de edad menores a 40 años pertenecen a cáncer colorrectal, mientras que ningún caso con cáncer gástrico fue diagnosticado en estos pacientes jóvenes. La edad media en los pacientes estudiados fue de 59.13 años. Para los pacientes con cáncer colorrectal la edad media fue de 50.45 años y para los pacientes con cáncer gástrico fue de 67.08 años.

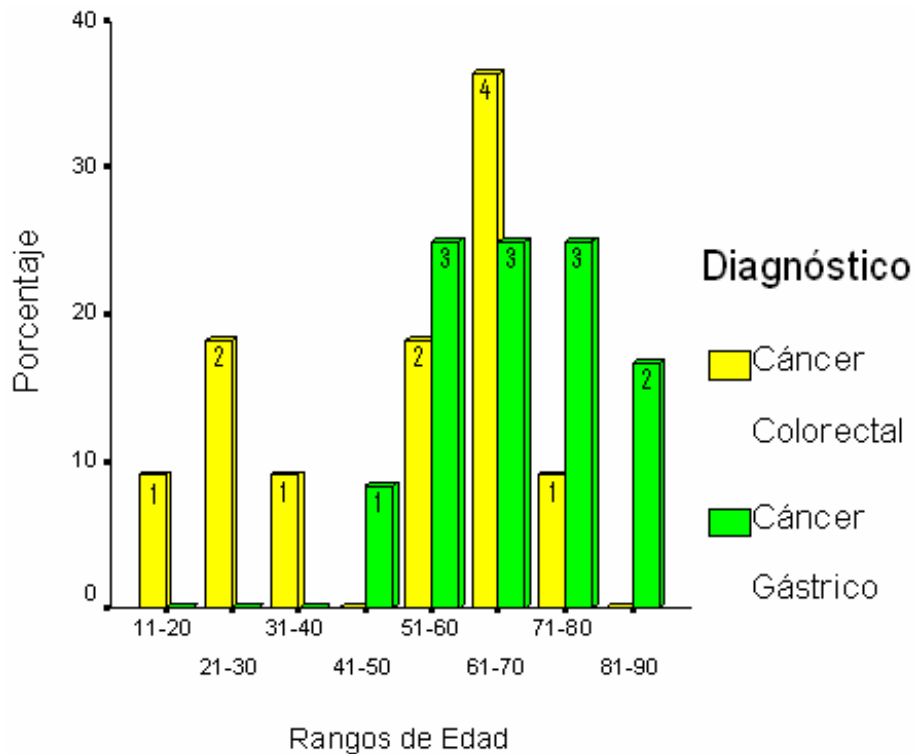


Fig. 3. Distribución de los pacientes según la edad y el diagnóstico patológico. En las barras observamos el número de individuos por rangos.

Según los resultados del test exacto de Fisher, no se encontró evidencia de asociación entre la edad de los pacientes y el diagnóstico patológico ($p=0.402$).

Según el sexo los casos estaban distribuidos homogéneamente 12 (51.2%) fueron mujeres: 6 de ellas (50%) padecían de cáncer colorrectal y las otras 6 (50%) de cáncer gástrico; los 11 restantes (48.8%) fueron hombres: 5 de ellos (52.4%) fueron diagnosticados con cáncer colorrectal y 6 (47.6%) con cáncer gástrico. Los resultados se pueden observar en la Figura 4.

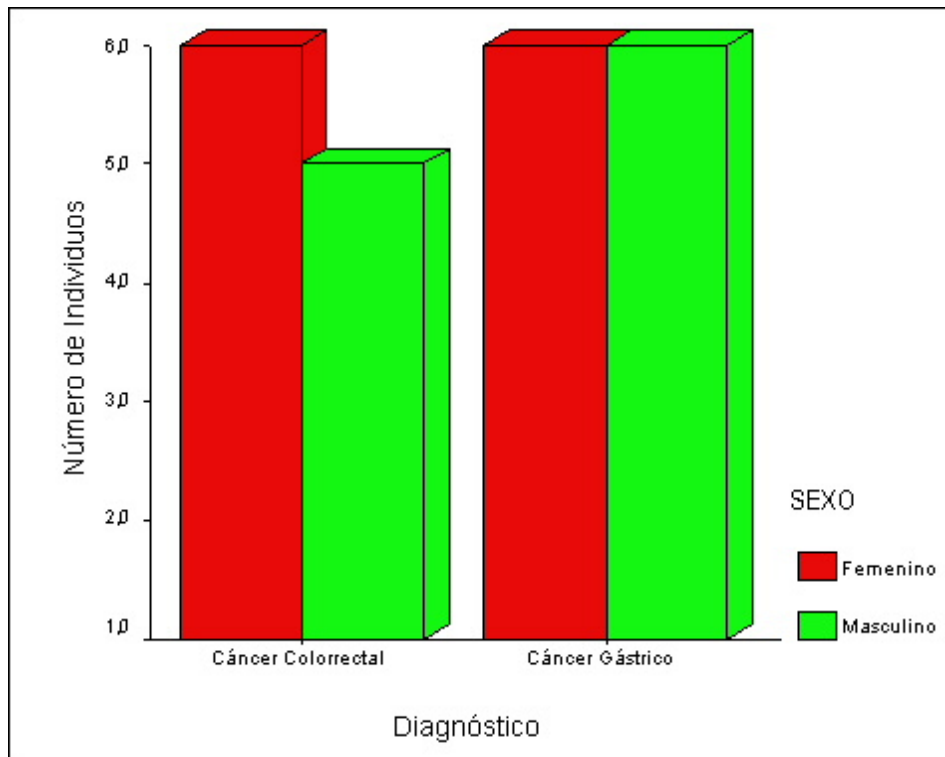


Fig 4. Distribución de los pacientes según el sexo y el diagnóstico

No se encontró asociación alguna entre el diagnóstico patológico y el sexo de los pacientes según el test exacto de Fisher ($p=0.579$).

5.2 Resultados del Análisis de ADN

El tamaño del marcador microsatélite BAT-26 en las muestras de sangre fue de 116.2 pares de bases, con la amplificación del microsatélite en la totalidad de ellas (100%), la presencia de un solo alelo para el marcador nos confirma el carácter monomórfico del microsatélite BAT-26. El fenotipo de inestabilidad de microsatélites se caracteriza por la variación del tamaño de los STR's, permitiendo observar un alelo alterado en las células cancerígenas con respecto al alelo normal que se encuentra en las células sanguíneas. Cualquier variación de más de 4 pb en el tamaño del marcador BAT-26 en las muestras de biopsias del tumor,

se consideró como presencia del fenotipo de inestabilidad de microsatélites como se observa en la Figura 5. En 19 de las muestras tumorales observamos solamente el alelo normal de 116 pb (Fenotipo estable, IMI-) como se muestra en la figura 6, mientras que en 4 muestras de tumor (4 casos 17%) se pudo detectar el fenotipo de inestabilidad de microsatélites en el marcador BAT-26 con una variación del tamaño entre el alelo normal y el alelo mutado de 11 pb.a 14 pb como se muestra en la tabla 1 (Fenotipo, IMI+), uno de los casos de IMI+ lo podemos observar en la Figura 7.

