

diferenciados, y machos (55,56%) y hembras (44,44%) con adenocarcinomas pobremente diferenciados.

No hay diferencia significativa ( $p=0,34606$ ) entre el porcentaje de machos y hembras en estadio de Dukes A (57,14% vs 42,85%), estadio B (63,33% vs 36,67%) y C (43,48% vs 56,52%).

Tampoco se ha encontrado relación entre la asociación o no a placa linfoide y el sexo de las ratas ( $p=0,21931$ ).

Se observaron lesiones metastásicas en el 83,87% de los tumores en ratas machos y en el 73,33% de los tumores en ratas hembras. La distribución de sexos no es significativamente diferente entre la asociación de las lesiones colorrectales a metástasis ( $p=0,39836$ ).

Las ratas macho presentan otros tumores sincrónicos colorrectales en mayor proporción (82,05%) que la ratas hembras (68,05%), mostrando una diferencia significativa ( $p=0,04696$ ). El porcentaje de tumores sincrónicos de intestino delgado es superior en las ratas macho que en las hembras ( $p=0,00002$ ).

### 3. 3. 3. 3. Comparación entre el sexo y las variables histoquímicas:

La distribución de sexos no es significativamente diferente para la reactividad a las distintas lectinas, tal como se muestra en la [Tabla 4-10](#).

### 3. 3. 3. 4. Comparación entre el sexo y el resultado por citometría de flujo:

Los estudios de comparación de medias entre ratas macho y hembra en cuanto al porcentaje de células en fase  $G_0G_1$  ( $p=0,6348$ ), fase  $G_2M$  ( $p=0,6484$ ), fase S ( $p=0,7757$ ) e índice de proliferación ( $p=0,6348$ ) no muestran diferencias significativas.

## 1. 1. 2. Localización

Variable	Categorías	Ciego	LOCALIZACIÓN			Significación(p)
			CA	C:T:	C. D.	
Macroscopía	T. P.	1	12	3	4	0,41797 $\chi^2 = 9,21170$
	T.S.	1	6	6	4	
	T.E.	4	11	14	13	
	T.U.	4	4	13	2	
Tamaño	$\leq 0.8$	13	31	23	24	0,99542
	$> 0.8$	5	12	10	10	$\chi^2 = 0,06760$
Tipo histológico	Tumor	8	36	26	23	0,00314
	L. benigna	17	11	15	14	$\chi^2 = 13,83519$
	Adenocarci.	1	18	9	18	0,00191
	Mucinoso	7	12	14	4	$\chi^2 = 14,89528$
Diferenciación	Moderado		15	6	16	
	Pobre	1	3	3	2	
Dukes	A	1	12	7	8	0,22093
	B	2	9	8	11	$\chi^2 = 8,24169$

	C	5	9	8	3	
Placa	si	7	11	8	11	0,73236
	no	18	36	33	26	$\chi^2 = 1,28643$
Tumores sincrónicos	si	21	30	30	32	0,07391
	no	4	17	11	5	$\chi^2 = 6,93762$
Tumores I. Delgado	si	8	17	14	23	0,03054
	no	17	30	27	14	$\chi^2 = 8,90785$
Metástasis *	si	6	11	13	10	0,20320
	no	2	19	10	12	$\chi^2 = 4,60404$
SBA	Todo	2	10	10	7	
	Áreas	7	3	6	5	
	No		6	1	3	
GSA-II	Todo	1	6	4	5	0,22028
	Áreas	2	5	10	10	$\chi^2 = 8,25222$
	No	4	3	2	3	
PNA	Todo	2	6	8	3	
	Áreas		4	3	6	
	No	2	3	3	3	
UEA-I	Todo	4	8	13	3	0,14777
	Áreas	3	5	5	8	$\chi^2 = 9,49144$
	No	1	6	2	2	
% células G0G 1		m=8,25	m=24,33	m=12,09	m=12,36	0,0033
% células G2M		m=23,50	m=10,5	m=18,23	m=21,93	0,0349
% células S		m=22,00	m=10,83	m=20,05	m=17,07	0,0667
I. Proliferación		m=24,75	m=8,67	m=20,91	m=20,64	0,0033

\* exclusivamente para adenocarcinomas y carcinomas mucinosos.

#### Tabla 4-16

Comparación entre la localización y el resto de variables.

##### 3. 3. 2. 3. Comparación entre la localización y el resto de variables clínicas:

\* Comparación entre la localización y la macroscopía tumoral: La localización tumoral no se relaciona con el aspecto macroscópico tumoral ( $p=0,41797$ ).

\* Comparación entre la localización y el tamaño tumoral: No se ha encontrado relación entre la localización tumoral y el tamaño de dichos tumores ( $p=0,99542$ ).

##### 3. 3. 2. 2. Comparación entre la localización y las variables anatomopatológicas:

Las lesiones neoplásicas se localizaron en el ciego en un 8,60%, en el colon

ascendente en 38,71%, en el colon transverso en un 27,96% y en el colon descendente en un 24,73%, mientras que las lesiones benignas se localizaban en el ciego en un 29,82%, en el colon ascendente en un 19,30%, en el colon transverso en el 26,32% y en el colon descendente en el 24,56%. Se observó una diferencia significativa entre la localización y los tipos histológicos benignos y malignos ( $p=0,00314$ ).

La localización tumoral no se relaciona con la clasificación de Dukes ( $p=0,22093$ ).

Tampoco se ha encontrado relación entre la asociación o no a placa linfoide y la localización tumoral ( $p=0,73236$ ).

observa una relación entre la localización y la aparición de metástasis ( $p=0,20320$ ).

### 3. 3. 2. 3. Comparación entre la localización y las variables histoquímicas:

Todos los tumores situados en el ciego presentaron reactividad para la lectina SBA. En el colon ascendente un 52,63% mostraron reactividad en todo el tumor, 15,79% sólo en áreas y 31,58% ausencia. En el colon transverso 58,82% en todo el tumor, 35,30% sólo en áreas y 5,88% ausencia y en el colon descendente 46,67% en todo el tumor, 33,33% sólo en áreas y 20% ausencia.

No se observaron diferencias significativas entre las localizaciones tumorales y la reactividad para la lectina GSA-II ( $p=0,22028$ ) ni para la lectina UEA-I ( $p=0,14777$ ).

En el ciego mostraron marcaje de PNA 2 tumores (50,00%) y ausencia otros 2, en el colon ascendente 10 tuvieron marcaje (76,92%) y 3 ausencia (23,08%), en el colon transverso 11 presentaron marcaje (78,57%) y 3 ausencia (21,43%), y a nivel del colon descendente 9 mostraron marcaje (75%) y 3 ausencia (25,00%), no mostrando diferencias significativas ( $p=0,69977$ ).

### 3. 3. 2. 4. Comparación entre el resultado por citometría de flujo y la localización del tumor:

Los tumores estudiados se localizaban 2 en ciego (6,25%), 12 en colon ascendente (37,50%), 11 en colon transverso (34,38%) y 7 en colon descendente (21,87%). Los estudios de comparación de medias entre las cuatro localizaciones colónicas y el porcentaje de células en fase  $G_0G_1$  ( $p=0,0033$ ), porcentaje de fase  $G_2M$  ( $p=0,0349$ ) e índice de proliferación ( $p=0,0033$ ) muestran diferencias significativas. El porcentaje de células en fase S no muestra diferencias significativas ( $p=0,0667$ ).

## 1. 1. 3. Aspecto macroscópico

Variable	Categorías	MACROSCOPIA				Significación (p)
		T.P.	T.S.	T.E.	T.U.	
Tamaño	$\leq 0.8$	16	15	24	4	0,00188 $\chi^2 = 14,92806$
	$> 0.8$	4	2	18	10	
Diferenciación	Moderado	7	8	18	4	0,95533 $\chi^2 = 0,32462$
	Pobre	1	2	5	1	
Dukes	A	4	7	13	4	0,63384 $\chi^2 = 4,31715$
	B	5	6	16	3	
	C	3	3	12	7	
Placa	si	2	3	3		
	no	18	14	39	14	

Tumores sincrónicos	si	15	11	32	10	0,87012
	no	5	6	10	4	$\chi^2 = 0,87012$
Tumores I. Delgado	si	10	8	22	7	0,98617
	no	10	9	20	7	$\chi^2 = 0,14333$
Metástasis	si	5	8	21	6	0,91098
	no	7	8	20	8	$\chi^2 = 0,53570$
SBA	Todo	6	6	10	3	0,66752
	Áreas	2	2	8	5	$\chi^2 = 4,06765$
	No	2	2	2	2	
GSA-II	Todo	4	2	6	4	0,50663
	Áreas	2	5	15	4	$\chi^2 = 5,29455$
	No	2	2	2	1	
PNA	Todo	4	2	8	3	
	Áreas	1	5	6	1	
	No	3		5		
UEA-I	Todo	5	5	10	7	
	Áreas	4	4	8	3	
	No	2	2	3		
% células G0G 1		m=24,50	m=16,00	m=17,15	m=12,57	0,4255
% células G2M		M=10,00	m=10,5	m=18,17	m=16,83	0,7811
% células S		m=8,00	m=13,17	m=15,65	m=22,79	0,1491
I. Proliferación		m=8,50	m=17,00	m=15,85	m=20,43	0,4255

**Tabla 4-17**

Comparación entre el aspecto macroscópico tumoral y el resto de variables.

*3. 3. 3. 3. Comparación entre el aspecto macroscópico y el tamaño tumoral:*

Los tumores ulcerados son en su mayoría de gran tamaño, y los tumores sesiles y pedunculados de pequeño, siendo estas diferencias significativas ( $p=0,00188$ ).

*3. 3. 3. 2. Comparación entre el aspecto macroscópico y las variables anatómo-patológicas:*

No se observa relación significativamente estadística entre el aspecto macroscópico y las variables anatómo-patológicas estudiadas.

*3. 3. 3. 3. Comparación entre el aspecto macroscópico y las variables histoquímicas:*

La reactividad de las lectinas estudiadas no muestra diferencias según el tipo macroscópico.

*3. 3. 3. 4. Comparación entre el aspecto macroscópico y el resultado por citometría de flujo:*

Los valores de las distintas fases del ciclo celular no se asocian al tipo macroscópico tumoral.

#### 1. 1. 4. Tamaño tumoral

Variable	Categorías	TAMAÑO TUMORAL		Significación (p)
		≤ 0,8	> 0,8	
Tipo histológico	Tumor	59	34	0,00185 $\chi^2 = 9,69288$
	Lesión benigna	32	3	
Diferenciación	Moderado	27	10	0,69754 $\chi^2 = 0,14200$
	Pobre	6	3	
Dukes	A	20	8	0,00256 $\chi^2 = 11,93294$
	B	22	8	
	C	8	17	
Placa	si	25	5	0,09101 $\chi^2 = 2,85638$
	no	66	32	

Tumores sincrónicos	si	69	27	0,73558
	no	22	10	$\chi^2 = 0,11405$
Tumores I. Delgado	si	48	14	0,12599
	no	43	23	$\chi^2 = 2,34120$
Metástasis	si	33	20	0,06396
	no	58	17	$\chi^2 = 3,43149$
SBA	Todo	19	10	0,53750
	Áreas	11	10	$\chi^2 = 1,24166$
	No	7	3	
GSA-II	Todo	9	7	0,90194
	Áreas	17	10	$\chi^2 = 0,20640$
	No	7	5	
PNA	Todo	11	8	0,88892
	Áreas	7	6	$\chi^2 = 0,23550$
	No	7	4	
UEA-I	Todo	17	11	0,26363
	Áreas	11	10	$\chi^2 = 2,66638$
	No	9	2	
% células G0GI		m=18,06	m=14,73	0,3169
% Células G2M		m=15,41	m=17,73	0,4846
% Células S		m=15,56	m=17,57	0,5456
I. Proliferación		m=14,94	m=18,27	0,3169

**Tabla 4-18**

Comparación entre el tamaño tumoral y las otras variables.

*3. 3. 4. 3. Comparación entre el tamaño tumoral y las variables anatomopatológicas:*

Las lesiones benignas tenían un menor tamaño que las malignas, siendo estas diferencias significativas ( $p=0,00185$ ).

El grado de diferenciación tumoral no se asocia significativamente con el tamaño tumoral ( $p=0,69754$ ).

El tamaño tumoral se asocia con el estadio de Dukes ( $p=0,00256$ ); los tumores en estadio C de Dukes son en un 68% de tamaño superior a 0,8 cm.

La presencia de placa linfóide no se relaciona con un tamaño superior ( $p=0,09101$ ).

La presencia de otros tumores sincrónicos en colon no se asocia con el tamaño tumoral ( $p=0,73558$ ), tampoco la presencia de lesiones metastásicas ( $p=0,06396$ ).

*3. 3. 4. 2. Comparación entre el tamaño tumoral y las variables histoquímicas:*

La reactividad de cada una de las lectinas estudiadas no muestra relación con el tamaño tumoral.

3. 3. 4. 3. *Comparación entre el tamaño tumoral y el resultado por citometría de flujo:*

Los valores de las distintas fases del ciclo celular no se asocian a pequeños o grandes tamaños de los tumores.

**IV. 1. 2. Comparación de las variables anatómo-patológicas y el resto de variables**

1. 2. 1. Comparación de las variables anatómo-patológicas entre sí

Mediante la prueba de  $\chi^2$  se ha estudiado la relación entre sí de las variables: tipo histológico, grado de diferenciación, estadio de Dukes, presencia de metástasis, presencia de otros tumores sincrónicos colorrectales, presencia de tumores en intestino delgado y asociación a placa linfoide.

Variable	Categorías	TIPO HISTOLÓGICO		Significación (p)
		Adenocarcinoma	C. mucinoso	
Dukes	A	20	8	0,01285 $\chi^2 = 8,76936$
	B	18	12	
	C	8	17	
Placa	si	4	3	1,00000 $\chi^2 = 0,00917$
	no	42	34	
Tumores sincrónicos	si	33	26	0,88336 $\chi^2 = 0,02152$
	no	13	11	
Tumores I. Delgado	si	25	16	0,31452

	no	21	21	$\chi^2 = 1,01160$
Metástasis	si	19	21	0,16139
	no	27	16	$\chi^2 = 1,96111$
SBA	Todo	10	10	0,94601
	Áreas	9	8	$\chi^2 = 0,11100$
	No	4	3	
GSA-II	Todo	5	8	0,38959
	Áreas	16	10	$\chi^2 = 1,88530$
	No	3	3	
PNA	Todo	7	8	0,11059
	Áreas	11	2	$\chi^2 = 4,40389$
	No	4	2	
UEA-I	Todo	12	14	
	Áreas	9	10	
	No	5		
Tinción AB-PAS	AB	1	6	0,005378
	AB-PAS	4	5	$\chi^2 = 7,65177$
	AB/PAS	2	3	
	Ausencia	10	3	
% células G0G1		m=18,76	m=13,19	0,0989
% Células G2M		m=14,95	m=18,77	0,2575
% Células S		m=15,47	m=18,00	0,4542
I. Proliferación		m=14,24	m=19,81	0,0989

**Tabla 4-19**

Comparación entre el tipo histológico y el resto de variables.

En estadio Dukes A se observaron 20 adenocarcinomas (71,43%) y 8 carcinomas mucinosos (28,57%), en estadio B se observaron 18 adenocarcinomas (60%) y 12 mucinosos (30%) y en estadio C se observaron 8 adenocarcinomas (32%) y 17 mucinosos (68%). La distribución del estadio tumoral (Dukes) es significativamente diferente dentro de los tipos histológicos de malignidad de los tumores colorrectales de rata ( $p=0,01285$ ). Los carcinomas mucinosos tienden a diagnosticarse en estadio C de Dukes (Tabla 4-19).

Sin embargo, 19 adenocarcinomas (41,30%) presentaron metástasis y 27 no (58,70%), mientras que 21 carcinomas mucinosos (56,76%) las presentaron y 16 no presentaron (43,24%). La presencia de metástasis no es significativamente diferente dentro de los tipos histológicos de malignidad de los tumores colorrectales ( $p=0,16139$ ).

El tipo histológico no se asocia significativamente a la presencia o no de placas linfoides ( $p=1,0000$ ).



Variable	Categorías	DIFERENCIACIÓN		Significación (p)
		Moderado	Pobre	
Dukes	A	18	2	0,05060 $\chi^2 = 5,96757$
	B	15	3	
	C	3	4	
Placa	si	4		
	no	33	9	
Tumores sincrónicos	si	29	4	0,09217 $\chi^2 = 4,11162$
	no	8	5	
Tumores I. Delgado	si	23	2	0,05902 $\chi^2 = 4,65433$
	no	14	7	
Metástasis	si	14	5	0,45563 $\chi^2 = 0,93735$
	no	23	4	
SBA	si	16	3	1,00000 $\chi^2 = 0,19512$
	no	3	1	
GSA-II	si	20	1	0,23913 $\chi^2 = 2,80519$
	no	2	1	
PNA	si	17	1	
	no	4		
UEA-I	si	17	4	1,00000 $\chi^2 = 0,00236$
	no	4	1	
% células G0G 1		m=10,07	m=9,75	0,9203
% Células G2M		m=9,70	m=11,13	0,6526
% Células S		m=10,13	m=9,50	0,8414
I. Proliferación		m=9,93	m=10,25	0,9203

**Tabla 4-20**

Comparación entre la diferenciación celular y el resto de variables.

No existe asociación entre el tipo histológico y la presencia o ausencia de otros tumores colorrectales ( $p=0,88336$ ), ni de otros tumores sincrónicos de intestino delgado ( $p=0,31452$ ).

Dieciocho tumores colorrectales moderadamente diferenciados se encontraban en estadio A de Dukes (48,65%), 15 en estadio B (40,54%) y 4 en estadio C (10,81%); mientras que 2 tumores colorrectales poco diferenciados se encontraban en estadio A de Dukes (22,22%), 3 en estadio B (33,33%) y 4 en estadio C (44,45%). Si bien se observa una tendencia de los carcinomas poco diferenciados a presentar estadios de Dukes más avanzados, no existe diferencia significativa ( $p=0,05060$ ) (Tabla 4-20).

Ningún adenocarcinoma pobremente diferenciado se asoció a la presencia de placa linfoide.

Variable	Categorías	DUKES			Significación (p)
		Dukes A	Dukes B	Dukes C	
Placa	si	3	4		
	no	25	26	25	
Tumores sincrónicos	si	17	25	17	0,15179
	no	11	5	8	$\chi^2 = 3,77048$
Tumores I. Delgado	si	13	16	12	0,85891
	no	15	14	13	$\chi^2 = 0,30419$
SBA	Todo	7	8	5	0,83697
	Áreas	3	9	5	$\chi^2 = 1,44140$
	No	2	3	2	
GSA-II	Todo	3	6	4	0,98874
	Áreas	9	12	5	$\chi^2 = 1,46968$
	No	1	3	2	
PNA	Todo	7	4	4	0,26495
	Áreas	3	9	1	$\chi^2 = 5,22532$
	No	2	3	1	
UEA-1	Todo	6	11	9	
	Áreas	3	10	6	
	No	2		3	
% células G0G1		m=17,79	m=17,58	m=14,46	0,6339
% células G2M		m=15,57	m=15,42	m=18,13	0,7491
% células S		m=15,75	m=16,50	m=17,38	0,9076
I. Proliferación		m=15,21	m=15,42	m=18,54	0,6339

**Tabla 4-21**

Comparación entre la clasificación de Dukes y el resto de variables.

