

***Estudio de los cambios en la mucosa colónica de rata y
cinética celular durante la carcinogénesis experimental
inducida con 1,2-Dimetilhidracina***

Carme Piñols Felis

I S B N: 84-89727-64-3
Depósito Legal: S. 54-98

Servei de Publicacions
Universitat de Lleida

*Als meus pares.
A Iñaki*

AGRADECIMIENTOS

Al prof. Joan Viñas i Salas, por asumir la dirección de esta Tesis Doctoral, por su constante estímulo, amistad y apoyo, sin los que no se hubiera podido realizar este trabajo.

Al Dr. Xavier Gómez i Arbonés, por su introducción y ayuda en las técnicas e interpretación de la citometría de flujo y del análisis estadístico.

Al Dr. Ramón Egido, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Arnau de Vilanova, por su dedicación en la revisión histopatológica de las muestras.

Als Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona, y a su personal por su amabilidad y su inestimable ayuda en la realización del estudio de microscopía electrónica

A los compañeros del laboratorio del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, que han hecho más agradable el trabajo diario.

Al sr. Xavier Calomarde por su colaboración en la realización de las microfotografías.

A la Dra. Pilar Biendicho por su ayuda en la microtomía y por brindarme su amistad en las largas horas compartidas en el laboratorio.

A los srs. Manolo Santiago y Emilià Vicente por el cuidado y manejo de los animales.

A Azucena, Ana, Gloria y Carlos de la Biblioteca del Complejo Hospitalario Juan Canalejo por su ayuda en la búsqueda bibliográfica.

A todos los compañeros y amigos del Departament de Medicina i Cirurgia que me han dado su aliento y consejo en los momentos difíciles.

A mis padres, por su estímulo constante y por soportar pacientemente los momentos de desánimo.

A Iñaki... Gracias por todo.

ÍNDICE GENERAL ABREVIATURAS

I. INTRODUCCIÓN

I. 1. CÁNCER DE COLON EN EL HOMBRE

I. 1. 1. EPIDEMIOLOGÍA

1. 1. 1. Patología geográfica

1. 1. 2. Relación entre el colon y el recto

1. 1. 3. diferencias de riesgo entre las poblaciones urbanas y rurales

1. 1. 4. Distribución por edad y sexo

I. 1. 2. FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER COLORRECTAL

1. 2. 1. Razas

1. 2. 2. Nivel socioeconómico

1. 2. 3. Religión

1. 2. 4. Factores ambientales

1. 2. 5. Factores genéticos

1. 2. 6. Antecedentes patológicos y grupos de riesgo

I. 1. 3. DIAGNÓSTICO

1. 3. 1. Manifestaciones clínicas

1. 3. 2. Diagnóstico en el paciente asintomático

1. 3. 3. Diagnóstico en el paciente sintomático

I. 1. 4. ANATOMÍA PATOLÓGICA

1. 4. 1. Características macroscópicas

1. 4. 2. Tipos histológicos

1. 4. 3. Mucosa transicional

I. 1. 5. LOCALIZACIÓN

I. 1. 6. DISEMINACIÓN TUMORAL

I. 1. 7. CLASIFICACIÓN

I. 1. 8. FACTORES PRONÓSTICOS DEL CÁNCER COLORRECTAL

1. 8. 1. Factores pronósticos clínicos

1. 8. 2. Factores pronósticos anatomopatológicos

1. 8. 3. Otras variables pronosticas

I. 2. CARCINOGENESIS COLÓNICA EXPERIMENTAL

I. 2. 1. RAZONES PARA EL USO DE MODELOS EXPERIMENTALES CARCINÓGENOS ANIMALES

I. 2. 2. PRINCIPALES CARCINÓGENOS CONOCIDOS

2. 2. 1. Compuestos relacionados con la cicasina

2. 2. 2. Otros carcinógenos químicos

I. 2. 3. 1,2 -DIMETILHIDRACINA DIHIDROCLORATO (1,2 - DMH)

2. 3. 1. Organotropismo, vías de administración y dosificación

2. 3. 2. Acciones de la DMH

2. 3. 3. teorías carcinogénicas del cáncer de colon inducido por DMH.

Mecanismo de acción

2. 3. 4. Factores constitucionales y regulación

2. 3. 5. Influencia de factores ambientales

2. 3. 6. Expresión de oncogenes

I. 3. MUCOSA COLÓNICA DE RATA NORMAL Y TUMORAL

I. 3. 1. MORFOLOGÍA DE LA MUCOSA COLÓNICA DE RATA

3. 1. 1. Descripción macroscópica

3. 1. 2. Descripción microscópica

- 3. 1. 3. Microscopía electrónica de scanning (MES)
 - I. 3. 2. CINÉTICA CELULAR
 - I. 3. 3. DESCRIPCIÓN DE LAS LESIONES INDUCIDAS CON DMH
 - 3. 3. 1. Categorías macroscópicas
 - 3. 3. 2. Categorías microscópicas
- I. 4. GLICOCONJUGADOS
 - I. 4. 1. GLICOCONJUGADOS CELULARES. PAPEL BIOLÓGICO
 - 4. 1. 1. Glicoproteínas
 - 4. 1. 2. Glicolípidos
 - I. 4. 2. OLIGOSACÁRIDOS DE LOS GLICOCONJUGADOS RELACIONADOS CON LOS GRUPOS SANGUÍNEOS
 - 4. 2. 1. Biosíntesis del sistema ABH, Ii y Lewis
 - 4. 2. 2. Expresión de glicoconjugados y de antígenos de grupo sanguíneo en el epitelio colónico
 - I. 4. 3. TINCIONES HABITUALES DE LOS GLICOCONJUGADOS
 - I. 4. 4. MÉTODOS ESPECÍFICOS DE TINCIÓN
- I. 5. LECTINAS
 - I. 5. 1. DEFINICIÓN
 - I. 5. 2. CLASIFICACIÓN DE LAS LECTINAS
 - I. 5. 3. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LAS LECTINAS
 - I. 5. 4. PROPIEDADES QUÍMICAS DE LAS LECTINAS
 - I. 5. 5. PRINCIPALES APLICACIONES DE LAS LECTINAS
 - 5. 5. 1. Lectinas como reactivos en anatomía
 - 5. 5. 2. Lectinas en patología
 - I. 5. 6. MICROSCOPIA DE LAS LECTINAS
 - 5. 6. 1. Métodos de marcaje de lectinas
 - 5. 6. 2. Lectinas conjugadas con oro coloidal
 - I. 5. 7. LECTINAS USADAS EN EL ESTUDIO
 - 5. 7. 1. *Glycine max* (SBA)
 - 5. 7. 2. *Griffonia simplicifolia* -II
 - 5. 7. 3. *Arachis hypogaea* (PNA)
 - 5. 7. 4. *Ulex europaeus* (UEA-I)
 - I. 5. 8. HISTOQUÍMICA CON LECTINAS DEL COLON NORMAL HUMANO
 - 5. 8. 1. *Glycine max*
 - 5. 8. 2. *Griffonia simplicifolia*-II
 - 5. 8. 3. *Arachis hypogaea*
 - 5. 8. 4. *Ulex europaeus*
 - I. 5. 9. VALOR CLÍNICO DE LAS LECTINAS EN EL CÁNCER COLORRECTAL EN HUMANOS
 - 5. 9. 1. *Glycine max*
 - 5. 9. 2. *Griffonia simplicifolia*-II
 - 5. 9. 3. *Arachis hypogaea*
 - 5. 9. 4. *Ulex europaeus*-I
 - I. 5. 10. LECTINAS Y MUCOSA COLÓNICA DE RATA
- I. 6. CITOMETRÍA DE FLUJO
 - I. 6. 1. CICLO CELULAR
 - I. 6. 2. INTRODUCCIÓN. ASPECTOS HISTÓRICOS
 - I. 6. 3. FUNDAMENTOS TÉCNICOS

- [6. 3. 1. Fuentes de luz](#)
 - [6. 3. 2. Suspensión celular](#)
 - [6. 3. 3. Colorantes](#)
 - [I. 6. 4. PARÁMETROS DE MEDICIÓN](#)
 - [I. 6. 5. APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO](#)
 - [6. 5. 1. Estudio del contenido en ADN y fases del ciclo celular por citometría de flujo](#)
 - [6. 5. 2. Aplicaciones de la cmf en diagnóstico tumoral](#)
 - [6. 5. 3. Pronóstico](#)
 - [6. 5. 4. Tratamiento](#)
 - [I. 6. 6. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA CMF](#)
 - [I. 6. 7. VALOR CLÍNICO Y PRONÓSTICO DE LA CMF EN EL CÁNCER COLORRECTAL HUMANO](#)
 - [II. HIPÓTESIS DEL ESTUDIO](#)
 - [II. 1. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN](#)
 - [II. 2. HIPÓTESIS DEL ESTUDIO](#)
 - [II. 3. OBJETIVOS DEL ESTUDIO](#)
 - [III. MATERIAL Y MÉTODO](#)
 - [III. 1. ANIMALES](#)
 - [III. 1. 1. ANIMALES, ESTABULACIÓN Y DIETA](#)
 - [III. 1. 2. GRUPOS DE ESTUDIO](#)
 - [III. 1. 3. INDUCCIÓN DE TUMORES CON 1,-2-DIMETILHIDRACINA](#)
 - [III. 1. 4. SACRIFICIO](#)
 - [III. 1. 5. RECOGIDA DE MUESTRAS](#)
 - [1. 5. 1. Recogida de muestras para microscopía óptica](#)
 - [1. 5. 2. Recogida de muestras para microscopía electrónica de scanning \(MES\)](#)
 - [III. 2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS](#)
 - [III. 2. 1. FIJACIÓN](#)
 - [2. 1. 1. Fijación para microscopía óptica](#)
 - [2. 1. 2. Fijación para microscopía electrónica](#)
 - [III. 2. 2. PROTOCOLO DE INCLUSIÓN DE LAS MUESTRAS EN PARAFINA](#)
 - [III. 2. 3. PROCESADO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA CONVENCIONAL](#)
 - [2. 3. 1. Protocolo de deshidratación para MES](#)
 - [2. 3. 2. Montaje y recubrimiento](#)
 - [III. 3. MÉTODOS CONVENCIONALES DE TINCIÓN](#)
 - [III. 3. 1. TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA](#)
 - [III. 3. 2. TINCIÓN PAS-AB](#)
 - [III. 4. LECTINAS](#)
 - [III. 4. 1. LECTINAS Y AZÚCARES INHIBIDORES USADOS](#)
 - [III. 4. 2. MÉTODO DE CONJUGACIÓN DE LAS LECTINAS](#)
 - [4. 2. 1. Preparación de las partículas de oro coloidal](#)
 - [4. 2. 2. Conjugación lectina-oro. Incubación con el complejo](#)
 - [III. 4. 3. METODOLOGÍA HISTOQUÍMICA CON LECTINAS CONJUGADAS](#)
 - [4. 3. 1. Procedimiento de incubación para MO](#)
 - [4. 3. 2. Procedimiento de incubación para MES](#)

- III. 4. 4. CONTROLES DE ESPECIFICIDAD
- III. 5. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA
 - III. 5. 1. MICROSCOPIA
 - III. 5. 2. MATERIAL FOTOGRÁFICO
- III. 6. CITOMETRÍA DE FLUJO
 - III. 6. 1. PROCESADO DE LAS MUESTRAS PARA CMF
 - III. 6. 2. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DEL CONTENIDO EN DNA Y CICLO CELULAR
 - 6. 2. 1. Citómetro de flujo
 - 6. 2. 2. Alineamiento del citómetro
 - 6. 2. 3. Lectura por el citómetro de flujo
 - 6. 2. 4. Interpretación de los resultados de la lectura por citometría de flujo
 - 6. 2. 5. Análisis de los histogramas del contenido en ADN mediante el programa informático
- III. 7. VARIABLES DEL ESTUDIO
 - III. 7. 1. IDENTIFICACIÓN DE LOS CASOS
 - III. 7. 2. VARIABLES CLÍNICAS
 - III. 7. 3. VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS
 - III. 7. 4. VARIABLES HISTOQUÍMICAS CON LECTINAS EN MICROSCOPIA ÓPTICA
 - III. 7. 5. VARIABLES HISTOQUÍMICAS CON LECTINAS EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA
 - III. 7. 6. VARIABLES HISTOQUÍMICAS CON LA TINCIÓN AB-PAS
 - III. 7. 7. VARIABLES CONSIDERADAS EN EL ESTUDIO DE CITOMETRÍA DE FLUJO
- III. 8. BASE DE DATOS. TRATAMIENTO DE LA BASE DE DATOS
- III. 9. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS
 - III. 9. 1. COMPARACIÓN DE VARIABLES CUALITATIVAS
 - III. 9. 2. COMPARACIÓN DE VARIABLES CUALITATIVAS Y CUANTITATIVAS
 - III. 9. 3. COMPARACIÓN DE VARIABLES CUANTITATIVAS
- IV. RESULTADOS
 - IV. A. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA UNIVARIANTE
 - IV. A. 1. GRUPO A
 - IV. 1. 1. CARACTERÍSTICAS MACRO Y MICROSCÓPICAS DE LA MUCOSA NORMAL DE RATA
 - 1. 1. 1. Características macroscópicas
 - 1. 1. 2. Características microscópicas
 - IV. 1. 2. VARIABLES HISTOQUÍMICAS CON LECTINAS EN MICROSCOPIA ÓPTICA DE MUCOSA NORMAL
 - 1. 2. 1. *Glycine max*
 - 1. 2. 2. *Griffonia simplicifolia-II*
 - 1. 2. 3. *Arachis hypogaea*
 - 1. 2. 4. *Ulex europaeus*
 - IV. 1. 3. VARIABLES HISTOQUÍMICAS CON LECTINAS EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO
 - 1. 3. 1. *Glycine max*
 - 1. 3. 2. *GSA-II*

1. 3. 3. *Arachis hypogaea*

1. 3. 4. *Ulex europaeus*

IV. 1. 4. VARIABLES HISTOQUÍMICAS CON LA TINCIÓN AB-PAS

IV. 1. 5. CITOMETRÍA DE FLUJO:

IV. 2. GRUPO B

IV. 2. 1. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

2. 1. 1. Características de la mucosa normal de rata inyectada con DMH, microscopía óptica

2. 1. 2. Características de la mucosa normal de rata inyectada con DMH, microscopía electrónica de scanning

2. 1. 3. Descripción de las lesiones neoplásicas con microscopía electrónica de scanning

IV. 2. 2. VARIABLES CLÍNICAS

2. 2. 1. Sexo

2. 2. 2. Localización tumoral

2. 2. 3. Aspecto macroscópico tumoral

2. 2. 4. Tamaño tumoral

IV. 2. 3. VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS

2. 3. 1. Tipo histológico

2. 3. 2. Grado de diferenciación

2. 3. 3. Estadio tumoral (Dukes)

2. 3. 4. Presencia de otros tumores sincrónicos colorrectales

2. 3. 5. Presencia de tumores sincrónicos de intestino delgado

2. 3. 6. Presencia de metástasis

2. 3. 7. Asociación a placa linfoide

IV. 2. 4. VARIABLES HISTOQUÍMICAS CON LECTINAS EN MICROSCOPIA ÓPTICA

2. 4. 1. Marcaje de la mucosa macroscópicamente normal

2. 4. 2. Marcaje de los tumores

2. 4. 3. Marcaje de la mucosa transicional (MT)

IV. 2. 5. VARIABLES HISTOQUÍMICAS CON LA TINCIÓN AB-PAS

2. 5. 1. Tinción de la mucosa normal

2. 5. 2. Tinción de la mucosa tumoral

2. 5. 3. Tinción de la mucosa transicional

IV. 2. 6. CITOMETRÍA DE FLUJO

2. 6. 1. Citometría de flujo de la mucosa macroscópicamente normal

2. 6. 2. Citometría de flujo de los tumores

IV. 3. GRUPO C

IV. 3. 1. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE LA MUCOSA NORMAL DE RATA INYECTADA CON DMH EN ETAPAS PRENEOPLÁSICAS

IV. 3. 2. VARIABLES CLÍNICAS

3. 2. 1. Sexo

3. 2. 2. Localización tumoral

3. 2. 3. Aspecto macroscópico tumoral

3. 2. 4. Tamaño tumoral

IV. 3. 3. VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS

3. 3. 1. Tipo histológico

3. 3. 2. Grado de diferenciación

3. 3. 3. Estadio tumoral (Dukes)

3. 3. 4. Presencia de tumores sincrónicos colorrectales

3. 3. 5. Presencia de tumores sincrónicos de intestino delgado

3. 3. 6. Presencia de metástasis

3. 3. 7. Asociación a placa linfoide

IV. 3. 4. VARIABLES HISTOQUÍMICAS CON LECTINAS EN MICROSCOPIA ÓPTICA

3. 4. 1. Marcaje de la mucosa macroscópicamente normal en etapas pre y neoplásicas

3. 4. 2. Marcaje de la mucosa tumoral

3. 4. 3. Marcaje de la mucosa transicional (MT)

IV. 3. 5. VARIABLES HISTOQUÍMICAS CON LECTINAS EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

3. 5. 1. Marcaje de la mucosa macroscópicamente normal en etapas pre y neoplásicas

3. 5. 2. Marcaje de las lesiones tumorales con lectinas en microscopía electrónica

IV. 3. 6. VARIABLES HISTOQUÍMICAS CON LA TINCIÓN AB-PAS

3. 6. 1. Tinción de la mucosa macroscópicamente normal en etapas pre y neoplásicas

3. 6. 2. Tinción de la mucosa tumoral

3. 6. 3. Tinción de la mucosa transicional

IV. 3. 7. CITOMETRÍA DE FLUJO

IV. 4. GRUPO D

IV. 4. 1. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

4. 1. 1. Características de la mucosa normal de rata inyectada con DMH, microscopía óptica

4. 1. 2. Características de la mucosa normal de rata inyectada con DMH, microscopía electrónica de scanning (MES)

4. 1. 3. Descripción de las lesiones neoplásicas (MES)

IV. 4. 2. VARIABLES CLÍNICAS

4. 2. 1. Sexo

4. 2. 2. Localización tumoral

4. 2. 3. Aspecto macroscópico

4. 2. 4. Tamaño tumoral

IV. 4. 3. VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS

4. 3. 1. Tipo histológico

4. 3. 2. Grado de diferenciación

4. 3. 3. Estadio tumoral (Dukes)

4. 3. 4. Presencia de otros tumores sincrónicos colorrectales

4. 3. 5. Presencia de tumores sincrónicos de intestino delgado

4. 3. 6. Presencia de metástasis

4. 3. 7. Asociación a placa linfoide

IV. 4. 4. VARIABLES HISTOQUÍMICAS CON LECTINAS EN MICROSCOPIA ÓPTICA

- [4. 4. 1. Marcaje de la mucosa macroscópicamente normal](#)
- [4. 4. 2. Marcaje de la mucosa tumoral](#)
- [4. 4. 3. Marcaje de la mucosa transicional](#)
- [IV. 4. 5. VARIABLES HISTOQUÍMICAS CON LA TINCIÓN AB-PAS](#)
 - [4. 5. 1. Tinción de la mucosa normal](#)
 - [4. 5. 2. Tinción de la mucosa tumoral](#)
 - [4. 5. 3. Tinción de la mucosa transicional](#)
- [IV. 5. GRUPO E](#)
 - [IV. 5. 1. ASPECTO MICROSCÓPICO](#)
 - [IV. 5. 2. VARIABLES HISTOQUÍMICAS CON LECTINAS](#)
 - [IV. 5. 3. VARIABLES HISTOQUÍMICAS CON LA TINCIÓN AB-PAS](#)
 - [IV. 5. 4. CITOMETRÍA DE FLUJO](#)
- [IV. 6. DESCRIPCIÓN DE LAS LESIONES TUMORALES](#)
 - [IV. 6. 1. VARIABLES CLÍNICAS](#)
 - [6. 1. 1. Sexo](#)
 - [6. 1. 2. Localización del tumor](#)
 - [6. 1. 3. Aspecto macroscópico](#)
 - [6. 1. 4. Tamaño tumoral](#)
 - [IV. 6. 2. VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS](#)
 - [6. 2. 1. Tipos histológicos](#)
 - [6. 2. 2. Grado de diferenciación tumoral](#)
 - [6. 2. 3. Grado de invasión de la pared \(Estadio de Dukes\)](#)
 - [6. 2. 4. Presencia de otros tumores sincrónicos colorrectales](#)
 - [6. 2. 5. Presencia de tumores sincrónicos en intestino delgado](#)
 - [6. 2. 6. Presencia de metástasis](#)
 - [6. 2. 7. Tumores colorrectales que asientan sobre placas linfoides](#)
 - [IV. 6. 3. VARIABLES HISTOQUÍMICAS CON LECTINAS EN MICROSCOPIA ÓPTICA](#)
 - [6. 3. 1. Marcaje de la mucosa normal](#)
 - [6. 3. 2. Marcaje de la mucosa tumoral](#)
 - [6. 3. 3. Marcaje de la mucosa transicional](#)
 - [IV. 6. 4. VARIABLES HISTOQUÍMICAS CON LECTINAS EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA](#)
 - [6. 4. 1. Marcaje de la mucosa macroscópicamente normal en etapas pre y neoplásicas](#)
 - [6. 4. 2. Marcaje de las lesiones tumorales con lectinas en microscopía electrónica](#)
 - [IV. 6. 5. TINCIÓN DE LA MUCOSA TUMORAL CON TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS CONVENCIONALES \(tinción de AB-PAS\)](#)
 - [IV. 6. 6. CITOMETRÍA DE FLUJO](#)
- [IV. B. ESTUDIO ESTADÍSTICO](#)
 - [IV. B. 1. VARIABLES TUMORALES](#)
 - [IV. 1. 1. COMPARACIÓN DE LAS VARIABLES CLÍNICAS Y EL RESTO DE VARIABLES](#)
 - [1. 1. 1. Sexo](#)
 - [1. 1. 2. Localización](#)

- 1. 1. 3. Aspecto macroscópico
- 1. 1. 4. Tamaño tumoral
- IV. 1. 2. COMPARACIÓN DE LAS VARIABLES ANATOMO-PATOLÓGICAS Y EL RESTO DE VARIABLES
 - 1. 2. 1. Comparación de las variables anatómo-patológicas entre sí
 - 1. 2. 2. Comparación de las variables anatomopatológicas e histoquímicas
 - 1. 2. 3. Comparación entre las variables anatomopatológicas y el resultado por citometría de flujo
- IV. 1. 3. COMPARACIÓN DE LAS VARIABLES HISTOQUÍMICAS Y EL RESTO DE VARIABLES
- IV. 1. 4. COMPARACIÓN DEL RESULTADO DEL ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO CON EL RESTO DE VARIABLES
 - 1. 4. 1. Comparación entre las semanas de tratamiento y el resultado por citometría de flujo
 - 1. 4. 2. Comparación entre el resultado por citometría de flujo y el resto de variables anatómo-patológicas
- IV. 2. COMPARACIÓN ENTRE LOS GRUPOS
 - IV. 2. 1. VARIABLES CLÍNICAS
 - 2. 1. 1. Sexo
 - 2. 1. 2. Localización
 - 2. 1. 3. Aspecto macroscópico
 - 2. 1. 4. Tamaño tumoral
 - IV. 2. 2. VARIABLES ANATOMO-PATOLÓGICAS:
 - 2. 2. 1. Tipo histológico
 - 2. 2. 2. Grado de diferenciación tumoral
 - 2. 2. 3. Estadio de Dukes
 - 2. 2. 4. Presencia de tumores sincrónicos colorrectales
 - 2. 2. 5. Presencia de tumores sincrónicos de intestino delgado
 - 2. 2. 6. Presencia de metástasis
 - 2. 2. 7. Presencia de placa linfoide
 - IV. 2. 3. VARIABLES HISTOQUÍMICAS
 - IV. 2. 4. CITOMETRÍA DE FLUJO
 - 2. 4. 1. Comparación entre los grupos de estudio y el resultado por citometría de flujo

V. DISCUSIÓN

V. 1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS

V. 1. 1. CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER COLORRECTAL INDUCIDO CON DMH

V. 1. 2. CARACTERÍSTICAS DE LAS LESIONES BENIGNAS INDUCIDAS CON DMH

V. 1. 3. FOCOS Y LESIONES DE PREDISPLASIA

V. 1. 4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE SCANNING

V. 2. EXPRESIÓN DE GLICOCONJUGADOS

V. 2. 1. MICROSCOPIA ÓPTICA

2. 1. 1. Mucosa normal

2. 1. 2. Lesiones neoplásicas

2. 1. 3. Mucosa macroscópicamente normal de ratas inyectadas con

DMH

2. 1. 4. Mucosa transicional

V. 2. 2. GLICOCONJUGADOS DE LA SUPERFICIE EPITELIAL

2. 2. 1. Mucosa normal

2. 2. 2. Mucosa tumoral

2. 2. 3. Mucosa macroscópicamente normal de ratas inyectadas con

DMH

V. 3. CITOMETRÍA DE FLUJO

V. 3. 1. VALOR DEL ESTUDIO DEL CONTENIDO EN ADN DE LAS
NEOPLASIAS COLÓNICAS INDUCIDAS EXPERIMENTALMENTE CON
1,2-DIMETILHIDRACINA EN LA RATA

V. 3. 2. VALOR DEL ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR
POR CITOMETRÍA DE FLUJO

VI. CONCLUSIONES

VII. RESUMEN

VIII. BIBLIOGRAFIA

IX. ANEXO

Abreviaturas

AB: tinción de azul alcian
ABH: sistema de grupos sanguíneos ABH (O)
ABO: sistema de grupos sanguíneos ABO
Ac: anticuerpo
ACS: *American Cancer Society*
ADN: ácido desoxirribonucleico
Ag: antígeno
AINE: antiinflamatorio no esteroide
AM: azoximetano
AOM: azoximetanol
APC: poliposis colónica adenomatosa (ing. *adenomatous polyposis coli*)
ARN: ácido ribonucleico
ARNasa: ribonucleasa
ARNm: ARN mensajero
BGA: antígenos de grupo sanguíneo (ing. *blood group antigens*)
BPA: lectina *Bauhinia purpurea*
BSE: electrones retrodispersados (ing. *backscattered electrons*)
CCHNP: cáncer colorrectal hereditario no polipósico
CEA: antígeno carcinoembrionario
CMF: citometría de flujo
Con-A: concanavalina A
CV: coeficiente de variación
DBA: lectina *Dolichos biflorus*
DMAB: 2'3 dimetil-4-aminobifenil
DMH: 1,2-Dimetilhidracina clorhidrato
DI: índice de DNA
DS: desviación standard
EDTA: ácido etilendiaminotetracético
FITC: isotiocianato de fluoresceína
Fuc: L-Fucosa
Gal: galactosa
GalNAc: N-acetilgalactosamina
Glc: glucosa
GlcNAc: N-acetilglucosamina
GSA-I: lectina *Griffonia simplicifolia-I*
GSA-II: lectina *Griffonia simplicifolia-II*
HE: coloración de hematoxilina-eosina
HPA: lectina *Helix pomatia*
Ig: inmunoglobulina
IL-2: interleuquina 2
IP: índice de proliferación
LBA: lectina *Phaseolus lunatus*
LCA: lectina *Lens culinaris*
LOH: pérdida de heterocigosidad (ing. *loss of heterozygosity*)
MAM: metilazoximetanol
Man: manosa
ME: microscopía electrónica

MET: microscopía electrónica de transmisión
MES: microscopía electrónica de scanning
MH: metilhidracina
MNNG: N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina
MNU: N-metlnitrosourea
MO: microscopía óptica
MPA: lectina *Maclura pomifera*
NeuAc: ácido siálico
OD: densidad óptica
PAS: reacción del ácido periódico de Schiff.
PBS: amortiguador (*buffer*) fosfato salino
PEA: lectina *Pisum sativum*
PEG: Polietilenglicol p.m. 20.000
PIE: punto isoeléctrico
PI: yoduro de propidio
PNA: lectina *Arachis hypogaea*
QFIA: análisis de imagen cuantitativa fluorescencia.
SBA: lectina *Glycine max*
SBH: proteínas hemaglutinantes de soja.
s.c.: subcutáneo
SJA: lectina *Sophora japonica*
SNC: sistema nervioso central
STA: lectina *Solanum tuberosum*
TC: tomografía computarizada
TAg: antígeno de Thomsen-Friedenreich
Tk: linfocitos T agresores (ing. *Killer*)
TNM: tumor-adenopatía-metástasis (ing. *tumor, node, metastasis*)
UEA-I: lectina *Ulex europaeus-I*
UEA-II: lectina *Ulex europaeus-II*
WGA: lectina *Triticum vulgares*

I. Introducción

I.1. Cáncer de colon en el hombre

I. 1. 1. Epidemiología

El cáncer colorrectal es, según estimaciones recientes, la tercera neoplasia en orden de frecuencia en la población mundial y supone casi el 15% de todos los nuevos cánceres (1). La incidencia es más elevada en los países occidentales y, en Europa, es la tercera neoplasia más frecuente, después del cáncer de pulmón y próstata en los hombres y la segunda después del de mama en mujeres (2).

En España la incidencia global es de 10 por 100.000 personas (3). En cuanto a la mortalidad, en nuestro medio representa la segunda o tercera causa de muerte por cáncer según los diferentes registros. En Cataluña se observa un aumento de la mortalidad por cáncer de colon en la última década, permaneciendo estable la de recto (4).

Una persona a los 50 años presenta un riesgo de un 5% de padecer un cáncer de colon antes de los 80 años y un riesgo de 2,5% de morir de él (5). Esto implica que sea actualmente uno de los problemas de salud pública más importante en cancerología.

1. 1. 1. Patología geográfica

La comparación internacional de las tasas de incidencia muestra variaciones importantes en el riesgo de padecer cáncer según las diferentes zonas geográficas. Las tasas de incidencia más elevadas corresponden a las áreas económicamente más desarrolladas del mundo occidental. Para el cáncer de colon, las zonas con incidencia más elevada son América del Norte, Canadá, Australia, Nueva Zelanda y el noroeste de Europa (6). Las diferencias más notables son la baja tasa observada en Japón (7) y en poblaciones negras subsaharianas africanas. Los emigrantes japoneses en Estados Unidos adquieren dentro de la misma generación tasas mucho más elevadas que las de su país de origen. Además los hijos de emigrantes de países europeos de bajo riesgo tienen tasas igual de elevadas que otros blancos estadounidenses. Estos datos sustentan que las causas de diferencias internacionales son ambientales y no genéticas (8).

1. 1. 2. Relación entre el colon y el recto

Al parecer existe un acusado paralelismo entre las incidencias del cáncer de colon y de recto en las diferentes poblaciones. En la década de los 70 quedó claro que la incidencia de los cánceres de colon y de recto se fue desviando desde un predominio del cáncer de recto a un predominio del cáncer de colon. La causa de este cambio de incidencia es desconocida. Alrededor del 10% de los casos y el 80% de los fallecimientos por cáncer de intestino grueso son debidos al cáncer de colon, el resto se localizan el recto. Estudios recientes han demostrado un desplazamiento proximal altamente significativo en la localización del cáncer colorrectal en las dos últimas décadas (9).

No ha habido cambios destacados en la incidencia o mortalidad del cáncer colorrectal en los últimos 50 años (8).

1. 1. 3. diferencias de riesgo entre las poblaciones urbanas y rurales

Una de las características más importantes de la epidemiología del cáncer colorrectal

es el elevado riesgo que presentan las poblaciones urbanas. En las zonas de riesgo elevado las diferencias no son tan evidentes como en las zonas de bajo riesgo, por el incremento más rápido de la incidencia en las zonas rurales (10).

1. 1. 4. Distribución por edad y sexo

En el cáncer colorrectal la incidencia aumenta exponencialmente con la edad. En las áreas de riesgo elevado, se observa un predominio del cáncer de colon en el sexo femenino antes de los 60 años. En la mayoría de los registros de cáncer, el cáncer de recto es más frecuente en el sexo masculino en todas las edades. Ajustado por edades y localizaciones la proporción de carcinomas es similar en ambos sexos (11). En España, la incidencia por sexos es similar, con afectación máxima a partir de los 65 años (3).

I. 1. 2. Factores de riesgo del cáncer colorrectal

1. 2. 1. Razas

Hasta el año 1950 las incidencias sobre personas de color fueron sensiblemente más bajas que sobre blancos, pero posteriormente los primeros han ido aumentando mientras que los segundos han permanecido constantes de modo que actualmente la incidencia es aproximadamente la misma en ambas razas (8). El aumento de la incidencia del cáncer de colon entre los negros constituye un argumento en contra del posible papel de la raza en la génesis del cáncer colorrectal (10).

1. 2. 2. Nivel socioeconómico

Se ha mencionado que las clases sociales altas tienen un riesgo más elevado de padecer cáncer de colon en relación con las clases sociales bajas, especialmente en el sexo masculino. Sin embargo, los estudios en que se ha encontrado esta relación provienen fundamentalmente de poblaciones de bajo riesgo. Se ha comprobado también que en las poblaciones de riesgo elevado del mundo occidental existen pocas diferencias entre los diversos grupos socioeconómicos. Monnet et al. (12) han descrito que los pacientes que viven en casas no confortables tienen un riesgo 2 veces más alto de morir durante el periodo de seguimiento que aquellos pacientes que viven en casas confortables siendo el riesgo relativo de 1,5 para la categoría de confort medio. Este efecto fue más remarcable en pacientes con estadios precoces que en pacientes con estadios avanzados.

1. 2. 3. Religión

Otro indicador del papel de los factores ambientales en la etiología del cáncer colorrectal proviene de las publicaciones sobre diferentes estudios religiosos, basados en sus costumbres alimenticias y consumo de tabaco y alcohol (13), (14).

1. 2. 4. Factores ambientales

a. Grasa dietética

Varios estudios epidemiológicos han demostrado que dietas ricas en grasa total y animal están generalmente asociadas con riesgo incrementado para cáncer de colon en el hombre (15), (6), aunque un reciente estudio prospectivo no confirma el papel de la grasa dietética total en la etiología del cáncer de colon (16).

Las dietas ricas en grasas contienen cantidades mayores de aminas heterocíclicas (a

partir de las proteínas de la carne) y de facilitadores como consecuencia de la cocción a una temperatura más elevada (el hecho de cocinar con grasa produce una temperatura más elevada que cuando se cocina con agua) (17).

Específicamente, la grasa incrementa la producción de ácido biliar, y en último término aumenta la exposición de la mucosa del intestino a los efectos tóxicos, tróficos y facilitadores de los ácidos biliares (especialmente, secundarios) (18).

Las dietas con aceites de pescado parecen tener efecto protector sobre el cáncer de colon (19).

b. Fibra dietética

El papel de la fibra dietética en la carcinogénesis del colon fue propuesto por primera vez por Burkitt (20) en 1969. La idea surgió de su observación clínica de que el cáncer de colon (y otras alteraciones) era raro en los africanos, cuyas dietas eran ricas en alimentos no procesados.

Posteriormente, diversos estudios epidemiológicos analíticos han demostrado la asociación de la fibra con un menor riesgo de padecer cáncer colorrectal (21) -(22). En estudios recientes se ha descrito que la más consistente e impresionante disminución del riesgo se ha asociado con el consumo de verduras (23) -(24), para algunos autores, superior al de fibra, cereales o fruta; siendo un hallazgo no limitado a verduras específicas o a grupos de verduras (17). Además, independientemente del efecto de la fibra, las verduras contienen un gran número de sustancias, tanto micronutrientes como carotenoides y ascorbato, como no nutrientes, caso de los fenoles, los flavonoides, los isocianatos y los indoles, con una diversidad de potentes propiedades anticarcinógenas.

La fibra se une a los ácidos biliares, disminuye el tiempo de tránsito, aumenta el volumen de las heces y fermenta los ácidos grasos volátiles que pueden ser directamente anticarcinógenos (25) y que, disminuyendo el pH, pueden reducir la conversión de los ácidos biliares primarios en secundarios (26) -(28).

c. pH fecal

Thornton (29) propuso que un pH colónico alto promueve la formación de cocarcinógenos a partir de ácidos biliares degradados por bacterias o colesterol, un proceso inhibido a pH fecal inferior a 6,5.

De los estudios de Walker et al.(30) se desprende que las personas que son familiarmente proclives y son pH fecal alto deberían ser aconsejadas a comer más fibra vegetal para disminuir el valor de su pH fecal.

d. Consumo de alcohol

Desde finales de los años 60, son muchos los trabajos que describen una relación entre el carcinoma rectal y el consumo de alcohol(31), sobre todo cerveza; sin embargo, el colon en sí parece afectarse en menor medida. Un consumo de alcohol relativamente bajo, de un litro de cerveza al día, duplica o triplica el riesgo de desarrollar un carcinoma colorrectal.

Estudios de experimentación animal parecen demostrar que aunque el alcohol no es un carcinógeno en sí mismo, posee un efecto favorecedor del desarrollo de cáncer, es decir co-carcinogénico(32). El alcohol actuaría desplazando los inhibidores de la dieta(33).

e. Calcio

Se ha propuesto que el calcio disminuye el riesgo de cáncer de colon a través de su unión a los ácidos biliares y ácidos grasos, reduciendo así la exposición a estas sustancias potencialmente tóxicas y carcinógenas (34) -(35). Además el calcio puede disminuir

directamente la proliferación celular(17), (36) -(38). Estudios realizados por Newmark et al.(39), sugieren un efecto protector con dosis de 1500 a 1800 mg/día.

f. Metales trazadores

En los últimos años el papel de los metales trazadores se ha hecho más importante, en estudios de laboratorio y clínicos en oncología. Estudios clínicos sostienen que la deficiencia de selenio puede jugar un papel en la oncogénesis(40) y que la abundancia geográfica del Se está relacionada indirectamente con tasas más bajas de mortalidad de cáncer(41) -(43).

g. Vitaminas

Se ha descrito una asociación negativa entre consumo de vitamina C y riesgo de cáncer de colon(33),(44) ,(45). El consumo de vitamina A y sus precursores dietéticos se asocia con una reducción del cáncer de colon(46). La vitamina A actuaría bloqueando la formación de radicales libres(47). Shibata et al.(48) en un estudio prospectivo encuentran que el riesgo disminuido de padecer cáncer de colon con suplementos de vitaminas A y C sólo es significativamente estadístico en mujeres.

También los suplementos de vitaminas A, C y E se ha descrito que son efectivos para reducir las alteraciones de la cinética celular que indican una condición preneoplásica(49).

h. Grado de actividad física

Diversos estudios indican que el riesgo relativo de padecer cáncer de colon aumenta en relación con la disminución del grado de actividad física desarrollado durante el trabajo(10),(50). La actividad ocupacional vigorosa muestra una reducción del riesgo de cáncer de colon en hombres(51).

1. 2. 5. Factores genéticos

Diversos estudios sugieren que los factores genéticos juegan un papel importante en la etiología del cáncer colorrectal(52).

En la población general, la mayoría de los casos de cáncer colorrectal se presenta de forma esporádica. Sin embargo, se calcula que aproximadamente un 5-6% de los casos aparecen en familias con predisposición genética a padecer este tipo de neoplasia. El prototipo de estos cánceres sería la poliposis adenomatosa colónica familiar (APC, del inglés, *adenomatous polyposis coli*), una enfermedad de herencia autosómica dominante que se caracteriza por el desarrollo de numerosos pólipos colorrectales benignos, de los cuales, algunos acaban malignizándose casi inevitablemente. Aunque gran parte de las características esenciales de esta enfermedad se conocen desde hace más de 100 años, su base patogenética es un descubrimiento reciente que fue posible sólo gracias a las técnicas de biología molecular. En efecto en 1987, se localizó el gen responsable de la poliposis adenomatosa colónica familiar en el brazo largo del cromosoma 5, a nivel de 5q21 ó 5q22(53) -(58). Aunque la poliposis adenomatosa colónica familiar es responsable de menos del 1% de todos los cánceres colorrectales, hoy en día se sabe que su gen tiene trascendencia clínica mucho mayor, ya que participa también en las fases iniciales del cáncer colorrectal esporádico (no familiar), aunque en algunas familias con poliposis no ha podido detectarse la presencia de este gen defectivo (59).

También se han descrito mutaciones germinales del gen APC en pacientes que tenían el síndrome de Gardner, una variante de la poliposis familiar en la que, además de los adenomas colorrectales, se desarrollan tumores desmoides, osteomas y otras neoplasias.

Pueden definirse 3 tipos de cáncer colorrectal, en base a historia familiar de cáncer e

información fenotípica. El tipo esporádico se produce en ausencia de historia familiar de cáncer de colon en familiares de primer grado. El tipo familiar se produce si existen familiares de primer grado con neoplasia. Aunque estas categorías requieren la exclusión de cáncer colorrectal hereditario. En este caso, se define como historia familiar de cáncer colorrectal en un patrón con herencia autosómica dominante, que también implica ciertos signos fenotípicos, como por ejemplo, adenomatosis colónica florida, lesiones benignas y malignas extracolónicas, neoplasias primarias múltiples; particularmente, cáncer colorrectal sincrónico y metacrónico(60).

El síndrome de Lynch tipo I presenta una predisposición hereditaria al cáncer de colon y edad de comienzo temprana (alrededor de los 44 años), con una propensión (70%) a la afectación del colon proximal, y un exceso de cáncer de colon sincrónicos y metacrónicos. Mientras que el síndrome de Lynch tipo II, presenta un fenotipo de colon similar junto con alto riesgo de carcinoma de endometrio. También se presentan en algunas familias el carcinoma de células transicionales del uréter y pelvis renal, y carcinoma de estómago, ovario y páncreas. Las estimaciones actuales indican que el cáncer colorrectal polipósico no hereditario (CCHNP) puede suponer hasta un 6% del total de los cánceres colorrectales. No existe ningún signo fenotípico premonitorio conocido o biomarcadores de la propensión al carcinoma en los síndromes de Lynch(61). Sin embargo, recientemente se han descubierto dos genes responsables del CCHNP, que son genes reparadores de ADN. El gen hMSH2, situado en el cromosoma 2, es responsable del 60% de los tumores de este tipo. El otro gen, el hMLH1, está localizado en el cromosoma 3 y es responsable del 20-30% de los casos(62).

Figura 1-1,(67)

Se conocen además cuatro tipos de alteraciones genéticas relacionadas con el cáncer colorrectal:

1. Cambio en el contenido en ADN y errores en la replicación del mismo en secuencias nucleótidas repetidas(63).
2. Pérdida completa del cromosoma 18(64), reordenación estructural del 17, conduciendo a menudo a la pérdida de un brazo corto, y pérdida del brazo largo del cromosoma 5.
3. Activación por mutación puntual de los oncogenes celulares *ras*. Esta activación se produce más frecuentemente para el *c-Ki-ras* y más raramente para el *N-ras*. Se han descrito mutaciones puntuales en los codones 12 y 13 y 61(65) -(68).
4. Sobreexpresiones de determinados oncogenes como *c-myc*, *c-myb* o *c-erbB2/neu* o proteína p53(7).

1. 2. 6. Antecedentes patológicos y grupos de riesgo

En la tabla siguiente se indican los grupos de riesgo más elevado para el cáncer colorrectal. Algunos aspectos han sido comentados previamente en los factores genéticos o ambientales, por lo que no se insistirá en ellos.

| |
|--|
| Riesgo medio |
| Edad |
| 50 años o más, asintomático |
| Alto riesgo |
| Enfermedad inflamatoria intestinal |
| Colitis ulcerosa |
| Colitis granulomatosa |
| Poliposis adenomatosa familiar |
| Poliposis familiar |
| Síndrome de Gardner |
| Síndrome de Turcot |
| Síndrome de Oldfield |
| Poliposis juvenil |
| Cáncer colorrectal hereditario no polipoide |
| Síndrome del cáncer familiar |
| Cáncer colorrectal no hereditario sitio-específico |
| Historia familiar |
| Adenoma colorrectal |
| Cáncer colorrectal |
| Historia previa |
| Adenomas colorrectales |
| Cáncer colorrectal |
| Cáncer de mama, ovario y útero |

Tabla 1-1

Factores de riesgo para cáncer colorrectal

a. Antecedentes de pólipos

La secuencia adenoma-carcinoma ha sido generalmente aceptada, y es una de las bases fundamentales de los recientes estudios genéticos moleculares así como de screening y prevención.

El riesgo de presentar cáncer de colon dependen del tipo histológico, tamaño y

número de adenomas. Los adenomas con componente vellosos o de tamaño superior a 1 cm. tienen un riesgo aumentado de 3,6 veces, y los que presentan adenomas múltiples grandes tienen un riesgo de 6,6 veces más. En contraste un adenoma tubular o pequeños adenomas múltiples sin displasia severa no aumentan el riesgo de cáncer de colon(1).

En un estudio multicéntrico llevado a cabo por Eddy et al.(68) se puso de manifiesto que el 93% de los cánceres colorrectales aparecían sobre pólipos adenomatosos. También describieron que los cánceres sobre pólipos adenomatosos tenían un tiempo de crecimiento desde 1 cm. a cáncer invasivo de 7 años, con un rango de 0-14 años y que cerca del 5% de los adenomas que alcanzan 5 mm. desarrollarán un cáncer invasivo. También que un cáncer invasivo alcanza el estadio Dukes A en dos años, el B en 1 año y el C en otro año.

La distribución anatómica de los adenomas apoya además la idea de su potencial maligno. Los adenomas del colon descendente distal y del sigma tienen una frecuencia más elevada de malignización que los que aparecen en otros puntos del colon; esto se correlaciona muy bien con la distribución del cáncer de intestino grueso(10).

Los familiares en primer grado de pacientes con poliposis colónica familiar presentan una incidencia considerablemente aumentada de cáncer colorrectal, iniciándose alrededor de los 20 años(70).

b. Enfermedad inflamatoria intestinal

La enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn se asocian a riesgo elevado de padecer neoplasia de intestino grueso. De 980 pacientes con enfermedad de Crohn de afectación colónica, 13,5% desarrollaron estenosis. La frecuencia de cáncer en pacientes con estenosis es de 6,8%(71).

Los pacientes con colitis ulcerosa tipo pancolitis tienen un riesgo aumentado de desarrollar cáncer de colon. Este riesgo empieza a subir después de 10 años de enfermedad y aumenta un 2% por año(7),(72).

c. Patología biliar previa

La actividad carcinogénica de algunos componentes de la bilis se ha descrito previamente al estudiar los factores ambientales.

Se ha supuesto, por lo tanto, que las personas colecistectomizadas podían tener un riesgo más elevado de desarrollar cáncer de intestino grueso, debido al flujo continuo de bilis en el tracto digestivo. De hecho una revisión detallada del tema no ha demostrado una relación evidente entre colecistectomía y riesgo de padecer cáncer de intestino grueso considerado globalmente, si bien hay indicios a favor de un aumento de riesgo para el cáncer de colon derecho en las mujeres(73).

I. 1. 3. Diagnóstico

1. 3. 1. Manifestaciones clínicas

El cáncer colorrectal habitualmente es silente durante un largo periodo de tiempo que incluye las fase iniciales de su desarrollo en la pared intestinal(74).

La existencia de un carcinoma colorrectal debe sospecharse en base a datos de una historia clínica cuidadosa. Los síntomas de alarma son básicamente los cambios inexplicables en el hábito intestinal, sangre en heces, tenesmo, descarga de moco, síndrome anémico crónico con microcitosis y ferropenia, y afectación del estado general con pérdida de peso. La progresión local de la enfermedad puede producir obstrucción, especialmente en el sigma, hemorragias y perforaciones, que empeoran notablemente el pronóstico. En el caso de

oclusiones o perforación intestinal, se presenta el cuadro de forma aguda y el diagnóstico de la neoplasia suele hacerse durante el acto quirúrgico.

