

**FENOTIPO HISTOPATOLÓGICO DE LA ALTA INESTABILIDAD DE  
MICROSATÉLITES EN EL CÁNCER COLORRECTAL UTILIZANDO EL  
MARCADOR BAT26 EN EL SERVICIO DE PATOLOGÍA DEL HOSPITAL  
UNIVERSITARIO RAMÓN GONZÁLEZ VALENCIA DE BUCARAMANGA**

**ETTY PAOLA CORTÉS RAMÍREZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE SALUD  
ESCUELA DE MEDICINA  
POSTGRADO PATOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2006**

**FENOTIPO HISTOPATOLÓGICO DE LA ALTA INESTABILIDAD DE  
MICROSATÉLITES EN EL CÁNCER COLORRECTAL UTILIZANDO EL  
MARCADOR BAT26 EN EL SERVICIO DE PATOLOGÍA DEL HOSPITAL  
UNIVERSITARIO RAMÓN GONZÁLEZ VALENCIA DE BUCARAMANGA**

**ETTY PAOLA CORTÉS RAMÍREZ**

Trabajo de grado presentado como requisito para  
optar el título de Especialista en Patología

**Directores**

**Dra. OLGA MERCEDES ÁLVAREZ OJEDA**  
PROFESOR ASOCIADO DE PATOLOGÍA

**Dra. CLARA INÉS VARGAS CASTELLANOS**  
MÉDICA GENETISTA

**ESCUELA DE MEDICINA  
POSTGRADO PATOLOGÍA  
FACULTAD DE SALUD  
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
BUCARAMANGA  
2006**

*A mis padres y hermanos,  
y a Daniel Felipe*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Departamento de Patología de la Universidad Industrial de Santander y en general a todo el personal

Al Laboratorio de Genética de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander

A la Unidad de Oncología del Hospital Universitario de Santander

A la médica cirujana Laura Isabel Valencia por su colaboración en el desarrollo de este trabajo

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN	16
1. JUSTIFICACIÓN	17
2. MARCO TEÓRICO	19
2.1. GENERALIDADES DEL CRC EN COLOMBIA	19
2.2. GENÉTICA DEL CÁNCER	19
2.2.1 Susceptibilidad al cáncer	19
2.3. INESTABILIDAD GENÓMICA	20
2.3.1 Tipos de inestabilidad genómica	21
2.4 REPARACIÓN DEL ADN HUMANO	21
2.4.1 Mecanismos de reparación del ADN	22
2.5. SISTEMA DE REPARACIÓN DE MAL APAREAMIENTO EN EL CRC	25
2.5.1 Hmsh2, hmsh6 y hmsh3	25
2.5.2 hMLH1, hPMS1, hPMS2 y hMLH3	25
2.6 DEFECTOS DEL SISTEMA DE MAL APAREAMIENTO EN LA	

CARCINOGENESIS HUMANA	26
2.7 CRC Y LA IMS	27
2.7.1 Inestabilidad de microsatélites	27
2.8 HISTOPATOLOGÍA DEL CRC CON IMS	29
2.8.1 Tipo histológico	29
2.8.2 Grado histológico	30
2.8.3 Infiltrado inflamatorio linfocitario intraepitelial	30
2.9 EVALUACIÓN DE LA IMS EN EL CRC Y SU CLASIFICACIÓN	31
2.9.1 Utilización de la IHQ en el CRC con IMS	31
2.9.2 IMS y pronóstico del CRC	32
2.10 TRATAMIENTO QUIRÚRGICO EN PACIENTES CON CCNPH	32
2.11 VIGILANCIA Y SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON CCNPH	33
2.12 ANÁLISIS DEL BAT26	33
3. OBJETIVOS	34
3.1. OBJETIVO GENERAL	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34

4. DISEÑO METODOLÓGICO	35
4.1. TIPO DE ESTUDIO	35
4.2. POBLACIÓN	35
4.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	35
4.4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	35
4.5. METODOLOGÍA	35
4.5.1 EVALUACIÓN DE LA HISTOPATOLOGÍA	35
4.6 VARIABLES DEL ESTUDIO	36
4.7 PROCEDIMIENTO	36
4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
4.9. CONSIDERACIONES ÉTICAS	37
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
6. RECOMENDACIONES	47
7. CONCLUSIONES	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

ANEXOS	55
GRÁFICOS	61

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
TABLA No 1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LOS CCR	42
TABLA No 2. FORMA DEL TUMOR	42
TABLA No 3. TAMAÑO DEL TUMOR	43
TABLA No 4. TIPO HISTOLÓGICO DEL TUMOR	43
TABLA No 5. GRADO HISTOLÓGICO DEL TUMOR	44
TABLA No 6. EXTENSIÓN DEL TUMOR	45
TABLA No 7. CORRELACIÓN DEL FENOTIPO DE IMS-A Y BAT26	46
TABLA No 8. CORRELACIÓN INTEROBSERVADORES	46

## LISTAS DE GRÁFICOS

	<b>Pág.</b>
GRÁFICO No 1. CAPACIDADES DE LA CÉLULA MUTADA	61
GRÁFICO No 2. DISTRIBUCIÓN POR GÉNERO DE LA POBLACIÓN DE CCR	38
GRÁFICO No 3. DISTRIBUCIÓN SEGÚN SITIO DEL TUMOR	40
GRÁFICO No 4. MACROSCOPIA DE LOS CCR	40
GRÁFICO No 5. TAMAÑO DEL TUMOR	41
GRÁFICO No 6. TIPO DE MUESTRA	62
GRÁFICO No 7. TIPO DE RESECCIÓN	62
GRÁFICO No 8. DISTRIBUCIÓN DEL CCR CON PRESENCIA DE IMS-A	63
GRÁFICO No 9. CCR NEGATIVOS PARA IMS-A	63
GRÁFICO No 10. COSTOS DEL CRC	64

## **LISTA DE ANEXOS**

	<b>Pág.</b>
ANEXO a. INFORMACIÓN PARA PACIENTES PARTICIPANTES EN EL PROYECTO	55
ANEXO b. HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	56
ANEXO c. INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS	57

## GLOSARIO

**ADN:** es una molécula grande que transmite la información genética compuesta por dos hebras complementarias que se disponen geográficamente como una hélice doble.

**GEN:** es un segmento del ADN (ubicado en el cromosoma en un espacio físico llamado locus) que contiene la información para codificar una proteína.

**EPIGENÉTICA:** es el estudio de cambios en la expresión de genes sin que se produzcan modificaciones del gen.

**MUTACIÓN DE PÉRDIDA DE FUNCIÓN:** es una mutación que resulta en la pérdida de la función o producción de una proteína. Para que se origine una pérdida total de la función de un gen se necesita que se presente homocigocidad en los alelos.

**HETEROCIGOCIDAD:** presencia de dos alelos diferentes en el mismo locus en un organismo diploide uno de origen materno y el otro de origen paterno.

**LÍNEA GERMINAL:** información genética transmitida de una generación a otra a través de los gametos. Una mutación de la línea germinal se presenta en todas las células de la descendencia originadas de ese gameto.

**INESTABILIDAD GENÓMICA:** hace referencia a una tasa de mutación espontánea elevada en las células. En la actualidad la inestabilidad genómica es una característica importante de los procesos de cáncer y envejecimiento.

## RESUMEN

**TÍTULO\*: FENOTIPO HISTOPATOLÓGICO DE LA ALTA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN EL CÁNCER COLORRECTAL UTILIZANDO EL MARCADOR BAT26 EN EL SEVICIO DE PATOLOGÍA DEL HOSPITAL RAMÓN GONZÁLEZ VALENCIA DE BUCARAMANGA**

AUTOR: ETTY PAOLA CORTÉS RAMÍREZ\*\*

PALABRAS CLAVES: Inestabilidad de microsatélites, cáncer colorrectal, BAT26, histopatología

RESUMEN: La identificación de los carcinomas colorrectales (CCR) con alta inestabilidad de microsatélites (IMS-A) es importante porque sugiere un mejor pronóstico y tratamientos asociados a la IMS. El papel de la histopatología en la identificación de CCR con IMS-A es importante para algunos autores así como es debatido por otros.

La IMS se presenta en el 90% de los CCR asociados al síndrome de Lynch y en un 15% de los CCR esporádicos. Los CCR originados por la vía de la IMS tienen un fenotipo característico.

OBJETIVO: Este estudio evaluó las características histopatológicas de los CCR con sospecha de IMS-A correlacionados con el marcador BAT26 MÉTODOS: Este estudio descriptivo recolectó pacientes remitidos de la unidad de oncología del hospital Universitario Ramón González Valencia de Bucaramanga quienes tenían un diagnóstico de CCR. Las historias clínicas de los pacientes se estudiaron para obtener datos sobre el marcador BAT26 y datos clínicos del CRC.

RESULTADOS: Las características histopatológicas de los 23 CCR que se relacionaron con IMS-A fueron la localización derecha, forma del tumor, tipo y grado de diferenciación del CCR. De los 23 CCR evaluados 9 de ellos por sugirieron por histopatología tener alta inestabilidad de microsatélites; dos de estos nueve CCR tuvieron correlación con un BAT26 inestable.

CONCLUSIONES: El fenotipo histopatológico de los CCR con IMS-A debe ser útil como una herramienta de tamizaje para una posterior evaluación complementaria con técnicas de inmunohistoquímica y un análisis molecular completo para un diagnóstico definitivo de CCR con IMS para decisiones terapéuticas.<sup>1</sup>

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Salud

Programa de Patología

Directores: Olga Mercedes Álvarez, Clara Inés Vargas

## ABSTRACT

TITLE\*: HISTOPATHOLOGICAL IDENTIFICATION OF COLORECTAL CANCER WITH HIGH-DEGREE MICROSATELLITE INSTABILITY USING BAT26 MARKER IN THE DEPARTMENT OF PATHOLOGY OF THE HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMÓN GONZÁLEZ VALENCIA IN BUCARAMANGA

AUTHOR: Ety Paola Cortés Ramírez\*\*

KEY WORDS: Microsatellite instability, colorectal cancer, BAT26, histopathology

ABSTRACT: Identification of colorectal carcinomas with high levels of DNA microsatellite instability (MSI-H) is important because of the suggested prognostic and therapeutic significance associated with MSI. The role of histopathology in identifying MSI-H colorectal carcinomas has been suggested by some studies but not confirmed by others.

Microsatellite instability occurs in 90% of colorectal cancer (CRC) from HNPCC patients and 15% of sporadic CRC. Patients with CRC and MSI have distinct phenotype. OBJECTIVE: To evaluate the isolated clinicopathological features of the CRC with high-degree microsatellite instability correlated to BAT26. METHODS: This descriptive study collected patients from 1999 to 2004, submitted to CRC diagnosis in the unit of oncology of the Hospital Universitario Ramón González Valencia of Bucaramanga. Medical records were studied in order to determine clinical data and BAT26 analysis was carried out.

RESULTS: The histological features associated to MSI-H CRC were location, shape, type and differentiation of the tumour. Of 23 CRC evaluated nine were positive phenotype of MSI-H and two of these cases were BAT26 instable.

CONCLUSIONS: The histopathological identification of CRC with MSI should be considered a useful screening method to select CRC patients for MSI-H, requiring molecular analysis and immunohistochemistry study to complete the diagnosis of MSI-H for therapeutic decisions.

2

---

\* Degree Work

\*\* Faculty of Health

Program of Pathology

Directors: Olga Mercedes Alvarez, Clara Ines Vargas

## INTRODUCCIÓN

Desde hace una década hay una revolución en el campo de la biología molecular que contribuye con un conocimiento más concreto en la carcinogénesis de muchas neoplasias, incluyendo el cáncer colorrectal (CCR); estos nuevos avances son aplicados en el entendimiento del CCR para reconocer los cambios histopatológicos iniciales de la mucosa colorrectal que posteriormente llevan a una neoplasia maligna con características macroscópicas y microscópicas propias dependiendo de cual fue la vía genómica afectada (11, 16, 17, 21, 22).

El CCR es la cuarta causa de muerte por cáncer en Colombia (55) y la segunda en los países industrializados, por lo tanto es necesario conocer su patogénesis molecular y el fenotipo histopatológico de manera que se generen métodos que lleven a una detección más temprana del cáncer, y a tratamientos quirúrgico y farmacológico dirigidos a este tipo de lesión, repercutiendo de esta forma en el campo de la salud pública. El pronóstico del CCR está estrechamente relacionado con el estado molecular y el estadio de la enfermedad al momento del diagnóstico (1, 11, 13, 18).

La inestabilidad genómica está involucrada en el desarrollo de tumores y es una herramienta clave en el CCR para reconocer la predisposición, iniciación y progresión de éste (1). La carcinogénesis colorrectal es consecuencia de acumulaciones sucesivas de mutaciones en los genes que controlan el crecimiento celular epitelial y su diferenciación. Los estudios de inestabilidad genómica en las células tumorales del CCR sugieren que existen dos tipos de inestabilidad generados a partir de dos vías diferentes: la inestabilidad cromosómica (INC) la vía más común y la inestabilidad de microsatélites (IMS) (2), cada una con una presentación esporádica y heredada del CCR.