No se aprecian diferencias significativas entre el grado de diferenciación celular y la presencia de otros tumores sincrónicos de intestino grueso ( $p=0,09217$ ), ni en la presencia de otros tumores de intestino delgado, aunque los tumores moderadamente diferenciados se asocian con mayor frecuencia a tumores sincrónicos de intestino delgado.

El grado de diferenciación moderado o pobre no se asocia significativamente con la presencia o ausencia de metástasis a distancia ( $p=0,45563$ ).

Ningún tumor en estadio C de Dukes estaba asociado a placa linfoide.

Los distintos estadios de Dukes no se asocian a la presencia o ausencia de otros tumores colorrectales ( $p=0,15179$ ), ni a la de tumores sincrónicos de intestino delgado

(p=0,85891).

### 1. 2. 2. Comparación de las variables anatomopatológicas e histoquímicas

Se ha empleado la prueba de  $\chi^2$  para comparar las variables anatomopatológicas, tipo histológico, grado de diferenciación y estadio de Dukes, con las variables cuantitativas resultado del enlace con lectinas en microscopía óptica y tinción con PAS-AB.

### 3. 2. 2. 3. Comparación entre el tipo histológico y el marcaje con lectinas:

(Tabla 4-19)

El 43,47% de los adenocarcinomas muestran enlace de SBA en todo el tumor, el 39,13% sólo en áreas y el 17,39% no muestra enlace, mientras que el 47,62% de los carcinomas mucinosos muestran marcaje de esta lectina en todo el tumor, el 38,09% sólo en áreas y el 14,29% no. La proporción de tumores con enlace de SBA no difiere significativamente según el tipo histológico tumoral (p=0,94601).

El 20,83% de los adenocarcinomas muestran enlace de GSA-II en todo el tumor, el 66,67% sólo en áreas y el 12,5% no muestra enlace, mientras que el 38,09% de los carcinomas mucinosos muestran marcaje de esta lectina en todo el tumor, el 47,62% sólo en áreas y el 14,29% no. La proporción de tumores con enlace de GSA-II no difiere significativamente según el tipo histológico tumoral (p=0,38959).

El 31,82% de los adenocarcinomas muestran enlace de PNA en todo el tumor, el 50,00% sólo en áreas y el 18,18% no muestra enlace, mientras que el 66,66% de los carcinomas mucinosos muestran marcaje de esta lectina en todo el tumor, el 16,67% sólo en áreas y el 16,67% no. La proporción de tumores con enlace de PNA no difiere significativamente según el tipo histológico tumoral (p=0,11059).

El 31,82% de los adenocarcinomas muestran enlace de UEA-I en todo el tumor, el 50% sólo en áreas y el 18,18% no muestra enlace, mientras que todos los carcinomas mucinosos muestran marcaje con esta lectina, un 58,33% en todo el tumor y un 41,67% sólo en áreas.

### 3. 2. 2. 2. Comparación entre el grado de diferenciación tumoral y el marcaje con lectinas:

(Tabla 4-20)

Nueve adenocarcinomas moderadamente diferenciados (47,37%) mostraron enlace de SBA en todo el tumor, 7 (36,84%) sólo en áreas y 3 (15,79%) mostraron ausencia, mientras que los adenocarcinomas poco diferenciados mostraron enlace en 1 caso (25%) en todo el tumor, 2 en áreas (50%) y 1 (25%) ausencia. No se observaron diferencias significativas (p=0,70905) entre el grado de diferenciación tumoral y el enlace con SBA.

Veinte adenocarcinomas moderadamente diferenciados (90,90%) presentaron marcaje con GSA-II y sólo 2 ausencia de marcaje (9,10%), mientras que de los adenocarcinomas pobremente diferenciados 1 mostró enlace y el otro no (50%), no existiendo diferencias significativas entre el grado de diferenciación celular y el enlace con GSA-II (p=0,23913).

Sólo pudo estudiarse un tumor poco diferenciado con la lectina PNA, mostrando marcaje en todas las áreas. Los tumores moderadamente diferenciados mostraron enlace en todo el tumor en 6 casos (28,57%), en áreas en 11 (52,38%) y ausencia en 4 casos (19,05%).

Presentaron marcaje con UEA-I en todo el tumor 9 adenocarcinomas moderadamente diferenciados, 8 sólo en áreas y 4 ausencia, de los adenocarcinomas pobremente diferenciados 3 mostraron marcaje en todo el tumor, 1 en áreas y 1 ausencia. La proporción de tumores con enlace de UEA-I no difiere significativamente según la diferenciación tumoral (p=1,00000).

### 3. 2. 2. 3. Comparación entre el estadio de Dukes y el marcaje con lectinas:

([Tabla 4-19](#)).

Presentaron enlace con SBA en todo el tumor 7 tumores en Dukes A (58,33%), 3 en áreas (25%), y 2 ausencia (16,67%); los tumores en estadio B presentaron enlace en todo el tumor en 8 casos (40%), en 9 en áreas (45%), y ausencia en 3 casos (15%); y en estadio C, 5 mostraron enlace en todo el tumor (41,67%), 5 en áreas (41,67%) y 2 ausencia (16,66%). No se observaron diferencias significativas entre el enlace con SBA y el estadio de Dukes ( $p=0,83697$ ).

Se observó enlace de GSA-II en todo el tumor en 3 tumores en Dukes A (23,08%), 9 en áreas (69,23%), y ausencia en 1 caso (7,69%). En los tumores con estadio B de Dukes se observó marcaje en todo el tumor en 6 casos (28,57%), en áreas en 12 ocasiones (57,14%), y ausencia en 3 casos (14,29%); en los tumores con estadio C de Dukes se observó enlace en todo el tumor en 4 casos (36,36%), en áreas en 5 casos (45,46%) y ausencia en 2 casos (18,18%). La proporción de tumores con enlace de GSA-II no difiere significativamente según el estadio de Dukes ( $p=0,98874$ ).

De los tumores en estadio A de Dukes presentaron enlace de PNA en todo el tumor 7 casos (58,33%), en 3 en áreas (25,00%) y ausencia en 2 (16,67%); los tumores Dukes B presentaron enlace en todo el tumor en 4 casos (25,00%), en áreas en 9 (56,25%), y ausencia en 3 (18,75%); en estadio Dukes C se observaron 4 tumores con marcaje en todo el tumor (66,66%), en áreas 1 (16,67%) y ausencia en 1 (16,67%). No existen diferencias significativas entre el enlace con PNA y el estadio de Dukes ( $p=0,26495$ ).

Presentaron enlace con UEA-I en todo el tumor 6 neoplasias (54,54%) en Dukes A, 3 en áreas (27,28%) y 2 ausencia (18,18%). Todos los tumores en estadio B de Dukes presentaron enlace; en todo el tumor 11 casos (52,38%) y en áreas en 10 (47,62%). En estadio C, 9 mostraron enlace en todo el tumor (50,00%), 6 en áreas (33,33%) y 3 ausencia (16,67%).

#### 3. 2. 2. 4. *Comparación entre el tipo histológico y la tinción AB-PAS:*

Los adenocarcinomas presentaron en 1 caso tinción AB (5,88%), en 4 AB-PAS (23,53%), en 2 AB/PAS (11,77%) y en 10 ausencia (58,82%). Los carcinomas mucinosos presentaron en 6 casos tinción AB (35,29%), en 5 AB-PAS (29,41%), en 3 AB/PAS (17,65%) y en 3 ausencia (17,65%). Si bien se observa una mayor tendencia de los tumores mucinosos a ser positivos para esta tinción, no se observan diferencias significativas ( $p=0,05378$ ).

#### 1. 2. 3. *Comparación entre las variables anatomopatológicas y el resultado por citometría de flujo*

Mediante la prueba de independencia de Kruskal-Wallis se ha analizado la relación entre las variables anatomopatológicas tipo histológico, grado de diferenciación y estadio de Dukes y los resultados obtenidos por citometría de flujo.

#### 3. 2. 3. 3. *Comparación entre el tipo histológico y el resultado por citometría de flujo:*

El estudio de las medias de las fases del ciclo celular e índice de proliferación no se asocian al tipo histológico ([Tabla 4-19](#)).

#### 3. 2. 3. 2. *Comparación entre el grado de diferenciación y el resultado por citometría de flujo:*

El grado de diferenciación celular no muestra relación con el resultado por citometría de flujo ([Tabla 4-20](#)).

### 3. 2. 3. 2. *Comparación entre el estadio de Dukes y el resultado por citometría de flujo:*

El estudio de las medias de las fases del ciclo celular e índice de proliferación no se relaciona con el estadio de Dukes ([Tabla 4-21](#)).

#### **IV. 1. 3. Comparación de las variables histoquímicas y el resto de variables**

En el estudio estadístico realizado previamente (apartados IV. 1. 1 y 1. 2. 2. de este capítulo) se ha demostrado que no existe relación entre las variables histoquímicas y el resto de variables del estudio.

#### **IV. 1. 4. Comparación del resultado del análisis por citometría de flujo con el resto de variables**

En el análisis estadístico previo se ha demostrado que existen diferencias significativas entre las fases del ciclo celular e índice de proliferación según la localización tumoral.

##### 1. 4. 1. Comparación entre las semanas de tratamiento y el resultado por citometría de flujo

Mediante el estudio del coeficiente de correlación lineal se ha estudiado la asociación entre los valores de citometría de flujo y las semanas de inducción tumoral.

No se ha mostrado correlación lineal significativa entre las semanas de tratamiento y ninguna de las variables cuantitativas resultado del estudio por citometría de flujo: porcentaje de células en fase  $G_0G_1$  ( $r=-0,02886$ ,  $p=0,7204$ ), porcentaje de células en fase  $G_2M$  ( $r=-0,02316$ ,  $p=0,5891$ ) y porcentaje de células en fase S ( $r=-0,03332$ ,  $p=0,9851$ ) e índice de proliferación ( $r=-0,02886$ ,  $p=0,7204$ ).

##### 1. 4. 2. Comparación entre el resultado por citometría de flujo y el resto de variables anatómo-patológicas

Los estudios de comparación de medias entre los tumores solitarios (6,25%) y los tumores sincrónicos (93,75%) del porcentaje de células en fase de  $G_0G_1$  ( $p=0,2428$ ), fase  $G_2M$  ( $p=0,0616$ ), fase S ( $p=0,8456$ ) e índice de proliferación ( $p=0,2428$ ) no muestran diferencias significativas.

Tampoco se observan diferencias significativas entre la presencia o ausencia de otros tumores sincrónicos de intestino delgado y el porcentaje de células en fase  $G_0G_1$  ( $p=0,7882$ ), fase  $G_2M$  ( $p=0,5519$ ), fase S ( $p=0,8030$ ) e índice de proliferación ( $p=0,7882$ ).

Estudios de comparación de medias entre la presencia (50%) o no de metástasis y el porcentaje de células en fase  $G_0G_1$  ( $p=0,1316$ ), fase  $G_2M$  ( $p=0,6108$ ), fase S ( $p=0,3178$ ), e índice de proliferación ( $p=0,1316$ ) no muestran diferencias significativas.

La presencia o ausencia de placa linfóide asociada no representa diferencias significativas en los valores, como media, del porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular ni del índice de proliferación.

## **IV. 2. Comparación entre los grupos**

### **IV. 2. 1. Variables clínicas**

#### 2. 1. 1. Sexo

La distribución tumoral por sexos no muestra diferencias en los tres grupos de estudio ( $p=0,18162$ ).

#### 2. 1. 2. Localización

En el grupo D no se observó ningún tumor a nivel del colon descendente-recto. Para el estudio entre grupos se agruparon las localizaciones en 2 categorías: proximal (ciego y colon ascendente) y distal (colon transversal y descendente).

Si consideramos los 3 grupos de estudio de inyección de DMH, se observan diferencias significativas en cuanto a la localización ( $p=0,00805$ ). Observándose un predominio de la localización proximal cuando se administran bajas dosis de DMH. No existen diferencias significativas entre los dos grupos tratados con dosis de 21 mg/kg/semana de DMH ( $p=0,35479$ ).

#### 2. 1. 3. Aspecto macroscópico

Se observaron diferencias entre los tres grupos inyectados con DMH y el aspecto macroscópico del tumor. En el grupo B inyectado con altas dosis de carcinógeno durante 20 semanas se observó una mayoría de tumores exofíticos, mientras que en los animales del grupo C era más frecuente el tipo polipoideo. De forma que existen diferencias significativas entre los grupos B y C ( $p=0,00536$ ), y no cuando se comparan los grupos tratados durante largos periodos de tiempo ( $p=0,17350$ ) o entre el grupo de ratas que recibieron dosis de 10 mg/kg/semana y el grupo inyectado durante menor tiempo ( $p=0,33267$ ).

#### 2. 1. 4. Tamaño tumoral

No se apreciaron diferencias significativas entre los 3 grupos con respecto al tamaño tumoral para las lesiones benignas y malignas ( $p=0,82634$ ).

### **IV. 2. 2. Variables anatomo-patológicas:**

#### 2. 2. 1. Tipo histológico

Clasificando todas las lesiones de los 3 grupos inyectados con DMH en dos categorías, benignas y malignas, existen diferencias significativas entre ellos ( $p=0,00001$ ). Comparando los grupos 2 a 2, observamos que no existen diferencias significativas ( $p=0,45869$ ) entre los grupos que recibieron DMH durante largos periodos de tiempo (20 semanas), mientras sí se observan entre el grupo de animales sacrificado en etapas preneoplásicas y los grupos inyectados durante 20 semanas ( $p=0,00000$  respecto al grupo B y  $0,03221$  respecto al D).

Sin embargo, no existen diferencias significativas entre los grupos y la presencia de tumores malignos adenocarcinomas y carcinomas mucinosos ( $p=0,22189$ ).

#### 2. 2. 2. Grado de diferenciación tumoral

Si comparamos los grupos B y D mediante la prueba exacta de Fisher observamos que no existen diferencias entre los dos grupos inyectados durante 20 semanas ( $p=0,16444$ ). En el grupo C no se observaron tumores pobremente diferenciados.

### 2. 2. 3. Estadio de Dukes

Si bien el grupo C mostró una mayoría de tumores en Dukes B, no existen diferencias significativas entre los grupos ( $p=0,05602$ ).

### 2. 2. 4. Presencia de tumores sincrónicos colorrectales

En total 56 lesiones del grupo B estaban asociadas a otros tumores colorrectales, 52 del grupo B y 5 del grupo C, mostrando diferencias significativas ( $p=0,00145$ ).

Las ratas que recibieron DMH a dosis de 10 mg/kg/semana mostraron menos tumores colorrectales por rata ( $p=0,00104$  respecto al grupo B y  $p=0,00080$  respecto al grupo C). No apreciándose diferencias significativas entre los dos grupos inyectados con dosis de 21 mg/kg/semana.

Variable	Categoría	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D	Significación
Sexo	Macho	39	35	4	0,18162
	Hembra	32	30	10	$\chi^2 = 9,64505$
Localización	Ciego	7	14	4	
	C. Ascendente	27	12	8	
	C. Transverso	18	21	2	
	C. Descendente	19	18		
	Proximal	34	26	12	0,00805
	Distal	37	39	2	$\chi^2 = 9,64505$
Macroscopía	P. pediculado	19	10	1	0,02181
	P. sesil	13	22	6	$\chi^2 = 14,80682$
	T. exofítico	27	11	5	
	T. ulcerado	10	2	2	
Tamaño *	$\leq 0,8$ cm	49	32	10	0,82634
	$> 0,8$ cm	22	11	4	$\chi^2 = 0,38150$
Tipo histológico	Adenocarcinoma	31	12	3	
	C. mucinoso	21	9	7	
	C. in situ	5	5		
	Adenoma	1			
	D. leve	1	8		
	D. moderada	8	24	4	
	D. severa	4	7		
	Lesión benigna	14	39	4	0,00001
	Lesión maligna	57	26	10	$\chi^2 = 23,95340$

Diferenciación	Moderado	24	12	1	
	Poco	7		2	
Dukes	A	18	5	5	0,05602
	B	15	13	2	$\chi^2 = 9,21162$
	C	19	3	3	
Placa	si	6	26	5	0,00007
	no	65	39	9	$\chi^2 = 19,19087$
Tumores sincrónicos	si	56	52	5	0,00145
	no	15	13	9	$\chi^2 = 13,06658$
Tumores I. Delgado	si	41	19	2	0,00033
	no	30	46	12	$\chi^2 = 16,03764$
SBA	si	23	19	8	0,38071
	no	7	2	1	$\chi^2 = 1,93143$
GSA-II	si	23	15	5	0,89793
	no	6	4	2	$\chi^2 = 0,21533$
PNA	si	16	12		
	no	2	9	4	
UEA-I	si	23	19	7	
	no	8	3		
* En algunas lesiones no se ha considerado el tamaño tumoral, puesto que asentaban sobre mucosa aparentemente normal.					

**Tabla 4-22**

Comparación entre los grupos inyectados con DMH (B, C y D) y el resto de variables.

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

Si consideramos los 3 grupos de estudio de inyección de DMH se observan diferencias significativas en cuanto a la presencia de tumores sincrónicos de intestino delgado ( $p=0,00033$ ). Se observa que las ratas que recibieron altas dosis de DMH y durante 20 semanas (grupo B) presentan mayor porcentaje de tumores sincrónicos de intestino delgado. No existiendo diferencia significativas entre los grupos C y D ( $p=0,25090$ ).

#### 2. 2. 6. Presencia de metástasis

No se observaron diferencias significativas entre los grupos B y D (dosis total y mitad) en cuanto a la presencia de metástasis ( $p=0,7455$ ).

#### 2. 2. 7. Presencia de placa linfoide



Considerando lesiones benignas y malignas asociadas a placa linfoide, se observa que existen diferencias significativas entre los 3 grupos ( $p=0,00007$ ). El grupo de estudio en etapas preneoplásicas muestra una mayor asociación a placa linfoide.

Si consideramos exclusivamente las lesiones neoplásicas persiste esta tendencia pero las diferencias no son significativas ( $p=0,05956$ ).

#### IV. 2. 3. Variables histoquímicas

Las lectinas SBA y GSA-II no mostraron diferencias entre los grupos. Los 4 tumores del grupo D incubados con la lectina PNA mostraron enlace con dicha lectina. Si comparamos los grupos B y C se observan diferencias en la reactividad para dicha lectina ( $p=0,02807$ ), puesto que la mayoría de los tumores del grupo B se marcaban.