Los síntomas variarán, obviamente, según la localización del tumor. Los tumores de colon derecho, que presentan una menor expresión clínica, raramente producen obstrucción ya que existe un calibre mayor de la luz colónica y las heces son más líquidas, habitualmente se manifestarán por anemia microcítica ferropénica, pérdida de peso y tumoración palpable en fosa ilíaca y vacíos derechos, aunque en no pocas ocasiones se manifiestan con dolor no siempre localizado en el lado derecho, que puede ser agravado o aliviado con las comidas, y que puede ser confundido con el dolor de la úlcera péptica o de una coleditiasis. Los tumores sigmoides debutan clínicamente con un cuadro de obstrucción en casi el 30% de los pacientes. Si existe dolor, es típicamente cólico, suele aliviarse con las deposiciones y se localiza preferentemente en la parte baja del abdomen. El carcinoma rectal produce rectorragias en el 60% de los casos y tenesmo en el 75%, y ocasionan dolor con poca frecuencia, pero cuando la tumoración rectal engloba los nervios pélvicos puede manifestarse con dolor sacro o cialgia, y acompañarse de incontinencia(3).

1. 3. 2. Diagnóstico en el paciente asintomático

Diversos métodos han sido propuestos para ser aplicados en el cribaje del cáncer colorrectal en las poblaciones de medio o alto riesgo de padecerlo tales como el tacto rectal, el estudio de la presencia de sangre oculta en heces y diferentes métodos endoscópicos o radiológicos.

De estos métodos el más simple es el tacto rectal al cual son asequibles los tumores localizados a menos de 8 cm. del esfínter anal, lo que significa aproximadamente el 10-13% de los cánceres colorrectales(75). No existe evidencia de que esta técnica reduzca la mortalidad, pero por su simplicidad es obligada en toda exploración médica.

Los test de hemorragias ocultas en heces se han empleado como método de screening de población en algunos países. Las ventajas que presenta el estudio de sangre oculta se centran en que es un método simple, de bajo coste y que permite diagnosticar tumores en estadios menos avanzados(76) pero aún disponemos de pocos trabajos que demuestren que la aplicación de éste método de detección descienda la mortalidad por cáncer colorrectal(77). Sus principales inconvenientes son su relativamente baja sensibilidad y especificidad que obligan a veces a poner en marcha toda una serie de estudios complementarios para descartar la existencia de un cáncer(78).

Los estudios endoscópicos tienen una alta sensibilidad (85-95%), el porcentaje de falsos positivos es despreciable y además aportan la ventaja de que las lesiones observadas pueden ser biopsiadas confirmando el diagnóstico y en ocasiones pueden ser técnicas terapéuticas (polipectomías)(79). Sus principales inconvenientes son las molestias para el paciente y el alto coste que supone cualquier campaña de diagnóstico precoz que asumiera esta técnica para un amplio grupo de población. Además, existe en el caso de la colonoscopia el riesgo de perforación de un 0,2%, requiriendo cirugía y con una mortalidad de un 7,5%(74). Las técnicas de *screening* mediante sigmoidoscopia se ha visto que reducen la mortalidad por cáncer de recto y colon distal(80).

Dentro de las técnicas radiológicas, el enema con doble contraste es el que ofrece una mayor sensibilidad (85%) con sólo un 3-4% de falsos positivos. Pero tiene el inconveniente de las molestias para el paciente, alto coste y la desventaja frente a las técnicas endoscópicas de que no permite un diagnóstico histológico y sus hallazgos deberán ser casi siempre confirmados con endoscopia-biopsia(81).

La *American Cancer Society* (ACS) recomienda practicar un screening en los

pacientes asintomáticos que presentan riesgo aumentado de padecer cáncer colorrectal consistente en un tacto rectal anual, un test de sangre oculta en heces anual y una sigmoidoscopia cada 5 años(82). Recientes estudios, describen la utilidad de una única sigmoidoscopia flexible realizada entre los 55 y los 60 años de edad en la prevención del cáncer colorrectal, con un seguimiento colonoscópico adecuado en el 3-5% de casos que presentan adenomas de alto riesgo (> 1 cm. o histología vellosa). La sigmoidoscopia como screening debería identificar a la mayoría de personas con adenomas distales que tienen probabilidades de desarrollar un cáncer(82). El screening de personas asintomáticas sin factores de riesgo conocidos no está justificado en la actualidad(5).

1. 3. 3. Diagnóstico en el paciente sintomático

Una vez el paciente ya presenta algunos de los síntomas previamente descritos, partimos de un diagnóstico clínico de sospecha y ponemos en marcha una serie de pruebas complementarias para confirmar el diagnóstico.

La mayoría de autores coinciden en que la secuencia más habitual de maniobras diagnósticas en el paciente sintomático es el tacto rectal, la proctosigmoidoscopia rígida o flexible, la colonoscopia y el enema de bario simple o de doble contraste. Estas últimas técnicas radiológicas son muy útiles en tumores inaccesibles, por diferentes motivos con la colonoscopia y para valorar la existencia de otras lesiones metacrónicas(81),(71) ,(84).

La ecografía y la TC sola o asociada a técnicas de angiorradiología como la portografía se usan como pruebas complementarias en el diagnóstico de extensión(85).

Desde el punto de vista analítico, el antígeno carcinoembrionario (CEA) está generalmente elevado en el cáncer colorrectal. No se ha demostrado su utilidad en el diagnóstico precoz, pero es muy útil para la predicción de recidivas antes de que exista evidencia clínica de éstas, facilitando la eficacia de las intervenciones secundarias(86).

I. 1. 4. Anatomía patológica

1. 4. 1. Características macroscópicas

Desde el punto de vista macroscópico, los carcinomas colorrectales adoptan predominantemente dos formas: ulcerada y polipoidea. La forma más frecuente es la de tumor ulcerado, que suele infiltrar por lo menos hasta la submucosa, es de bordes sobreelevados y puede perforarse y formar fístulas.

Los tumores polipoides, de crecimiento exofítico, son menos frecuentes y suelen corresponder a tipos histológicos de bajo grado y menos infiltrantes. Probablemente por estas últimas razones los tumores polipoideos se asocian a un mejor pronóstico que las formas ulcerativas. Estos tumores se encuentran preferentemente en el colon derecho(87).

En raras ocasiones los tumores colorrectales adoptan una forma de crecimiento con engrosamiento difuso y rígido de la pared intestinal, con escasa manifestación en la superficie luminal, similar a la linitis plásica del estómago.

Los carcinomas colorrectales pueden ser múltiples en el 3-6% de los casos, aunque en algunas series esta cifra se eleva al 18%(88) -(90). Además el 20% de los pacientes con cáncer colorrectal presentan adenomas sincrónicos(91). Esta cifra aumenta al 66% cuando existe más de una neoplasia maligna(90).

1. 4. 2. Tipos histológicos

1. 4. 2. 1. Adenocarcinoma

El tumor más frecuente en el intestino grueso es el adenocarcinoma. Su incidencia

global oscila entre el 75 y el 85% según las series(88),(92).

Histológicamente, se caracteriza por la formación de glándulas con mayor o menor grado de diferenciación.

Los adenocarcinomas se dividen según el grado de diferenciación en adenocarcinomas bien diferenciados, moderadamente diferenciados y poco diferenciados.

El grado de diferenciación de los adenocarcinomas se establece fundamentalmente en base a la arquitectura o la configuración tubular o el grado de polaridad nuclear. Los adenocarcinomas bien diferenciados presentan túbulos simples o complejos con aspecto pseudocribiforme, las células suelen mantener cierta polaridad con los núcleos basales y son de tamaño uniforme(93). Los adenocarcinomas moderadamente diferenciados muestran túbulos simples, complejos o ligeramente irregulares, cuya polaridad nuclear se pierde o es difícilmente identificable. Los adenocarcinomas poco diferenciados se caracterizan por la presencia de glándulas irregulares o ausencia de su formación, con pérdida de polaridad nuclear. Basándose en estos criterios, el 15-20% de los adenocarcinomas son bien diferenciados, el 60-70% moderadamente diferenciados y el 15-20% poco diferenciados(94).

1. 4. 2. 2. Carcinoma mucinoso

La producción de material mucoide por los adenocarcinomas intestinales es un hecho frecuente.

Deben distinguirse dos formas de carcinomas mucosectores: a) el carcinoma coloide o mucinoso, caracterizado por grandes cantidades de moco situado preferentemente fuera de las células, y b) una variante más rara, constituida por células con moco intracitoplasmático y núcleos localizados periféricamente, dispuestos individualmente o en forma de grupos sueltos y difusamente extendidos a lo largo de toda la pared, del tipo células en *anillo de sello*(95). Histológicamente, la característica de este tumor es la presencia de una gran reacción desmoplásica que engloba a las células tumorales, las cuales muestran la imagen típica en *anillo de sello*. También pueden observarse glándulas abortivas o células pequeñas indiferenciadas.

El carcinoma mucinoso constituye aproximadamente el 15-16% de los tumores colorrectales(96).

1. 4. 2. 3. Carcinoma de células pequeñas

El carcinoma de células pequeñas colorrectal es un tumor muy infrecuente que histológicamente se parece al carcinoma de células pequeñas de pulmón(97). Algunos de estos casos pueden presentar focos de diferenciación glandular o mucina. También pueden encontrarse en relación con adenomas (45%). Estudios inmunohistoquímicos y ultraestructurales han permitido establecer la naturaleza neuroendocrina de estos tumores, ya que son positivos para marcadores neuroendocrinos como la enolasa neuronal específica y la cromogranina, entre otros. En la mayoría de los casos se localizan en el colon ascendente(98).

1. 4. 2. 4. Otros tipos histológicos

El carcinoma escamoso puro de intestino grueso es un tipo histológico extremadamente raro. La incidencia de este tumor es poco conocida, pero puede oscilar entre el 0,25 y el 0,50%(99).

El carcinoma adenoscamoso es un tipo histológico que está constituido por elementos glandulares y escamosos entremezclados. Su frecuencia es también baja(93).

Se han descrito algunos casos de adenocarcinomas colorrectales con diferenciación a coriocarcinoma(100). Estos tumores presentan áreas de adenocarcinoma que coexisten con áreas de diferenciación trofoblástica con presencia de células gigantes multinucleadas de tipo

sincitiotrofoblástico y en las que se puede demostrar la producción de gonadotropina coriónica.

Se han descrito casos aislados de otros tipos histológicos raros, como el carcinoma de células claras o de tipo nefrogénico(88), el carcinoma phisialífero que se caracteriza por una estructura papilar con presencia de células semejantes al cordoma(101). En estos últimos años se han publicado casos de tumores intestinales con una diferenciación histológica multidireccional. Así, se han descrito casos de adenocarcinoma con abundantes células endocrinas que contenían serotonina, somatostatina, gastrina y otros péptidos, y casos de carcinoma adenoscamoso con diferenciación carcinoide(102).

En el apéndice, el tumor más frecuente es el carcinoide. El adenocarcinoma de apéndice puede desarrollarse como mucocele y, en casos excepcionales, producir implantes peritoneales en forma de pseudomixoma(3).

1. 4. 3. Mucosa transicional

La mucosa transicional o mucosa adyacente al tumor colónico se ha observado que muestra alteraciones ultraestructurales e histoquímicas respecto a la mucosa normal alejada del tumor. Histológicamente, las glándulas de la mucosa transicional (MT) están alargadas y ramificadas(103). Se observa aumento de las sialomucinas y alteración en las proporciones relativas de los distintos tipos celulares a lo largo de la cripta con persistencia de células inmaduras en niveles altos de las criptas. Las células caliciformes están aumentadas en número y tamaño(104).

El significado biológico de la mucosa transicional no está claro(105). Inicialmente se pensó que podría ser un respuesta preneoplásica a un estímulo carcinogénico a partir del cual se desarrollaría la neoplasia, pero algunos estudios inmunohistoquímicos describen un origen no neoplásico de la mucosa transicional(106).

I. 1. 5. Localización

La localización por orden de frecuencia es, en primer lugar, en el recto (50%), seguido de sigma (20%), colon derecho y ciego (12%), ascendente (5%), transversa (6%), y descendente (7%)(3) (Figura 1-2).

I. 1. 6. Diseminación tumoral

Los tumores colorrectales presentan cuatro vías clásicas de crecimiento: la extensión local, la diseminación por vía linfática, la diseminación hematogena y la implantación. En la extensión local, el carcinoma crece hacia la luz o bien extramuralmente. Otra forma de crecimiento local, es la invasión perineural que explica el dolor que refieren algunos pacientes.

La diseminación a través de la vía linfática se produce de forma escalonada y depende de la localización de la tumoración. Los tumores rectales dan metástasis primariamente a nivel de los ganglios perirrectales y posteriormente a los hemorroidales. La vía normal de diseminación de los tumores de colon se realiza de forma escalonada a través de los ganglios pericólicos, intermedios, y finalmente, de los ganglios principales situados en la raíz de los vasos mesentéricos, pasando luego a los ganglios periaórticos.

Las metástasis por vía hematogena afectan prácticamente siempre al hígado, siendo la localización pulmonar la segunda en orden de frecuencia. El recto presenta un drenaje venoso especial: las venas hemorroidales superiores que drenan al sistema porta y por tanto hacia el hígado y las venas hemorroidales inferiores que drenan hacia la cava y por tanto la sangre que

proceda de las mismas alcanza los pulmones sin pasar por el filtro hepático.

Existe una tercera vía de drenaje a nivel rectal que se realiza a través de un plexo venoso vertebral y las metástasis por esta vía se localizan en sacro-coxis, pelvis y columna vertebral.

La implantación es un sistema de metástasis en el cual existe una liberación de células tumorales viables que se depositan en otra superficie. Puede ser intraluminal al desprenderse células de la superficie externa del tumor al interior de la luz y anidar en otro punto de la superficie intestinal. Si el desprendimiento de células se produce desde la superficie serosa del tumor la implantación se hará a nivel de la cavidad peritoneal (carcinomatosis peritoneal). Finalmente pueden desprenderse células tumorales durante la manipulación quirúrgica del tumor y pueden producirse implantes a nivel de la herida quirúrgica, en los márgenes mucocutáneos de una colostomía y en cualquier punto de campo operatorio(74).

I. 1. 7. Clasificación

El carcinoma de colon es el tumor digestivo que tiene la relación situación anatomopatológica/pronóstico mejor establecida.

En 1927, Lockhart-Mummery, al observar una relación entre el pronóstico y la extensión de los tumores rectales, sugirió una clasificación clínica que posteriormente fue modificada para incluir en ella datos patológicos(107).

Más tarde, Dukes modificó los criterios y desarrolló un sistema para la clasificación anatomopatológica del carcinoma rectal. En el sistema de clasificación original propuesto por Gordon-Watson y Dukes la profundidad de penetración en la pared intestinal era valorada según el grado de invasión de las capas normales de la pared intestinal. Simpson y Mayo usaron una modificación de la clasificación de Dukes de 1929-1930 para ayudar a analizar los factores que influyen en la supervivencia en el carcinoma del colon por encima del recto-sigma.

No obstante Dukes comprendió que estos sistemas de clasificación eran excesivamente complicados para los cánceres rectales avanzados que solían verse en el St. Marks Hospital. En 1932 propuso el sistema de clasificación actualmente vigente:

- Grado A de Dukes: "Los casos A son aquellos en los cuales el carcinoma está limitado a la pared del recto sin haberse extendido al tejido extrarrectal y sin haber metástasis en ganglios linfáticos".
- Grado B: "Los casos B son aquellos en los cuales el carcinoma se ha extendido por continuidad a los tejidos extrarrectales, pero todavía no ha invadido los ganglios regionales".
- Grado C: "Los casos C son aquellos en los cuales las metástasis están presentes en los ganglios linfáticos regionales".

En 1935 Gabriel, Dukes y Bussey propusieron su única modificación al sistema de clasificación anteriormente descrito. Los casos en los cuales estaban invadidos únicamente los ganglios linfáticos regionales o en los que como mínimo la propagación no había alcanzado los ganglios en el punto de ligadura de los vasos sanguíneos se clasificaron como C₁. Los casos en los que la propagación ganglionar había alcanzado el punto de ligadura de los vasos sanguíneos se clasificaron como C₂.

En 1949 Kirklin, Dockerty y Waugh(108) introdujeron una modificación en la clasificación de Dukes: las lesiones A estaban limitadas a la mucosa; las lesiones B₁ se extendían a la *muscularis* propia, pero no la atravesaban; las lesiones B₂ penetraban a través de la *muscularis* propia, y las lesiones C eran las del tipo B₁ ó B₂ con invasión ganglionar linfática.

En 1954 Astler y Coller propusieron una modificación al sistema anterior, las lesiones

C eran aquellas que contenían metástasis ganglionares linfáticas, pero fueron subdivididas en categorías C₁ y C₂. Las lesiones C₁ estaban limitadas a la pared intestinal con ganglios positivos.

En 1967 Turbull et al. añadieron un cuarto estadio a la clasificación original de Dukes(109), el estadio D que define metástasis tumorales en hígado, pulmón, hueso, siembra de tumor, tumor inextirpable por invasión parietal o invasión a órganos adyacentes. A esta clasificación puede añadirse dos nuevos tipos: D₁ y D₂. D₁ incluiría tumores que podrían tener posibilidades quirúrgicas de curación (invasión de órganos adyacentes, metástasis hepática o pulmonar solitaria) y D₂ incluiría las lesiones irresecables (metástasis hepáticas múltiples o hepáticas más pulmonares, metástasis en médula ósea, etc.)(8).

La última clasificación TNM, es un sistema clinicopatológico, propuesto conjuntamente por la *Unión Internacional contra el Cáncer* (UICC) y el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), tiene en cuenta la invasión de estructuras vecinas, además del número de ganglios positivos: T₁, invasión de la submucosa; T₂, invasión de la muscularis propia; T₃, invasión de la subserosa o tejido perirrectal no peritonizado; T₄, perforación del peritoneo visceral o invasión directa de otros órganos o estructuras vecinas; N₀, sin metástasis en los ganglios linfáticos regionales; N₁, metástasis en 1-3 ganglios regionales; N₂, metástasis en 4 ó más ganglios regionales; N₃, metástasis en cualquier ganglio central; M₀, sin metástasis a distancia; y M₁, metástasis a distancia. Posteriormente, la clasificación original fue modificada puesto que la extensión del carcinoma de colon no podía valorarse por completo clínicamente en el momento de la intervención quirúrgica y se añadieron una serie de prefijos a la clasificación TNM para relacionarla con la extensión de la enfermedad en localizaciones y momentos dados. Se relacionan a continuación: cTNM, estadio diagnóstico clínico; sTNM, estadio de evaluación quirúrgica; pTNM, estadio patológico postquirúrgico; rTNM, estadio en retratamiento; y aTNM, estadio en autopsia.(107),(110). Esta clasificación TNM norteamericana ha sido considerada por muchos demasiado compleja para su uso habitual.

I. 1. 8. Factores pronósticos del cáncer colorrectal

El estudio de los factores pronósticos mejora nuestro conocimiento de la historia natural de la enfermedad, ayuda a comprender mejor sus mecanismos y a evaluar nuevas formas de tratamiento(111).

Definiremos dos grandes grupos de factores pronósticos: uno, formado por los factores pronósticos clínicos, que pueden ser obtenidos a través de la historia clínica o mediante la exploración del paciente, y una segunda categoría de variables pronósticas anatomopatológicas, que se establecen a partir del estudio de la biopsia o de la pieza de resección quirúrgica.

1. 8. 1. Factores pronósticos clínicos

a. Sexo

Las mujeres tienen una supervivencia más alta que los varones en la mayoría de los tumores malignos. Las mujeres tienen una mayor esperanza de vida y por tanto una menor mortalidad por todas las causas.

En relación al cáncer colorrectal, hay algunos estudios que demuestran una mejor supervivencia de las mujeres(112), mientras otros autores no encuentran diferencias significativas(113),(114). En análisis multivariantes, el sexo se demuestra como un factor pronóstico independiente, hallándose siempre el sexo femenino asociado a una mayor supervivencia(115). Algunos autores han observado que el efecto beneficioso para la

condición femenina sólo se observa en las mujeres que han estado embarazadas(116).

b. Raza

Diversos estudios realizados en Estados Unidos, encuentran un peor pronóstico en los pacientes de raza negra, diagnosticados de cáncer, en comparación con los de raza blanca(117). Este efecto de la raza sobre la supervivencia se ha observado en prácticamente todas las neoplasias, y por tanto, también en el cáncer colorrectal. Los blancos afectados de un cáncer colorrectal, tienen un riesgo de mortalidad más bajo que los de raza negra a lo largo de toda la evolución de la enfermedad, y que las diferencias se mantienen dentro de las distintas categorías del estadio tumoral, sexo, edad y nivel socioeconómico, únicamente la primera permanece como variable pronóstica significativa(118).

c. Edad

La edad inferior a 30-35 años en el momento del diagnóstico se relaciona con un pronóstico desfavorable según los autores(119). Este hecho ha sido atribuido a que en estas edades el 60-80% de los casos son diagnosticados en estadios Dukes C y con metástasis. Las formas histológicas de mal pronóstico tales como los adenocarcinomas mucinosos y adenocarcinomas con células en anillo de sello son más frecuentes en los pacientes jóvenes (hasta un 80%)(94) mientras que en los adultos son raras (5-15%). En un 40-50% de enfermos jóvenes los tumores son mal diferenciados, y el 50% está localizado en el colon derecho, lo que comporta un diagnóstico más tardío al presentar síntomas vagos como anemia o dolor abdominal(120), vómitos, distensión abdominal y aproximadamente un 70% se diagnostican por obstrucción(121).

También se ha atribuido el mal pronóstico de los jóvenes al predominio del sexo masculino en este grupo.

Parece ser sin embargo, que si los tumores colorrectales se diagnostican en un estadio precoz, el pronóstico no es peor que el de los pacientes de mayor edad(110).

La edad avanzada es también un factor que ensombrece el pronóstico del cáncer colorrectal y de todos los tumores malignos en general, aunque es necesario ajustar la mortalidad observada por la mortalidad esperada en un grupo de personas de la misma edad y sexo.

En los pacientes de edad avanzada, el cáncer colorrectal no es más agresivo que en otras edades, sin embargo, la edad avanzada puede conllevar ciertas limitaciones terapéuticas puesto que los efectos secundarios de los tratamientos son más frecuentes, produciendo una disminución de la supervivencia(122). De todos modos estudios recientes han sugerido que la edad en sí no debe ser un factor determinante al considerar la conveniencia de una intervención en pacientes con cáncer colorrectal.

d. Síntomas

La sintomatología con que se presenta la enfermedad, a menudo está relacionada con el estadio. La hemorragia o el cambio de ritmo intestinal suelen ser síntomas asociados con estadios más iniciales y por tanto, con mejor pronóstico, mientras que la anemia, la palpación de una masa abdominal o una perforación u oclusión intestinal, son síntomas que ocurren en estadios más avanzados.

Cuando el paciente está totalmente asintomático, como sucede en personas que son diagnosticadas en un programa de screening, el pronóstico es mucho mejor que en los pacientes con síntomas, la supervivencia es de un 75% a 80%, mientras que para los pacientes sintomáticos es del 50% a los cinco años(80).

Hemorragia

La hemorragia es un factor de buen pronóstico en la mayoría de trabajos que han analizado esta variable, si bien no es un factor pronóstico independiente de estadio(123).

Obstrucción intestinal

La obstrucción intestinal como primera manifestación de un cáncer de colon o recto es relativamente frecuente, y supone un factor de mal pronóstico.

Las causas que explican este mal pronóstico son, entre otras, el estadio avanzado del tumor, la gran actividad peristáltica del intestino ocluido que facilita la diseminación tumoral, y una mortalidad operatoria superior al 15%. La mortalidad operatoria es menor en el colon izquierdo, pero llega a alcanzar cifras del 29% en el colon derecho(124),(125).

Si el tumor oclusivo está situado en el colon derecho, el pronóstico es peor que en el colon izquierdo. Por otra parte los tumores obstructivos de colon derecho tienen una supervivencia tres veces menor que los tumores no obstructivos de la misma localización(126).

La perforación intestinal, que con frecuencia se asocia a la oclusión, también es una circunstancia que comporta un pronóstico muy desfavorable incluso independiente del estadio(127).

e. Intervalo entre el primer síntoma y el diagnóstico

El retraso diagnóstico es un factor que puede condicionar el pronóstico. Se ha comprobado que los pacientes con un retraso largo (de aproximadamente 5-6 meses), tienen un mejor pronóstico que los enfermos con menor retraso(128). Este hecho, paradójico a primera vista, se cree que es debido a que los tumores con sintomatología de menos de 6 meses de evolución tienen una mayor mortalidad operatoria, una tasa de cirugía radical más baja, y además se asocian con síntomas de mal pronóstico como la obstrucción y perforación intestinal.

f. Localización del tumor

Los tumores localizados en el colon tienen mejor pronóstico que los tumores rectales. Dentro de las localizaciones colónicas, algunos estudios muestran un pronóstico más favorable para el colon derecho en relación al izquierdo(129), sin embargo, otros autores demuestran lo contrario, con un pronóstico especialmente grave en los tumores de ciego. En los tumores de colon derecho hay una menor proporción de estadios Dukes A y un mayor número de estadios avanzados que en las otras localizaciones del colon(130), lo que explicaría su menor supervivencia a los 5 años.

Estos resultados discordantes podrían explicarse por la historia natural más larga de los tumores de colon izquierdo y sigma, en los que se han descrito recidivas y muertes más allá de los 5 años del diagnóstico, circunstancia que es más rara en los tumores de colon derecho y transverso.

g. Variables clínicas preoperatorias

En un estudio del *Medical Research Council* de Gran Bretaña(131), la movilidad del tumor al tacto digital o a la exploración endoscópica, fue la variable preoperatoria más importante en los tumores de recto, seguida del número de cuadrantes afectados y que la distancia entre el tumor se localizara a menos de 8 cm. del esfínter.

h. Tamaño del tumor

En la mayoría de tumores malignos el tamaño tumoral está relacionado con el

pronóstico y también ocurre así en el cáncer colorrectal, y especialmente en los tumores de colon existiendo una correlación entre el tamaño y el nivel de penetración tumoral en la pared del intestino; que como es sabido, tiene una importancia pronóstica considerable(132). Steinberg et al.(123) en su estudio señalan que existe un incremento del riesgo de mortalidad del 7% por centímetro de longitud tumoral.

i. Morfología tumoral

Los tumores exofíticos tienen un mejor pronóstico que los tumores anulares, ulcerados o desmoplásicos(133).

1. 8. 2. Factores pronósticos anatomopatológicos

a. Nivel de penetración del tumor en la pared del intestino

Los pacientes con tumores en grado A de Dukes sobreviven más del 80% (80-95%) a los 5 años. Los del nivel B, solamente de un 40 a 60%, y el nivel C menos del 40%(134).

b. Número de ganglios positivos

La supervivencia se reduce progresivamente según el mayor número de ganglios afectados y en algunos estudios es un factor significativo para la supervivencia(135).

c. Invasión de órganos vecinos

La clasificación TNM, citada anteriormente, ha mostrado su utilidad pronóstica, en los diferentes subgrupos, con supervivencia a los 5 años del 91% para el estadio T₁, 84% para el T₂, 63% para los T₃-T₄, 56% para el N₁, 38% para el N₂, y 34% para el N₃ (136),(137).

Nathanson et al.(138) en un artículo de revisión llegan a la conclusión de que la clasificación de Dukes continúa siendo válida, si bien para mejorar su sensibilidad pronóstica, deberían incluir el porcentaje de ganglios positivos, la presencia o ausencia de ulceración del tumor primario y la invasión de las estructuras vecinas. Deans et al.(107) en su estudio de factores pronósticos en el cáncer colorrectal concluyen que la clasificación de Dukes sigue siendo el mejor predictor de la supervivencia después de transcurrido más de 60 años.

d. Histología

El adenocarcinoma mucinoso o coloide tiene una tasa de recidivas superiores al adenocarcinoma puro y se diagnostica con mayor frecuencia en estadios Dukes C y con metástasis. La supervivencia de la variante mucinosa es menor que la del adenocarcinoma no mucinoso(139),(140), aunque existen discrepancias al respecto. Los estudios de Halvorsen et al(96), sugieren que la presencia de componentes mucinosos probablemente no implican un peor pronóstico excepto cuando se trata de un carcinoma con células en *anillo de sello*.

e. Grado de diferenciación

Diversos estudios han puesto de manifiesto la importancia del grado histológico como variable pronóstica independiente en el cáncer colorrectal(107).

f. Invasión vascular

La invasión vascular reduce de forma significativa la supervivencia de los pacientes con cáncer colorrectal independientemente del estadio y el grado de diferenciación(141). Se ha observado una correlación entre la invasión vascular y la existencia de metástasis hepáticas y también con la invasión perineural. Algunos estudios muestran un peor pronóstico de la invasión intramural de los capilares por el tumor y otros, sin embargo,

recogen que la invasión de las venas próximas al tumor tiene un efecto más ominoso(142).

1. 8. 3. Otras variables pronosticas

a. Contenido de ADN y ploidia del tumor

Esta variable se estudia ampliamente en el apartado 6. 7. de la introducción.

b. Antígeno carcinoembrionario

Un nivel sérico alto de antígeno carcinoembrionario (CEA) en los pacientes que no han sido operados tiene un significado pronóstico desfavorable, ya que las cifras de CEA reflejan, de alguna manera el volumen y la extensión del tumor. Los pacientes con valores de CEA inferiores a 200 ng/ml tienen una supervivencia estimada del 50% a los 5 años(143),(144).

Tomando la cifra de 5 ng/ml como el valor a partir del cual consideramos positivo el CEA, se ha comprobado que sólo un 26% de pacientes con CEA positivo puede ser intervenido de forma radical, mientras que si el CEA es negativo el porcentaje de cirugía radical se eleva al 72%(13).

También se ha demostrado que los pacientes con un CEA positivo tienen tumores en fases más avanzadas (53% son estadios C cuando el CEA es positivo y 21% cuando es negativo)(145).

c. Determinantes genéticos:

La pérdida de heterocigosidad (LOH) de los cromosomas 17p, 18q y 22q es detectada con más frecuencia en carcinomas avanzados que en carcinomas intramucosales, y LOH de 17p está significativamente correlacionado con la invasión vascular y LOH 18q está correlacionado con la invasión linfática y metastásica(146). La pérdida de un alelo del cromosoma 18q parece predecir un pobre pronóstico en pacientes con cáncer de colon en estadio II. La tasa de supervivencia a los 5 años de los pacientes con enfermedad en estadio II y 18q intacto es del 93%, y en los que presentan pérdida es comparable a los enfermos con estadio III(147).

Las deleciones alélicas de Nm23-H1, un gen asociado con bajo potencial metastásico localizado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q21.3-22), están significativamente asociadas con comportamiento más agresivo de los carcinomas colorrectales(148).

Las acumulaciones citoplasmáticas de la proteína p53 en los carcinomas colorrectales es un indicador pronóstico independiente de supervivencia global, pero con un análisis adicional con ploidia de ADN, el indicador p53 es significativo sólo respecto a la supervivencia libre de enfermedad(149). Otro estudio confirma estos resultados en cuanto a la supervivencia a corto plazo(150).

Los errores en la replicación del ADN se asocian a crecimiento exofítico, mayor tamaño, pobre diferenciación, producción extracelular de mucina, reacción linfoide tipo Crohn, y mayor expresión del gen p53 por inmunohistoquímica(63).

I. 2. Carcinogénesis colónica experimental

I. 2. 1. Razones para el uso de modelos experimentales carcinógenos animales

Es evidente, como en otros campos, que la única respuesta satisfactoria al problema de la neoplasia maligna es su prevención. Esto necesariamente implica y demanda un cabal conocimiento de los aspectos básicos de la carcinogénesis.

Se cree que los tumores inducidos químicamente (autóctonos) en los roedores son los mejores modelos que tenemos a nuestro alcance para obtener resultados transferibles a la

situación clínica.

Una de las razones para su utilización es la gran dificultad en realizar estudios prospectivos de variaciones ambientales en humanos, puesto que la tasa de crecimiento es extremadamente lenta y la edad avanzada de aparición de la neoplasia necesitarían de un periodo muy largo de seguimiento de una población expuesta para establecer cualquier evidencia epidemiológica de causalidad(18).

También debemos señalar que, aunque los tumores en muchos órganos aparecen de forma natural o pueden ser producidos fácilmente, las neoplasias de intestino de origen natural en animales, son extremadamente raras(151). La escasa frecuencia de los tumores de intestino, fue indicada ya en 1938 por Wells et al.(152), con la demostración de 19 ejemplos de carcinoma intestinal en 142.000 autopsias de ratón. Tampoco existen cepas de ratas o hámsters seleccionadas por su susceptibilidad para carcinoma intestinal espontáneo, del mismo modo que las hay para leucemia o tumores mamarios. Se encuentra una excepción con el *Sanguinus oedipus*, un primate nativo de Sudamérica que presenta una enfermedad del colon genéticamente relacionada; consistente en tumores no polipoides que crecen de novo en el epitelio mucosal, semejando cáncer colorrectal no polipoides hereditario o cáncer originado en pacientes no portadores de pólipos con colitis ulcerosa. Los tumores están localizados en el colon derecho en un 60%. Esta raza en particular está protegida y no está disponible para investigación de cáncer(153).

De este modo, para un satisfactorio trabajo en el laboratorio son claramente necesarias las lesiones producidas experimentalmente(154). Estos modelos reproducibles aportan la oportunidad de estudiar la enfermedad y permiten al investigador manipular ciertas variables tales como dieta, anatomía del colon, factores microbiológicos y parámetros inmunológicos que pueden demostrarse como importantes en la etiología del cáncer de colon(155).

Por consiguiente, los modelos animales nos permiten estudiar las influencias que pueden modificar el inicio y desarrollo del cáncer de colon bajo condiciones estrictamente controladas y diseñar las analogías apropiadas para aproximarnos al entendimiento de la etiología y también para conseguir los fines de prevención, diagnóstico y mejor manejo del cáncer de colon en el hombre.

I. 2. 2. Principales carcinógenos conocidos

Los tumores de intestino han sido inducidos por distintos carcinógenos(156), que se han desarrollado principalmente en estos últimos 40 años.

En la Tabla 1-2 se recogen los principales carcinógenos químicos así como el/los investigadores que desarrollaron su uso y conocimiento, los animales susceptibles a los mismos y el órgano diana de la acción carcinogénica.

| | | | | |
|---|-------------------------------|----------------|-------------------------|--|
| Isótopo Itrio 91 | Rata | or | Tubo digestivo | Lisco, Brues, Finkel, Hansen, 1947 |
| Irradiación por Rx | Rata | general | Mucosa intestinal | Brecher, Cronkite Peers, 1953 |
| Irradiación por neutrones rápidos | Rata | general | Mucosa intestinal | Nowell, Cole, y Ellis, 1956 |
| 1,2-Dibezantreno | Rata | or | Intestino | Lorenz y Stewart, 1941 |
| 20-Metilcolantreno | Rata | or | Intestino | Stewars, 1953 |
| Aceite lubricante | Rata | or | Intestino | Lushsbaugh y Hackett, 1948 |
| 20-Metilcolantreno | Rata | ir | I. G. | Rack, Kaufman, Simeone, 1955 |
| Alcohol | Rata | ir | I. G. | Krebs, 1928 |
| 20-Metilcolantreno | Rata | sc | I. G. | Millers, Pybus, 1955 |
| 2- Acetamidofluoreno | Rata | | Intestino | Cox, 1937. Bielschowsky 1944. Dunn y Kessel 1945. Simeonides, 1954. Morris, 1955 |
| Bencidina (4,4-Diaminofenil) | Rata | | Oído, hígado, intestino | Spitz, Magninan, Dobriner, 1950 |
| N-N-Dimetil-aminodifenil | Rata | | Intestino | Miller, Miller, Sandin y Brown, 1947 |
| 3,2-Dimetil-4-aninodifenil | Rata | sc, or | I. D. e I. G. | Walpole y Williams, 1958 |
| Cicasina | Rata | or | I. G. | Laqueur, 1963 |
| 1,2-Dimetilhidracina | Rata, ratón, hamster | or, sc, ip, ir | I. D. e I. G. | Druckrey, 1967 |
| Azoximetano | Rata, ratón | or, sc, ir | I. D. el. I. G. | Druckrey, 1970 |
| Metilazoximetano | Rata | or, sc, ip, ir | I. D. el. I. G. | Druckrey, 1970 |
| N-metil-N ³ -nitro-N-nitrosguanidina | Rata, ratón, conejo de indias | ir | I. G. distal | Narisawa, 1971 |

| | | | | |
|--------------------------|-------------------------------|--------|---------------|----------------|
| 3- Metil- N-nitrosourea | Rata, ratón, conejo de indias | ir | I. G. distal | Narisawa, 1971 |
| 3-Metil-2-aminonaftaleno | Rata | or, sc | I. D. e I. G. | |
| 3-Metilcolantreno | Hamster | or | I.G. | |

or= oral sc=subcutáneo ip=intraperitoneal ir=intrarrectal I. D.=intestino delgado I.G.=intestino grueso

Tabla 1-2

Principales carcinógenos conocidos.

Los tumores animales producidos por carcinógenos deben seguir unos criterios para su utilización como modelos para estudios epidemiológicos y quimioterapéuticos(157).

1. Aparición unilocular del tumor.
2. Período de incubación tumoral relativamente corto, bien definido y con pequeña desviación tumoral.
3. Tumor diagnosticable en el tiempo.
4. Biología tumoral paralela a su equivalente humano.
5. Quimiosensibilidad paralela a su equivalente humano(164) -(166).

Los carcinógenos químicos colónicos pueden ser clasificados en 7 grupos en base a su estructura química, tal como se muestra en la tabla siguiente:

| FAMILIA QUÍMICA | CARCINÓGENO |
|--|---|
| Hidracinas | 1, 1 - Dimetilhidracina (1,1-DMH) 1,2 - Dimetilhidracina dihidrocloruro (1,2-DMH) Metilhidracina (MH) Acido fórmico 2-4-(5-nitro-2-furil)-2-tiazolilhidracida (FAH) 1-Metil-2-butilhidracina dihidrocloruro (MBH) Trimetilhidracina hidrocloruro (TMH) |
| Compuestos azoxi | Azoximetano (AM) ONN-Metilazoxibutano (MAB) Metilazoximetanol (MAM) Metilazoximetanol glucósido, cicasina (MAMG) |
| Compuestos N-Nitroso | N-Metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) N-Metilnitrosourea (NMU) N-Nitrosobis (2-hidroxiopropil) amina (BHP) N-Nitrosobis (2-oxopropil) amina (BOP) |
| Dextrano sulfato y polisacáridos relacionados | Asbestos |
| Aflatoxina | |
| Aminas ariles y heterocíclicas | 3,2'-Dimetil-4-aminobifenil (DMAB) |

| | |
|--|----------------------------------|
| | 2-Amino-3-Metilimidazolquinolina |
| Hidrocarburos aromáticos policíclicos | 3-Metilcolantreno |

Tabla 1-3

Familias químicas de carcinógenos (modificado de Green et al. 1987).

2. 2. 1. Compuestos relacionados con la cicasina

A continuación se comentan brevemente el grupo de carcinógenos relacionados con la cicasina, comenzando con este compuesto natural y sus homólogos químicos a excepción de la 1,2-Dimetilhidracina que merece un apartado propio al ser el carcinógeno utilizado en este estudio.

2. 2. 1. 1. CICASINA

Procede de las nueces cycad, obtenidas de *Cycas Circinalis*, proveniente de la isla Guam. Laqueur et al.(160) observaron en 1963; de forma casual, cuando buscaban una posible causa dietética de la incidencia inusualmente alta de esclerosis lateral amiotrófica en Guam, que las nueces de cycad desarrollaban tumores benignos y malignos, principalmente en hígado y riñones y también en menor cantidad en pulmón e intestino en roedores. Observaron las semejanzas entre los cambios patológicos existentes en ratas alimentadas con comida de nuez cycad tóxica y las alteraciones publicadas en la literatura, que son producidas por el compuesto carcinógeno dimetilnitrosamina en animales, sugiriendo la posibilidad de que un glucósido aislado en las cycads, llamado cicasina diese lugar en su rotura metabólica a un compuesto carcinogénico para ratas semejante al que se sugiere que da la dimetilnitrosamina. Este supuesto, es hoy en día ampliamente aceptado. La cicasina es el glucósido soluble en agua del metilazoximetanol.

Se abandonó su uso posteriormente, sin embargo, ya que las nueces de cycad no eran fácilmente accesibles y la cicasina era químicamente inestable(167). Laqueur et al. mostraron que la cicasina produjo cáncer de colon en ratas tras administración oral y no parenteral.

La carcinogenicidad de la harina de cycad para el hombre es desconocida.

2. 2. 1. 2. 1,1-DIMETILHIDRACINA (CH₃)₂-N-NH₂

La 1,1-dimetilhidracina, es un compuesto de síntesis que administrado en el agua de bebida, produce tumores en ciego, riñón, pulmón, hígado y vasos sanguíneos (angiosarcomas)(168).

Ha sido hallada en el tabaco, a razón de 147 ng/g de planta, así como en el humo(169). En consecuencia, un gran segmento de la población está expuesto a ella, además de a otros carcinógenos humanos. De todas formas, no se ha encontrado correlación clara entre el hábito de fumar y la neoplasia colónica.

La 1,1-dimetilhidracina está presente también en el combustible de cohete(170).

2. 2. 1. 3. METILHIDRACINA (MH) CH₃-NH-NH₂

Un champiñón salvaje comestible *Gyromita Esculenta* contiene cantidades importantes de acetaldehído de formilhidrazona y N-metil-N-forlhilhidrazina. Este último compuesto produce MH bajo ciertas condiciones que mimetizan el medio del estómago humano. Se ha estimado que anualmente, aproximadamente 1 millón de personas en todo el mundo comen este hongo.

La MH también se usa como propelente de cohetes.

Produce pólipos adenomatosos y adenocarcinomas administrado en el agua de bebida de hámsters(171).

2. 2. 1. 4. AZOXIMETANO (AM)

El azoximetano en inyección subcutánea o infusión rectal produce alta incidencia de adenomas y adenocarcinomas en intestino grueso y delgado(169).

2. 2. 1. 5. AZOXIMETANOL (AOM)

El azoximetanol es esencialmente igual a la 1,2-DMH en términos de especificidad para el colon, pero requiere menos reacciones de activación y está más próximo al carcinógeno final.

Fiala(172) en sus estudios considera al AOM más adecuado que la DMH como posible carcinógeno químico implicado en el cáncer de colon humano. La formación endógena de AOM a partir de precursores accesibles, como la metilamina por la flora bacteriana intestinal y por otros órganos tales como el hígado o el intestino parece bastante fiable.

El azoximetano a una dosis de 8-15 mg/kg produce carcinoma intestinal en el 100% de ratas por vía subcutánea o intramuscular(172). Ratas inyectadas con una dosis relativamente alta de AOM desarrollan más tumores en el colon distal y en duodeno, y aquellas inyectadas con dosis bajas tienen más tumores en colon proximal y ciego(154). En ratones son más frecuentes las lesiones rectales. El AOM produce una toxicidad hepática de hasta un 20% y los animales fallecen durante el periodo de inducción debido a necrosis hepática(173).

2. 2. 1. 6. METILAZOXIMETANOL (MAM)

Es una aglicona de la cicasina. Fue descrita por Laqueur et al.(174) en 1966. Induce neoplasias en hígado, riñones y tracto intestinal.

El MAM administrado por vía oral, subcutánea o intraperitoneal desarrolla adenomas y carcinomas de colon(168).

2. 2. 2. Otros carcinógenos químicos

2. 2. 2. 1 COLANTRENOS

Lorenz y Stewart(157) publicaron el primer artículo de inducción química de tumores intestinales en ratas en 1941. Alimentaron con dibenzantraceno y metilcolantreno a dos cepas de ratones y documentaron carcinomas intestinales altos al igual que tumores de pulmón. También producen un modelo de cáncer mamario en roedores(175).

No se vieron tumores colónicos en estos experimentos(166).

Posteriormente, se publicó que la alimentación con 3-metilcolantreno produjo cáncer de colon en machos pero no en hembras de varias cepas de hámsters(176).

2. 2. 2. 2 N- METILNITROSOUREA (MNU)

La MNU induce tumores por alquilación. Su metabolismo da lugar al compuesto Azometano.

El MNU es una sustancia inestable con vida media biológica muy corta.

En rata, hámster, ratón y conejillo de indias, la infusión intrarrectal de MNU induce carcinoma invasivo y bien diferenciado, con una incidencia del 100%(163),(177).

Tras su aplicación endovenosa, los tumores se localizan en distintos órganos, tales como hueso, estómago, intestino delgado, colon, páncreas, riñón, mama y SNC.

Histopatológicamente son adenocarcinomas con alto grado de invasión y baja diseminación(178).

Su desventaja es el largo periodo de dosificación preciso para la inducción tumoral.

2. 2. 2. 3. N-METIL-N-NITRO-N-NITROSOGUANIDINA (MNNG)

En 1971, Narisawa et al.(163) mostraron que la N-Metil-N-Nitro-N-Nitrosoguanidina instilada directamente vía rectal tiene un efecto carcinogénico directo(179),(180) , siendo utilizada para estudios in vitro(167). Actúa directamente en el ADN y ARN de las células diana, modificando la síntesis proteica(153) y precisa del efecto promotor del contenido intestinal(181), en concreto de la acción de las bacterias intestinales.

Se degrada en medio alcalino al carcinógeno diazometano, sin necesidad de acción enzimática. Esta degradación rápida es la responsable del cáncer.

Su administración intrarrectal tiene como resultado la inducción de pólipos adenomatosos y cánceres colónicos en ratas(167),(182). Su desventaja son sus largos periodos de inducción y de latencia (40 a 60 semanas)(153).

Por vía oral, produce una alta incidencia de adenocarcinomas gástricos y de intestino delgado.

Cuando se inyecta subcutáneamente, produce sarcomas en el punto de la inyección(176).

2. 2. 2. 4. N - NITROSO-ACETOXIMETIL-METILAMINA

Como otras nitrosaminas, no es per se un carcinógeno, pero se degrada al carcinógeno Diazohidróxido.

Se administra intrarrectalmente. El tiempo de latencia es de aproximadamente 252 días y puede producir metástasis(153).

2. 2. 2. 5. BENCIDINA

La bencidina es carcinogénica para las ratas, produce hepatomas y adenocarcinomas de recto en una pequeña proporción de animales, sobre todo machos.

Es más potente administrada subcutáneamente(183).

2. 2. 2. 6 AFLATOXINA

En los años 60 Newberne et al(184) describieron que la aflatoxina B1, un metabolito del moho *Aspergillus flavus*, causa tumores de colon en ratas vitamino A deficientes cuando se añade al agua de bebida, aunque la carcinogénesis colónica por aflatoxina no ha sido estudiada y es desconocida(185),(186). La aflatoxina se usa principalmente como carcinógeno hepático(187).

2. 2. 2. 7. 2'3 DIMETIL-4-AMINOBIFENIL (DMAB)

El primer producto que se conoció que inducía cáncer colónico fue el 2'3dimetil-4-aminobifenil. Por administración oral o subcutánea en la rata el DMAB induce carcinoma de colon y una mayoría de pólipos en 4 a 12 meses(153) con igual morfología, tipo histológico y localización que el cáncer humano(159),(182).

El DMAB es secretado activamente en la bilis y transportado a las células diana vía corriente fecal(176),(188). De este modo, la diversión de la corriente fecal mediante colostomías previene el desarrollo de neoplasias colónicas(189), aunque aparecen neoplasias extraintestinales.

I. 2. 3. 1,2 -Dimetilhidracina dihidroclorato (1,2 - DMH)

La 1,2 -DMH es el carcinógeno intestinal más usado.

En 1967, Druckrey et al.(161) pusieron de manifiesto que la DMH era estructuralmente semejante al compuesto natural cicasina, describiendo que posee una específica y real capacidad de producir tumores de colon en diversas especies de roedores(190). La DMH es la mitad activa de la comida de nuez de cycad(167).