El impacto social que tienen las consecuencias fenotípicas asociadas a las mutaciones del CCR esporádico o heredado actúa como uno de los principales motores impulsores del estudio de los mecanismos y factores implicados en la estabilidad del genoma para poder establecer la contribución relativa de los mismos y adoptar medidas preventivas.

## 1. JUSTIFICACIÓN

Los CCR que se generan por la vía de la inestabilidad de microsatélites se han asociado a un mejor pronóstico y sobrevida comparados con los CCR derivados de la vía de la inestabilidad cromosómica. Por lo tanto es muy importante identificar estos CCR con la histopatología como lo indican algunos estudios (15, 17, 21, 22, 29). Los dos tipos de CCR de la vía de inestabilidad de microsatélites son el cáncer colorrectal no polipósico heredado (CCNPH o síndrome de Lynch I) y el CCR esporádico cuya histopatología es similar en ambos casos, sugerencia que ha sido debatida por estudios más recientes (17).

En los pacientes con diagnóstico de CCR es meritorio que la histopatología sea una prueba de tamizaje para discriminar si el CCR observado es consecuencia de una inestabilidad cromosómica o de una inestabilidad de microsatélites. En este caso el estudio histopatológico es una fase inicial del estudio en este grupo de pacientes que posteriormente se debe complementar con estudios de inmunohistoquímica y análisis moleculares para hacer el diagnóstico definitivo de CCR con alta inestabilidad de microsatélites.

El método actual de lectura de histopatología del CCR en el Departamento de Patología de la Universidad Industrial de Santander (UIS), no incluye una división entre las características histopatológicas correspondientes a cada una de las vías genómicas involucradas en el desarrollo de un CCR. El método de lectura diagnóstica se basa únicamente en reconocer la presencia de CCR y clasificarlo según recomendación de la Organización Mundial de la Salud para lesiones tumorales del colon (22).

El propósito de este estudio en su primera fase es evaluar por medio de la histopatología los CCR, identificando las características macroscópicas y microscópicas propias del CCR con IMS-A (sin tener en cuenta los CCR esporádicos o CCNPH).

Por último, en el ámbito local no existe algún estudio relacionado con las características histopatológicas de los CCR con alta IMS, pese al gran impacto que tiene en la práctica médica, para un posterior manejo quirúrgico y quimioterapéutico del paciente y un manejo preventivo a sus familiares de primera línea de consanguinidad.

El presente estudio pretende realizar un acercamiento histopatológico más preciso en las muestras quirúrgicas de CCR (biopsias y resecciones intestinales) que llegaron al Departamento de Patología de la UIS-HURGV (actualmente el Departamento de Patología de la UIS-HUS) en el periodo comprendido desde enero de 1999 y diciembre de 2004 analizando las variables histológicas relacionadas con la vía de inestabilidad de microsatélites.

A pesar de lo antes mencionado el sistema de salud colombiano no posee un programa organizado de detección para el CCR y estudios como la colonoscopia no son exámenes de rutina, por lo tanto se necesita más investigación en esta área para dar una respuesta al cambio drástico en la incidencia por este tipo de cáncer, mortalidad y tasas de sobrevivencia, así como también estudios específicos para incluir servicios de salud relacionados al cáncer en el sistema de salud colombiano (66).

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 GENERALIDADES DEL CCR EN COLOMBIA

Según Piñeros *et al.* (66) en Colombia así como en otros países latinoamericanos hay una gran transición social y demográfica debido a la urbanización de las zonas rurales que llevan a una modificación del estilo de vida. Esto se ve reflejado en el cambio de la tasas de mortalidad por cáncer según la región geográfica. En Colombia la mortalidad por cáncer tuvo una variación con respecto a la incidencia, ocupando el octavo puesto en 1964 y el tercer puesto en 1996; con respecto al CCR la mortalidad por éste se incrementó, ocupando hoy el quinto puesto de las causas de muerte por cáncer en nuestro país, con una relación de hombre / mujer de 0.8. Aunque en Colombia como en el resto de Latinoamérica el CCR tiene un riesgo relativo bajo, según el registro de Cali la incidencia de CCR en Colombia se triplicó en los últimos 50 años (66).

En la actualidad en Colombia el cáncer en general es un problema de salud pública por lo tanto es imperativo tener estrategias de control del cáncer incluyendo programas de vigilancia, prevención, educación y métodos de investigación en cáncer para prevenir muertes innecesarias entre hombres y mujeres colombianos productivos de las generaciones actual y futura (66).

### 2.2 GENÉTICA DEL CÁNCER

El cáncer es esencialmente una enfermedad genética y literalmente un proceso donde se presenta un nuevo crecimiento anormal en forma de masa con características propias como nutrición, evasión de los mecanismos de muerte y la capacidad de proliferación en respuesta a numerosos factores de crecimiento. Según Boveri en 1914 el cáncer se producía por una mala segregación de los cromosomas generando un estado de aneuploidia. Según Nowell desde 1966 con las nuevas técnicas moleculares y de citogenética se demostró que el cáncer es una expansión clonal a partir de una célula alterada dando como resultado cambios epigenéticos y genéticos somáticos secuenciales que por un método de selección generan subpoblaciones agresivas dentro de este clon expansivo.

#### 2.2.1 SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER.

Varios tipos de genes son susceptibles al cáncer, los cuales difieren de un tumor a otro, y tienen en común una pérdida o alteración de su función.

La tumorigénesis y la metástasis tumoral requieren de numerosas mutaciones genéticas; una célula adquiere mutaciones y pérdidas en el control del ciclo celular, la diferenciación y en la apoptosis haciéndola diferente a las otras células normales.

Hanahan *et al.* (69) proponen que las capacidades adquiridas en las células afectadas por mutaciones en los genes involucrados en el cáncer son autosuficiencia en señales de crecimiento, evasión de la apoptosis, ser refractarios a señales que controlan el crecimiento celular, invasión tisular local y metástasis, angiogénesis permanente y potencial de replicación ilimitado (Gráfico 1)

Para Kinzler, Vogelstein (70) y Michor (71), los genes involucrados de forma directa o indirecta en la formación del cáncer se pueden clasificar en tres grupos: gatekeepers, landscapers y los caretakers.

- Gatekeepers. En este grupo se incluyen los oncogenes y los genes supresores de tumor. Según Vogelstein *et al.* (70), las mutaciones en ambos subgrupos se comportan fisiológicamente similar y conducen a un proceso neoplásico debido al incremento celular tumoral por inhibición de la muerte celular o del arresto del ciclo celular. Estas mutaciones están ampliamente implicadas en la formación tumoral. Ejemplos de este grupo son los oncogenes b-catenina, KRAS, MYC y los genes supresores de tumor APC y p53.

- Landscapers. Para Iwasa *et al.* (72) estos genes modifican el microambiente de las células, así cualquier mutación en ellos no afecta directamente el crecimiento celular, sino genera un microambiente anormal del estroma de un tejido favoreciendo el cáncer. Ejemplos de estos genes son los genes de las metaloproteinasas, el activador del uroplasminógeno, el activador del plasminógeno tisular y el factor de crecimiento de fibroblastos-2

- Caretakers. Estos genes están encargados de la estabilidad del genoma y regulan los mecanismos de reparación del ADN. Los defectos en estos genes llevan a una inestabilidad genómica que contribuyen a la acumulación de mutaciones en otros genes tales como oncogenes y genes supresores de tumor, promoviendo de forma indirecta de la tumorigénesis (72).

Ejemplos: Genes de los sistemas de reparación del ADN, genes de la segregación de los cromosomas y los genes que intervienen en el ciclo celular.

### 2.3 INESTABILIDAD GENÓMICA

La inestabilidad genómica está asociada a una alta tasa de mutaciones en el genoma de las células, lo que indica que se rompió el equilibrio entre el daño espontáneo y la capacidad de reparación del mismo por la célula, debido a la saturación de los sistemas de reparación (producida por una alta tasa de daños en el ADN) o a factores genéticos (alteraciones en genes descritos anteriormente, implicados en la estabilidad genómica que garantizan la fidelidad de la síntesis del ADN y/o su adecuada reparación).

### 2.3.1 TIPOS DE INESTABILIDAD GENÓMICA

La inestabilidad genómica en las células tumorales muestra que existen dos tipos de vías que son excluyentes y se caracterizan por presentar inestabilidad a nivel cromosómico (aneuploidias, traslocaciones, deleciones, inversiones, duplicaciones) o a nivel del ADN (mutaciones puntuales, alteración de secuencias de microsatélites).

- Inestabilidad Cromosómica. La inestabilidad cromosómica (INC) se afecta genes involucrados en la segregación de los cromosomas durante la mitosis como lo son los genes supresores de tumor APC y p53, produciendo aneuploidias y aberraciones cromosómicas que caracterizan la mayoría de los tumores.

- Inestabilidad de Microsatélites. La inestabilidad de microsatélites se origina cuando las mutaciones afectan la longitud de los microsatélites. Este tipo de inestabilidad genómica se discute más adelante.

### 2.4 REPARACIÓN DEL ADN HUMANO

Esta función es clave para la conservación de la información genética de los organismos. Los mecanismos genéticos básicos implicados en la transferencia fiel de la información genética de un organismo a otro son la replicación y reparación del ADN, transcripción a ARN y síntesis proteica.

La reparación del ADN es un proceso que mantiene su integridad, es decir de esto depende la sobrevivencia de las especies y el mantenimiento de la información genética. Las mutaciones se pueden presentar de dos formas según su origen: de forma germinal, es decir que se afectan genes presentes en las células reproductivas; y de forma somática que afectan el resto de células de un organismo multicelular. Con respecto a las mutaciones de línea germinal son las que se transmiten de una generación a otra y tienen un efecto

sobre la especie afectada. Por lo contrario con las mutaciones somáticas el individuo afectado por este tipo de mutaciones, es el único que padece la enfermedad. Las mutaciones somáticas producen el mayor porcentaje de enfermedades en el humano como el cáncer (de forma esporádica) (69).

Normalmente en la replicación del ADN se presentan mutaciones originadas por una incorporación errónea de un nucleótido por la ADN polimerasa ocasionando un error de apareamiento. Estos errores de replicación se corrigen por un sistema de reparación llamado sistema de errores de apareamiento. Cuando la ADN polimerasa incorpora erróneamente un nucleótido, este error debe ser corregido por el sistema para garantizar la fidelidad de la replicación del ADN. Si por algún motivo este error no se corrige la tasa de mutaciones espontáneas se aumenta y progresivamente se lleva a una mutación que afecta el gen implicado por la mutación.

Generalmente el error de apareamiento produce una distorsión geométrica de la doble hélice del ADN siendo reconocida por las proteínas del sistema de reparación que cortan el nucleótido erróneo e incorporan el nucleótido correcto el cual es complementario al nucleótido ubicado en la hebra plantilla.

Hay una variedad de mecanismos de reparación del ADN en la célula dependiendo de qué tipo de daño está presente, pero todos tienen en común tres pasos fundamentales que son la excisión, resíntesis y ligadura.

#### 2.4.1 MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN

Según Iwasa *et al.* (72) las células tienen la propiedad de frenar su ciclo celular para reparar el ADN y mantener de esta forma la información genética fidedigna y la tasa de errores espontáneos baja. Sin embargo cuando la tasa de errores espontáneos es muy alta los sistemas de reparación se saturan y la célula afectada no es capaz de reparar estos daños y entonces activa mecanismos de autodestrucción como lo es la apoptosis (como una manera de destruir las células con mutaciones que pueden ser letales para la sobrevivencia de la especie).

Las células tienen cinco mecanismos de reparación del ADN de acuerdo al tamaño de la mutación, los cuales son:

- Reparación Directa. Son sistemas que eliminan directamente el daño del UV en el DNA, como es el caso de los dímeros de timina. La luz visible activa la fotoliasa que rompe los dímeros de timina.

Otro ejemplo son las alquiltransferasas y su actividad consiste en eliminar los grupos alquilo, también se repara la despurinización gracias a las glicosidasas del ADN.

- Dependiente de Replicación.** Todas las células contienen endonucleasas que atacan los sitios que quedan tras la pérdida espontánea de residuos de purina o pirimidina. Por comodidad, los sitios sin purina o sin pirimidina se denominan sitios AP. Las endonucleasas AP son vitales para la célula porque, como se apuntó con anterioridad, la despurinización espontánea es un hecho relativamente frecuente. Estas enzimas introducen hendiduras en la cadena mediante la rotura de enlaces fosfodiésteres en los sitios AP. Esto promueve un proceso de reparación por escisión mediado por otras tres enzimas: una exonucleasa, la polimerasa de DNA I y la ligasa de DNA.

- Excisión.** Esta vía de reparación está determinada por tres genes denominados *uvrA*, *uvrB* y *uvrC*. Este sistema reconoce cualquier lesión que cree una distorsión importante en la doble hélice de DNA. Una endonucleasa denominada nucleasa *uvrABC* realiza una incisión alejada varios pares de bases a cualquier lado de la base dañada, eliminándose a continuación un fragmente de DNA de cadena sencilla. El pequeño hueco se rellena entonces mediante síntesis de reparación y queda sellado por la ligasa de DNA.