En el grupo D todos los tumores incubados con la lectina UEA-I presentaron reactividad para la misma, no observándose diferencias significativas entre los grupos de dosis alta de DMH.

#### IV. 2. 4. Citometría de flujo

Fueron aptos para el análisis por citometría de flujo un total de 126 histogramas de los 5 grupos de estudio. En la Tabla 4-23 se muestran los valores del ciclo celular y el índice de proliferación para cada uno de los grupos de estudio ([Figura 4-35](#)).

	FASE G0G1	FASE G2M	FASE S	I. PROLIFERACIÓN
NORMAL	88.74	5.03	6.21	11.25
DMH-NORMAL	86.65	5.91	7.43	13.34
DMH-TUMOR	87.50	4.84	7.65	12.49
EDTA	89.61	4.72	5.66	10.38
PRENEOPLÁSICO	89.96	3.95	6.07	10.03
Total	87.89	5.16	6.93	12.10

**Tabla 4-23**

Valores medios de las distintas fases del ciclo celular e IP para los distintos grupos de estudio.

Previamente, se ha descrito la presencia de diferencias significativas en los valores del índice de proliferación según la localización tumoral (Resultados B 1. 1. 2. 4). El grupo de ratas que no recibió ningún tratamiento (normal) mostró diferencias significativas entre el segmento de colon estudiado y la fase S ( $p=0,0465$ ), pero no en cuanto al índice de proliferación ( $p=0,0712$ ) (Tabla 4-24). El grupo control inyectado con EDTA, la mucosa preneoplásica tanto de etapas previas o coexistiendo con tumores no presentan diferencias significativas.

	Normal	DMH-Normal	DMH-Tumor	EDTA	Preneoplásico	Significación
GOG1	m=71.34	m=50.11	m=59.64	m=81.65	m=87.00	0.0023
G2M	m=63.50	m=77.90	m=55.92	m=53.74	m=42.33	0.0080

S	m=52.71	m=71.14	m=75.88	m=41.74	m=49.13	0.0042
IP	m=55.66	m=76.85	m=67.39	m=45.38	m=40.04	0.0024

**Tabla 4-24**

Medias y significación de las distintas fases del ciclo celular e índice de proliferación para los distintos grupos de estudio.

#### 2. 4. 1. Comparación entre los grupos de estudio y el resultado por citometría de flujo

Se han encontrado diferencias significativas entre los distintos grupos de estudio y las variables cuantitativas resultado del estudio por citometría de flujo. Las medias de los% de células en fase G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>M, S y el índice de proliferación y su significación estadística se muestran en la Tabla 4-24.

Cuando se estudia la variable índice de proliferación (IP) comparando los grupos dos a dos mediante la prueba U de Mann-Whitney, se observan diferencias significativas entre el grupo normal y el grupo DMH-normal (p=0,0358), entre los grupos EDTA y DMH-normal (p=0,0018) y EDTA y DMH-tumor (p=0,0483), preneoplásico y DMH-normal (p=0,0020). EDTA y DMH-tumor (p=0,0483), preneoplásico y DMH-normal (p=0,0020). y preneoplásico y DMH-tumor (p=0,0268). La comparación de medias del resto de grupos no demostró diferencias significativas.

Los estudios del % de células en fase S de los grupos muestra que existen diferencias significativas entre la ausencia de tratamiento (grupo normal) y DMH-tumor (p=0,0353), entre EDTA y DMH-normal (p=0,0077), entre EDTA y DMH-tumor (p=0,0022), y entre los grupo preneoplásico y DMH-tumor (p=0,0078). La comparación de medias no mostró diferencias significativas en los otros grupos.

## V. Discusión

### V. 1. Aspectos morfológicos

#### V. 1. 1. Características del cáncer colorrectal inducido con DMH

Los tumores de intestino grueso inducidos por 1,2-dimetilhidracina en roedores son histopatológicamente análogos al cáncer de colon humano(212),(234).

La morfología general de los tumores inducidos por DMH semeja los descritos previamente por otros autores(203),(314).

Dosis de 21mg/kg/semana durante 20 semanas proporcionan una tasa tumoral en el intestino grueso del 82,05%. Se han obtenido unas tasas inferiores a las de otros estudios que oscilan entre el 90 y el 100%(167) (195) (195). El número medio de tumores invasivos por animal es de 1,26. Con dosis de 10 mg/kg/semana durante el mismo periodo se obtiene una tasa del 55%, con una media de tumores invasivos por rata de 0,5, inferior a la publicada en otras series(206).

Con altas dosis de DMH los tumores observados son generalmente múltiples (68,75%), mientras que con dosis de 10 mg sólo en un 18, 18%.

Los tumores inducidos con DMH no son clasificados de una manera uniforme en la literatura, sin embargo, todos coinciden en una división entre adenocarcinomas mucinosos y no mucinosos.

En conjunto en todos los animales usados en el modelo experimental se han observado un 60,22% de adenocarcinomas no-mucinosos, considerando además los carcinomas *in situ*. Las cifras de tumores mucinosos (39,78%) son superiores a las obtenidas en otros estudios, en los que suponen un 15% del total de tumores(206). Si consideramos exclusivamente los tumores invasivos obtenemos un altísimo porcentaje de tumores mucinosos (44,73%), mientras en la serie de Teague(320) este tipo tumoral constituye menos de un 5% de todos los tumores invasivos.

Las distintas dosis y tiempos de inducción tumoral no representan una variación significativa en la presencia de adenocarcinomas mucinosos o no mucinosos.

En este estudio la mayoría de los tumores son invasivos (89,25%), con cifras similares a las observadas por Teague(320), y en 1 solo caso se describen adenomas, a pesar de que los animales recibían dosis altas y bajas de carcinógeno, y distintos tiempos de inducción. El adenoma observado en el estudio se observó en una rata que recibió altas dosis de carcinógeno durante 20 semanas. Estos resultados difieren de los publicados por otros autores con alta proporción de adenomas(216), (314) y corroboran otros que afirman que en la rata la mayoría de adenocarcinomas aparecen *de novo* sobre mucosa plana(208),(209).

Otra diferencia sustancial respecto a la literatura se refiere a la localización tanto de las lesiones benignas como malignas. Mientras en el presente estudio se situaban con mayor frecuencia en colon ascendente tanto en animales tratados con altas como con bajas dosis de DMH; otros autores describen el predominio distal de las neoplasias(208),(211) ,(216) ,(303) , otros las observan a nivel de la flexura mayor(314) (intersección entre colon transversal y descendente en este estudio), mientras otros encontraban una alta proporción de tumores en el ciego adyacente al íleon en ratones Swiss(216). Estas diferencias no pueden atribuirse a emplear una distinta clasificación anatómica, puesto que se ha considerado la distancia del tumor al ano en todos los casos.

Se han observado diferencias entre los tipos histológicos y la localización tumoral: en el colon descendente existe una mayoría de adenocarcinomas no mucinosos, mientras en el colon transversal y el ciego se objetiva una mayor frecuencia de carcinomas mucinosos. En la

literatura se recoge también una mayoría de adenocarcinomas no mucinosos en el colon izquierdo(211).

Otros investigadores describen hallazgos histopatológicos distintos entre el colon proximal y distal, observando que los adenocarcinomas mucinosos son más frecuentes en el colon ascendente(199), en asociación con colecciones de folículos linfoides(206),(300). Postulando que el tipo de crecimiento lento del adenocarcinoma bien diferenciado es probable que se origine en la propia mucosa del colon distal mientras que el tipo de crecimiento rápido del colon proximal se realice a partir de glándulas atípicas en los folículos linfoides. Por lo tanto, se sugiere que la histogénesis y los procesos de crecimiento del carcinoma son distintos en el colon proximal respecto al distal(571). Este aspecto no ha sido confirmado, puesto que no se han observado diferencias entre la asociación a placa linfoide y los tipos histológicos malignos, se observaban folículos linfoides en asociación con adenocarcinomas y con carcinomas mucinosos. Tampoco se han observado diferencias respecto a la localización tumoral, ya que en los cuatro segmentos colónicos los tumores podían estar asociados a placas linfoides. El 8,43% de los tumores invasivos se localizaban al lado de folículos linfoides, muy por debajo del 22% observado por Ross(206).

La presencia de cánceres experimentales en las parcelas linfoides formula la pregunta de su posible papel en la modulación de la proliferación y la diferenciación de las criptas intestinales(152).

El tratamiento con bajas dosis de carcinógeno (10 mg/kg/semana) durante 20 semanas reduce el número de carcinomas de intestino grueso y delgado por rata y el número de animales con metástasis respecto al grupo de altas dosis de DMH, tal como habían descrito previamente otros autores(167). Sin embargo, no hay diferencias respecto a los tipos histológicos y grado de diferenciación. La principal dificultad par el uso de esta dosis y durante este periodo de tiempo como modelo experimental es la ausencia de lesiones en el colon descendente, constituyendo la principal diferencia respecto al carcinoma de intestino grueso humano.

En el grupo de ratas inyectado con dosis de 21 mg/Kg/semana de DMH y sacrificio en etapas precoces se detectó el primer tumor maligno en la semana 16 de inducción. Greener(155) encuentra tumores a las 18 semanas en ratas inyectadas con 20 mg/kg del carcinógeno, desarrollándose en la mayoría de los animales los cánceres definitivos a las 24 semanas de tratamiento. Otros estudios reflejan un periodo de latencia idéntico a dosis de 10-20 mg/kg/semana(196).

Los tumores mucinosos se encuentran en grados de invasión superior (78,38% en Dukes B o C) comparado con los adenocarcinomas no mucinosos. La relativamente baja invasividad de las lesiones no mucinosas queda reflejada en la alta proporción de Dukes A (53,57%) si asociamos los 10 carcinomas *in situ* observados en el estudio. Los resultados obtenidos son similares a los observados por otros investigadores(199),(206).

Las tres pautas de tratamiento no han mostrado diferencias en la clasificación de Dukes.

El tamaño tumoral está relacionado con la invasividad del tumor.

Algunos trabajos describen que los tumores mucinosos son los únicos que se asocian con metástasis(300), mientras que en el presente estudio tanto los tumores mucinosos como los no mucinosos muestran metástasis: Es más, los tumores con heterogeneidad morfológica presentan metástasis con ambos componentes.

Las metástasis son locales, peritoneales, en los ganglios regionales o a distancia al igual que lo observado previamente por otros investigadores(155).

Existe una ligera menor susceptibilidad de las ratas hembras al carcinógeno. Se han descrito 41 lesiones malignas en hembras (44,09%) frente a las 52 desarrolladas en machos

(55,91%). Sin embargo, se observan diferencias significativas respecto al tipo histológico y una mayoría de ratas hembras presentan carcinomas mucinosos.

La presencia de tumores no colorrectales en el presente estudio concuerda con los previamente publicados de carcinogénesis por DMH(206). Así como la localización más frecuente a nivel de intestino delgado, en el duodeno y yeyuno proximal(206).

### **V. 1. 2. Características de las lesiones benignas inducidas con DMH**

La exposición al carcinógeno DMH induce cambios morfológicos precoces en las glándulas de la mucosa de aspecto macroscópico normal en etapas preneoplásicas.

La presencia de glándulas displásicas asociadas a placa linfoide es un evento precoz, ya visible en las primeras 4 semanas de inyección con DMH a dosis de 21 mg/kg/semana.

Las primeras lesiones displásicas no asociadas a placas linfoides se apreciaron en la sexta semana, eran displasias leves y se situaban en el ciego. No pudimos detectar en ningún caso la aparición de un tumor invasivo originado dentro de un adenoma en la rara, trabajos similares confirman nuestros resultados(178),(188). Incluso Maskens(193), describió la aparición de los pólipos benignos en períodos de latencia superiores a los del carcinoma, también en nuestro caso el hallazgo del único adenoma del estudio se obtuvo de una rata sacrificada a las 34 semanas, es decir, con un máximo periodo de inducción.

Es importante remarcar la coexistencia de lesiones benignas (displasias, adenoma) y malignas en el tiempo. Aunque en este grupo se observara con mayor frecuencia la presencia de lesiones benignas, tipo displasia, no existe una secuencia en la aparición de lesiones a partir de un cierto periodo de latencia. Estos resultados niegan la secuencia adenoma-carcinoma en el modelo animal de carcinogénesis inducida con DMH, propia de la neoplasia colónica humana(572),(68). En que el adenocarcinoma de colon puede entenderse como el final de un aparente proceso continuo que incluye el adenoma en el punto medio y el colon normal al principio. De hecho, no es probable que todo carcinoma colorrectal tenga su origen en un pólipo. La mucosa colónica respondiendo a los factores que promueven el crecimiento polipoide podrían responder similarmente con el desarrollo de un carcinoma sin que intervenga el crecimiento polipoideo benigno.

Por otro lado, confirman la relación de las placas linfoides con la degeneración neoplásica. Se sabe que la renovación epitelial ordenada depende de la membrana basal que actúa como un recubrimiento de soporte móvil y supone un freno de la progresión celular y por consiguiente de las mitosis(573). Las placas linfoides generalmente rompen la membrana basal aumentando el área proliferativa y la capacidad neoplásica.

### **V. 1. 3. Focos y lesiones de predisplasia**

La transformación de la mucosa del intestino grueso se caracteriza por acumulación de lesiones cada vez más aberrantes a medida que aumenta la exposición al carcinógeno, antes del desarrollo de tumores invasivos.

Desde que Spjut y Smith en 1977(574), describieran las lesiones focales predisplásicas en ratas tratadas con DMH, numerosos estudios se han efectuado al respecto(572), (575).

Las criptas aberrantes o focos de predisplasia son criptas de tamaño aumentado, línea epitelial más gruesa y zona pericriptal aumentada, que se sitúan generalmente en la parte superior de la cripta(572). Semejantes anomalías en las criptas han sido puestas de manifiesto en la mucosa colónica humana inmediatamente al lado y a distancia de cáncer de colon al igual que en áreas afectadas por la enfermedad de Crohn(166),(575).

Los focos de predisplasia se consideran la primera etapa en el desarrollo de neoplasias colónicas y representan focos neoplásicos clonogénicos, a partir de los cuales se desarrolla el tumor, y sostienen el origen clonal de la neoplasia(572).

El status preneoplásico es un estado comprometido y no es dependiente de la presencia del carcinógeno. Todo el epitelio de la cripta es preneoplásico, aunque no todas las células progresan al estado abiertamente transformado(295).

En este estudio las lesiones de predisplasia afectando a glándulas aisladas o grupos de 2 glándulas se observaron a las dos semanas de iniciado el tratamiento con DMH, siendo más evidente en la porción apical del epitelio. De forma concomitante lesiones más difusas y de iguales características aparecieron en el ciego, y más ligeramente en colon ascendente, mientras en colon transversal y descendente la morfología estaba conservada. Cooke y colaboradores(314) también han demostrado áreas focales de criptas ensanchadas en la mucosa macroscópicamente normal de ratas tratadas con DMH durante una fase muy precoz de la carcinogénesis usando microscopía electrónica de scanning y Glickman et al.(576) describen severas aberraciones nucleares en las criptas del colon de ratón tras una única exposición al carcinógeno. Otros autores describen su presencia en etapas más tardías, a partir de la 9ª semana de exposición(320).

Estos hallazgos difieren de los vistos por James et al(235), en otra especie animal, con predominio de las lesiones en el colon distal. Otros autores describen ausencia de afectación del ciego durante el periodo de tratamiento(577).

Las lesiones secuenciales observada por Delapierre et al.(578) en ratas Wistar con alteración de las mucinas en ratas a partir de la 2ª semana y modificaciones nucleares de las células caliciformes en la 2ª semana, y de las absortivas en la 3ª concuerdan con los resultados obtenidos.

Al igual que los resultados presentados por otros investigadores(211),(575) con el tiempo de tratamiento aumenta la frecuencia y el tamaño de estas lesiones en cada segmento intestinal.

La aparente recuperación de las lesiones predisplásicas en la cuarta semana de inyección podría atribuirse a una recuperación del efecto tóxico local agudo del carcinógeno.

Existe una disminución progresiva en el número de células caliciformes y una disposición irregular del núcleo, menos evidente en el colon descendente, sugiriendo que éste no es el segmento "diana" por excelencia de la carcinogénesis inducida por DMH en este modelo.

En este estudio la hiperplasia de las glándulas mucosas, caracterizada por una elongación de las mismas, se objetiva en la mucosa macroscópicamente normal de ratas que han recibido altas dosis de carcinógeno a diferencia de lo observado por otros autores como un evento precoz de la carcinogénesis.

Los hallazgos del presente estudio experimental sugieren que las áreas de criptas aberrantes pueden interpretarse como lesiones precursoras en el desarrollo del cáncer de colon y pueden ser de gran importancia en el diagnóstico de pacientes con riesgo de padecer esta neoplasia.

#### **V. 1. 4. Microscopía electrónica de scanning**

En términos amplios el MES ha sido usado generalmente para examinar la topografía de las superficies naturalmente expuestas de células y tejidos. Aún, en muchos estudios es esencial explorar tanto los aspectos de superficie, como las relaciones espaciales de las células localizadas en los tejidos, y visualizar estructuras intracelulares de interés(416).

En contraste con las secciones de microscopía electrónica de transmisión, la MES nos

permite un análisis tridimensional de los eventos que ocurren en la superficie celular.

Diversos estudios muestran las características de la mucosa normal y tratada con DMH mediante MES, sin embargo, estos estudios no se refieren a todos los segmentos del intestino grueso y se limitan al colon distal(313),(579).

La observación con MES muestra clara diferencias regionales en el aspecto de la mucosa normal de la rata a pocos aumentos, aunque la superficie epitelial está cubierta en su mayoría por una densa capa de moco.

Se observan diferencias en la disposición de los pliegues: el ciego muestra pliegues de disposición irregular, en el colon ascendente y transversal se disponen oblicuamente y en el descendente son longitudinales paralelos al eje del intestino.

El aspecto, forma y número de las criptas varía en los cuatro segmentos del intestino grueso. En el ciego son circulares y abundantes, en el colon transversal tienen aspecto fusiformes y abultadas, con abundantes grumos de moco sobre ellas. En el colon transversal se observan escasos orificios criptales. El colon descendente muestra circunvoluciones, con aspecto cerebroide.

A mayor aumento, se puede apreciar las microvellosidades en los cuatro segmentos, que no muestran diferencias entre ellos.

Los cambios morfológicos observados durante la carcinogénesis experimental con DMH indican que hay un patrón definido de anormalidades mucosales progresivas empezando mucho antes del desarrollo de tumores focales de colon, que estas alteraciones son dosis dependiente, y que son más evidentes en el colon proximal, corroborando que es esta región el órgano diana de este modelo experimental.

Las neoplasias del intestino grueso de la rata no muestran diferencias ultraestructurales según la localización colónica y se asemejan a las descritas por otros autores(313),(579).

## **V. 2. Expresión de glicoconjugados**

Las mucinas son las fuentes predominantes de glicoproteínas en el epitelio gastrointestinal, y su estructura difiere según la localización en el tracto gastrointestinal y el estado de diferenciación(329),(580).