Es un compuesto de síntesis. Hoy en día, no se sabe que este compuesto aparezca en la naturaleza. Es sintetizado para uso de laboratorio en cantidades limitadas.

La potencia y organoespecificidad de procarcinógenos químicos vienen en gran medida determinados por la reactividad química y por la capacidad de que haya suficiente cantidad de sus formas carcinogénicas últimas en los tejidos diana. La cantidad del carcinógeno final está en función de la actividad de las vías metabólicas que conducen a su formación, de la actividad de las vías de detoxificación y también de las vidas medias biológicas de todas las especies biológicas implicadas(171).

Druckrey postuló que la DMH sufre una serie de transformaciones químicas in vitro. La activación metabólica de la DMH se muestra en la [Figura 1-3,\(161\)](#). En un primer paso implica la oxidación a azometano, un gas a temperatura corporal, que aparece en el aire espirado de las ratas tratadas con DMH. Una oxidación convierte al azometano en azoximetano que entonces, mediante un proceso de N-hidroxilación, se convierte en metilazoximetanol. El metilazoximetanol es químicamente inestable a temperatura corporal e in vitro se descompone espontáneamente en formaldehído, agua y nitrógeno. Durante esta descomposición se forma el agente alquilante metildiazonio, llamado carcinógeno final. Este último es una sustancia altamente reactiva que forma iones metil-carbono, que se cree que son responsables de las metilaciones de macromoléculas tanto in vivo como in vitro. La alteración de las propiedades de las macromoléculas críticas como ADN, ARN y otras proteínas, por alquilación y otras reacciones, es un paso esencial en la carcinogénesis química.

Fiala et al.(191) corroboraron que el supuesto de la figura anterior se producía in vivo, midiendo la excreción de metabolitos mediante cromatografía de gas y líquidos a alta presión.

Los grupos metilo de la DMH son importantes para determinar su especificidad de acción. Reemplazando el grupo metil por un grupo etil da como resultado la producción de tumores de cerebro, bazo, timo, glándula mamaria e hígado en lugar de colon(167). El marcado de la DMH por deuterio ocasiona un cambio en los órganos diana. Los resultados indican que la rotura del enlace C-H es cinéticamente importante en la activación del DMH hasta su forma carcinogénica en órganos diana, y que la deuteración del sustrato permite un mecanismo de diversión que hace que un efecto isótopo pequeño se haga relativamente más extenso(192).

La 1,2-dimetilhidracina es un carcinógeno efectivo y selectivo de colon, debido a su actividad alquilante en los ácidos nucleicos del epitelio intestinal y sus propiedades mutagénicas(193). Actúa modificando el genoma de la célula, ocasionando eventualmente alteraciones del fenotipo celular, tales como pérdida de diferenciación, invasividad o conducta proliferativa anormal. La N-metilguanina y la O-6-metilguanina han sido aisladas del ADN de la mucosa colónica de ratas inyectadas con(14) C-DMH y en colon de rata cultivado tras incubación con DMH marcado. Los niveles iniciales de O-6-metilguanina son más altos en algunos órganos no diana que en el colon, pero ya que la tasa de reparación del colon es más lenta, el lapso de descodificación se prolonga por más tiempo.

La potencia y organoespecificidad de procarcinógenos químicos están en gran medida determinadas por la reactividad química y por la capacidad de que haya suficiente cantidad de sus formas carcinogénicas últimas en los tejidos diana. La cantidad del carcinógeno final está en función de la actividad de las vías metabólicas que conducen a su formación, de la

actividad de las vías de detoxificación y también de las vidas medias biológicas de las especies implicadas(171).

2. 3. 1. Organotropismo, vías de administración y dosificación

La vía de administración afecta al organotropismo del carcinógeno, mostrando la importancia de los diferentes tejidos en la activación y detoxificación de la DMH. Las instilaciones intracolónicas simples o múltiples de DMH en ratones producen adenomas y adenocarcinomas de los pulmones, angiomas y angiosarcomas de vasos sanguíneos(194) y fibrosarcomas subcutáneos.

También se ha observado, que dosis bajas diarias de DMH en el agua de bebida producen hemangioendoteliomas de hígado y no tumores colónicos. Sin embargo, la misma dosis total administrada una vez por semana produce cáncer de colon en la mayoría de las ratas(153).

Usualmente, la DMH se administra por vía subcutánea, y en unas dosis que van de 7 a 21 mg/kg de 12 a 20 semanas, ó 40 a 200 mg/kg en una única inyección.

También puede administrarse por vía oral, en el pienso, a razón de 21 mg/kg/semana durante 12 semanas(153) o en el agua de bebida.

El órgano de manifestación y la distribución tumoral depende de la dosis del carcinógeno. Se considera que la dosificación óptima para la inducción selectiva de tumores de colon es de 10 mg/kg durante 25 semanas (dosis total de 250 mg). Este tiempo de inducción idóneo de 180-240 días proporciona una tasa tumoral del 90%, incluso algunos autores hablan de un 100% (166),(195) , en todas la localizaciones. El periodo de latencia, definido como el intervalo de tiempo entre la primera inyección de carcinógeno y la aparición de tumores, es aproximadamente de 6 meses a dosis de 10-20 mg/kg/semana. Con una dosificación más alta de DMH, la incidencia de tumores extracolónicos aumenta. Al disminuir la dosis, aumenta el periodo de latencia y los animales desarrollan menos tumores colónicos y extracolónicos(166) así como metástasis(196).

Incluso una dosis simple de DMH producirá tumores, con un periodo de latencia estimado de 15-20 meses(166), aunque estudios más recientes describen un alta incidencia tumoral con un periodo de latencia de 9 meses(197).

Los componentes de la corriente fecal no son capaces de activar la DMH administrada intrarrectalmente, ya que no aparecen tumores localmente por esta vía.

Sin embargo, experimentos de transposición de colon a yeyuno y viceversa han demostrado susceptibilidad específica de colon, en comparación con mucosa de intestino delgado, en la que no aparecen tumores; a la carcinogenicidad de la DMH(198). Rubio et al.(199) describieron que se producen tumores en los segmentos desfuncionalizados de colon, aunque en menor proporción que en los segmentos funcionantes, sugiriendo que factores endógenos del contenido intestinal facilitan la carcinogénesis químicamente inducida(200). Se ha demostrado que el trauma quirúrgico aumenta la carcinogénesis de colon en la rata. Las reacciones locales vasculares e inflamatorias probablemente desempeñan un papel en este fenómeno. También se ha descrito la importancia de la técnica de sutura y material usado(201) en la anastomosis como promotoras de carcinogénesis. Las suturas seromusculares, que no atraviesan la mucosa del colon, inducen menor proporción de neoplasias perianastomóticas que las transmurales(202). Se ha descrito que tras el daño quirúrgico se produce proliferación de las células de las criptas del colon y entran más células en ciclo mitótico, etapa en las que parecen ser más receptivas a las influencias carcinogénicas(203),(204). También la producción química de colitis puede predisponer a las células colónicas epiteliales de la rata al efecto carcinogénico de la DMH(205).

2. 3. 2. Acciones de la DMH

La DMH induce proliferación celular en la cripta colónica, previo al desarrollo de atipias focales.

La mayoría de tumores inducidos están localizados en el intestino grueso.

Como ya hemos dicho la especificidad colónica está ligada a la dosis y el momento de observación.

Los tumores son generalmente múltiples, con semejanza próxima a los tumores humanos(206). Se acompañan de anorexia, pérdida de peso, heces sanguinolentas, obstrucción intestinal y, ocasionalmente, invaginación(207).

En la rata hay pocos pólipos adenomatosos benignos y una mayoría de adenocarcinomas aparecen de novo sobre mucosa plana(208),(209), aunque estudios tiempo-dependientes demuestran que no de forma excluyente(210). Estos adenocarcinomas más o menos diferenciados se localizan en la mitad distal del colon izquierdo y generalmente, no son muco-secretores(211). Los carcinomas mucinosos y de células en anillo de sello prevalecen en el colon proximal y ciego; siendo a menudo más metastásicos que los del colon izquierdo. Las metástasis son locales, peritoneales, en los ganglios linfáticos regionales o a distancia(153). Las metástasis hepáticas son excepcionales, en contraste con lo que ocurre en los tumores colónicos humanos, en los que supone una causa muy importante de muerte(166),(212); sin embargo, líneas celulares obtenidas a partir de adenocarcinomas de colon de rata transplantable que fue inducido por administración subcutánea de DMH, desarrollan metástasis de hígado y pulmón(213).

En los ratones se encuentran pocos adenocarcinomas y prevalece una mayoría de pólipos.

Se ha descrito que 4 semanas es el intervalo necesario para que la mucosa del colon vuelva a su estado normal tras los efectos tóxicos agudos de una inyección de DMH.

El modelo de DMH nos lleva a una diseminación tumoral (en el 93% de los casos) en contraste con otros modelos.

Su desventaja es la alta incidencia de tumores primarios en otros órganos. Por ruta subcutánea, inyecciones de DMH simples o repetidas inducen tumores de intestino, riñones, hígado, glándulas de Zymbal de la oreja en la rata(214); e intestino grueso, ano, pulmones (predominantemente de crecimiento alveolar)(215), hígado, riñones y vasos sanguíneos en ratones(216). También produce megalocitosis hepática y aparición de úlceras gástricas(217).

Otra desventaja es la localización tumoral en todo el colon que dificulta el control del tamaño y crecimiento tumoral.

La DMH induce cambios en los lípidos plasmáticos, aumenta el colesterol libre y disminuye los niveles de fosfolípidos en los animales tratados(217).

La DMH es diurética a dosis de 21 mg/kg de peso(169).

2. 3. 3. teorías carcinogénicas del cáncer de colon inducido por DMH. Mecanismo de acción

La carcinogénesis como un largo proceso multietapas fue descrito por primera vez por Blerenblum(218) en 1941 para explicar cómo hidrocarburos policíclicos inducían cáncer epidérmico en ratones. Este autor encontró que la aplicación de benzopreno en la piel de los animales no causó cáncer, excepto cuando se aplicó repetidamente aceite de crotona. El aceite de crotona solo o aplicado antes del carcinógeno no produjo neoplasias. De tales experimentos dedujo que el cáncer se produce lentamente en dos etapas separadas: una primera etapa de iniciación y una segunda de promoción. Esta teoría se extendió

posteriormente al cáncer de todos los órganos, incluyendo las neoplasias de colon.

La aceptación de la carcinogénesis como un modelo multietapas era unánime, hasta que en 1981 A. Maskens(193), publicó un revolucionario trabajo en el que utilizando la lógica matemática, la estadística y el cálculo de probabilidades demostró fehacientemente que la carcinogénesis es un fenómeno en dos etapas, que además no se corresponderían con los experimentos clásicos de iniciación-promoción.

La carcinogénesis por DMH en el colon de la rata es un proceso en 2 etapas y el producto de las tasas a las que cada paso aparece es de alrededor de 2×10^{-8} /célula en riesgo/dosis de DMH/año.

El tratamiento con DMH es capaz de inducir directamente un cambio estable y transmisible en un número de células epiteliales que por consiguiente estarían en riesgo respecto a un segundo suceso capaz de iniciar el crecimiento tumoral.

Este cambio es transmisible dentro de la mucosa, que se renueva por períodos prolongados. Las células afectadas no tienen expresión fenotípica en términos de ventaja proliferativa.

El segundo cambio no requiere exposición al carcinógeno (aunque la presencia continuada del carcinógeno puede probablemente contribuir a ello) y afecta aleatoriamente a las células expuestas al carcinógeno a una tasa que es constante, al menos dentro del tejido considerado(219).

La suposición más razonable es que el primer paso representa una mutación somática. Las propiedades químicas y biológicas de la DMH, sus propiedades mutagénicas así como la naturaleza transmisible y estable de sus efectos en el epitelio intestinal apoyan este mecanismo. Cada inyección de DMH entra en interacciones inespecíficas diseminadas con el ADN y otros constituyentes macromoleculares celulares y es probablemente capaz de inducir, sobre una base aleatoria, una primera mutación específica en una proporción dada de células del colon.

Esta células estarían en riesgo para el segundo cambio, que permitiría la expresión del fenotipo cáncer. En tal sistema, el umbral teórico de la dosis de carcinógeno sería la dosis más pequeña capaz de inducir la primera mutación específica en al menos una célula. En este momento, existe un mecanismo en el epitelio del colon que puede aparecer independientemente de la exposición al carcinógeno y es capaz ya de producir un efecto mutacional específico en las células.

El cáncer en este ejemplo es el resultado de una mutación somática recesiva inducida por DMH, seguida de una conversión del mutante recesivo a un estado homocigótico, siendo la tasa de conversión una propiedad intrínseca del tejido cólico. Durante una exposición prolongada la DMH puede, en consecuencia, incrementar también la incidencia de cáncer afectando al segundo gen homólogo en las células heterocigóticas.

La organoespecificidad de la DMH depende de reacciones de oxidación catalizadas por reacciones enzimáticas no identificables en los tejidos diana. Estudios autorradiográficos utilizando DMH marcada con(14) C muestran que este agente es captado por el hígado aproximadamente 1 hora después de la inyección y en las células epiteliales del colon 3 horas después de la misma. La DMH es excretada primariamente por el pulmón y riñones que eliminan del animal aproximadamente un 50% de la dosis inyectada. Los principales metabolitos en aire espirado son CO₂ y azometano(220); la orina contiene, DMH inalterada, azoximetano, azometano y metilazoximetanol. Se presume que el hígado es el lugar primario de oxidación de DMH a metilazoximetanol (MAM), que es entonces transportado vía sangre y/o corriente fecal al colon y otros órganos, aunque otros estudios indican que el colon en sí mismo contiene tipos celulares epiteliales o enzimas capaces de convertir la DMH en productos mutagénicos sin implicar necesariamente metabolismo intermediario por

hepatocitos(221),(222) , de hecho la mucosa colorrectal implantada en el estómago es sensible a la tumorigénesis causada por DMH(223). También se ha observado que el tránsito intestinal enlentecido induce un número aumentado de neoplasias colónicas en relación con el contacto prolongado con la mucosa del carcinógeno o debido a una mayor concentración en la luz colónica(224). Los estudios de Stralka et al.(225) usando anticuerpos policlonales anti P₄₅₀, IIB₁ y IIA₁ postulan un sistema de metabolización de la droga P₄₅₀-dependiente en el colon capaz de activar y metabolizar el modelo de carcinógeno colon-específico 1,2-DMH. Algunos inhibidores metabólicos pueden interrumpir la activación del DMH y prevenir la inducción tumoral. Algunos antioxidantes como el disulfiram y otros compuestos relacionados como el carbón disulfuro o el bis (etilxantógeno) son capaces de inhibir la carcinogénesis inducida por DMH y azometano (AOM) inhibiendo la N-oxidación in vivo de azometano a azoximetano y la C-oxidación del AOM in vivo(226) -(229).

Los estudios de Davies et al.(230) demuestran que aparecen alteraciones en la bomba de Na⁺-K⁺ en la mucosa premaligna de animales tratados con DMH meses antes de que se desarrollen tumores visibles y estos cambios pueden explicar parcialmente los niveles alterados de Na⁺ y K⁺ en el citoplasma y membrana basal de colonocitos premalignos y malignos(231),(232). La despolarización epitelial se produce tras la inyección del carcinógeno(233).

2. 3. 4. Factores constitucionales y regulación

Especies, raza, sexo y edad influyen en la inducción de carcinoma intestinal.

Las especies y las razas dentro de las especies muestran grandes diferencias en susceptibilidad al carcinógeno. Los conejillos de indias son resistentes a la carcinogénesis inducida por DMH. Los hámsters son extremadamente susceptibles a DMH y son necesarias dosis muy bajas para evitar toxicidad hepática(153).

Las ratas y los ratones responden bien a carcinógenos pero con grandes variaciones entre las diferentes razas(212),(234) , mostrando incluso distinta susceptibilidad para los diferentes segmentos anatómicos del colon(235). Las razas más sensibles a la DMH son Fisher, Sprague-Dawley y BD-IX.

Las susceptibilidades genéticas encontradas en diferentes razas de ratón podrían explicar las diferencias en la capacidad de metabolizar el carcinógeno a su forma activa, pero no se encontró ningún sistema enzimático principal deficiente que sustente esta hipótesis. Estudios genéticos más recientes mostraron una falta de herencia dominante y la acción o presencia de genes supresores. Dos factores genéticos, al menos, podrían influir en la resistencia a DMH, uno gobernado por el metabolismo del carcinógeno y el otro controlado por el género.

Los roedores hembras son ligeramente menos susceptibles que los machos a la acción carcinogénica de la DMH(192). La administración de andrógenos a ratas macho BD-IX castradas incrementa la incidencia de cáncer de colon(236).

La edad es importante en la organoespecificidad del carcinógeno. El tratamiento prenatal de monos con DMH induce nefroma embriológico, similar al tumor de Wilms(237).

Experimentos con una inyección de DMH a ratas de 1, 10 ó 30 días mostró que el carcinoma de colon apareció sólo en las ratas tratadas de 30 días. Los machos neonatalmente androgenizados y tratados con DMH desarrollan una mayor proporción de tumores colónicos que sus controles(238).

Otros factores autocrinos potenciales, como factor de crecimiento insulínico, transferrina y gastrina podrían tener gran valor en la regulación de los tumores colónicos. Además de la secreción de factores estimuladores del crecimiento, las células colónicas

tumorales secretan y responden a factores inhibidores del crecimiento(153).

Se ha observado que la esplenectomía aumenta la incidencia de tumores malignos sin alterar la presencia de tumoraciones benignas. Se cree que la capacidad del bazo de proteger los animales de la inducción de tumores colónicos es probablemente debida a la preservación de la vigilancia inmunológica en el huesped(239).

2. 3. 5. Influencia de factores ambientales

Dieta, ácidos biliares y bacterias, tienen influencias por sí mismas y por su acción sobre el metabolismo de la DMH.

Estudios experimentales en animales sostienen la hipótesis de que la composición cualitativa de los ácidos grasos es uno de los factores determinantes en la carcinogénesis colónica. El tipo y cantidad de grasa dietética afecta al metabolismo microsomal de los carcinógenos, reforzando la iniciación tumoral(240) -(247), modificando la respuesta del tejido colónico al desafío genotóxico(248), incluso alterando el sistema inmune(249). Se ha observado que restricciones calóricas severas en la dieta pueden inhibir el crecimiento de los tumores de colon inducidos por DMH(250),(251). Otros autores demuestran que ni una reducción moderada en la toma de grasas ni un aumento en los carbohidratos en la dieta ni una dieta vegetariana es probable que den como resultado una reducción sustancial en la incidencia de cáncer de colon(252).

El papel de las proteínas es controvertido, sin efecto en algunos experimentos o con un efecto de refuerzo en la aparición tumoral en animales alimentados con un alto contenido en proteínas comparado con animales que reciben un bajo contenido, independientemente del tipo de proteínas(190). Igualmente se ha descrito el papel de las proteínas de la leche en el desarrollo de tumores inducidos químicamente y en el tiempo de supervivencia de las ratas(253).

Ratas con pH ácido en las heces producido por consumo de lactulosa, sulfato sódico o ambos tienen significativamente menos tumores colónicos tras inyecciones con DMH que las ratas tratadas con DMH solo(254).

La fibra dietética es un buen candidato para el papel protector en cáncer de colon y está sostenida por datos epidemiológicos, pero los modelos experimentales animales aportan resultados aparentemente contradictorios de acuerdo con la naturaleza de las fibras estudiadas. El efecto protector de la fibra dietética consistiría en un aumento en la masa fecal y dilución de ácidos biliares y otros carcinógenos fecales. Los suplementos de celulosa en la dieta (5-15%) producen una supresión de la actividad mitótica reforzada por la DMH en las criptas del colon descendente durante el estadio de iniciación de la carcinogénesis(255). Este hallazgo se correlaciona con una reducción del número de animales que presentan tumores colónicos y una incidencia significativamente más baja de adenocarcinomas en ratas mantenidas con suplemento de celulosa a lo largo de las etapas de iniciación y de promoción(256),(257). En ratas a las que se alimentó con dietas ricas en frutas y vegetales se observó una baja incidencia de adenomas; si además tomaban una dieta con fritos y asados de tipo humano, frutas y verduras no mostraron protección total, pero sí disminuyeron la incidencia de carcinomas(258). Una dieta alta en proteína animal y grasa, correlacionada con alto riesgo de cáncer de colon, se asocia con un aumento en enzimas bacterianas capaces de generar carcinógenos en el intestino. Hay una correlación entre actividad enzimática bacteriana aumentada y conversión creciente de procarcinógenos a carcinógenos proximales en la corriente fecal. La DMH se ha visto que induce alteración en la actividad de las enzimas bacterianas colónicas(259). Animales libres de gérmenes tratados con DMH tienen menor incidencia de tumores de colon en comparación con las ratas convencionales. La microflora

intestinal interfiere con el metabolismo de los ácidos biliares y con la grasa dietética, factores todos que ejercen gran importancia en la activación de la carcinogénesis por DMH(260) - (262). Los ácidos biliares secundarios, deoxicólico y litocólico son estructuralmente semejantes a compuestos que se sabe que son carcinógenos(263), como los colantrenos. Morvay et al.(264) mostraron un aumento de la incidencia de tumores colónicos en ratas con niveles diarios totales de ácidos biliares y concentración de ácido biliar en el lado izquierdo del colon aumentados(265). Otros autores, consideran que los ácidos biliares no desempeñan un papel en los tumores colónicos inducidos por DMH(266).

La carcinogénesis química en animales de experimentación ha sido inhibida por gran número de compuestos con diversas estructuras químicas. Un posible efecto protector del selenio ha sido encontrado en carcinomas inducidos por DMH(267). La inhibición de la carcinogénesis colónica por antioxidantes como el selenio es multifacética. Los niveles de fosfolípidos poliinsaturados (componentes de las membranas biológicas) son muy sensibles a la peroxidación. Los radicales libres generados pueden romper la estructura y la integridad funcional de las membranas, alterar las propiedades de transporte, y causa daño potencial en el ADN, ARN y proteínas diana. La enzima superóxido dismutasa proporciona una defensa fisiológica normal al potencial daño de estos radicales(268).

Otro oligoelemento como el germanio orgánico previene el cáncer intestinal en este modelo(269). Los resultados más prometedores conciernen al efecto protector del calcio dietético en la carcinogénesis colónica(270),(271). Los estudios de Sitrin et al.(272) mostraron que el calcio disminuye significativamente el número de ratas con tumores múltiples y el tamaño tumoral, y que estos efectos estaban abolidos por el déficit de vitamina D; postulando, por lo tanto, que la DMH aumenta los niveles de poliamina en la mucosa colónica premaligna en ratas, efecto que se anula con calcio dietético alto. El calcio suplementario se ha mostrado que inhibe el aumento de proliferación inducida por sales biliares y ácidos grasos en animales de experimentación(273),(274), probablemente enlazándose a los mismos e inhibiendo su acción tóxica(275) y disminuyendo sus niveles totales en heces(276). Otros estudios han demostrado que los suplementos de calcio dietético son capaces de inhibir las mutaciones K-ras observadas en los tumores inducidos por DMH(277). Diversos estudios han confirmado el papel de los -carotenos en la prevención de cáncer de colon inducido por DMH en ratas y ratones(278),(279), entre un 60-100%(280).

También se ha descrito que la vitamina A podría tener efecto antiproliferativo y anticarcinogénico directo y que ratas deficientes en vitamina A y expuestas a DMH presentan una incidencia aumentada de carcinoma de colon(185),(281), sobre todo en animales a los que se administró alto contenido de grasa en la dieta(282). Igualmente, algunos investigadores han descrito que suplementos de vitamina E reducen la incidencia tumoral en ratones(283), si bien experimentos de otros autores refieren resultados contrarios, en los que la deficiencia de vitamina E no promovió la incidencia tumoral(284),(285). La administración subcutánea de 1,25-dihidroxitamina D₃ previo a la agresión carcinogénica reduce significativamente la incidencia de tumores colónicos, presumiblemente actuando como antiproliferativo(286). Se ha descrito que la vitamina C presenta un efecto protector sobre la carcinogénesis inducida por DMH, probablemente por su capacidad de reaccionar directamente con el carcinógeno(268). A pesar de todo, otros autores sugieren que niveles no tóxicos de vitaminas es improbable que inhiban específicamente el proceso de carcinogénesis(252).

Los suplementos de potasio en el agua de bebida muestran de forma significativa prevención parcial de la inducción de tumores en intestino delgado de ratas Sprague-Dawley tratadas con DMH, y también se observó disminución en la incidencia de tumores colónicos y de glándulas de Zymbal, aunque no con significación estadística(287).

Wargovich y Newmark(288), evaluaron la capacidad de los flavonoides para proteger frente al daño en el ADN colónico inducido por DMH. No producen abolición de núcleos aberrantes lo que sugiere que son inactivos en las fases de iniciación de la carcinogénesis.

Los estudios de Caderni et al.(289) sugieren que el almidón tiene un efecto protector contra la carcinogénesis colónica en ratas tratadas con DMH y alimentadas con dietas ricas en grasa, baja en calcio y celulosa.

Estudios epidemiológicos describen que altos niveles de legumbres dietarios han sido asociados con bajas tasas de cáncer en general, y se correlacionan inversamente con las incidencias de cáncer de mama, colon y próstata. Las legumbres se sabe que contienen altas concentraciones de inhibidores de proteasa, al igual que otros agentes como lectinas que pueden modificar la carcinogénesis. Los inhibidores de la proteasa se ha visto tienen actividad anticarcinogénica tanto in vivo como in vitro. Billings et al.(290) publicaron que un derivado de la alubia de soja que contiene el inhibidor de Bowman-Birk, suprime la carcinogénesis de hígado y colon en ratones inducida por DMH cuando está presente en la dieta.

Otros agentes, como los antiinflamatorios y en concreto el ácido acetilsalicílico reducen al 60% la cantidad de tumores inducidos por DMH(291). El sulindac también se ha descrito que inhibe las tasas de desarrollo y de crecimiento de los tumores colónicos de la rata(292), en las etapas de displasia y microadenoma(293). La salazopirina, fármaco empleado en el tratamiento de la colitis ulcerosa, cuando se administra a ratas tratadas con el carcinógeno, no altera la incidencia tumoral, pero sí las características tumorales, son más pequeños, sesiles y microinvasivos(294).

Los estudios de Daniel et al.(295) sugieren que el cloroformo inhibe de forma dosis dependiente la inducción de daño nuclear y/o ADN por DMH en células epiteliales colónicas del ratón.

La ruta de administración de la dieta tiene una significativa influencia en la proliferación epitelial del epitelio colónico en ratas tratadas con DMH. Ratas alimentadas con nutrición parenteral no presentaron aumento en la proliferación celular epitelial(296), mostrando disminución importante de las figuras de metafase por cripta y altura de la cripta(297).

La actividad física aumentada en las ratas reduce la incidencia tumoral, posiblemente por una bajada del pH fecal, disminuyendo el flujo sanguíneo al colon y aumentando las enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa, catalasa y la glutatión peroxidasa(298). Los estudios de Andrianopoulos et al.(299) describen la acción del stress sobre la carcinogénesis colónica por DMH. Cuando ambos aparecen simultáneamente existe una reducción del número de tumores comparado con los controles y cuando el stress sigue al tratamiento, este efecto es similar pero en menor grado.

Asimismo, se ha descrito un sinergismo entre la radiación en el abdomen y el carcinógeno(300).

2. 3. 6. Expresión de oncogenes

Yander et al. han mostrado amplificación del oncogen myc al igual que expresión elevada del RNAm myc en los tumores de colon de ratón. Tulchin et al., usaron azoximetano, un metabolito de la DMH, para inducir cáncer de colon en ratas en un estudio llevado a cabo para investigar la distribución de la proteína c-myc respecto a los cambios histopatológicos. Estos investigadores demostraron una expresión aumentada de c-myc en las células tumorales de rata en comparación con las normales(166).

Llor et al. describen mutaciones K-ras de G a A en aproximadamente 1/3 de los

carcinomas inducidos por DMH y, en líneas celulares de tumores de colon de rata derivados de tumores inducidos por la misma DMH(166), mientras que no observaron mutaciones H-ras(277),(301). Estas mutaciones se produjeron en el segundo nucleótido de los codones 12 ó 13 o en el primer nucleótido del codon 59 del gen K-ras.

Las mutaciones k-ras fueron observadas en mucosa colónica premaligna a las 15 semanas de la inyección de DMH, en zonas sin displasia, adenoma o carcinomas, sugiriendo que la mutación ras es un evento precoz en la carcinogénesis colónica(301).

En tumores colónicos de ratones tratados con DMH se observa una ausencia de pérdida alélica en el locus p53, lo que sugiere que las pérdidas alélicas del locus p53 no intervienen en la carcinogénesis inducida por DMH o que la alteración de los productos del gen podría tener un efecto de abolición de la función normal del p53(302).

I. 3. Mucosa colónica de rata normal y tumoral

I. 3. 1. Morfología de la mucosa colónica de rata

3. 1. 1. Descripción macroscópica

El intestino grueso de la rata está dividido con propósitos descriptivos en las siguientes partes: ciego, colon ascendente, colon transverso, colon descendente y recto(303) [Figura 1-4](#).

Aunque diversos autores consideran solamente tres segmentos: ciego, colon ascendente o proximal y colon descendente-recto o distal(304),(305).

Macroscópicamente, el ciego, el colon ascendente y el colon distal pueden distinguirse con facilidad. El ciego es un órgano ancho en forma de coma, de paredes delgadas y distendidas; móvil y sin apéndice. Los pliegues de la mucosa cecal están dispuestos aleatoriamente(304).

El colon proximal o ascendente, de aspecto más tubular, presenta unos pliegues ordenados oblicuamente, en forma de V. Uno o dos de estos pliegues muestra un área de engrosamiento nodular representando placas linfoides. Su porción más proximal es similar al ciego y distalmente incrementa su espesor por aumento de la submucosa y de la muscular externa(305). El colon ascendente describe una larga curva hasta la flexura esplénica.

El colon descendente de la rata presenta una mucosa más lisa y está plegado en 4 a 6 elevaciones paralelas longitudinales; estos pliegues se interrumpen por áreas aplanadas en número y tamaño variables(305). Se extiende desde la flexura esplénica, pasa hacia abajo y medialmente para cruzar el eje pélvico donde se hace retroperitoneal para formar el recto, sin un colon sigmoide interpuesto y termina en el ano justo en la raíz de la cola. La pared del recto es similar a la de la porción terminal del colon(304).

Cuando el colon se distiende por las masas fecales la superficie mucosal se hace lisa. La ausencia de *taenia coli* y haustras es una peculiaridad anatómica del colon de la rata.

El ciego mide de 6 a 9 cm. y el resto del colon mide de 16 a 20(303).

3. 1. 2. Descripción microscópica

En el epitelio del intestino grueso de la rata se han podido identificar varios tipos celulares:

3. 1. 2. 1. Células caliciformes:

Las células caliciformes son el tipo celular más frecuente del intestino grueso de la

rata.

Las células caliciformes presentan generalmente, un núcleo redondeado, con un nucleolo pequeño y regular. El núcleo se dispone en la base celular, al quedar rechazado por las vacuolas de moco que ocupan el citoplasma(306).

La morfología de estas células varía en relación al segmento estudiado(307) -(309). En el ciego y colon proximal, las células caliciformes localizadas en la base y en el tercio inferior de la cripta se muestran bien formadas, numerosas y llenas de moco; contrariamente, en la porción superior de las criptas, estas células se muestran más bien escasas, pero más grandes y de forma alargada u oval. En el colon distal, en el tercio inferior de la cripta son más pequeñas, mientras que la situadas en los dos tercios superiores de las criptas son más numerosas y voluminosas(209).

En la mucosa colónica normal, las células caliciformes secretan sialomucinas a lo largo del total o 2/3 inferiores de las criptas, mientras que en la parte superior de las criptas y la superficie epitelial se producen ambas sulfo y sialomucinas. El patrón normal mucoso puede variar, con ambos tipos de mucinas ácidas sulfo y sialomucinas secretadas en igual proporción a lo largo del epitelio criptal o sialomucinas predominando en la mitad superior de la cripta (patrón mixto) (306).

3. 1. 2. 2. Células columnares:

Son el tipo celular más abundante en la superficie luminal y en el tercio superior de las criptas. La superficie luminal está formada por una capa simple de células epiteliales en continuidad con el epitelio de recubrimiento recto de las glándulas intestinales tubulares(305).

Al microscopio óptico se muestran como células altas con un citoplasma eosinófilo y núcleo ovoide. Carecen de vacuolas de moco(309).

Este tipo celular es más evidente en el colon ascendente y presenta microvellosidades(209).

3. 1. 2. 3. Células endocrinas:

Estas células se sitúan principalmente en las porciones inferiores de las criptas y, ocasionalmente en el epitelio superficial. Presentan gránulos de secreción oscuros (células de Kulchitsky)(308).

3. 1. 2. 4. Células indiferenciadas:

Las células indiferenciadas se localizan en la base de las criptas y se reconocen fácilmente por su núcleo voluminoso y escaso citoplasma.

Son células alargadas y delgadas en el colon proximal y, poligonales y redondeadas en los segmentos distales. Presentan un núcleo grande, redondeado u oval, con algunas invaginaciones y un nucleolo pequeño y redondeado(308),(310).

3. 1. 2. 5. Células vacuoladas:

Este tipo celular, denominado así por su aspecto, se ha identificado en la porción más distal del intestino grueso de la rata. De predominio en los segmentos inferiores y medios de las criptas(311).

Contienen numerosas vacuolas de moco, más dispersas y más pequeñas que las de las células caliciformes.

3. 1. 2. 6. Células secretoras del fondo de la cripta:

Un tipo morfológicamente especial de células con capacidad secretora de moco fue

descrito por Altmann(311) en 1983 en el colon de la rata. Reciben este nombre por su localización y por su aparente función principal. Estas células se localizan en el fondo de las criptas del colon proximal, no observándose en el resto de segmentos de intestino grueso.

Al microscopio óptico muestran una forma piramidal, con un citoplasma repleto de vacuolas. El núcleo es basal, ovoide o aplanado.

El microscopio óptico revela agregados de linfocitos bajo las áreas aplanadas de mucosa.

3. 1. 2. 7. Células caveoladas:

Se localizan a nivel del colon distal de la rata y representan un tipo celular relativamente infrecuente. Se identifican exclusivamente por microscopía electrónica(312). Presentan grandes microvellosidades, con haces de filamentos que se extienden al interior del citoplasma; así como numerosas vesículas que se sitúan en el citoplasma apical.

Microscópicamente, las criptas experimentan un incremento progresivo de su longitud desde el ciego al colon distal. En el ciego, la mucosa es delgada y las criptas cortas, en alguna ocasión pueden ramificarse en su base. En el colon descendente, las criptas son más alargadas y delgadas, rectas y sin ramificaciones.

El número de células por cripta es aproximadamente 625, con 33 células por columna y 19 columnas por circunferencia de cripta(304).

3. 1. 3. Microscopía electrónica de scanning (MES)

El aspecto del colon normal de rata varía para cada región también con MES. Aunque generalmente está cubierto por una densa y homogénea capa de moco, que cubre por completo el epitelio subyacente(313),(314).

La superficie del ciego es plana, y las criptas están rodeadas por surcos irregulares, similares a la corteza cerebral.

En el colon ascendente las criptas son poco abundantes y se encuentran ordenadas en lo alto de los marcados pliegues de la mucosa.

En el colon transversal el epitelio es aplanado y está cubierto de moco, y presentan criptas regularmente dispuestas y de forma circular(315).

La mucosa del colon distal está ordenada en pliegues longitudinales, los orificios de las criptas tienen forma estrellada(315). La superficie luminal del colon descendente está formada por repetición de grupos de unidades celulares rodeando el orificio de una glándula intestinal. Estas unidades glandulares muestran pequeñas variaciones en el tamaño, aunque los límites entre glándulas adyacentes no es obvio.

Se identifican tres tipos de células distintos en la superficie luminal:

1. Las células absorptivas: presentan un contorno plano o suavemente convexo, cubierto por una densa y uniforme capa de *microvilli* alargados.
2. Las células mucosas: son elementos simples que sobresalen entre las células absorptivas y muestran una superficie convexa cubierta de *microvilli* cortos y escasos.
3. Se observa otro tipo de células en áreas cercanas a la periferia de las unidades glandulares. Estas células redondeadas parecen estar dispuestas sobre la superficie de la mucosa más que formando parte de ella, y su localización y aspecto sugieren que son el efecto de la exfoliación que sufren las células absorptivas y mucosas(305).

I. 3. 2. Cinética celular

La proporción de producción celular varía de región en región en todo el colon, los

valores más bajos se obtienen en el colon distal, mientras los más altos se observan en el ciego(315).

En el colon normal la zona proliferativa se encuentra localizada en la porción inferior de las criptas, estas células son mitóticamente activas y están implicadas en la síntesis de ADN(316). Existe una región de lenta proliferación celular situada en la porción más basal de la cripta, y una región de más rápida proliferación en segundo quinto de la cripta(317). Estas células criptales son inmaduras y van migrando lentamente a la superficie sufriendo la maduración durante esta migración(318) (Figura 1-5,(316))

En un periodo que oscila entre 60 y 72 horas una célula emigra desde la zona proliferativa de la cripta a la superficie luminal(305).

Este proceso normal, está dificultado en ciertos estados patológicos. Así en el cáncer, adenoma, mucosa de aspecto normal en pacientes con poliposis y roedores tratados con DMH, las células sintetizan ADN en toda la longitud de la cripta(211),(315).

I. 3. 3. Descripción de las lesiones inducidas con DMH

Los tumores y lesiones benignas inducidos con DMH pueden ser asignados a alguna de estas categorías macroscópicas y microscópicas:

3. 3. 1. Categorías macroscópicas

Los tumores inducidos con 1,2-dimetilhidracina pueden agruparse en las siguientes categorías macroscópicas (Figura 1-6):

Tumores sesiles: Son masas que protruyen sobre la superficie mucosal y con un diámetro máximo mayor que el de su unión a la mucosa y muy cercanos a la misma(319).

Tumores pedunculados: son pólipos con un tallo claramente visible(320).

Tumores exofíticos: son tumores usualmente polipoides protruyendo hacia la luz. Presentan un margen elevado con cavitación central y una masa subyacente lobulada que generalmente, distiende la serosa subyacente(315).

Tumores endofíticos: son tumores en forma de meseta o ulcerativos con tendencia ligera o nula a abultar hacia la luz. A menudo son tumores constrictivos(321). Han sido denominados también tumores fungoides(319).

Placas: son lesiones con una superficie relativamente plana, ligeramente por encima del nivel de la mucosa.

3. 3. 2. Categorías microscópicas

Diversos autores han realizado clasificaciones microscópicas de los tumores inducidos por DMH en la rata. Lindström et al. (319) propusieron unas definiciones de los tumores adenomatosos benignos y malignos:

Adenoma: es un tumor benigno que aparece a partir de epitelio glandular y con desarrollo de formaciones tubulares o acinares o intercaladas con estructuras vellosas o papilares(322). El adenoma puede tener un grado variable de atipia epitelial, desde leve, moderada y severa, hasta atipia con posible pero no confirmada malignidad.

Adenocarcinoma *in situ*: este término se usa para atipia marcada intraepitelial o intraglandular, justificando un diagnóstico de malignidad. No muestran invasión de la *muscularis mucosa* o más allá, por los elementos epiteliales.

Se corresponde a la categoría de adenocarcinoma intramucosal de otros autores(319).

Adenocarcinoma infiltrante: A este grupo se refiere en todos los casos con

infiltración en la lámina propia o capas de tejido más profundas como la submucosa, *muscularis mucosae*, etc.

Los adenocarcinomas se clasifican según su grado de diferenciación en:

1. Bien diferenciado: con estructuras organoides bien diferenciadas de tipo acínico o tubular y una atipia celular moderada y mitosis en el epitelio, con los núcleos basales y de tamaño regular(323).

2. Moderadamente diferenciado: son adenocarcinomas con estructuras organoides no bien desarrolladas, presentan criptas epiteliales o túbulos con ramificación y dilatación compleja e irregular(319). Se asocian a atipia epitelial más marcada y alta frecuencia mitótica.

3. Pobrementemente diferenciado: se caracterizan por la presencia de células epiteliales que carecen de una disposición uniforme. Son adenocarcinomas con parte del tumor con estructura adenomatosa ligera o nula, pero con producción mucosa conservada.

Los tumores productores de moco en *anillo de sello*, se clasifican según los autores como un grupo aparte(209) y se les denomina, **adenocarcinomas mucinosos**; o como adenocarcinomas poco diferenciados(321). Otros autores realizan una clasificación en dos tipos: no mucinosos y productores de mucina(309).

El carcinoma anaplásico ha sido definido como un tumor maligno con atipia celular extrema y sin características celulares de diferenciación.

Otros tipos histológicos descritos por Pozhariski(303) son:

Carcinoma sólido: Este es un tumor pobrementemente diferenciado en el que las células tienden a una solidificación secundaria.

Carcinoma escirro: Es un tumor pobrementemente diferenciado en el que las células tienden a separarse, formándose tejido conectivo alrededor de los pequeños complejos separados y se parece al carcinoma escirro clásico.

I. 4. Glicoconjugados

I. 4. 1. Glicoconjugados celulares. Papel biológico

Los glicoconjugados (glicoproteínas y glicolípidos) forman parte de la membrana plasmática de esencialmente todos los mamíferos; y participan en la mayoría de las funciones biológicas de la superficie celular.

Los carbohidratos de los glicoconjugados se comportan como lugares de reconocimiento de una gran variedad de moléculas extracelulares, como hormonas, antígenos, factores de crecimiento, fármacos, etc. Sirven como enlaces, moléculas de transporte y son marcadores de individualidad de la célula.

Los carbohidratos participan directamente en las reacciones de reconocimiento intercelular y de interacción con el sustrato.

Confieren a la célula propiedades inmunológicas al actuar como antígenos(324),(325).

Debido a que confieren estabilidad y grupos de reconocimiento se encuentran predominantemente en la superficie de células normales, particularmente en la superficie luminal de las células epiteliales y en sus secreciones. Sin embargo, en las células implicadas en secreción activa, en células indiferenciadas y en células que están experimentando cambio neoplásico y displásico hay una acumulación de glicoconjugados en el citoplasma(326),(327).

4. 1. 1. Glicoproteínas

Las glicoproteínas pueden encontrarse como componentes de la membrana plasmática

y formando parte de los productos de secreción celulares. Son los principales componentes de las mucinas secretadas al igual que de las membranas de las células mucosas gastrointestinales(328),(329).

Son proteínas que tienen una cadena oligosacárida unida covalentemente a la porción peptídica.

La unidad carbohidrato de las glicoproteínas animales contiene un número limitado de monosacáridos; estos son básicamente: D-galactosa, D-manosa, L-fucosa, N-acetil-D-galactosamina y ácido siálico.

Las glicoproteínas han sido clasificadas según la naturaleza de unión entre las cadenas oligosacáridas y las polipeptídicas. Las dos principales familias son aquellas que tienen cadenas oligosacáridas enlazadas N-glicosídicamente con N-acetil-D-glucosamina al nitrógeno de la amida aspargina y, aquellas que tienen cadenas oligosacáridas unidas O-glicosídicamente con N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) a los grupos hidroxil de serina y/o treonina, y ocasionalmente hidroxilisina o hidroxiprolina; este segundo grupo también puede unirse a la D-galactosa y a la D-xilosa(330),(331).

4. 1. 1. 1. Biosíntesis de las glicoproteínas

La biosíntesis de la porción carbohidrato de las glicoproteínas está precedida por la biosíntesis de las cadenas polipeptídicas en el ribosoma. En la actualidad se cree que los polisacáridos unidos a las cadenas polipeptídicas por medio de grupos hidroxil de los residuos serina, treonina, hidroxiprolina o hidroxilisina son sintetizados por residuos azúcar añadidos a la cadena oligosacárida naciente.

La biosíntesis de glicoproteínas N-enlazadas es considerada como una vía simple, que implica la unión de un oligosacárido enlazado a lípido, el oligosacárido dolicol-difosfato; la transferencia en bloque del oligosacárido por su transportador lipídico a la cadena polipeptídica naciente, el procesamiento de las cadenas oligosacáridas por glicosidasas, y la adición de un azúcar terminal por glicosiltransferasas(331).

El establecimiento del carbohidrato unido a la proteína en N-glicosilación parece ser un proceso cotranslacional localizado en el retículo endoplasmático rugoso (RER) y posteriores pasos del ensamblaje se piensa que ocurren fundamentalmente en el aparato de Golgi(331),(332).

Mucha menos información es obtenida a partir de la unión de las cadenas oligosacáridas de glicoproteínas O-enlazadas y su topología. La reacción de glicosilación inicial en la síntesis de proteínas O-enlazadas implica la transferencia directa de GalNAc desde uridina difosfato (UDP)-GalNAc al polipéptido por una UDP-GalNAc: transferasa polipeptídica y no requiere preunión a oligosacáridos ni intermediarios lipídicos(331),(333) (Figura 1-7). Diversos autores, contemplan la localización subcelular del lugar de inicio de la reacción de glicosilación. Otros evidencian que los microsomas lisos son la principal localización submicrosomal de la enzima responsable de la transferencia de GalNAc al polipéptido y además, más distal, localización de las cadenas oligosacáridas(333). Estudios posteriores demuestran que la O-glicosilación se produce en las cisternas del aparato de Golgi y no en el RER(331).

4. 1. 2. Glicolípidos

Los glicolípidos son componentes estructurales de las membranas plasmáticas, que se encuentran localizados en su monocapa externa.

Los glicolípidos son lípidos complejos, en los cuales las cadenas de carbohidratos están unidos a la ceramida (esfingosina N-acilada y un ácido graso). La estructura así

constituida presenta una región altamente hidrofóbica y otra hidrofílica.

Pueden ser galactosilceramidas, ceramidas que contienen residuos D-galactosa en el grupo hidroxil terminal; o glucosilceramidas, ceramidas que contiene D-glucosa.

Según sus cadenas oligosacáridas centrales, los glicolípidos se pueden dividir en cuatro tipos principales, que se denominan series: ganglio, globo, lacto y neolacto. Las diversas sustituciones de los azúcares de estas estructuras determinan una amplia variedad de glicolípidos. Los globósidos y los gangliósidos contienen N-acetilgalactosamina. Los glicolípidos más complejos conocidos son los gangliósidos, que resultan de la adición de ácido siálico a las series ganglio de los glicolípidos(334).

I. 4. 2. Oligosacáridos de los glicoconjugados relacionados con los grupos sanguíneos

Los antígenos del sistema de grupos sanguíneos ABO son sintetizados además de en los eritrocitos y el endotelio vascular, por las células epiteliales secretoras del organismo(335). Los inmunodeterminantes de los antígenos ABH son estructuras carbohidrato específicas que residen en las terminaciones no reductoras de las cadenas laterales de oligosacárido de los glicolípidos y glicoproteínas(336). La proporción de carbohidratos de las sustancias de grupo sanguíneo son aproximadamente de un 80%(337).

La síntesis de esta estructura se produce por adición progresiva de monosacáridos en uniones anoméricas y glicosídicas, este procedimiento ocurre por la acción secuencial de genes-codificados a enzimas glicosiltransferasas(336).

Del fenotipo A se pueden distinguir dos subgrupos principales: A₁ y A₂ que corresponden a los dos productos de dos alelos. Entre ellos existen diferencias en cuanto al número de lugares antigénicos (los hematíes A₁ tienen más antígenos A que los hematíes A₂), además de alguna diferencia cualitativa. El comportamiento frente al reactivo anti-A es similar para los dos subgrupos.

El subgrupo A₃, mucho más raro que los dos anteriores, presenta como características que algunos hematíes son aglutinados por el reactivo anti-A y otros no. Otros subgrupos débiles de A son: A_x, A_m, A_{end}, A_{el}...

El grupo B también presenta subgrupos, pero con mucha menos frecuencia que el A. Se denominan B₃, B_x, B_m y B_{el}.