- Sistema GO.** Dos glucosilasas actúan conjuntamente para eliminar las mutaciones causadas por las lesiones que produce en el DNA el 8-oxodG. Las glucosilasas junto al producto del gen *mutT* forman el sistema GO.

Cuando se originan lesiones GO en el DNA, por daño oxidativo espontáneo, una glucosilasa codificada en el gen *mutM* elimina la lesión. Aún así persisten algunas lesiones GO que emparejan erróneamente con adenina. Una segunda glucosilasa producto del gen *mutY* elimina la adenina de este emparejamiento erróneo específico, llevando al restablecimiento de la citosina correcta por síntesis de reparación.

- Sistema SOS.** En *E. coli* depende de los genes *recA*, *umuC* y *umuD*. Cuando se encuentra un tramo sin cifrar actúa el sistema SOS. Se activa la proteína *recA* que induce la presencia de las proteínas *SulA* y *SulB* que interaccionan con la DNA pol III. Ésta hace que pierda afinidad y prosiga la síntesis de ADN y dejando el hueco y sin que la célula muera.

- Reparación Postreplicativa.** Algunas vías de reparación reconocen errores incluso después de que haya tenido lugar la replicación. Uno de estos sistemas, denominado sistema de reparación de emparejamientos erróneos.

Para averiguar cual de las dos bases es la errónea debe diferenciarse entre la cadena progenitora y la cadena hija. Lo diferencia porque la enzima metiladora metilasa de la adenina tarda varios minutos en metilar la cadena hija. Las proteínas *mut S* y *mut L* interaccionan con el sitio mal emparejado y una proteína *mutH* rompe la cadena recién sintetizada. Alrededor del emparejamiento erróneo, las cadenas de DNA se separan con ayuda de una

proteína denominada MutU y se estabilizan con SSB. Y las polimerasas copian el segmento de DNA

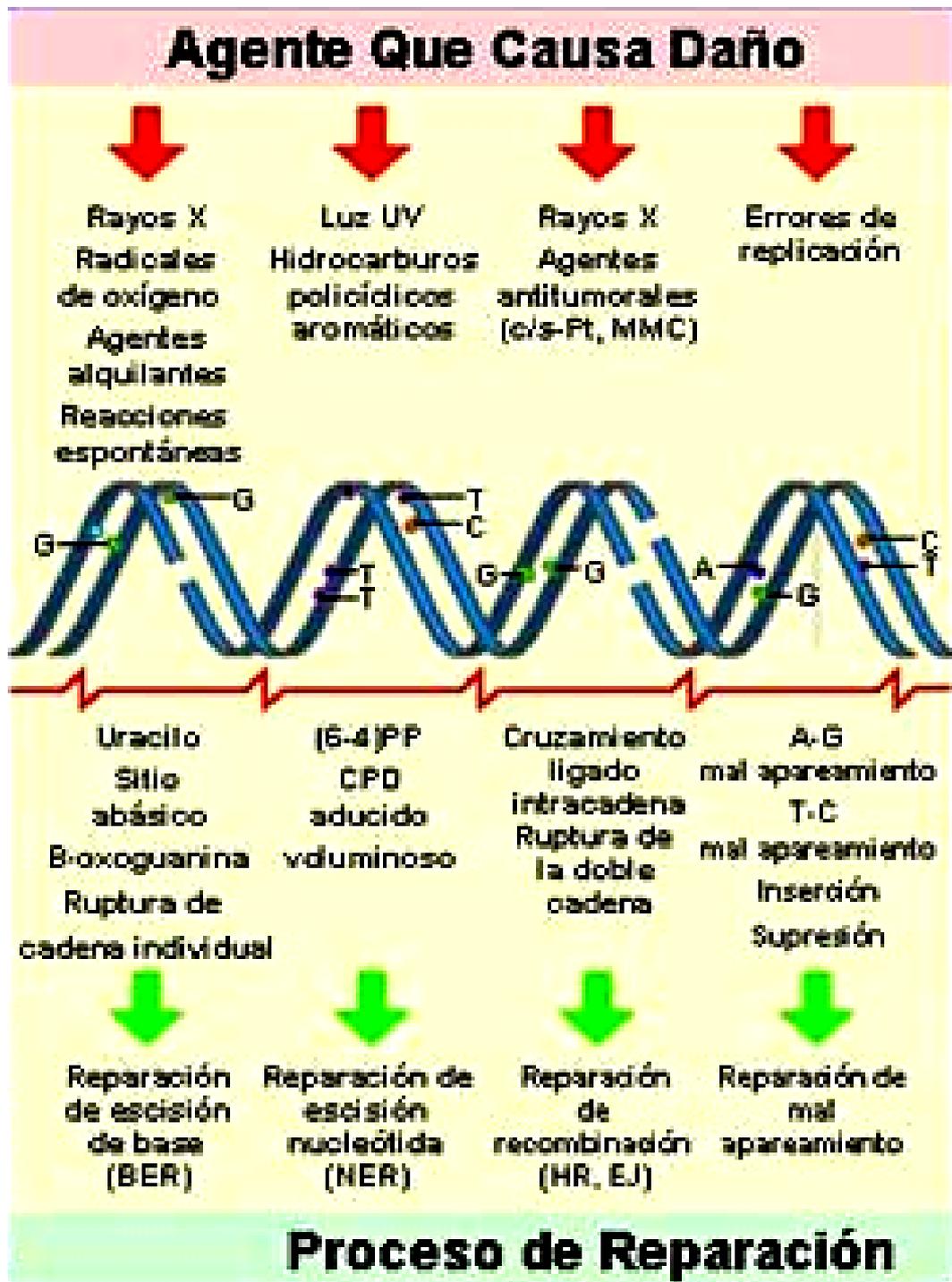


Figura 1. Esquema de Reparación de ADN. Tomado de NCI

## 2.5 SISTEMA DE REPARACIÓN DE MAL APAREAMIENTO EN EL CRC

El sistema de reparo de error de apareamiento del ADN es necesario para mantener la estabilidad genómica. En pocas palabras las funciones de este sistema incluyen: la corrección de errores biosintéticos, vigilancia del ADN con mutaciones y la prevención de recombinación entre secuencias no idénticas. Una deficiencia en este sistema produce defectos heredados originando cánceres heredados como el CCNPH. Por aparte los defectos adquiridos del mismo sistema pueden contar para el 15% al 25% o incluso un porcentaje mayor de cánceres esporádicos en diferentes órganos del "espectro del CCNPH", incluyendo el colon, recto, endometrio, estómago y ovarios.

Este sistema de reparación se ha estudiado extensamente en células procariotas, especialmente en *E. coli*. Los nucleótidos mal incorporados durante la replicación del ADN que escapan a la actividad de prueba de lectura de la ADN polimerasa, pueden ser reconocidos por medio de la proteína MutS. La unión de la MutS al sitio de mal apareamiento lleva al reclutamiento de otras proteínas incluyendo la MutL y la MutH, generando una serie de reacciones enzimáticas resultando en la remoción de los nucleótidos mal incorporados.

El sistema de reparación de mal apareamiento es más complicado en los humanos. La homología en las enzimas MutS y MutL se han identificado y clonado en el humano. Tres importantes homólogos de la MutS son las proteínas hMSH2, hMSH6 y hMSH3 (45, 52, 56).

### 2.5.1 hMSH2, hMSH6 y hMSH3:

El gen hMSH2 localizado en 2p16 tiene un producto proteico que forma un heterodímero con la proteína hMSH3 (14q24.3) o con la hMSH6 (2p16), formando dos complejos proteicos diferentes designados hMutS $\alpha$  y hMutS $\beta$  respectivamente que tienen la función de reconocer el sitio de apareamiento erróneo en la hebra hija de ADN.

### 2.5.2 hMLH1, hPMS1, hPMS2 y hMLH3:

Varios homólogos de la enzima MutL incluyen hMLH1, hPMS1, hPMS2 y hMLH3 que forman heterodímeros como hMLH1-hPMS2 (hMutL $\alpha$ ), hMLH1-hPMS1 (hMutL $\beta$ ) y hMLH1-hMLH3 que tienen la función de cortar y rellenar el espacio dejado por el nucleótido excedido (45, 52, 56).

Brevemente, el hMSH2 sirve como un vigilante que reconoce y se une directamente a la secuencia de ADN alterada, esto forma un complejo heterodimérico con la hMSH6 cuando hay una sola base mal apareada; pero cuando es más de una base, es decir es una secuencia corta de bases (de 2 a

8 nucleótidos) las que están mal incorporadas, entonces el hMSH2 se une es con la proteína hMSH3.

Un segundo complejo heterodimérico se forma posterior a lo anterior constituido por la proteína hMLH1 y hPMS2, para cortar los nucleótidos mal incorporados. Aunque los heterodímeros de hMLH1/hPMS1 y hMLH1/hMLH3 pueden formarse también, su papel en el humano no se ha definido muy bien.

En resumen, para errores que no son inmediatamente corregidos por la ADN polimerasa, el sistema de mal apareamiento es un segundo sistema secundario de lectura. No sólo corrige mal apareamientos de bases sino también pequeñas asas de ADN mal apareadas que son el resultado de los errores de replicación de los trayectos de microsatélites del ADN (45, 52, 56).

## 2.6 DEFECTOS DEL SISTEMA DE MAL APAREAMIENTO EN LA CARCINOGENESIS HUMANA

“Los defectos del sistema de mal apareamiento del ADN son cancerígenos” a esta conclusión se llegó hace más de 80 años después de la descripción original del CCNPH en el cual los defectos de este sistema de reparación del ADN están involucrados.

Un sistema de reparación defectuoso por ejemplo en la levadura produce un aumento en la inestabilidad de los microsatélites desde 100 a 700 veces (45). Cuando los genes del sistema de reparación de error de apareamiento tienen una mutación, el sistema sufre una disminución de su función generando un sistema de reparación defectuoso, el cual no es capaz de reparar daños del ADN originados por errores de apareamiento. Si el gen afectado por una mutación es el gen hMSH2 o el gen hMLH1 se genera un nivel de inestabilidad alto, lo que se llama fenotipo de alta IMS. Cuando el gen afectado es el hMSH6 se produce una deficiencia parcial del sistema de reparación y se genera una baja inestabilidad conocido como el fenotipo de baja IMS.

Las mutaciones de los genes del sistema de reparación pueden ser germinales o somáticas. En el caso de la mutación por línea germinal se necesita que el otro alelo sufra una mutación somática, ya que este sólo un alelo puede proveer una función suficiente del sistema de reparación. El fenotipo de la mutación por línea germinal es la predisposición a presentar tumores en una edad temprana, principalmente en el colon y el endometrio (45). Cuando la mutación es somática se refiere a que los dos alelos eran en un principio normales y que durante la vida uno de ellos sufrió de una mutación o metilación y posteriormente el otro alelo se vio también afectado por una mutación o metilación que finalmente llevan a una pérdida de la función del gen.

Los defectos del sistema de reparación de errores de apareamiento se han asociado fuertemente a ciertos tipos de cánceres especialmente al CCNPH y CRC esporádico. Más del 70% del CCNPH tienen mutaciones de línea

germinal presentes en el gen hMSH2 o en el gen hMLH1, y un pequeño porcentaje tienen afectados genes como el hPMS2 o el hPMS1. Recientemente se han encontrado mutaciones de línea germinal en el gen hMHS6 que se asocian con CCNPH de fenotipo de baja IMS.

## 2.7 CRC E INESTABILIDAD GENÓMICA

La inestabilidad genómica está implicada en el desarrollo de tumores y es una herramienta clave en el CRC para reconocer la predisposición, iniciación y progresión de éste (1)

En el CRC se conocen dos vías de progresión de la inestabilidad genómica: la inestabilidad cromosómica (INC) y la inestabilidad microsatelital (IMS) (2). La carcinogénesis colorrectal está caracterizada por acumulaciones sucesivas de mutaciones en genes que controlan el crecimiento celular epitelial y su diferenciación (2). La segunda vía es la inestabilidad de microsatélites.

### 2.7.1 INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

Los microsatélites son segmentos de ADN compuestos por una secuencia corta de nucleótidos (usualmente de 2 a 7 nucleótidos de longitud) que se repite de 10 a 1000 veces en el genoma (4, 6). Normalmente los microsatélites están ubicados en las regiones no codificadoras del ADN (intrones), pero también se encuentran en los exones de algunos genes por ejemplo en genes de receptores para factores de crecimiento, genes reguladores del ciclo celular (E2F4), genes reguladores de la apoptosis (BAX) e incluso los genes del sistema de reparación de errores de apareamientos (hMHS3 y hMSH6) (45).

La inestabilidad de microsatélites se define como un cambio en la longitud del microsatélite como un resultado de adición o delección de pares de bases.

Los microsatélites son marcadores genéticos excelentes y herramientas importantes para buscar genes que causan enfermedades, para realizar investigaciones en medicina forense y para estudiar delecciones genéticas en tumores (pérdida de heterocigocidad) (4).