Caso No.	Diagnóstico de cáncer	Edad	Sexo	Dif. Histopatologica	BAT-26 en Sangre	BAT-26 en Tumor	Fenotipo IMI
1	Colorrectal	28	Femenino	Mod. Dif.	116.1	116	IMI-
2	Colorrectal	40	Femenino	Mod. Dif.	116.4	105.4	IMI+
3	Colorrectal	76	Femenino	Mod. Dif.	116.2	116	IMI-
4	Gástrico	53	Femenino	Mucinoso o Difuso	116.2	116.3	IMI-
5	Colorrectal	70	Femenino	Bien Dif.	116.2	102.8	IMI+
6	Gástrico	70	Femenino	Mod. Dif.	116	116	IMI-
7	Colorrectal	53	Femenino	Mod. Dif.	116.2	116.4	IMI-
8	Colorrectal	30	Femenino	Mal Dif.	116.3	102.6	IMI+
9	Gástrico	45	Femenino	Mod. Dif.	116.2	116.3	IMI-
10	Gástrico	68	Femenino	Mod. Dif.	116.2	116.2	IMI-
11	Gástrico	76	Femenino	Mal Dif.	116.3	115.9	IMI-
12	Gástrico	73	Femenino	Bien Dif.	116.1	116.4	IMI-
13	Colorrectal	66	Masculino	Mod. Dif.	116.2	116.0	IMI-
14	Colorrectal	52	Masculino	Mod. Dif.	116.7	116.2	IMI-
15	Colorrectal	13	Masculino	Mod. Dif.	116.2	116.1	IMI-
16	Gástrico	53	Masculino	Mod. Dif.	116.5	116.5	IMI-
17	Gástrico	59	Masculino	Mucinoso o Difuso	116.3	116.4	IMI-
18	Colorrectal	62	Masculino	Mod. Dif.	116.3	116.3	IMI-
19	Gástrico	66	Masculino	Mal Dif.	116.8	104.4	IMI+
20	Gástrico	86	Masculino	Mod. Dif.	116.2	116.7	IMI-
21	Gástrico	72	Masculino	Mucinoso o Difuso	116.7	116.9	IMI-
22	Gástrico	84	Masculino	Mod. Dif.	116	115.9	IMI-
23	Colorrectal	65	Masculino	Bien Dif.	116.2	116.3	IMI-

Tabla 1. Resultados del análisis de inestabilidad de microsatélite mediante el marcador microsatélite BAT-26.

En las figuras 6 (IMI-) se observan tres electroferogramas: un control positivo del marcador BAT-26 (C+), un electroferograma de la muestra sanguínea (SG035) y el

electroferograma correspondiente de la muestra de tumor (T035).

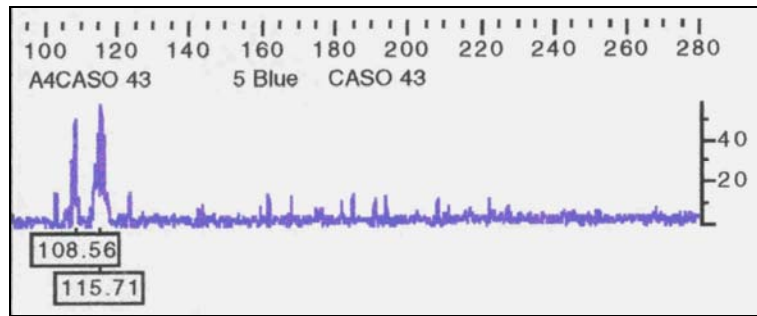


Fig. 5. Inestabilidad de microsatélites en el marcador BAT-26

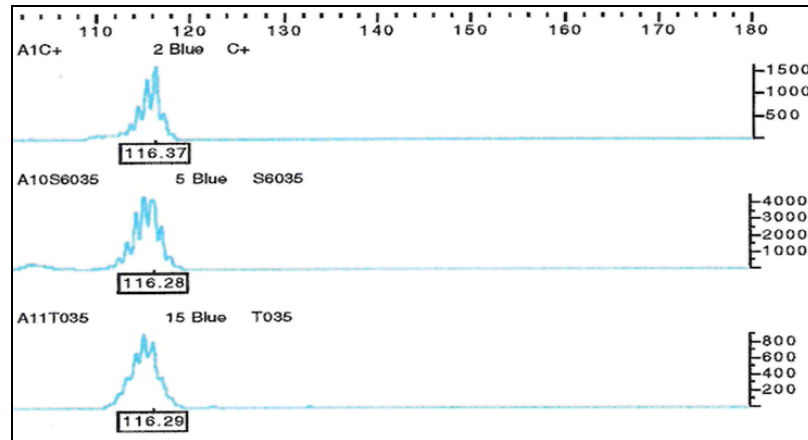


Fig. 6. Fenotipo estable de microsatélites IMI-

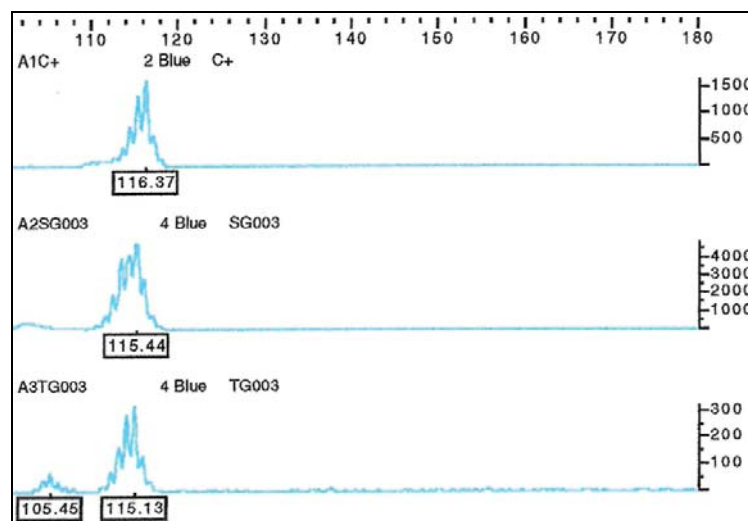


Fig. 7 Fenotipo de inestabilidad de microsatélites IMI+

En las figuras 7 (IMI+) se observan tres electroferogramas: un control positivo del marcador BAT-26 (C+), un electroferograma de la muestra sanguínea (SG003) y el electroferograma correspondiente de la muestra de tumor (TG003).

En la distribución por edades de los pacientes podemos observar 2 casos de inestabilidad de microsatélites detectados en edades jóvenes (<40 años), estos dos casos según el examen histopatológico, pertenecen a pacientes con diagnóstico de cáncer colorrectal, y puede existir una asociación entre alguno de ellos con el síndrome de Lynch o HNPCC, el cual se manifiesta en edades tempranas y se deriva de esta vía de formación de cáncer. En edades mas avanzadas 2 pacientes presentaron el fenotipo de inestabilidad de microsatélites uno de ellos con diagnóstico de cáncer gástrico y el otro con diagnóstico de cáncer colorrectal los dos se encontraban dentro del rango de los 61 a 70 Años de edad. Los datos se pueden observar en la Figura 8.