Estudios histoquímicos con tinciones como el ácido periódico de Schiff, azul alzian, diamina rica en hierro y diamina azul alzian rica en hierro, han demostrado la presencia de mucosustancias en la mucosa colónica(351).

Se acepta que alteraciones estructurales en el moco secretado están directamente relacionados con algunas enfermedades gastrointestinales. Este concepto es sostenido por hallazgos histoquímicos que muestran algunos cambios estructurales en células epiteliales benignas y malignas. Las alteraciones histoquímicas, caracterizadas por una cantidad mayor de glucoproteínas sulfatadas y ácido siálico sustituidas o por cambios en la antigenidad de grupo sanguíneo son de significado diagnóstico en la práctica patohistológica, estos métodos histoquímicos clásicos no permiten discriminar los diferentes carbohidratos. Para comprender las actuaciones del moco sin embargo, se necesitan análisis más detallados de sus secuencias carbohidrato.

Por otra parte, los estudios bioquímicos realizados en el intestino grueso no pueden precisar la distribución de los carbohidratos a nivel celular y subcelular.

### **V. 2. 1. Microscopía óptica**

#### **2. 1. 1. Mucosa normal**



La aplicación de las distintas lectinas en muestras de intestino grueso permiten observar diversos patrones de localización de los glicoconjugados del epitelio.

Los resultados obtenidos con lectinas conjugadas con oro coloidal en ratas controles normal no difieren de los presentados por otros autores usando lectinas conjugadas con otros marcadores(462) (465),(392).

Cada una de las lectinas usadas en el estudio ha mostrado un patrón de reactividad propio y característico, mostrando diferencias a lo largo de las criptas, así como a nivel de los distintos segmentos del colon normal de rata.

Freeman(328) realiza estudios histoquímicos del contenido en azúcares y de la actividad de diversas glicosidasas y glicosiltransferasas en el colon de rata normal y tratado con DMH a nivel proximal y distal, encontrando diferencias regionales entre el colon de rata normal proximal y distal. Diversos estudios histoquímicos han sugerido diferencias regionales entre el colon de rata normal proximal y distal en relación al contenido mucoso de carbohidratos y enzimas implicadas en el metabolismo de glicoproteínas. El contenido en azúcar es mayor distalmente. Existen diferencias regionales para la mayoría de las glicosiltransferasas y algunas actividades degradativas de la glicosidasa.

Las claras diferencias observadas en los patrones de enlace de lectina en los cuatro segmentos del intestino grueso de rata, asemejan a las descritas por otros investigadores para la SBA(394), UEA-I(392),(465) ,(466) y PNA(463). A pesar de esto, se han encontrado diferencias atribuibles a la especie animal empleada o a la sensibilidad de la técnica, como la ausencia de diferencias regionales de enlace de la UEA-I observadas por Freeman(392).

Las diferencias más notables se han observado con la UEA-I. Esta lectina marca la mucina de ciego y colon ascendente, pero no la mucosa del colon descendente, teniendo el colon transversal un comportamiento mixto entre colon ascendente y descendente.

Las posiciones terminales de las cadenas laterales de oligosacáridos están generalmente ocupada por ácido siálico-fucosa, estos dos azúcares compiten entre sí para la ocupación de las posiciones terminales. En estudios químicos de secreciones normales en humanos se observa un contenido de ácido siálico mayor y menor de fucosa en la mucosa rectal. Ya que la UEA-I es específica al residuo fucosil terminal la falta de enlace de esta lectina con el moco rectal puede estar relacionado con el bajo contenido en fucosa del recto. Otra posible explicación a la ausencia de enlace distal no estaría relacionado con el contenido de fucosa, sino en la presencia de ácidos siálicos que compiten para la ocupación de las posiciones terminales de las cadenas laterales de los azúcares. Cabe suponer que idénticos motivos se dan en el colon descendente de la rata.

Las lectinas SBA, GSA-II y PNA muestran enlace en todos los segmentos colónicos. La SBA reconoce específicamente residuos no reducidos de N-acetil-D-galactosamina, situados en la posición terminal de las glicoproteínas.

Las diferencias regionales en la expresión de glicoconjugación pueden correlacionarse con la distinta actividad de las glicosiltransferasas y glicosidasas en los segmentos proximales y distales del intestino grueso de la rata.

Las lectinas muestran asimismo diferencias de enlace en los distintos niveles de las criptas. Las lectinas SBA y GSA-II presentan diferencias a lo largo de las criptas y en su comportamiento de unión a nivel citoplasmático o supranuclear en las distintas localizaciones colónicas.

En el ciego, la SBA se une a la mucina de las células caliciformes a nivel basal, en los tercios medios y apical la situación es supranuclear. En el resto del colon se sitúa en citoplasma de las células caliciformes en toda la longitud de la cripta. Por lo tanto, la N-acetilgalactosamina es un carbohidrato terminal presente en la mucina del intestino grueso,



aunque no a todos los niveles.

La GSA-II también muestra diferencias locales con mayor afinidad por los segmentos basales.

La PNA muestra una disposición constante en todos los segmentos del colon, y su reactividad queda confinada en el área supranuclear de las células caliciformes y columnares. En el intestino grueso normal de rata las vacuolas de moco de las células caliciformes no se han marcado con esta lectina. Se ha observado marcaje de la superficie luminal del ciego y débilmente la del colon proximal, pero no reacciona con la superficie luminal del colon distal.

En el ciego, la UEA-I se une a la mucina de las células caliciformes en toda la longitud de la cripta, en el colon ascendente de la rata queda confinada a la base de las criptas. Estos gradientes de reactividad se relacionan con el grado de diferenciación celular.

En general, las lectinas usadas en este estudio muestran un patrón de reactividad similar al observado en el colon humano(441) (443),(446) ,(351) ,(450).

Las diferencias regionales reflejan modificaciones cualitativas y cuantitativas en la estructura de los glicoconjugados celulares.

## 2. 1. 2. Lesiones neoplásicas

Los patrones de reactividad de las lectinas en las lesiones neoplásicas difieren considerablemente de los de la mucosa normal. Estos cambios observados en los tumores indican una clara modificación del metabolismo de los glicoconjugados en la transformación neoplásica.

Los estudios bioquímicos previos describen diferencias considerables en el contenido de carbohidratos o glicoproteínas mucinosas entre mucosa colónica normal, adyacente no afectada y tumores colónicos. El tratamiento con el carcinógeno DMH tiene un efecto diferencial en el tipo de azúcar y enzimas implicadas en el metabolismo glicoproteico, con reducción en el contenido de azúcar (hexosa total, no dializable y enlazada) y aumento de las enzimas galactosiltransferasas(328).

El patrón de unión de las lectinas a los carcinomas se han caracterizado por positividad de la SBA en 83, 33% de los casos, de la GSA-II en 78,18%, PNA en 70, 77% y UEA-I en 76,67%.

Las diferencias más notables entre los carcinomas y la respectiva mucosa normal se han observado en todos los segmentos del colon con la lectina PNA y con la UEA-I en el colon descendente, con aumento de la reactividad para dichas lectinas. Si las alteraciones observadas son hechos primarios o reflejan cambios secundariamente a la transformación neoplásica se desconoce.

Por el contrario, la SBA ha mostrado un enlace disminuido en los tumores de colon ascendente respecto a los controles normales, la reducción del enlace indica que hay menos residuos GalNAc terminales no reductores en las cadenas de oligosacáridos de la mucina debido probablemente a una glicosilación incompleta superior de las glicoproteínas en este segmento con altas tasas de neoplasia.

La GSA-II no mostró diferencias regionales evidentes en su enlace, aunque tanto en colon ascendente como en transversal normal se encuentran a nivel supranuclear, en las mismas localizaciones tumorales se expresa como una fina tinción de las membranas celulares apicales y en ocasiones del citoplasma de las células caliciformes, y explicaría un aumento de la N-acetilglucosamina en la mucina de las células transformadas.

Los resultados con las lectinas PNA y UEA-I en los carcinomas de rata inducidos con DMH confirman los obtenidos en estudios previos(463),(466) ,(467) y son similares a los observado en el cáncer humano(454),(351).

Los cambios más aparentes se han detectado con la PNA. Esta lectina muestra afinidad para los grupos galactosil y reconoce el disacárido D-Gal- $\beta$ (1-3) D-GalNAc. A diferencia de la mucosa normal, la reactividad de esta lectina en los carcinomas se localiza en la superficie luminal del epitelio, en el material intraglandular y en las vacuolas de mucina de las células tumorales. Las células neoplásicas presentan la capacidad de expresar la estructura D-Gal- $\beta$ (1-3) D-GalNAc en compartimentos donde habitualmente no se encuentra. El hecho que esta estructura ocupe normalmente una posición interna en las cadenas oligosacáridas de los glicoconjugados sugiere que las células neoplásicas sintetizan glicoconjugados incompletamente glicosilados, antes de la incorporación del ácido siálico terminal. El enlace de PNA observado en los tumores puede explicarse también por una disminución de las glicosiltransferasas a este nivel con aumento de la síntesis del antígeno de grupo sanguíneo T(318).

La PNA ha mostrado afinidad por los tumores de intestino grueso de rata independientemente de la localización tumoral, a diferencia de lo observado por Calderó et al(463), con menor expresión en el colon proximal.

La UEA-I se enlaza con la  $\alpha$ -L-Fucosa y muestra gran afinidad por las neoplasias de intestino grueso, tal como previamente se ha descrito. Aunque las situadas en el colon ascendente presentan la menor reactividad, con cambios en relación a la mucosa normal, no se observan diferencias significativas entre la localización tumoral y el enlace con esta lectina.

Es decir, en el colon proximal, la  $\alpha$ -L-Fucosa es accesible a la lectina en condiciones normales y está disminuido o no es accesible para todas las neoplasias. A diferencia de lo publicado por otros autores(463) en que la positividad obtenida con la UEA-I no varía con la transformación neoplásica. La pérdida del efecto gradiente proximal-distal en las muestras tumorales parece ser debida a una capacidad disminuida de disponibilidad de los residuos fucosil en el colon ascendente.

La UEA-I es positiva en el colon transversal y descendente, indicando la síntesis de glicoconjugados con residuos  $\alpha$ -L-Fucosa en el terminal no reducido de las cadenas oligosacáridos, los cuales no estaban presentes en condiciones normales.

Las diferencias regionales en el enlace de las neoplasias con las lectinas PNA y UEA-I, respecto a la mucosa normal sugieren que los mecanismos que condicionan las diferencias segmentarias se pierden en la transformación maligna.

La heterogeneidad intratumoral en la reactividad de las lectinas estudiadas, expresada en los resultados como áreas de marcaje, con alternancia de zonas tumorales reactivas con otras de intensidad disminuida o ausente, podría reflejar la existencia de diferentes subpoblaciones celulares en un mismo tumor, con distinta alteración en el metabolismo de los glicoconjugados o podría traducir simplemente la existencia de tumores con patrón mixto adenocarcinoma-carcinoma mucinoso o con diferente grado de diferenciación, observado en otros estudios de carcinogénesis por DMH(320) que tendrían diferente contenido en carbohidratos.

Las lectinas SBA y GSA-II no mostraron diferencias entre los grupos de estudio. En el grupo D pudieron estudiarse menos casos con las lectinas PNA y UEA-I, mostrando enlace de lectina todos los tumores de intestino grueso. La lectina PNA mostró diferencias entre los dos grupos que recibieron altas dosis de carcinógeno, la mayoría de los tumores del grupo de inyección más prolongada presentaron enlace de esta lectina a diferencia del grupo de sacrificio más precoz. Este hallazgo podría explicar que periodos prolongados de inducción tumoral incrementan la capacidad de expresar la estructura D-Gal- $\beta$ (1-3) D-GalNAc.

La reactividad de las lectinas estudiadas no muestra diferencias según el aspecto

macroscópico y el tamaño tumoral.

Tampoco han mostrado diferencias respecto al tipo histológico, grado de diferenciación y el estadio de Dukes. En tumores humanos se ha encontrado mayor reactividad de las lectinas GSA-II y PNA en los tumores invasivos que en los carcinomas mucosales(443).

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

En este estudio hemos observado cambios graduales y progresivos de los glicoconjugados determinados por lectinas de la mucosa del intestino grueso de la rata, según las semanas de exposición al carcinógeno.

Varios autores han descrito un cambio en la producción de moco del colon de rata tratado con DMH. Filipe(581) encontró un aumento de los ácidos siálicos en la mucina de ratas tratadas con este carcinógeno y deplección de las sulfomucinas en las seis primeras semanas de tratamiento. Varios autores han descrito un cambio en la producción de moco de colon de rata tratado con DMH. En la serie de Delapierre et al.(578) en ratas Wistar se observa un paro en la secreción de sulfomucinas en algunas criptas, en la porción superior o en toda la longitud con una dosis de 30 mg/kg. Otros autores observan glándulas sin cambios epiteliales asociados que presentan una ausencia completa de mucosustancias(196). Otros autores describen cambios paralelos cualitativos y cuantitativos en las sialoglicoproteínas en las distintas regiones del colon durante la carcinogénesis inducida con DMH(582).

Al igual que en la mucosa neoplásica los cambios regionales más importantes se han observado con las lectinas PNA y UEA-I y asentaban sobre mucosa sin alteraciones epiteliales evidentes. Estos resultados difieren de los publicados por Balzer et al.(468) en ratas Wistar en que no observa cambios en el patrón de enlace de UEA-I respecto a las ratas control ni cambios constantes cáncer-asociados en la mucina con la lectina PNA.

La SBA ha mostrado un patrón irregular de enlace en el ciego y colon descendente, y en general una disminución de la reactividad a partir de la 16<sup>a</sup> semana, concomitante a la aparición de lesiones tumorales.

La GSA-II ha mostrado disminución de la reactividad en el colon ascendente.

Coincidiendo con la acción tóxica local del carcinógeno en las dos primeras semanas de iniciada la inyección con DMH se observó enlace de la PNA a la mucina de las células caliciformes, que posteriormente desapareció para hacerse constante en la semana 26.

La UEA-I mostró disminución de la reactividad en ciego y colon ascendente y un aumento de la misma en el colon descendente a partir de la semana 16. Estos resultados son congruentes con la observación de un menor enlace en los tumores de este segmento.

La aparición de la UEA-I en la mucosa del colon descendente de ratas tratadas con DMH sugiere la reaparición de los antígenos de grupo sanguíneo H, la alteración de la estructura terminal de los carbohidratos de este segmento con formación de cadenas de azúcar adicionales o a la producción de glicoproteínas neoplásicas

Estos hallazgos expresarían cambios bioquímicos en la función celular no observados en los estudios morfológicos convencionales.

Al igual que en el trabajo de Suzuki et al(571) se han observado diferencias en los patrones de enlace de las lectinas entre los carcinomas y/o las glándulas atípicas asociadas a folículos linfoides y la mucosa colónica normal de la rata. Así como entre el enlace de las lectinas en los focos de glándulas predisplásicas y la mucosa normal, tumoral y en las glándulas atípicas asociadas a folículos linfoides de ratas inyectadas con DMH.

Puesto que tanto criptas predisplásicas aberrantes como las glándulas atípicas asociadas a folículos linfoides han sido descritas como lesiones precursoras del cáncer de

colon en este modelo experimental, las distintas características en los glicoconjugados de estas lesiones podría establecer dos orígenes distintos de las neoplasias inducidas por DMH.

#### 2. 1. 4. Mucosa transicional

Los estudios de Filipe et al(583), Riddell y Levin(102), y Shamsuddin et al(584) han mostrado que la mucosa adyacente a carcinoma de colon (mucosa transicional) no es normal, mientras que otros estudios que algunos de los cambios descritos son inespecíficos ya que aparecen en procesos inflamatorios. Específicamente, Filipe y Branfoot(583), encontraron aumento de sialomucinas en la mucosa transicional, (en la mucosa normal predominan las sulfomucinas). Riddell y Levin(102), y Dawson y Filipe(104) describieron alteraciones ultraestructurales, distorsión y pérdida de la arquitectura normal de la mucosa y células inmaduras e intermedias en los niveles altos de las criptas. Shamsuddin et al. (584) describen cambios benignos mucosales no polipoides, incluyendo un aumento en las células caliciformes y una disminución en las células absortivas, un aumento en la longitud de las criptas de 0,8 a 2 mm; variaciones en la configuración glandular tales como ramificación, tortuosidad y criptas distendidas; células basales hiperplásicas y número aumentado de mitosis(500). Freeman(328) ha descrito diferencias en el metabolismo de las glicoproteínas.

La mucosa transicional podría ser:

- a) una respuesta específica de la mucosa colónica a cualquier factor irritante
- b) una respuesta mucosal específica a la presencia del carcinoma, un cambio inducido por una neoplasia adyacente
- c) respuesta preneoplásica a un estudio carcinogénico a partir del cual las neoplasias colónicas podrían desarrollarse
- e) este cambio podría reflejar la diseminación intraluminal del tumor colónico(500).

La reactividad de las lectinas en la mucosa adyacente a los tumores muestra diferencias evidentes en relación a la mucosa normal no tratada. Sin embargo, estas alteraciones son menos evidentes respecto a la mucosa macroscópicamente normal de ratas tratadas con DMH y en múltiples ocasiones presentan un enlace similar, aunque no idéntico.

Las diferencias más notables en el enlace a nivel de la mucosa transicional se han observado en el ciego y colon ascendente con la lectina UEA-I con disminución de enlace respecto a la mucosa control no tratada y la macroscópicamente normal tratada con DMH. Mostrando en general esta lectina una reactividad disminuida respecto a la mucosa tumoral en todos los segmentos. A nivel del ciego es también evidente un mayor enlace de la PNA a nivel de la mucosa transicional respecto a la tratada del mismo segmento. Por el contrario, en el ciego la MT enlazada a GSA-II se comporta de forma idéntica a la tratada con el carcinógeno.

Estos hallazgos sugieren que los cambios en los glicoconjugados de la mucosa transicional de los tumores inducidos por DMH son similares a los de la mucosa macroscópicamente normal. Es más, en este modelo animal el concepto "mucosa transicional" dejaría de ser válido, y se referiría a un cambio premaligno difuso de la mucosa.

### V. 2. 2. Glicoconjugados de la superficie epitelial

El MES ha tenido una penetración relativamente limitada en el área de la inmunocitoquímica y la histoquímica con lectinas. La capacidad de emparejar la tecnología de la inmunocitoquímica al MES ofrece un gran potencial para ampliar el repertorio de

información útil que puede ser obtenida a partir de procedimientos de marcado inmuno y no inmunocitológicos.

### 2. 2. 1. Mucosa normal

La observación por MES en modo de retrodispersados de las lectinas SBA y UEA-I conjugadas con oro coloidal ha mostrado una vez más las diferencias regionales existentes en el intestino grueso normal de la rata.