La IMS es una situación en la cual un alelo de un microsatélite por línea germinal ha ganado o perdido unidades repetitivas dando como resultado un cambio en la longitud del alelo. Este tipo de alteración puede ser detectado sí solamente muchas células están afectadas por el mismo cambio en la longitud, siendo un indicador de expansión clonal (frecuente en las neoplasias) (44, 45, 47, 52, 56). Cuando se estudió los CCNPH, se encontró que casi todos los cánceres tenían alelos microsatelitales con cambio de longitud como resultado de inserciones o delecciones de nucleótidos. Estas modificaciones encontradas no sólo en microsatélites de exones sino también en el resto del genoma del

tumor fue un fenómeno llamado inicialmente como “error de replicación” y más tarde como “Inestabilidad de microsatélites” (58). Posteriormente en un extenso estudio del síndrome de Lynch (HNPCC) se estableció una asociación con un defecto en el sistema de reparación de errores de apareamiento de nucleótidos en la replicación del ADN. Estudios del Síndrome de Lynch muestran que las mutaciones en este sistema afectan principalmente los genes MSH2 y MLH1, que codifican las proteínas del complejo enzimático del sistema. El defecto del sistema de reparación de errores de apareamiento facilita la acumulación de mutaciones letales que alteran genes que normalmente tiene funciones importantes en la célula. El sistema de reparación defectuoso también afecta la corrección de mutaciones que se presentan en microsatélites ubicados en los exones de genes produciendo un gen mutado como se observa en el gen BAX y el gen del receptor 2 del TGF- $\beta$ . El gen BAX en su región codificadora porta un microsatélite de guanina (G) con 8 repeticiones, y en casi el 35% de todos los tumores con defecto en el sistema de reparación de errores de apareamiento, este microsatélite tiene pérdida de una o 2 guaninas, resultando en una mutación de marco de lectura, que inactiva el gen BAX (mutación de marco de lectura es producida por la delección o inserción de un nucleótido que cambia la secuencia normal de nucleótidos en un codón). Este gen mutado contribuye a la carcinogénesis del CRC por afectar la apoptosis mediada por Bcl-2. EL gen del receptor 2 del TGF- $\beta$  codifica el receptor 2 del factor de crecimiento transformante, y tiene un microsatélite de adenina (A) con 10 repeticiones en su región codificadora que sufre una mutación de marco de lectura hasta en el 90% de los CCNPH. Este gen mutado afecta la función del gen TGF- $\beta$  como gen supresor de tumor el cual es clave en el CRC (1, 4).

- Tipos de CRC por la vía de la IMS. Tradicionalmente el CRC por la vía de IMS se divide en dos formas de presentación: el CRC heredado (CCNPH o síndrome de Lynch) con un 2 al 5% y el CRC esporádico que tiene un porcentaje de 12 al 15% de todos lo CRC (1, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14). El síndrome de Lynch es el cáncer colorrectal heredado no polipósico que involucra una predisposición no sólo a CRC sino también a otros cánceres de endometrio, estómago, ovarios, intestino delgado, epitelio hepatobiliar y epitelio urotelial y cerebro (llamado síndrome de Lynch II) (1, 11).

Los genes alterados en el CCHPN muestran mutaciones de línea germinal de los genes hMSH2, hMLH1, hMSH3, hMSH6 y PMS2 con una penetrancia casi del 80% para CRC, 60% para cáncer endometrial y una penetrancia más baja hasta del 20% en otros cánceres (la penetrancia es la frecuencia con la cual los individuos quienes portan una mutación expresan el fenotipo asociado a dicha mutación) (1).

El síndrome de Lynch es un síndrome raro autosómico dominante (11, 41, 43) con una probabilidad de desarrollar un CRC en el 80% de los casos y este riesgo incrementa 1.6% por año desde los 25 años hasta los 75 años de edad.

La edad promedio de desarrollar un CRC en el HPNCC es de 44 años, casi 30 años menos que la población general (11, 18, 61).

Según Robbins *et al.* (11) el CRC esporádico se desarrolla en personas sin susceptibilidad heredada aparente. Este tipo de CRC hace el 15% al 20% de todos los CRC, pero su vía de IMS difiere del CCPNH ya que la mutación es a nivel epigenético y se debe a una metilación de la isla CpG que se encuentra en la región promotora del gen hMLH1 que se afecta en el 75% de los casos, lo que se traduce en un silencio trascricional del gen (11, 25, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43)

## 2.8 HISTOPATOLOGÍA DEL CRC CON IMS

En el estudio de Wright *et al.* (15) se estudiaron 458 casos consecutivos de CRC con análisis histopatológico y molecular de la IMS en el que concluyeron que los CRC con alta IMS tenían características histopatológicas diferentes a aquellos CRC con IMS baja o estables.

Los CRC con alta IMS afectan más el género femenino, tienen un fenotipo macroscópico y microscópico reconocido como localización en el colon derecho, tumores mayores de 6cm de tamaño, de aspecto exofítico, adenocarcinomas convencionales pobremente diferenciados, adenocarcinomas mucinosos, con células en anillo de sello, carcinomas medulares e infiltrado linfocitario intraepitelial marcado.

En el estudio de Ward *et al.* (14) mostró que los CRC esporádicos con IMS-A tienen una edad de presentación más tardía comparado con el CCNPH, un mejor pronóstico (10, 15), y un mayor riesgo de producir carcinomas metacrónicos, por lo tanto requieren de una vigilancia por colonoscopia frecuente.

En el estudio de Alexander *et al.* (10) sobre la identificación del CRC con IMS mostró que el tipo histológico de carcinoma medular, los linfocitos intraepiteliales y el adenocarcinoma convencional con pobre diferenciación, son las características más importantes para discriminar un CRC de IMS-A y un CRC con estabilidad de microsatélites. Las sensibilidades encontradas en este estudio fueron muy bajas del 14% al 38%, con una correlación interobservadores buena para el diagnóstico del adenocarcinoma pobremente diferenciado (kappa: 0.69) (10). El resultado del estudio indicó que la evaluación histopatológica puede ser útil para reconocer los CRC IMS-A pero que tiene baja sensibilidad requiriendo de análisis moleculares para decisiones terapéuticas (10).

### 2.8.1 TIPO HISTOLÓGICO

Los cortes histopatológicos con tinción de hematoxilina-eosina (HE) muestran tipos especiales de carcinomas incluyendo el mucinoso, medular y célula en anillo de sello relacionados con IMS-A. Según la clasificación de la OMS se dividen en:

*Carcinoma mucinoso:* Esta categoría es para aquellos tumores que muestran un adenocarcinoma con un componente de mucina mayor del 50%. Esta variante se caracteriza por lagos de mucina extracelular que contiene células epiteliales malignas dispuestas en acinos, cordones y células individuales.

*Carcinoma de célula en anillo de sello:* Esta variante de adenocarcinoma se define por la presencia de más del 50% de células tumorales con prominente citoplasma cargado de mucina.

*Carcinoma medular:* Esta variante de carcinoma es caracterizado por células malignas dispuestas en sábanas, con núcleos vesiculares, prominente nucleolo y abundante citoplasma acidófilo: asociado a prominente infiltrado de linfocitos intraepiteliales. Este tipo histológico se correlaciona en un 99% con IMS-A.

Shia *et al.* (17) en su estudio mostró que la especificidad del tipo de tumor fue del 80% para predecir CRC con IMS-A y un 100% para el carcinoma medular.

## 2.8.2 GRADO HISTOLÓGICO

Según la OMS los grados histológicos de los adenocarcinomas son:

*Grado 1 (Bien diferenciado):* Formación de glándulas en más del 95% del tumor

*Grado 2 (Moderadamente diferenciado):* Formación glandular entre el 50% al 95% del total del tumor

*Grado 3 (Pobrementemente diferenciado):* El componente glandular está entre el 5% y el 50% del total del tumor. Este tipo está relacionado con CCR con IMS-A.

*Grado 4 (indiferenciado):* Formación glandular menor al 5% del total del tumor. Está relacionado con CCR con IMS-A

## 2.8.3 INFILTRADO INFLAMATORIO LINFOCITARIO INTRAEPITELIAL

Los CCR con IMS-A presentan una reacción linfocitaria en forma de nódulos linfoides con centro germinativo tipo Crohn (criterios de Gramham y Appelman) o de una forma difusa con intraepitelial (10, 21).

Wright *et al* (15) utilizaron una medida exacta para medir el número de linfocitos intraepiteliales en 10 campos de alto poder, pero en los CRC que tenían positivo este aspecto histológico sólo tenían 4 linfocitos intraepiteliales en un campo de alto poder así como lo encontró Young *et al*. (10) en su estudio (14, 15, 17).

En otro estudio Shia *et al*. (17) en 218 casos de CCR realizado en el Memorial Sloan-Kettering, el conteo de los linfocitos intraepiteliales tuvo una sensibilidad del 81% y una especificidad del 60% cuando el punto de corte era de 5 linfocitos por 10 campos de alto poder, para tratar de discriminar entre el CCR estable para microsatélites y los CCR con IMS-A.

## 2.9 EVALUACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LA IMS EN EL CCR

Wright *et al*. (15) en su estudio observaron que el análisis de CCR con alta IMS requieren de estudios moleculares para el diagnóstico definitivo de IMS, utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que examina secuencias de ADN del tejido normal y tumoral. Esto genera costos y consumo de tiempo en los laboratorios de patología quirúrgica.

En 1997 el Instituto Nacional de Cancerología de los Estados Unidos propuso un panel de cinco marcadores para una detección de tumores con IMS. Este panel incluye dos mononucleótidos, BAT25 y BAT26, y tres dinucleótidos D2S123, D5S346 y el D17S250. Los CCR con inestabilidad de dos o más marcadores se definen como CCR con alta IMS, mientras los CCR con uno o ningún marcador con inestabilidad se definen como CCR con baja IMS o estables, respectivamente (12).

Según Nash *et al*. (59) los CCR con IMS-A se presentan en el 10% de todos los CCR y tienen mayor riesgo de desarrollar CCR metacrónicos (14).

Dietemaier *et al* en 1997 concluyeron que los marcadores de mononucleótidos eran más específicos para buscar CCR con alta IMS, y así lo corroboró Jass *et al*.(41).

Para Hatch *et al*. (59) los marcadores dinucleótidos son sensibles para buscar el estatus de IMS baja (12, 14).

### 2.9.1 UTILIZACIÓN DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA EN CCR CON IMS

Shia *et al*. (24) describen la inmunohistoquímica (IHQ) como un método complementario rápido y más barato para evaluar el estatus de IMS en el CCR.

La IHQ es para buscar los dos genes de mayor penetrancia el hMSH2 y el hMLH1, así como para otro gen de menor penetrancia como el hMSH3 (10,15). La sensibilidad de la técnica para detectar CCR con IMS-A es casi del 80% hasta un 100%. La especificidad de la IHQ en CCR de IMS-A es casi del 100%. Pero hay que recordar que la IHQ sólo busca identificar aquellos CCR con alteración de los genes hMSH2 y hMLH1, quedando por fuera los CCR con otro tipo de gen del sistema de reparación alterado (15).

## 2.9.2 IMS Y PRONÓSTICO DEL CCR

Otra diferencia importante entre los CCR producidos por la inestabilidad de microsatélites con respecto a la vía de inestabilidad cromosómica, es que los primeros tienen una mayor respuesta a los agentes quimioterapéuticos como el 5 fluoruracilo (1, 4, 11, 18, 39, 42, 45, 48, 54).

En estos momentos es controversial el uso del 5 fluoruracilo como monoterapia pues se necesitan estudios con mayor muestra para definir su beneficio en pacientes con alta IMS (18).

Benatti *et al.* (18) en su estudio mostraron que el tipo de inestabilidad genómica independientemente influye en los resultados clínicos de los pacientes con CCR. En particular se observaron diferencias de supervivencia entre pacientes con CCR con alta IMS con los pacientes con CCR estables, con una ventaja pronóstica para aquellos que tenían IMS, sobretodo en los estadios de la enfermedad II y III. La explicación clara sobre la ventaja pronóstica de la IMS aún no se conoce con precisión, pero se le atribuye al denso infiltrado inflamatorio linfocitario intratumoral y al un mínimo involucro de los nódulos linfoides (18).

## 2.10 TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE PACIENTES CON LYNCH

Según Varacco (65) el tratamiento quirúrgico es diferente en CCR con IMS-A debido a la incidencia de tumores sincrónicos y metacrónicos, por lo tanto es importante aclarar el tipo de CCR para realizar la cirugía adecuada. Se puede realizar una resección colónica ampliada (colectomía total o subtotal). La alta frecuencia del adenocarcinoma de útero y ovario hacen que la anexohisterectomía profiláctica esté indicada al momento de la colectomía en mujeres menopáusicas.

Para el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos, la cirugía profiláctica debe ser una colectomía subtotal en pacientes con adenomas en la vigilancia colonoscópica y Lynch debido al riesgo de otros adenomas y otros CCR (54).