Para que puedan expresarse los genes A y B debe existir otro gen llamado H. Está situado en un *locus* aparte de los anteriores y define el sistema de grupo sanguíneo Hh.

El sistema Lewis se diferencia de los sistemas de grupo sanguíneo, ya que para la síntesis de sus antígenos es necesaria la segregación independiente de los genes Hh, Sese, y Lele, pudiendo el fenotipo ABO modificar el fenotipo Lewis.

Este sistema está formado por un par de genes alelos, Le y le, este segundo silente(337).

4. 2. 1. Biosíntesis del sistema ABH, Ii y Lewis

Con respecto a los antígenos ABH y Lewis se ha observado que tienen idéntica estructura básica. La especificidad de cada antígeno viene determinada por el azúcar terminal de la molécula.

La síntesis de las sustancias ABH y Lewis se efectúa por la adición secuencial de unidades glucídicas simples en el extremo terminal no reductor de las cadenas glucídicas unidas covalentemente a un precursor de naturaleza proteica o lipídica (Figura 1-8).

Actualmente se distinguen 4 tipos de sustancia según la estructura del disacárido terminal aceptor:

- Tipo 1: Gal 1-3 GlcNAc 1-R
- Tipo 2: Gal 1-4 GlcNAc 1-R
- Tipo 3: Gal 1-3 GlcNAc 1-R
- Tipo 4: Gal 1-3 GlcNAc 1-R

Las sustancias de tipo 1 y 2 son abundantes en los tejidos y secreciones de las células epiteliales y glandulares de origen endodérmico. Al contrario, los constituyentes membranosos (glicoproteínas, glicolípidos) de las células de origen ectodérmico y mesodérmico (glóbulos rojos, piel, endotelio vascular, etc.) contienen principalmente sustancias del tipo 2.

Las cadenas de tipo 3 representan estructuras glicánicas fijadas por la unión O-glicosídica sobre los residuos serina o treonina de las glicoproteínas.

Las cadenas de tipo 4 están caracterizados por glicolípidos derivados de globósidos, el glicolípido mayor de los eritrocitos humanos que lleva el antígeno P. Los antígenos H y A de tipo 4 (globo-H y globo A) se han identificado en tejido renal, meconio y eritrocitos A₁(337).

La secuencia Gal (1-3) GalNAc constituye el antígeno T (de Thomsen-Friedenreich), que es el precursor de los antígenos de grupo sanguíneo M y N.

El antígeno H está formado por la acción de una 1, 2 fucosiltransferasa que enlaza fucosa a la galactosa de tipo 1 (Gal 1, 3GlcNAc) o tipo 2 (Gal 1, 4GlcNAc) de las cadenas laterales oligosacárido. En individuos con grupo sanguíneo tipo O, la síntesis de antígenos está detenida por la sustancia H. Sin embargo, en individuos con tipo sanguíneo A, B, o AB, la sustancia H sirve de precursor inmediato para los antígenos A y B. Es más, en individuos con grupo tipo A, una 1, 3 N-acetilgalactosaminiltransferasa (transferasa 1,3 GalNAc) cataliza la transferencia de GalNAc a la sustancia H, mientras que en individuos con tipo B el antígeno B es sintetizado como resultado de una 1,3 galactosiltransferasa (transferasa 1, 3 Gal) que transfiere galactosa al precursor H(338).

El antígeno Lewis (Le^a) está formado por la adición de 4 L-Fucosa sobre la N-acetilglucosamina de las cadenas tipo 1. El antígeno X resulta de la unión de 3 L-Fucosa sobre la N-acetilglucosamina de las cadenas tipo 2. La presencia simultánea de las dos fucosas (sobre la galactosa y la N-acetilglucosamina) de las cadenas de tipo 1 y 2 conduce a los antígenos Le^b e Y(339).

Los antígenos o sustancias Lewis que existen en el plasma son glicoesfingolípidos; en cambio, los antígenos Lewis de las secreciones son glicoproteínas.

Los antígenos Lewis no están bien desarrollados al nacer; todos los recién nacidos son Le (a⁻b⁻); si poseen el gen Le, al cabo de pocos días aparece el antígeno Le_a, estableciéndose el fenotipo definitivo años después.

Las cadenas sialosil tipo 1 actúan como precursor inmediato para el antígeno tumor-asociado sialosil-Le^a, definido por el anticuerpo monoclonal CA 19.9(340) -(342).

El sistema Ii, que algunos autores no lo consideran como tal, está formado por dos antígenos principales, I e i, cuyo gen puede interaccionar con los del sistema ABO. Los determinantes I e i son caracterizados por una estructura tipo 2 en su extremidad terminal no reductora, y pueden ser considerados los precursores bioquímicos de los determinantes antigénicos lineales o ramificados.

El determinante i es una secuencia oligosacárida lineal hecha de unidades Gal 1-4 GlcNAc repetitivas.

Determinante i Gal 1-4 GlcNAc 1-3 Gal

1-4 GlcNAc 1-3 Gal-R

Este antígeno es sintetizado por la acción de dos glicosiltransferasas, la transferasa 1-4 Gal y la 1-3 GlcNAc.

El determinante I es una secuencia oligosacárida ramificada (polilactosaminoglicano), identificada por primera vez en la fracción gangliósida de los eritrocitos.

Determinante I

Gal 1-4 GlcNAc

1-6

Gal 1-4 GlcNAc 1-3 Gal-R

1-3

Gal 1-4 GlcNAc

Su biosíntesis se efectúa por la acción secuencial de tres glicosiltransferasas: las dos enzimas responsables de la síntesis de las estructuras lineales, 1-4 galactosiltransferasa y 1-3 GlcNAc transferasa; y la enzima que puede formar los puentes de ramificación, la 1-6 GlcNAc transferasa.

El antígeno I procede del i por un proceso de ramificación que añade una secuencia Gal 1-4 GlcNAc a una galactosa interna de la estructura del antígeno i(343).

4. 2. 2. Expresión de glicoconjugados y de antígenos de grupo sanguíneo en el epitelio colónico

Una de las principales funciones de las células del epitelio gastrointestinal es la producción de moco protector y lubricante. El moco se ha mostrado que es una entidad bioquímicamente heteróloga compuesta de glicoproteínas de alto p.m. con varios aspectos estructurales que portan incluso especificidades de grupo sanguíneo del individuo(344).

La expresión de antígenos ABH por las células epiteliales muestran ciertos cambios regionales asociados con el desarrollo y la transformación neoplásica(338),(345). En los fetos, los antígenos A, B o H que corresponden a los tipos sanguíneos individuales son expresados por los colonocitos en toda la longitud del colon(346),(347). Sin embargo, en el nacimiento y persistiendo en el adulto, la expresión de los grupos sanguíneos por los colonocitos desaparece en el colon distal, resultando en un gradiente de expresión proximal-distal(348) -(350).

Con el desarrollo de carcinoma, pueden aparecer tres alteraciones en la expresión ABH. La más frecuente es la reaparición del fenotipo fetal en el colon distal(349),(351) ,(352). En el colon distal los antígenos ABH se comportan como antígenos oncodesarrollados. La segunda alteración más frecuente es la delección de la esperada sustancia de grupo sanguíneo en el colon proximal(347),(349). Por último, las células del cáncer de colon de la proximidad del colon proximal y distal pueden expresar sustancias de grupo sanguíneo que son incompatibles con las de su tipo sanguíneo(347),(353). A pesar de que estas tres alteraciones ocurren en el cáncer de colon y no en la mucosa normal, han sido observadas en lesiones asociadas con el cáncer, como pólipos adenomatosos colónicos, que presentan positividad variable para la sustancia H, y la expresión del antígeno aparece correlacionada con el grado de displasia observado en el examen microscópico, los pólipos no adenomatosos y las neoplasias no epiteliales no presentan expresión de sustancia H(354).

Los mecanismos por los que existe una alteración de los antígenos ABH en el desarrollo y en la transformación neoplásica son desconocidos. Aunque han sido postuladas varias teorías: 1. Insuficiente actividad de las glicosiltransferasas para la adición de un azúcar inmunodeterminante. 2. Los antígenos ABH son sintetizados normalmente pero son divididos por glicosidasas específicas de grupo. 3. Los antígenos ABH son sintetizados normalmente pero quedan enmascarados por la adición de otros carbohidratos. 4. Las glicosidasas A, B, y H son normalmente activas, pero la sustancia H o un primer precursor no son eficaces, resultando en una baja expresión de los antígenos ABH(338).

Diversos estudios han examinado la actividad de las glicosiltransferasas ABH en tejidos de cáncer de colon humano. Kim et al.(355) describen que la actividad de la transferasa de grupo sanguíneo A es más baja en los tejidos neoplásicos que en los normales, correspondiéndose a una disminución del contenido total de GalNAc de la membrana glicopéptida. Asimismo, la actividad transferasa de grupo B es baja, pero se corresponde en una disminución del contenido de galactosa en el citoplasma, no en la membrana(356). Sin embargo, otros autores no han hallado diferencias significativas entre el colon proximal ni el distal ni disminución significativa de actividad transferasa A o B(357). Kuhns y Schoentag(358) observan que la mucosa colónica normal muestra un gradiente de disminución de la actividad transferasa A y H proximal-distal y que la actividad de ambas transferasas es más baja en el cáncer que en la mucosa normal adyacente en el colon proximal, pero que distalmente los niveles normales son ya bajos y no existe disminución asociada al cáncer. Otros estudios demuestran disminución de la actividad de las transferasas A y B en el cáncer, pero no de la H(338).

En el colon derecho se expresan los ya citados antígenos de grupo sanguíneo (BGA) A y B, y Le^b y Le^y (359).

En todo el colon están presentes los antígenos Le^a, Le^y y H-tipo 2.

En el colon distal y recto normal del adulto se expresan los BGA, sialosil-Le^a, Le^a, Le^x, Le^y, en varios compartimentos celulares epiteliales de las criptas(360),(361). Le^x y x-like se expresan ocasionalmente. El antígeno sializado Lea muestra diferentes patrones según el anticuerpo empleado, siendo más intenso para el CO 29.11 que para el CA 19.9(360).

El antígeno Le^b está ausente normalmente del colon distal y recto, pero está presente en el colon fetal, neoplasias y adenomas, y puede ser considerado junto a los antígenos A, B y H como antígenos oncofetales tumor-asociados(360),(352).

El Le^y es un marcador de células indiferenciadas en la base de las criptas(346) y no se encuentra en la mucosa colónica normal(345).

La mucina de las células caliciformes de la mucosa transicional muestran disminución de los antígenos A y B, y aumento de H(362).

I. 4. 3. Tinciones habituales de los glicoconjugados

Para la visualización de los glicoconjugados celulares y extracelulares a nivel de MO y ME están a nuestro alcance varias reacciones de tinción. Estas técnicas están basadas fundamentalmente en la detección de grupos sulfato y carboxil o configuraciones reactivas de ácido periódico(363). Las tinciones histoquímicas habitualmente usadas para la detección de glicoconjugados son:

1. Acido periódico de Schiff(364) y sus combinaciones con azul alzian (AB), potasio hidróxido alcohólico (KOH), borohidrido periodado (PBT), o PAS preparado con tionina(365), la enzima D-galactosa oxidada (GO)(366).
2. Azul Alzian(367)
3. Diamina rica en hierro

4. Diamina- azul Alzian rica en hierro (HID-AB) (369)

Los problemas intrínsecos en estas técnicas son las limitaciones en su especificidad para residuos sacáridos particulares y resolución espacial al igual que sólo uno de ellos puede ser usado a nivel de ME para la detección de carbohidratos en compartimentos intracelulares y en tejidos compactos(369).

I. 4. 4. Métodos específicos de tinción

La mejor comprensión actual de los complejos glicoconjugados está basada en el desarrollo de aproximaciones técnicas que han permitido una mejor caracterización, purificación y análisis estructural de los componentes carbohidratos. Entre estos métodos nuevos y/o mejorados debe hacerse mención especial de los anticuerpos monoclonales y de las lectinas como las principales herramientas analíticas para el estudio de glicoconjugados tanto solubles como celulares:

1. Lectinas: El uso de lectinas proporciona una aproximación más diferenciada y específica. Puesto que las lectinas se enlazan a secuencias definidas de azúcar de cadena de oligosacáridos de glicoconjugados(367), en cortes congelados, parafinados, embebidos en Lowicryl, etc.

Las lectinas tienen 2 ventajas principales sobre cualquier otro método histoquímico para demostrar carbohidratos; pueden ser extremadamente sensibles y específicas. Debido a esta especificidad, sólo una pequeña proporción de los carbohidratos actualmente pueden ser identificados salvo que usemos combinaciones de lectinas.

2. Anticuerpos contra epitopos de carbohidrato, en cortes congelados y parafinados.

Otros métodos usados en la caracterización de glicoconjugados son:

3. Algunas toxinas

4. Glicosiltransferasas: su uso basado en estrictas especificidades de aceptor se han mostrado como reactivos valiosos en la comprensión bioquímica de estructuras de oligosacáridos(370). Usualmente requieren cortes congelados no fijados(371) y su principal inconveniente es que su cuantificación depende de la cantidad de tejido(372).

5. *Ligands*, que se enlazan con sus receptores específicos, requieren cortes sin fijar congelados.

I. 5. Lectinas

I. 5. 1. Definición

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas, obtenidas fundamentalmente de plantas, que tienen la propiedad de unirse específicamente a carbohidratos. La primera descripción de estas sustancias la realizó Hermann Stillmark(373) en el año 1888, al observar que los extractos de las semillas de ricino (*Ricinus communis*) provocaban una aglutinación de los eritrocitos humanos y de algunos animales de experimentación(370). Con el tiempo se fueron descubriendo nuevos extractos proteicos de semillas de otras plantas que también mostraban la capacidad de aglutinar eritrocitos. Ello indujo a denominar a estas sustancias hemaglutininas vegetales, y más adelante fitoaglutininas o fitohemaglutininas, resaltando su origen y su capacidad aglutinadora de eritrocitos(374). No obstante, la terminología utilizada para designarlas se fue modificando paralelamente al desarrollo de nuevos conocimientos sobre estos agentes. Con los años se identificaron, purificaron y caracterizaron nuevas sustancias con propiedades similares de orígenes muy diversos, plantas inferiores, bacterias, hongos, animales invertebrados y vertebrados. Además, se observó que no sólo aglutinaban eritrocitos, sino que también podían estimular la división de los linfocitos(375),(376) y aglutinar células neoplásicas. Por esta razón se utilizaron nuevos términos genéricos para

denominarlas: aglutininas naturales, heteroaglutininas o anticuerpos naturales.

El término actual lectina, del verbo latino lego, legi, lectum, que significa elegir, escoger y seleccionar, fue acuñado por W. C. Boyd y E. Shapleigh en 1954(377) como un nombre genérico para designar unas sustancias que presentaban la capacidad de unirse selectivamente a moléculas de carbohidratos, de manera similar a como lo hacían los anticuerpos, pero que no eran inducidas como parte de la respuesta inmune a la estimulación antigénica.

Este término bastante amplio e impreciso fue usado bastante intuitivamente y diversos autores le dieron significados distintos hasta que se llegó a un consenso por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica recomendando la aceptación de la definición propuesta por Goldstein et al. en 1981(378). De acuerdo con esta definición, las lectinas son proteínas o glicoproteínas de enlace con carbohidratos que aglutinan células y/o precipitan glicoconjugados. Esta definición incluye, además, los siguientes aspectos: a) las lectinas tienen por lo menos dos lugares de unión a los carbohidratos específicos de las células que aglutinan y/o los polisacáridos, glicoproteínas o glicolípidos que precipitan; b) la especificidad de la lectina se define, habitualmente, en función de los monosacáridos u oligosacáridos que inhiben las reacciones de aglutinación, precipitación o agregación inducidas por la lectina; c) las lectinas no desarrollan ninguna actividad metabólica sobre el azúcar al cual se unen.

La clasificación de Goldstein no distingue las lectinas de enzimas con lugares específicos de enlace con azúcar(370), por esto, Franz y Ziska(379) en 1981 propusieron el término "afinitinas" como una denominación colectiva para lectinas, enzimas y anticuerpos con una alta afinidad para estructuras químicas específicas(370). También se ha propuesto el término proteínas-receptor específicas por Gold y Balding en 1975. Sin embargo, el término lectina es actualmente el mejor conocido para cubrir estas entidades no inmunes(370).

Las lectinas han sido detectadas en un amplio rango de organismos, especialmente vegetales y una exhaustiva lista de fuentes fue publicada por Gold y Balding en 1975(380). Ya que todas las lectinas poseen al menos 2 localizaciones de enlace de carbohidratos pueden aglutinar células portadoras de glicoconjugados de superficie.

La mayoría de los trabajos sobre las lectinas han sido dirigidos hacia el hallazgo de reactivos específicos de grupo sanguíneo; por todo ello, la mayoría de las lectinas han sido identificadas por su capacidad de aglutinar glóbulos rojos, ya sean no tratados o bien enzimáticamente modificados, por ejemplo con neuraminidasa. Las lectinas son generalmente seguidas durante su purificación por su propiedad de hemaglutinación pero pueden aglutinar otras células en suspensión dependiendo de la expresión de los oligosacáridos en la superficie celular. La retirada de grupos terminales tales como ácidos siálicos mediante enzimas (por ejemplo tripsina y neuraminidasa) revela frecuentemente carbohidratos no expuestos. Aunque tales carbohidratos pueden estar normalmente secuestrados por grupos terminales, los cambios en la conducta celular y función pueden ser reflejados por la incapacidad de formar los grupos azúcar terminales típicos. Durante los cambios en el ciclo celular, transformación, desarrollo tumoral, potencial metastásico, así como en la diferenciación celular normal hay cambios de superficie en los azúcares detectables por las lectinas. Aunque actualmente no hay lectinas que sean célula-específicas o tumor específicas hay un gran interés por usar las lectinas como una ayuda en la determinación de la diferenciación, potencial metastásico y funcional en oposición a la simple transformación morfológica. Más recientemente los oligosacáridos citoplasmáticos han sido identificados por lectinas en cortes de tejidos y esto aporta una herramienta nueva y potencialmente enormemente útil para confirmar la diferenciación celular y la función en cortes en parafina fijados en formalina normales e histopatológicos.

I. 5. 2. Clasificación de las lectinas

Se han realizado numerosos intentos con la finalidad de unificar criterios para una mejor clasificación de las lectinas. Gallagher(381) propuso una clasificación basada en los carbohidratos que son capaces de inhibir las reacciones inducidas por las lectinas. Esta clasificación dividía a las diferentes lectinas en dos grandes grupos: 1. Lectinas de la clase I, que pueden ser inhibidas con bajas concentraciones de monosacáridos y, 2. Lectinas de la clase II, cuyas reacciones son inhibidas exclusivamente por oligosacáridos (lineales o ramificados) y no por monosacáridos.

A pesar de esta clasificación, la mayoría de los autores prefieren agrupar las lectinas en función de su especificidad de unión a los azúcares terminales en las cadenas de carbohidratos. Así, la mayoría de las lectinas empleadas en los laboratorios pueden clasificarse en cinco grupos: a) lectinas que se unen a la glucosa/manosa, b) lectinas que se unen a la N-acetilglucosamina, c) lectinas que se unen a la galactosa/N-acetilgalactosamina, d) lectinas que se unen a la L-fucosa y e) lectinas que se unen al ácido siálico. Las lectinas más usadas y su especificidad se han resumido en la tabla siguiente:

| GRUPO DE ENLACE | ABREVIATURA | LECTINA | CARBOHIDRATO ESPECÍFICO |
|---------------------------------|-------------|---|---|
| Glucosa/Manosa | Con A | <i>Canavalia ensiformis</i> | α Man > α Glc > GlcNAc α Man > α Glc = GlcNAc |
| | LCA | <i>Lens culinaris</i> | α Man > α Glc > GlcNAc |
| | PEA | <i>Pisum sativum</i> | α Man > Glc = NAc |
| | | | |
| N-acetilglucosamina | DSA | <i>Datura stramonium</i> | GlcNAc(β 1,4GlcNAc) ₁₋₃ =Gal β 1,4GlcNAc |
| | GSA-II | <i>Griffonia simplicifolia</i> | y β GlcNAc |
| | PWM | <i>Phytolacca americana</i> | GlcNAc(β 1,4GLcNAc) ₁₋₅ =(Gal β 1,4GlcNAc) ₂₋₅ |
| | STA | <i>Solanum tuberosum</i> | GlcNAc(β 1,4GlcNAc) ₁₋₄ |
| | UEA-II | <i>Ulex europaeus II</i> | L-Fuc1,2Gal β 1,4GlcNAc > GlcNAc(β 1,4GlcNAc) ₁₋₃ |
| | WGA | <i>Triticum vulgare</i> | GlcNAc(β 1,4GlcNAc) ₁₋₂ > β GlcNAc > Neu5Ac |
| N-acetilgalactosamina/galactosa | BPA | <i>Bauhinia purpurea</i> | α y β GalNAc > α y β Gal |
| | DBA | <i>Dolichos biflorus</i> | GalNAc α 1,3GalNAc >> α GalNAc |
| | GSA-I | <i>Griffonia simplicifolia -I-A₄</i> | α GalNAc > α Gal |

| | | | |
|---------------|-------|-------------------------------------|---|
| | GSA-1 | <i>Griffonia simplicifolia</i> I-B4 | α Gal |
| | HPA | <i>Helix pomatia</i> | GalNAc α 1,3GalNAc > α GalNAc |
| | LBA | <i>Phaseolus lunatus</i> | GalNAc α , 1,3GalNAc > α GalNAc |
| | MPA | <i>Maclura pomifera</i> | α GalNAc > α Gal |
| | PNA | <i>Arachis hypogaea</i> | Gal β 1,3GalNAc > α y β Gal |
| | RCA-I | <i>Ricinus communis</i> | β Gal > α Gal >> GalNAc |
| | SBA | <i>Glycine maximus</i> | α y β GalNAc > α y β Gal |
| | SJA | <i>Sophora japonica</i> | α y β GalNAc > α y β Gal |
| | VVA | <i>Vicia villosa</i> | GalNAc α 1,3Gal = α GalNAc α GalNAc |
| | WFA | <i>Wistaria floribunda</i> | GaNAc α 1,6Gal > aGalNAc > β GalNAc |
| L-Fucosa | AAA | <i>Aleuria aurantia</i> | α L-Fuc |
| | LTA | <i>Lotus tetragonolobus</i> | α L-Fuc > L-Fuca 1,2Gal β 1,4GlcNAc >> L-Fuca 1,2Gal β 1,3GlcNAc |
| | UEA-I | <i>Ulex europaeus</i> | α L-Fuc |
| Ácido siálico | LFA | <i>Limax flavus</i> | α Neu5Ac > α Neu5Gc |
| | LPA | <i>Limulus polyphemus</i> | Neu5Ac(oGc) α 2,6GalNAc > Neu5Ac |

Tabla 1-4

I. 5. 3. Propiedades biológicas de las lectinas

Las lectinas pueden aparecer en cualquier tipo de organismos, pueden ser solubles o estar enlazadas con membranas, pueden ser glicoproteínas u otros derivados proteicos post-translacionalmente modificados(378).

Las lectinas ejercen importantes funciones en los organismos donde se encuentran, algunas de las cuales no se conocen todavía con precisión. En líneas generales las lectinas pueden estar relacionadas con fenómenos de reconocimiento y de adhesión celular(382), intervienen en la regulación de los tejidos durante la ontogenia, en la adhesión de bacterias y en la eliminación de glicoproteínas circulantes por el hígado(383).

En las plantas, las lectinas juegan un papel importante en los mecanismos de defensa y protección contra agentes fitopatógenos(374), también favorecen la simbiosis entre éstas y ciertos microorganismos(382).

La aglutinación es la manifestación más inicialmente detectable de la interacción de la

lectinas con las células(384).

La aglutinación es un fenómeno complejo que depende de las propiedades de las proteínas, de las células y del medio usado. La aglutinación no representa, al menos en la gran mayoría de los casos, la auténtica actividad fisiológica de las lectinas. Esto deja a los criterios de aglutinación como poco prácticos para el uso general y bastante artefactuosos(378).

Las lectinas pueden poseer varias actividades biológicas, pueden ser toxinas, hormonas, etc. y pueden ser enzimas cuya actividad no esté dirigida hacia las moléculas azúcar(378).

Las lectinas de legumbres inducen cambios en el metabolismo celular(385).

Las lectinas pueden simular antígenos e inducen mitosis en linfocitos(374). Las lectinas inducen la producción interleuquina 2 (IL-2) y la aparición de receptores de IL-2 en células T(375).

I. 5. 4. Propiedades químicas de las lectinas

La mayoría de las lectinas reaccionan con azúcares no reducidos situados en la posición terminal de los glicoconjugados. Sin embargo, existen lectinas que pueden reaccionar con componentes internos o ramificados de las cadenas de los carbohidratos(382).

La especificidad nominal a monosacáridos de las lectinas no refleja siempre la naturaleza exacta del carbohidrato que tiene la mayor afinidad por esa lectina. El azúcar simple soluble que inhibe el enlace de lectinas y la hemaglutinación pueden no ser el mismo que el grupo azúcar que se enlace preferentemente con la lectina en el tejido. Esto se debe en gran parte a que cada localización de enlace puede unirse a una combinación de azúcares más íntimamente que a un azúcar simple. Es más aunque el polisacárido preferido pueda componerse de unidades idénticas la especificidades pueden ser diferentes(370).

La especificidad de las lectinas se define convencionalmente en base de un test de inhibición de haptenos tipo Landsteiner en el que varios azúcares son probados respecto a su capacidad de inhibir la hemaglutinación de glóbulos rojos(382).

La unión entre los carbohidratos y las lectinas se asemeja en gran manera a la unión antígeno-anticuerpo. El tipo de enlace que se establece es lábil, no covalente y reversible. En ocasiones, algunas lectinas requieren la presencia de metales pesados, en particular Ca^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} para mantener activos sus lugares de unión; en ausencia de estos la lectina pierde reactividad y no se produce reacción(382).

Muchas lectinas de la misma especificidad nominal a monosacáridos muestran diferente afinidad por la misma célula o estructura tisular en preparaciones histoquímicas. Aunque la mayoría de las lectinas reaccionan preferentemente con los azúcares terminales no reductores algunas también reaccionan con los componentes internos de las cadenas carbohidrato(386).

Algunas lectinas exhiben una fuerte especificidad anomérica mientras que otras no distinguen diferentes formas anoméricas de los azúcares D-piranosos.

Las lectinas también pueden enlazarse con ligands no carbohidratos. El enlace de lectinas con ligands carbohidrato generalmente no se altera por la adición de biotina, agarosa, o isotiocianato de fluoresceína (FITC)(387). Las lectinas derivadas pueden tener algunas ventajas sobre las formas puras. Por ejemplo, encontramos que la Con-A succinilada es más estable y da resultados más consistentes que la lectina pura, si bien bajo condiciones correctamente controladas los resultados histoquímicos son comparables.

I. 5. 5. Principales aplicaciones de las lectinas

5. 5. 1. Lectinas como reactivos en anatomía

Los complejos glicoproteicos son marcadores adecuados, y las lectinas que reconocen estas macromoléculas han sido usadas extensamente como reactivos bioquímicos e histoquímicos en patología y biología celular(384). A nivel celular las lectinas han sido usadas para estudiar varios orgánulos citoplasmáticos y microdominios de las membranas celulares. A nivel tisular las lectinas han sido usadas como reactivos específicos para varios tipos celulares al igual que para los varios estadios de diferenciación o maduración(388). A nivel de histología de órganos las lectinas han sido usadas como reactivos para delineación de segmentos funcionales y anatómicos o de microentornos. Las lectinas también han sido usadas para estudios originales y comparativos para aportar pistas a cerca de la ontogenia y filogenia de varios órganos o tejidos(389). Los cambios funcionales también han sido explorados al igual que los cambios asociados con o que conducen a la transformación maligna, metástasis y heterogeneidad tumoral celular.

5. 5. 1. 1. Componentes celulares

En biología celular, las lectinas han sido mayoritariamente usadas con éxito como reactivos de orgánulos citoplasmáticos ricos en glicoconjugados tales como superficie de membrana celular u orgánulos implicados en la síntesis, almacenamiento, o liberación de carbohidratos complejos(324).

La función o significado biológico de la mayoría de las lectinas que se enlazan con moléculas de superficie permanece desconocido. Sin embargo, a pesar de esta limitación, los receptores de lectinas de superficie celular han sido explotados intensamente en el estudio de la superficie celular. Las lectinas marcadas con FITC aplicadas a células vivas pueden ser usadas para estudiar la fluidez de la membrana celular y los cambios en la distribución de localizaciones de receptores bajo la influencia de varios estímulos(390). La endocitosis de lectinas marcadas con peroxidasa aplicada a la membrana celular de células vivas ha sido usada como modelo para estudiar la internalización de receptores de superficie en muchos sistemas celulares.

Las localizaciones de enlace de lectina en la superficie celular pueden servir como marcadores para el estudio de la polaridad celular. En epitelios polarizados tales como los que delimitan el tracto gastrointestinal algunas lectinas se sabe que reaccionan con la membrana celular luminal apical pero no con las membranas basolaterales(391).

5. 5. 1. 2. Tráfico intracitoplasmático

Las lectinas han sido usadas como reactivos ultraestructurales para la modificación postranslacional de las proteínas en los subcompartimentos del aparato de Golgi y del retículo endoplasmático rugoso(388),(324).

5. 5. 1. 3. Identificación de tipos celulares específicos

Debido a la glicosilación diferencial de las membranas celulares y de componentes citoplasmáticos en células altamente especializadas las lectinas pueden ser usadas como reactivos para el estudio e identificación de varios tipos celulares(392).

5. 5. 1. 4. Marcadores de maduración

La diferenciación y maduración de varias células en los tejidos en desarrollo al igual que los tejidos que sufren constante renovación puede ser eficientemente estudiada usando la histoquímica con lectinas(324).

5. 5. 1. 5. Cambios funcionales y del desarrollo

En la cavidad uterina, en relación al embarazo y estudios de embriones precoces de rata han mostrados que los glicoconjugados de superficie aparecen y desaparecen de la superficie celular de una forma regulada por el desarrollo(393),(394).

5. 5. 1. 6. Diferencias de especie, raza y grupo

La glicosilación de células equivalentes y macromoléculas citoplasmáticas difiere entre las especies, por todo esto no es una sorpresa que estructuras anatómicas equivalentes por su localización y función difieran entre sí según las especies en lo que respecta a sus patrones de enlace de lectinas(392),(395). La histoquímica de las lectinas ha sido usada ampliamente para explorar sutiles diferencias entre especies. Las diferencias en los patrones de enlaces de lectinas en segmentos equivalentes de varios órganos han sido publicados incluyendo testículos, epidídimo, oviducto, útero, glándulas salivales, páncreas, riñones y linfocitos(324).

5. 5. 1. 7. Matriz extracelular

Muchas lectinas se enlazan intensamente al estroma del tejido conectivo de una manera inespecífica.

5. 5. 2. Lectinas en patología

Formulando la hipótesis de que algunas condiciones patológicas podían perturbar el metabolismo de los glicoconjugados celulares, muchos investigadores han obtenido ventaja de la accesibilidad comercial de las lectinas y las han utilizado como reactivos para estudios patológicos.

5. 5. 2. 1. Cambios reactivos

Los cambios relacionados con la inflamación en la distribución de glicoconjugados celulares han sido mejor ilustrados en el intestino grueso y se tratarán posteriormente.

5. 5. 2. 2. Patología tumoral

Los glicoconjugados de superficie celular están a menudo alterados en las células neoplásicas, globalmente estos cambios pueden ser clasificados como: a) pérdidas de ciertos componentes normales b) cantidades aumentadas de componentes normales c) distribución alterada de componentes normales y d) aparición de componentes que no se encuentran en células adultas normales a partir de las que el tumor ha aparecido.

Las lectinas han sido usadas ampliamente como reactivos histoquímicos para estudiar glicoconjugados de superficie celular en células tumorales, y globalmente los resultados complementan los datos obtenidos por inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales y policlonales. Sin embargo, al contrario de los anticuerpos, muchos de los cuales son diagnósticos para ciertas lesiones patológicas, los datos histoquímicos de lectinas son raramente patognomónicos.

Las lectinas han sido aplicadas a tumores animales y humanos de muchos sistemas orgánicos incluyendo entre otros ojo, diente, pituitaria, tiroides, paratiroides, tracto respiratorio, tracto gastrointestinal, riñón, mama, órganos genitales masculinos y femeninos, tejidos hematopoyéticos y linfoides, y tejidos blandos(344),(396) -(404).

Las lectinas han sido usadas como reactivos para estudiar la histogénesis tumoral, relación de los tumores con situaciones inflamatorias y preneoplásicas, diferenciación de

células tumorales, heterogeneidad de poblaciones celulares tumorales y biología básica de las células tumorales. Los datos obtenidos en varios laboratorios son a menudo difíciles de reducir a un común denominador. Todavía no han sido identificados coherentemente marcadores de malignidad, invasividad o tendencia a la metastatización. La mayoría de los tumores muestran una extensa heterogeneidad celular. Por todo esto, en este momento no parecen factibles interpretaciones definitivas de estos hallazgos.

I. 5. 6. MICROSCOPIA DE LAS LECTINAS

Para el uso en estudios de localización microscópica las lectinas deben ser enlazadas con marcadores apropiados.

5. 6. 1. Métodos de marcaje de lectinas

El marcaje de lectinas de secciones de tejido puede realizarse según dos métodos:

5. 6. 1. 1. Métodos directos

Los métodos directos de marcado usan lectinas covalentemente enlazadas o adsorbidas a marcadores visuales, generalmente fluorocromos (isotiocianato de fluoresceína o de tetrametilrodamina) o una enzima (peroxidasa de rábano)(370),(405). También han sido usados la ferritina y el oro coloidal.

Estos métodos se deben primariamente, a la accesibilidad de las preparaciones puras de lectina y a la relativa facilidad con la que puede conjugarse a marcadores sin pérdida significativa en la capacidad de enlace(405).

Los métodos directos muestran mayor sensibilidad particularmente para secciones de parafina, pero necesita altas concentraciones de lectina(370).

5. 6. 1. 2. Métodos indirectos

Varios métodos indirectos para análisis microscópicos han sido desarrollados.

Los métodos indirectos actúan localizando la lectina enlazada o bien con un anticuerpo dirigido frente a la lectina por una reacción avidina-biotina o bien aplicando azúcar marcado a lugares de enlace no ocupados en la lectina(370). Existen 5 aproximaciones:

1. Método de anticuerpo en una etapa: Consiste en un anticuerpo dirigido frente a la lectina, en una tinción de tipo anticuerpo indirecto. Esto puede usarse con un anticuerpo anti-lectina conjugado con un marcador.

2. Método de anticuerpo en dos etapas: Por incubación con un anticuerpo anti-lectina tras incubación con lectina y finalmente incubación con un segundo anticuerpo conjugado al marcador. Alternativamente, puede usarse un proceso en tres etapas en las que las células son secuencialmente tratadas con lectina, el anticuerpo anti-lectina y el conjugado anti-Ig-marcador o proteína-A marcador. Tales métodos inmunológicos, sin embargo, no ofrecen ventajas significativas sobre el método directo u otros métodos indirectos(406).

3. Método de lectina avidina-biotina: Este sistema avidina-biotina requiere una lectina biotinada y posteriormente avidina conjugada con un marcador (generalmente peroxidasa). Esta técnica es también aplicable con anticuerpos biotinados para marcado de localizaciones antigénicas.

4. Método de lectina ferritina-avidina(406)

5. Método de lectina-oro coloidal.

6. Método del sandwich azúcar-lectina-azúcar. Consiste en un marcador glicosilado añadido a la muestra incubada con lectina para unirse a las localizaciones de enlace no ocupadas(370).

El análisis más común es el método indirecto de Con-A usado con hemocianina. En este método las células son previamente tratadas con Con-A, lavadas con tampón y posteriormente tratadas con hemocianina. Ya que la Con-A es multivalente, es decir, tetramérica bajo condiciones fisiológicas tamponadas puede enlazarse tanto con los receptores específicos de superficie celular Con-A y con los residuos específicos Con-A en la hemocianina. También han sido usados para MES otros marcadores como la peroxidasa de rábano(407) o el hierro dextrano que también se enlazan con Con-A(406). También se ha usado el oro-ovomucoide para la detección de lectina Wheat germ (WGA)(408) y fetuína-oro para la lectina *Limax flavus*(409) y WGA(368). Un método indirecto semejante puede ser usado con otras lectinas o marcadores derivados con los correspondientes residuos azúcar.

5. 6. 2. Lectinas conjugadas con oro coloidal

Las partículas de oro coloidal (OC) han demostrado ser particularmente útiles para la localización microscópica de las lectinas(368),(410).

Aunque el oro coloidal ha sido motivo de atención desde hace más de 400 años(411); fue introducido en técnicas inmunológicas por Faulk y Taylor(412) en 1971; desde entonces ha sido un marcador ampliamente utilizado para la detección a nivel de MO, MET y MES de una variedad de sustancias exógenas y endógenas(413). La aplicación del oro coloidal en MES fue introducida por Horisberger et al.(414) en 1975. Estudios anteriores llevados a cabo con complejos lectina-oro han hecho hincapié en la detección de lugares de enlace en la superficie de células cultivadas o aisladas y aspectos de su estado dinámico. Posteriormente las aplicaciones se encaminaron a la visualización de residuos de azúcar en tejidos intactos y dentro de las células(397),(415).

5. 6. 2. 1. Propiedades del oro coloidal

-Los soles monodispersos de oro con partículas de oro de tamaño uniforme y forma pueden ser preparadas rápida, reproduciblemente y con bajo coste en un rango de partículas de 2 a 150 nm de diámetro.

-La naturaleza del OC proporciona una fina localización de los lugares de marcado; el rango de tamaños garantiza alta flexibilidad en la resolución lateral.

-Las partículas de OC están cargadas negativamente y pueden ser cargadas por adsorción electrostática no-covalente con varias macromoléculas (por ej. proteína A estafilocócica, inmunoglobulinas, lectinas, toxinas, glicoproteínas, enzimas, estreptavidina, hormonas, antígenos peptídicos conjugados con albúmina sérica bovina) formando complejos oro-ligand estables y bioactivos. En condiciones apropiadas de almacenamiento permanece estable y retiene gran parte de su bioactividad durante varios meses a 4°C.

-Las partículas de OC presentan alta densidad electrónica debido a su alto número atómico y son capaces de emitir fuertemente electrones secundarios y retrodispersados: estas características físicas hacen del oro coloidal un excelente marcador para MET y MES.

-El alto coeficiente de electrones retrodispersados del oro sugiere que el contraste reforzado de la imagen por electrones retrodispersados proporciona una alternativa superior para análisis cuantitativo visual o ayudado por ordenador de las moléculas diana. Su alta electrodensidad hace que no puedan ser confundidas con estructuras biológicas.

-Las señales características de rayos X emitidas por oro pueden ser para iluminar y cuantificar los marcadores de oro enlazados con las células por aplicación de técnicas microanalíticas de rayos X y programas de ordenador adecuados.

-El marcado doble o múltiple de las diferentes localizaciones diana es posible por

aplicación de marcas de oro monodisperso de diversos tamaños.

-La cuantificación puede conseguirse por contaje directo de las partículas de oro.

-Debido al bajo grado de adsorción inespecífica de las marcas de oro a las superficies de la muestra, el ratio señal/ruido es muy alto.

-Debido a las altas constantes de enlace de las marcas de oro a las superficies de las muestras, las muestras biológicas pueden ser procesadas con una pérdida mínima de partículas de oro.

-Debido a que las partículas de oro adsorben o reflejan la luz y pueden ser amplificadas por procesos de refuerzo de plata, son aplicables para una variedad de técnicas de marcado de MO, así como procesos no microscópicos (incluyendo inmunocoagulación e inmunoprecipitación) y por lo tanto aportan un amplio rango de metodologías correlativas(416).

-El color del OC en luz transmitida es usualmente rojo si las partículas son esféricas e inferiores a 80 nm. El OC que se compone de partículas más grandes, no esféricas o aglomeradas aparece azul a la luz transmitida. Las soluciones rojas presentan un pico simple de absorción en el espectro visible que va entre 520 y 540 nm(417).

5. 6. 2. 2. Formación de partículas de oro coloidal

El método químico más útil y extendido para la formación de partículas de oro coloidal es la reducción(416),(418).

El oro coloidal se forma a partir de ácido tetracloroáurico, pero se han utilizado gran cantidad de agentes reductores, como el fósforo blanco desarrollado por Zsigmondy(419) en 1905 y Zsigmondy y Thiessen en 1925; formaldehído (Zsigmondy, 1898), etanol (Vanino, 1905), monóxido de carbono (Donau, 1905), hidroxilamina o hidracina (Gubier, 1903), peróxido de hidrógeno (Dörinkel, 1905), ácido ascórbico (Stathis y Fabrikanos(420), 1958), citrato sódico (Frens(421), 1973), con ultrasonidos (Baigent y Müller, 1980), borohidrato sódico (Tschopp et al., 1982) (416), (418).

En este estudio se ha empleado el método de formación de partículas de 30 nm según Frens(420). Este procedimiento aporta coloides monodispersos, y dependiendo de la cantidad de citrato sódico añadido a una cantidad constante de ácido tetracloroáurico, se pueden obtener soles monodispersos con diámetros de partículas variando entre 15 a 150 nm.

Los procesos de reducción requieren limpieza escrupulosa del material de cristal y el uso de agua bidestilada y filtrada, ya que la presencia de sustancias orgánicas, polvo, etc, interfiere en la formación del coloide(417).

Las partículas de oro coloidal de 15 a 40 nm son visualizadas por un equipo convencional de SEM con un filamento de tungsteno en forma de electrones retrodispersados (BSE), este método ofrece la ventaja distintiva de ser capaz de correlacionar la organización en tres dimensiones con las localizaciones citoquímicas o inmunohistoquímicas(396), aunque también pueden ser observadas en forma de electrones secundarios(422) y las partículas ser discernidas de otros contaminantes de la superficie mediante el uso de rayos X. Las partículas de menor tamaño (5-15 nm) requieren equipos SEM de emisión de campo (field emission) o detectores de BSE de alta sensibilidad(423),(424).

La aplicación de estos reactivos en MO es posible en tejidos fijados e incluidos rutinariamente. Se obtienen resultados muy satisfactorios con paraformaldehído, glutaraldehído o mezclas de ambos y formalina al 4%(425). Las incubaciones pueden llevarse a cabo en cortes desparafinados(426) y rehidratados, o en cortes congelados.

La aplicación de partículas de oro coloidal de pequeño tamaño en MO es posible gracias a la intensificación con plata de estas partículas. El objetivo de estas técnicas es aumentar la intensidad de la señal del objeto con baja tinción del fondo(427) -(429).

5. 6. 2. 3. Conjugación de lectinas con oro coloidal

Para la preparación de complejos lectina-oro es necesaria a siguiente información básica:

En primer lugar, la conjugación de las lectinas con oro coloidal depende de los puntos isoeléctricos específicos de cada lectina(416). Es decir, debe ajustarse el pH del oro coloidal según la lectina que se desea acomplejar. En segundo lugar, la cantidad mínima u óptima de lectina para estabilizar el coloide, para lo que suele utilizarse el test de floculación de la sal.

La mezcla de OC y lectina se hace directamente en tubos de centrifuga, tras unos 1-2 minutos se añade una solución acuosa de polietilenglicol.

La purificación del complejo se obtiene por ultracentrifugación en rotor de ángulo fijo. Las condiciones de centrifugación dependen del tamaño de las partículas del coloide. Esta centrifugación resulta en la formación de sedimento suelto, intensamente rojo en el fondo del tubo. Además se forma un punteado oscuro de material densamente comprimido en la pared del tubo ligeramente por encima del sedimento y consiste en complejos precipitados agregados o partículas no totalmente estabilizadas y debe ser descartado. El sobrenadante incoloro que contiene proteína libre se aspira cuidadosamente y se descarta(415).

Debido al bloqueo estérico, el acceso de los marcadores de oro marcado con lectina a los receptores depende del tamaño de las partículas. Por lo tanto, el que no haya reacción de enlace no significa necesariamente la ausencia de receptores de superficie celular para marcadores de oro(430).

Los complejos de lectina-oro pueden aplicarse mediante las dos técnicas previamente descritas, los más usados son complejos oro-peroxidasa de rábano (HRP)(388). Las técnicas de marcado indirecto aplicando complejos glicoproteína-oro para demostrar las localizaciones de enlace con lectinas en la superficie celular fueron investigados por Geoghegan y Ackerman(408) en 1977.

Las superficies altamente estructuradas de grandes muestras observadas en modo de imagen de electrones retrodispersados son alteradas por efectos de carga, estos problemas se obvian optimizando el grosor de la capa de carbono conductora y la intensidad de destello del electrón(431).

I. 5. 7. LECTINAS USADAS EN EL ESTUDIO

En el presente estudio se han utilizado las *lectinas Glycine max, Griffonia simplicifolia-II, Arachis hypogaea, Ulex europaeus-I.*

5. 7. 1. Glycine max (SBA)

La capacidad hemaglutinante de los extractos de comida de soja es conocida desde hace muchos años. Primero se asociaron con las propiedades tóxicas y de retraso del crecimiento de la comida de soja sin cocinar, posteriormente se mostró que la actividad hemaglutinante residía en un único grupo de proteínas conocidas como hemaglutinantes de soja (SBH), más tarde renombrada como aglutinina de soja (SBA). Posteriormente, muchos investigadores consiguieron el aislamiento de la aglutinina de soja, con diversas técnicas de purificación de proteínas.

Parece ser que la aglutinina de soja existe en formas múltiples y altamente semejantes. Las isolectinas tienen composiciones y especificidad hemaglutinante muy similares, y eran inmunológicamente indistinguibles. Aunque está presente en las semillas de la mayoría de especies de soja, unas pocas carecen de esta lectina.

La SBA tiene un p. m. de 120.000 determinado por filtración de gel.

La aglutinina de soja es una glicoproteína tetramérica compuesta de iguales cantidades de 2 subunidades ligeramente diferentes de p.m. 30000, conteniendo cada una de ellas alanina N-terminal. Al igual que muchas otras lectinas, la SBA es comparativamente rica en aminoácidos ácidos e hidroxílicos y está desprovista de cisteína. En común con otras lectinas de legumbres, la aglutinina de soja posee una gran cantidad de conformaciones en hoja aplanada (B-estructura)(432).

La *glycine max* es una glicoproteína que contiene un 7% de su peso en carbohidratos consistentes en manosa y N-acetilglucosamina en una proporción molar de 9 a 2.

Estudios de enlace de carbohidratos, sobre la lectina de soja mostraron que exhibe una mayor afinidad por la N-acetilgalactosamina, sus glucósidos y oligosacáridos en los que este azúcar es la unidad terminal no reductora, la galactosa y sus derivados son menos reactivos.

La sustitución de oligosacáridos activos de grupo A por un grupo L-Fucosil en el residuo galactosil subterminal disminuyeron grandemente su capacidad de enlace.

La SBA precipitó diversas sustancias purificadas de grupo sanguíneo. La precipitación máxima fue conseguida con las sustancias tipo A₁, mientras que las sustancias tipo A₂ eran considerablemente menos activas. Sin embargo, las sustancias B activas reaccionaron pobremente a pesar de su contenido de grupos terminales -galactosil. Este hallazgo fue atribuido al efecto bloqueante de los grupos L-Fucosil enlazados con N-acetilglucosamina subterminal tal como ya se ha puesto de manifiesto. Las sustancias H activas eran no reactivas(432).

5. 7. 2. Griffonia simplicifolia -II

La *Griffonia Simplicifolia*, una lectina de alta afinidad para los grupos no reductores o N-acetilglucosaminil, fue aislada del extracto de la semilla de la planta con mismo nombre por cromatografía de afinidad en chitina.

Estas semillas contienen también otra lectina específica -galactopiranosil denominada *Griffonia Simplicifolia-I* (GSA-I).