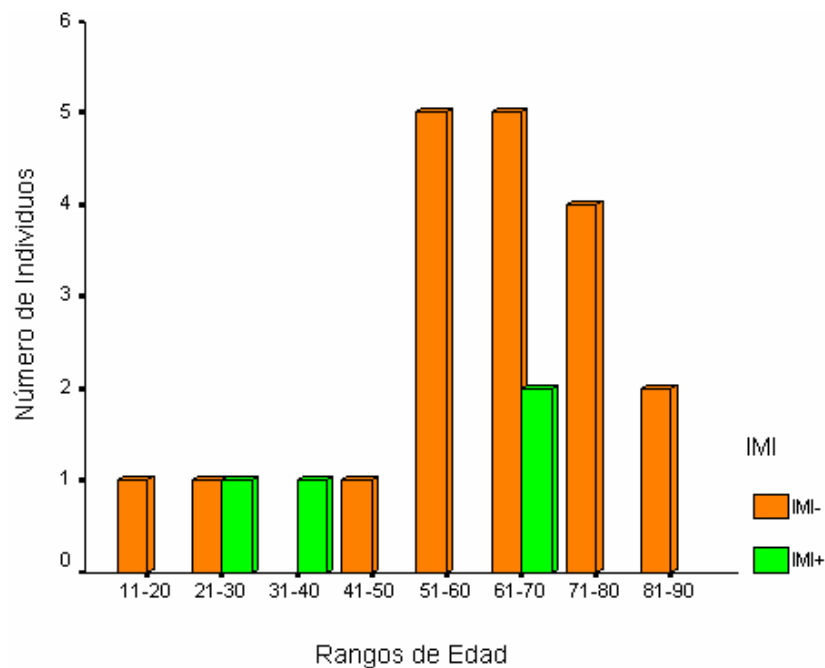


Fig. 8. Fenotipo de inestabilidad de microsatélites en cáncer gástrico y colorrectal según la edad de los pacientes, en rangos de 10 en 10.

Después de realizado el test exacto de Fisher no se encontró evidencia de asociación entre la edad de los pacientes y el fenotipo de inestabilidad de microsatélites ($p=0.295$).

Según el diagnóstico patológico el fenotipo de inestabilidad de microsatélites se observo en un mayor numero de casos de cáncer colorrectal que de cáncer gástrico. En cáncer colorrectal 3 individuos (28%) presentaron el fenotipo de inestabilidad de microsatélites, mientras que en cáncer gástrico solamente 1 individuo (9%) lo presentó Figura 9.

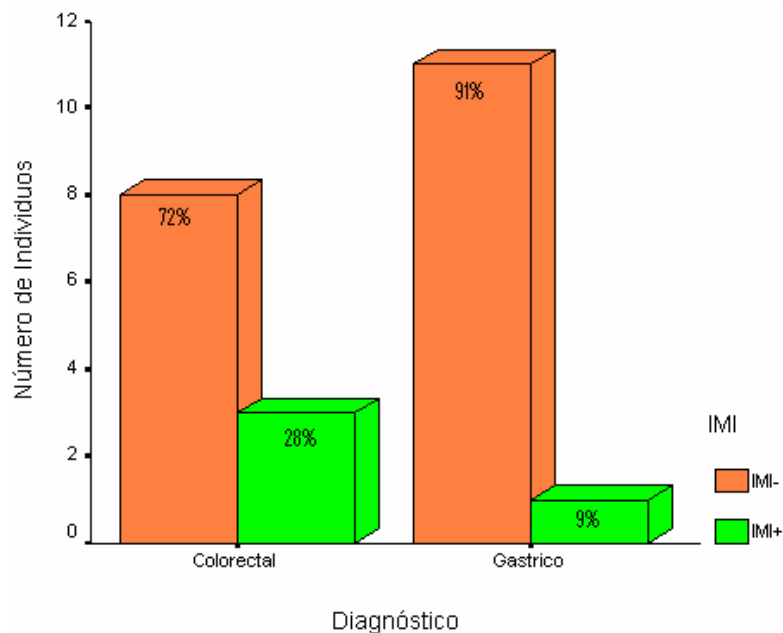


Fig. 9. Fenotipo de inestabilidad de microsatélites según el diagnóstico patológico.

Según el test exacto de Fisher no se encontró asociación entre el fenotipo de inestabilidad de microsatélites y el diagnóstico patológico ($p=0.261$).

Según el género de los pacientes el sexo femenino presentó un número más alto de individuos con inestabilidad de microsatélites con 3 individuos afectados (25%),

que el sexo masculino donde solamente se observó 1 caso del fenotipo (9.1%). La distribución de los datos se muestra en la Figura 10.

No se encontró asociación entre el sexo y el fenotipo de inestabilidad de microsatélites según el test exacto de Fisher ($p= 0.329$).

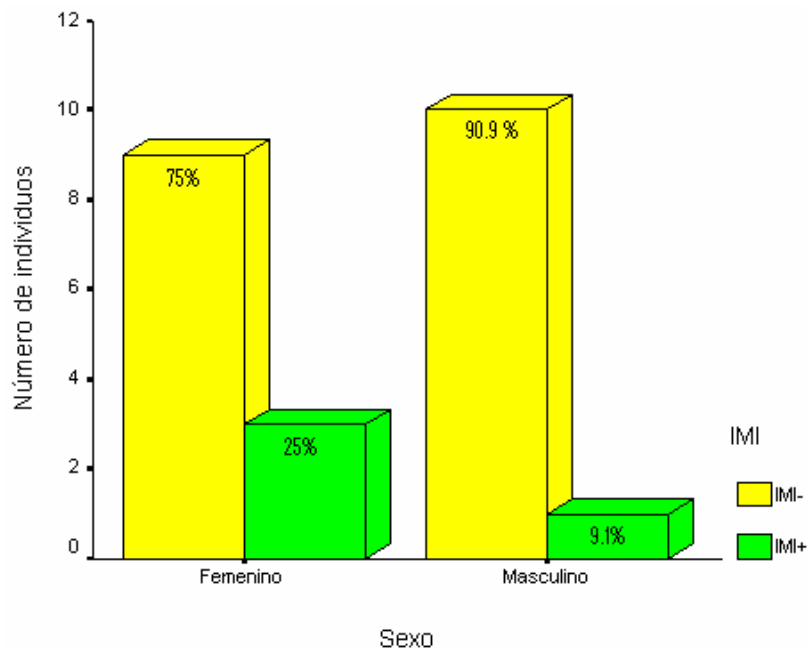


Fig. 10. Fenotipo de inestabilidad de microsatélites en cáncer gástrico y colorrectal según el género.

5.3 Resultados del Análisis Histopatológico

5.3.1 Cáncer Colorrectal

Los 11 casos pertenecían a la variedad clásica, 8 de ellos (72.7%) de tipo moderadamente diferenciado, 2 (18.2%) bien diferenciado y 1 (9.1%) mal diferenciado. 3 individuos (27.3%) presentaron el fenotipo de inestabilidad de microsatélites, uno para cada tipo de diferenciación histopatológica (Bien

Diferenciado, Moderadamente diferenciado y Mal diferenciado). Ninguna muestra de tumor con cáncer colorrectal de variedad mucinoso se encontró en los casos analizados. Los resultados se muestran en la Tabla 2 y Figura 11.

Diagnóstico	Grado de diferenciación histopatológica		Inestabilidad de BAT-26		Total
			IMI-	IMI+	
Cáncer Colorrectal	Variedad Clásica	Bien Dif.	1	1	2
		Mod. Dif.	7	1	8
		Mal Dif.	0	1	1
	Total		8	3	11
Cáncer Gástrico	Variedad Intestinal	Bien Dif.	1	0	1
		Mod. Dif.	6	0	6
		Mal Dif.	1	1	2
	Variedad Difuso		3	0	3
	Total		11	1	12

Tabla 2. Distribución de casos según el grado de diferenciación histopatológica y el fenotipo de inestabilidad de microsatélites.