## 2.11 VIGILANCIA Y SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON IMS

Según las guías del Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos la vigilancia debe comenzarse entre los 20 y 25 años con videocolonoscopía total cada 3 años. Los hijos de pacientes con CCR derecho lo deben hacer antes de los 35 años, aunque todavía no está bien establecida esta norma. Con respecto al Lynch II se recomienda el examen citológico, ginecológico, biopsia endometrial por aspirado, ecografía endovaginal y CA-125 en forma anual desde los 25-35 años (54).

## 2.12 ANALISIS DEL BAT26

El BAT-26 es una secuencia de 26 adenosinas (A)<sub>26</sub>, localizada en el intrón 5 del gen hMSH2. Algunos individuos pueden presentar 24, 25 o 27 adenosinas en lugar de 26, aunque estos individuos representan menos de 5 % de la población, por lo que se considera como un marcador monomórfico (50). Debido a la condición casi monomórfica de ambos locus es posible diferenciar los alelos inestables de los alelos de longitud normal sin necesidad de trabajar con mucosa normal.

En el estudio de González-García *et al.* (60) de 415 casos de CCR la detección de IMS por medio del BAT26 se basa en la alta especificidad reportada para este mononucleótido.

El estudio de Carvalho *et al.* (13) en 184 pacientes con CCR se concluyó que la inestabilidad del marcador BAT26 debe considerarse como un método de tamizaje de IMS (13, 60).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

- Describir las características histopatológicas del cáncer colorrectal como producto de una alta inestabilidad de microsatélites en pacientes provenientes de la Unidad de Oncología del Hospital Universitario Ramón González Valencia.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar las características histopatológicas del cáncer colorrectal generado por la IMS-A.

## 4. DISEÑO METODOLÓGICO

### 4.1 TIPO DE ESTUDIO:

Estudio descriptivo con recolección retrospectiva de la información.

### 4.2 POBLACIÓN:

Todos los pacientes que ingresaron al servicio de Patología del Hospital Universitario Ramón González Valencia de Bucaramanga con el diagnóstico de cáncer colorrectal desde enero de 1999 hasta agosto de 2004.

### 4.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Tener el diagnóstico confirmado por patólogo
- Haber ingresado por el servicio de oncología del Hospital Universitario de Ramón González Valencia de Bucaramanga.
- Tener bloque de parafina o láminas del CRC en el departamento de patología de la UIS

### 4.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Diagnóstico no confirmado de cáncer colorrectal.
- Pacientes que recibieron manejo con quimioterapia.
- No tener el bloque de parafina para evaluación del CRC
- Bloque de parafina con insuficiente material para evaluación

### 4.5 METODOLOGÍA

#### 4.5.1 Evaluación de la histopatología (Anexo c)

Se realizó un corte adicional al bloque de parafina para tinción de hematoxilina-eosina. Se aplicó el cuestionario para la evaluación histopatológica de cada caso de CRC.

Posteriormente se tuvo copia del reporte de patología para obtener los datos clínicos y de las características macroscópicas del tumor.

La evaluación histopatológica se realizó en una lámina del tumor, por dos patólogos del servicio de patología de la UIS individualmente, sin conocer los datos del análisis molecular del BAT26.

#### 4.6 VARIABLES DEL ESTUDIO

NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	NIVEL DE MEDICION	CODIFICACION OPERATIVA
<b>1. SOCIODEMOGRAFICAS</b>			
Edad	Consignada por grupos de lustros desde nacimiento.	Razón	Años cumplidos
Género	Tipo de sexo	Nominal	masculino y femenino
<b>2. MACROSCOPIA</b>			
Sitio del tumor		Nominal	Derecho - izquierdo
Tamaño del tumor		Nominal	Mayor de 6cm Menor de 6cm
Forma del tumor		Nominal	Exofítico Ulcerado Infiltrante
<b>3. MICROSCOPIA</b>			
Tipo de tumor		Nominal	Pobrementemente diferenciado Mucinoso Célula en anillo de sello Medular
Grado histológico		Nominal	Grado 1, 2 o 3
Infiltrado linfocitario intraepitelial		Nominal	Mayor de 5/CAP Menor de 5/CAP

#### 4.7 PROCEDIMIENTO

Todos los pacientes que ingresaron al servicio de patología con diagnóstico de CRC que cumplieron los criterios de inclusión, fueron valorados por el servicio de patología aplicándoles el instrumento de recolección de datos (Anexo c), donde se tomaron datos claves sobre historia clínica y según concepto de dos patólogos se clasificaron según la macroscopia y microscopia presentes en el CRC analizado.

En el Laboratorio de Genética de la Facultad de Salud de la UIS se analizó el microsatélite BAT26 en el CRC (con un tamaño normal del marcador de 116pb), con un BAT26 inestable cuando presentó delección de 14pb a 12pb.

Luego se correlacionaron ambos estudios el histopatológico y molecular del CRC para observar si las características histopatológicas de alta IMS tenían inestabilidad del microsatélite BAT26.

#### 4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se elaboró una base de datos en EPI-INFO, en donde digitó la información.

Se hizo un análisis descriptivo mediante tablas de frecuencia, estableciendo medidas de tendencia central o dispersión según la naturaleza y distribución de las variables sociodemográficas, características macroscópicas y microscópicas del tumor.

Se hizo una correlación interobservador midiendo el kappa y el intervalo de confiabilidad.

#### 4.9 CONSIDERACIONES ÉTICAS

En este estudio, no hubo intervención clínica alguna diferente a la que normalmente se realiza, se garantizó la confiabilidad de la información que fue suministrada por los pacientes que participaron de forma escrita en el estudio (Anexo b), para iniciar la aplicación del instrumento de histopatología. En la base de datos no se puede identificar ninguna persona en particular, los datos personales fueron reemplazados por códigos numéricos.

La presente investigación tuvo en cuenta las normas éticas establecidas para la investigación en seres humanos, según código de Nuremberg, la convención de Helsinki y la resolución 8430 de 1993 emanada por el Ministerio de Salud de la República de Colombia.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

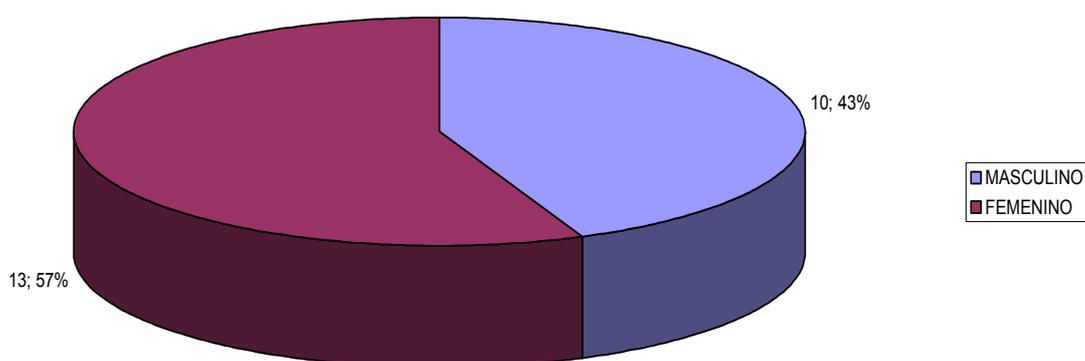
En este estudio piloto se encontró que el promedio de edad de los 23 pacientes con CRC fue de 50 años, siendo 13 de ellos mujeres (56.5%) y 10 hombres (43.5 %) (Gráfico 2).

Aunque el tamaño de la población de nuestro estudio tuvo pocos eventos, se observaron tendencias en las variables importantes para predecir un fenotipo de alta IMS que concuerdan con la literatura disponible.

Del total de 23 CRC tres casos tuvieron inestabilidad para el BAT26 (13%), con un promedio de edad de 41 años, de género femenino (100%), lo cual se correlaciona con los estudios de Carvalho *et al.* (13), el cual encontró que el 72.7% de los CRC con inestabilidad del BAT26 eran mujeres.

Gráfico 2. Distribución por Género de la población de CRC

DISTRIBUCIÓN POR GÉNERO DE LA POBLACIÓN DE CRC



Por fenotipo 9 de los 23 casos de CCR sugirieron IMS-A, dos de los cuales mostraron BAT26 inestable (22%), tres con BAT26 estable y cuatro tuvieron BAT26 indeterminado por problemas técnicos.

De los 14 casos sin fenotipo de IMS-A, uno mostró inestabilidad para BAT26; este CCR se presentó como una lesión ulceroinfiltrante, lo cual está descrito en la literatura que entre los CCR con IMS-A también pueden presentarse como tumores con patrones mixtos, de márgenes expansivos y ulcerados aunque no es lo usual.

Las características macroscópicas que definieron un fenotipo de IMS-A fueron la localización, sitio y tamaño del CCR, tal como lo describen los estudios de Alexander *et al.* (10), Shia *et al.* (17), y Wright *et al.* (15) la histopatología de los CCR con alta IMS presentan una localización del lado derecho, son exofíticos y de mayores de 6cm de diámetro mayor. (Tablas 1, 2 y 3).

Con respecto a la localización de los nueve casos de este estudio que clasificaron para el fenotipo de IMS, se presentaron en el lado derecho como masas polipoides siguiendo la tendencia observada por Wright *et al.* (15) en este tipo de cánceres (15, 18) (Gráfico 3 y 4).

Los tumores que mostraron inestabilidad del BAT26, tuvieron tendencia a localizarse en el colon proximal (33.3%) y en recto sigmoides (66.6%). En relación con las variables morfológicas, se encontraron dos de tipo macroscópico exofítico, y uno de tipo ulceroinfiltrante; todos como lesiones solitarias (10, 14 y 15).

Con respecto a las características microscópicas de los CCR inestables para el BAT26, el 66% (n=2) fueron de tipo histológico clásico/convencional y el 33%(n=1) de tipo mucinoso, con grado histológico para el tipo clásico/convencional de bien diferenciado.