En ocasiones la mucina de la superficie epitelial no muestra enlace de lectinas y es la mucosa que emerge de la cripta la que sí lo hace, mostrando la afinidad por las lectinas de la mucina de las capas más profundas.

Las lectinas GSA-II y PNA han mostrado ausencia de reactividad en toda la mucosa colónica. La capa mucinosa de la superficie colónica epitelial de ratas Sprague-Dawley no han expresado las estructura N-acetilglucosamina y D-Gal- $\beta$ (1-3) D-GalNAc.

### 2. 2. 2. Mucosa tumoral

El patrón de unión de las lectinas a los carcinomas se han caracterizado por positividad de la SBA en 77,80% de los casos, de la GSA-II en 28,60%, PNA en 57,20% y UEA-I en 60%.

Se observa por lo tanto, una disminución en la positividad de los tumores observados por MES, respecto a los mismos observados por microscopía óptica.

Las lectinas GSA-II y PNA mostraron las mayores diferencias al ser positivos los tumores respecto a la mucosa normal no tratada que era negativa.

Al igual que en los hallazgos en microscopía óptica, se observó reactividad de los tumores de colon descendente para la UEA-I, indicando la síntesis de glicoconjugados con residuos -L-Fucosa en el terminal no reducido de las cadenas oligosacáridos en la mucina del epitelio superficial tumoral, los cuales no estaban presentes en condiciones normales.

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

Los diferentes segmentos colónicos sufrieron un distinto comportamiento a lo largo de las semanas de inducción del carcinógeno.

Las principales diferencias se observaron en la lectina GSA-II en todos los segmentos y se apreciaron desde etapas precoces de la carcinogénesis, respecto a la mucosa normal observada por BES que era negativa para esta lectina.

La SBA mantuvo su patrón de enlace en el ciego, y se observó un aumento de la reactividad en el resto de los segmentos.

Se observó enlace de la lectina PNA a la mucina de la superficie epitelial, predominando en el ciego y en el colon descendente.

El colon descendente de ratas tratadas con DMH expresa UEA-I desde las primeras semanas de inducción del carcinógeno.

En general, la detección de glicoconjugados de superficie del colon de rata mediante MES en modo de BES aporta mayor sensibilidad e información adicional a la observación con microscopía óptica convencional.

## V. 3. Citometría de flujo

Durante la pasada década, el análisis del contenido de ADN mediante técnicas de CMF se ha convertido en una herramienta de gran utilidad en el constante intento por parte de

los investigadores y de los clínicos de encontrar nuevos factores pronósticos en las distintas neoplasias y en concreto en el cáncer de colon. Identificar grupos de pacientes con alto riesgo para desarrollar recidiva local o metástasis a distancia es hoy en día de gran importancia para indicar tratamientos de radioterapia y quimioterapia adyuvante.

### **V. 3. 1. Valor del estudio del contenido en ADN de las neoplasias colónicas inducidas experimentalmente con 1,2-dimetilhidracina en la rata**

Pocos estudios hablan de la citometría de flujo de los tumores de colon inducidos con DMH en ratas.

Fischbach et al.(585) estudian 39 carcinomas y 27 adenomas de colon inducidos en ratas con DMH, encontrando un único caso de carcinoma "casi diploide". El resto de las lesiones mostraron un patrón diploide de DNA. Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestra serie, en la que todos los tumores son diploides.

Estos hallazgos difieren de los observados en el cáncer de colon humano, con cifras de aneuploidia según las series que oscila entre un 39 y un 82%(516),(507). A pesar de la similitud histológica de los tumores inducidos en la rata con DMH y los tumores humanos existen evidentes diferencias en la morfología biológica.

Las teorías carcinogénicas del cáncer de colon inducido por DMH sostienen un proceso en dos etapas. Cada inyección de DMH entra en interacciones inespecíficas con el ADN y es capaz de producir una mutación somática y en una segunda etapa se expresaría el fenotipo cáncer(193). Si esta teoría es acertada, una posible explicación a la presencia de tumores diploides en la rata podría atribuirse a los límites de resolución del análisis del contenido de ADN con las técnicas de citometría de flujo (una variación determinada de 0,05 en el índice de ADN representa 1 cromosoma), y en los tumores que han sufrido una traslocación u otros cambios genómicos no reflejados en el contenido de ADN o número de cromosomas(508).

### **V. 3. 2. Valor del estudio de la proliferación celular por citometría de flujo**

Para la valoración de la actividad proliferativa se ha empleado la cuantificación del porcentaje de células en fase S y el denominado índice de proliferación, resultado de sumar el porcentaje de células en fase S y en fase G<sub>2</sub>M.

Ambos parámetros han demostrado ser válidos para la evaluación de la proliferación en neoplasias humanas y animales(539), pero se ha sugerido que podría ser más fiable el uso del porcentaje de células en fase S que el índice de proliferación, debido a la mayor variabilidad y dispersión de los resultados de la fase G<sub>2</sub>M respecto a la fase S en el estudio de los histogramas del ciclo celular. La variabilidad en la medición de la fase G<sub>2</sub>M puede provocar un aumento en la dispersión de los valores del índice de proliferación y la pérdida de significación de las pruebas estadísticas(586),(587).

En nuestro estudio se han calculado ambos parámetros, con comportamiento similar en el estudio estadístico, pero no idéntico.

Aunque la actividad proliferativa de un tumor puede ser un determinante pronóstico más completo que el contenido en ADN(515),(582), pocos investigadores han utilizado la medida de la proliferación celular en el cáncer colorrectal humano y de rata(540),(588).

En las neoplasias aneuploides se observa un aumento de la fase S, sin embargo, en estos casos debe interpretarse con precaución, puesto que podría deberse al remanente de células diploides de la mucosa en la distribución del DNA(544). En los tumores diploides, al contrario, se hace imprescindible considerar el porcentaje de células en fase S y el índice de



proliferación celular. En el cáncer colorrectal humano un alto índice de proliferación es un factor pronóstico independiente desfavorable(543).

En los últimos años diversos estudios han sugerido que en el proceso de carcinogénesis colorrectal existe una alteración difusa de la mucosa de dicho segmento digestivo con un patrón proliferativo alterado que precede a la aparición del cáncer. Se han utilizado diversos métodos para detectar esta anomalía, como son el estudio de la proliferación de sialomucinas, la actividad de enzima ornitina-decarboxilasa, el índice de captación de timidina, técnicas de citofotometría y citometría de flujo, entre otros(589).

Es conocido que la DMH y otros carcinógenos colónicos conducen a una proliferación celular aumentada(317), lo que es crítico para el proceso de carcinogénesis(166), al existir un mayor contenido de células en el ciclo mitótico que podrían estar en mayor riesgo de transformación maligna(590).

Básicamente, el colon tiene un nivel relativamente alto de renovación celular. El efecto de altos niveles de proliferación es producir más células en fase S, que son sensibles a daño en el ADN, para aumentar el riesgo de transformación neoplásica y acortar el periodo de latencia del tumor(591).

En los tumores experimentales hay un aumento de la proporción de células en proliferación (S+G<sub>2</sub>M) con progresión del centro a la periferia medidos por el índice de timidina tritiada(508). En nuestro estudio, los tumores de intestino grueso de la rata muestran un índice de proliferación superior al de las muestras normales control e inyectadas con EDTA, sin embargo, un índice de proliferación superior ha sido observado en muestras tratadas no tumorales, una posible explicación sería que la mucosa tumoral pierde en parte su capacidad de proliferación frente a las células alteradas no tumorales que aumentan su proliferación y por tanto continúan en riesgo de transformación neoplásica.

Las diferencias observadas en los estudios de fase S entre el índice de marcado de timidina tritiada y la citometría de flujo pueden deberse a la difusión del radioisótopo por todo el tumor, y se piensa que algunas células tumorales pueden tener baja o ausente actividad sintética de DNA, comparada con las células en fase S<sub>0</sub> durante la meseta del crecimiento *in vitro*(508).

La localización tumoral tiene relación con los resultados citométricos si consideramos el índice de proliferación, mostrando los tumores de colon ascendente menor tasa de proliferación y los de ciego la mayor tasa. La fase S no muestra diferencias significativas, aunque sí es menor también en el mismo segmento. En el colon normal de ratas control no tratadas, en cambio, es el porcentaje de células en fase S el que muestra diferencias respecto a los segmentos colónicos, siendo también las muestras de colon ascendente las de menor proliferación y las de colon descendente las que presentan fases S más altas.

Este dato, es inesperado teniendo en cuenta que en el colon ascendente es donde se da una tasa más alta de tumores colónicos en la rata en este estudio. Glickman et al(592) usando cepas de ratones con susceptibilidad genética a la DMH diferente, demuestran que la susceptibilidad a la carcinogénesis por DMH puede ser predicha por las características proliferativas fisiológicas de la mucosa colónica.

El alto índice de proliferación observado en las muestras de ciego macroscópicamente normal podría explicarse por la mayor presencia de focos de displasia y lesión difusa de la mucosa con pérdida de células caliciformes observadas en este segmento.

En el cáncer colorrectal humano García et al(540) encuentran diferencias significativas en el porcentaje de células en fase S entre la localización colónica y rectal, siendo ésta superior en el recto, estos hallazgos podrían ser compatibles con los observados en el presente estudio.

Diversos autores(314),(577) ,(593) han descrito diferencias regionales en los

parámetros de proliferación usando otras técnicas. Sin embargo, mientras Sandford(577) describe un aumento del compartimento de proliferación celular mucho más evidente en el colon distal, atribuyéndolo a una inadecuada o ausente represión de la síntesis de ADN, McGarrity(593) describe diferencias regionales en los animales control. De forma que los parámetros de proliferación cambian en paralelo en todas las regiones durante la carcinogénesis.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo de los distintos segmentos colónicos no corroboran el cambio en paralelo desde muestras control a muestras tumorales o muestras colónicas macroscópicamente normales de ratas inyectadas. Es más, tanto el porcentaje de células en fase S como el índice de proliferación sufren una ligera disminución en el colon descendente tumoral y algo más evidente en el colon normal de ratas tratadas con DMH. El mayor aumento de ambos parámetros se da en el colon transversal normal y tumoral. Este distinto comportamiento de los tumores proximales y distales podría ser debido a un origen distinto de los mismos o a que los tumores de colon descendente necesitan un periodo de inducción tumoral superior.

El aspecto macroscópico y el tamaño tumoral no guardan relación con los parámetros de proliferación.

El porcentaje medio de células en fase S y el índice de proliferación no es significativamente distintos entre los diferentes grupos de malignidad histológica, ni grado de diferenciación. Estos estudios corroboran los encontrados por otros autores para el cáncer colorrectal humano(537),(538) ,(542).

Todos los tumores estudiados por citometría de flujo eran invasivos. No se ha observado la presencia de parámetros de proliferación aumentados en estadios avanzados de Dukes y tumores metastásicos. En el cáncer humano altas fases S se corresponden a un mayor grado invasivo, con tumores en estadios C y D de Dukes(529),(540).

No se ha observado cambios significativos en los parámetros de proliferación según las semanas de exposición al carcinógeno en los tumores colorrectales.

El aspecto macroscópico y el tamaño tumoral no guardan relación con los parámetros de proliferación.

Aunque las diferencias en los parámetros de proliferación no son significativas entre los tumores asociados a placa linfoides y los que no lo están. Los valores medios de fase S son superiores en las neoplasias asociadas a nódulo linfoides. Se postula que los agregados linfoides alteran la cinética epitelial celular local y que además están asociados con fenestraciones en la membrana basal, factores favorecedores de la aparición de neoplasias colónicas(299).

Los valores de fase S de la mucosa normal y tumoral inyectada con DMH durante los mismos periodos de tiempo son similares, sugiriendo una alteración del patrón de proliferación celular a todos los niveles, por consiguiente existen alteraciones con potencial carcinógeno a nivel de toda la mucosa. Hallazgos similares se han encontrado en mucosa sana de pacientes con cáncer colorrectal(588). Los resultados difieren de los publicados por Fishbach(585) con un notable aumento del porcentaje de fase S en las muestras tumorales respecto a la mucosa normal de ratas expuestas a DMH.

Se han observado diferencias entre los parámetros de proliferación y los grupos de estudio.

Los estudios de la fase S encuentran diferencias entre la mucosa normal (sin tratamiento o inyectada con EDTA), y la mucosa inyectada con DMH durante 21 semanas, tanto normal como tumoral. No observándose diferencias con la mucosa normal de ratas inyectadas hasta la octava semana de inyección. Estos datos irían en contra de otros publicados usando técnicas distintas en que la DMH induciría proliferación celular en etapas



precoces de la carcinogénesis(204),(594). Mediante la citología de análisis de imagen de fluorescencia cuantitativa (QFIA), técnica que combina el examen citológico con cuantificación de contenido en ADN en células exfoliadas, se ha observado un aumento del contenido en ADN a partir de la segunda semana de inyección del carcinógeno(595). En este estudio el valor medio del porcentaje de células en fase S es menor al de la mucosa normal y corroboraría los resultados de Baril et al(596): entre los 28 y 35 días después de la primera inyección del carcinógeno se produce un aumento en el número de células en fase S y a partir de los 35 días se produce un paradójico y progresivo descenso en todos los compartimentos celulares de los valores de fase S. Datos similares han sido publicados por Deschner(211).

Otra posible explicación a las diferencias a estos resultados podría deberse al momento del sacrificio después de la inyección puesto que se ha descrito mediante el índice de timidina tritiada que el aumento en la capacidad proliferativa ocurre dentro de un corto espacio de tiempo tras la exposición a la DMH y sería el resultado de la reparación de la ruptura de las cadenas de ADN, reemplazo de las células que fueron destruidas por el carcinógeno o alargamiento de la población de células proliferativas debido al estímulo de la actividad mitótica en la base de las glándulas. Sandforth et al(577) describen una correlación entre el aumento en la proliferación celular y la duración de exposición al carcinógeno con una meseta después de las 24 semanas. Otros autores describen una caída en el índice mitótico después de 48 horas de exposición al carcinógeno. En el presente estudio los animales recogidos en etapas precoces de la carcinogénesis eran sacrificados una semana después de la última inyección(577).

En todos los grupos de estudio las medias del porcentaje de células en fase S son inferiores a los publicados previamente(588).

Los estudios estadísticos del índice de proliferación proporcionan resultados inesperados, con diferencias significativas en los valores medios del IP entre la mucosa normal y tumoral de ratas inyectadas con DMH, y con diferencias entre los dos grupos control. En estos aspectos parece que los resultados obtenidos con el estudio del porcentaje de células en fase S son más coherentes, y en las lesiones inducidas con DMH es preferible el uso de la fase S para la medición de la proliferación celular.

## VI. Conclusiones

**PRIMERA:** Los tumores colorrectales inducidos con dosis de 21 mg/kg/semana en inyección subcutánea durante 20 semanas de 1,2-Dimetilhidracina aparecen *de novo* sobre la mucosa plana o a partir de glándulas displásicas relacionadas con placas linfoides. No se observa la secuencia pólipo-cáncer en este modelo experimental.

**SEGUNDA:** El número de tumores de intestino grueso y delgado, el número de metástasis y la distribución de los tumores depende de las dosis de inducción tumoral con Dimetilhidracina.

**TERCERA:** En la mucosa normal de rata la afinidad de las lectinas muestra diferencias regionales entre los cuatro segmentos colónicos, y entre las células de los distintos niveles de las criptas. Estas diferencias sugieren variaciones en el estado de glicosilación de los glicoconjugados en relación a la diferenciación celular y al segmento anatómico del intestino grueso.

**CUARTA:** Los patrones de reactividad de las lectinas en los carcinomas de intestino grueso difieren notablemente de la mucosa normal no tratada con carcinógeno. La PNA modifica la reactividad de los tumores de todos los segmentos anatómicos, mientras que el cambio de patrón de la UEA-I queda confinado en los tumores de los segmentos distales.

**QUINTA:** La localización tumoral no representa variaciones sustanciales en el patrón de reactividad de las lectinas.

**SEXTA:** Los patrones normales de reactividad de las lectinas sufren cambios progresivos con la inducción tumoral con DMH. La PNA altera su patrón de unión a lo largo de las criptas y en todos los segmentos, y la UEA-I se expresa en los segmentos distales. La observación con MES en forma de retrodispersados confirma un cambio precoz en los patrones de reactividad de las lectinas.

**SÉPTIMA:** En líneas generales, los glicoconjugados de la mucosa transicional del intestino grueso de la rata difieren de la mucosa normal no tratada y neoplásica.

**OCTAVA:** Los patrones en la distribución de los glicoconjugados de los focos de predisplasia y de las glándulas atípicas asociadas a placa linfóide son diferentes a los de la mucosa normal y tumoral, y difieren entre ellos. Es decir, son dos lesiones potencialmente neoplásicas con diferente estado de glicosilación.

**NOVENA:** Los glicoconjugados de la mucosa transicional del intestino grueso de la rata muestra un patrón similar al observado en la mucosa macroscópicamente normal de ratas inyectadas con DMH, estos cambios expresan un cambio premaligno del epitelio.

**DÉCIMA:** La expresión de glicoconjugados en tumores de rata es independiente del tipo histológico, grado de diferenciación y estadio de Dukes.

**UNDÉCIMA:** Los tumores de intestino grueso inducidos con DMH en ratas son diploides por citometría de flujo. Son tumores biológicamente diferentes a los humanos.

**DUODÉCIMA:** En muestras de colon normal y tumoral se observan diferencias regionales en los parámetros de proliferación celular.

**DECIMOTERCERA:** El porcentaje de células en fase S del colon tumoral y macroscópicamente normal de ratas tratadas con DMH son similares, sugiriendo que existe un cambio premaligno difuso del epitelio con características proliferativas semejantes al maligno.

**DECIMOCUARTA:** Los parámetros de proliferación celular en los tumores inducidos con DMH en la rata no muestran diferencias respecto al tipo histológico, grado de diferenciación y Dukes.

Como **CONCLUSIÓN FINAL** del trabajo de investigación realizado se puede:

1. Confirmar la primera hipótesis, pues se ha comprobado que la mucosa colónica macroscópicamente normal de rata exhibe cambios secuenciales en la expresión de glicoconjugados en las etapas preneoplásicas, precursoras de la aparición tumoral.
2. Confirmar también la segunda hipótesis, al haber obtenido un patrón de enlace alterado en las criptas aberrantes y focos de displasia asociados a placa linfoide.
3. Confirmar parcialmente la tercera hipótesis puesto que si bien el estudio por citometría de flujo muestra diferencias respecto al segmento estudiado del colon, en cambio no se observan respecto al resto de variables clínicas y anatomopatológicas.
4. Rechazar la cuarta hipótesis, puesto que no existen cambios evidentes por citometría de flujo de las muestras macroscópicamente normales en etapas preneoplásicas, respecto al grupo control.