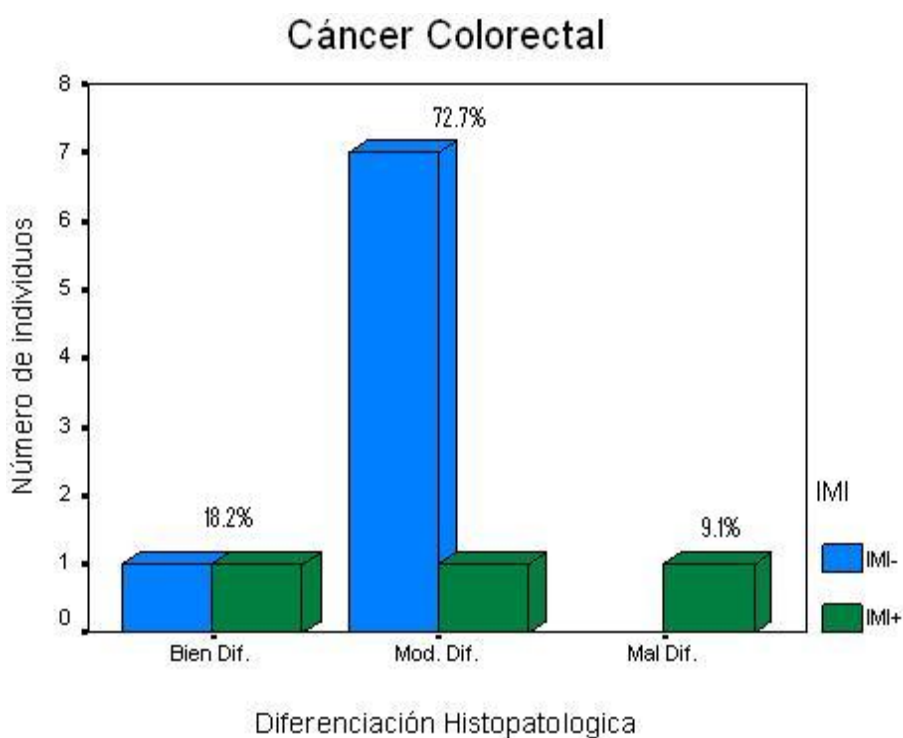


Fig. 11. Fenotipo de inestabilidad de microsatélites en cáncer colorrectal según el grado de diferenciación histopatológica del tumor.

5.3.2 Cáncer Gástrico

En cáncer gástrico por el contrario observamos todos los tipos de diferenciación histopatológica, 9 de los casos fueron de variedad intestinal y 3 de variedad difusa, 6 (50%) moderadamente diferenciados, 2 (16.7%) pobremente diferenciados, 1 (8.3%) bien diferenciado y 3 (25%) de variedad mucinosa. Solamente observamos un caso (8.3%) con el fenotipo de inestabilidad de microsatélites y perteneció al tipo pobremente diferenciado Tabla 8 y Figura 12.

En ninguno de los dos tipos de cáncer (Gástrico y Colorrectal) se encontró una asociación entre el fenotipo de inestabilidad de microsatélites y el grado de diferenciación histopatológica, según el test exacto de Fisher ($p=0.152$ para cáncer colorrectal y $p=0.250$ para cáncer gástrico).

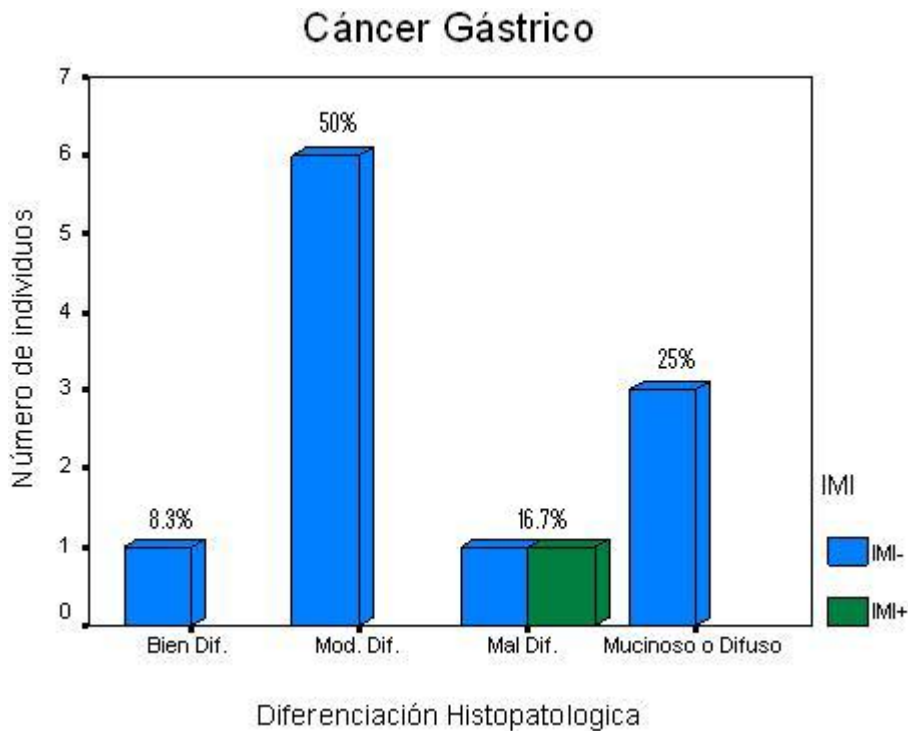


Fig. 12. Fenotipo de inestabilidad de microsatélites en cáncer gástrico según el grado de diferenciación histopatológica del tumor.

6. DISCUSION

Este estudio representa un paso inicial en la evaluación del fenotipo de inestabilidad de microsatélites (IMI) o de fenotipo de error de la replicación (RER) en Santander. El grupo de pacientes en nuestro estudio se encontraba homogéneamente distribuido entre los dos sexos para los dos tipos de cáncer. No se encontró ninguna asociación entre el diagnóstico patológico y el género. Se encontró una mayor frecuencia de mujeres con estos tipos de cáncer (un 51.2% fueron del sexo femenino y 48.8% del sexo masculino) sin embargo, en otros estudios los hombres se han encontrado mas afectados por este tipo de patologías (43.4% para mujeres y 56.6% para hombres), lo cual indica un riesgo más alto de desarrollar cáncer en los hombres. Nuestros datos muestran una pequeña variación de esta proporción, sin un cambio significativo. (Fisher $p=0.579$) (Touma *et al.* 1993, Camacho *et al.* 1995, Hayden *et al.* 1997, Perucho M. 1998, Robert *et al.* 2000, Jemal *et al.* 2004).

Las características demográficas de los casos analizados muestran un diagnóstico en pacientes con edades avanzadas de cáncer gástrico, y de cáncer de colon; sin embargo algunos individuos presentaron un diagnóstico de cáncer colorrectal en edades menores a los 45 años. Para cáncer gástrico el diagnóstico se presentó en edades mas avanzadas con una media de 67.08, comparando las medias y la distribución en rangos de edad de los dos tipos de cáncer, sin embargo estadísticamente no hay diferencias significativas entre el diagnóstico patológico y la edad de los pacientes como lo han visto otros autores en anteriores investigaciones. (Fisher $p=0.402$) (Keller *et al.* 1995, Dos Santos *et al.* 1996, Hayden *et al.* 1997, Parsons R. 1997, Seruca *et al.* 1997, Fang *et al.* 1999, Laukola

et al. 1999, Fleisher *et al.* 1999, Hemminki *et al.* 2000, Chai *et al.* 2004, Chang *et al.* 2006)

El marcador BAT-26 altamente sensible para detectar inestabilidad de microsatélites gracias a su carácter monomórfico, presentó un tamaño de 116.2 pb y aunque algunos autores reportan alelos diferentes para dicho marcador poniendo en duda el carácter monomórfico del mismo (Pyatt R, *et al.* 1999), todos los pacientes presentaban un pico principal de este tamaño en las muestras de sangre, algunos picos extras alrededor del pico principal se observaron, debido al deslizamiento normal de la ADN polimerasa en el momento de la PCR, por la naturaleza del marcador constituido por 26 repeticiones de adenina.