Gráfico 3. Distribución según sitio de tumor

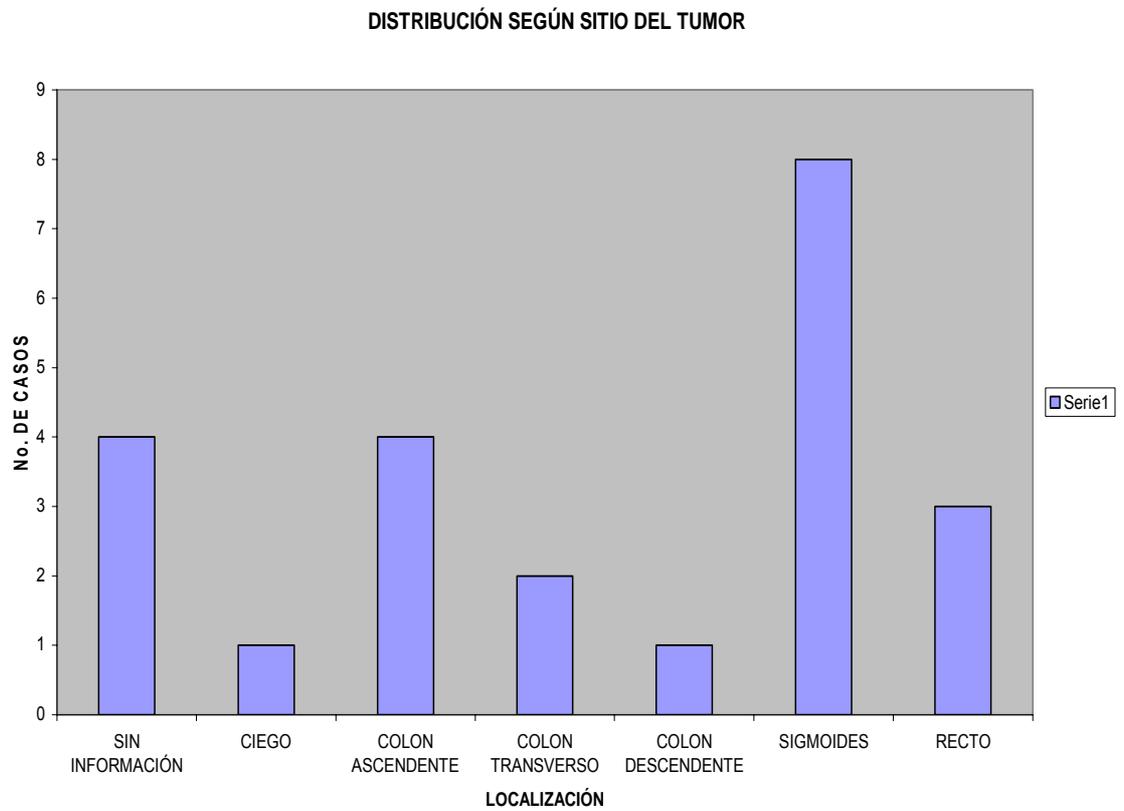


Gráfico 4. Microscopia de los CRC

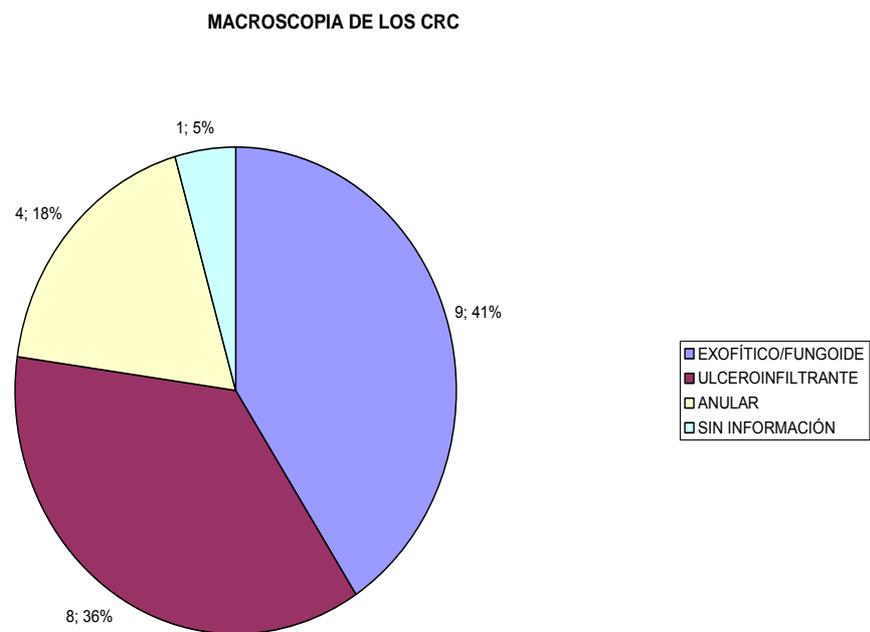


GRÁFICO 5. TAMAÑO DEL TUMOR

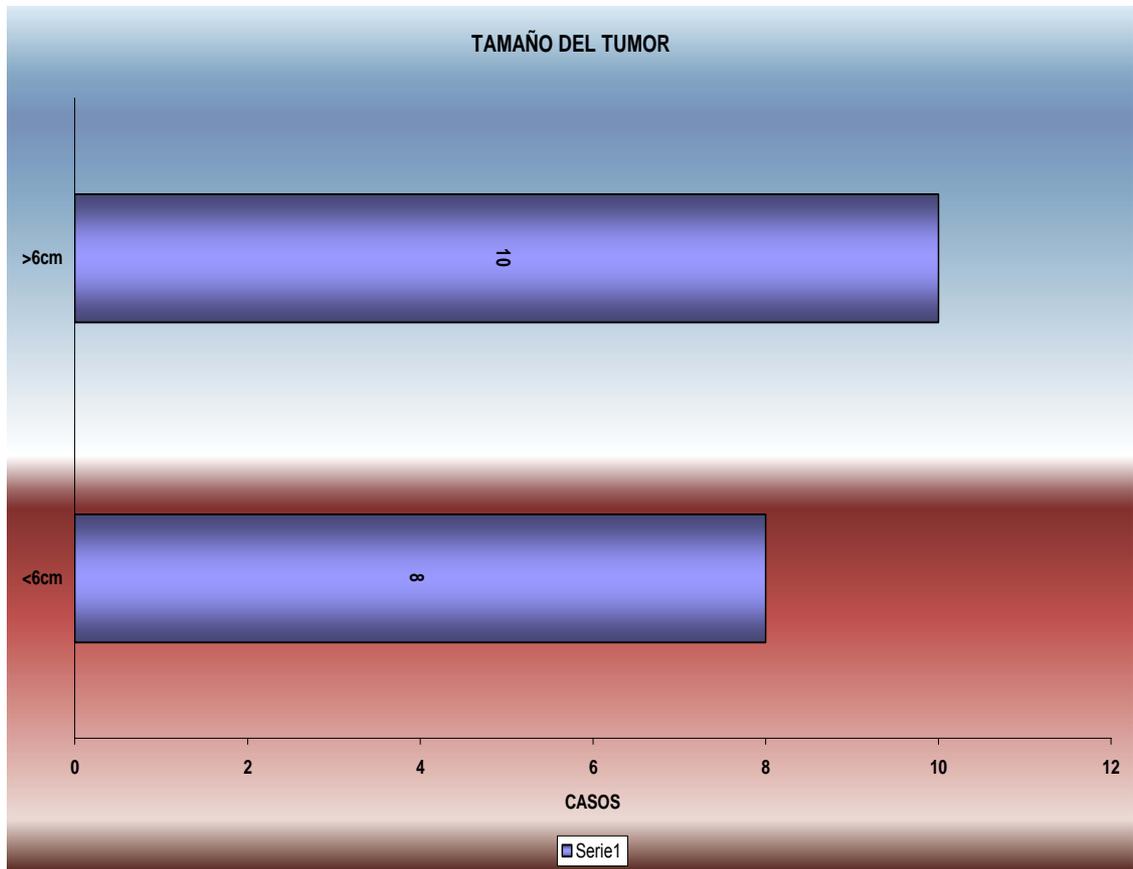


Tabla 1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LOS CCR

SITIO DEL TUMOR	ESTATUS DEL BAT26			TOTAL n=23
	INESTABLE n=3	ESTABLE n=9	INDETERMINADO n=11	
SIN INFORMACIÓN	0	2	2	4
CIEGO	0	1	0	1
COLON ASCENDENTE	1	1	2	4
COLON TRASVERSO	0	1	1	2
COLON DESCENDENTE	0	1	0	1
SIGMOIDES	1	3	4	8
RECTO	1	0	2	3

Tabla 2. FORMA DEL TUMOR

FORMA DEL TUMOR	ESTATUS DEL BAT26			TOTAL n=23
	INESTABLE n=3	ESTABLE n=9	INDETERMINADO n=11	
EXOFÍTICO	2	2	4	8
INFILTRANTE	1	4	4	9
ANULAR	0	2	2	4
SIN INFORMACIÓN	0	1	1	2

Tabla 3. TAMAÑO DEL TUMOR

TAMAÑO DEL TUMOR	ESTATUS DEL BAT26			TOTAL n=23
	INESTABLE n=3	ESTABLE n=9	INDETERMINADO n=11	
> DE 6cm	1	3	4	8
< DE 6cm	1	3	6	10
SIN INFORMACIÓN	1	2	1	4

Aunque en otros estudios consideran los adenocarcinomas clásico/convencionales con grado histológico de bien diferenciado no son de fenotipo de alta IMS, este estudio reveló que el 66% de los CCR con inestabilidad para el BAT26 presentaron este tipo de grado histológico, de manera similar a otros estudios como el de Carvalho *et al.* (13), donde de un total de 184 pacientes evaluados el 86.4% de los CCR con inestabilidad para BAT26 fueron de este grado histológico (13).

Tabla 4. Características Microscópicas de Los CCR

TIPO HISTOLÓGICO DEL TUMOR	ESTATUS DEL BAT26			TOTAL n=23
	INESTABLE n=3	ESTABLE n=9	INDETERMINADO n=11	
ADENOCARCINOMA CLÁSICO/CONVENCIONAL	2	7	9	18(78%)
ADENOCARCINOMA MUCINOSO	1	1	2	4 (17%)
ADENOCARCINOMA CÉLULA EN ANILLO DE SELLO	0	1	0	1(4%)

Tabla 5. Grado histológico del tumor

GRADO HISTOLÓGICO DEL TUMOR *	ESTATUS DEL BAT26			TOTAL n=23
	INESTABLE n=3	ESTABLE n=9	INDETERMINADO n=11	
BIEN DIFERENCIADO	2	4	6	12(52%)
MODERADAMENTE DIFERENCIADO	0	2	2	4 (17%)
POBREMENTE DIFERENCIADO	0	1	1	2(8.6%)
NO APLICABLE**	1	2	2	5(21.7%)

\*El grado histológico sólo se aplica para los adenocarcinomas tipo clásico/convencional

\*\* Entran en este grupo los adenocarcinomas mucinosos y los de anillo de sello

El infiltrado linfocitario intraepitelial tumoral fue menor de 5 linfocitos por campo de alto poder en los tres CCR inestables para el BAT26 y la extensión tumoral en los casos de resección segmentaria (n=2) fue hasta la subserosa. (Tabla 5).

Correlacionando lo anterior con los artículos publicados, los CCR con inestabilidad para el BAT26 en el presente trabajo tuvieron tendencia a los descrito, sin embargo sobre el infiltrado linfocitario intraepitelial se observa que sólo con una evaluación de hematoxilina-eosina sin ayuda de la inmunohistoquímica (antiCD3), es un parámetro de difícil evaluación por los numerosos artefactos que dificultan la identificación de estos linfocitos maduros como lo son, otras células inflamatorias mal preservadas, cuerpos apoptóticos y núcleos tumorales con numerosos nucleolos. En la literatura la evaluación de este parámetro histológico se realiza en otra lámina con anticuerpos contra linfocitos CD4/CD8 subpoblaciones de linfocitos T como se especifica en el estudio de Banerjea *et al.* y en el estudio de Alexander *et al.* (10, 16).

En cuanto a cáncer rectal se refiere se observó en este estudio que la alta IMS se correlaciona con adenocarcinomas mucinosos cuando el tumor presenta alteraciones del sistema de reparo según lo descrito por Ishikubo *et al.* en su estudio de hombres japoneses con carcinomas del recto de alta IMS quienes hasta un 36% tenían un componente mucinoso (29).

A pesar de que por histopatología se sugirieron 9 CCR con alta IMS, y sólo 2 se correlacionaron con la prueba molecular, indica que sólo el estudio histopatológico es una prueba de tamizaje y que se debe complementar con el estudio de inmunotipificación para genes del sistema de reparación de malos apareamientos y con el análisis molecular, así como se describe en los estudios de Alexander et al. (Tabla 7).

Las variables fenotípicas de mayor peso para hacer la aproximación para IMS alta fueron el sitio del tumor, forma del tumor, el tipo y grado histológico.

El estudio de concordancia interobservador para las variables tipo histológico, grado histológico, infiltrado linfocitario intraepitelial y extensión tumoral. (Tabla 8).

La baja concordancia en el grado histológico demuestra que es uno de los parámetros que exige mayor experticia por el evaluador y que aún es un ítem de poca precisión a pesar de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud realizó en el 2000 para unificar criterios.

Tabla 6. Extensión del Tumor

EXTENSIÓN TUMORAL	ESTATUS DEL BAT26			TOTAL n=23
	INESTABLE n=3	ESTABLE n=9	INDETERMINADO n=11	
<b>NO APLICABLE *</b>	1	3	1	5(21%)
<b>HASTA LA MUSCULAR PROPIA SIN ATRAVESARLA</b>	0	0	4	4 (17%)
<b>HASTA LA SUBSerosa</b>	2	1	3	6(26%)
<b>MÁS ALLÁ DE LA SEROSA</b>	0	5	3	8(35%)

Tabla 7. Correlación de Fenotipo de IMS-A Y BAT26

FENOTIPO DE ALTA IMS	ESTATUS DEL BAT26			TOTAL n=23
	INESTABLE n=3	ESTABLE n=9	INDETERMINADO* n=11	
<b>CCR CON FENOTIPO PRESENTE</b>	2	3	4	9 (39%)
<b>CCR SIN FENOTIPO</b>	1	6	7	14 (60%)

\*indeterminados por problemas técnicos

Tabla 8. Correlación Interobservadores

CARACTERÍSTICA	Observadores	Kappa	IC 95%
Tipo histológico	2	0.8757	(0.68 – 1.0)
Grado histológico	2	0.5158	(0.39 – 0.63)
Infiltrado linfocitario intraepitelial	2	0.7767	(0.57 – 0.97)
Extensión tumoral	2	0.5119	(0.38 – 0.63)

A pesar de que este estudio es una prueba piloto que buscó unificar términos histopatológicos y dar a conocer el fenotipo histopatológico de la vía de inestabilidad de microsatélites en nuestro ámbito local, el estudio presentó varios problemas técnicos; uno de estos el de la obtención de un tejido adecuado bien preservado para aplicaciones de estudios moleculares. Otros fueron problemas relacionados con la técnica de la PCR para amplificar las muestras como fue la toma de partes del tumor con presencia de fibrosis, necrosis e insuficiente material tumoral debido a que las muestras se tomaron de bloques de parafina que ya tenían el tejido devastado y no se pudo obtener más muestra tumoral (la evaluación histopatológica se realizó de nuevos cortes y no sobre las láminas originales en las cuales se había hecho el diagnóstico inicial pudiendo llevar a un mayor desgaste del tejido de los bloques de parafina).

## 6. RECOMENDACIONES

Este estudio presenta datos histopatológicos, moleculares y de presentación epidemiológica muy similares a los de la literatura mundial, sin embargo de los 23 casos de CCR, 11 resultaron indeterminados por lo que se hace necesario realizar las siguientes recomendaciones: la primera es el mejoramiento en el proceso de histotecnología para permitir el posterior estudio histopatológico y molecular de diversas enfermedades inflamatorias y neoplásicas, y así evitar posibles artefactos o pérdida antigénica del tejido analizado secundarios a inadecuado procesamiento tisular, que genera resultados indeterminados y no concluyentes.