## VII. Resumen

El cáncer colorrectal es la tercera causa de mortalidad y morbilidad en los países occidentales(1),(2). En el pasado la información relacionada con esta alteración se ha derivado en gran medida de la observación clínica. La dificultad de realizar estudios prospectivos de los factores etiopatogénicos del cáncer de colon humano, hace necesario la inducción de neoplasias colónicas experimentales en animales con carcinógenos químicos. Estos estudios han aportado medios adicionales para investigar algunas de las características biológicas de estos tumores. La 1, 2-Dimetilhidracina es un carcinógeno efectivo y selectivo de colon en inyección subcutánea en la rata(193). Los tumores colónicos inducidos con DMH en roedores muestran remarcable semejanza histopatológica con la neoplasia humana(206).

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(575),(589) , 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. La aplicación de las lectinas en secciones de intestino grueso permite observar diversos patrones de localización celular y subcelular de los glicoconjugados del epitelio colónico(463).

En la pasada década la posibilidad de realizar estudios citométricos en muestras parafinadas ha facilitado la realización de estudios prospectivos para conocer nuevos factores predictivos de la evolución de pacientes con cáncer colorrectal.

El conocimiento de la cinética celular de los tumores colónicos y de la mucosa expuesta a la DMH en roedores mediante citometría de flujo, y de los glicoconjugados mediante lectinas pueden proporcionar claves en la patogenia del cáncer de colon y ayudar a una pronta detección de la transformación neoplásica.

## MATERIAL Y MÉTODO

### Animales y diseño experimental

172 Ratas Sprague-Dawley de 10 semanas de vida alimentadas con dieta standard de laboratorio y agua ad libitum, se dividieron en varios grupos de estudio:

Grupo A: 10 ratas control sin tratamiento, sacrificadas con dosis letal de hidrato de cloral entre las 34 y 44 semanas de vida.

Grupo B: 42 ratas recibieron inyecciones s.c. de 1,2-Dimetilhidracina (SIGMA®) a dosis de 21 mg/kg/semana disuelto en EDTA a pH 6,5 durante 20 semanas, con sacrificio entre las 24 y 34 semanas de la primera inyección.

Grupo C: 60 animales recibieron iguales dosis de carcinógeno y se sacrificaron cada 2 semanas hasta la 30 de la primera inyección.

Grupo D: 20 ratas fueron inyectadas con DMH a dosis de 10mg/kg/semana durante 20 semanas y sacrificadas entre las 24 y 36 semanas de la primera exposición.

Grupo E: 20 ratas recibieron inyección de EDTA exclusivamente y se sacrificaron en los mismos periodos que las ratas del grupo B.

Se extrajo el colon y se tomaron muestras de los cuatro segmentos (ciego, colon ascendente, colon transverso y colon descendente) de aspecto macroscópicamente normal y

de todos los tumores. Para su inclusión en parafina las muestras fueron fijadas con formalina al 4 %, mientras que las muestras destinadas a microscopía electrónica de scanning se fijaron 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.

### **Investigaciones morfológicas**

Las muestras incluidas en parafina y en secciones de 5  $\mu\text{m}$  fueron teñidas con hematoxilina-eosina, para la clasificación de los tumores y para observar la presencia de lesiones sobre mucosa aparentemente normal mediante microscopía óptica convencional.

Para la observación ultraestructural con microscopía electrónica de scanning las muestras se lavaron con tampón fosfato y se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol y se sometieron a punto crítico. Las muestras se recubrieron con una capa fina de oro y se montaron de forma convencional.

### **Métodos citoquímicos**

Secciones de parafina de muestras normales y tumorales fueron teñidas mediante el método PAS-AB para diferenciar la presencia de mucinas ácidas y neutras en la mucina de las células caliciformes(564).

### **Métodos histoquímicos con lectinas**

Para el estudio de los glicoconjugados se han usado las lectinas *Glycine max* (SBA), *Griffonia simplicifolia-II* (GSA-II), *Arachis hypogaea* (PNA) y *Ulex europaeus-I* (UEA-I) (SIGMA®) conjugadas con oro coloidal de 30 nm según el método de Frens(421), usando como agente reductor citrato trisódico. Se ha ajustado el pH del oro coloidal al punto isoeléctrico (pI) de cada una de las lectinas(566) y se ha determinado la cantidad óptima de lectina necesaria para estabilizar la solución mediante el test de floculación de la sal(567). La solución se ultracentrifuga a 45.000 r.p.m. durante 45 minutos a 4° C, y se extrae el pellet o complejo-proteína oro. Posteriormente se realiza un banco de diluciones para obtener la concentración óptima de lectina, siendo ésta la que conduce a una absorbancia de 0,40-0,42 medida por convenio a una densidad óptica de 520 nm(497). Los complejos lectina-oro en PBS se suplementan con 1 mM de Cloruro Cálcico y 1 nM de Cloruro Magnésico más 0,5 % de albúmina bovina, puesto que algunas lectinas necesitan la presencia de estos metales pesados para mantener un localización de enlace activa; y 0,05 % de TWEEN 20 (SIGMA®), para inhibir la interacción del enlace de lectina con carbohidratos a través de enlaces hidrofóbicos. Se practicaron controles de especificidad, con incubaciones control con los azúcares correspondientes para cada lectina.

*Microscopía óptica:* Se incuban los portas desparafinados e hidratados con el complejo lectina-oro durante 45 minutos a temperatura ambiente.

Las muestras de cada uno de los cuatro segmentos normales e inyectadas con DMH, así como de todos los tumores se han observado con microscopía óptica convencional tras intensificación con plata (Silver Enhancing kit, BIOCELL®)

*Microscopía electrónica de scanning:* Las muestras se lavan con tampón fosfato, se tratan con cloruro amónico 0,15 M durante 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear los grupos aldehído, se lavan de nuevo con PBS y se incuban durante 45 minutos a temperatura con el complejo lectina-oro. Se realizan nuevos lavados con PBS y se procede a la deshidratación y recubrimiento de las muestras con una capa fina de carbón.

Se observaron con microscopía electrónica de scanning (MES) (JSM 840, JEOL® y

S2300, HITACHI®) en modo de imagen de electrones retrodispersados los glicoconjugados enlazados a lectina de la superficie epitelial de la mucosa colónica de los mismos segmentos, tanto de la mucosa normal, como tumoral y macroscópicamente normal de ratas inyectadas con DMH en etapas sucesivas de la carcinogénesis.

### Citometría de flujo

Para el procesado de las muestras parafinadas de colon de rata por CMF se usó una modificación de la técnica de Hedley(481). Se obtuvieron secciones de tejido de 50 m, se desparafinaron con xilol y rehidrataron con concentraciones decrecientes de etanol. Las muestras fueron disgregadas mecánicamente con la ayuda de un bisturí y tratadas con pepsina al 0,5 % en cloruro sódico al 9 % a pH 1,5 durante 45 minutos al baño María. Posteriormente, se centrifugaron durante 10 minutos a 2.000 r.p.m. a temperatura ambiente y el tejido se resuspendió en PBS agitando con un vórtex y se filtró con una malla de nylon de 50  $\mu$ m de poro y se resuspende con yoduro de propidio y RNAasa (DNA prep Reagent, COULTER®). Para el análisis se ha empleado un citómetro de flujo EPICS PROFILE I (COULTER®), para cada histograma se adquirieron un total de 50.000 eventos. Se identificó la presencia de uno o más picos de células en fase G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>. Para la interpretación del ciclo celular se empleó el programa informático MUTICYCLE®, Phoenix Flow Systems.

Se excluyeron del estudio los histogramas con un coeficiente de variación del pico G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> ≤ 10, no se obtuvo un pico reconocible de G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>, existía una pobre discriminación del ruido de fondo o el número de núcleos adquiridos era inferior a 25.000.

### Análisis estadístico

Con todos los parámetros recogidos se construyó una base de datos matricial e informatizada y se realizó el estudio estadístico de los datos con el programa informático SPSS para Windows (SPSS Inc, MICROSOFT®). El grado de significación se ha establecido para una  $p \leq 0,05$ . Las variables cualitativas se han estudiado mediante una prueba de independencia de  $\chi^2$ , con corrección de Yates o la prueba exacta de Fischer. Para el estudio de relación entre variables cualitativas y cuantitativas se ha empleado la prueba de Kruskal-Wallis y modelos de regresión lineal simple para el estudio entre variables cuantitativas(570).

## RESULTADOS

### Aspectos morfológicos

*Microscopía óptica:* Los animales de los grupos control A y E no presentaron lesiones neoplásicas. En la tabla siguiente se resumen los resultados para cada uno de los grupos inyectados con DMH.

Dieciséis animales del grupo B (50 %) presentaron metástasis. Un 8,45 % de las lesiones benignas y malignas se asociaban a placa linfoide.

Variable	Categoría	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D
Localización	Ciego	7 (9,8 %)	14 (21,5 %)	4 (28,6 %)
	C. Ascendente	27 (38,1 %)	12 (18,5 %)	8 (57,1 %)
	C. Transverso	18 (25,3 %)	21 (32,3 %)	2 (14,3 %)
	C. Descendente	19 (26,8 %)	18 (27,7 %)	
	Proximal	34 (47,9 %)	26 (40,0 %)	12 (85,7 %)

	Distal	37 (52,1 %)	39 (60,0 %)	2 (14,3 %)
Macroscopía	P. pediculado	19 (27,5 %)	10 (22,2 %)	1 (7,1 %)
	P. sesil	13 (18,9 %)	22 (48,9 %)	6 (42,9 %)
	T. exofítico	27 (39,1 %)	11 (24,5 %)	5 (35,7 %)
	T. ulcerado	10 (14,5 %)	2 (44,4 %)	2 (14,3 %)
Tamaño *	≤ 0,8 cm	49 (69,0 %)	32 (74,4 %)	10 (71,4 %)
	> 0,8 cm	22 (31,0 %)	11 (25,6 %)	4 (28,6 %)
Tipo histológico	Adenocarcinoma	31 (43,7 %)	12 (18,5 %)	3 (21,4 %)
	C. mucinoso	21 (29,6 %)	9 (13,8 %)	7 (50,0 %)
	C. in situ	5 (7,0 %)	5 (7,7 %)	
	Adenoma	1 (1,4 %)		
	D. leve	1 (1,4 %)	8 (12,3 %)	
	D. moderada	8 (11,3 %)	24 (36,9 %)	4 (28,6 %)
	D. severa	4 (5,6 %)	7 (10,8 %)	
		Lesión benigna	14 (19,7 %)	39 (60,0 %)
	Lesión maligna	57 (80,3 %)	26 (40,0 %)	10 (71,4 %)
Diferenciación	Moderado	24 (77,4 %)	12 (100 %)	1 (33,3 %)
	Poco	7 (22,6 %)		2 (66,67 %)
Dukes	A	18 (34,7 %)	5 (23,8 %)	5 (50,0 %)
	B	15 (28,8 %)	13 (61,9 %)	2 (20,0 %)
	C	19 (36,5 %)	3 (14,3 %)	3 (30,0 %)
Placa	si	6 (8,4 %)	26 (40,0 %)	5 (35,7 %)
	no	65 (91,6 %)	39 (60,0 %)	9 (64,3 %)
Tumores sincrónicos	si	56 (78,8 %)	52 (80,0 %)	5 (35,7 %)
	no	15 (21,2 %)	13 (13,0 %)	9 (64,3 %)
Tumores I. Delgado	si	41 (57,7 %)	19 (29,2 %)	2 (4,3 %)
	no	30 (42,3 %)	46 (70,8 %)	12 (85,7 %)
SBA	si	23 (76,7 %)	19 (90,5 %)	8 (88,9 %)
	no	7 (23,3 %)	2 (9,5 %)	1 (11,1 %)
GSA-II	si	23 (79,3 %)	15 (78,9 %)	5 (71,4 %)
	no	6 (20,7 %)	4 (21,1 %)	2 (28,6 %)
PNA	si	16 (88,9 %)	12 (57,1 %)	4 (100 %)
	no	2 (11,1 %)	9 (42,9 %)	
UEA-I	si	23 (74,2 %)	19 (86,4 %)	7 (100 %)

	no	8 (25,8 %)	3(13,6 %)	
--	----	------------	-----------	--

**Tabla 7-1**

Variables estudiadas para cada grupo inyectado con DMH.

La mucosa macroscópicamente normal de ratas tratadas con DMH (grupo B) observada por MO exhibe cambios importantes respecto a la normal, con hipercromatismo, pseudoestratificación, alto índice mitótico y pérdida de moco muy evidente. También se observa la presencia de focos de criptas aberrantes.

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 observó a las 16 semanas.

La mucosa de aspecto normal muestra alteraciones precoces tras la inducción tumoral con DMH, a las 2 semanas se observaron grupos de criptas aberrantes en la zona apical. El ciego exhibió disminución de la cantidad de moco, hipercromatismo y aumento del tamaño nuclear, estando los otros segmentos más conservados y apareciendo lesiones cada vez más evidentes. En este grupo el 8,47 % de las ratas presentaron metástasis. El 40% de las lesiones se asociaban a placa linfóide.

En el grupo D el 55 % de los animales presentaron tumoraciones colónicas. Se observaron tres adenocarcinomas y 7 carcinomas mucinosos. El 14,28 % de las ratas presentaron metástasis. La mucosa normal de este grupo mostraba una arquitectura más conservada que la del grupo B.

*Microscopía electrónica:* El estudio de la superficie epitelial del colon de rata tratado con dosis de 21 mg/kg/semana de DMH muestra una pérdida (fenestraciones) o ausencia del moco que recubre la mucosa. Se observa una pérdida de microvellosidades y células caliciformes, sobre todo en el ciego, y una desestructuración de los pliegues de la mucosa. El epitelio colónico de ratas tratadas con DMH a dosis de mg/kg/semana se mostró mejor conservado que el de las ratas que recibieron altas dosis.

Las lesiones tumorales se muestran como grupos de células que protruyen en la luz, acompañadas de depresiones del epitelio. Las células absortivas pierden su aspecto poligonal y las aberturas crípticas están distorsionadas y comprimidas, y disminuidas en número o ausentes.

### **Histoquímica con la tinción AB-PAS**

Evidentes diferencias regionales y distinta distribución a lo largo de la cripta se han observado con esta tinción en el colon de rata normal.

La mucosa normal de ratas tratadas con DMH a dosis altas mostró disminución de la tinción de las mucinas ácidas y neutras, siendo estas alteraciones más evidentes en el ciego.

En general se observó una disminución en la intensidad de tinción de la secuencia AB-PAS en las ratas del grupo D, manteniéndose la positividad para la tinción AB y siendo más evidente la disminución de las mucinas neutras.

### **Histoquímica con lectinas**

*Microscopía óptica:* La observación del colon de rata normal incubado con lectinas muestra un patrón característico para cada una de ellas. Las lectinas SBA, GSA-II y PNA muestran enlace en toda la longitud del epitelio colónico, mientras que el colon descendente no muestra reactividad para la UEA-I. Se observan diferencias de enlace locales, a lo largo de la cripta. La GSA-II se encuentra a nivel basal, excepto en colon ascendente en que se



expresa en toda la longitud. La UEA-I se expresa en toda su longitud en el ciego y es basal en colon ascendente.

La expresión de enlace de los tumores según los grupos se muestra en la [Tabla 7-1](#).

En la mucosa macroscópicamente normal de ratas en etapas preneoplásicas no se observaron cambios destacables en el patrón de enlace de la lectina SBA y GSA-II, por el contrario la PNA se expresó a nivel del citoplasma de las células caliciformes en etapas precoces de la carcinogénesis, así como la lectina UEA-I que mostró reactividad en el colon descendente a partir de la semana 16.

*Microscopía electrónica de scanning:* La observación en modo de electrones retrodispersados de la superficie epitelial del colon normal muestra evidentes diferencias regionales en la expresión de glicoconjugados. Las lectinas SBA y UEA-I se expresan en mayor medida a nivel del ciego. No se observa reactividad para las lectinas GSA-II y PNA.

Las muestras de aspecto normal del grupo C exhibieron cambios precoces en la expresión de lectinas respecto a la mucosa normal. Se hizo presente la reactividad de GSA-II y PNA, y SBA y UEA-I se expresaron en toda la longitud del colon.

### Citometría de flujo

	Normal	DMH-Normal	DMH-Tumor	EDTA	Preneoplásico
GOG 1	83,1	86,6	87,5	89,61	89,96
G2M	5,03	5,91	4,84	4,72	3,95
S	6,21	7,43	7,65	5,66	6,07
IP	11,25	11,25	12,49	10,38	10,03

**Tabla 7-2**

Porcentaje medio de las fases del ciclo celular e IP de los grupos de estudio.

### Estudio comparativo

El tipo histológico muestra diferencias significativas en cuanto a la localización tumoral, siendo más frecuente la presencia de adenocarcinomas en el colon descendente. El tamaño tumoral guarda relación con el aspecto macroscópico y con el tipo histológico tumoral. Los carcinomas mucinosos se encuentran con mayor frecuencia en Dukes C. El enlace de lectinas no muestra relación con ninguna de las variables anatomopatológicas: tipo histológico, grado de diferenciación o estadio de Dukes.

En el grupo D no se observó ningún tumor a nivel de colon descendente, se observa un predominio de la localización proximal cuando se administran bajas dosis de carcinógeno. En el grupo B se observó una mayoría de tumores exofíticos, mientras que en el grupo C eran de tipo polipoideo, siendo estas diferencias significativas. No existen diferencias significativas entre los grupos de estudio y la presencia de tumores malignos. El grupo B muestra una mayoría de lesiones asociadas a otros tumores colorrectales y de intestino delgado sincrónicos. El grupo de estudio en etapas preneoplásicas muestra una mayor asociación a placa linfoide.

Las lectinas SBA y GSA-II no mostraron diferencias de enlace entre los grupos. Se observan diferencias de enlace entre los grupos B y C para la PNA. Todos los tumores del grupo D mostraron enlace para PNA y UEA-I.

Las muestras de colon en todos los grupos muestran diferencias significativas en el porcentaje de células en fase S según los segmentos estudiados. Existen diferencias entre los grupos de estudio. No existen diferencias entre la mucosa normal y tumoral de ratas tratadas con DMH a dosis de 21 mg/kg/semana.

## DISCUSIÓN

La morfología general de los tumores inducidos por DMH semeja los descritos previamente por otros autores(212),(234).

Dosis de 21 mg/kg/semana durante 20 semanas proporcionan una tasa tumoral en el intestino grueso del 82,05 %. Se han obtenido unas tasas inferiores a las de otros estudios que oscilan entre el 90 y el 100 % (166),(195). El número medio de tumores invasivos por animal es de 1,26. Con dosis de 10 mg/kg/semana durante el mismo periodo se obtiene una tasa del 55 %, con una media de tumores invasivos por rata de 0,5, inferior a la publicada en otras series(206).

En conjunto en todos los animales usados en el modelo experimental se han observado un 60,22 % de adenocarcinomas no-mucinosos, considerando además los carcinomas in situ. Las cifras de tumores mucinosos (39,78 %) son superiores a las obtenidas en otros estudios, en los que suponen un 15 % del total de tumores(206).