Alelos mutados entre 102 y 105 pares de bases fueron encontrados en 4 pacientes (IMI+), con una frecuencia en el fenotipo de 0.17 (17%) en cánceres de vías digestivas y no se encontró ninguna asociación entre el diagnóstico y el fenotipo de inestabilidad de microsatélites (Fisher $p=0.261$). Algunas investigaciones han detectado inestabilidad de microsatélites entre un 12-31% de los pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal. Nosotros encontramos la presencia del fenotipo en 28% de los casos; para muchos autores prevalencias superiores a 15% han sido asociadas con la inclusión de pacientes distribuidos entre todos los rangos de edad; ya que la mayoría de investigaciones han apuntado a evaluar los pacientes con un diagnóstico en edades jóvenes. (Parsons R. 1997, Laukola *et al.* 1999, Hemminki *et al.* 2000, Chai *et al.* 2004, Chang *et al.* 2006)

Por otra parte en cáncer gástrico todos los individuos fueron diagnosticados en edades avanzadas de vida, tal como han sido hallados en muchos estudios que

verifican que el diagnóstico de pacientes con este tipo de patología generalmente se presenta en edades superiores a los 40 años de edad. El fenotipo de inestabilidad de microsatélites en pacientes jóvenes tal como lo indican otras investigaciones poco está relacionado con la vía de inestabilidad de microsatélites en el desarrollo de cáncer gástrico; esto es porque la mayoría de los cánceres gástricos involucrados con pacientes jóvenes se han visto desarrollados por causa de la hipermetilación de el promotor del gen hMLH1. Los individuos con cáncer gástrico participantes en el trabajo, fueron diagnosticados con mas de 50 años de edad y un solo individuo (9%) presentó el fenotipo de inestabilidad de microsatélites, en otros reportes algunos autores han observado este mismo fenotipo con mas frecuencia (32.1-34.4%), en nuestros resultados puede estar involucrado el bajo número de muestras utilizado en el estudio (Keller *et al.* 1995, Seruca *et al.* 1997, Dos Santos *et al.* 1996, Hayden *et al.* 1997, Fang *et al.* 1999, Fleisher *et al.* 1999).

En nuestro trabajo no encontramos ninguna asociación entre el fenotipo de inestabilidad de microsatélites con la edad de los pacientes $p=0.295$, sin embargo 2 individuos diagnosticados en edades jóvenes son pacientes con síndrome de Lynch o cáncer hereditario, esto se pudo corroborar gracias al estudio de la historia familiar de este. En cuanto al sexo de los pacientes no encontramos ninguna asociación con el fenotipo de inestabilidad de microsatélites ($p=0.329$), en otros trabajos no se han encontrado este tipo de asociaciones con una probabilidad de $p=0.53$ esto indica y corrobora que el fenotipo se presenta de igual forma en pacientes de los dos sexos (Aaltonen *et al.* 1993, Dos Santos *et al.* 1996, Hayden *et al.* 1997, Hoang *et al.* 1997, Serrucha *et al.* 1997, Perucho 1998, Smyrk *et al.* 1999, Heinimann *et al.* 1999, Hemminki *et al.* 2000, Lynch & La Chapelle 1999, Castillo *et al.* 2002).

Durante varios años se ha intentado buscar una asociación entre el fenotipo histopatológico y el grado de inestabilidad de microsatélites; algunos autores han encontrado esta asociación entre los cánceres del tipo pobremente diferenciados entre un 26% y 38% (Alexander *et al.* 2001, Mori *et al.* 2003, Morifuji *et al.* 2003, Tang *et al.* 2004, Shi *et al.* 2006, Chang *et al.* 2006), otros por el contrario han encontrado asociación en tumores bien diferenciados, y unos más no encuentran ninguna asociación con el grado de diferenciación histopatológica (Hemminki *et al.* 2000, Shi *et al.* 2006) y el de inestabilidad de microsatélites. En nuestro trabajo encontramos 4 pacientes con el fenotipo de inestabilidad de microsatélites: 3 pertenecían a la variedad clásica de cáncer colorrectal distribuidos en cada uno de los tipos de diferenciación histopatológica, para el grado de diferenciación pobremente diferenciados solamente 1 caso (9.1%) fue observado. No se encontró asociación entre el fenotipo y el grado de diferenciación del tumor $p=0.152$. En cáncer gástrico 1 de los 11 casos (8.3%) presentó un grado de diferenciación mal o pobremente diferenciado. No se encontró ninguna asociación entre el fenotipo de inestabilidad y el grado de diferenciación del tumor $p=0.250$ confirmando lo observado por algunos autores en cuyas investigaciones la probabilidad ha sido aun mas baja $p=0.151$ (Semba *et al.* 1997, Halling *et al.* 1999, Musulém *et al.* 2003).

Algunos reportes indican mejores técnicas de extracción de ADN diferentes a la técnica utilizada en esta investigación, sin embargo estos reportes obtienen ADN amplificable de Muestras fijadas y embebidas en parafina en un 50 a 65% de los casos, nosotros logramos por el método de fenol/cloroformo extraer ADN amplificable en 53% de los casos, y para las muestras que no amplificaron se intentó extraer mediante Chelex-100 sin ningún resultado positivo (Coombs *et al.* 1999, Chan *et al.* 2001, Shi *et al.* 2002). Por este motivo de 43 casos incluidos en el proceso solamente de 23 obtuvimos resultados para la amplificación del microsatélite BAT-26, debido a la fijación de tejidos que implica una degradación

de las moléculas de ADN por acción de diferentes factores; entre los cuales los más probables son la utilización de formalina no bufferizada en el almacenamiento de las biopsias para su posterior inclusión en parafina. En este proceso el formaldehído reacciona con trioles, grupos aminoácidos libres y grupos fenólicos en los aminoácidos y en las proteínas, inhibiendo la acción de la proteínasa K en el proceso de digestión previo a la extracción, además la formalina no tamponada se oxida a ácido fórmico, generando un medio ácido, factor principal en la degradación del DNA dado que a pHs menores a 4 hay hidrólisis de los enlaces β glicosídicos de las purinas. En esta condición las purinas son protonadas y fácilmente clivadas quedando la cadena abierta y el DNA apurinico es susceptible a clivaje por iones hidroxilo, esta degradación del ADN puede verse reflejada en el momento de la amplificación por PCR. La parafina también es un inhibidor de la digestión y la extracción inclusive con los lavados pertinentes previos a los procesos de digestión. Otro factor relevante es la presencia de autólisis (putrefacción) de algunas de las muestras, por causa de la degradación de las membranas lipídicas de los lisosomas que liberan su contenido enzimático y degradan todo el contenido citoplasmático, dentro de ellos el núcleo y con ello el ADN, aunque el proceso de autólisis se ve retenido por el efecto de la fijación de los tejidos, la demora en el procesamiento de las muestras o el almacenamiento mal adecuado de las mismas en lugares húmedos puede desencadenar este proceso. Aunque muchos intentos se han hecho para mejorar las técnicas de extracción de ADN a partir de tejidos embebidos en parafina, los resultados siguen siendo poco óptimos para la evaluación molecular de muestras potencialmente importantes para observar alteraciones provocadas en los ácidos nucleicos y proteínas (Monskaluk and Ker. 1997, Shedlock *et al.* 1997, Jalouli *et al.* 1999, Bonin *et al.* 2003, Vargas *et al.* 2004). Sería mucho más efectivo obtener por parte del departamento de Gastroenterología muestras frescas embebidas en solución salina las cuales serían utilizadas únicamente para las evaluaciones moleculares, almacenando una gran cantidad de muestra de ADN geonómico que servirán para posteriores investigaciones.