La segunda recomendación y relacionada con el estudio presente es la necesidad de la implementación de dos técnicas auxiliares en los servicios de Patología quirúrgica y de Genética en los que se manejan diversos especímenes quirúrgicos oncológicos; estos dos procesamientos son respectivamente la inmunohistoquímica (con el fin de buscar moléculas de importancia terapéutica y pronóstica) y el estudio molecular completo para cánceres relacionados con IMS no sólo el CCR sino los relacionados al Lynch 2.

Como una tercera recomendación es la validación del cuestionario de recolección de datos para que sea aplicado a todas las biopsias y piezas quirúrgicas de CCR, que se reciben en el departamento de patología de la UIS.

Aunque el presente trabajo es un estudio de tipo descriptivo sirve como base para otras investigaciones y brinda información de tipo epidemiológico sobre las variables que intervienen en la presentación, manejo y evolución de esta patología.

## **7. CONCLUSIONES**

Aunque este trabajo de grado es una prueba piloto y la muestra de pacientes fue pequeña el estudio histopatológico mostró nueve CCR con IMS-A de los cuales dos se correlacionaron con la prueba molecular sugiriendo que la histopatología es una prueba de tamizaje.

Las variables fenotípicas de mayor peso en la aproximación de la IMS-A fueron el sitio, forma, tipo y grado histológico del CCR.

Por lo cual se debe complementar la histopatología con estudios de inmunotipificación y el estudio molecular como se describe en la literatura.

Las técnicas de procesamiento de tejidos y su conservación afectan los estudios moleculares en este tipo de muestras.

Las pruebas de tamizaje disminuyen los costos en el sistema de salud de los países en los cuales hay programas de prevención y detección temprana de CCR

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nature Rev.*, 4:769-78, 2004
2. Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res.*, 63:1608-14, 2003
3. Park J, Betel D, Gryfe R, et al. Mutation profiling of mismatch repair-deficient colorectal cancers using an in silico genome scan to identify coding microsatellites. *Cancer Res.*, 62:1284-88, 2002
4. Chapelle A. Microsatellite Instability. *N Engl J Med.*, 349(3):209-10, 2003.
5. Hawkins NJ, Ward RL JV. Sporadic colorectal cancers with microsatellite instability and their possible origin in hyperplastic polyps and serrated adenomas. *Jl Natl Cancer Inst.*,93(17): 1307-13, 2001
6. Samowitz WS. Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer epidemiol, Biomarkers Prev*, 10:917-23, 2001
7. Hoang JM, Cottu PH. BAT26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res.*, 57(2): 300-3, 1997
8. Mukherjee M. Allelic variation of BAT26 and BAT40 polyadenine repeat loci in North Indians. *International journal of molecular medicine*. 9: 91-4, 2002
9. Huang S. mononucleotide microsatellite markers are the better markers for microsatellite instability detection. *American Society of clinical oncology 2004 gastrointestinal cancer symposium*. Abstract No. 278.
10. Alexander J. Histopathology identification of colon cancer with microsatellite instability. *American journal of pathology*, 158(2): 527-35, 2001
11. Robbins DH, Itzkowitz SH. The molecular and genetic basis of colon cancer. *Med Clin N Am.*, 86: 1467-95, 2002
12. Hatch SB, Lighthfoot HM. Microsatellite instability testing in colorectal carcinoma: Choice of markers affects sensitivity of detection of mismatch repair-deficient tumors. *Clin Cancer Res.*, 11:2180-87, 2005
- 13.

Carvalho F, Monteiro Santos EM. Clinopathological significance of BAT26 instability in 184 patients with colorectal cancer. *Applied cancer research*, 25(1): 36-40, 2005

14. Ward R, Meagher A. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut*. 48:821-29, 2001

15. Wright CL, Stewart ID. Histopathology and mismatch repair status of 458 consecutive colorectal carcinomas. *Am J Surg Pathol.*, 27(11): 1393-1406, 2003

16. Banerjee A., Bustin SA. The immunogenicity of colorectal cancers with high-degree microsatellite instability. *World Journal of surgical oncology*. 3:1-9, 2005

17. Shia J., Ellis NA. Value of histopathology in predicting microsatellite instability in Hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic colorectal cancer. *Am J Surg Pathol.*, 27(11): 1407-17, 2003

18. Benatti P, Gafà R. Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clin Cancer Res.*, 11(23): 8332-40, 2005

19. Chen S, Watson F. Accuracy of MSI testing in predicting germline mutations of MSH2 and MLH1: a case study in Bayesian meta-analysis of diagnostic tests without a gold standard. *Biostatistics*. 6: 450-64, 2005

20. Burgart LJ. Testing for defective DNA mismatch repair in colorectal carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.*, 129:1385-89, 2005

21. Colomer A., Erill N. A novel logistic model based on clinicopathological features predicts microsatellite instability in colorectal carcinomas. *Diagn Mol Pathol.*, 14(4): 213-23, 2005

22. Hamilton SR., Vogelstein B. Carcinoma of the colon and rectum. Tumours of the colon and rectum Pathology and Genetics. WHO., 104-119, 2000

23. Sugano K., Ichikawa A. DNA variants of BAT25 in Japanese, a locus frequently used for analysis of microsatellite instability. *Jpn J Clin Oncol.*, 31(7): 346-8, 2001

24. Shia J, Klimstra DS. Value of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair proteins in predicting germline mutation in Hereditary colorectal neoplasms. *Am J Surg Pathol.*, 29(1): 96-104, 2005

25. Atkin NB., Microsatellite Instability. *Cytogenet Cell Genet.*, 92: 177-81, 2001

26. Slattery ML., Curtin K. Associations between cigarette smoking, lifestyle factors, and microsatellite instability in colon tumors. *Journal of the National Cancer Institute.*, 92(22): 1831-36, 2000
27. Srinivas PR, Kramer BS. Trends in biomarker research for cancer detection. *The lancet oncology.*, 2(11) 2001
28. Burgart LJ. Colorectal polyps and other precursor lesions need for an expanded view. *Gastroenterol Clin N Am.*, 31: 959-70, 2002
29. Ishikubo T., Nishimura Y. The clinical features of rectal cancers with high frequency microsatellite instability (MSI-H) in Japanese males. *Cancer letters.*, 216(1): 55-62, 2004
30. Sood AK, Holmes R. Application of the national cancer institute international criteria for determination of microsatellite instability in ovarian cancer. *Cancer res.*,61: 4371-74, 2001
31. Shuber AP, Boynton KA. Improved detection of BAT26 microsatellite deletions by a modified primer extension assay. Presented at digestive disease week annual conference May 2001.
32. Payne S. Draft best practice guidelines for molecular analysis of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Clinical Molecular Genetics Society. Guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer 2001*
33. Atkin W, Martin JP. Stool DNA –based colorectal cancer detection: Finding the needle in the Haystack. *Journal of the Natl Cancer Inst.*, 93(11): 798-9, 2001
34. Umar A, Boland CR. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch Syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the Natl Cancer Inst.*, 96(4): 261-8, 2004
35. Loukold A, Eklin K. Microsatellite marker analysis in screening for Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer res.*, 61:4545-9, 2001
36. Trojan J, Raedle J. Detection of microsatellite instability from archival, hematoxylin-eosin-stained colorectal cancer specimen. *Arch Pathol Lab Med.*, 126: 202-4, 2002.
37. Flórez O, González CI. Amplificación por PCR de tejidos de archivo: efecto de los fijadores. *Salud UIS*, 36:56-64, 2004
38. Chao A, Gilliland F. Patient and tumor characteristics of colon cancers with microsatellite instability: A population based study. *Cancer epidemiology biomarkers and prevention.* 9: 539-44, 2000

39. Wright CM, Dent OF. Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer. *British Journal of Surgery.*, 87(9): 1197-202, 2000
40. Kuismanen SA, Holmberg MT. Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers. *American Journal of Pathology.* 156(5): 1773-9, 2000
41. Jass JR, Young J. Hyperplastic polyps and DNA microsatellite unstable cancers of the colorectum. *Histopathology* 37: 295-301, 2000
42. Gryfe R, Kim H. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med.* 342(2): 69-77, 2000
43. Mitchell RJ, Farrington SM. Mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 and colorectal cancer: a Huge review. *Am J Epidemiol.*, 156(10): 885-902, 2002
44. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med.* 348(10): 919-32, 2003
45. Cheng DC, Rustig AK. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: Genetics and clinical implications. *Ann Intern Med.* 138:560-70, 2003
46. Calhoun BC, Gomes F. Sampling error in the Standard evaluation of endoscopic colonic biopsies. *The American Journal of Surgical Pathology.* 27(2): 254-7, 2003
47. Rigau V, Sebbagh N. Microsatellite instability in colorectal carcinoma. The comparison of immunochemistry and molecular biology suggest a role for hMLH1 immunostaining. *Arch Pathol Lab Med.* 127: 694-700, 2003
48. Ribic CM, Sargent DJ. Tumor microsatellite – instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 349(3): 247-57, 2003
49. Glebov OK, Rodriguez LM. Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression. *Cancer epidemiology Biomarkers and prevention.* 12: 755-62, 2003
50. Wheller JMD, Beck NE. Mechanisms of inactivation of mismatch repair genes in human colorectal cancer cell lines. The predominant role of hMLH1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 10296-301, 1999
51. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 349(21): 2042-54, 2003
52. Narayan S, Roy D. Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Molecular cancer.* 2:41-55, 2003

53. Montenegro YM, Ramírez AT. Cáncer colorrectal heredado. Presentación de casos y revisión de temas. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
54. Genetics of colorrectal cancer. National Cancer Institute 2005
55. Giraldo A, Gómez A. hMLH1 and hMSH2 mutations in Colombian families with HNPCC. Description of two novel mutations. Posters: Cancer genetics and genomics. *The American Journal of human genetics*, 73(5): 354, 2003
56. Modrich P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu Rev Genet.*, 25: 229-53, 1991
57. Mantilla A, Vesga BE. Registro de cáncer del periodo 1996-1999 en la Unidad de Oncología del Hospital Ramón González Valencia de Bucaramanga, Colombia. Trabajo de Tesis
58. Samowitz WS, Slattery ML. BAT26 and BAT40 instability in colorrectal adenomas and carcinomas and germline polymorphisms. *AJP*. 154(6): 1637-41, 1999
59. Nash GM, Gimbel M. Automated, multiplex assay for high frequency microsatellite instability in colorrectal cancer. *JCO*. 21(16): 3105-12, 2003
60. González-García I, Moreno V. Standardized approach for microsatellite instability detection in colorrectal carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(7): 544-9, 2000
61. Shin KH, Park KH. Prevalence of microsatellite instability, inactivation of mismatch repair genes, p53 mutation, and human papillomavirus infection in Korean oral cancer patients. *International Journal of oncology*. 21: 297-302, 2002
62. Bardi G, Fenger C. Tumor karyotype predicts clinical outcome in colorrectal cancer patients. *JCO*, 22(13): 2623-34, 2004
63. Datos y estadísticas del cancer en los hispanos/latinos 2003-2005. American Cancer Society
64. Marshall JB, Díaz-Arias AA. Prospective evaluation of optimal number of biopsy specimens and brush cytology in the diagnosis of cancer of the colorrectum. *Am J Gastroenterol.*, 88(9): 1352-4, 1993
65. Vaccaro CA. Carcinogénesis colorrectal: De la biología molecular a la práctica quirúrgica. Sector de coloproctología Servicio de Cirugía general Hospital – Italiano de Buenos Aires.

66. Piñeros M, Hernández G. Increasing mortality rates of common malignancies in Colombia, an emerging problem. *Cancer* 101(10): 2285-92, 2004
67. Vogelstein B, Wilson J. Increased mutation rate at the hprt locus accompanies microsatellite instability in colon cancer. *Oncogene*;10:33-7, 1995
68. Knudson AG. Mutation and Cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 68: 820-23, 1971
69. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100: 57-70, 2000
70. Kinzler K, Vogelstein B. Lessons from hereditary colon cancer. *Cell*. 87: 159-70, 1996
71. Michor F. Chromosomal instability and human cancer. *Phil Trans R. Soc B*. 360: 631-5, 2005
72. Iwasa Y, Michor F. Can chromosomal instability initiate tumorigenesis?. *Seminars in cancer biology*. 15: 43-9, 2005
73. ICONTEC. Compendio – Tesis y otros Trabajos de Grado. Imprelibros S.A; Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación- ICONTEC; Bogotá D.C. Mayo de 2005

## ANEXOS

### Anexo a.

#### **INFORMACIÓN PARA PACIENTES PARTICIPANTES EN EL PROYECTO: INESTABILIDAD DE MICROSATELITES EN CÁNCERES DE VÍAS DIGESTIVAS GÁSTRICO Y COLORRECTAL EN LA POBLACIÓN SANTANDEREANA**

Estimado(a) Paciente: Los investigadores del proyecto “INESTABILIDAD DE MICROSATELITES EN CÁNCERES DE VÍAS DIGESTIVAS GÁSTRICO Y COLORRECTAL EN LA POBLACIÓN SANTANDEREANA” realizado por miembros del Grupo de Genética Humana 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 asociados 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 de 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 consistiría en autorizar la toma de una muestra de 10 ml de sangre. Este procedimiento tiene un riesgo mínimo y la molestia que puede presentar es un dolor leve en el sitio de sangrado. Es necesario también su autorización para utilizar fragmentos sobrantes de la muestra de la biopsia usada en el análisis patológico. En este momento esta investigación no trae 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 beneficiaría 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 sus resultados no sean incluidos en las conclusiones del trabajo si así lo desea.