La GSA-II de enlace con N-acetilglucosamina es un tetrámero de 4 subunidades aparentemente idénticas de p.m. 30.000.

Una glicoproteína GSA-II (4% de carbohidrato) contiene como muchas otras lectinas de legumbres una alta proporción de aminoácidos hidroxílicos y ácidos. A diferencia de la mayoría de lectinas de legumbres contiene 3 residuos de cisteína por subunidad y un puente disulfuro enlaza las dos subunidades.

La GSA-II posee una localización de enlace carbohidrato por subunidad.

La lectina GSA-II no aglutina los eritrocitos A, B u O, pero sí células poliaglutinables B-adquiridas T activadas y Tk. La GSA-II dio curvas de precipitina con conjugados de suero bovino, p-azofenil, N-acetil y -glucosaminida. Coherentemente con su conducta de aglutinina inespecífica de grupo sanguíneo, la lectina GSA-II no precipitó con las sustancias de grupo sanguíneo A₁, A₂ o LE^a o con la sustancia precursora de grupo sanguíneo con actividad I e i. De las sustancias humanas B y H sólo aquellas con residuos terminales N-acetilglucosamina reaccionaron bien(433).

Se ha establecido que la GSA-II interacciona con los mismos determinantes de grupo N-acetil- -glucosaminil derivados de sustancias de grupo sanguíneo de líneas celulares de estómago humano y cerdo al igual que con la Concanavalina A. Las glicoproteínas con unidades terminales N-acetil--glucosaminil tales como los agalactorosomucoides también precipitaron estas lectinas. El glucógeno y el dextrano formaron precipitados a altas concentraciones de lectina.

La lectina GSA-II es liberada por una fosfolipasa C fosfatidilinositol específica por

las células de la membrana. Se cree que se ancla a la membrana por la vía de una molécula glicosil-fosfatidilinositol(433).

La GSA-II es de particular interés y valor porque es la única lectina que interacciona exclusivamente con los grupos terminales no reductores que terminan en O -N-acetilglucosamina(432).

5. 7. 3. *Arachis hypogaea* (PNA)

La PNA es una lectina glicoproteica vegetal derivada de las semillas de *Arachis hypogaea*. Presenta un extenso lugar de unión, con afinidad para los grupos galactosil y reconoce el disacárido D-Gal- (1-3) D-GalNAc(362),(434).

Este se encuentra con frecuencia en posición subterminal, oculto por el ácido siálico, por lo tanto, es necesaria la extracción del siálico para que el disacárido quede al descubierto y la lectina pueda tener acceso. Así, los eritrocitos se enlazan con PNA sólo tras desialación por neuraminidasa. Esto altera el Ag de grupo sanguíneo MN al exponer el Ag normalmente críptico de Thomsen-Friedenreich (TAg). Este Ag, descubierto en 1927, se cree que es el lugar de enlace de tejido con PNA en una variedad de localizaciones(324).

La PNA es una lectina tetramérica libre de carbohidratos compuesta de 4 subunidades idénticas. Las estimaciones del p.m. agregado de la lectina purificada por afinidad varían de 98.000 y 106.500 hasta 110.000; el tamaño de las subunidades ha sido variablemente publicado en 27.000, 28.000 y 24.500.

La PNA contiene un átomo de calcio y otro de magnesio por subunidad. Es rica en aminoácidos ácidos e hidroxílicos y está desprovista de cisteína. Lotan et al(435), publicaron 2 residuos triptófano por subunidad, mientras que Miller publicó la presencia de 3 triptófanos. Los estudios de cristalización y cristalográficos revelaron que contenía un 50% de agua(432).

La PNA parece ser un marcador adecuado para macrófagos, histiocitos y células de Reed-Sternberg.

5. 7. 4. *Ulex europaeus* (UEA-I)

La lectina UEA-I se une específicamente con la -L-fucosa, el azúcar terminal de las sustancias de grupo sanguíneo H₂ y Le^y cuya expresión está confinada principalmente en el colon proximal(436).

Cazal y Lalaurie(437) mostraron que las semillas de UEA-I contienen una proteína que reacciona con el antígeno de grupo sanguíneo H (O); los extractos de UEA-I han sido usados para el estudio de la sustancia de grupo sanguíneo H(O) en tejidos humanos. El Antígeno H(O) se considera que es una sustancia precursora de los antígenos ABO y está presente no sólo en el grupo sanguíneo humano O, sino también en los grupos sanguíneos no O.

Esta aglutinación se inhibe específicamente por sustancia H en saliva humana y esta reacción se usa en los bancos de sangre para detectar secretores de sustancia A, B y H.

Esta lectina también precipitó con las sustancias humanas A₂, por una sustancia con actividad A, y con sustancias B de origen animal(438).

La lectina UEA-I no precipitó con las sustancias de grupo sanguíneo A₁, con las sustancias Le^a o con la sustancia precursora de grupo sanguíneo con actividad I o con las fracciones P1 obtenidas por hidrólisis ácida de las sustancias de grupo sanguíneo B(438).

Los extractos de *Ulex* contienen dos lectinas denominadas I y II, que pueden ser separadas por precipitación fraccional por sulfato de amonio; la actividad hemaglutinante de

la lectina UEA-I precipitada con sulfato de amonio al 40%, se inhibe mejor por L-fucosa, mientras que la UEA -II, precipitada con sulfato amónico entre un 40 y un 70%, no se inhibe por la L-fucosa y se inhibe bastante pobremente N,N'-diacetilchitobiosa. La lectina UEA-I ha sido purificada por cromatografía de afinidad, adsorbiéndose con gel de -L-Fucosil-O-poliacrilamida o con columna de Fucosil sefarosa 4B y eluyéndolo con L-Fucosa. La lectina también ha sido purificada por métodos convencionales de filtración de gel y cromatografía de intercambio iónico. La lectina Ulex purificada es una glicoproteína de p.m. 46.000, constituida por cadenas polipeptídicas unidas por fuerzas no covalentes. Presenta un punto isoeléctrico de pH 6,0-6,1 conteniendo un 7,2% de azúcar neutro(432).

I. 5. 8. Histoquímica con lectinas del colon normal humano

La histoquímica de las lectinas ha revelado patrones específicos de tinción para epitelio colorrectal normal y neoplásico, indicando un cambio en la estructura de los carbohidratos de las lectinas(434).

El colon proximal y distal tanto en el hombre como en los animales difieren tanto en origen embriológico, función fisiológica, morfología e histología detallada. También se han descrito diferencias en la epidemiología, patogenia y conducta de los tumores que se desarrollan en colon proximal respecto al distal. Diversos autores han descrito diferencias regionales en la distribución de glicoconjugados en mucosa colónica normal(439),(440).

La histoquímica de las lectinas ha revelado patrones específicos de tinción para epitelio colorrectal normal(434).

5. 8. 1. Glycine max

Un enlace de SBA máximo se observa en células epiteliales colónicas normales bien diferenciadas. La SBA ha sido usada como biomarcador de diferenciación celular(441).

5. 8. 2. Griffonia simplicifolia-II

La lectina GSA-II se enlaza exclusivamente a nivel supranuclear de las células caliciformes y absortivas normales(442),(443). La GSA-II reacciona con glicoproteínas en el aparato de Golgi de las células productoras de moco.

Esta lectina detecta mitades específicas de grupos glucosil en glicoconjugados incompletamente glicosilados de la región del aparato de Golgi.

5. 8. 3. Arachis hypogaea

En el colon normal humano la PNA se enlaza a nivel supranuclear de las células caliciformes y columnares, en la zona del aparato de Golgi(443) -(445). En la mucosa normal del adulto, no existe mucina enlazada con PNA(446), en cambio, sí existe unión al colon neonatal(447).

La detección de un patrón de enlace de PNA supranuclear en el epitelio colónico representa la detección de oligosacáridos nacientes en el aparato de Golgi, previamente a la adición de ácido siálico terminal, lo que necesita la acción de la enzima sialiltransferasa. El ácido siálico sólo es incorporado por las células superficiales caliciformes más maduras y por las células columnares(447). Es decir, que la adición subsiguiente de otros azúcares terminales enmascara los lugares de enlace y convierte a las glicoproteínas de las gotículas de mucina en no reactivas con esta lectina. Retirando el ácido siálico terminal con neuraminidasa se expondrá el penúltimo residuo Gal y hará que la mucina de las células

caliciformes sea reactiva con la PNA(362). Esta secuencia de digestión por enzima-enlace con lectina puede ser utilizada para definir anomalías en la producción de moco en varias situaciones inflamatorias o neoplásicas.

El pretratamiento con neuraminidasa no produce cambios en las criptas que expresan localizaciones de enlace de PNA en la región Golgi(448).

Estudios recientes demuestran que la PNA actúa aumentando la proliferación celular del epitelio colónico normal in vitro(449).

5. 8. 4. Ulex europaeus

La lectina UEA-I muestra diferencias regionales en su distribución a lo largo del colon.

La mucosa no neoplásica del colon derecho, ciego y colon ascendente, presenta enlace de esta lectina en la mayoría de las células caliciformes o en algunas, no se observa ningún caso sin marcaje(351). En el colon izquierdo, colon descendente y colon sigmoide la UEA-I enlaza ocasionalmente con la mucina del colon descendente normal humano, mientras que el recto carece de localizaciones de enlace de UEA-I(351),(450) ,(451).

En el colon humano normal se sitúa en el moco de las células caliciformes. En cortes congelados también se observa unión con los capilares y vesículas sanguíneas y muy débil con las células de la membrana; estos enlaces no se observan en los tejidos colónicos fijados con formalina(351).

La UEA-I muestra enlace en la superficie apical de las células columnares, especialmente en el colon derecho(443).

I. 5. 9. Valor clínico de las lectinas en el cáncer colorrectal en humanos

Una transformación en la composición de los glicoconjugados colónicos ha sido descrita en adenomas, carcinomas, y condiciones premalignas como la poliposis familiar y los síndromes de cáncer de colon hereditario no polipósico(452), traduciendo la existencia de diferencias cualitativas y cuantitativas entre las mucinas de epitelios colónicos benignos y neoplásicos(448).

Los cambios en las características de enlace de las lectinas reflejan el estado de diferenciación y la presencia de transformación maligna en las células epiteliales colónicas(446). Estos cambios en el espectro de glicoconjugados de las células cancerosas o embrionarias están causados por glicosilación incompleta o por formación de cadenas de azúcar adicionales(351).

En general la positividad de la tinción de áreas de displasia severa y en carcinomas colorrectales consiste en una fina reactividad lineal de las membranas de las células apicales en las criptas severamente displásicas o carcinomatosas y en las secreciones intraluminales. De forma ocasional, se observa enlace de lectina en áreas focales a nivel citoplasmático apical.

No se observan diferencias regionales en los patrones de lectinas de cánceres colónicos proximales y distales(439),(440) , ni ninguna relación detectada entre reactividades de lectina y estadio de Dukes, tamaño o tipo histológico de los tumores. De modo que los carcinomas de diferentes regiones colónicas tienen una distribución más uniforme de carbohidratos que la respectiva mucosa normal(439).

El análisis de las glicoproteínas de la membrana del cáncer de colon ha revelado una marcada reducción en el contenido global de carbohidratos, actividad de grupo sanguíneo ABO y actividad de glicosiltransferasa en comparación con las del colon normal(446).

5. 9. 1. Glycine max

La SBA muestra máximo enlace en el colon descendente normal humano y está más reducido en colon proximal y recto(378).

Bioquímicamente, la reducción del enlace de SBA en la mucina de las células caliciformes indica que hay menos residuos GalNAc terminales no reductores en las cadenas de oligosacáridos de la mucina, lo que podría ser debido a la glicosilación incompleta de las glicoproteínas en las células epiteliales colónicas inmaduras(446).

En la mucosa quiescente de la colitis ulcerosa la SBA se enlaza con N-acetilgalactosamina expuesta, en la mitad superior de la cripta de las células caliciformes.

5. 9. 2. Griffonia simplicifolia-II

Las neoplasias colónicas reaccionan con tinción heterogénea intralesional para la GSA-II. En general, muestran una fina tinción lineal de las membranas celulares apicales y ocasionalmente, muestra tinción a nivel citoplasmático con gran especificidad, aunque la mayoría no se enlazan con dicha lectina(442),(453).

En los adenomas con displasia leve o moderada la lectina GSA-II se enlaza a la región supranuclear de las células caliciformes en la mayoría de los casos(440), (441).

5. 9. 3. Arachis hypogaea

La PNA marca las mucinas de los carcinomas colorrectales(452).

Cooper(454) describe dos patrones de enlace de la PNA en las neoplasias colónicas humanas. El primero de localización en la región del glicocálix y el segundo de localización intracitoplasmática en la porción apical de las células.

Las neoplasias más pobremente diferenciadas expresan localizaciones de enlace de PNA con menor frecuencia(454). En las neoplasias bien diferenciadas se observa reactividad a lo largo de las membranas celulares(455). En tumores moderadamente diferenciados aparece una tinción citoplasmática difusa de las vacuolas citoplasmáticas, en otras áreas se observa tinción periapical como en los casos pobremente diferenciados en los que se constituye como patrón primario. La PNA es un marcador no sólo de progresión neoplásica sino también de diferenciación(455).

La heterogeneidad intralesional consistente en áreas de glándulas carcinomatosas positivas o negativas se observa frecuentemente en carcinomas colorrectales tras tinción con PNA.

La mayoría de los carcinomas *in situ* (áreas de displasia adenomatosa severa) muestran un enlace fuerte y directo de PNA.

El tratamiento con neuraminidasa muestra que muchos tumores inicialmente no reactivos expresaron localizaciones de enlace con PNA(440). Estos resultados difieren de los de Boland et al.(329) que encuentran enlace de PNA localizado en la mucina de las células caliciformes sin tratamiento previo con neuraminidasa.

El patrón de reactividad de PNA al igual que la expresión de los grupos sanguíneos ABH, diferenciación de células en caliciformes y producción de glicosiltransferasa son semejantes en el epitelio colónico carcinomatoso y en el fetal.

La alteración en el patrón normal denota como ya hemos dicho síntesis incompleta de glicoproteínas, probablemente asociado a deficiencias de ciertas glicosiltransferasas y no es un hecho bioquímico limitado a los tejidos neoplásicos(324). De hecho se ha descrito un aumento de la reactividad de la PNA en la mucosa transicional de tumores colorrectales(445) y en lesiones preneoplásicas.

La PNA marcó en la región supranuclear de pólipos hiperplásicos, o pólipos adenomatosos mostrando displasia ligera o moderada; y no en las células neoplásicas de adenomas(456). El enlace también depende del tamaño del pólipo(457). Estos resultados han

sido confirmados posteriormente por otros investigadores al observar un número decreciente de criptas que expresan localizaciones de enlace de PNA en la región Golgi con desdiferenciación creciente conduciendo a una completa ausencia de localizaciones de enlace de PNA en adenomas grado IV(449). Mientras que otros autores describen un patrón aumentado relacionado con el grado de displasia(435),(329), y por consiguiente consideran el enlace de PNA como indicador de riesgo aumentado de desarrollar cáncer de colon en la poliposis colónica(329).

El marcado de adenomas tubulares y vellosos fue semejante con excepción de la tinción lineal apical en áreas focales de células no mucinosas columnares que se ven frecuentemente en los adenomas vellosos(455). El tratamiento con neuraminidasa no cambió significativamente el enlace de PNA.

En la displasia la PNA se enlaza a la mucina de las células caliciformes y también a nivel supranuclear(446), así como a nivel de las células columnares no mucinosas(362). En ocasiones las muestras displásicas presentan una reactividad intracitoplasmática finamente granular(455).

El enlace de PNA es constantemente positivo en presencia de displasia en la colitis ulcerosa(434) tanto en agudización como en su ausencia(458),(459), aunque algunos autores describen exclusivamente reactividad a nivel supranuclear(434), (446) o presencia de un patrón normal en la colitis ulcerosa ligera e inactiva(362).

Existe una asociación global significativa entre la positividad de PNA y la presencia de carcinoma en pacientes con colitis ulcerosa, pero la alta tasa de falsos positivos (62%) parece limitar su valor en la confirmación de riesgo de cáncer en un paciente individual(459).

En la colitis ulcerosa la sialidación terminal no tiene lugar en la membrana celular dejando de esta manera el receptor accesible para enlace con lectina. La síntesis de glicoproteínas incompletas es probablemente un hecho reversible y revierte cuando la inflamación es quiescente. En la displasia se observa una alteración similar, pero es más probablemente irreversible(362).

Tras el tratamiento con neuraminidasa de mucosa hiperplásica de pacientes con colitis ulcerosa, la reactividad con PNA se encuentra fundamentalmente en la mucina de las células caliciformes y a todos los niveles de la cripta(442).

En la enfermedad de Crohn se registra la pérdida de residuos Fuc en el colon izquierdo y de residuos GalNAc en el colon descendente, indicando que el moco colorrectal está anormalmente glicosilado.

La PNA actúa como un mitógeno en líneas celulares de cáncer de colon(447).

5. 9. 4. Ulex europaeus-I

En el colon neoplásico el enlace de UEA-I se sitúa en los ápices celulares, en los bordes apicales lumbinales y en las secreciones lumbinales(351),(453).

Yonezawa et al. (351), describen diversidad de unión de la lectina UEA-I según la localización tumoral; mientras en el colon derecho no todos los tumores se enlazan con esta lectina, en el colon izquierdo y en el recto, la mayoría de las lesiones neoplásicas muestran enlace con esta lectina(473).

La extensión de las lesiones cancerosas no está correlacionada con el grado de enlace de UEA-I(351).

Las sustancias UEA-I reactivas tienen una distribución similar al CEA en los tejidos(460).

En los adenomas se observa también enlace de lectina. En el punto de contacto de adenomas y mucosa no neoplásica, la UEA-I marcó el epitelio no neoplásico pero no el neoplásico. La presencia de adenomas marcados sugiere tres posibilidades: 1. Presencia de

sustancias de grupo sanguíneo H (O), 2. Alteración de la estructura terminal de carbohidratos o, 3. La producción de glicoproteínas neoplásicas(351).

En biopsias de mucosa de colon proximal de pacientes con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn se observa una tasa disminuida en la presencia de localizaciones de enlace de UEA-I. La alteración en la disposición normal, parece ser debida a una capacidad disminuida de disponibilidad de residuos Fucosil en el colon proximal en estos pacientes: Se produce una reducción significativa de los residuos Fucosil frente a los galactosil(450). Otros autores no consideran la UEA-I un buen método diagnóstico de los cambios premalignos asociados a la colitis ulcerosa(458).

Jass et al.(436) describen una expresión aumentada de L-fucosa en algunos adenomas, mostrando un patrón en mosaico; en carcinomas, con patrón difuso y en pólipos hiperplásicos, a nivel de la base de la cripta, no mostrando reactividad la mucosa normal ni la adyacente al tumor de pacientes con cáncer de colon.

La UEA-I ha sido usada para identificar en biopsias rectales grupos de alto riesgo para cáncer colorrectal, puesto que los individuos genéticamente con alto riesgo de cáncer de colon y recto y los pacientes con poliposis adenomatosa familiar muestran una reactividad similar en la mucosa aparentemente normal(461). La mucosa normal de pacientes con poliposis familiar muestran una intensidad de enlace superior a los controles con esta lectina(452).

I. 5. 10. Lectinas y mucosa colónica de rata

Freeman et al.(462) usaron lectinas para detectar las diferencias en los glicoconjugados de las células caliciformes del colon proximal y distal, observando diferencias de enlace con la Con-A y Lens Culinaris, en la mucina de las células caliciformes. Otros autores han confirmado, las diferencias regionales en la mucosa normal de ratas usando otras lectinas.

En ratas Wistar, la lectina SBA, muestra un patrón distinto para la localización proximal y distal. La mucina de las células caliciformes reacciona más intensamente en la superficie epitelial que en las células de la base de la mucosa, que muestran reacción débil. También muestran reactividad las células epiteliales a nivel de la superficie luminal y basolateral(394).

En el colon proximal la UEA-I marca la mucina de las células caliciformes(392). Es más intenso en la región basal de la cripta comparado con el epitelio superficial. En el colon distal el enlace es negativo o muestra una reactividad muy ligera. Se obtiene marcaje en la superficie luminal de las células epiteliales a nivel basal(392).

La PNA muestra un patrón de marcaje en la mucosa de rata normal similar al colon humano. Se localiza en la región supranuclear, correspondiente a la región del aparato de Golgi, en forma de patrón granular; y está ausente a nivel de la mucina de las células caliciformes(464), siendo más evidente en el epitelio más superficial,(463). Algunos autores describen que su localización se limita al colon proximal(463).

Usando lectinas marcadas con peroxidasa Kotake(465) estudió los carbohidratos de la membrana celular y citoplasma de tumores de rata inducidos con DMH, observando patrones distintos de marcaje para las lectinas PNA, WGA y UEA-I entre la mucosa normal y neoplásica. Las células cancerosas mostraban un alto grado de enlace, superior a las no neoplásicas. La PNA y la UEA-I mostraron altos índices de marcaje en el citoplasma de la mucosa transicional.

La lectina PNA muestra enlace intenso con la mucina de las células caliciformes tumorales, así como a nivel de la mucosa transicional(463), (464) , presentando enlace con

mayor frecuencia la mucosa distal y se sitúa también débilmente en la superficie luminal. También la mucosa macroscópicamente normal de ratas tratadas con DMH muestra ocasionalmente enlace con PNA(463).

La UEA-I es positiva en todos los carcinomas proximales y distales, mostrando la mucosa transicional fuerte reacción con esta lectina en la mucina de las células caliciformes y en la superficie luminal(463),(466) ,(467).

Balzer y cols.(468) no observaron cambios preneoplásicos en el enlace de UEA-I con respecto a la mucosa control normal en ratas tratadas con DMH. Mientras que Calderó et al. (463) encuentran diferencias en la mucosa distal de ratas tratadas.

I. 6. Citometría de flujo

I. 6. 1. Ciclo celular

En el ciclo celular se distinguen varias fases: Las células denominadas como fase de reposo (G_0) no están en el ciclo; las células en fase de síntesis proteica (G_{1a}) o síntesis de ARN (G_{1b}), están colocadas justo después de recuperarse de una división o preparándose para iniciar otro ciclo. Las células se dice que están en fase S cuando están en proceso de síntesis de material genético o ADN; las células que están en fase G_2 , son células que han terminado la síntesis de ADN y por lo tanto poseen una cantidad doble de la normal de ADN y, por último, las células en fase M están sufriendo la división celular(469) (Figura 1-9). Según el tipo y función de la célula, ésta tiene más o menos actividad proliferativa y el ciclo puede variar según diversas condiciones como fármacos, radiaciones o hipertermia(470).

I. 6. 2. Introducción. Aspectos históricos

Los intentos de abrir espacio a una citología analítica o cuantitativa se remontan a los trabajos de Caspersson en 1936, desarrollados posteriormente por Pollister y Ris(471). Se comenzó cuantificando los ácidos nucleicos en células sin teñir mediante microespectrofotometría, utilizando rayos ultravioletas como fuente de energía; más tarde se aprovechó al mismo fin la reacción de Feulgen y, posteriormente, sustancias fluorescentes que se intercalan directamente con los ácidos nucleicos, de forma estequiométrica, es decir la reacción colorimétrica es proporcional a la cantidad de ADN(472). A pesar del porcentaje significativo de falsos positivos y negativos, la citometría estática ha ido progresando hasta nuestros días.

La instrumentación alternativa que parece que ha resuelto la mayor parte de la problemática que puede plantear la lectura de una preparación citológica estática es la citometría de flujo, aparentemente inspirada en la afortunada observación de Coulter, un *electrical engineer*, que supuso que al pasar células sanguíneas en solución salina por un orificio muy pequeño se detectarían por los cambios producidos en la impedancia eléctrica en el orificio(473).

La citometría de flujo es una técnica que permite el estudio combinado de distintas características morfológicas, estructurales y funcionales de las células incluidas en un flujo de líquido isotónico.

Su empleo ha aportado fundamentalmente rapidez, sensibilidad y objetividad en el análisis celular, constituyendo actualmente un valioso complemento de las técnicas clásicas de estudio de la morfología y biología celulares.

En este sentido, puede decirse que las aplicaciones actuales de esta técnica son innumerables, si bien la cuantificación del ADN es la más conocida y difundida, desde que

Van Dilla et al. obtuvieron el primer histograma de ADN realizado por CMF en 1967(474).

I. 6. 3. Fundamentos técnicos

El principio básico de la citometría de flujo es la medición de características ópticas y fluorescentes de una célula individual inmersa en un flujo líquido y que interacciona con un haz de luz monocromática, usualmente producida por un láser.

Un citómetro de flujo (CMF) está integrado por cuatro componentes:

1. Compartimento fluídico
2. Fuente luminosa
3. Sistema óptico
4. Soporte informático para el análisis de datos(475).

En el compartimento fluídico se consigue un patrón de flujo laminar al ser introducidas las células a medir en el centro de una cámara rodeada por un fluido de arrastre que tiene mayor volumen y se encuentra a mayor presión. El sistema de fluido es usualmente un tampón salino isotónico. Después de pasar por el inyector, el chorro de la muestra se reduce a un grosor de 10 micrones y las células que fluyen en él se separan alrededor de 2 mm. De esta forma se busca que las células incluidas en el centro de ese flujo crucen ortogonalmente y de una en una la fuente luminosa del instrumento.

Para paliar las posibles desviaciones de la corriente de líquido en el que viajan las células respecto al punto medio del haz de láser, lo cual provocaría la iluminación de algunas células con intensidades menores a la máxima, los citómetros disponen de mecanismos que permiten al observador efectuar pequeñas modificaciones en la posición de la cámara de flujo y en la trayectoria del haz de luz para ajustar al máximo la intercepción de los mismos.

Cuando la célula pasa a través de la luz del láser, los transductores convierten señales ópticas y fluorescentes en señales eléctricas. Estos pulsos eléctricos son posteriormente amplificados, integrados y registrados por medio de un conversor analógico-digital para que puedan ser analizados por un computador. Cada célula es considerada un evento apropiado que es proporcional a la intensidad de la señal. En este sentido una intensidad continua de fluorescencia (o de otros parámetros) es convertida en impulsos digitales discontinuos o canales, cuyo número está entre 256 y 1024. Cada canal representa un cierto rango de intensidad de luz, y la señal de una célula se registra en uno u otro canal dependiendo de la intensidad de la señal. A partir de los datos se genera un histograma de distribución de las células de la población analizada en función de los diferentes valores del parámetro estudiado que imprime el número de eventos por canal (intensidad)(476).

Los datos pueden ser mostrados comparando cualquier combinación de parámetros: *forward* contra *side scatter*, fluorescencia uno contra dos, intensidad de fluorescencia, etc..., tal como se describe posteriormente.

6. 3. 1. Fuentes de luz

La iluminación de las partículas a medida que fluyen a través de una fuente de luz es la responsable de la generación y difusión de las señales fluorescentes en las que el análisis por citometría de flujo está basado.

Las fuentes de luz primaria usadas más frecuentemente en citometría de flujo son láseres de argón o kriptón y lámparas de mercurio. El láser es ajustado a la longitud de onda apropiada para excitar un colorante en particular.

El paso de una célula por delante del haz de rayo láser va a proporcionar información

sobre las distintas características celulares en relación a la dispersión de la luz que provocan y la emisión de luz por los fluorocromos presentes en las células y excitados por el láser(476).

6. 3. 2. Suspensión celular

Para el estudio por citometría de flujo, en primer lugar es preciso obtener una suspensión de células o núcleos de la muestra a analizar que sea representativa, de alta calidad, sin contaminantes y con buen rendimiento(477). Aunque tales células en suspensión son fácilmente preparadas para especímenes fluidos tales como sangre periférica, o fluidos serosos, o para tejidos linfoides, los tumores sólidos son disgregados con mayor dificultad. A este fin se han descrito una gran cantidad de métodos para disgregar tejido sólido y fresco y convertirlo en una suspensión de células o núcleos, rompiendo los enlaces intercelulares. Estos métodos se basan en la disgregación mecánica sola, por ejemplo, muestras obtenidas por aspiración con aguja fina(478) -(480), o combinada con digestión enzimática o con detergentes dependiendo de las características del tejido a analizar. Todos estos agentes y su procesamiento producen variables grados de lesión celular en las células y producción de restos celulares que dificultan un cálculo preciso de las fases del ciclo celular(471), una de las principales fuentes de error en la determinación de la ploidia de ADN en tumores sólidos, que depende de la concentración enzimática y el tiempo de incubación(477).

En 1983 Hedley(481) publicó la técnica de determinación del ADN en piezas incluidas en parafina modificada posteriormente por otros autores. Este método usa la digestión con pepsina. La utilización de este material presenta gran número de ventajas para la realización de estudios clínicos. En primer lugar, pueden investigarse grandes series de pacientes en los que es posible realizar un seguimiento retrospectivo, conocida ya la evolución de los enfermos. Además, si se desea estudiar lesiones poco frecuentes el uso de material archivado nos permite recoger una casuística adecuada.

Desde el punto de vista técnico estos histogramas son más difíciles de interpretar por la variabilidad de la intensidad de la fluorescencia en cada muestra, la existencia de más detritus, lo que hace que la deflexión G_0/G_1 sea más irregular y de base más amplia (con mayor coeficiente de variación) lo que puede enmascarar algunas aneuploidias y alteraciones en la fase S(482) -(484). Otra limitación es que sólo pueden estudiarse los parámetros nucleares, ya que el citoplasma se destruye cuando los cortes gruesos tienen que trocearse muy finamente y digerirse con enzimas proteolíticas. De forma que el grosor del corte de tejido afecta la calidad del resultado obtenido(485).

La edad del bloque no influye al menos en periodos inferiores a 10 años(486) aunque la fluorescencia disminuye con el tiempo(475).

Otros métodos de digestión enzimática han sido desarrollados posteriormente para obtener suspensiones nucleares de muestras incluidas en parafina, como los de Vindelov(487) y Schutte que usan la digestión con tripsina(488).

También cabe considerar que en algunos casos se produce una autólisis de las muestras que a menudo no se detecta por microscopía óptica. La autólisis de las muestras es causante de la aparición de picos falsos de aneuploidia, en su mayoría son picos redondeados y con gran coeficiente de variación; aunque algunos son estrechos con coeficiente de variación pequeño e índice de ADN pequeño, fundidos más o menos con el pico diploide G_1 y pueden dificultar el análisis por citometría de flujo al interpretarse como picos aneuploides. La autólisis aparece más pronto en tejidos que contienen enzimas digestivas, y que han sido fijadas pobremente o muy despacio, por ejemplo con un volumen limitado de fijador. Otro factor, a tener en cuenta es que las neoplasias se hacen macro y microscópicamente necróticas *in vivo*. En los casos de autólisis, la degeneración de la cromatina podría resultar

en un enlace aumentado de los fluorocromos con los cordones de ADN(489),(490).

Aunque en general, la mayoría de los autores comentan que los cortes de parafina ofrecen información segura, similar a la obtenida con tejido fresco congelado(472),(491).

6. 3. 3. Colorantes

Diversos tipos de tinciones fluorescentes están a nuestro alcance para el análisis de ADN; sus características los hacen adecuados para diversas aplicaciones (Tabla 1-5). Los colorantes fluorescentes más frecuentemente utilizados son el isocianato de fluoresceína (FITC), el naranja de acridina, la ficoeritrina (PE) y el yoduro de propidio (PI), que pueden ser excitados por una luz láser seleccionada a una longitud de onda de 488 nm, la más usada en la práctica.

| TIPO DE LUZ | MEDICIÓN | PARÁMETRO |
|-----------------|--|--|
| Láser incidente | dispersión frontal dispersión a 90° | tamaño celular, estructura externa estructura intracelular (relación núcleo/citoplasma, vesiculación, etc.) |
| | FLUOROCROMOS | |
| Fluorescencia | bromuro de etidio yoduro de propidio naranja de acridina mitramicina 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Hoechst 33258 | cantidad de ADN |
| | naranja de acridina | cantidad de ARN |
| | isocianato de fluoresceína (FITC) isocianato de tetrametilrodamina (TRIC) | cantidad de proteínas |
| | diacetato de fluoresceína (FDA) dibutirato de fluoresceína flavona-3-difosfato triamónico 7-Br-3-hidroxi-2-nafto--anisidina fosfato lisil-alanil-4-metoxi-2-naftilidina γ -glutamil-4-metoxi-2-naftilamida 7-Br-3-hidroxi-2-nafto- α -anisidina- β -D-glucurónico | esterasas enzimas fosfatasa ácida fosfatasa alcalina proteasas β -glucuronidasa |

| | |
|---------------------------------|---|
| anticuerpos marcados con FITC | antígenos de membrana |
| anticuerpos marcados con TRIC | |
| NADPH, NADH | autofluorescencia |
| diacetato de fluoresceína (FDA) | permeabilidad Membrana celular potencial cadena respiratoria mitocondrial |
| yoduro de propidio | |
| 3,3'-dihexiloscarbicianida | |
| rodamina 120 | |

Tabla 1-5

Algunos de los parámetros y fluorocromos que se pueden determinar y utilizar en CMF.

El *yoduro de propidio*, el fluorocromo utilizado en este estudio, es del tipo intercalante que se une al material genético de doble cadena intercalándose entre las dos bases, presenta especificidad por el ADN y ARN de doble cadena, de modo, que la muestra requiere de tratamiento previo con ARNasa si sólo se desea medir ADN, además células con nucleolos prominentes y citoplasmas ricos en ribosomas producen contajes anormales con fases S altas(484). El espectro de excitación se encuentra en el azul/verde-rojo. Precisa de células muertas y fijadas puesto que no atraviesa las membranas íntegras, lo que sirve para discriminar células viables de no viables. El PI no es fluorescente a menos que esté enlazado a ácido nucleico de doble cordón, y por lo tanto, no es útil enlazado a anticuerpos para la tinción de superficies celulares.

I. 6. 4. Parámetros de medición

Los tipos de parámetros celulares que se pueden determinar por esta técnica, pueden agruparse en función del tipo de luz detectada, tal como se resume en la Tabla 1-5.

Cuando una luz de láser incide sobre una célula se obtiene simultáneamente tres parámetros, según los grados de deflexión o dispersión de la luz:

1. *Forward scatter* -(FSC) o Low-angle light scatter a 0°. La luz dispersada hacia delante en ángulos cercanos a 0° es recogida por un fotodetector colocado frontalmente respecto al láser justo al otro lado de la cámara de flujo. En el centro del detector hay colocada una barra de oscurecimiento para evitar que la luz incida directamente sobre el mismo. Su magnitud se correlaciona con el tamaño celular principalmente, aunque puede venir influida por la estructura y composición intracelular (vesículas, concentración de ribosomas, etc.) y puede ser empleada para la resolución de distintas poblaciones celulares(486).

2. La cantidad de luz dispersada lateralmente - *side scatter* - (SSC) y recogida en ángulos cercanos a 90 ° depende de la composición físico-química de la célula en lo que hace referencia entre otras características a la granularidad y las membranas.

3. Fluorescencia a 90°. Las fluorescencias emitidas por las propias células (autofluorescencia) o por colorantes unidos a las mismas, al igual que el SSC son recogidas lateralmente, lo que hace imprescindible disponer también de un sistema óptico integrado por una combinación adecuada de espejos dicróicos (provistos de dos líneas de paso de luz), filtros y lentes que permitan separar la luz del láser que ha sido dispersada lateralmente de la

luz emitida por cada uno de los fluorocromos presentes en la célula con el fin de que cada una vaya al detector correspondiente(492).

Si las células sometidas a examen son unidas con dos o tres fluorocromos distintos, podemos entonces obtener varias medidas simultáneas de una misma célula.

I. 6. 5. Aplicaciones de la citometría de flujo

Por medio de la citometría de flujo podemos determinar dos tipos de propiedades celulares. Las llamadas intrínsecas son aquellas que podemos medir sin necesidad de añadir reactivos exógenos, como pueden ser el tamaño o la granularidad. En cambio, las extrínsecas, como el contenido de ADN, para poder ser medidas necesitan la adición de un reactivo. Tanto las propiedades intrínsecas como las extrínsecas pueden ser a su vez estructurales como el tamaño o el contenido de ADN, o funcionales como el estado redox o la actividad enzimática. Por lo general, las propiedades intrínsecas y estructurales son las que se suelen usar como filtro en los estudios multiparamétricos para poder determinar las propiedades extrínsecas en la población en estudio(493).

Una de las aplicaciones más conocidas de la citometría de flujo es la diferenciación de poblaciones celulares en una muestra heterogénea(485),(494). La heterogeneidad tumoral continúa siendo un aspecto de interés para el clínico, puesto que entre un 20 y 30% de los tumores colorrectales son heterogéneos(495). Parece que el cáncer es un proceso de enfermedad dinámico con crecimiento incontrolable por diversos clones tumorales. La biología de estos clones tumorales puede alterarse con el tiempo como resultado de interacciones continuas huesped-tumor, interacciones entre oncogenes y genes supresores y presión ambiental tal como tratamientos citotóxicos(496).

La detección de antígenos de superficie celular es otra de las grandes aplicaciones de la citometría de flujo. Para su detección se usan anticuerpos monoclonales conjugados con distintos fluorocromos que emiten una determinada fluorescencia pudiéndose usar varios anticuerpos monoclonales conjugados con distintos fluorocromos o con partículas de oro coloidal(497), para realizar un análisis multiparamétrico. Esta técnica ha sido ampliamente usada para el estudio de subpoblaciones linfocitarias(493),(498).

6. 5. 1. Estudio del contenido en ADN y fases del ciclo celular por citometría de flujo

Desde el punto de vista práctico la cuantificación del ADN celular proporciona dos tipos de información:

1. por un lado permite conocer la distribución de una población celular a lo largo de las distintas fases del ciclo celular, y

2. por otra determinar la existencia o no de aneuploidias.

La cuantificación del ADN mediante citometría de flujo está en estrecha correlación con el número de cromosomas, con una correlación de aproximadamente un 10% cuando se calcula en base al contenido individual cromosómico. Conocer así si un tumor es aneuploide o en qué proporción lo es, es operativamente más sencillo que obtener un cariotipo, puesto que se pueden utilizar todas las células independientemente de su fase en el ciclo celular.

Un histograma de flujo de ADN aporta la instantánea de la distribución de los diferentes tipos de núcleos presentes en un momento en particular.

El análisis del contenido del ADN se basa en: 1) las células en diferentes estadios del ciclo celular tienen diferente contenido de ADN y esto es predecible, 2) los fluorocromos se unen de forma estequiométrica, es decir, la intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de fluorocromo que es proporcional a la cantidad de ADN de la célula y 3) las células normales son euploides mientras que las malignas tienden a ser aneuploides.

En la [Figura 1-10 A](#) se representa el esquema de un histograma correspondiente a la cantidad de ADN de células de la pared de colon normal utilizando yoduro de propidio. Se observa la existencia de una disposición bimodal con un primer pico (contenido de ADN en el eje de abscisas y número de células en el de ordenadas) que engloba a la mayoría de las células y que corresponde a las fases de reposo G_0 y G_1 del ciclo celular (cantidad $2c$ de ADN) y un segundo pico constituido por una pequeña proporción de células con doble cantidad de ADN ($4c$) que las anteriores que correspondería a las fases G_2 y mitosis (M) del ciclo celular y algunas células con diversas cantidades de ADN que ensanchan el rango entre estas poblaciones $2c$ y $4c$.

Las células con cantidad de ADN intermedio entre ambos picos son las que se encuentran en fase de síntesis (S), con una cantidad de ADN entre $2c$ y $4c$.

La base de la primera deflexión de la curva G_0/G_1 es el coeficiente de variación que nos indica la pureza de la técnica.

El rango de la cantidad de ADN se obtiene de forma relativa en la relación entre clase del pico G_0/G_1 y del pico G_2/M .

La existencia de una población celular con cantidad de ADN distinta a las células normales en la misma fase del ciclo celular es lo que se conoce como aneuploidia que se traduce en histogramas como el representado en la [Figura 1-10 B](#), correspondiente a un caso de cáncer de colon humano.

La proporción de células que están en las distintas fases del ciclo celular medidas por CMF se correlaciona sensiblemente con la captación de timidina tritiada en los estudios de autorradiografía. Los valores de la fase S medidos por citometría de flujo son aproximadamente dos veces más altos que los valores del índice de marcado de timidina estimados por autorradiografía([472](#)),([499](#)).

Hay cierta variación entre el resultado teórico y el obtenido debido a la variación biológica en la tinción y en la lectura, por ello, se define el coeficiente de variación (CV) que nos da una idea de la semejanza de los resultados obtenidos a la realidad y que hace necesario el empleo de programas informáticos para discriminar correctamente el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular.

La medición del ADN ha sido una de las primeras y más empleadas aplicaciones de la citometría de flujo. El contenido de ADN nuclear es un útil marcador que aporta una visión del status genotípico de la célula([500](#)). Las células tumorales, a menudo, presentan alteraciones en el contenido de ADN que pueden ser detectadas por CMF. El estudio del contenido en ADN y cinética celular son útiles para el estudio de la biología celular y han demostrado una relación pronóstica en determinadas neoplasias humanas([485](#)). En general, la combinación de un alto índice de ADN y una alta proporción de células en fase S es la de peor pronóstico([473](#)),([501](#)).

El estudio del ciclo celular también puede tener implicaciones terapéuticas ya que se ha observado que algunos agentes terapéuticos (quimioterapia y radioterapia) producen alteraciones en este ciclo que se correlaciona con la respuesta al tratamiento([502](#)) -([505](#)).

6. 5. 2. Aplicaciones de la cmf en diagnóstico tumoral

Los métodos citométricos miden el contenido de ADN y, por tanto, pueden reflejar anomalías cromosómicas siempre que se traduzcan en un cambio del contenido de ADN que no escape al poder de resolución del citómetro. Es decir, pequeños cambios del contenido total del ADN no serán detectados por el citómetro. Este, en cambio, ofrece la ventaja de realizar la medición sobre un gran contenido de núcleos, de poderse realizar en células en interfase y de ser independiente de la actividad proliferativa del tumor([506](#)).

En estudios con citometría de flujo se ha documentado que la aneuploidia aparece con gran frecuencia, hasta un 92%, en tumores sólidos y es un parámetro de gran sensibilidad y especificidad. El grado de ploidia está correlacionado con el diagnóstico histopatológico, sexo, edad y actividad proliferativa. Es un marcador que no varía en las distintas localizaciones del tumor (metástasis) ni a lo largo del seguimiento(507).

En los casos en los que el tumor es diploide y por consiguiente, el contenido de ADN deja de ser un buen marcador tumoral, resulta útil para discriminar las células malignas de las benignas el análisis multiparamétrico del ADN, la inmunofluorescencia de superficie, el ARN o el contenido proteico.

6. 5. 3. Pronóstico

Entre las aplicaciones de la citometría de flujo la más extensamente estudiada es la correlación entre contenido de ADN y pronóstico. En los estudios pronósticos el contenido de ADN generalmente se expresa como *índice de ADN* y es el cociente del contenido de ADN de las células tumorales en fase G₁ y el contenido de ADN de las células euploides en la misma fase. Por lo tanto, un índice de ADN de 1 será sinónimo de diploide, 1,5 de triploide, 2 de tetraploide y así sucesivamente, si es menor de 1 se consideran hipoploides(508).

La relación entre ploidia y pronóstico, al igual que la curva de distribución del ADN, es distinta para cada estirpe tumoral. Sin embargo, el índice de ADN sólo mide el contenido de ADN "medio" de un tumor y no da información acerca de la heterogeneidad del tumor analizado. En consecuencia, dos tumores que posean dos distribuciones de ADN completamente distintas pueden exhibir idénticos valores de DNA(509).

6. 5. 4. Tratamiento

Ya hemos comentado que las alteraciones del ciclo celular que producen los tratamientos oncológicos se correlacionan con la respuesta al tratamiento, al menos en el caso de la quimioterapia y la radioterapia.

Hasta ahora la valoración de la citotoxicidad producida por un determinado agente citostático sobre células neoplásicas se realizaba por métodos laboriosos y complicados de llevar a la práctica como la medición de la incorporación de timidina tritiada, la formación de colonias en agar, el test de exclusión de contraste y otros. La citometría de flujo permite acercar los ensayos de citotoxicidad a la práctica clínica por la rapidez y fiabilidad con que se puede realizar.

La toxicidad de los agentes alquilantes y nitrosoureas se puede reconocer en citometría de flujo por medio de anticuerpos monoclonales, como el F7-26 que se une a los segmentos desnaturalizados del ADN por el agente alquilante. Así si marcamos el anticuerpo con un fluorocromo podremos evaluar de una forma fiable el daño celular y predecir los efectos de la quimioterapia(510).

También se han usado las técnicas fluorocitométricas para valorar la resistencia de líneas tumorales a los quimioterápicos(511).

Es posible que en un futuro no muy lejano por medio de la citometría de flujo se pueda disponer del panel de citostáticos a los que es sensible un tumor determinado en un paciente concreto y así dirigir la terapia de una forma más selectiva.

Otra utilidad terapéutica es el uso de anticuerpos monoclonales citogenéticamente orientados(498).

I. 6. 6. Ventajas e inconvenientes de la CMF

Las ventajas de la citometría de flujo son:

- Permite medir de forma objetiva y automatizada parámetros celulares(485).
- Los resultados obtenidos son reproducibles de un centro a otro, incluso cuando son interpretados por investigadores distintos, siempre que se utilicen procesos de estandarización(512).
- Rapidez de ejecución, pueden medirse hasta 20.000 células/seg.
 - Sensibilidad(475).
 - A diferencia del cariotipado mitótico el análisis ploidie por CMF de ADN es independiente de la actividad proliferativa celular.
 - Respecto a las técnicas estáticas muestra menor coeficiente de variación para poblaciones homogéneas(471).

Inconvenientes:

- Necesidad de una suspensión celular monodispersa (lo que aparte de requerir una preparación, en el caso de tumores sólidos hace perder la arquitectura celular).
- Contaminación con poblaciones celulares no malignas, no permite establecer una diferenciación clara entre las células euploides tumorales, linfocitos, células infectadas y epitelio normal.
- No se preserva la arquitectura del tejido.
- Posibilidad de error por pobre discriminación de dobletes (dos núcleos adherentes y registrados como un solo núcleo en CMF) de las células en fase G₂M del ciclo celular.
- Alto costo de estos equipos(513),(514).

I. 6. 7. Valor clínico y pronóstico de la CMF en el cáncer colorrectal humano

Para mejorar la supervivencia de los enfermos con cáncer colorrectal es necesario encontrar factores adicionales independientes para predecir la evolución en pacientes que tienen una resección quirúrgica potencialmente curativa(515). El conocimiento de que las células cancerosas se caracterizan por núcleos grandes y unas líneas originales de ADN o ploidia anormales, ha hecho que se investigara si las técnicas que permiten identificar estas variaciones pueden mejorar las deficiencias que tienen las actuales clasificaciones patológicas. En este sentido, ha habido un considerable interés en el contenido relativo de ADN (ploidia) de los tumores, valorado principalmente por citometría de flujo. Sin embargo, el valor pronóstico de la diploidia de ADN valorada con esta técnica es incierto.

Wolley et al.(516) realizaron el primer estudio prospectivo del valor pronóstico de la determinación del ADN por citometría de flujo en carcinoma colorrectal. Estos autores demostraron que los tumores aneuploides muestran una rápida evolución clínica que consiste en enfermedad diseminada y muerte.

Desde entonces, diversos investigadores han estudiado la CMF del cáncer de colon, sin embargo, no existen en la literatura patrones uniformes que definan los modelos de histogramas correspondientes a tumores colorrectales. Emblad(517) admite tres tipos de histogramas: 1) aneuploide, 2) diploide y, 3) casi diploide; tomando como modelos las curvas de ploidia obtenidas con CMF. Estudios recientes relatan la importancia de las poblaciones aneuploides de ADN casi diploide con índice de ADN entre 0,8-1,2; puesto que pueden conferir diferente significado pronóstico y conducta biológica que otras categorías de ploidia de DNA. Aunque, picos artefactuales aneuploides de ADN casi diploides pueden ser producidos por diferencias en la capacidad de tinción de ADN en subpoblaciones de células diploides de ADN(518).