7. CONCLUSIONES

El fenotipo de inestabilidad de microsatélites se encontró, en un 17% de los casos analizados.

Ninguna asociación fue encontrada entre el fenotipo de inestabilidad de microsatélites con el grado de diferenciación histopatológica del tumor, ni con el sexo, ni con la edad de los pacientes ni tampoco con el diagnóstico patológico en las muestras analizadas.

El síndrome de Lynch o HNPCC (cáncer colorrectal no poliposico hereditario) es una patología asociada a pacientes de edades jóvenes y cuya principal vía de formación es la de inestabilidad de microsatélites. El fenotipo de inestabilidad de microsatélites o RER+ se observó en dos de los pacientes cuya edad de diagnóstico fue menor a 45 años, dos de ellos uno de 40 años de edad y otro de 13 años de edad poseen antecedentes familiares en cáncer de vías digestivas; con uno de ellos en primer grado de consanguinidad cumpliendo con los criterios para asociarlo con el síndrome de Lynch.

8. RECOMENDACIONES

Aunque se logro corroborar el carácter monomórfico del microsatélite BAT-26 y la posibilidad de utilizarlo para identificar casos con inestabilidad de microsatélites, es indispensable realizar nuevas investigaciones de esta misma índole con el fin de aumentar el número de muestras analizadas y sacar conclusiones que puedan ser representativas para población santandereana.

El maltrato del tejido en el proceso de fijación y almacenamiento de las muestras dificulta los procesos de digestión y de extracción de ADN. Por ello se recomienda elaborar métodos que afecten menos las propiedades de los ácidos nucleicos, como la utilización de formalina bufferizada en los procesos de fijación de las muestras; o realizar recolecciones en solución salina en el momento de las tomas de las biopsias previas al diagnóstico por parte del departamento de patología; con el fin de utilizarlas únicamente para la recuperación de una buena cantidad de ADN que se puede almacenar y utilizar en posteriores investigaciones.

Aunque este es un análisis descriptivo y no pretendía inferir en el comportamiento de la población, es recomendable continuar con nuevas investigaciones con el fin de conocer mejor esta patología que en nuestro medio no se hace diagnosticar desde el punto de vista molecular sino simplemente según la historia clínica del paciente, sin embargo muchos de estos paciente no conocen su predisposición genética asociada con este síndrome.

La información errada suministrada por parte de los pacientes que acuden al servicio de oncología del HUS, impiden un seguimiento continuo de la evolución

de los mismos después del diagnóstico de cáncer y de la implementación del tratamiento, es indispensable hacer caer en cuenta a los pacientes de la importancia de conocer sus datos reales, para poder ubicarlos en el transcurso de su enfermedad y de ese modo evitar la pérdida de los mismos.

BIBLIOGRAFIA

AALTONEN L.A. *et al.* Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 260: 812-816. 1993

ALEXANDER J., *et al.* Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *American Journal of Pathology*. 158(2):527-535. 2001

ARZIMANOGLU I. *et al.* Microsatellite instability in human solid tumors. *Cancer*. 82(10): 1808-1820. 1988

BHATTACHARYYA N.P. *et al.* Mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91. 6319-6323. 1994

BOCKER T. *et al.* Microsatellite instability analysis: a multicenter study for reliability and quality control. *Cancer Research*. 57. 4739-4743. 1977

BODMER W., BISHOP T. & KARRAN P. Genetic steps in colorectal cancer. *Nature Genetics*. 6. 217-219. 1994

BRONNER C. *et al.* Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH 1 is associated with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*. 368: 258-261. 1994

BONIN S. *et al.* PCR Análisis in archival postmortem tisúes. *Journal of Clinical Pathology. Molecular Pathology*. 56:184-186 2003

CALDAS C. and PONDER B. Cancer genes and molecular oncology in the clinic. *Lancet*. 349(II). 16-18. 1997

CAMACHO D.E. *et al.* Incidencia del carcinoma gástrico en Cali. *Colombia Médica*. 26:146-149. 1995

CARNEIRO F. Classification of gastric carcinomas. *Current Diagnostic Pathology*. 4. 51-59. 1997

CASTILLO A., MORENO O. M., e INSUASTY J. Inestabilidad de Microsatélites en Cáncer Gástrico y Colorrectal. *Acta Medica Colombiana*.131-141. 2002

CHAI S. *et al.* Screening for defective DNA mismatch repair in stage ii and iii colorectal cancer patients. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2:1017-1025. 2004

CHAN, P *et al.* Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA. *J Clin Pathol*. 54:401-403.. 2001

CHANG E. *et al.* A prospective analysis of microsatellite instability as a molecular marker in colorectal cancer. *The American Journal of Surgery*. 191:646-651. 2006

COOMBS N., GAUGH., and PRIMROSE J. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Research*. 27(16). 1999

CUNNINGHAM J. *et al.* The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. *Am. J. Hum. Genet*. 69:780-790. 2001

DOS SANTOS N. *et al.* Microsatellite instability at multiple loci in gastric carcinoma:

clinicopathologic implications and prognosis. *Gastroenterology*. 110:38-44. 1996

DROCOLOLI N.C *et al.* CURRENT PROTOCOLS IN HUMAN GENETICS. *John Wiley Sons, Inc.* New York, 1994

ESHLEMAN J., AND MARKOWITZ D. Mismatch repair defects in human carcinogenesis. *Human Molecular Genetics*. 5: 1489-1494. 1996

FANG DC. *et al.* Infrequent loss of heterozygosity of APC/MCC and DCC genes in gastric cancer showing DNA microsatellite instability. *Journal of Clinical Pathology*. 52(7): 504-508. 1999

FISHEL R. Genomic instability, mutators, and the development of cancer: is there a role for p53? *Journal of the National Cancer Institute*. 88(2). 1608-1609. 1996

FLEISHER AS. *et al.* Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Research*. 59(5): 1090-1095. 1999

FROGGATT N.J. *et al.* A frequent hMSH2 mutation in hereditary non-polyposis colon cancer syndrome. *Lancet*. 345:727. 1995

GAY. M. *et al.* Recomendaciones para la recogida y envío de muestras con fines de identificación genética. Grupo Español y Portugués de la ISFG. Madeira. Pp 16. 2000

GONZÁLES-GARCÍA I. *et al.* Standardized approach for microsatellite instability detection in colorectal carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*. 92(7):544-549. 2000

GRYFE. R. *et al.* S. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine.* 342(2): 69-77. 2000

HALLING K.C. *et al.* Origin of microsatellite instability in gastric cancer. *American Journal of Pathology.* 155: 205-211. 1999

HAMAMOTO T. *et al.* Altered microsatellites in incomplete-type intestinal mataplasia adjacent to primary gastric cancers. *J Clin Pathol.* 50(10):841-846. 1997

HAYDEN J.D. *et al.* Assessment of microsatellite alterations in Young patients with gastric adenocarcinoma. *Cancer.* 79:684-687. 1997

HEINIMANN K *et al.* Influence of selection criteria on mutation detection in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer.* 85(12):2512-2518

HEMMINKI A. *et al.* Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology.* 119:921-928. 2000