En este estudio la mayoría de los tumores son invasivos (89,25 %), con cifras similares a las observadas por Teague(320), y en 1 solo caso se describen adenomas, a pesar de que los animales recibían dosis altas y bajas de carcinógeno, y distintos tiempos de inducción. El adenoma observado en el estudio se observó en una rata que recibió altas dosis de carcinógeno durante 20 semanas. Estos resultados difieren de los publicados por otros autores con alta proporción de adenomas(216),(314) y corroboran otros que afirman que en la rata la mayoría de adenocarcinomas aparecen de novo sobre mucosa plana(208),(209).

Otra diferencia sustancial respecto a la literatura se refiere a la localización tanto de las lesiones benignas como malignas. Mientras en el presente estudio se situaban con mayor frecuencia en colon ascendente tanto en animales tratados con altas como con bajas dosis de DMH; otros autores describen el predominio distal de las neoplasias(208),(211) , (216) ,(303) , otros las observan a nivel de la flexura mayor(314) (intersección entre colon transversal y descendente en este estudio), mientras otros encontraban una alta proporción de tumores en el ciego adyacente al íleon en ratones Swiss(216).

Se han observado diferencias entre los tipos histológicos y la localización tumoral: en el colon descendente existe una mayoría de adenocarcinomas no mucinosos, mientras en el colon transversal y el ciego se objetiva una mayor frecuencia de carcinomas mucinosos. En la literatura se recoge también una mayoría de adenocarcinomas no mucinosos en el colon izquierdo(211).

Otros investigadores describen hallazgos histopatológicos distintos entre el colon proximal y distal, observando que los adenocarcinomas mucinosos son más frecuentes en el colon ascendente(199), en asociación con colecciones de folículos linfoides(206),(300) y se sugiere que la histogénesis y los procesos de crecimiento del carcinoma son distintos en el colon proximal respecto al distal(571). Este aspecto no ha sido confirmado, puesto que no se han observado diferencias entre la asociación a placa linfóide y los tipos histológicos malignos, se observaban folículos linfoides en asociación con adenocarcinomas y con carcinomas mucinosos. Tampoco se han observado diferencias respecto a la localización tumoral, ya que en los cuatro segmentos colónicos los tumores podían estar asociados a placas linfoides.

El tratamiento con bajas dosis de carcinógeno (10 mg/kg/semana) durante 20 semanas

reduce el número de carcinomas de intestino grueso y delgado por rata y el número de animales con metástasis respecto al grupo de altas dosis de DMH, tal como habían descrito previamente otros autores(167). Sin embargo, no hay diferencias respecto a los tipos histológicos y grado de diferenciación. La principal dificultad para el uso de esta dosis y durante este periodo de tiempo como modelo experimental es la ausencia de lesiones en el colon descendente, constituyendo la principal diferencia respecto al carcinoma de intestino grueso humano.

En el grupo de ratas inyectado con dosis de 21 mg/Kg/semana de DMH y sacrificio en etapas precoces se detectó el primer tumor maligno en la semana 16 de inducción. Greener(155) encuentra tumores a las 18 semanas en ratas inyectadas con 20 mg/kg del carcinógeno, desarrollándose en la mayoría de los animales los cánceres definitivos a las 24 semanas de tratamiento. Otros estudios reflejan un periodo de latencia idéntico a dosis de 10-20 mg/kg/semana(196).

Los tumores mucinosos se encuentran en grados de invasión superior (78,38 % en Dukes B o C) comparado con los adenocarcinomas no mucinosos. La relativamente baja invasividad de las lesiones no mucinosas queda reflejada en la alta proporción de Dukes A (53,57 %) si asociamos los 10 carcinomas in situ observados en el estudio. Los resultados obtenidos son similares a los observados por otros investigadores(199),(206).

Algunos trabajos describen que los tumores mucinosos son los únicos que se asocian con metástasis(300), mientras que en el presente estudio tanto los tumores mucinosos como los no mucinosos muestran metástasis: Es más, los tumores con heterogeneidad morfológica presentan metástasis con ambos componentes.

La exposición al carcinógeno DMH induce cambios morfológicos precoces en las glándulas de la mucosa de aspecto macroscópico normal en etapas preneoplásicas. La presencia de glándulas displásicas asociadas a placa linfoide es un evento precoz, ya visible en las primeras 4 semanas de inyección con DMH a dosis de 21 mg/kg/semana.

No pudimos detectar en ningún caso la aparición de un tumor invasivo originado dentro de un adenoma en la rata, trabajos similares confirman nuestros resultados(178),(188). Incluso Maskens(193), describió la aparición de los pólipos benignos en periodos de latencia superiores a los del carcinoma, también en nuestro caso el hallazgo del único adenoma del estudio se obtuvo de una rata sacrificada a las 34 semanas, es decir, con un máximo periodo de inducción.

Es importante remarcar la coexistencia de lesiones benignas (displasias, adenoma) y malignas en el tiempo. Aunque en este grupo se observara con mayor frecuencia la presencia de lesiones benignas, tipo displasia, no existe una secuencia en la aparición de lesiones a partir de un cierto periodo de latencia. Estos resultados niegan la secuencia adenoma-carcinoma en el modelo animal de carcinogénesis inducida con DMH, propia de la neoplasia colónica humana(68),(572). Por otro lado, confirman la relación de las placas linfoides con la degeneración neoplásica.

La transformación de la mucosa del intestino grueso se caracteriza por acumulación de lesiones cada vez más aberrantes a medida que aumenta la exposición al carcinógeno. Desde que Spjut y Smith en 1977(574), describieran las lesiones focales predisplásicas en ratas tratadas con DMH, numerosos estudios se han efectuado al respecto(572),(575). Las criptas aberrantes o focos de predisplasia son criptas de tamaño aumentado, línea epitelial más gruesa y zona pericriptal aumentada, que se sitúan generalmente en la parte superior de la cripta(572). Los focos de predisplasia se consideran la primera etapa en el desarrollo de neoplasias colónicas y representan focos neoplásicos clonogénicos, a partir de los cuales se desarrolla el tumor, y sostienen el origen clonal de la neoplasia(572).

En este estudio las lesiones de predisplasia afectando a glándulas aisladas o grupos de

2 glándulas se observaron a las dos semanas de iniciado el tratamiento con DMH, siendo más evidente en la porción apical del epitelio. De forma concomitante lesiones más difusas y de iguales características aparecieron en el ciego, y más ligeramente en colon ascendente, mientras en colon transversal y descendente la morfología estaba conservada. Estos hallazgos difieren de los vistos por James et al(235), en otra especie animal, con predominio de las lesiones en el colon distal. Otros autores describen ausencia de afectación del ciego durante el periodo de tratamiento(577).

Al igual que los resultados presentados por otros investigadores(211), (575) con el tiempo de tratamiento aumenta la frecuencia y el tamaño de estas lesiones en cada segmento intestinal.

Existe una disminución progresiva en el número de células caliciformes y una disposición irregular del núcleo, menos evidente en el colon descendente, sugiriendo que éste no es el segmento "diana" por excelencia de la carcinogénesis inducida por DMH en este modelo.

Los hallazgos del presente estudio experimental sugieren que las áreas de criptas aberrantes pueden interpretarse como lesiones precursoras en el desarrollo del cáncer de colon y pueden ser de gran importancia en el diagnóstico de pacientes con riesgo de padecer esta neoplasia.

En términos amplios el MES ha sido usado generalmente para examinar la topografía de las superficies naturalmente expuestas de células y tejidos. En contraste con las secciones de microscopía electrónica de transmisión, la MES nos permite un análisis tridimensional de los eventos que ocurren en la superficie celular. Diversos estudios muestran las características de la mucosa normal y tratada con DMH mediante MES, sin embargo, estos estudios no se refieren a todos los segmentos del intestino grueso(313),(579). La observación con MES muestra clara diferencias regionales en el aspecto de la mucosa normal de la rata a pocos aumentos, aunque la superficie epitelial está cubierta en su mayoría por una densa capa de moco. El aspecto, forma y número de las criptas varía en los cuatro segmentos del intestino grueso.

Los cambios morfológicos observados durante la carcinogénesis experimental con DMH indican que hay un patrón definido de anomalías mucosales progresivas empezando mucho antes del desarrollo de tumores focales de colon, que estas alteraciones son dosis dependiente, y que son más evidentes en el colon proximal, corroborando que es esta región el órgano diana de este modelo experimental.

Las neoplasias del intestino grueso de la rata no muestran diferencias ultraestructurales según la localización colónica y se asemejan a las descritas por otros autores(313),(579).

La aplicación de las distintas lectinas en muestras de intestino grueso permiten observar diversos patrones de localización de los glicoconjugados del epitelio. Los resultados obtenidos con lectinas conjugadas con oro coloidal en ratas controles normal no difieren de los presentados por otros autores usando lectinas conjugadas con otros marcadores(392),(462) (465).

Cada una de las lectinas usadas en el estudio ha mostrado un patrón de reactividad propio y característico, mostrando diferencias a lo largo de las criptas, así como a nivel de los distintos segmentos del colon normal de rata. Las diferencias más notables se han observado con la UEA-I. Esta lectina marca la mucina de ciego y colon ascendente, pero no la mucosa del colon descendente, teniendo el colon transversal un comportamiento mixto entre colon ascendente y descendente. Las lectinas SBA, GSA-II y PNA muestran enlace en todos los segmentos colónicos. La SBA reconoce específicamente residuos no reducidos de N-acetil-D-galactosamina, situados en la posición terminal de las glicoproteínas.

Las diferencias regionales en la expresión de glicoconjugación pueden correlacionarse con la distinta actividad de las glicosiltransferasas y glicosidasas en los segmentos proximales y distales del intestino grueso de la rata.

Las lectinas muestran asimismo diferencias de enlace en los distintos niveles de las criptas. Las lectinas SBA y GSA-II presentan diferencias a lo largo de las criptas y en su comportamiento de unión a nivel citoplasmático o supranuclear en las distintas localizaciones colónicas. En el ciego, la SBA se une a la mucina de las células caliciformes a nivel basal, en los tercios medios y apical la situación es supranuclear. En el resto del colon se sitúa en citoplasma de las células caliciformes en toda la longitud de la cripta. Por lo tanto, la N-acetilgalactosamina es un carbohidrato terminal presente en la mucina del intestino grueso, aunque no a todos los niveles. La GSA-II también muestra diferencias locales con mayor afinidad por los segmentos basales. La PNA muestra una disposición constante en todos los segmentos del colon, y su reactividad queda confinada en el área supranuclear de las células caliciformes y columnares. En el ciego, la UEA-I se une a la mucina de las células caliciformes en toda la longitud de la cripta, en el colon ascendente de la rata queda confinada a la base de las criptas. Estos gradientes de reactividad se relacionan con el grado de diferenciación celular.

En general, las lectinas usadas en este estudio muestran un patrón de reactividad similar al observado en el colon humano(351),(441) (443),(446) ,(450).

Los patrones de reactividad de las lectinas en las lesiones neoplásicas difieren considerablemente de los de la mucosa normal. Estos cambios observados en los tumores indican una clara modificación del metabolismo de los glicoconjugados en la transformación neoplásica. Las diferencias más notables entre los carcinomas y la respectiva mucosa normal se han observado en todos los segmentos del colon con la lectina PNA y con la UEA-I en el colon descendente, con aumento de la reactividad para dichas lectinas. Por el contrario, la SBA ha mostrado un enlace disminuido en los tumores de colon ascendente respecto a los controles normales, la reducción del enlace indica que hay menos residuos GalNAc terminales no reductores en las cadenas de oligosacáridos de la mucina debido probablemente a una glicosilación incompleta superior de las glicoproteínas en este segmento con altas tasas de neoplasia. La GSA-II no mostró diferencias regionales evidentes en su enlace, aunque tanto en colon ascendente como en transversal normal se encuentran a nivel supranuclear, en las mismas localizaciones tumorales se expresa como una fina tinción de las membranas celulares apicales y en ocasiones del citoplasma de las células caliciformes, y explicaría un aumento de la N-acetilglucosamina en la mucina de las células transformadas.

Los resultados con las lectinas PNA y UEA-I en los carcinomas de rata inducidos con DMH confirman los obtenidos en estudios previos(463),(466) ,(467) y son similares a los observado en el cáncer humano(351),(454).

Los cambios más aparentes se han detectado con la PNA. A diferencia de la mucosa normal, la reactividad de esta lectina en los carcinomas se localiza en la superficie luminal del epitelio, en el material intraglandular y en las vacuolas de mucina de las células tumorales. Las células neoplásicas presentan la capacidad de expresar la estructura D-Gal- $\beta$  (1-3) D-GalNAc en compartimentos donde habitualmente no se encuentra. La PNA ha mostrado afinidad por los tumores de intestino grueso de rata independientemente de la localización tumoral, a diferencia de lo observado por Calderó et al(463), con menor expresión en el colon proximal.

La UEA-I se enlaza con la -L-Fucosa y muestra gran afinidad por las neoplasias de intestino grueso, tal como previamente se ha descrito. Aunque las situadas en el colon ascendente presentan la menor reactividad, con cambios en relación a la mucosa normal, no se observan diferencias significativas entre la localización tumoral y el enlace con esta



lectina. Es decir, en el colon proximal, la  $\alpha$ -L-Fucosa es accesible a la lectina en condiciones normales y está disminuido o no es accesible para todas las neoplasias. A diferencia de lo publicado por otros autores(463) en que la positividad obtenida con la UEA-I no varía con la transformación neoplásica.

Las lectinas SBA y GSA-II no mostraron diferencias entre los grupos de estudio. En el grupo D pudieron estudiarse menos casos con las lectinas PNA y UEA-I, mostrando enlace de lectina todos los tumores de intestino grueso. La lectina PNA mostró diferencias entre los dos grupos que recibieron altas dosis de carcinógeno, la mayoría de los tumores del grupo de inyección más prolongada presentaron enlace de esta lectina a diferencia del grupo de sacrificio más precoz. Este hallazgo podría explicar que periodos prolongados de inducción tumoral incrementan la capacidad de expresar la estructura D-Gal- (1-3) D-GalNAc.

En este estudio hemos observado cambios graduales y progresivos de los glicoconjugados determinados por lectinas de la mucosa del intestino grueso de la rata, según las semanas de exposición al carcinógeno.

Varios autores han descrito un cambio en la producción de moco del colon de rata tratado con DMH(578) (581),(58).

Al igual que en la mucosa neoplásica los cambios regionales más importantes se han observado con las lectinas PNA y UEA-I y asentaban sobre mucosa sin alteraciones epiteliales evidentes. Estos resultados difieren de los publicados por Balzer et al.(468) en ratas Wistar en que no observa cambios en el patrón de enlace de UEA-I respecto a las ratas control ni cambios constantes cáncer-asociados en la mucina con la lectina PNA.

La SBA ha mostrado un patrón irregular de enlace en el ciego y colon descendente, y en general una disminución de la reactividad a partir de la 16ª semana, concomitante a la aparición de lesiones tumorales. La GSA-II ha mostrado disminución de la reactividad en el colon ascendente.

Coincidiendo con la acción tóxica local del carcinógeno en las dos primeras semanas de iniciada la inyección con DMH se observó enlace de la PNA a la mucina de las células caliciformes, que posteriormente desapareció para hacerse constante en la semana 26.

La UEA-I mostró disminución de la reactividad en ciego y colon ascendente y un aumento de la misma en el colon descendente a partir de la semana 16. Estos resultados son congruentes con la observación de un menor enlace en los tumores de este segmento.

Al igual que en el trabajo de Suzuki et al(571) se han observado diferencias en los patrones de enlace de las lectinas entre los carcinomas y/o las glándulas atípicas asociadas a folículos linfoides y la mucosa colónica normal de la rata. Así como entre el enlace de las lectinas en los focos de glándulas predisplásicas y la mucosa normal, tumoral y en las glándulas atípicas asociadas a folículos linfoides de ratas inyectadas con DMH.

Puesto que tanto criptas predisplásicas aberrantes como las glándulas atípicas asociadas a folículos linfoides han sido descritas como lesiones precursoras del cáncer de colon en este modelo experimental, las distintas características en los glicoconjugados de estas lesiones podría establecer dos orígenes distintos de las neoplasias inducidas por DMH.

La reactividad de las lectinas en la mucosa adyacente a los tumores muestra diferencias en relación a la mucosa normal no tratada. Sin embargo, estas alteraciones son menos evidentes respecto a la mucosa macroscópicamente normal de ratas tratadas con DMH. Las diferencias más notables se han observado en el ciego con la lectina GSA-II respecto a la mucosa tratada, con un aumento de la reactividad y también en el ciego con la UEA-I en este caso con disminución de enlace. Estos hallazgos sugieren que los cambios en los glicoconjugados de la mucosa transicional de los tumores inducidos por DMH son similares a los de la mucosa macroscópicamente normal, es más, en este modelo animal el concepto "mucosa transicional" dejaría de ser válido, y se referiría a un cambio premaligno

difuso de la mucosa.

La observación por MES en modo de retrodispersados de las lectinas SBA y UEA-I conjugadas con oro coloidal ha mostrado una vez más las diferencias regionales existentes en el intestino grueso normal de la rata. En ocasiones la mucina de la superficie epitelial no muestra enlace de lectinas y es la mucosa que emerge de la cripta la que sí lo hace, mostrando la afinidad por las lectinas de la mucina de las capas más profundas.

Se observa una disminución en la positividad de los tumores observados por MES, respecto a los mismos observados por microscopía óptica.

En general, la detección de glicoconjugados de superficie del colon de rata mediante BES aporta mayor sensibilidad e información adicional a la observación con microscopía óptica convencional.

Pocos estudios hablan de la citometría de flujo de los tumores de colon inducidos con DMH en ratas. Fischbach et al.(585) estudian 39 carcinomas y 27 adenomas de colon inducidos en ratas con DMH, encontrando un único caso de carcinoma "casi diploide". El resto de las lesiones mostraron un patrón diploide de DNA. Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestra serie, en la que todos los tumores son diploides. Estos hallazgos difieren de los observados en el cáncer de colon humano, con cifras de aneuploidia según las series que oscila entre un 39 y un 82 % (516),(507). A pesar de la similitud histológica de los tumores inducidos en la rata con DMH y los tumores humanos existen evidentes diferencias en la morfología biológica.

Es conocido que la DMH y otros carcinógenos colónicos conducen a una proliferación celular aumentada, lo que es crítico para el proceso de carcinogénesis(166), al existir un mayor contenido de células en el ciclo mitótico que podrían estar en mayor riesgo de transformación maligna(590).

En nuestro estudio, los tumores de intestino grueso de la rata muestran un índice de proliferación superior al de las muestras normales control e inyectadas con EDTA, sin embargo, un índice de proliferación superior ha sido observado en muestras tratadas no tumorales, una posible explicación sería que la mucosa tumoral pierde en parte su capacidad de proliferación frente a las células alteradas no tumorales que aumentan su proliferación y por tanto continúan en riesgo de transformación neoplásica.