Albe et al.(519) describen también tres tipos: 1) diploide, 2) diploide con S alta y, 3)

aneuploide, siguiendo los criterios de la *Conference on Analytical Cytology and Cytometry IX* y del *VI International Symposium on Flow Cytometry*, también basados en citometría de flujo.

Con excepciones(472) los estudios realizados tanto en muestras frescas como en las incluidas en parafina indican una tendencia de los tumores con un contenido de ADN casi normal (diploide) a tener un mejor pronóstico que los que tienen una composición de ADN anormal (aneuploide)(520) -(524). Sin embargo, la significación atribuida a la ploidia como variable pronóstica independiente en el cáncer colorrectal varía considerablemente. No hay artículos que demuestren la aneuploidia de ADN como aspecto favorable, pero varias publicaciones han concluido que la ploidia de ADN no aporta información pronóstica significativa adicional, particularmente cuando son considerados tras análisis multivariante que incluye los factores pronósticos tradicionales(525) -(527). Bauer et al.(528), mediante un análisis de regresión de Cox, demuestra que la existencia de ganglios positivos o metástasis son factores pronósticos mucho más potentes que cualquier parámetro de actividad del ADN. Los estudios de Stipa y cols.(529) consideran que la aneuploidia de ADN no es una variable pronóstica independiente capaz de predecir la supervivencia a largo tiempo en pacientes sometidos a resección radical. La mayoría de los estudios sugieren una tendencia hacia una frecuencia creciente de aneuploidia de ADN en los estadios de Dukes altos (estadio D)(530),(531) y para tumores localizados en el colon izquierdo y recto(518),(530) ,(532) ,(533) , sin embargo otros investigadores no encuentran diferencias significativas en frecuencia de aneuploidia o índice de ADN, entre los estadios de Dukes (B, C y D) ni para distintos grados de diferenciación(472),(534). Para Jones et al.(535), los tumores con ADN aneuploide tienen peor pronóstico que los tumores diploides únicamente en los estadios Dukes B.

En general la frecuencia de tumor aneuploide no se relaciona con las variables clínicas como sexo y edad, aunque el hallazgo de aneuploidia se asocia a peor pronóstico en pacientes jóvenes (< 40 años)(536) y, Kouri(533) encuentra mayor número de aneuploidias en los hombres, debido a que éstos presentan mayor número de tumores de colon izquierdo.

El porcentaje de carcinomas colorrectales diploides es superior en pacientes con historia de neoplasia no-colorrectal(533).

La presencia de tumores colorrectales aneuploides varía según el tipo y preparación de las muestras y oscila entre un 20 y un 80%. Una revisión bibliográfica puede verse en la tabla siguiente. La frecuencia de aneuploidia múltiple de ADN en cáncer colorrectal va de 7 a 40%(518).

| INVESTIGADOR | Muestra | Disgregación | Colorante | Nº pac. | % Aneuploidia |
|--|------------|--------------|-----------|---------|---------------|
| Barlogie et al. (1980) ⁵⁰⁷ | Fresca | Pepsina | BE | 11 | 82 |
| Wolley et al. (1982) ⁵¹⁶ | Fresca | Mecánica | | 33 | 39 |
| Hiddemann et al. (1986) ⁵⁴⁴ | Fresca | Mecánica | BE | 88 | 82 |
| Frankfurt et al. (1986) ⁵³⁴ | Fresca | Tritón | DAPI | 91 | 68 |
| Kokal et al. (1986) ⁵⁴² | Parafinada | Pepsina | IP | 77 | 65 |
| Emdin et al. (1987) ⁴⁹⁵ | Parafinada | Tripsina | IP | 37 | 62 |
| Daver et al. (1987) ⁴⁷⁸ | Fresca | Mecánica | IP | 60 | 73 |
| Scott et al. (1987) ⁴⁷⁸ | Parafinada | Pepsina | IP | 264 | 48 |
| Wiggers et al. (1988) ⁵²⁵ | Parafinada | Tripsina | IP | 350 | 54 |
| Heimann et al. (1990) ⁵³⁹ | Parafinada | Pepsina | IP | 39 | 48 |

| | | | | | |
|---------------------------------------|------------|-----------------------|------|-----|----|
| Armitage et al. (1991) ⁵³⁷ | Parafinada | Colagenasa + elastasa | IP | 333 | 57 |
| García et al. (1991) ⁵⁴⁰ | Fresca | Mecánica | IP | 74 | 62 |
| Giaretti et al. (1991) ⁵⁴¹ | Fresca | Mecánica | DAPI | 62 | 79 |
| | Parafinada | Pepsina | IP | 53 | 41 |
| Witzig et al. (1991) ⁵⁴³ | Parafinada | Pepsina | IP | 694 | 62 |
| Tagawa et al.(1992) ⁴⁸⁸ | Parafinada | Pepsina | | 6 | 33 |
| | | Tripsina | | 6 | 66 |
| Bianchi et al.(1992) ⁵⁴⁵ | Parafinada | Pepsina | IP | 18 | 61 |
| Ensley et al. (1993) ⁴⁷⁷ | Fresca | Mecánica | IP | 25 | 42 |
| | | Enzimática | | 25 | 20 |
| Bianchi et al. (1993) ⁵⁴⁶ | Parafinada | Pepsina | IP | | |
| Kearney et al. (1993) ⁵³⁶ | Parafinada | Tripsina | IP | 116 | 61 |

BE: Bromuro de etidio. IP: yoduro de propidio. DAPI: 4,6-diamino-2-fenilindol.

Tabla 1-6

Procedimiento de procesado de las muestras de cáncer de colon, pacientes y % de aneuploidia según distintos autores.

Armitage et al.(537) demostraron que los niveles de ploidia representan un factor pronóstico independiente no directamente relacionado con el estadio de Dukes. Wersto et al.(509) confirma estos resultados y además encuentra que los resultados obtenidos por citometría de flujo son independientes del tipo histológico. Otros autores encuentran resultados similares(538) -(541) y confirman que pacientes con cáncer colorrectal en estadio B que tienen tumores que son ADN diploides y/o con bajo índice de proliferación (IP) muestran un pronóstico comparativamente favorable respecto a pacientes con aneuploidia de ADN y alto IP 5(544),(539). Los primeros tienen una tasa de supervivencia semejante a controles normales emparejados por edad; estos pacientes pueden no ser candidatos a terapia coadyuvante.

Otros autores no observan relación entre alta fase S y pronóstico desfavorable(532).

Se ha observado asociación entre el grado de atipia celular y el aumento en la proporción de aneuploidia en carcinomas colorrectales(547).

Aunque la ploidia de ADN e IP pueden ser pronósticos en pacientes con estadio C, no ayuda a la hora de decisiones clínicas ya que todos estos pacientes se tratan normalmente de rutina con terapia adyuvante. Sin embargo, esta información puede ser útil para aconsejar los pacientes y establecer su pronóstico(518).

Scott et al. (538) relatan una frecuencia significativa superior de aneuploidia en el colon izquierdo (descendente y sigma) respecto al colon ascendente.

Wersto y colaboradores(509), ponen de manifiesto la gran heterogeneidad intratumoral de las neoplasias de colon, analizando separadamente 3 muestras de un mismo tumor sólo encuentran concordancia en la medida del ADN en un 63% de los casos. Estudios similares de otros autores confirman estos resultados, mostrando subpoblaciones tumorales, con aneuploidia múltiple(543). La frecuencia de aneuploidia múltiple de ADN en cáncer de colon va de 7 a 41%(515).

Los tumores aneuploides muestran valores de% de fase S superiores a los diploides(530). La existencia de una elevada proporción de células en fase S se acompaña en pacientes con cáncer colorrectal de un mayor grado invasivo (grados avanzados de Dukes), y mientras para unos autores se asocia con la localización en el recto(540), para otros los

valores altos de fase S se observan en los tumores de localización derecha(530). En el cáncer de recto hay dos grupos que han referido un mejor pronóstico en tumores diploides con una baja fase S en comparación a los que presentan una fase S alta(548),(549). En el estudio de Quirke y cols. (549) la proliferación celular parece aportar una información pronóstica adicional a la de la ploidia.

Los tumores aneuploides muestran en general altas concentraciones plasmáticas de CEA(550).

Otra de las utilidades de la citometría de flujo es la identificación de lesiones premalignas asociadas a ADN anormal, como la colitis ulcerosa o enfermedad polipósica. Los estudios encaminados a determinar el grado de aneuploidia de ADN y proliferación en adenomas colorrectales y carcinomas parecen sostener el concepto de que existe una evolución de la ploidia de ADN a lo largo de la secuencia adenoma-carcinoma(518).

Numerosos estudios han descrito la aneuploidia de ADN en tejidos displásicos de colitis ulcerosa, incluso en biopsias normales e inflamatorias(551),(552). En la colitis ulcerosa la aneuploidia es más frecuente en pacientes con displasia o cáncer que en los que no se observa neoplasia(553).

La CMF puede ayudar a identificar los pacientes con colitis ulcerosa que tienen mayor necesidad de vigilancia endoscópica, sobre todo en pacientes con displasia con "cambios indefinidos". Además, dada la subjetividad de los distintos patólogos en la interpretación de las displasias. La citometría de flujo se confirma como un marcador objetivo en estos casos(554). Se ha observado que la frecuencia de la aneuploidia aumenta con la duración de la enfermedad(508). Sin embargo, el significado de aneuploidia de ADN en ausencia de displasia es desconocido(555). El hallazgo de aneuploidia en una biopsia colorrectal no tiene valor predictivo en decidir si un paciente tiene o no un carcinoma concurrente en algún lugar del intestino, sin embargo, podría ser un indicador de futuros cambios neoplásicos(556). La aneuploidia puede ser usada como marcador del riesgo de cáncer en pacientes con colitis ulcerosa crónica(553).

La incidencia de ADN aneuploide en enfermedades inflamatorias crónicas es del 31%(556).

Sciallero y cols.(557) realizan un estudio de la ploidia de adenomas colorrectales en pacientes con historia familiar de cáncer colorrectal y describen que ambas informaciones combinadas tienen gran valor en la identificación de pacientes con alto riesgo de desarrollar enfermedad maligna.

La incidencia de adenomas aneuploides es muy variables según las series, oscila entre un 6 a un 27%(558),(559).

La CMF también ha sido usado para determinar el origen común de adenocarcinomas sincrónicos colorrectales(560).

II. Hipótesis del estudio

II. 1. Justificación del proyecto de investigación

El cáncer colorrectal es la tercera neoplasia en orden de frecuencia en la población mundial y supone casi el 15 % de todos los nuevos cánceres 1. A pesar de los avances en diagnóstico precoz, en los recientes conocimientos genéticos del cáncer colorrectal hereditario(56),(61) ,(62) , en los nuevos procesos de *screening* para individuos de alto riesgo y aproximaciones quirúrgicas, el pronóstico del cáncer colorrectal casi no ha variado durante los últimos 50 años y sólo ha mostrado una ligera e insatisfactoria mejoría. Este entorno desfavorable explica parcialmente la continua búsqueda e intento de identificación de indicadores pronósticos del curso clínico del cáncer colorrectal. Tales indicadores pronósticos pueden corresponder por ejemplo a la inmunohistoquímica de las lectinas y al contenido de ADN y fases del ciclo celular.

La carcinogénesis experimental usando dimetilhidracina (DMH) es un modelo bien establecido que muestra fuertes paralelismos con la carcinogénesis colónica humana(206). Los modelos animales aportan pues, medios adicionales para investigar algunas de las características biológicas de estos tumores.

Diversas evidencias experimentales sugieren que la carcinogénesis incluye una serie de cambios secuenciales celulares con diferentes propiedades biológicas, bioquímicas y morfológicas respecto a las células normales.

Estudios bioquímicos(328) e histoquímicos(587), han demostrado que la transformación neoplásica de la mucosa colónica tratada con DMH está asociada con importantes cambios en la composición de los glicoconjugados y actividad de las glicosiltransferasas. Sin embargo, los métodos histoquímicos clásicos no permiten discriminar los diferentes carbohidratos que componen los glicoconjugados ni los cambios asociados a la transformación neoplásica.

Si bien la histoquímica de lectinas ha sido aplicada para conocer los cambios en el metabolismo de los glicoconjugados en la mucosa colónica tumoral tanto humana como inducida por DMH(463),(468) , son pocos los trabajos que aplican esta técnica en las fases preneoplásicas de la carcinogénesis y su estudio en lesiones premalignas asociadas al desarrollo tumoral(569), tal como ha sido vista en pacientes con colitis ulcerosa(551),(552). Así como las posibles alteraciones secuenciales en la mucosa no tumoral de ratas tratadas con el carcinógeno, ya puesta de manifiesto con técnicas histoquímicas convencionales(587).

La histoquímica de las lectinas conjugadas con oro coloidal aplicadas en microscopía electrónica de scanning (MES) permite conocer la distribución de los glicoconjugados de la superficie mucosa normal y sus cambios en la transformación neoplásica y etapas previas.

Las técnicas de citometría de flujo para determinar la existencia o no de aneuploidias y la distribución de una población celular a lo largo de las distintas fases del ciclo celular ha sido usada en patología colorrectal humana para encontrar factores adicionales independientes para predecir la evolución de estos pacientes. Conocer el comportamiento citométrico (contenido de ADN y proliferación celular) de los tumores colónicos inducidos con DMH puede ayudarnos a conocer el patrón biológico de estos tumores experimentales y valorar su semejanza con los humanos y determinar la existencia de un cambio difuso de la mucosa expuesta al carcinógeno tal como ha sido observada por otras técnicas.

Los estudios realizados hasta el momento(576), mediante la técnica de citometría de flujo en ratas no toman en consideración las diferencias regionales en la cinética celular de la mucosa colónica normal y tumoral. Tampoco hemos encontrado en la literatura un estudio por citometría de flujo de la cinética celular en etapas preneoplásicas de la carcinogénesis

experimental inducida con DMH.

Por todo ello, se plantean las siguientes hipótesis experimentales:

II. 2. Hipótesis del estudio

Las hipótesis que se plantean en el estudio son las que se describen a continuación:

1. Hipótesis primera:

La mucosa colónica macroscópicamente normal exhibe cambios secuenciales en la expresión de glicoconjugados en las etapas preneoplásicas, precursoras de la aparición tumoral.

2. Hipótesis segunda:

Los focos de criptas aberrantes y las lesiones asociadas a placa linfoide expresan un patrón alterado del enlace de lectinas.

3. Hipótesis tercera:

El estudio por citometría de flujo de las fases del ciclo celular de muestras de ratas tumorales inyectadas con DMH tiene relación con las variables clínicas y anatomopatológicas.

4. Hipótesis cuarta:

El estudio por citometría de flujo de las fases del ciclo celular en etapas preneoplásicas de muestras de intestino grueso de aspecto macroscópicamente normal tratadas con DMH demuestran alteraciones sugestivas de malignidad.

II. 3. Objetivos del estudio

Para corroborar las hipótesis previamente planteadas se ha pretendido:

3. 1. Estudiar las características macro y microscópicas (MO y MES) del intestino grueso normal y tumoral de rata tratada con distintas dosis y pautas de DMH:

- a) dosis de 21 mg/kg/semana durante 20 semanas
- b) dosis de 10 mg/kg/semana durante 20 semanas
- c) dosis de 21 mg/kg/semana durante las etapas de inducción neoplásica y, comparar los hallazgos con sendos grupos control:
 - a) ratas sin tratamiento
 - b) ratas inyectadas con EDTA

3. 2. Estudiar la localización celular y la distribución de los glicoconjugados en la mucosa del intestino grueso de ratas Sprague-Dawley de ambos grupos control, mediante lectinas. Describiendo las posibles diferencias existentes entre los distintos segmentos colónicos y a lo largo de las criptas.

3. 3. Detectar los cambios en la expresión de los glicoconjugados en la mucosa normal, tumoral, y mucosa adyacente al tumor de ratas tratadas con DMH con las tres pautas de tratamiento descritas previamente. Así como en los focos de displasia y en las lesiones displásicas asociadas a placa linfoide.

3. 4. Intentar establecer la existencia de alguna posible correlación entre las modificaciones de los glicoconjugados de los tumores inducidos con DMH en la rata y los parámetros clínicos: sexo, localización, aspecto macroscópico y tamaño tumoral; y parámetros anatomopatológicos: tipo histológico, grado de diferenciación, grado de invasión, asociación a otros tumores intestinales y potencial metastásico.

3. 5. Estudiar la expresión y los cambios que experimentan los glicoconjugados de la mucosa colónica de la rata en las etapas de inducción de los tumores de intestino grueso por DMH, mediante microscopía convencional y microscopía electrónica de scanning.

3. 6. Cuantificar por citometría de flujo el contenido de ADN de los tumores colónicos de rata inducidos por DMH, y comprobar si existe relación con las variables clínicas e histológicas descritas previamente.

3. 7. Cuantificar por citometría de flujo, el porcentaje de células en proliferación de los tumores de colon inducidos con DMH, mucosa macroscópicamente normal inyectada con el carcinógeno durante cortos y largos periodos de inducción, y mucosa control.

III. Material y método

III. 1. Animales

III. 1. 1. Animales, estabulación y dieta

Para el estudio se han utilizado 152 ratas Sprague-Dawley, de la misma línea genética criadas en nuestro Estabulario de la Facultad de Medicina de Lleida, no consanguíneas, de 10 semanas de vida, 76 de ellas eran machos y 76 hembras.

Los animales fueron alimentados con dieta standard de laboratorio (fórmula rata-ratón, cría ITC-R10 y mantenimiento ITM-R20, LETICA ®, en la tabla siguiente se detalla sus composiciones) y agua *ad libitum*.

| | | CRÍA ITC-R10 | MANTENIMIENTO ITM-R20 |
|--------------------|-------------------|---|---|
| Componentes | | Cereales Subproductos de molinería Proteínas animales y vegetales Corrector vitamínico/mineral | Cereales Subproductos de molinería Proteínas animales y vegetales Corrector vitamínico/mineral |
| Análisis químico | Humedad máxima | 7,00% | 7,00% |
| | Proteína bruta | 19,50% | 17,00% |
| | Lisina, min. | 0,92% | 0,70% |
| | Metionina, min. | 0,60% | 0,50% |
| | Grasa bruta, min. | 3,50% | 3,00% |
| | Fibra bruta, max. | 4,50% | 5,00% |
| | Cenizas, max. | 5,00% | 5,00% |
| | Calcio, min. | 0,85% | 0,80% |
| | Fósforo, min | 0,70% | 0,65% |
| | Cloruros, max | 0,50% | 0,60% |
| | M.E.L.N. | 60,50% | 63,0% |
| Vitaminas (por Kg) | Vitamina A | 18000 U.I. | 9000 U.I. |
| | Vitamina D3 | 2000 U.I. | 1000 U.I. |
| | Vitamina E | 100 mg. | 50 mg. |
| | Vitamina K3 | 2,4 mg. | 1,2 mg. |
| | Vitamina B1 | 15 mg. | 7,5 mg. |
| | Vitamina B2 | 12 mg. | 6 mg. |
| | Vitamina B6 | 10 mg. | 5 mg. |
| | Vitamina B12 | 50 mg. | 25 mg. |
| | Vitamina PP | 60 mg. | 30 mg. |
| | Ac. pantoténico | 30 mg. | 15 mg. |

| | Colina | 1500 mg. | 750 mg |
|-------------------------|-------------------------|-----------|-----------|
| Ofigoelementos (por Kg) | Manganeso | 80 mg. | 40 mg. |
| | Cinc | 60 mg. | 30 mg. |
| | Hierro | 50 mg. | 25 mg. |
| | Cobre | 20 mg. | 10 mg. |
| | Iodo | 1,52 mg. | 0,76 mg. |
| | Cobalto | 0,88 mg. | 0,44 mg. |
| | Análisis bacteriológico | Hongos | 10 cél/g. |
| | Levaduras | 10 cél/g. | 10 cél/g. |

Tabla 3-1

Fórmula y composición de las dietas standard usadas en este estudio.

Los animales fueron divididos en diversos grupos para llevar a cabo el estudio y estabulados en jaulas debidamente etiquetadas.

III. 1. 2. Grupos de estudio

Los animales se distribuyeron para su estudio en 5 grupos:

Grupo A:

5 ratas machos y 5 hembras, no recibieron ningún tratamiento y fueron utilizadas como grupo control y sacrificadas en los mismos periodos de tiempo que el grupo B.

Grupo B:

21 ratas machos y 21 hembras, inyectadas semanalmente con DMH a dosis de 21 mg/kg de peso, durante 20 semanas; y sacrificadas a partir de las 4 semanas de la última inyección del carcinógeno hasta la semana 34.

Grupo C:

30 ratas machos y 30 hembras inyectadas con DMH como el grupo A y sacrificadas en las etapas preneoplásicas, de forma que se sacrificaron los animales de 4 en 4, dos machos y dos hembras, a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 y 30 semanas de inyección del carcinógeno.

Grupo D:

10 ratas machos y 10 hembras inyectadas con DMH a dosis de 10 mg/kg de peso durante 20 semanas y sacrificadas como el grupo B.

Grupo E:

10 ratas machos y 10 hembras inyectas con EDTA, estabilizante de la solución de DMH, y a la misma dosis de 37 mg en 100 ml. de agua, es decir a una dosis de 1,94 mg/Kg de peso y semana. Estos animales fueron considerados un segundo grupo control.

III. 1. 3. Inducción de tumores con 1,2-Dimetilhidracina

Las ratas fueron inyectadas semanalmente con 1,2-*sym*-Dimetilhidracina (DMH) (SIGMA®), subcutáneamente (s.c.) en la zona lumbar izquierda.

Se emplearon dos dosis distintas para la inducción tumoral. Como queda reflejado en el apartado 1. 2. Los animales del grupo B recibieron una dosis de DMH de 21 mg/kg de peso. La solución utilizada estaba compuesta de 400 mg. de DMH en 100 ml. de agua destilada que contenía 37 mg. de EDTA, como estabilizador y tamponada a pH 6,5 con hidróxido sódico(199).

El grupo D recibió una dosis de DMH de 10 mg/kg de peso. En este caso la solución stock contenía 200 mg del compuesto y se disolvía en agua destilada conteniendo 20 mg de EDTA y ajustada al mismo pH.

El compuesto se preparaba semanalmente previa a la inyección y se manipulaba en campana extractora y con protección de guantes y mascarilla para evitar el contacto con la piel y mucosas así como su posible inhalación.

Semanalmente se elegían al azar 4 ratas de cada uno de los grupos tratados y de los distintos sexos y se pesaban de una en una con una báscula de laboratorio en una jaula vacía que previamente se había tarado, para obtener el peso medio de las mismas y poder calcular la dosis, que era conjunta para todo el grupo.

III. 1. 4. Sacrificio

Los animales se sacrificaron mediante inyección intraperitoneal de una dosis letal de Hidrato de Cloral al 4.5%, a razón 20 ml/kg de peso(561).

Cada uno de los animales fue pesado en una balanza de laboratorio una vez sacrificado.

Los animales se inspeccionaron externamente en busca de tumoraciones cutáneas y se sujetaron con las extremidades en extensión sobre una tabla para facilitar su necropsia.

Se practicó incisión tóraco abdominal media y se exploró cada una de las ratas en busca de tumores primitivos y metastásicos, a nivel de pulmones, pleura, diafragma, corazón y pericardio, hígado, bazo, mesenterio, peritoneo, retroperitoneo, genitales, esófago, estómago e intestino delgado.

También se exploraron los oídos de las ratas con un microscopio de microcirugía OPMI (ZEISS®) en busca de posibles tumores.

Se disecó el intestino grueso y se extrajo. Posteriormente se procedió a su apertura longitudinal por el borde antimesentérico y limpieza suave de la superficie mucosa con agua para eliminar los restos de heces.

Se midieron las diferentes porciones del colon que según la estructura macroscópica de los pliegues colónicos se dividieron en ciego, colon ascendente, colon transversal y colon descendente-recto.

Se observó la presencia de lesiones tumorales, que también se midieron y se anotaron sus características macroscópicas.

Todos los hallazgos anteriormente descritos se anotaron en protocolos de recogida de datos para cada una de las ratas.

III. 1. 5. Recogida de muestras

1. 5. 1. Recogida de muestras para microscopía óptica

Para MO se obtuvieron fragmentos con ayuda de un bisturí de ciego, colon ascendente, colon transversal y colon descendente de todas las ratas control (grupos A y E). El tamaño de las muestras era de aproximadamente 1 cm² de superficie para el ciego y en el resto de colon se tomó la anchura total del intestino y

aproximadamente también 1 cm de longitud.

Se recogieron las muestras de ratas tratadas con DMH (grupos B, C y D) de las distintas zonas del colon de aspecto macroscópicamente sano situado a distancia de las lesiones neoplásicas, como en los grupos control así como de los tumores, de manera que en la misma pieza se incluyera la mucosa transicional.

Las lesiones neoplásicas se dividieron por la mitad, uno de los fragmentos se usó para estudio histológico y el otro para estudio ultraestructural.

Las muestras se colocaron sobre un fragmento de papel de filtro, con la mucosa expuesta, a fin de evitar al máximo la retracción durante la fijación posterior.

1. 5. 2. Recogida de muestras para microscopía electrónica de scanning (MES)

Se recogieron muestras de las mismas zonas citadas en el apartado anterior para microscopía electrónica, procurando obtener fragmentos de 0,5 cm² de superficie. En total se tomaron 8 muestras de cada uno de los segmentos de colon.

Cuando las lesiones neoplásicas alcanzaban un tamaño superior a 0,2 cm², la mitad del tumor destinado a microscopía electrónica se dividía junto a su mucosa transicional y normal para obtener más muestras para estudio histoquímico.

Las piezas obtenidas se colocaban sobre papel de filtro para evitar la retracción y sobre todo para facilitar su orientación para MES.

III. 2. Procesamiento de las muestras

III. 2. 1. Fijación

2. 1. 1. Fijación para microscopía óptica

Para las muestras de microscopía óptica, los fragmentos de intestino grueso se fijaron por inmersión en una solución de formalina al 4%.

El tiempo de fijación fue de unas 24 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente se iniciaron los pasos correspondientes para su inclusión en parafina.

2. 1. 2. Fijación para microscopía electrónica

La fijación del material para estudios ultraestructurales e histoquímicos se realizó exclusivamente con una solución de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 1% (0,1 M) en tampón fosfato monosódico/bisódico 0,2 M a pH 7,4 durante 24 horas en nevera a 4°C.

Una vez fijado el material se realizaron lavados con el mismo tampón usado para el fijador y posteriormente se realizó un tratamiento de la muestra con cloruro amónico 50 mM en tampón fosfato salino (PBS) (pH 7,4, en tabletas SIGMA®) durante 1 hora para bloquear los grupos aldehídicos producidos por el glutaraldehído durante la fijación, y finalmente se realizaron diversos lavados con tampón fosfato para eliminar los restos de cloruro amónico(562) -(563).

III. 2. 2. Protocolo de inclusión de las muestras en parafina

Las muestras destinadas a microscopía óptica se han incluido en parafina.

La inclusión en parafina se ha iniciado con la deshidratación de las piezas en alcoholes de gradación creciente (50, 70, 80, 90%) y finalmente se han hecho 3 cambios en

alcohol absoluto.

Una vez bien deshidratadas las muestras, se aclaran mediante pasos sucesivos en xilol para extraer el agente deshidratante.

Finalmente se hacen los bloques siguiendo el procedimiento habitual, procurando que los fragmentos queden bien orientados en los moldes.

Se realizan secciones con el microtomo de 5 μ m de espesor.

III. 2. 3. Procesado de muestras para microscopía electrónica convencional

2. 3. 1. Protocolo de deshidratación para MES

La deshidratación se realizó por inmersión del material en una serie de concentraciones crecientes de etanol al 50, 60, 70 y 90%, durante intervalos de 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de 3 cambios también de 10 minutos en alcohol al 96% y 3 cambios más en alcohol absoluto de 15 minutos. Seguidamente las muestras se sumergieron en una mezcla de etanol/acetato de amilo. Gradualmente, durante 30 minutos a temperatura ambiente se aumenta la concentración de éste último pasándose a una proporción de 3:1, de 1:1 y luego de 1:3. A continuación se introdujeron en acetato de amilo puro, donde pueden permanecer varios días, posibilitando el traslado de las muestras.

Por último, las muestras se desecaron mediante la técnica del punto crítico en un aparato POLARON® modelo E 2000, utilizando dióxido de carbono, que solubiliza en el acetato de amilo con el que están impregnadas.

2. 3. 2. Montaje y recubrimiento

Una vez procesadas las muestras se fijaron en stubs de aluminio mediante una gota de plata coloidal (Electrodog 1415, ACHESON®) de forma convencional, teniendo cuidado de mantener expuesta a la observación la superficie luminal. A continuación se procede al recubrimiento de las muestras. Para el estudio con MES convencional las muestras se recubren con una fina capa de oro, de unos 30 nm, en un diodo de "sputtering" POLARON® E 5000(564),(565).

III. 3. Métodos convencionales de tinción

III. 3. 1. Tinción con hematoxilina-eosina

La tinción de hematoxilina-eosina se ha utilizado como tinción de rutina para observar el aspecto morfológico de las secciones de parafina y el estado del tejido a estudiar.

Preparación de los colorantes:

- Hematoxilina de Harris

| | |
|--------------------------------|------------|
| Cristales de Hematoxilina..... | 5,0 g. |
| Alcohol 100%..... | 50,0 ml. |
| Alumbre potásico..... | 100,0 g. |
| Agua destilada..... | 1000,0 ml. |
| Óxido de mercurio..... | 2,5 g. |

Se disuelve la hematoxilina en el alcohol, el alumbre en el agua y se mezcla con la ayuda del calor. Se retira menos de 1 minuto y se agita. A continuación se añade lentamente el óxido de mercurio. Se recalienta lentamente hasta que la solución adquiere un color púrpura oscuro, retirándola rápidamente del calor y sumergiéndola en un recipiente con agua fría. La tinción estará lista para su uso tan pronto como se enfríe. Se añaden 2-4 ml. de ácido acético glacial por cada 100 ml de solución a fin de mejorar la tinción de los núcleos celulares. Se filtra la hematoxilina antes de ser usada.

- Eosina alcohólica

Se prepara la solución *stock*

| | |
|--------------------------------|--------|
| Eosina Y, soluble en agua..... | 1,0 g. |
| Agua destilada..... | 20 ml. |

Se disuelve y añade:

| | |
|------------------|--------|
| Alcohol 95%..... | 80 ml. |
|------------------|--------|

La solución de trabajo se prepara como sigue:

| | |
|-------------------------------|----------|
| Solución stock de eosina..... | 1 parte |
| Alcohol 80%..... | 3 partes |

Justo antes de su uso se añaden 0,5 ml de ácido acético glacial por cada 100 ml.

Protocolo de tinción

Los portas se colocaron en cestillas de tinción y se desparafinaron sumergiéndolos en xilol durante 15 minutos, repitiendo este paso 2 veces más. Posteriormente las muestras se rehidratan con concentraciones decrecientes de alcohol hasta llegar a agua destilada, procediéndose seguidamente a la tinción:

| | |
|--|------------|
| Hematoxilina Harris..... | 15 minutos |
| Lavado en agua corriente..... | 5 minutos |
| Aclarado con HCl (4 ml en 250 ml de alcohol 96%) | |
| Lavado en agua corriente..... | 10 minutos |
| Eosina alcohólica..... | 5 minutos |

Se deshidrató con concentraciones crecientes de alcohol y xilol y se montaron con DPX.

III. 3. 2. Tinción PAS-AB

La tinción combinada con azul alcian (pH 2,5)/ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS-AB) se realizó para la caracterización de las diferentes mucosustancias. El PAS marca los carbohidratos que contienen 1, 2 grupos glicol: glucógeno, glucolípidos, mucosustancias neutras y algunas mucosustancias no sulfatadas. El PAS-AB marca mucosustancias neutras y ácido reactivas periodadas. El AB marca mucosustancias ácidas(566).

Preparación de los colorantes

-Azul alcian. Se disuelven:

| | |
|----------------------------|--------|
| Azul alcian..... | 1 g. |
| Agua destilada..... | 97 ml. |
| Acido acético glacial..... | 3 ml. |

-Ácido periódico. Se disuelven:

| | |
|----------------------|---------|
| Acido periódico..... | 1 g. |
| Agua destilada..... | 100 ml. |

-Metabisulfito sódico

Se prepara la solución stock, disolviendo:

| | |
|---------------------------|---------|
| Metabisulfito sódico..... | 10 g. |
| Agua destilada..... | 100 ml. |

La solución de trabajo se prepara con una mezcla de:

| | |
|---------------------|---------|
| Solución stock..... | 30 ml. |
| Agua destilada..... | 570 ml. |

-Solución de Schiff

| | |
|---------------------------|---------|
| Fuschina básica..... | 4 g. |
| Metabisulfito sódico..... | 7,6 g. |
| CIH 0,25 N..... | 400 ml. |

Se agita la solución a intervalos durante 2 horas, hasta que queda clara y amarillenta o ligeramente pardusca clara. Se añaden 0,5 g.-1 g. de carbón activado, agitando 1-2 minutos. Se filtra en una probeta, lavando el residuo del filtro con agua destilada hasta recuperar el volumen de 400 ml.

La solución debe guardarse a 4° C.

Protocolo de tinción

Se desparafinó hasta agua destilada al igual que en el protocolo para hematoxilina-eosina.

| | |
|--|------------|
| Azul alcian..... | 5 minutos |
| Lavado con agua destilada | |
| Oxidación con ácido periódico..... | 15 minutos |
| Lavado en agua destilada | |
| Solución de Schiff..... | 25 minutos |
| 3 baños sucesivos de metabisulfito sódico..... | 6 minutos |

| | |
|-------------------------------|----------------------------|
| | (de 2 en 2 minutos)lavando |
| | entre ellos |
| Lavado en agua corriente..... | 5 minutos |
| Hematoxilina Harris..... | 2 minutos |

Posteriormente se deshidratava y montaba con DPX.

III. 4. Lectinas

III. 4. 1. Lectinas y azúcares inhibidores usados

Todas las lectinas utilizadas en este estudio tienen como marcador para su visualización el oro coloidal de 30 nm de diámetro(413). Este sistema presenta la ventaja de poder ser visualizado tanto a nivel de microscopía óptica como electrónica. Además, la tinción obtenida es permanente y no necesita de microscopio especial para su observación.

III. 4. 2. Método de conjugación de las lectinas

4. 2. 1. Preparación de las partículas de oro coloidal

En el presente estudio, el oro coloidal ha sido preparado a partir de ácido tetracloroáurico, usando como agente reductor el citrato trisódico, según el método de Frens(421).

Preparación de las soluciones

Para obtener 250 ml de oro coloidal, es necesario preparar 2 soluciones:

A. Solución de cloruro de oro:

El ácido tetracloroáurico es una sustancia cristalina altamente hidrófila, por este motivo se preparó una solución madre acuosa al 1% con la totalidad de la ampolla sellada. Esta solución puede ser almacenada durante varios meses a temperatura ambiente en un vial bien cerrado.

Todas las soluciones deben ser preparadas con agua bidestilada y filtrada, (filtro MILLIPORE®, tamaño de poro 0,45 μm , ya que la presencia de sustancias orgánicas, partículas de polvo, etc., interfieren la formación del coloide y pueden causar variación en el tamaño de las partículas o turbiedad del coloide. Por la misma razón, el material usado en la preparación debe ser limpiado escrupulosamente, sumergido en agua bidestilada y siliconizado (Sigmacote, SIGMA®).

B. Mezcla reductora.

El citrato trisódico se prepara como solución acuosa al 1% y es estable para almacenar.

Formación de oro coloidal. Método

El tamaño de las partículas de oro coloidal considerado óptimo para el microscopio de scanning del que se dispone fue de 30 nm. Para conseguir este diámetro de las partículas se

tomaron 246,25 ml de la solución de cloruro de oro diluida al 0,01% (solución A) y 3,75 ml de citrato trisódico (solución B) para un volumen total de 250 ml.

Ambas soluciones se calientan hasta 60°C, entonces se añade B rápidamente sobre A, agitando. Una vez formado el coloide, evidente por su color rojo burdeos característico, se calienta la solución hasta hervir durante 5 minutos. Cuando la solución presenta este color, se deja enfriar a temperatura ambiente.

4. 2. 2. Conjugación lectina-oro. Incubación con el complejo

Preparación de las soluciones

El polietilenglicol (PEG) (Pm. 20.000) se preparó como solución acuosa al 1%.

El carbonato potásico (K₂CO₃ anhidro) se preparó como solución acuosa 0,2 M. Esta solución no es muy estable y se preparó en fresco previamente a su uso.

Las lectinas del estudio fueron diluidas 1:1 con agua bidestilada.

Conjugación lectina-oro. Método

La formación de complejos de proteínas con oro coloidal es pH dependiente(408) y es óptimo a un pH próximo o ligeramente por encima del punto isoelectrico (PIE)(565). En la tabla siguiente se muestran los valores de pH para la formación de complejos de las lectinas usadas en el presente estudio.

| LECTINA | pH |
|--------------------------------|-----------|
| <i>Glycine max</i> | 6,1 |
| <i>Bandeirae simplicifolia</i> | 6,2 |
| <i>Arachis hypogaea</i> | 6,3 |
| <i>Ulex europaeus I</i> | 6,3 |

Tabla 3-2 (566)

Valores de pH para la formación de complejos de lectina-oro coloidal (Roth 1987).

El ajuste del pH se ha realizado a partir de un pequeño volumen de oro coloidal (6 ml). Dado que las partículas de oro pueden taponar el poro del electrodo y estropearlo, se añaden al coloide 3 ml de polietilenglicol (p.m. 20.000) que actúa como estabilizador y permite ajustar el pH de la alícuota sin peligro para el electrodo. La cantidad de K₂CO₃ añadida para ajustar el pH a este volumen de 5 ml, se extrapoló al volumen total de la solución(566).

La medida del tamaño de las partículas de oro coloidal se comprobó mediante la medición sobre microfotografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión colocando una gota de la solución sobre una rejilla recubierta de *formvar*.

Se ha estimado con el test de floculación de sal la cantidad óptima de lectina necesaria para la estabilización de un cierto volumen de oro coloidal(567). El banco de diluciones se realizó, como se demuestra en la tabla siguiente, con un volumen constante de oro coloidal de 250 μ l, se agitó en un vórtex 15 segundos y se esperó de 2 a 5 minutos a fin de que se conjugaran bien y finalmente se añadió 25 μ l de ClNa al 10%. La cantidad mínima de lectina

que no vira a color azul se considera adecuada. Estos datos pueden mostrar variación dependiendo de la fuerza y pureza de las lectinas y necesitan ser estimados individualmente(568).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Oro | 250 μ l | 250 μ l | 250 μ l | 250 μ l | 250 μ l |
| Agua | 25 μ l | 24 μ l | 23 μ l | 20 μ l | 10 μ l |
| Lectina | 0 μ l | 1 μ l | 20 μ l | 5 μ l | 10 μ l |

Tabla 3-3

Banco de diluciones para encontrar la cantidad óptima de lectina.

Una vez conocida la cantidad mínima de lectina para estabilizar el coloide, se preparan 100 ml de oro (ajustado al punto isoeléctrico (PIE) de la lectina) y se añade la cantidad de lectina correspondiente. Pasados unos 2-5 minutos se añaden a esta mezcla 10-20 μ l de PEG, como estabilizador.

Seguidamente, se realizó una primera centrifugación (L.7-55 Ultracentrifuge BECKMAN®) a 45.000 r.p.m. durante 45 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante (conteniendo la lectina libre) hasta llegar por debajo del spot (oro no acomplejado) y seguidamente se extrajo el pellet o complejo proteína-oro.

Este pellet fue resuspendido en otros tubos de centrífuga con una solución de PBS (0,01 μ M) y PEG (10-20 μ l) hasta obtener el volumen de la solución inicial. Se realizó una segunda centrifugación a 25.000 r.p.m. durante 45 minutos a 4°C. Se vuelve a extraer el pellet y se resuspende con PBS, realizándose un banco de diluciones (PBS y complejo lectina-oro) 1000: 2, 1000: 5, 1000: 10, 1000: 20 en cubetas especiales (Halb-Mikro, GREINER®). Se midió con un espectrofotómetro (UV-150-02 SHIMADZU®). Se considera una concentración óptima para partículas de 30 nm de diámetro, aquella que conduce a una absorbancia de 0,40-0,42 medida por convenio a una densidad óptica de 520 nm (OD₅₂₀)(497).

Los complejos de lectina-oro son muy estables y retienen su bioactividad específica durante largos periodos de tiempo(567), de forma que las alícuotas se conservaron congeladas a -80° C con glicerol al 20% y 0,2 mg/ml de PEG 20000(497).

III. 4. 3. Metodología histoquímica con lectinas conjugadas

El procedimiento de tinción utilizado ha sido el denominado "método directo". Es un método sencillo, ya que sólo es necesario realizar una única incubación de la muestra. El principal inconveniente en relación a los métodos indirectos es que la menor sensibilidad hace necesarias concentraciones más altas de lectina y tiempo de incubación más prolongado. (Figura 3-1 A y B).

Mediante este método, sólo es necesario incubar el tejido con la lectina correspondiente, previa conjugación de ésta con el marcador.

Preparación de las lectinas

Los complejos lectina-oro en PBS se descongelan y centrifugan a temperatura ambiente en una centrífuga para eppendorfs (Biofuge A, HERIUS®) a 800 r.p.m. durante 15

minutos. Se extrae el sobrenadante y se suplementa con 1 mM de Cloruro Cálculo (CaCl_2) y 1 nM de Cloruro Magnésico (MgCl_2) más 0,5% de albúmina bovina (SIGMA®) puesto que algunas lectinas necesitan de la presencia de estos metales pesados para mantener una localización de enlace activa; y 0,05% de TWEEN 20 (Polioxietileno-Sorbitan Monolaurato, SIGMA®). Este último producto se añade para inhibir la interacción del enlace de lectina con carbohidratos a través de enlaces hidrofóbicos(400).

4. 3. 1. Procedimiento de incubación para MO

Los portas se desparafinan e hidratan como en el protocolo para hematoxilina-eosina (apartado III. 3. 1.).

Las preparaciones se secan sin tocar la muestra y se realiza un círculo alrededor de la misma con esmalte de uñas para evitar la diseminación de los reactivos.

Una vez seco se realizan 3 lavados de 10 minutos con PBS.

Se incuban las muestras con lectina a temperatura ambiente durante 45 minutos y posteriormente se lavan las muestras con agua destilada durante 2 minutos.

Amplificación de la señal

Seguidamente se ha realizado una amplificación del oro coloidal mediante el producto Silver Enhancing Kit, BIOCELL®.

El producto provoca un precipitado de plata metálica sobre las partículas de oro que tenemos en la muestra amplificando su señal. [Figura 3-1 C](#)

El Kit contiene dos soluciones: una solución amplificadora y otra iniciadora, las cuales es necesario mantener en nevera a 4° C y pueden congelarse y descongelarse unas 10 veces sin alterar las propiedades del producto.

El proceso de amplificación es dependiente del tiempo. En el primer periodo de actuación la reacción es muy específica para oro coloidal. Pequeñas partículas de 5 nm de diámetro pueden crecer de forma rápida durante este primer periodo de tiempo, que estará en relación con la temperatura de trabajo. Se pueden producir precipitados de plata de forma espontánea por un fenómeno denominado de nucleación que dará lugar a un ruido de fondo indeseable.

Se prepara la solución final del producto y se deposita una gota sobre la preparación, de forma que esta quede cubierta por completo.

El proceso tiene lugar a temperatura ambiente (22° C) durante un tiempo comprendido entre 12 y 16 minutos, observando la muestra bajo el microscopio a baja intensidad de luz, y valorando el marcaje que se va produciendo.

Seguidamente se realizan diversos lavados en agua corriente y se contrasta con una tinción suave de hematoxilina de Harris (durante 3 minutos) y se realiza el montaje con DPX.

4. 3. 2. Procedimiento de incubación para MES

- Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con tampón fosfato de los tejidos previamente fijados.
- Se tratan con Cloruro amónico (NH_4Cl) 0,15 M durante 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear los grupos aldehído(410).
- Se realizan lavados con PBS (3 durante 10 minutos).
- Se procede a la incubación de cada una de los complejos lectina-oro con la muestra durante 45 minutos a temperatura ambiente en tubos Eppendorf.
- Lavados en PBS (3 durante 10 minutos).

Montaje y recubrimiento

El montaje de las muestras se realiza según el apartado 2. 3. 2.

Para el estudio con retrodispersados en MES, las muestras se recubren con una capa de carbón mediante un evaporador EDWARDS 12E6® de alto vacío.

III. 4. 4. Controles de especificidad

Los controles nos permiten evaluar si el marcaje o la reactividad que hemos obtenido es específica o no. Por esto, paralelamente con las incubaciones para cada una de las lectinas, se han realizado incubaciones control con los azúcares inhibidores correspondientes para cada lectina en particular. Los azúcares utilizados han sido siempre de la marca SIGMA®.

Paralelamente, se han realizado las soluciones de los azúcares inhibidores (0,2 M) correspondientes para cada lectina; mezclándose v/v con la solución del complejo lectina-oro. La solución final se ha mantenido durante 45 minutos a temperatura ambiente a fin de que se produjera la unión del azúcar con la lectina. Seguidamente se ha procedido a la incubación del tejido y se ha valorado posteriormente el marcaje.

Con estos controles se pretende evitar la unión de la lectina con el tejido, dado que el punto de anclaje de la lectina será ocupado por el azúcar correspondiente ([Figura 3-1 D](#)). En caso de observar marcaje, cabría pensar en la presencia de posibles interacciones hidrofóbicas entre la lectina y el tejido y por tanto el resultado de un marcaje inespecífico que invalidaría los resultados obtenidos en la incubación del complejo lectina-oro.

III. 5. Observación microscópica

III. 5. 1. Microscopía

Los estudios de MES para detección de retrodispersados se realizó con dos microscopios según la disponibilidad de los mismos: JSM 840 (JEOL®) y S2300 (HITACHI®) este último provisto de un detector ROBINSON® modelo RBH-2300 M, usando en ambos potenciales de aceleración entre 15-25 kv.

Los estudios de SEM convencional se realizaron con los mismos microscopios, a un potencial de aceleración de 15 Kv. estudiándose las muestras a 50, 100, 300, 1000 y 8000 aumentos.

Para los estudios de MO y microfotografía se usó el microscopio BX 50 (OLIMPUS®).

III. 5. 2. Material fotográfico

La película fotográfica utilizada para la MES tanto convencional como para estudio de retrodispersados fue de la marca KODAK® tipo Tmax. Para microscopía óptica se usó película Agfachrome 100 de AGFA.

III. 6. Citometría de flujo

III. 6. 1. Procesado de las muestras para cmf

Para el procesado de las muestras parafinadas de colon de rata para CMF se usó una

modificación de la técnica de Hedley, tal como se describe seguidamente:

1. Se obtuvieron secciones de tejido parafinado de 50 μm con la ayuda de un microtomo y se colocaron unos 5-6 cortes en tubos separados y debidamente etiquetados.

2. Se desparafinan sumergiendo las secciones de tejido en tubos de cristal con 5 ml de xilol durante 10 minutos.

Decantar y repetir este paso con otros 10 ml de xilol.

Decantar y eliminar los restos de xilol mediante lavados con alcohol absoluto.