KIM H.S. *et al.* Assessment of markers for the identification of microsatellite instability phenotype in gastric neoplasms. *Cancer Lett.* 164(1):61-68. 2001

HENDERSON B., ROSS R. and PIKE M. Toward the primary prevention of cancer. *Science.* 154: 1131-1137. 1991

HOANG J.M *et al.* BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancers Research.* 57:300-303. 1997

HUANG R-L. *et al.* Multiple epithelial and nonepithelial tumors in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: characterization of germline and somatic mutations of the *MSH2* gene and heterogeneity of replication error phenotypes. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 153:108-114. 2004

JÄGER A. *et al.* Reduced frequency of extracolonic cancers in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families with monoallelic hMLH1 expression. *Am. J. Hum. Genet.* 51. 129-138. 1997

JALOULI J. *et al.* High-Throughput DNA Extraction from old paraffin-embedded biopsies. *BioTechniques*. 27:334-338. 1999

JEMAL A. *et al.* Cancer Statistics. *CA A Cancer Journal for Clinicians*. 54:8-29. 2004

KAWAMURA A. *et al.* Correlation between microsatellite instability and metachronous disease recurrence after endoscopic mucosal resection in patients with early stage gastric carcinoma. *Cancer*. 91(2): 339-345. 2000

KELLER G. *et al.* Microsatellite instability in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. Relation to clinicopathological data and family history. *American journal of Pathology*. 147 (3):593-599. 1995

KELLER G. *et al.* Microsatellite instability and loss of heterozygosity in gastric carcinoma in comparison to family history. *American Journal of Pathology*. 152(5): 1281-1289. 1998

KIM HS. *et al.* Assessment of markers for the identification of microsatellite instability phenotype in gastric neoplasms. *Cancer Lett.* 164(1):61-68. 2001

KIM HS. *et al.* Microsatellite instability in the adenoma-carcinoma sequence of the stomach. *Lab Invest.* 80(1):57. 2000

LAMBERTI C. *et al.* Microsatellite instability-a useful diagnostic tool to select patients at high risk for hereditary non-polyposis colorectal cancer: a study in different groups of patients with colorectal cancer. *Gut.* 44. 839-843. 1999

LAUKOLA A. *et al.* Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Research.* 61: 4545-4549. 2001

LAUKOLA A., DE LA CHAPELLE A., and AOLTEN L. Strategies for screening for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet.* 36:819-822. 1999

LEUNG S. *et al.* hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Research.* 59: 159-164. 1999

LI L. *et al.* Chromosomal imbalances in the Colorectal Carcinomas with Microsatellite Instability. *American Journal of Pathology.* 163(8):1429-1436. 2003

LICHTENSTEIN P. *et al.* Environmental and heritable factors in the causation of cancer. *The New England Journal of Medicine.* 343(2):78-84. 2000

LIU EDISON T. Tumor-suppressor genes: changing concepts. *American Society of Clinical Oncology.* 49-52. 1999

LYNCH H. & DE LA CHAPELLE A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet.* 36:801-818. 1999

LYNCH H., Y KAUL K. Microsatellite instability, Clinical implications, and new

methodologies. *Journal Of National Cancer Institute*. 92(7): 511-512. 2000

LLEONART M. *et al.* Microsatellite instability and p53 mutations in sporadic right and left colon carcinoma. *Cancer*. 83(5). 889-895. 1998

MAO L. *et al.* Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 91: 9871-9875. 1994

MODRICH P. Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science*. 266. 1959-1960. 1994

MOSKALUK C. and KERN S. Microdissection and polymerase chain reaction amplification of genomic DNA from histological tissue sections. *American Journal of Pathology*. 150(5): 1547-1552. 1997

MORI Y. *et al.* The impact of microsatellite instability on molecular phenotype of colorectal tumors. *Cancer Research*. 63:4577-4582. 2003

MODRICH PAUL. Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science*. 266:1959-1960. 1994

MORIFUJI M. *et al.* Fluorescent-based BAT-26 analysis for distinct screening of microsatellite instability in colorectal cancers. *International Journal of Oncology*. 22: 807-813. 2003

MORIN P. *et al.* Activation of β -Catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -Catenin or APC. *Science*. 275. 1787-1790. 1977

MOXON E. and WILLS C. Microsatélites de ADN. *Investigación y Ciencia*. 68-74. Marzo de 1999

MUSULÉN E. *et al.* Standardized approach for microsatellite instability detection in gastric carcinomas. *Human Pathology*. 35(3):335-342. 2004

NARAYAN S. and ROY D. Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Molecular Cancer*. 2:41. 2003

NAROD S. Host susceptibility to cancer progression. *Am. J. Hum. Genet.* 63. 1-5. 1998

NICOLAIDES N. *et al.* Mutation of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*. 371. 75-80. 1994

ODA S. *et al.* Two modes of microsatellite instability in human cancer: differential connection of defective DNA mismatch repair to dinucleotide repeat instability. *Nucleic Acids research*. 33(5):1628-1636. 2005

PANDURO A., LIMA G. y VILLALOBOS J. Genética molecular del cáncer colorrectal y carcinogénesis. *Rev Invest Clin*. 45. 493-504. 1993

PARC Y. *et al.* hMSH6 Alterations in patients with microsatellite instability-low colorectal cancer. *Cancer Research*. 60:2225-2231. 2000

PARSONS R. *et al.* Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor β type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Research*. 55:5548-5550. 1995

PARSONS R. Molecular genetics and hereditary cancer. *Cancer*. 80(3). 533-536. 1997

PEINADO M.A. *et al.* Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 89:10065-10069. 1992

PERERA F. Environment and cancer: who are susceptible? *Science*. 278. 1068-1073. 1997

PERUCHO. M. Cáncer del fenotipo mutador de microsatélites. *Investigación y Ciencia*. 46-55. 1998

POETSCH M. *et al.* Evaluation of allelic alterations in short tandem repeats in different kinds of solid tumors – possible pitfalls in forensic casework. *Forensic Science International*. 145:1-6. 2004

POWELL S.M. *et al.* APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*. 359:235-237. 1992

Pyatt r *et al.* Polymorphic variation at the BAT-25 and BAT-26 loci in individuals of African origin. Implications for microsatellite instability testing. *American Journal of Pathology*. 155(2):349-353. 1999

RAMPINO N. *et al.* Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*. 275. 967-969. 1997

RICCIARDIELLO L. *et al.* Frequent loss of hMLH1 by promoter hypermethylation leads to microsatellite instability in adenomas polyps of patients with a single first-degree member affected by colon cancer. *Cancer Research*. 63:787-792. 2003

ROBBINS D., and ITZKOWITZ S. The molecular and genetics basis of colon cancer. *Med Clin N Am*. 86:1467-1495. 2002

ROBERT T. *et al.* Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 50:7-33. 2000

RODRIGUEZ-BIGAS M. *et al.* A national cancer institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *Journal of the National Cancer Institute.* 89(23). 1758-1762. 1997

SAMOWITZ W., and SLATTERY M. Transforming growth factor- β receptor type 2 mutations and microsatellite instability in sporadic colorectal adenomas and carcinomas. *American Journal of Pathology.* 151(1). 33-35. 1997

SAMOWITZ. W. *et al.* BAT-26 and BAT-40 instability in colorectal adenomas and carcinomas and germline polymorphisms. *American Journal of Pathology.* 154(6): 1637-1641. 1999

SCARTOZZI M. *et al.* Molecular biology of sporadic gastric cancer: prognostic indicators and novel therapeutic approaches. *Cancer Treatment Reviews.* 30:451-459. 2004