Agradecemos de antemano su colaboración.

**GRUPO DE GENÉTICA HUMANA**

Unidad de Oncología HURGV – Laboratorio de Genética UIS

Anexo b.

## HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

### PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

**“INESTABILIDAD DE MICROSATELITES EN CÁNCERES DE VÍAS DIGESTIVAS GÁSTRICO Y COLORRECTAL EN LA POBLACIÓN SANTANDEREANA**

FECHA \_\_\_\_\_

NOMBRE \_\_\_\_\_

Por medio del presente documento hago constar que el personal científico de la investigación “INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN CÁNCERES DE VÍAS DIGESTIVAS GÁSTRICO Y COLORRECTAL 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 consciente 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. \_\_\_\_\_

Anexo c.



POSTGRADO PATOLOGÍA

INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE DATOS

*El objetivo de este instrumento es determinar las características macroscópicas y microscópicas de los tumores de cáncer colorrectal evaluados en el servicio de patología de la UIS-HUS. La información contenida será utilizada estrictamente con fines investigativos, garantizando la confidencialidad en el manejo de datos suministrados.*

**1. IDENTIFICACIÓN**

- 1.1 Número de historia clínica: \_\_\_\_\_  
1.2 GÉNERO: M  F   
1.3 EDAD: \_\_\_\_\_  
1.4 CÓDIGO DE LA PLACA \_\_\_\_\_  
1.5 CÓDIGO DE OBSERVADOR 1  2

**2. TIPO DE MUESTRA**

- 2.1 BIOPSIA   
Número de fragmentos: 2.1.1 Más de 6  2.1.2 Menos de 6   
2.2 RESECCIÓN   
2.2.1 Hemicolectomía derecha   
2.2.2 Hemicolectomía izquierda   
2.2.3 Colectomía transversa   
2.2.4 Sigmoidectomía   
2.2.5 Otros

**3. EXAMEN MACROSCÓPICO**

- 3.1 SITIO ANATÓMICO DEL TUMOR  
3.1.1 No aplicable (sin información)

- 3.1.2 Ciego
- 3.1.3 Colon ascendente
- 3.1.4 Colon transverso
- 3.1.5 Colon descendente
- 3.1.6 Sigmoides
- 3.1.7 Recto
- 3.2 NÚMERO DE TUMORES: 3.2.1 Uno
- 3.2.2 Más de uno
- (Si la respuesta es Uno, PASE a la pregunta 3.3)

CARACTERÍSTICAS	TUMOR 2	TUMOR 3	TUMOR 4
Ubicación			
Tamaño			
Aspecto macroscópico			
Distancia a la lesión de mayor tamaño			

### 3.3 FORMA MACROSCÓPICA DEL TUMOR

- 3.3.1 Exofítico/fungoide
- 3.3.2 Endofítico/Ulcerado
- 3.3.3 Infiltrante/difuso/linitis plástica
- 3.3.4 Anular

- 3.4 TAMAÑO DEL TUMOR: 3.4.1 Menor de 6cm  3.4.2 Mayor de 6cm

## 4. EXAMEN MICROSCÓPICO

### 4.1 TIPO HISTOLÓGICO (OMS 2000)

- 4.1.1 Adenocarcinoma Clásico/Convencional
- 4.1.2 Adenocarcinoma mucinoso (Más del 50% compuesto de mucina)
- 4.1.3 Adenocarcinoma en anillo de sello (Mas del 50% de células en anillo de sello)
- 4.1.4 Carcinoma Adenoescamoso (presencia de componentes glandular y escamoso malignos en porcentajes variables)

- 4.1.5 Carcinoma Medular (sábanas de células epiteliales malignas, sin componente glandular y con presencia de prominente infiltrado linfocitario intraepitelial)
- 4.1.6 Carcinoma Indiferenciado (carcinoma que carece de diferenciación histológica/considerado de alto grado histológico)
- 4.1.7 Carcinoma de células ahusadas (presencia de células malignas fusiformes positivas (al menos de manera focal) para citoqueratina)
- 4.1.8 Carcinosarcoma (presencia de componente fusiforme maligno acompañado a elementos mesenquimales heterólogos)

#### 4.2 GRADO HISTOLÓGICO

- 4.2.1 No aplicable
- 4.2.2 Grado 1 (Bien diferenciado/Bajo grado) componente glandular mayor del 95%
- 4.2.3 Grado 2 (Moderadamente diferenciado/Bajo grado) Componente glandular entre el 50 y el 95%
- 4.2.4 Grado 3 (Pobremente diferenciado/Alto grado) Componente glandular entre el 5 y el 50%

#### 4.3 INFILTRADO LINFOCÍTICO INTRAEPITELIAL

- 4.3.1 > DE 5 LINFOCITOS /CAP (CAMPO DE ALTO PODER)
- 4.3.2 < DE 5 LINFOCITOS /CAP

#### 4.4 EXTENSIÓN DE LA INVASIÓN (SEGÚN CLASIFICACIÓN DE TNM)

- 4.4.1 No puede ser determinado (es biopsia)
- 4.4.2 Limitado a lámina propia (carcinoma In situ. Intraepitelial o invasión de lámina propia)
- 4.4.3 Invasión de la submucosa
- 4.4.4 Invasión de la muscular propia sin atravesarla completamente
- 4.4.5 Invasión de la muscular propia hasta la subserosa
- 4.4.6 Invasión de la serosa, atravesándola e infiltrando otros órganos y estructuras y/o perforando el peritoneo visceral)

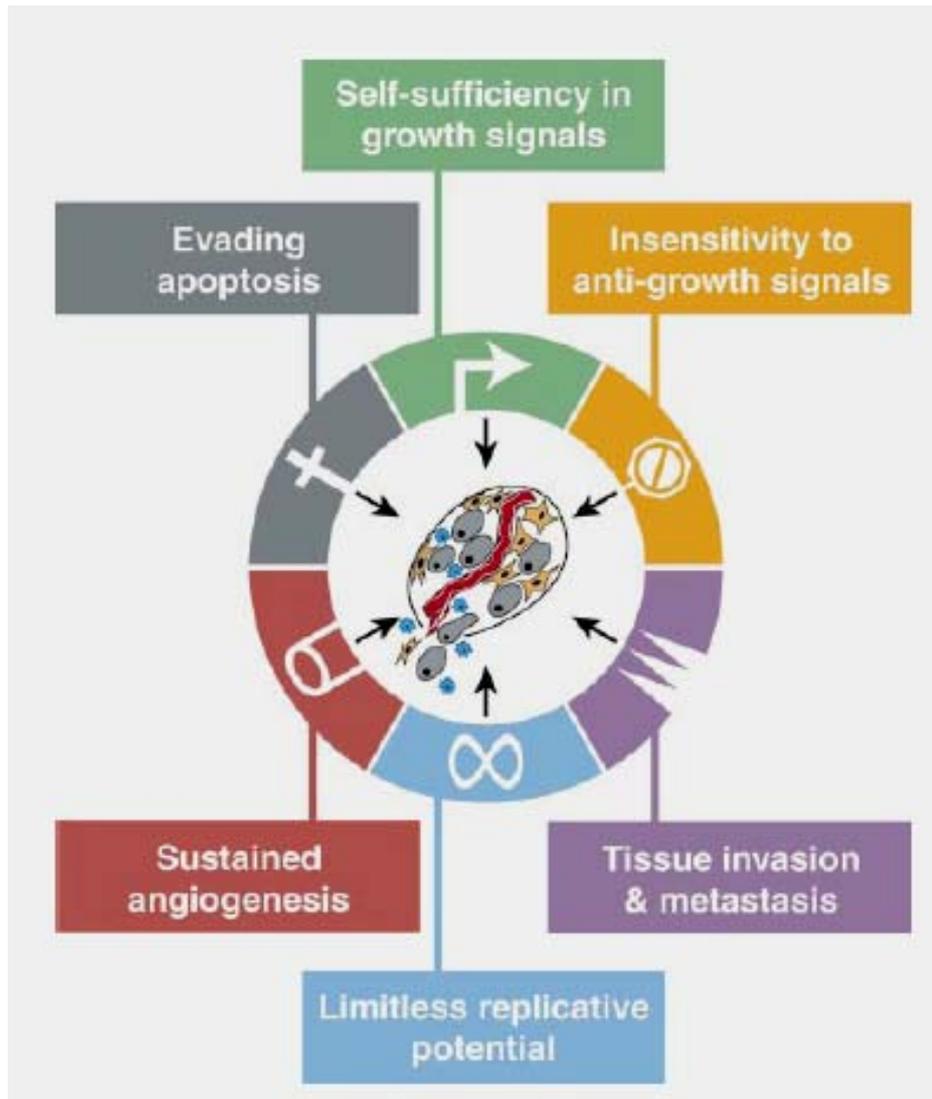
5. LO ANTERIOR CORRESPONDE A UN FENOTIPO DE IMS-A SÍ\_\_ NO\_\_

5. BAT26 CON INESTABILIDAD: SÍ\_\_ NO\_\_ INDETERMINADO (POR  
PROBLEMAS  
TÉCNICOS)\_\_

## GRÁFICOS

Gráfico 1.

### CAPACIDADES DE LA CÉLULA MUTADA



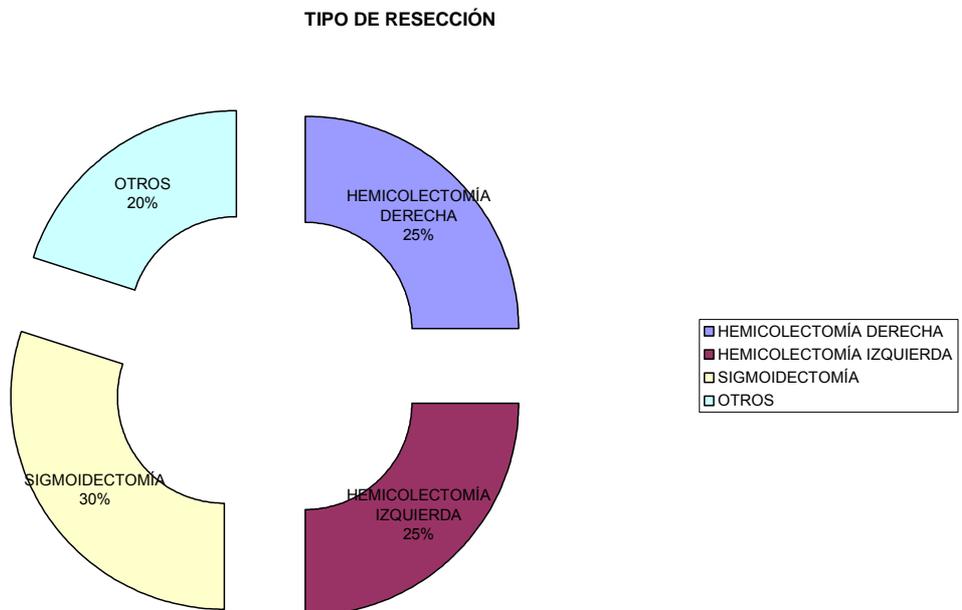
**Gráfico 6.**

### TIPO DE MUESTRA



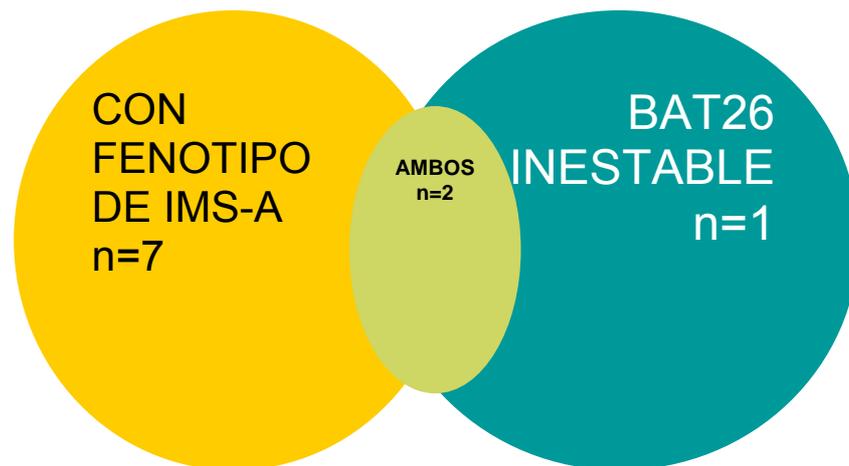
**Gráfico 7.**

### TIPO DE RESECCIÓN



**Gráfico 8.**

**DISTRIBUCIÓN DE CRC CON PRESENCIA DE IMS-A**



**Gráfico 9.**

**CRC NEGATIVOS PARA IMS-A**



Gráfico 10.

COSTOS DEL CCR