3. Rehidratar, sumergiendo sucesivamente las secciones en:

| | |
|---------------------|--------|
| Etanol 100%..... | 5 min |
| Etanol 95%..... | 5 min |
| Etanol 96%..... | 5 min |
| Etanol 70%..... | 5 min |
| Etanol 50%..... | 10 min |
| Agua destilada..... | 10 min |

4. Se decanta el agua y se disgregan mecánicamente las piezas con ayuda de un bisturí.

5. Se tratan con 4 ml de disolución de pepsina (Pepsin, SIGMA®) al 0,5% en cloruro sódico al 0,9% en agua destilada y ajustando el pH a 1,5. Se colocan los tubos en un baño María a 37° C durante 40 minutos, con agitaciones intermitentes en vórtex.

6. Se centrifugan 10 minutos a 2000 r.p.m. a temperatura ambiente en una centrífuga clínica. Se decanta y resuspende el tejido en PBS y se agita nuevamente en el vórtex para liberar los núcleos celulares de los fragmentos de tejido.

7. Se filtra la suspensión con malla de nylon de 50 μm de poro. El filtrado se realiza para remover agregados celulares y tejido insuficientemente disgregado que pudiera obstruir la cámara de flujo del citómetro.

8. Se determina la concentración de la suspensión de núcleos con un contador celular o hemocitómetro. Si es necesario, puede añadirse PBS o centrifugar y resuspender en tampón hasta que la concentración final de núcleos esté en el rango de 3-10 x10⁵ células /ml.

9. Se decanta y resuspende con 2 ml de solución de yoduro de propidio y RNAsa (DNA prep Reagent, COULTER®), dejando actuar 20 minutos a temperatura ambiente y en lugar oscuro.

10. Se pasa la suspensión a través de una jeringa de aguja fina, para separar los núcleos y evitar la formación de dobletes.

III. 6. 2. Análisis por citometría de flujo del contenido en DNA y ciclo celular

Las muestras teñidas con yoduro de propidio, tal como se describe en el apartado anterior, han adquirido una determinada cantidad de fluorocromo en proporción a su contenido en ADN. Con el citómetro de flujo pretendemos medir de una manera rápida y objetiva la fluorescencia emitida por los núcleos. A partir de los datos obtenidos se realiza el análisis de la ploidia y de las fases del ciclo celular.

6. 2. 1. Citómetro de flujo

Para el análisis se ha empleado un citómetro de flujo EPICS PROFILE I (COULTER®), de cámara cerrada sin sorter.

Se ha creado un test específico para la lectura de las muestras de colon de rata. Los valores por defecto del test son los siguientes:

- Volumen de muestra aspirada: 190 μ l.
- Velocidad de inyección de la muestra: 100 μ l/minuto.
- Presión de fluido de arrastre: 7,50 psi.
- Potencia de láser: 15 mW.
- Voltaje de los fotomultiplicadores: SS: 400 V, FL3: 750 V.
- No hay compensación del color al trabajar con una única fluorescencia.
- Parámetros seleccionados: LFS, FL3, FL3P, LSS.
- Ventanas de adquisición: No activadas; LFS: 204-1023, FL3: 198-1023. El resto: 0-1023.
- Ganancias: FL3: 2, FL3P: 1.
- Discriminadores: para FL3 en el canal 50.
- Parada a los 50.000 eventos.
- Regiones amorfas (bitmap) de adquisición: FL3-FL3P, para discriminación de dobletes.
- Histogramas: Se estudiaron 4 histogramas: 2 monoparamétricos: FL3 (uno sin bitmaps activados y el otro activando bitmap de FL3-FL3P. Histograma biparamétrico de FL3 y LFS para comprobar la calidad de la tinción (independencia del canal de FL3 y tamaño nuclear).
- Los resultados se almacenaron en forma de histogramas y en modo lista en un diskette.

6. 2. 2. Alineamiento del citómetro

Previamente a la lectura de las muestras, se calibró la alineación del sistema, con bolas fluorescentes de látex (DNA-check, EPICS®)

6. 2. 3. Lectura por el citómetro de flujo

Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo según el test definido. La adquisición de los datos se realizó tras 60 segundos de inicio de paso de muestra para que se estabilizara el flujo. Para cada histograma se adquirieron un total de 50.000 eventos.

Se usaron como controles para las muestras tumorales las propias células normales del tejido, obviamente tratadas simultáneamente y en las mismas condiciones.

6. 2. 4. Interpretación de los resultados de la lectura por citometría de flujo

Como resultado de la lectura por citometría de flujo de las muestras de colon teñidas con yoduro de propidio se obtienen histogramas monoparamétricos con la distribución de la fluorescencia proporcional al contenido de ADN de los núcleos analizados.

Para la correcta cuantificación de la cinética celular se ha empleado un programa informático específico para la interpretación del ciclo celular (MULTICYCLE®, Phoenix Flow Systems). Este programa emplea procedimientos matemáticos capaces de sustraer la señal debida a núcleos cortados y otros detritus.

6. 2. 5. Análisis de los histogramas del contenido en ADN mediante el programa informático

Para cada uno de los histogramas seleccionados se identificó la presencia de uno o más picos correspondientes a células en fase G₀G₁. La presencia de un único pico se considera como un histograma diploide y si aparecen más de uno, un histograma aneuploide. En nuestro caso todos los histogramas fueron diploides como se comentará posteriormente, por lo que, las explicaciones ulteriores se refieren exclusivamente al análisis de histogramas

diploides.

El programa informático obtiene los valores mejor ajustados al histograma y con menor error calculando el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular.

Para el análisis por CMF se obtuvieron para cada histograma un mínimo de 25.000 células.

Se excluyeron del estudio aquellos histogramas en los que el coeficiente de variación del pico G_0-G_1 fue ≥ 10 , no se obtuvo un pico reconocible de G_0-G_1 , existía una pobre discriminación entre el ruido de fondo y el ciclo celular o el número de núcleos adquiridos era inferior a 25.000.

III. 7. Variables del estudio

Para el estudio estadístico se resumen y agrupan los resultados en una hoja de recogida de datos precodificada, registrando las siguientes variables:

III. 7. 1. Identificación de los casos

- *Número de rata*: es una variable cuantitativa asignada en el momento del sacrificio que identifica los animales en estudio.
- *Grupo de estudio*: variable cualitativa con 5 categorías (1) grupo A, (2) grupo B, (3) grupo C, (4) grupo D, (5) grupo E.

III. 7. 2. Variables clínicas

- *Sexo*: variable cualitativa que puede tener dos categorías: macho y hembra.
- *Semanas de tratamiento*: variable cuantitativa que recoge las semanas de tratamiento desde la primera inyección con DMH o EDTA.
- *Localización*: variable cualitativa que recoge la localización de la muestra tanto normal como tumoral según cuatro categorías: ciego, colon ascendente, colon transversal, colon descendente-recto.
- *Tamaño tumoral*: Se consideró como una variable cualitativa, reduciéndose a dos categorías: pequeño $< 0,8$ cm. de diámetro y grande $\geq 0,8$ cm.

III. 7. 3. Variables anatomopatológicas

- *Tipo histológico*: variable cualitativa con 8 categorías:

- (1) adenocarcinoma,
- (2) carcinoma mucinoso,
- (3) carcinoma in situ,
- (4) adenoma,
- (5) displasia severa,
- (6) displasia moderada,
- (7) displasia leve,
- (8) normal.

Si la muestra había sido descrita anatomopatológicamente como neoplásica, se valoró también el:

- *grado de diferenciación*: variable cualitativa que recoge el grado de diferenciación celular tumoral según tres categorías:

- (1) bien,
- (2) moderado,

(3) pobremente diferenciado.

- *estadio según la clasificación de Dukes*: El estadio patológico de invasión tumoral fue definido de acuerdo al sistema original de Dukes en 3 variables:

(1) Dukes A: tumor limitado a la muscularis mucosa

(2) Dukes B: tumor que sobrepasa la muscularis mucosa

(3) Dukes C: invasión local o distal de los ganglios linfáticos.

No se aceptó el estadio Dukes D como tal, puesto que la existencia de varios tumores sincrónicos colorrectales dificultaba conocer cuál de estos tumores era el causante de la invasión tumoral. Por este motivo se recogió para cada una de las ratas la existencia de metástasis independientemente de los tumores primarios.

- *presencia de metástasis*: variable cualitativa que recoge la presencia de metástasis a distancia, estratificándose en dos categorías: 1) presencia, ó 2) ausencia de metástasis. Como ya se ha comentado previamente, dada la dificultad para reconocer el primario siempre que existía un adenocarcinoma con invasión a serosa y otras metástasis a distancias, se le adjudicaba esta existencia es decir, si dos tumores sincrónicos presentaban metástasis se apuntaba esta variable para ambos.

- *presencia de otros tumores sincrónicos colorrectales*: variable cualitativa que recoge si la muestra estudiada se asocia (categoría 1) o no (categoría 2) a la presencia de otros tumores colorrectales.

- *presencia de otros tumores sincrónicos de intestino delgado*: se consideraron 2 categorías para esta variable cualitativa:

(1) presencia,

(2) ausencia.

- *presencia de placa linfoide*: variable con 2 categorías:

(1) asociación de la lesión a placa linfoide,

(2) no asociación.

III. 7. 4. Variables histoquímicas con lectinas en microscopía óptica

- *Marcaje de los tumores con lectinas en microscopía óptica*: Para las cuatro lectinas empleadas en el estudio se consideró 3 categorías en cuanto al marcaje de lectinas:

(1) Todo: cuando el tumor se marcaba por completo o casi por completo.

(2) Areas: cuando el tumor presentaba áreas de marcaje y otras con marcaje ausente.

(3) No: cuando el tumor no presentaba marcaje de lectinas o era muy escaso.

- *Marcaje de la mucosa transicional con lectinas en microscopía óptica*: Para las cuatro lectinas usadas en el estudio, se consideraron dos categorías en cuanto al marcaje:

(1) Presencia de marcaje.

(2) Ausencia de marcaje.

- *Marcaje de la mucosa normal alejada del tumor*: Variable cualitativa para cada una de las lectinas con dos categorías:

(1) Presencia de marcaje.

(2) Ausencia de marcaje.

III. 7. 5. Variables histoquímicas con lectinas en microscopía electrónica

La afinidad de la mucosa del colon, tanto normal como neoplásica, a las lectinas se consideró como una variable cualitativa con 2 categorías:

(1) Presencia de marcaje.

(2) Ausencia de marcaje.

III. 7. 6. Variables histoquímicas con la tinción ab-pas

La tinción con AB-PAS es una variable cualitativa con 5 categorías que recoge el predominio de marcado en las células calciformes normales y tumorales de: AB, PAS, PAS/AB, AB-PAS y ausencia de tinción.

III. 7. 7. Variables consideradas en el estudio de citometría de flujo

Para cada una de las muestras analizadas y puesto que no se ha reconocido en ningún caso aneuploidia, se han recogido las siguientes variables cuantitativas:

- porcentaje de células en fase G₀G₁
- porcentaje de células en G₂M:
- porcentaje de células en fase S

III. 8. Base de datos. Tratamiento de la base de datos

Con todos los parámetros recogidos de los casos se construyó una base de datos matricial e informatizada. Se ha empleado un sistema de filas y columnas capaz de ser leído por el programa informático SPSS. Todos los datos se introdujeron como dígitos alfanuméricos que en las variables cuantitativas representaban el valor de la variable y en las cualitativas una determinada categoría de las mismas.

Se calculó el índice de proliferación (IP) que es igual a la suma de la proporción de células en fase S y en G₂M y determina la proporción de células que están en fase proliferativa(545).

III. 9. Estudio estadístico de los resultados

El estudio estadístico de los resultados se ha realizado con la ayuda del programa informático SPSS para Windows (SPSS Inc, 1989-1992, MICROSOFT®). En cada caso, y de acuerdo con las características específicas de las hipótesis formuladas, el tipo de variables estudiadas y del cumplimiento de determinadas condiciones de aplicación se ha utilizado distintas técnicas estadísticas. El grado de significación se ha establecido para una $p \leq 0,05$.

Los métodos estadísticos utilizados en el estudio son los siguientes:

III. 9. 1. Comparación de variables cualitativas

Para el estudio estadístico de la relación de variables cualitativas se ha empleado una prueba de independencia de χ^2 . Cuando los efectivos calculados eran cercanos a 5 y alguna de las variables tenía más de dos categorías se ha utilizado la prueba de χ^2 con la corrección de Yates. Si los efectivos calculados eran inferiores a 5 ó el número total de casos inferior a 20 en una tabla de 2x2, se ha empleado la prueba exacta de Fischer.

III. 9. 2. Comparación de variables cualitativas y cuantitativas

Para el estudio de relación entre variables cualitativas y cuantitativas se ha empleado la prueba de Kruskal-Wallis, prueba no paramétrica para la comparación de dos o más medias. En el caso de que se cumplieran las condiciones de aplicación, se ha utilizado el análisis de la varianza.

III. 9. 3. Comparación de variables cuantitativas

Para el estudio de relación entre variables cuantitativas se han empleado modelos de regresión lineal simple. Para el estudio multivariante se han aplicado modelos de regresión múltiple([569](#)),([570](#)).

IV. Resultados

IV. A. Estadística descriptiva univariante

IV. A. 1. Grupo A

El grupo control A no presentó ningún tipo de lesión tumoral en ninguna localización tanto colónica como extracolónica.

IV. 1. 1. Características macro y microscópicas de la mucosa normal de rata

1. 1. 1. Características macroscópicas

Abierto el colon por el borde antimesentérico distinguimos macroscópicamente los diversos segmentos del colon:

El ciego se muestra como una bolsa en forma de coma, de paredes delgadas y distendidas, y ausencia de pliegues o de disposición desordenada. La longitud media del ciego es de 4,26 cm, con DS de 0,70, máximo de 6,00 y mínimo de 3,00 cm.

El colon ascendente, ya de forma tubular presenta 8 pliegues, de 0,4 mm. de grosor, separados por surcos de 0,2 a 0,3 mm. Estos pliegues están ordenados de forma oblicua, formando ángulo entre ellos en dirección proximal. La longitud media del colon ascendente es de 4,41 cm, con DS de 0,59. El valor máximo es de 6,00 y el mínimo de 3,00 cm.

Los pliegues del colon transversal muestran una disposición oblicua como los del colon ascendente, pero sus pliegues son más gruesos (0,6 mm), en número de 6. A menos de 1 cm. de iniciado el colon transversal se observa generalmente, la presencia de un gran folículo linfático, que produce una protrusión en la superficie mucosa sin distorsionar los pliegues. La longitud media del colon transversal es de 4,83 cm, con DS de 0,70, valor máximo de 6,60 y mínimo de 3,50 cm.

En el colon descendente-recto la superficie mucosa es más lisa, y los pliegues en número de 6 adquieren una disposición longitudinal. Miden unos 0,6 mm y están separados por surcos de 0,2 a 0,3 mm, excepto el central que mide 0,4 mm. Se observa la presencia ocasional de folículos linfáticos, situados con mayor frecuencia en la mucosa rectal. En el recto los pliegues aumentan de grosor, siendo de 0,85 mm. La longitud media del colon descendente-recto es de 10,95 cm; con DS de 1,59. El valor máximo es de 15,00 y el mínimo de 7,00 cm ([Figura 4-1](#))

1. 1. 2. Características microscópicas

A. Microscopía óptica:

Microscópicamente, las criptas experimentan un incremento progresivo de su longitud desde el ciego al colon descendente-recto. En el ciego, la mucosa es delgada y las criptas más cortas y anchas. En el colon ascendente y transversal las criptas son más alargadas y se ramifican en la base. En el colon descendente, las criptas son alargadas y estrechas, rectas y sin ramificaciones ([Figura 4-2](#))

Al microscopio óptico se pueden distinguir 3 tipos de células en la mucosa de las ratas Sprague-Dawley adultas: a) las caliciformes, b) las columnares, y c) las endocrinas. La distribución de las células caliciformes en las criptas muestra diferencias según el segmento del colon analizado. En el ciego, predominan en la base de las criptas mientras, mientras que en el resto de las zonas son más numerosas y de mayor tamaño en los 2 tercios

superiores de las criptas.

Las células columnares se localizan principalmente en el tercio superior de las criptas y en el epitelio de la superficie.

Las células endocrinas se reconocen por sus gránulos de secreción oscuros y predominan en la base.

B. Microscopía electrónica de scanning:

La observación con MES muestra también claras diferencias regionales en el aspecto de la mucosa normal de la rata. Aunque en general está cubierta por una densa capa de moco que impide ver las estructuras subyacentes.

A poco aumento, se observa en el ciego una superficie plana, con criptas abundantes de aspecto circular, separadas por hendiduras irregulares.

En el colon ascendente se observa la disposición de pliegues descrita previamente, siendo estos de tamaño regular, y con formaciones reticulares de moco entre ellos. Los pliegues muestran hendiduras perpendiculares al eje mayor, entre los que se observan las bocas de las criptas de aspecto fusiforme. A mayor aumento el epitelio del colon ascendente muestra unas criptas abultadas, que sobresalen de la superficie con abundantes grumos de moco sobre ellas ([Figura 4-3 B](#)).

El colon transversal muestra pliegues ordenados oblicuamente, similares al ascendente, de disposición uniforme, y con moco entre ellos. A 300 y 1000 aumentos se observa una superficie recubierta de células absortivas poligonales recubiertas de microvellosidades y escasos orificios criptales ([Figura 4-3 C](#)).

El colon descendente-recto muestra pliegues paralelos al eje mayor del intestino grueso, de tamaño variable. Los orificios de las criptas están ordenadas en formación paralela, rodeados por células absortivas en forma de polígono regular. La mucina se distribuye como borlas de material amorfo sobre estas células. A mayor aumento el epitelio forma circunvoluciones, que le confieren aspecto cerebroide ([Figura 4-3 D](#)).

En general, a 50 aumentos, en los cuatro segmentos descritos las criptas están regularmente ordenadas y son de tamaño similar.

A 300 aumentos, se observan los orificios de las criptas uniformes, y el aspecto simétrico de las células absortivas. Se observan hilos de mucina sobre la superficie.

A 1000 aumentos, se observa la presencia de secreciones mucinosas que emergen de las bocas de múltiples criptas y que cubren parte de la superficie. En algunas muestras este recubrimiento es tan extenso como para oscurecer todos los aspectos de las superficies epiteliales.

A 8.000 aumentos, se observaban microvellosidades regulares, íntimamente agrupadas y de tamaño uniforme ([Figura 4-3 A](#)). La superficie luminal de cada célula es convexa, con depresión en los bordes, produciendo un surco epitelial en la región de unión entre las células. Puede observarse la presencia de microorganismos sobre la luz intestinal, que ocupan el espacio entre microvellosidades.

IV. 1. 2. Variables histoquímicas con lectinas en microscopía óptica de mucosa normal

Los patrones de reactividad de las lectinas usadas en este estudio muestran claras diferencias regionales, con presencia o ausencia de enlace y distinta localización en la longitud de las criptas.

1. 2. 1. Glycine max

En el ciego, la lectina SBA muestra una reactividad a nivel supranuclear, esta disposición es más evidente a nivel de los 1/3 medio y apical. A nivel basal el marcaje es más irregular y se dispone también en el interior de los globos de moco y como un refuerzo de los mismos en su periferia. A nivel del colon ascendente existe reactividad de las vacuolas de moco en toda la longitud de la cripta, aunque es más intenso a nivel apical, y mostrando reactividad de la superficie epitelial. En el colon transverso se observa afinidad de esta lectina por la mucina de las células caliciformes en toda la longitud de la cripta, e igual reactividad que en el colon descendente.

La SBA mostró una intensa reactividad en la superficie luminal del epitelio de ciego y colon ascendente, mientras que en el colon transverso y descendente este compartimento celular se ha marcado más moderadamente.

A nivel de ciego y colon ascendente, las células columnares presentan un patrón de localización supranuclear, en forma de pequeñas formaciones ovaladas o redondeadas, principalmente visibles en la porción alta de las criptas y a lo largo del epitelio de superficie (Tabla 4-1).

| | CIEGO | C. ASC. | C. TRANS | C. DESC |
|-------------------|--------------|----------------|-----------------|----------------|
| BASAL | SN, C | C | C | C |
| MEDIO | SN | C | C | C |
| APICAL | SN | C | C | C |
| SUPERFICIE | SN | SN | | |

C: citoplasma, SN: supranuclear

Tabla 4-1

Patrón de enlace de la lectina *Glycine max.*

En las glándulas displásicas en relación a placa linfóide se observa una disminución o ausencia de la reactividad del citoplasma de las células caliciformes.

1. 2. 2. Griffonia simplicifolia-II

La lectina GSA-II a nivel de ciego se localiza en el interior del citoplasma de las células caliciformes en el tercio basal y medio. La GSA-II muestra marcaje intenso supranuclear a nivel de colon ascendente, de predominio basal. En el colon transverso se sitúa a nivel del 1/3 basal.

Mientras que en el colon descendente este marcaje es también basal pero se sitúa en el interior del citoplasma de las células caliciformes (vacuolas de moco) (Tabla 4-2).

| | CIEGO | C. ASC. | C. TRANS. | C. DESC. |
|--------------------|--------------|----------------|------------------|-----------------|
| BASAL | C | SN | SN | C |
| MEDIO | C | SN | | |
| APICAL | | SN | | |
| SUPERFICIAL | | SN | | |

C: citoplasma, SN: supranuclear

Tabla 4-2

Patrón de enlace de la lectina *Griffonia simplicifolia*.

1. 2. 3. *Arachis hypogaea*

La lectina PNA no se une a la mucina de las células caliciformes en ninguno de los segmentos examinados, dando un marcaje positivo granular, fino y débil en la región supranuclear de estas células.

La PNA también tiñe la superficie luminal del ciego y más débilmente la del colon ascendente, pero no la del colon transversal y descendente (Tabla 4-3).

| | CIEGO | C. ASC. | C. TRANS. | C. DESC. |
|--------------------|--------------|----------------|------------------|-----------------|
| BASAL | SN | SN | SN | SN |
| MEDIO | SN | SN | SN | SN |
| APICAL | SN | SN | SN | SN |
| SUPERFICIAL | SN | SN | | |

SN: supranuclear

Tabla 4-3

Patrón de enlace con la lectina *Arachis hypogaea*.

1. 2. 4. *Ulex europaeus*

Las diferencias regionales más notables se han observado con esta lectina. En el ciego las células caliciformes se marcan a todos los niveles de las criptas, en el colon ascendente solamente en la base; mientras que en el colon transversal se marcan ocasionalmente, y en el colon descendente, esta lectina no presenta afinidad por la mucina de las células caliciformes.

A nivel de ciego, la UEA-I, reacciona con la superficie epitelial, y se sitúa a nivel de las células caliciformes (interior de las vacuolas de moco) y la luz glandular de todos los niveles de las criptas como ya hemos citado. A nivel de colon ascendente, se sitúa en el interior de las criptas y luz glandular del 1/3 basal. En el colon transversal tiene un comportamiento mixto igual que el colon ascendente o de reactividad ausente como en el colon descendente (Tabla 4-4).

| | CIEGO | C. ASC. | C. TRANS. | C. DESC. |
|--------------------|--------------|----------------|------------------|-----------------|
| BASAL | C, LG | C, LG | C, LG/ausente | |
| MEDIO | C, LG | | | |
| APICAL | C, LG | | | |
| SUPERFICIAL | C | | | |

C: citoplasma, LG: luz glandular

Tabla 4-4

Patrón de enlace de la lectina *Ulex europaeus*.

IV. 1. 3. Variables histoquímicas con lectinas en microscopía electrónica de barrido

Con esta técnica los lugares de enlace de la lectina son revelados por partículas de oro electrón opacas, comprobado mediante microanálisis la presencia de oro.

1. 3. 1. Glycine max

La lectina SBA muestra afinidad por la mucina de la superficie epitelial del ciego, no observándose afinidad en el resto de las localizaciones colónicas, excepto a nivel de colon descendente donde se ha observado marcaje del moco que emerge de la cripta.

1. 3. 2. GSA-II

No se obtuvo marcaje con la lectina GSA-II de la superficie de la mucosa colónica normal en ninguno de los segmentos del intestino grueso de rata.

1. 3. 3. Arachis hypogaea

No se obtuvo enlace con PNA de la superficie de la mucosa colónica normal en ninguno de los 4 segmentos.

1. 3. 4. Ulex europaeus

La UEA-I reacciona intensamente con la mucina de la superficie epitelial de la mucosa colónica a nivel de ciego, observándose en colon ascendente reactividad en el moco que emerge de la cripta, y ausencia a nivel de colon transversal y descendente.

IV. 1. 4. Variables histoquímicas con la tinción AB-PAS

La tinción con la secuencia AB-PAS de la mucina de las células caliciformes muestra gran intensidad y una positividad débil en el borde apical.

Según el aspecto tintorial de las vacuolas de moco de las células caliciformes, se han observado 3 poblaciones celulares: a) unas, que muestran coloración azul por el AB, b) otras teñidas de color magenta propia del PAS, y c) otras de coloración morado oscuro debido a la combinación de las 2 tinciones, AB y PAS.

La tinción AB-PAS mostró también diferencias regionales y distinta distribución a lo largo de la cripta.

| | CIEGO | C.ASCENDENTE | C.TRANSVERSO | C.DESCENDENTE |
|---------------|---------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| APICAL | AB/AB-PAS/PAS | AB-PAS | AB-PAS | AB-PAS |
| MEDIO | AB/AB-PAS/PAS | AB-PAS | AB-PAS | AB-PAS |
| BASAL | AB/AB-PAS/PAS | AB | AB/AB-PAS | AB-PAS/AB |

PAS: Color magenta

AB: Color azul

AB-PAS: Color morado oscuro

Tabla 4-5

Patrones de tinción AB-PAS en los 4 segmentos colónicos.

En el ciego se obtuvo tinción de los 3 tipos en toda la longitud de las criptas, aunque a nivel del 1/3 basal de la cripta era más evidente la tinción AB, encontrándose también tinción AB en la luz glandular en toda la longitud ([Figura 4-4A](#)). A nivel de colon ascendente encontrábamos en toda la longitud los 3 tipos de tinciones: AB/AB-PAS/PAS, predominando en el tercio basal la tinción azul y en el resto la tinción morada oscura. En el colon transverso la tinción era cambiante adoptando la forma de colon ascendente o de colon descendente. Y por último en colon descendente, a nivel basal y 1/3 medio encontramos tinción AB débil y siendo evidente en toda la longitud la tinción AB-PAS (Tabla 4-5).

La superficie luminal de las células columnares reacciona débilmente con la tinción AB-PAS, y se muestra bastante homogénea a lo largo de toda la superficie del colon.

IV. 1. 5. Citometría de flujo:

-Análisis del ADN: fase G₀G₁ del ciclo celular:

El porcentaje medio de células en fase G₀G₁ para el grupo normal, es de 88,74, con una DS de 3,48. El valor mínimo es de 83,1 y el máximo de 95,3.

- Análisis del ADN: fase G₂M del ciclo celular:

El porcentaje medio de células en fase G₂M para el grupo normal, es de 5,03, con una DS de 1,72. El valor mínimo es de 1,7, y el máximo de 8,3.

- Análisis del ADN: fase S del ciclo celular:

El porcentaje medio de células en fase S para el grupo normal, es de 6,21, con una DS de 2,46. El valor mínimo es de 1,70, y el máximo de 10,9.

- Índice de proliferación:

El índice de proliferación (IP) es la suma del porcentaje de células en fase S y en fase G₂M. El valor medio es de 11,25 para el grupo normal, con una DS de 3,48, el valor mínimo es de 4,7 y el máximo de 16,9.

- Aneuploidia; índice de ADN:

Todas la muestras analizadas eran diploides, sólo se identificó un único pico de fase G₀G₁ ([Figura 4-5](#))

En la Tabla 4-6 se muestran las medias de las fases del ciclo celular e índice de proliferación según el sexo y el segmento estudiado.

| VARIABLES | Categorías | GOG1 | G2M | FASE S | IP |
|--------------|------------|-------|------|--------|-------|
| Sexo | Macho | 88,74 | 5,17 | 6,55 | 11,72 |
| | Hembra | 89,18 | 4,91 | 5,91 | 10,82 |
| Localización | Ciego | 86,92 | 5,36 | 7,72 | 13,08 |
| | C.A. | 90,31 | 4,95 | 4,73 | 9,68 |
| | C.T. | 90,66 | 4,10 | 5,24 | 9,34 |
| | C.D. | 85,46 | 6,23 | 8,30 | 14,53 |

Tabla 4-6

Valores medios de las fases del ciclo celular e IP según el sexo y la localización.

IV. 2. Grupo B

En el grupo B, fallecieron espontáneamente 3 animales, y debido a la rápida autólisis de los roedores se descartaron para el estudio posterior. Dos ratas murieron debido a tumores oclusivos y la tercera por caquexia extrema asociada a la presencia de tumores múltiples.

De los 39 animales supervivientes del grupo B, 32 presentaron lesiones tumorales a nivel del colon (82,05%), 4 tumores extracolónicos (10,25%) y sólo 3 mostraron ausencia tumoral (7,69%) ([Figura 4-6](#)). De los 32 animales que presentaron tumor, 22 presentaron tumores múltiples sincrónicos en intestino grueso (68,75%) y el resto (31,25%) fueron lesiones tumorales únicas.

IV. 2. 1. Características microscópicas

2. 1. 1. Características de la mucosa normal de rata inyectada con DMH, microscopía óptica

Al microscopio óptico, la mucosa del colon de rata tratada con DMH a dosis de 21 mg/kg/semana durante 20 semanas, muestra hiper cromatismo, pseudoestratificación y alargamiento del núcleo; alto índice mitótico y pérdida de moco muy evidente ([Figura 4-7](#)).

También se observan focos de criptas aberrantes, es decir, glándulas aisladas o grupos de dos glándulas con disminución del moco intracelular, intensa basofilia, pérdida de la polaridad normal y alineación celular, con ramificación de las criptas.

2. 1. 2. Características de la mucosa normal de rata inyectada con DMH, microscopía electrónica de scanning

El estudio de la superficie epitelial del colon de rata en este grupo demuestra en todos los segmentos en general, una pérdida (fenestraciones de la capa de moco, distribución reticular de la mucina) o ausencia del moco que recubre la mucosa.

El ciego de ratas tratadas a altas dosis de carcinógeno, aunque puede mantener su morfología ([Figura 4-8 A](#)), presenta a menudo una gran desestructuración, con pérdida total de las células caliciformes, persistiendo las células columnares con ausencia total de microvellosidades, dándole el aspecto de un panal de miel ([Figura 4-8 B](#)). Ocasionalmente esta alteración ha sido observada en otros segmentos del colon.

Con frecuencia las criptas del ciego pierden su forma redondeada, se distorsionan y adquieren forma romboidal.

En el colon ascendente los pliegues se hacen irregulares, las células absortivas pierden sus microvellosidades y protruyen en la luz, formando cordones cerebriformes de epitelio. Los orificios de las criptas muestran tamaños muy variables e incluso son demasiado anchos para corresponder a esta estructura. Sus bocas están cerradas por formaciones planas, probablemente correspondientes a colecciones mucinosas y restos celulares, que se desprenden con facilidad ([Figura 4-9 A](#)).

Tanto el colon transversal como el colon descendente suelen presentar una estructura más conservada. Se observa la protrusión de las criptas y de los espacios intercriptas, pero las células absortivas a diferencia del colon ascendente mantienen sus microvellosidades ([Figura 4-9 B](#) y [Figura 4-10 A](#)).

En general, en toda la longitud del colon se observan áreas de mucosa protuberante, que afectan un número variable de glándulas.

A 8000 aumentos las microvellosidades son cortas y romas, más anchas de diámetro y se bifurcan ([Figura 4-10 B](#)).

2. 1. 3. Descripción de las lesiones neoplásicas con microscopía electrónica de scanning

A poco aumento las muestras tumorales muestran protrusión en la superficie luminal con desaparición de los pliegues y desarreglo de los mismos o ausencia en las áreas adyacentes.

A más aumento, se observaron células protruyendo en la luz del colon, acompañadas de depresiones del epitelio ([Figura 4-11 C](#)) Las células absortivas pierden su aspecto poligonal y las aberturas crípticas están distorsionadas y comprimidas, y disminuídas en número o ausentes ([Figura 4-11 A](#)), confiriéndole una superficie plana en la que no se reconoce la celularidad normal.

En ocasiones se aprecia sobre la superficie tumoral, grandes acúmulos de material amorfo, traduciendo un aumento de las secreciones mucinosas ([Figura 4-11 B](#)).

A 8.000 aumentos se hacen más obvias las elevaciones y depresiones del epitelio y se observan células sin microvellosidades o un patrón alterado de las mismas, que se hacen más irregulares y cortas.

IV. 2. 2. Variables clínicas

2. 2. 1. Sexo

Las 71 lesiones tumorales asentaron en 39 casos (54,93%) sobre ratas macho y 32 sobre hembras (45,17%).

2. 2. 2. Localización tumoral

Las 71 lesiones benignas y malignas observadas en este grupo se localizaban en 7 casos en el ciego (9,86%), 27 en el colon ascendente (38,03%), 18 en colon transverso (25,35%) y 19 en colon descendente (26,76%).

2. 2. 3. Aspecto macroscópico tumoral

La mayoría de los tumores fueron del tipo tumor exofítico (26 casos 45,61%), se observaron 13 lesiones polipoideas (22,81%), 8 en forma de pólipo sesil (14,04%) y 10 eran tumores ulcerados (17,54%) ([Figura 4-12](#))

Las lesiones benignas se clasificaron como tumores polipoideos en 6 casos (50%), en 5 casos como pólipos sesiles (14,67%) y en 1 como tumor exofítico (8,33%). El resto de lesiones aparecieron en mucosa de aspecto normal o asociadas a placa linfoide, considerándose en un apartado posterior.

2. 2. 4. Tamaño tumoral

En el grupo B las neoplasias colónicas tienen una media de 0,91 cm, DS de 0,78. El valor mínimo es de 0,2 y el máximo de 3 cm.

IV. 2. 3. Variables anatomopatológicas

2. 3. 1. Tipo histológico

En el grupo B se apreciaron 57 lesiones malignas divididas en 31 adenocarcinomas

(Figura 4-13 A), 21 carcinomas mucinosos (Figura 4-13 B) y 5 carcinomas in situ y 14 lesiones benignas distribuidas en 1 displasia leve, 8 moderadas y 4 severas y 1 adenoma túbulo-velloso.

2. 3. 2. Grado de diferenciación

Los 31 adenocarcinomas se dividieron según su grado de diferenciación en 24 moderadamente diferenciados (77,42%) y 7 poco diferenciados (22,58%).

2. 3. 3. Estadío tumoral (Dukes)

Se encontraban en estadio A de Dukes 18 adenocarcinomas (34,61%), 15 en estadio B (28,85%) y 19 en estadio C (36, 54%).

2. 3. 4. Presencia de otros tumores sincrónicos colorrectales

Un total de 56 lesiones (78,87%) se asociaban a la presencia de otras lesiones colorrectales sincrónicas.

2. 3. 5. Presencia de tumores sincrónicos de intestino delgado

Un total de 41 lesiones tumorales (57,75%) se asociaban a la presencia de tumores sincrónicos de intestino delgado. Presentaron tumores de intestino delgado 14 ratas.

2. 3. 6. Presencia de metástasis

Se observaron metástasis en 16 ratas (50,00%) de las 32 con tumores. De este modo 37 lesiones (52,11%) estaban asociadas a la presencia de metástasis.

2. 3. 7. Asociación a placa linfoide

Exclusivamente 6 lesiones benignas y malignas (8,45%) se asociaban a la presencia de placa linfoide en este grupo.

IV. 2. 4. Variables histoquímicas con lectinas en microscopía óptica

2. 4. 1. Marcaje de la mucosa macroscópicamente normal

- *Marcaje con Glycine max (SBA):*

Se estudió la mucosa normal de idéntica localización al tumor en 18 casos mediante la lectina SBA, de modo que 12 mostraron reactividad para dicha lectina (66,66%), estando ausente en 6 casos (33,33%).

- *Marcaje con Griffonia simplicifolia-II (GSA-II):*

Se estudiaron un total de 18 muestras normales con la lectina GSA-II. Estando presente el marcaje en 15 casos (83,33%) y siendo negativo en 3 (16,67%).

- *Marcaje con Arachis hypogaea (PNA):*

Se estudió la mucosa normal en 14 casos con la lectina PNA. Mostraron enlace de lectina 3 casos (21,43%) y ausencia de enlace 11 casos (78,57%).

- *Marcaje con Ulex europaeus (UEA-I):*

El estudio de 24 casos de mucosa normal, mostró reactividad en 10 casos (41,67%) y ausencia en 14 casos (58,33%).

2. 4. 2. Marcaje de los tumores

- *Marcaje con SBA:*

Se estudiaron un total de 30 neoplasias colónicas con la lectina SBA. En este grupo, en 12 casos se observaron enlaces de lectina en todo el tumor (40,00%), en 11 casos se limitaba a algunas áreas (36,67%) y en 7 casos no se observaron (23,33%).

- *Marcaje con GSA-II:*

Se estudiaron un total de 29 tumores con la lectina GSA-II, de los que 11 presentaron marcaje de todo el tumor (37,93%), áreas de marcaje en 12 casos (41,38%) y ausencia de marcaje en 6 casos (20,69%).

- *Marcaje con PNA:*

Se estudió el marcaje con la lectina PNA en 18 tumores colorrectales, presentaron enlaces de lectina en todo el tumor 12 (66,67%), áreas de marcaje 4 casos (22,22%) y ausencia de enlace 2 tumores (11,11%).

- *Marcaje de tumores con UEA-I:*

En 31 tumores colorrectales se probó el enlace de lectina UEA-I, resultando en un enlace completo 14 tumores (45,16%), en áreas en 9 casos (29,03%) y ausencia de enlace en 8 casos (25,81%).

2. 4. 3. Marcaje de la mucosa transicional (MT)

- *Marcaje con SBA:*

Se estudió la mucosa transicional de 25 tumores mediante la lectina SBA, de modo que 18 mostraron reactividad para dicha lectina (72,00%), estando ausente en 7 casos (28,00%).

- *Marcaje con GSA-II:*

Se probó el enlace de lectina GSA-II en 25 casos. Estando presente el marcaje en 19 casos (76,00%) y siendo negativo en 6 (24,00%).

- *Marcaje con PNA:*

Se estudió la mucosa transicional de 18 tumores con la lectina PNA. Mostraron enlace de lectina 8 casos (46,67%) y ausencia de enlace 10 casos (53,33%).

- *Marcaje con UEA-I:*

El estudio de la MT de 30 tumores mediante la lectina UEA-I, mostró reactividad en 9 casos (29,63%) y ausencia en 6 casos (70,37%).

IV. 2. 5. Variables histoquímicas con la tinción AB-PAS

2. 5. 1. Tinción de la mucosa normal

La mucosa normal de las ratas tratadas con DMH a altas dosis mostró disminución de la tinción de las mucinas ácidas y neutras, pero en especial de las mucinas PAS +, presentando algunas glándulas ausencia total de la misma. Estas alteraciones eran más evidentes en el ciego ([Figura 4-4 B](#)).

2. 5. 2. Tinción de la mucosa tumoral

En este grupo se estudiaron mediante la tinción AB-PAS 17 tumores colorrectales, de los cuales 5 fueron AB, 4 AB-PAS, 1 PAS/AB, y 6 no se tiñeron.

2. 5. 3. Tinción de la mucosa transicional

Se estudió en 20 casos la MT, mostrando alteración de la secuencia AB-PAS 14 casos (70%) y un aspecto idéntico a la normal alejada del tumor en el resto. Las alteraciones consistieron en ausencia de AB en 3 casos y de PAS en 11.

IV. 2. 6. Citometría de flujo

2. 6. 1. Citometría de flujo de la mucosa macroscópicamente normal

- *Análisis del ADN: fase G₀G₁ del ciclo celular:*

El porcentaje medio de células en fase G₀G₁ para el grupo DMH-normal es de 86,65 con una DS de 3,21. El valor mínimo es de 79,4 y el máximo de 92,3.

- *Análisis del ADN: fase G₂M del ciclo celular:*

El porcentaje medio de células en fase G₂M es de 5,91 con una DS de 1,95. El valor mínimo es de 2,6 y el máximo de 11,2.

| Variable | Categorías | GOGI | G2M | FASES | IP |
|--------------|------------|-------|------|-------|-------|
| Sexo | Macho | 86,36 | 6,31 | 7,31 | 13,62 |
| | Hembra | 86,93 | 5,51 | 7,54 | 13,06 |
| Localización | Ciego | 86,54 | 5,58 | 7,88 | 13,46 |
| | C.A | 89,10 | 5,20 | 5,70 | 10,90 |
| | C.T. | 85,75 | 6,82 | 7,41 | 14,23 |
| | C.D. | 96,98 | 5,53 | 7,47 | 13,01 |

Tabla 4-7

Valores medios de las fases del ciclo celular e IP según el sexo y la localización.

- *Análisis del ADN: fase S del ciclo celular:*

El porcentaje medio de células en fase S es de 7,43 con una DS de 2,35. Con valor mínimo de 3,4 y máximo de 12,9.

- *Índice de proliferación:*

El índice de proliferación (IP) es la suma del porcentaje de células en fase S y en fase G₂

M. El valor medio es de 11,25 para el grupo DMH normal el valor medio es de 13,34, DS de 3,21. Mínimo de 7,7 y máximo de 20,6 ([Figura 4-14 A](#))

2. 6. 2. Citometría de flujo de los tumores

- *Análisis del ADN: fase G₀G₁ del ciclo celular:*

El porcentaje medio de células en fase G₀G₁ para el grupo DMH-tumor es de 87,50 con una DS de 3,30, con mínimo de 82,0 y máximo de 93,1.

-Análisis del ADN: fase G₂M del ciclo celular:

El porcentaje medio de células en fase G₂M para el grupo DMH-tumor es de 4,84 con una DS de 2,25, con máximo de 10,0 y mínimo de 1,2.

- Análisis del ADN: fase S del ciclo celular:

El porcentaje medio de células en fase S para el grupo DMH-tumor es de 7,65 con una DS de 1,94, con máximo de 11,7 y mínimo de 3,5.

- Índice de proliferación:

El valor medio del IP del grupo DMH-tumor es 12,49. Muestra una DS de 3,30. El valor mínimo es de 6,9 y el máximo de 18,0.

- Aneuploidia; índice de ADN:

Ninguno de los casos estudiados presenta alteración en el contenido de ADN (índice de ADN de 1,00). En el presente estudio todos los tumores de colon de rata son euploides por citometría de flujo ([Figura 4-14 B](#)).

En la Tabla 4-8 se recogen las medias de las variables estudiadas por CMF de los tumores colorrectales en relación a las variables clínicas y anatomopatológicas.

| Variable | Categorías | GOG1 | G2M | FASE S | IP |
|------------------|-------------|-------|------|--------|-------|
| Sexo | Macho | 87,32 | 4,91 | 7,75 | 12,67 |
| | Hembra | 87,72 | 4,75 | 7,52 | 12,27 |
| Localización | Ciego | 84,80 | 6,40 | 8,80 | 15,20 |
| | C.A. | 90,20 | 3,40 | 6,39 | 9,80 |
| | C.T. | 86,06 | 5,35 | 8,58 | 13,93 |
| | C.D. | 85,91 | 6,05 | 8,02 | 14,08 |
| Macroscopía | T. P. | 90,65 | 3,45 | 5,90 | 9,35 |
| | T.S. | 87,53 | 5,53 | 6,93 | 12,46 |
| | T.E. | 87,66 | 4,91 | 7,42 | 12,33 |
| | T.U. | 86,12 | 4,75 | 9,11 | 13,87 |
| Tamaño | 0,8 cm | 87,91 | 4,76 | 7,32 | 12,08 |
| | 0,8 cm | 87,04 | 4,93 | 8,02 | 12,96 |
| Tipo histológico | Adenocarci. | 88,24 | 4,37 | 7,37 | 11,75 |
| | Mucinoso | 86,41 | 5,52 | 8,06 | 13,58 |
| Diferenciación | Moderado | 88,31 | 4,34 | 7,34 | 11,68 |
| | Pobre | 88,00 | 4,52 | 7,47 | 12,00 |
| Dukes | A | 89,00 | 3,92 | 7,06 | 10,99 |
| | B | 87,31 | 4,92 | 7,76 | 12,68 |
| | C | 86,55 | 5,50 | 7,93 | 13,44 |
| Placa | si | 87,95 | 3,78 | 8,25 | 12,04 |
| | no | 87,32 | 5,25 | 7,14 | 12,67 |

| | | | | | |
|---------------------|----|-------|------|------|-------|
| Tumores sincrónicos | si | 87,35 | 4,99 | 7,65 | 12,64 |
| | no | 89,75 | 2,55 | 7,70 | 10,25 |
| Tumores I. Delgado | si | 87,35 | 5,08 | 7,56 | 12,64 |
| | no | 87,72 | 4,49 | 7,78 | 12,27 |
| Metástasis | si | 86,62 | 5,32 | 8,05 | 13,37 |
| | no | 88,38 | 4,36 | 7,25 | 11,61 |

Tabla 4-8

Medias de las fases de ciclo celular e IP según las variables clínicas y anatopatológicas.

IV. 3. Grupo C

En el grupo C se observó la presencia de lesiones benignas sobre mucosa de aspecto sano a partir de la sexta semana de tratamiento, el primer tumor maligno se detectó en la semana 16 de inducción. En la [Figura 4-15](#) se muestra el tiempo de inducción de las lesiones microscópicas en el grupo C. En la semana 22 falleció un animal, revelando la necropsia un tumor oclusivo en colon descendente. De los 59 animales supervivientes 31 desarrollaron algún tipo de lesión benigna o maligna; mostrando lesiones sincrónicas múltiples 18 ratas.

IV. 3. 1. Características microscópicas de la mucosa normal de rata inyectada con dmh en etapas preneoplásicas

A las 2 semanas de iniciado el tratamiento con DMH se observaron glándulas aisladas o grupos de dos glándulas con disminución de moco intracelular, intensa basofilia, pérdida de la polaridad normal y alineación celular, con ramificación de las criptas. Estos cambios eran más evidentes en la zona apical, próxima a la superficie epitelial, y se les denominó lesiones de predisplasia, o focos de criptas aberrantes. Estas alteraciones se mostraron de forma muy aislada.

El ciego mostró disminución de la cantidad de moco, con aumento del índice mitótico; hiper cromatismo y aumento del tamaño nuclear, siendo la afectación bastante general. El colon ascendente mostró disminución de la cantidad de moco, mientras que colon transversal y colon descendente-recto presentaron una morfología conservada, excepto aisladísimos focos de predisplasia.

En la 4^a semana de inyección las lesiones fueron menos evidentes que en las anteriores, excepto grupos de glándulas que presentaban focos de predisplasia asociados a folículos linfoides ([Figura 4-16](#)). El ciego mostró una discreta pérdida de moco.

En la 6^a semana se observaron las primeras displasias leves a nivel del ciego; además de las lesiones descritas en la 4^a semana.

En las semanas 8 y 10 las lesiones eran similares a las descritas previamente (4^a y 6^a semanas). La pérdida de moco se hizo más constante en todos los segmentos, estando más conservada la morfología en el colon descendente-recto.

En las semanas 12 a 20 se observaron displasias moderadas asociadas a placa linfóide.

A partir de la 20^a semana se apreciaron displasias moderadas no asociadas a placa, además de las descritas previamente y cierta recuperación de las lesiones en algunas muestras, con aspecto conservado. Es decir, en un mismo animal coexisten displasias y

mucosa normal.

Hasta la 30ª semana no se hizo evidente la hiperplasia de las glándulas con elongación de las mismas.

IV. 3. 2. Variables clínicas

3. 2. 1. Sexo

Las lesiones asentaban en 35 casos sobre ratas macho y en 30 sobre hembras. Las lesiones malignas asentaban sobre ratas macho en 16 casos (61,54%) y en 10 sobre ratas hembra (48,46%).