SENBA S. *et al.* Clinicopathologic and genetic features of nonfamilial colorectal carcinomas with DNA replication errors. *Cancer.* 82(2): 279-285. 1998

SEPULVEDA AR. *et al.* Marked differences in the frequency of microsatellite instability in gastric cancer from different countries. *American Journal of Gastroenterology.* 94(10). 3034-3038. 1999

SERUCA R. and SOBRINHO-SIMÕES M. Assessment of microsatellite alterations in young patients with gastric adenocarcinoma. *Cancer.* 80(7): 1358-1360. 1997

SHERR C. Cancer cell cycles. *Science.* 274. 1672-1677. 1996

SHI S-R. *et al.* DNA extraction from Archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the influence of pH. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 50(8): 1005-1011. 2002

SHI X. *et al.* Simultaneous analysis of microsatellite instability and loss of heterozygosity by capillary electrophoresis with a homemade kit. *Journal of Chromatography B*. 834:122-127. 2006

SHIBATA D., and MELTZER S. The impact of microsatellite instability on the molecular phenotype of colorectal tumors. *Cancer Research*. 63:4577-4582. 2003

SHIBATA D. *et al.* Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nature Genetics*. 6:273-280. 1994

SHEDLOCK A. *et al.* Enhanced DNA extraction of PCR amplification of mitochondrial genes from formalin-fixed museum specimens. *BioTechniques*. 22:394-400. 1997

SILVA F. *et al.* Tetra and pentanucleotide short tandem repeat instability in gastric cancer. *Electrophoresis*. 18. 1633-1636. 1997

SMYRK T.C. and LYNCH H.T. Microsatellite instability: impact on cancer progression in proximal and distal colorectal cancers. *European Journal of Cancer*. 35(2):171-172. 1999

SMYRK T. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer*. 15 (12):2417-2422. 2001

SOLOMON E., BORROW J. and GODDARD AD. Chromosome aberrations and cancer. *Science*, 254: 1153-1166.

STOJIC L., BRUN R. and JIRICNY J. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA repair* 3:1091-1101. 2004

TERDIMAN J. *et al.* Efficient detection of hereditary nonpoliposis colorectal cancer gene carriers by screening for tumor microsatellite instability before germline genetic testing. *Gastroenterology*. 120:21-30. 2001

TANG R. *et al.* Colorectal cancer without high microsatellite instability and cromosomal instability an alternative genetic pathway to human colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 25(5):841-846. 2004

TOGO G. *et al.* A transforming growth factor β type II receptor gene mutation common in sporadic cecum cancer with microsatellite instability. *Cancer Research*. 56. 5620-5623. 1996

TOUMA M. *et al.* Cáncer gástrico avanzado e incipiente en la población laboral. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 7(1):41-47.

VARGAS O., and GONZALES C. Amplificación por PCR de tejidos de archivo: efecto de los fijadores. *Salud UIS*. 36(2):56-64. 2004

Vasen HF, *et al.* Molecular genetic tests as a guide to surgical management of familial adenomatous polyposis. *Lancet* 348:433-435. 1996

WEINBERG. R. Así se produce el cáncer. *Investigación y Ciencia*: 10-18. 1996

WU CW. *et al.* A genome-wide study of microsatellite instability in advanced gastric carcinoma. *Cancer*. 92: 92-101. 2001

YOUNG L. *et al.* DNA mismatch repair proteins: potential guardians against genomic instability and tumorigenesis induced by ultraviolet photoproducts. *Journal of Investigative Dermatology*. 121(3):435-439. 2003

ZHANG L. *et al.* Short mononucleotidic repeat sequence variability in mismatch repair-deficient cancers. *Cancer Research*. 61:3801-3805. 2001

ANEXOS

ANEXO A.

INFORMACIÓN PARA PACIENTES PARTICIPANTES EN EL PROYECTO

INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN CÁNCERES DE VÍAS DIGESTIVAS GÁSTRICO COLORRECTAL DE LA POBLACIÓN SANTANDEREANA

Estimado(a) Paciente:

Los investigadores del proyecto investigación **ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN CÁNCER GÁSTRICO Y COLORRECTAL** realizado por miembros del Grupo de Genética de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander y de la Unidad de Oncología del Hospital Universitario Ramón González Valencia, nos permitimos solicitarle su participación en esta investigación, la cual pretende analizar algunos marcadores genéticos asociado con el desarrollo de tumores de vías digestivas. Estos marcadores genéticos llamados STR's son secuencias de ADN de tamaño pequeño que están repetidas una tras otra. El número de repeticiones permite establecer un patrón característico para cada persona. Debido a que estos marcadores son heredados todas las células de una persona presentan el mismo patrón durante toda su vida.

Cuando una persona desarrolla un cáncer sus células modifican su material genético y como consecuencia de esto pueden surgir patrones de STR's diferentes al original. Esta situación se denomina inestabilidad de microsatélites y se ha observado en diferentes tipos de cáncer como: cáncer gástrico, de colon, de vesícula, de endometrio, etc.

La presencia o no de inestabilidad de microsatélites en el tumor se ha asociado con un mejor o peor pronóstico de la evolución del tumor, respuesta al tratamiento y una disminución en la posibilidad de metástasis y recidivas.

Su participación en la investigación consistirá en autorizar la toma de una muestra de 10 ml de sangre. Este procedimiento tendrá un riesgo mínimo y la molestia que puede presentar es un dolor leve en el sitio de sangrado. Es necesaria también su autorización para utilizar fragmentos sobrantes de la biopsia usada en el análisis patológico.

En este momento esta investigación no traerá ningún beneficio personal directo para Usted, pero sirve para conocer la frecuencia con que se presenta la inestabilidad de microsatélites en los cánceres de nuestra población así como para establecer su asociación con factores como: pronóstico, respuesta al tratamiento, aparición de recidiva, etc. Y por lo tanto beneficiaria a personas que desarrollen en un futuro estos tipos de cánceres.

Su participación en esta investigación es completamente voluntaria y no tiene ningún costo para Usted. De la misma manera la información sobre los resultados del estudio es completamente confidencial y Usted tiene derecho a conocerlos cuando lo desee, así como a solicitar que los resultados no sean concluidos en las conclusiones del trabajo si así lo desea.

Agradecemos de antemano su colaboración.

GRUPO DE ONCOGENÉTICA

Unidad de Oncología HURGV – laboratorio de genética UIS

ANEXO B

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

“ANÁLISIS DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN CÁNCER GÁSTRICO Y DE COLON EN LA POBLACIÓN SANTANDEREANA”

NOMBRE _____

FECHA _____

Por medio del presente documento hago constar que el personal científico de la investigación **“ANÁLISIS DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN CÁNCER GÁSTRICO Y DE COLON EN LA POBLACIÓN SANTANDEREANA”** me ha informado claramente en que consiste el proyecto.

Me queda claro que para mi participación en el proyecto se utilizará los fragmentos sobrantes de la biopsia tomada para el estudio patológico, así como una muestra de sangre venosa que se me tomará. Soy conciente de las condiciones en que se me toma esta muestra y de los riesgos mínimos que implica, así como, que no interfiere con ningún tratamiento que esté recibiendo en este momento. Así mismo, es claro para mí que los investigadores no tienen ninguna responsabilidad en la evolución de la enfermedad.

FIRMA _____

C.C. No. _____

TESTIGO _____

C.C. No. _____

DIRECCIÓN _____

TESTIGO _____

C.C. No. _____

DIRECCIÓN _____