3. 2. 2. Localización tumoral

Las 65 lesiones benignas y malignas observadas en este grupo se localizaban en 14 casos en el ciego (21,54%), 12 en el colon ascendente y (18,46%), 21 en colon transversal (32,31%) y 18 en colon descendente (27,69%). Si consideramos exclusivamente las lesiones malignas; éstas se situaban en 1 caso en el ciego (3,85%), en 5 en el colon ascendente (19,23%), 9 en colon transversal (34,61%) y 11 en colon descendente (42,31%).

3. 2. 3. Aspecto macroscópico tumoral

Los tumores malignos se dividieron por su aspecto macroscópico en 7 pólipos polipoideos (26,92%), 6 pólipos sesiles (23,08%), 11 tumores exofíticos (42,31%) y 2 tumores ulcerados (7,69%). El primer tumor aparecido a las 16 semanas era del tipo pólipo polipoideo, y todos los tumores ulcerados se observaron en la 30ª semana.

Las lesiones benignas observadas eran en 3 casos pólipos polipoideos (15,79%) y en 16 sesiles (84,21%). El resto de lesiones benignas aparecieron sobre mucosa de aspecto normal o asociadas a placas linfoides.

3. 2. 4. Tamaño tumoral

El tamaño medio de las lesiones tumorales del grupo C es de 0,62 cm², DS de 0,43. El valor mínimo es de 0,2 y el máximo de 2,0.

IV. 3. 3. Variables anatomopatológicas

3. 3. 1. Tipo histológico

En el grupo C se observaron un total de 26 lesiones malignas, consistiendo en 12 adenocarcinomas, 9 carcinomas mucinosos y 5 carcinomas in situ, y 39 lesiones benignas, divididas en 8 displasias leves, 24 moderadas y 7 severas.

3. 3. 2. Grado de diferenciación

Todos los adenocarcinomas de este grupo fueron moderadamente diferenciados.

3. 3. 3. Estadio tumoral (Dukes)

Se encontraban en estadio A de Dukes 5 adenocarcinomas (23,81%), 13 en estadio B (61,90%) y 3 en estadio C (14,29%).

3. 3. 4. Presencia de tumores sincrónicos colorrectales

Un total de 52 lesiones (80,00%) se asociaban a la presencia de otras lesiones colorrectales sincrónicas.

3. 3. 5. Presencia de tumores sincrónicos de intestino delgado

Un total de 19 lesiones tumorales (29,23%) se asociaban a la presencia de tumores sincrónicos de intestino delgado. Presentaron tumores en esta localización 8 ratas.

3. 3. 6. Presencia de metástasis

Presentaron metástasis 5 ratas (8,47%).

Se observó que 12 lesiones (18,46%) estaban asociadas a la presencia de metástasis.

3. 3. 7. Asociación a placa linfoide

En total 26 lesiones benignas y malignas (40,00%) se asociaban a la presencia de placa linfoide en este grupo.

IV. 3. 4. Variables histoquímicas con lectinas en microscopía óptica

3. 4. 1. Marcaje de la mucosa macroscópicamente normal en etapas pre y neoplásicas

-Marcaje con SBA:

No se observaron cambios destacables en el patrón de enlace de la lectina SBA. A nivel del ciego, en las semanas 8 a 18 se observó un discreto aumento del marcaje a nivel de las vacuolas de moco de la zona basal que posteriormente se hizo negativo.

En el colon ascendente ([Figura 4-17 A](#)) y colon transversal no se apreciaron cambios en el patrón de enlace.

A nivel del colon descendente-recto se observó un aumento de enlace de lectina en el tercio basal entre las semanas 8 y 14, estando disminuido en las semanas posteriores a todos los niveles, presentando grupos de glándulas ausencia completa.

Las glándulas displásicas mostraron ausencia de enlace con esta lectina. Las glándulas displásicas situadas en la proximidad de una placa linfoide, exhibieron exclusivamente reactividad supranuclear.

- Marcaje con GSA-II:

Ligeras alteraciones se apreciaron en algunas muestras de ciego tratadas con DMH. Ocasionalmente, exhibieron reactividad de las vacuolas de moco a la GSA-II a partir de la semana 16 y en otras muestras se observó un patrón de enlace disminuido.

El colon ascendente mostró desde etapas tempranas (4ª semana) ausencia de enlace en los tercios medio y apical, con unión a la mucina de las células caliciformes basales, generalmente como un fino punteado granular.

No se apreciaron alteraciones del patrón de unión en el colon transversal.

Escasas alteraciones en el patrón de unión se observaron en el colon descendente-recto de ratas inyectadas con DMH. En grupos de 2-3 glándulas se apreció además del marcaje

basal de las vacuolas de moco normal, reactividad a nivel de los tercios medio y apical en el citoplasma de las células caliciformes a partir de la semana 16 ([Figura 4-17 B](#))

Las glándulas predisplásicas mantienen la positividad pero pierden la distribución regular. Las glándulas displásicas observadas en relación a placas linfoides mostraron enlace a nivel supranuclear, perdiéndose la afinidad por las vacuolas de moco. Las glándulas hiperplásicas, elongadas, mostraron una clara disminución en el enlace de GSA-II.

- *Marcaje con PNA:*

En la 2ª semana de iniciado el tratamiento el ciego mostró reactividad a nivel del citoplasma de las células caliciformes ([Figura 4-18 A](#)). En el colon ascendente se observó positividad supranuclear en el tercio basal exclusivamente. El colon transversal no mostró alteración respecto a las ratas control. En el colon descendente no se objetivó unión a la lectina.

En las semanas 8, 12, 14 y 18 se mantuvieron los patrones normales de enlace.

En la semana 20 se observó de nuevo positividad en las vacuolas de moco en el ciego y en la semana 26 en otros segmentos.

Se observa un patrón distinto de enlace de la PNA en las glándulas displásicas situadas en la proximidad de una placa linfoides en relación a la mucosa normal adyacente, en algunos casos, con ausencia de reactividad siendo la mucosa normal positiva, y en otros, con reactividad a nivel supranuclear en ausencia de enlace de la mucosa normal. Los focos de criptas aberrantes muestran un marcaje más intenso que la respectiva mucosa adyacente normal.

- *Marcaje con UEA-I:*

En la 2ª semana no se observaron cambios en la distribución del enlace de esta lectina en el ciego, a partir de la 4ª semana la disposición se hizo más irregular, con disminución o ausencia del marcaje a nivel de las vacuolas de moco en toda la longitud de la cripta, incluso en las semanas 16 y 18 se pudo observar desaparición del enlace en los tercios medio y apical. También se hizo evidente la ausencia o disminución de enlace en las células del epitelio superficial.

A nivel de colon ascendente se observó reactividad de las vacuolas de moco de los tercios medio y apical, en muestras aisladas a partir de la 4ª semana. En general no se apreció afinidad de las células superficiales por la lectina.

El comportamiento irregular en los patrones de reactividad de la UEA-I en el colon transversal hicieron difícil valorar los cambios preneoplásicos. Sin embargo, se observaron alteraciones similares a las del colon ascendente.

Además de un punteado difuso en toda la longitud de la cripta en algunas muestras a partir de la 6ª semana, más patente de la 18 a la 30 semanas.

En el colon descendente no se obtuvieron cambios del enlace de lectina en las semanas 2 a 14. A partir de la semana 16 algunos animales mostraron reactividad a nivel de las vacuolas de moco en toda la longitud de la cripta ([Figura 4-18 B](#)).

Las glándulas displásicas en relación a placas linfoides, mostraron enlace disminuido en todos los segmentos. Mientras que los focos de criptas aberrantes mostraron enlace aumentado.

3. 4. 2. Marcaje de la mucosa tumoral

- *Marcaje con SBA:*

Se estudiaron un total de 21 neoplasias colónicas con la lectina SBA en este grupo, en 12 casos se observaron enlaces de lectina en todo el tumor (57,15%), en 7 casos se limitaba a

algunas áreas (33,33%) y en 2 casos no se observaron (9,52%) ([Figura 4-19 A](#)).

- *Marcaje con GSA-II:*

Se estudiaron un total de 19 tumores con la lectina GSA-II, de los que 4 presentaron marcaje de todo el tumor (21,05%), áreas de marcaje en 11 casos (57,90%) y ausencia de marcaje en 4 casos (21,05%) ([Figura 4-19](#)).

- *Marcaje con PNA:*

Se estudió el marcaje con la lectina PNA en 21 tumores colorrectales, presentando 4 de ellos enlaces de lectina en todo el tumor (19,05%), áreas de marcaje en 8 casos (38,10%) y ausencia de enlace en 9 tumores (42,85%) ([Figura 4-20 A](#)).

- *Marcaje de tumores con UEA-I:*

En 22 tumores colorrectales se probó el enlace de lectina UEA-I, resultando en un enlace completo en 10 tumores (45,45%), en 9 casos en áreas (40,91%) y ausencia de enlace en 3 casos (13,64%) ([Figura 4-20 B](#)).

3. 4. 3. Marcaje de la mucosa transicional (MT)

- *Marcaje con SBA:*

Se estudió la MT de 20 tumores mediante la lectina SBA, de modo que 18 mostraron reactividad para dicha lectina (90,00%), estando ausente en 2 casos (10,00%).

- *Marcaje con GSA-II:*

Se observó la MT de las neoplasias colónicas en 17 casos con la lectina GSA-II, siendo el marcaje positivo en 16 casos (94,12%) y negativo en 1 (5,88%).

- *Marcaje con PNA:*

Se estudió la MT de 20 tumores con la lectina PNA. Mostraron enlace de lectina 13 casos (65,00%) y ausencia en 7 casos.

- *Marcaje con UEA-I:*

Se observó reactividad en la MT en 15 casos (71,43%) y ausencia en 6 (28,57%).

IV. 3. 5. Variables histoquímicas con lectinas en microscopía electrónica

3. 5. 1. Marcaje de la mucosa macroscópicamente normal en etapas pre y neoplásicas

La reactividad de las lectinas en la mucosa macroscópicamente normal de ratas inyectadas con DMH sigue unos patrones de enlace comunes a todas las lectinas del estudio. Se ha observado enlace de lectina a nivel de la mucina que tapiza la superficie luminal de la mucosa, así como en las áreas más denudadas a nivel de los acúmulos de moco en forma de globo o en forma de hilo. También se ha observado unión de las lectinas al moco que emerge de las criptas. Se han considerado tres categorías en el enlace de lectina: 1) ausente, 2) débil, y 3) intenso ([Figura 4-21 B](#), [Figura 4-22](#) y [Figura 4-23](#)). La observación de algunas muestras no resultó valorable debido a problemas en el procesado de las mismas, sobre todo por la existencia de carga electrostática. Los resultados para cada una de las lectinas se expresan en las tablas siguientes (Tablas 4-9, 4-10, 4-11 y 4-12). La presencia de oro coloidal se confirmó mediante microanálisis ([Figura 4-24](#))

| | CIEGO | | | C. ASC. | | | C. TRANS. | | | C. DESC. | | |
|----------------|-------|---|---|---------|---|---|-----------|---|---|----------|---|---|
| Semana | A | D | I | A | D | I | A | D | I | A | D | I |
| 2 ^a | 1 | 3 | | 3 | | 1 | 1 | 2 | | 2 | 1 | |

| | | | | |
|-----------------|-----|-----|-----|-------|
| 4 ^a | 2 | 1 2 | 3 | 1 1 |
| 6 ^a | 1 1 | 3 | 2 | 1 1 |
| 8 ^a | 1 3 | 1 3 | 2 1 | 1 3 |
| 10 ^a | 4 | 1 3 | 4 | 2 1 1 |
| 12 ^a | 1 3 | 3 1 | 4 | 1 2 |
| 14 ^a | | | | |
| 16 ^a | | | | |
| 18 ^a | 1 2 | 2 | 2 1 | 2 1 |
| 20 ^a | 3 1 | 1 3 | 2 | 1 3 |
| 22 ^a | 2 | 1 1 | 1 1 | 2 |
| 24 ^a | 3 | 2 1 | 2 1 | 2 1 |
| 26 ^a | 3 | 1 1 | 3 | 3 |
| 28 ^a | 2 1 | 1 2 | 1 2 | 2 1 |
| 30 ^a | 1 3 | 2 2 | 3 1 | 1 3 |

A. ausente
D: débil
I: intenso

Tabla 4-9

Enlace de la lectina Glycine max a la mucosa macroscópicamente normal del colon de rata tratado con DMH, según las distintas semanas de tratamiento.

| Semana | CIEGO | | | C. ASC. | | | C. TRANS. | | | C. DESC. | | |
|-----------------|-------|---|---|---------|---|---|-----------|---|---|----------|---|---|
| | A | D | I | A | D | I | A | D | I | A | D | I |
| 2 ^a | 2 | 2 | | 3 | 1 | | 3 | 1 | | 3 | | |
| 4 ^a | 2 | 1 | | 2 | 1 | | 3 | | | 2 | | |
| 6 ^a | 1 | 1 | | 1 | 2 | | 2 | 1 | | 2 | | |
| 8 ^a | 2 | 1 | | 2 | | | 1 | 3 | | 1 | 3 | |
| 10 ^a | 4 | | | 2 | 2 | | 2 | 2 | | 1 | 3 | |
| 12 ^a | 2 | 1 | | 3 | | | 3 | | | 2 | 1 | |
| 14 ^a | 2 | | | 1 | 1 | | 1 | 1 | | 1 | | |
| 16 ^a | 2 | | | 2 | | | 2 | | | 1 | 1 | |
| 18 ^a | | | | | | | | | | | | |
| 20 ^a | 2 | | | 1 | 1 | | 1 | | | 2 | | |
| 22 ^a | | | | | | | 2 | | | 2 | | |
| 24 ^a | 2 | | | 3 | | | 3 | | | 2 | | |

| | | | | |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|
| 26 ^a | 2 | 2 1 | 3 | 3 1 |
| 28 ^a | 1 2 | 3 | 2 1 | 1 2 |
| 30 ^a | 3 | 2 2 | 3 1 | 4 |

A: ausente
D: débil
I: intenso

Tabla 4-10

Enlace de la lectina *Griffonia simplicifolia*-II a la mucosa macroscópicamente normal del colon de rata tratado con DMH, según las distintas semanas de tratamiento.

| Semana | CIEGO | | | C. ASC. | | | C. TRANS. | | | C. DESC. | | |
|-----------------|-------|---|---|---------|---|---|-----------|---|---|----------|---|---|
| | A | D | I | A | D | I | A | D | I | A | D | I |
| 2 ^a | 3 | 1 | | 4 | | | 3 | 1 | | 4 | | |
| 4 ^a | | 3 | | 1 | 2 | | 1 | 2 | | | 2 | |
| 6 ^a | | 1 | | 1 | | | | 2 | | | 1 | |
| 8 ^a | | 1 | | 1 | | | 1 | | | | | |
| 10 ^a | | 1 | | 1 | | | 1 | | | 3 | 1 | |
| 12 ^a | 1 | 1 | 1 | 1 | | 1 | 2 | | | 2 | | |
| 14 ^a | | | | | | | | | | | | |
| 16 ^a | | | | | | | | | | | | |
| 18 ^a | 1 | | | | | | | | | | 1 | |
| 20 ^a | | 3 | | 3 | 1 | | 2 | 1 | | 1 | 2 | |
| 22 ^a | 1 | | | 1 | | | 1 | | | 1 | 2 | |
| 24 ^a | 3 | | | 4 | | | 4 | | | 4 | | |
| 26 ^a | 2 | 1 | | 2 | 1 | | 2 | | | 1 | 2 | |
| 28 ^a | 2 | | | 2 | 1 | | 2 | | | 1 | 2 | |
| 30 ^a | 3 | 1 | | | 4 | | 1 | 3 | | 2 | 2 | |

A: ausente
D: débil
I: intenso

Tabla 4-11

Enlace de la lectina *Arachis hypogaea* a la mucosa macroscópicamente normal del colon de rata tratado con DMH,

según las distintas semanas de tratamiento.

| Semana | CIEGO | | | C. ASC. | | | C. TRANS. | | | C. DESC. | | |
|-----------------|-------|---|---|---------|---|---|-----------|---|---|----------|---|---|
| | A | D | I | A | D | I | A | D | I | A | D | I |
| 2 ^a | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | | 3 | 1 | |
| 4 ^a | | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | | 1 | 2 | |
| 6 ^a | | 2 | 2 | | 2 | | | 3 | 1 | | 2 | 1 |
| 8 ^a | 1 | 1 | | 2 | 2 | | 2 | 2 | | 1 | 3 | |
| 10 ^a | | 1 | | | 2 | | 1 | 1 | | | 1 | |
| 12 ^a | | | 1 | | | 2 | 2 | | | 1 | 1 | |
| 14 ^a | | | | | | | | | | | | |
| 16 ^a | 1 | 1 | | 1 | 1 | | | 1 | | 1 | | |
| 18 ^a | 3 | 1 | | 1 | 2 | | 1 | | | 4 | | |
| 20 ^a | | 2 | | 2 | 1 | | 1 | 1 | | 3 | 1 | |
| 22 ^a | | 1 | | | 1 | | 1 | | | 1 | | 1 |
| 24 ^a | | 2 | | | 2 | | 1 | | | 2 | | |
| 26 ^a | 2 | 1 | | 2 | 1 | | 4 | | | 2 | | |
| 28 ^a | 3 | | | 3 | | | 1 | 1 | | 2 | 1 | |
| 30 ^a | 1 | 3 | | 1 | 1 | | 2 | | | 3 | 1 | |

A: ausente
D: débil
I: intenso

Tabla 4-12
Enlace de la lectina Ulex europaeus a la mucosa

macroscópicamente normal del colon de rata tratado con DMH, según las distintas semanas de tratamiento.

3. 5. 2. Marcaje de las lesiones tumorales con lectinas en microscopía electrónica

- *Marcaje con SBA:*

Las neoplasias colónicas observadas por MES mostraron una reactividad para la SBA del 77,8% ([Figura 4-21 A](#)).

- *Marcaje con GSA-II:*

Un 28,6% de los tumores colónicos expresaron localizaciones de enlace con GSA-II.

- *Marcaje con PNA:*

La reactividad de los tumores colorrectales para la PNA fue de 57,2%.

- *Marcaje con UEA-I:*

La reactividad de la UEA-I en muestras colorrectales observadas por MES fue del 60%.

IV. 3. 6. Variables histoquímicas con la tinción AB-PAS

3. 6. 1. Tinción de la mucosa macroscópicamente normal en etapas pre y neoplásicas

No se apreciaron cambios en la distribución de las mucinas en ninguno de los segmentos durante las 6 primeras semanas. En la semana 8 se observó en el ciego disminución de la tinción de las mucinas ácidas y neutras, pero en especial de las mucinas PAS+, presentando algunas glándulas ausencia de tinción apical.

Desde la semana 20 era más patente esta alteración, con ausencia total de tinción PAS+, glándulas sin tinción; y afectación ocasional de otros segmentos del intestino grueso.

Las glándulas displásicas relacionadas con placas linfoides presentaban una alteración de la tinción normal, con ausencia de algunos de los componentes (AB/PAS, en el 33,33% y PAS en el 22,22%) o ausencia total de tinción (44,44%).

3. 6. 2. Tinción de la mucosa tumoral

En este grupo se estudiaron mediante la tinción AB-PAS 12 tumores colorrectales, de los cuales 2 fueron AB, 3 AB-PAS, 1 PAS/AB, y 6 no se tiñeron.

3. 6. 3. Tinción de la mucosa transicional

La MT presentaba cambios en la distribución de la tinción en 7 casos (58, 33%) en los 5 casos restantes las características eran idénticas a la mucosa alejada del tumor.

Se observó ausencia de la tinción AB en 1 caso, ausencia de PAS en 3, cambio en la disposición pero conservando los componentes en otro caso y ausencia total en 2.

IV. 3. 7. Citometría de flujo

Se analizó por citometría de flujo el colon de ratas con mucosa macroscópicamente normal en las etapas más precoces de la carcinogénesis (entre las 2 y la 8 semanas de inyección).

- *Análisis del ADN: fase G₀G₁ del ciclo celular:*

El porcentaje medio de células en fase G₀G₁ del grupo preneoplásico es de 89,96 con DS de 1,81. El valor mínimo es de 87,5 y el máximo de 93,6.

- *Análisis del ADN: fase G₂M del ciclo celular:*

El porcentaje medio de células en fase G₂M es de 3,95 con DS de 0,85. El valor mínimo es de 1,7 y el máximo de 4,8.

- *Análisis del ADN: fase S del ciclo celular:*

El porcentaje medio de células en fase S es de 6,07 con DS de 1,14 y mínimo de 4,5 y máximo de 8,0.

- *Índice de proliferación:*

El valor medio del IP del grupo preneoplásico es 10,03, DS de 1,81. El valor mínimo es de 6,4 y el máximo de 12,5 ([Figura 4-25](#)).

En la Tabla 4-13 se recogen los valores medios de las fases del ciclo celular según el sexo y la localización.

| Variable | Categorías | GOGI | G2M | FASE S | IP |
|--------------|------------|-------|------|--------|-------|
| Sexo | Macho | 90,10 | 4,27 | 5,62 | 9,90 |
| | Hembra | 89,90 | 3,80 | 6,30 | 10,10 |
| Localización | Ciego | 89,30 | 4,45 | 6,25 | 10,70 |
| | C.A. | 91,10 | 3,60 | 5,30 | 8,90 |
| | C.T. | 89,50 | 4,17 | 6,32 | 10,50 |
| | C.D. | 90,20 | 3,67 | 6,12 | 9,80 |

Tabla 4-13

Medias de las fases del ciclo celular e IP según el sexo y la localización.

IV. 4. Grupo D

En el grupo D, formado por 20 animales, 11 presentaron lesiones tumorales colónicas (55%), tumor extracolónico en 3 ocasiones (30%) y ausencia de tumor en 6 casos (15%) ([Figura 4-26](#)). De los animales que presentaron tumor, sólo 2 mostraron tumores sincrónicos en el colon, el resto fueron tumores únicos.

IV. 4. 1. Características microscópicas

4. 1. 1. Características de la mucosa normal de rata inyectada con DMH, microscopía óptica

La mucosa normal de las ratas de este grupo mostró una arquitectura más conservada respecto al grupo tratado con 21 mg/kg/semana; sin embargo, se hicieron patentes alteraciones como pérdida de moco, hipercromatismo y pseudoestratificación.

4. 1. 2. Características de la mucosa normal de rata inyectada con DMH, microscopía electrónica de scanning (MES)

El epitelio colónico de ratas tratadas con DMH a dosis de 10 mg/Kg/semana se mostró mejor conservado que el de las ratas que recibieron altas dosis de carcinógeno. Exhibió un mayor recubrimiento de material mucinoso. Las criptas presentaron un tamaño regular y las células absortivas estaban denudadas con menor frecuencia, aunque a grandes aumentos las microvellosidades mostraron alteración similar a la observada a altas dosis, siendo más cortas y bifurcadas.

4. 1. 3. Descripción de las lesiones neoplásicas (MES)

Las lesiones neoplásicas presentaban idéntica estructura y morfología a las inducidas con alta dosis de carcinógeno.

IV. 4. 2. Variables clínicas

4. 2. 1. Sexo

Se observó la presencia de lesiones malignas colorrectales en 4 ratas macho y en 6 hembras.

4. 2. 2. Localización tumoral

Las 14 lesiones benignas y malignas observadas en este grupo se localizaban en 4 casos en el ciego (28,57%), 8 en el colon ascendente y (57,14%), 2 en colon transverso (14,29%) y en ningún caso se situaron en colon descendente. Si consideramos exclusivamente las lesiones malignas, éstas se situaban en 2 casos en el ciego (20,00%), en 6 en el colon ascendente (60,00%) y 2 en colon transverso (20,00%).

4. 2. 3. Aspecto macroscópico

Las lesiones benignas tuvieron aspecto de pólipo polipoideo en 1 caso (25%) y en los otros 3 de pólipo sesil (75%). Las lesiones malignas eran en 3 casos tumores sesiles (30%), en 5 casos un tumor exofítico (50%) y en los dos restantes un tumor ulcerado (20%)

4. 2. 4. Tamaño tumoral

El tamaño medio de las neoplasias del grupo D es de 0,97 cm². La DS es de 0,59. El valor mínimo es de 0,3 y el máximo de 1,8.

IV. 4. 3. Variables anatomopatológicas

4. 3. 1. Tipo histológico

En el grupo D se observaron 10 lesiones malignas: 3 adenocarcinomas y 7 carcinomas mucinosos y 4 lesiones benignas en forma de displasia moderada.

4. 3. 2. Grado de diferenciación

Los 3 adenocarcinomas observados en este grupo se clasificaron según su grado de diferenciación en 1 moderadamente diferenciado (33,33%) y 2 poco diferenciados (66,66%).

4. 3. 3. Estadio tumoral (Dukes)

Se encontraban en estadio A de Dukes 5 adenocarcinomas (50,00%), 2 en estadio B (20,00%) y 3 en estadio C (30,00%).

4. 3. 4. Presencia de otros tumores sincrónicos colorrectales

Un total de 5 lesiones (35,71%) se asociaban a la presencia de otras lesiones colorrectales sincrónicas.

4. 3. 5. Presencia de tumores sincrónicos de intestino delgado

Un total de 2 lesiones tumorales (14,28%) se acompañaban de tumores sincrónicos de intestino delgado. Presentaron tumores en esta localización 5 ratas.

4. 3. 6. Presencia de metástasis

Presentaron metástasis 4 ratas (36,36%) de las 11 que presentaron lesiones tumorales.

4. 3. 7. Asociación a placa linfoide

En conjunto 5 lesiones benignas y malignas (35,71%) se asociaban a la presencia de placa linfoide en este grupo.

IV. 4. 4. Variables histoquímicas con lectinas en microscopía óptica

4. 4. 1. Marcaje de la mucosa macroscópicamente normal

- Marcaje con SBA:

Se observó la mucosa macroscópicamente normal en 8 casos, mostrando todos ellos (100%) reactividad para la SBA.

- Marcaje con GSA-II:

Se estudió la mucosa normal alejada del tumor en 3 casos, presentando todos ellos (100%) enlace con la lectina GSA-II.

- Marcaje con PNA:

Se pudo estudiar la mucosa macroscópicamente normal en 3 casos, de forma que se observó reactividad para esta lectina en 2 muestras (66,67%).

- Marcaje con UEA-I:

En este grupo se observó la mucosa normal en 5 casos con la lectina UEA-I. Se apreció enlace en 3 casos (60,00%) y en 2 ausencia (30,00%).

4. 4. 2. Marcaje de la mucosa tumoral

- Marcaje con SBA:

Se estudiaron un total de 9 neoplasias colónicas con la lectina SBA en este grupo. En 5 casos se observaron enlaces de lectina en todo el tumor (55,56%), que en 3 casos se limitaba a algunas áreas (33,33%) y en 7 casos no fue observado (11,11%).

- Marcaje con GSA-II:

Se estudió el marcaje con la lectina GSA-II en 7 neoplasias colorrectales, presentaron enlaces de lectina en todo el tumor 1 (14,19%), áreas de marcaje 4 casos (57,14%) y ausencia de enlace 2 tumores (28,57%).

- Marcaje con PNA:

En este grupo se estudiaron un total de 4 neoplasias colónicas con la lectina PNA. En 3 casos se observaron enlaces de lectina en todo el tumor (75,00%), en 1 caso se limitaba a

áreas de enlace (25,00%) y no se observó en ningún caso ausencia de reactividad.

- *Marcaje de tumores con UEA-I:*

Se estudió la mucosa tumoral de 7 lesiones con la lectina UEA-I, mostrando enlace de lectina en todo el tumor 4 casos (57,14%) y en áreas el resto (42,86%).

4. 4. 3. Marcaje de la mucosa transicional

- *Marcaje con SBA:*

Se pudo estudiar la mucosa transicional de 8 tumores mediante la lectina SBA, de modo que los 8 mostraron reactividad para dicha lectina (100%).

- *Marcaje con GSA-II:*

Se estudió la mucosa transicional en 5 casos, presentando enlace de lectina 3 (60,00%), y ausencia 2.

- *Marcaje con PNA:*

Se pudo estudiar la mucosa transicional de 3 tumores, de forma que sólo mostró reactividad para esta lectina 1 muestra (33,33%).

- *Marcaje con UEA-I:*

En este grupo se observó la mucosa transicional de 5 tumores con la lectina UEA-I. En 2 casos se observaron enlace (40,00%) y en 3 ausencia.

IV. 4. 5. Variables histoquímicas con la tinción AB-PAS

4. 5. 1. Tinción de la mucosa normal

En general se observó disminución de la intensidad de tinción de la secuencia AB-PAS, siendo más evidente en el ciego como en las ratas que recibieron altas dosis de carcinógeno.

Manteniéndose la positividad para la tinción AB ([Figura 4-27 A](#)), siendo más evidente la disminución de las mucinas neutras.

4. 5. 2. Tinción de la mucosa tumoral

En este grupo se estudiaron mediante la tinción AB-PAS, 7 tumores colorrectales, de los cuales 3 fueron AB-PAS, 3 PAS/AB, y 1 no presentó tinción.

4. 5. 3. Tinción de la mucosa transicional

En la MT de los tumores del grupo C se apreció alteración de la tinción en 3 casos (60%), consistente en todos ellos en disminución de la tinción AB.

IV. 5. Grupo E

Las ratas del grupo E a las que se administró EDTA no presentaron ninguna lesión tumoral y el aspecto macroscópico fue considerado normal.

IV. 5. 1. Aspecto microscópico

La morfología microscópica (MO y MES) de las ratas tratadas con EDTA no difiere de la observada en el grupo control sin tratamiento.

IV. 5. 2. Variables histoquímicas con lectinas

La histoquímica de lectinas reveló pequeñas variaciones entre el grupo control no tratado y el grupo EDTA. Sin embargo no se apreció aparición de enlace en las localizaciones que habitualmente carecen de él con ninguna de las lectinas.

- *Marcaje con SBA:*

En general no se observaron cambios en la reactividad de esta lectina en ratas tratadas con EDTA, aunque la disposición fue algo más heterogénea y se acompañaba de un punteado difuso inespecífico. En el ciego y en el colon descendente se observó disminución del enlace de SBA a nivel basal en 3 casos.

- *Marcaje con GSA-II:*

No se apreciaron cambios evidentes con respecto al enlace de esta lectina.

- *Marcaje con PNA:*

El enlace de PNA estaba ausente en las muestras de intestino grueso observadas.

- *Marcaje con UEA-I:*

Se observaron alteraciones en el patrón de unión de la lectina UEA-I, consistentes en alteración a nivel de ciego y colon ascendente, con ausencia o positividad de algunas vacuolas de moco de forma aislada.

IV. 5. 3. Variables histoquímicas con la tinción AB-PAS

En general se observó en las muestras de colon de ratas inyectadas con EDTA una disminución de la cantidad de tinción AB-PAS, que traducía una disminución global de moco. Esta alteración era más evidente en el ciego ([Figura 4-27 B](#)).

En el ciego de las ratas inyectadas con EDTA la distribución de la tinción era idéntica a la de las ratas normales del grupo A, aunque a nivel apical la mayoría de las glándulas mostraban ausencia de tinción. A nivel de colon ascendente encontrábamos en toda la longitud AB/AB-PAS/PAS en menor cantidad, igual que en las ratas no inyectadas, aunque en 1 de los animales sólo se obtuvo tinción AB en toda la longitud. En el colon transversal la tinción era cambiante adoptando la forma de colon ascendente o de colon descendente. Y por último el colon descendente, en general, conservaba la tinción descrita para la mucosa normal (a nivel basal y 1/3 medio tinción AB y en el tercio apical AB-PAS).

IV. 5. 4. Citometría de flujo

- *Análisis del ADN: fase G₀G₁ del ciclo celular:*

El porcentaje medio de células en fase G₀G₁ para el grupo de ratas tratado con EDTA es de 89,61 con DS de 2,45. El valor mínimo es de 85,5 y el máximo de 94,8.

- *Análisis del ADN: fase G₂M del ciclo celular:*

El porcentaje medio de células en fase G₂M para el grupo de ratas tratado con EDTA presenta un porcentaje medio de 4,72 con DS de 2,00. El valor mínimo es de 2,1 y el máximo de 8,8.

- *Análisis del ADN: fase S del ciclo celular:*

El porcentaje medio de células en fase S para el grupo de ratas tratado con EDTA presenta un porcentaje medio de 5,66 con DS de 2,19. El valor mínimo es de 3,1 y el máximo de 10,8.

- *Índice de proliferación:*

El valor medio del IP del grupo EDTA es de 10,38, con un DS de 2,45. Valor mínimo de 5,2 y máximo de 14,5.

En la Tabla 4-14 se muestran los valores medios de las fases del ciclo celular según el sexo y la localización.

| Variable | Categorías | GOGI | G2M | FASE S | IP |
|--------------|------------|-------|------|--------|-------|
| Sexo | Macho | 89,22 | 6,17 | 4,60 | 10,77 |
| | Hembra | 89,73 | 4,27 | 5,99 | 10,26 |
| Localización | Ciego | 88,90 | 4,90 | 6,20 | 11,10 |
| | C.A. | 87,60 | 7,75 | 4,65 | 12,40 |
| | C.T. | 89,41 | 3,88 | 6,70 | 10,58 |
| | C.D. | 90,75 | 4,63 | 4,61 | 9,25 |

Tabla 4-14

Medias de las fases del ciclo celular e IP según el sexo y la localización.

IV. 6. Descripción de las lesiones tumorales

En los tres grupos inyectados con DMH se observaron lesiones tumorales macroscópicas, que luego se comprobaron por microscopía óptica y otras lesiones que aparecieron sobre mucosa aparentemente normal. Los datos a los que nos referiremos posteriormente recogen las lesiones estudiadas anatomopatológicamente, que fueron un total de 150 lesiones tumorales (benignas y malignas).

IV. 6. 1. Variables clínicas

6. 1. 1. Sexo

De las 73 ratas de los grupos B, C y D que presentaron lesiones tumorales 35 son machos (47,9%) y 38 hembras (52,1%). Cuando se consideraba exclusivamente las lesiones malignas 29 eran machos (53,7%) y 25 hembras (46,3%).

6. 1. 2. Localización del tumor

De las 150 lesiones tumorales consideradas en conjunto, 25 se localizaron a nivel de ciego, 47 en colon ascendente, 41 en colon transverso y 37 en colon descendente. Cuando se consideraban las lesiones malignas exclusivamente (adenocarcinomas, carcinomas mucinosos y carcinomas in situ), 8 se localizaban en ciego, 36 en colon ascendente, 26 en colon transverso y 23 en colon descendente ([Figura 4-28](#)).

6. 1. 3. Aspecto macroscópico

Los tumores malignos se dividieron por su aspecto macroscópico en 20 tumores polipoideos (21,51%), 17 tumores sesiles (18,28%), 42 tumores exofíticos (45,16%) y 14 tumores ulcerados (15,05%).

6. 1. 4. Tamaño tumoral

El tamaño medio de las lesiones tumorales malignas, medidas en cm² es de 0,82 con una DS de 0,66. El valor mínimo es de 0,2 y el máximo de 3,0.

IV. 6. 2. Variables anatomopatológicas

6. 2. 1. Tipos histológicos

Como ya hemos citado se observaron un total de 150 lesiones tumorales localizadas en el colon. De estas 46 fueron adenocarcinomas, 37 carcinomas mucinosos, 10 carcinomas *in situ*, 1 adenoma túbulo-velloso, 9 displasias leves, 36 displasias moderadas y 11 displasias severas ([Figura 4-29](#)).

6. 2. 2. Grado de diferenciación tumoral

Cuando las lesiones presentaron heterogeneidad morfológica con diversos grados de diferenciación en el mismo tumor, se estableció el mismo según el patrón predominante.

Los adenocarcinomas se dividieron según su grado de diferenciación en moderadamente diferenciados (37 casos, 80,43%) y poco diferenciados (9 casos, 19,57%), en ninguno de los grupos se observaron adenocarcinomas bien diferenciados.

6. 2. 3. Grado de invasión de la pared (Estadio de Dukes)

Se han considerado exclusivamente los adenocarcinomas y carcinomas mucinosos, excluyendo las lesiones tumorales que en su propia definición excluyen su invasión a capas profundas del colon.

Los tumores fueron Dukes A en 28 casos, Dukes B en 30 casos y Dukes C en 25 casos ([Figura 4-30](#)).

6. 2. 4. Presencia de otros tumores sincrónicos colorrectales

En todos los grupos inyectados con DMH y considerando tanto lesiones benignas como malignas, un total de 42 ratas (23,46%) presentaron tumores sincrónicos colorrectales.

6. 2. 5. Presencia de tumores sincrónicos en intestino delgado

Presentaron tumores sincrónicos en intestino delgado 22 ratas (12,29%) del total de animales inyectados.

6. 2. 6. Presencia de metástasis

De las 179 ratas supervivientes inyectadas con DMH un total de 20 ratas (11,17%) presentaron metástasis locales y a distancia. En la mayoría de los casos se situaban en los ganglios regionales, epiplon, cápsula de Glisson hepática y diafragma, por este orden.

6. 2. 7. Tumores colorrectales que asientan sobre placas linfoides

En este caso se consideró si las lesiones tumorales tanto benignas como malignas asentaban sobre placas linfoides o no, valorando la posibilidad de que estas fueran precursoras de las mismas. Un total de 37 lesiones asentaron sobre placas linfoides o estaban

en relación a ellas, en 8 casos eran lesiones malignas y el resto (29), eran lesiones benignas.

IV. 6. 3. Variables histoquímicas con lectinas en microscopía óptica

6. 3. 1. Marcaje de la mucosa normal

- Marcaje con SBA:

Se estudió la mucosa normal de idéntica localización al tumor en 46 casos mediante la lectina SBA, de modo que 38 mostraron reactividad para dicha lectina (82,61%), estando ausente en 8 casos (17,39%) ([Figura 4-31](#)).

- Marcaje con GSA-II:

Se estudiaron un total de 39 muestras normales con la lectina GSA-II. Estando presente el marcaje en 36 casos (92,31%) y siendo negativo en 3 (7,69%) ([Figura 4-32](#)).

- Marcaje con PNA:

Se estudió la mucosa normal en 38 casos con la lectina PNA. Mostraron enlace de lectina 19 casos (50,00%) y ausencia de enlace otros 19 casos (50,00%) ([Figura 4-33](#)).

- Marcaje con UEA-I:

Se estudió la mucosa de muestras normales mediante la lectina UEA-I en 54 casos, de modo que 32 mostraron reactividad para dicha lectina (59,26%) y estando ausente en 22 casos (40,73%) ([Figura 4-34](#)).

6. 3. 2. Marcaje de la mucosa tumoral

Se han obtenido 2 principales patrones de reactividad con las distintas lectinas en los tumores colónicos de rata: a) marcaje de la mucina intraglandular y, b) marcaje de la superficie luminal del epitelio. Ocasionalmente, también se ha observado reactividad en las vacuolas de mucina presentes en algunas áreas de los tumores y un fino marcaje granular intracitoplasmático en la zona supranuclear.

- Marcaje con SBA:

Se estudiaron un total de 60 neoplasias colónicas con la lectina SBA. En 29 casos se observaron enlaces de lectina en todo el tumor (48,33%), en 21 casos se limitaba a algunas áreas (35,00%), no observándose en 10 casos (16,67%) ([Figura 4-31](#)).

- Marcaje con GSA-II:

Se estudiaron un total de 55 tumores con la lectina GSA-II, de los que 16 presentaron marcaje de todo el tumor (29,09%), áreas de marcaje en 27 casos (49,09%) y ausencia de marcaje en 12 casos (21,82%) ([Figura 4-32](#)).

- Marcaje con PNA:

Se estudió el marcaje con la lectina PNA en 43 tumores colorrectales, presentando 19 de ellos enlaces de lectina en todo el tumor (44,19%), áreas de marcaje en 13 casos (30,23%) y ausencia de enlace en 11 tumores (25,58%) ([Figura 4-33](#)).

- Marcaje con UEA-I:

En 60 tumores colorrectales se probó el enlace de lectina UEA-I, resultando en un enlace completo 28 tumores (46,67%), en áreas en 21 casos (35,00%) y ausencia de enlace en 11 casos (18,33%) ([Figura 4-34](#)).

6. 3. 3. Marcaje de la mucosa transicional

- Marcaje con SBA:

Se estudió la MT de 43 tumores mediante la lectina SBA, de modo que 36 mostraron reactividad para dicha lectina (83,72%), estando ausente en 7 casos (16,27%) ([figura 4-31](#)).

- *Marcaje con GSA-II:*

Se estudiaron 47 casos de MT con la lectina GSA-II, estando el marcaje presente en 38 casos (80,85%) y negativo en 9 (19,15%) ([figura 4-32](#))

- *Marcaje con PNA:*

Se estudió la MT de 34 tumores con la lectina PNA. Mostraron enlace de lectina 19 casos (55,88%) y ausencia de enlace 15 casos (44,12%) ([figura 4-33](#)).

- *Marcaje con UEA-I:*

Se pudo estudiar la MT de 46 tumores mediante la lectina UEA-I, de modo que 21 mostraron reactividad para dicha lectina (45,65%) y estando ausente en 25 casos (54,35%) ([figura 4-34](#)).

IV. 6. 4. Variables histoquímicas con lectinas en microscopía electrónica

6. 4. 1. Marcaje de la mucosa macroscópicamente normal en etapas pre y neoplásicas

Se estudió la mucosa normal de las ratas exclusivamente en el grupo C, los resultados se describen previamente en el apartado 3. 5. 1.

6. 4. 2. Marcaje de las lesiones tumorales con lectinas en microscopía electrónica

Exclusivamente se marcaron con lectinas para MES los tumores del grupo C, los resultados se han recogido previamente en el apartado 3. 5. 2.

IV. 6. 5. Tinción de la mucosa tumoral con técnicas histoquímicas convencionales (tinción de AB-PAS)

Se estudiaron mediante la tinción AB-PAS 43 tumores colorrectales, de los cuales 8 fueron AB, 2 PAS, 11 AB-PAS, 5 PAS/AB, y 17 no se tiñeron.

IV. 6. 6. Citometría de flujo

Se estudiaron por citometría de flujo todos los tumores obtenidos por inyección con DMH, sólo se consideraron adecuados para el estudio 32 histogramas tumorales, según los criterios expuestos en material y método (apartado III. 6. 2. 5.).

Se realizaron pruebas estadísticas de independencia de χ^2 para comprobar que los tumores aptos para el estudio por citometría de flujo eran representativos. No se observaron diferencias significativas con respecto a ninguna variable del estudio.

Se decidió no considerar el canal medio de los picos correspondientes a las distintas fases del ciclo celular de los histogramas por su alto coeficiente de variación entre los grupos de estudio, no considerándose sin embargo, este error debido a mala técnica, puesto que éste se mantenía en los diversos animales de un mismo grupo.

Las medias de las fases del ciclo celular e índice de proliferación de los tumores de intestino grueso han sido expuestas previamente en el apartado 2. 5. 2. de este capítulo.

IV. B. Estudio estadístico

IV. B. 1. Variables tumorales

IV. 1. 1. Comparación de las variables clínicas y el resto de variables

Con la prueba de χ^2 se ha estudiado la relación de las variables clínicas entre sí: sexo, localización, aspecto macroscópico y tamaño tumoral, y entre éstas y las variables anatomopatológicas: tipo histológico, diferenciación, Dukes, asociación a placa, presencia de tumores sincrónicos de intestino grueso y delgado y metástasis, así como entre las variables histoquímicas con lectinas. Mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis se han comparado estos parámetros y las medias de las variables que recogen las fases del ciclo celular y el índice de proliferación.

1. 1. 1. Sexo

Se ha estudiado la asociación entre el sexo de los animales y el resto de variables de estudio (Tabla 4-15).

| Variable | Categorías | SEXO | | Significación (p) |
|---------------------|----------------|-------|--------|---------------------|
| | | Macho | Hembra | |
| Localización | Ciego | 12 | 13 | 0,08419 |
| | C. Ascendente | 21 | 26 | $\chi^2 = 6,64314$ |
| | C. Transverso | 19 | 22 | |
| | C. Descendente | 26 | 11 | |
| Macroscopía | T.P. | 10 | 10 | 0,42495 |
| | T.S. | 7 | 10 | $\chi^2 = 2,79119$ |
| | T.E. | 26 | 16 | |
| | T.U. | 9 | 5 | |
| Tamaño | ≤ 0.8 | 49 | 42 | 0,79764 |
| | > 0.8 | 19 | 18 | $\chi^2 = 0,06575$ |
| Tipo histológico | Tumor | 52 | 41 | 0,22035 |
| | Lesión benigna | 26 | 31 | $\chi^2 = 1,50208$ |
| Diferenciación | Moderado | 26 | 11 | 0,44531 |
| | Pobre | 5 | 4 | $\chi^2 = 0,71327$ |
| Dukes | A | 16 | 12 | 0,51946 |
| | B | 19 | 11 | $\chi^2 = 1,30994$ |
| | C | 12 | 13 | |
| Placa | si | 16 | 21 | 0,21931 |
| | no | 62 | 51 | $\chi^2 = 1,50889$ |
| Tumores sincrónicos | si | 64 | 49 | 0,04696 |
| | no | 14 | 23 | $\chi^2 = 3,94665$ |
| Tumores I. Delgado | si | 45 | 17 | 0,0002 |
| | no | 33 | 55 | $\chi^2 = 17,93386$ |

| | | | | |
|------------------|-------|---------|---------|--------------------|
| Metástasis | si | 32 | 22 | 0,18198 |
| | no | 46 | 50 | $\chi^2 = 1,78137$ |
| SBA | Todo | 15 | 14 | 0,318466 |
| | Áreas | 15 | 6 | $\chi^2 = 2,28853$ |
| | No | 5 | 5 | |
| GSA-II | Todo | 7 | 9 | 0,06337 |
| | Áreas | 20 | 7 | $\chi^2 = 5,51761$ |
| | No | 5 | 7 | |
| PNA | Todo | 10 | 9 | 0,55270 |
| | Áreas | 8 | 5 | $\chi^2 = 1,18590$ |
| | No | 8 | 3 | |
| UEA-I | Todo | 15 | 13 | 0,81978 |
| | Áreas | 12 | 9 | $\chi^2 = 0,39744$ |
| | No | 5 | 6 | |
| % células G0G1 | | m=15,81 | m=17,39 | 0,6348 |
| % Células G2M | | m=17,17 | m=15,64 | 0,6484 |
| % Células S | | m=16,92 | m=15,96 | 0,7757 |
| I. Proliferación | | m=17,19 | m=16,94 | 0,6348 |

Tabla 4-15

Comparación entre el sexo y las otras variables.

3. 3. 3. 3. Comparación entre el sexo y el resto de variables clínicas:

* Comparación entre el sexo y la localización de las lesiones colónicas: Dentro de las lesiones que asientan en el ciego, un 48% correspondían a machos y un 52% a hembras. De los que asientan en colon ascendente, 44,68% eran machos y 55,32% hembras. De los de colon transversal, 46,34% machos y 53,66% hembras y los de colon descendente 70,27% machos y 27,73% hembras. No hay diferencia significativa ($p=0,0841$) entre el porcentaje de machos y hembras y las 4 localizaciones colónicas.

* Comparación entre el sexo y el aspecto macroscópico: El aspecto macroscópico de las lesiones no guarda relación con el sexo de los animales ($p=0,42495$).

* Comparación entre el sexo y el tamaño tumoral: El porcentaje de machos con tumores pequeños (72,06%) y grandes (27,94%) no difiere significativamente ($p=0,79764$) del de hembras con pequeños (70%) o grandes tumores (30%).

3. 3. 3. 2. Comparación entre el sexo y las variables anatomopatológicas:

Dentro de las lesiones neoplásicas, un 55,91% se daban en ratas macho y un 44,09% en hembras, y dentro de las lesiones benignas un 45,61% en ratas macho y un 54,39% en hembras. La distribución de sexos no es significativamente diferente entre los tipos histológicos de las lesiones colorrectales ($p=0,22035$).

Tampoco se encuentra diferencia estadística significativa ($p=0,44531$) entre el porcentaje de machos (70,27%) y hembras (29,73%) con adenocarcinomas moderadamente