La localización tumoral tiene relación con los resultados citométricos si consideramos el índice de proliferación, mostrando los tumores de colon ascendente menor tasa de proliferación y los de ciego la mayor tasa. En el colon normal de ratas control no tratadas el porcentaje de células en fase S muestra diferencias respecto a los segmentos colónicos, siendo también las muestras de colon ascendente las de menor proliferación y las de colon descendente las que presentan fases S más altas. Este dato, es inesperado teniendo en cuenta que en el colon ascendente es donde se da una tasa más alta de tumores colónicos en la rata en este estudio.

Diversos autores(314),(577) ,(593) han descrito diferencias regionales en los parámetros de proliferación usando otras técnicas. Sin embargo, mientras Sandford(577) describe un aumento del compartimento de proliferación celular mucho más evidente en el colon distal, atribuyéndolo a una inadecuada o ausente represión de la síntesis de ADN, McGarrity(593) describe diferencias regionales en los animales control. De forma que los parámetros de proliferación cambian en paralelo en todas las regiones durante la carcinogénesis.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo de los distintos segmentos colónicos no corroboran el cambio en paralelo desde muestras control a muestras tumorales o muestras colónicas macroscópicamente normales de ratas inyectadas. Es más, tanto el porcentaje de células en fase S como el índice de proliferación sufren una ligera disminución en el colon

descendente tumoral y algo más evidente en el colon normal de ratas tratadas con DMH. El mayor aumento de ambos parámetros se da en el colon transversal normal y tumoral. Este distinto comportamiento de los tumores proximales y distales podría ser debido a un origen distinto de los mismos o a que los tumores de colon descendente necesitan un periodo de inducción tumoral superior.

Todos los tumores estudiados por citometría de flujo eran invasivos. No se ha observado la presencia de parámetros de proliferación aumentados en estadios avanzados de Dukes y tumores metastásicos. En el cáncer humano altas fases S se corresponden a un mayor grado invasivo, con tumores en estadios C y D de Dukes(529),(540).

Aunque las diferencias en los parámetros de proliferación no son significativas entre los tumores asociados a placa linfóide y los que no lo están. Los valores medios de fase S son superiores en las neoplasias asociadas a nódulo linfóide.

Los valores de fase S de la mucosa normal y tumoral inyectada con DMH durante los mismos periodos de tiempo son similares, sugiriendo una alteración del patrón de proliferación celular a todos los niveles, por consiguiente existen alteraciones con potencial carcinógeno a nivel de toda la mucosa. Hallazgos similares se han encontrado en mucosa sana de pacientes con cáncer colorrectal(588). Los resultados difieren de los publicados por Fishbach(585) con un notable aumento del porcentaje de fase S en las muestras tumorales respecto a la mucosa normal de ratas expuestas a DMH.

Se han observado diferencias entre los parámetros de proliferación y los grupos de estudio.

Los estudios de la fase S encuentran diferencias entre la mucosa normal (sin tratamiento o inyectada con EDTA), y la mucosa inyectada con DMH durante 21 semanas, tanto normal como tumoral. No observándose diferencias con la mucosa normal de ratas inyectadas hasta la octava semana de inyección. Estos datos irían en contra de otros publicados usando técnicas distintas en que la DMH induciría proliferación celular en etapas precoces de la carcinogénesis(204),(594).



## VIII. Bibliografía

- 1.-1 Luk G D. Epidemiology, etiology, and diagnosis of colorectal neoplasia. *Cur Opin Gastroenterol* 1993; 9: 19-27.
- 2.-2 Jensen O M, Esteve J, Moller H, Renard H. Cancer in the European Community and its member states. *Eur J Cancer* 1990; 26: 1167-1256.
- 3.-Carda P. Cáncer del aparato digestivo. En: Manual de Oncología Básica. DieGoyanes A, Llombart M, Matilla A (eds). Asociación Española contra el Cáncer. Madrid: ISBN; 1989: 121-132.
- 4.-Sánchez V, Borràs J M, Mingot M. Evolución de la mortalidad por cáncer en Cataluña: 1975-1990. *Med Clin* 1994; 102: 606-612.
- 5.-Ransohoff D F, Lang C A. Screening for colorectal cancer. *New Engl J Med* 1991; 325: 37-41.
- 6.-Hill M J, Drasar B S, Aries V, Crowther J S, Hawksworth G, Williams R E. Bacteria and etiology of cancer of large bowel. *Lancet* 1971; 16: 95-100.
- 7.-Beart R W. Colon, rectum, and anus. *Cancer* 1990; 33: 684-688.
- 8.-Sugarbaker P H, MacDonald J S, Gunderson L L. Cáncer de colon y recto. En: DeVita V C, Hellamn S, Rosenberg S A. (eds). Cáncer. Principios y práctica de oncología. Barcelona: Salvat edit.; 1984: 598-660.
- 9.-Kee F. B. Changing site distribution of colorectal cancer. *BMJ* 1992; 18: 158.
- 10.-Obrador A, Benito E. Epidemiología. En: Grau J J, Piqué J M. (eds.). Monografías clínicas en Oncología. Cáncer colorrectal. Barcelona: Edic. Doyma; 1990: 1-11.
- 11.-Eide T J. The Age-, sex-, and site-specific occurrence of adenomas and carcinomas of the large intestine within a defined population. *Scand J Gastroenterol* 1986; 21: 1083-1088.
- 12.-Monnet E, Boutron M C, Faivre J, Milan C. Influence of socioeconomic status on prognosis of colorectal cancer. *Cancer* 1993; 72: 1165-1170.
- 13.-Phillips R L. Role of life-style and dietary habits in risk of cancer among Seventh-Day adventists. *Cancer Res* 1975; 35: 3513-3522.
- 14.-Slattery M L, West D W, Robison L M, French T K, Ford M H, Schuman K L, Sorenson A W. Tobacco, alcohol, coffee, and caffeine as risk factors for colon cancer in a low-risk population. *Epidemiology* 1990; 1: 141-145.
- 15.-Statland B E. Nutrition and cancer. *Clin Chem* 1992; 38: 1587-1594.
- 16.-Goldbohm R A, van den Brandt P A, van 't Veer P, Brants H A, Dorant E, Sturmans F, Hermus R J. A prospective cohort study on the relation between meat consumption and the

risk of colon cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 718-723.

**17.-**Potter J D. Reconciliación de la epidemiología, la fisiología y la biología molecular del cáncer de colon. *JAMA* (ed. esp.) 1993; 2: 303-307.

**18.-**Wynder E L, Reddy B S. Colon cancer prevention. Today's challenge to biomedical scientist and clinical investigators. *Cancer* 1977; 40: 2565-2571.

**19.-**Bartram H P, Gostner A, Scheppach W, Reddy BS, Rao C V, Dusel G, Richter F, Richter A, Kasper H. Effects of fish oil on rectal cell proliferation, mucosal fatty acids, and prostaglandin E2 release in healthy subjects. *Gastroenterology* 1993; 105: 1317-1322.

**20.-**Burkitt D. Related disease-related cause?. *Lancet* 1969; 2: 1229-1231.

**21.-**West D W, Slattery M L, Robinson L M, Schuman K L, Ford M H, Mahoney A W, Lyon J L, Sorensen A W. Dietary intake and colon cancer: sex and anatomic site-specific associations. *Am J Epidemiol* 1989; 130: 883-894.

**22.-**Vogel V G, McPherson R S. Dietary epidemiology of colon cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 1989; 3: 35-63.

**23.-**Steinmetz K A, Potter J D. Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes Control* 1991; 2: 325-357.

**24.-**Lampe J W, Slavin J L, Melcher E A, Potter J D. Effects of cereal and vegetable fiber feeding on potential risk factor for colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1992; 1: 207-211.

**25.-**Stephen A, Cummings J. Mechanism of action of dietary fiber in the human colon. *Nature* 1980; 284: 283-284.

**26.-**Shankar S, Lanza E. Dietary fiber and cancer prevention. *Hematol Oncol Clin North Am* 1991; 5: 25-41.

**27.-**Hill M J, Drasar B S, Williams R E O, Meade T W, Cox A G, Simpson J E P, Morson B C. Fecal bile-acids and clostridia in patients with cancer of the large bowel. *Lancet* 1975; 535-538.

**28.-**Burkitt D P. Epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1971; 28: 3-13.

**29.-**Thorton J R. High colonic pH promotes colorectal cancer. *Lancet* 1981; i: 1083-1087.

**30.-**Walker A R P, Walker B F. Faecal pH and colon cancer. *Gut* 1992; 33: 572.

**31.-**Morales M, Lopis A, Castillo A, Vitoria I. Cancer of the rectum in relation to components of the Spanish diet. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1990; 10: 214-219.

**32.-**Simanowski U A, Seitz H K, Kommerell B. Alcohol y co-carcinogénesis. *Colo-proctology* 1991; 7: 4-6.

- 33.**-Stemmermann G N, Nomura A M, Chyou P H, Yoshizawa C. Prospective study of alcohol intake and large bowel cancer. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 1414-1420.
- 34.**-Garland C F, Garland F C, Gorham E D. Can colon cancer incidence and death rates be reduced with calcium and vitamin D? *Am J Clin Nutr* 1991; 54 (Suppl. 1): S193-S201.
- 35.**-Van der Meer R, Termont D S, De Vries H T. Differential effects of calcium ions and calcium phosphate on cytotoxicity of bile acids. *Am J Physiol* 1991; 260: 142-147.
- 36.**-Lointier P, Meggouh F, Dechelotte P, Pezet D, Ferrier Ch, Chipponi J, Saez S. Receptores de la 1, 25-dihidroxitamina D3 y adenocarcinoma de colon humano. *Br J Surg (edic. esp)* 1991; 78: 435-439.
- 37.**-Lipkin M, Friedman E, Winawer S J, Newmark H. Colonic epithelial cell proliferation in responders and non responders to supplemental dietary calcium. *Cancer Res* 1989; 49: 248-254.
- 38.**-Barsoum G H, Hendrickse C, Winslet M C, Youngs D, Donovan I A, Neoptolemos J P, Keighley M R B. Reducción de la proliferación de las células de las criptas mucosas en los pacientes con pólipos adenomatosos colorrectales mediante suplementos de calcio en la dieta. *Br J Surg (ed. Esp)* 1992; 8: 187-190.
- 39.**-Newmark H L, Lipkin M. Calcium, vitamin D, and colon cancer. *Cancer Res* 1992; 52(Suppl): S2067-S2070.
- 40.**-Willett W C. Selenium, vitamin E, fiber, and the incidence of human cancer: an epidemiologic perspective. *Adv Exp Med Biol* 1986; 206: 27-34.
- 41.**-Shamberger R J, Rukovena E, Longfield A K, Tytko S A, Deodhar S, Willis C E. Antioxidants and cancer. I. Selenium in the blood of normals and cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1973; 863-870.
- 42.**-Shamberger R J. Relationship of selenium to cancer. I. Inhibitory effect of selenium on carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1970; 44: 931-936.
- 43.**-Jacobs M M. Inhibitory effects of selenium on 1,2-dimethylhydrazine and methylazoxy-methanol colon carcinogenesis. *Cancer* 1977; 40: 2557-2564.
- 44.**-Heilbrun L K, Nomura A, Hankin J H, Stemmermann G N. Diet and colorectal cancer with special reference to fiber intake. *Int J Cancer* 1989; 44: 1-6.
- 45.**-Potter J D, McMichael A J. Diet and cancer of the colon and rectum: a case control study. *J Natl Cancer Inst* 1986; 76: 557-569.
- 46.**-Birt D F. Effects of the intake of selected vitamins and minerals on cancer prevention. *Magnesium* 1989; 8: 17-30.
- 47.**-Troll W. Prevention of cancer by agents that suppress oxygen radical formation. *Free*

Radic Res Commun 1991; 12: 751-757.

**48.**-Shibata A, Paganini Hill A, Ross R K, Henderson B E. Intake of vegetables, fruits, beta-carotene, vitamin C and vitamin supplements and cancer incidence among the elderly: a prospective study. *Br J Cancer* 1992; 66: 673-679.

**49.**-Paganelli G M, Biasco G, Brandi G, Santucci R, Gizzi G, Villani V, Cianci M, Miglioli M, Barbara L. Effect of vitamin A, C, and E supplementation on rectal cell proliferation in patients with colorectal adenomas. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 47-51.

**50.**-Slattery M L, Abd-Elghani N, Kerber R, Schumacher M C. Physical activity and colon cancer: a comparison of various indicators of physical activity to evaluate the association. *Epidemiology* 1990; 1: 481-485.

**51.**-Kritchevsky D. Colorectal cancer: the role of dietary fat and caloric restriction. *Mutat Res* 1993; 290: 63-70.

**52.**-Ghadirian P, Cadotte M, Lacroix A, Baillargeon J, Perret C. Colon cancer in seven siblings. *Eur J Cancer* 1993; 29: 1553-1556.

**53.**-Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spiro L, Robertson M, Sargeant L, Krapcho K, Wolff E, Burt R, Hughes J P, Warrington J, McPherson J, Wasmuth J, Lepaslier D, Abderrahim H, Cohen D, Leppert M, White R. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991; 66: 589-600.

**54.**-Kinzler K W, Nilbert M C, Su L-K, Vogesltien B, Bryan T M, Levy DB, Smith K J, Preisinger A C, Hedge P, Mckechne D, Finniear R, Markham A, Groffen J, Boguski M S, Altschul S F, Horii A, Ando H, Miyoshi Y, Miki Y, Nishisho I, Nakamura Y. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991; 253: 661-665.

**55.**-Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P, Markham A, Krusch A J, Petersen G, Hamilton S R, Nilbert MC, Levy DB, Bryan T M, Preisinger AC, Smith K J, Su L-K, Kinzler K W, Vogelstein B. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP in colorectal cancer patients. *Science* 1991; 253: 665-669.

**56.**-Laurent-Puig, Olschwang S, Delattre O, Remvikos Y, Asselain B, Melot T, Validire P, Muleris M, Girodet J, Salmon R J, Thomas G. Survival and acquired genetic alterations in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1992; 102: 1136-1141.

**57.**-Sidransky D, Tokino T, Hamilton S R, Kinzler K W, Levin B, Frost P, Vogelstein B. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 1992; 256: 102-105.

**58.**-Bedenne L, Faivre J, Boutron M C, Piard F, Cauvin J M, Hillon P. Adenoma: carcinoma sequence or "de novo" carcinogenesis? A study of adenomatous remnants in a population-based series of large bowel cancers. *Cancer* 1992; 69: 883-888.

**59.**-Leggett B A, Thomas L R, Knight N, Haeley S, Chenevix-Trench G, Searle J. Exclusion

of APC and MCC as the gene defect in one family with familial juvenile polyposis. *Gastroenterology* 1993; 105: 1313-1316.

**60.**-Lynch HT, Watson P, Smyrck TC, Lanspa S J, Boman B M, Boland C R, Lynch J F, Cavalieri R J, Leppert M, White R. Colon cancer genetics. *Cancer* 1992; 70: 1300-1312.

**61.**-Lynch H T, Smyrk T C, Watson P, Lanspa S J, Lynch J F, Lynch P M, Cavalieri R J, Boland C R. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an update review. *Gastroenterology* 1993; 104: 1535-1549.

**62.**-Los científicos encuentran genes del cáncer colorrectal, aumentando las esperanzas de análisis genético. Editorial. *Annals of Oncology* 1994; 9: 759-765.

**63.**-Kim H, Hen J, Vogestein B, Hamilton S R. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1994; 145: 148-156.

**64.**-Fearon E R, Cho K R, Nigro J M, Kern S E, Simons J W, Ruppert J M, Hamilton S R, Preisinger A C, Thomas G, Kinzler K W. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990; 247: 49-56.

**65.**-Delattre O, Law D J, Remvikos Y, Sastre X, Feinberg A P, Olschwang S, Melot T, Salmon R J, Validire P, Thomas G. Multiple genetic alterations in distal and proximal colorectal cancer. *Lancet* 1989; 1: 353-356.

**66.**-Bishop D T, Burt R W. Genetic epidemiology and molecular genetics of colorectal adenomas and cancer. *Front Gastrointest Res* 1991; 18: 99-114.

**67.**-Benito de las Heras M. Implicaciones de los oncogenes en el cáncer de colon. *Rev Cancer* 1992; 6: 156-159.

**68.**-Burmer G C, Levine D S, Kulander B G, Haggitt R C, Rubin C E, Rabinovitch P S. C-Ki-ras mutations in chronic ulcerative colitis and sporadic colon carcinoma. *Gastroenterology* 1990; 99: 416-420.

**69.**-Eddy D M, Nugent F W, Eddy J F, Coller J, Gilbertsen V, Gottlieb L S, Rice R, Sherlock P, Winawer S. Screening for colorectal cancer in a high risk population. Results of a mathematical model. *Gastroenterology* 1987; 92: 682-92.

**70.**-Iwama T, Mishima Y. Mortality in young first-degree relatives of patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer* 1994; 73: 2065-2068.

**71.**-Yamakazi Y, Ribeiro M B, Sachar D B, Aufses A H, Greenstein A J. Malignant colorectal strictures in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1991; 69: 121-126.

**72.**-Axon A T. Cancer surveillance in ulcerative colitis - a time for reappraisal. *Gut* 1994; 35: 587-589.

**73.**-Friedman G D, Golhaber M K, Quesenberry C P. Colectomía y cáncer de intestino

grueso. *Lancet* (ed esp) 1987; 11: 129-132.

**74.**-Bassa A, Garau I, Cabeza E. Aspectos generales del cáncer colorrectal. *Gastroenterol Hepatol* 1992; 15: 2-6.

**75.**-Medrano J. Detección precoz. En: Grau J J, Piqué J M. (eds.). *Monografías clínicas en Oncología. Cáncer colorrectal*. Barcelona: Edic. Doyma; 1990: 13-18.

**76.**-Winawer S J, Zauber A G, Stewart E, O'Brien M J. The natural history of colorectal cancer. Opportunities for intervention. *Cancer* 1991; 67: 1143-1149.

**77.**-Mandel J S, Bond J H, Church T R, Snover D C, Bradley G M, Schuman L M, Edever F. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. *N Eng J* 1993; 328: 1365-1371.

**78.**-Wanebo H J, Fang W L, Mill A S, Zfass A M. Colorectal cancer. A blueprint for disease control through screening by primary care physicians. *Arch Surg* 1986; 121: 1347-1352.

**79.**-Bordas J M. Diagnóstico endoscópico. En: Grau J J, Piqué J M. (eds.). *Monografías clínicas en Oncología. Cáncer colorrectal*. Barcelona: Edic. Doyma; 1990: 31-44.

**80.**-Selby J V, Friedman G D, Quesenberry C P, Weiss N S. A case-control study of screening sigmoidoscopy and mortality from colorectal cancer. *N Engl J Med* 1992; 326: 653-657.

**81.**-Dodd G D. Imaging techniques in the diagnosis of carcinoma of the colon. *Cancer* 1991; 67: 1150-1154.

**82.**-Slavin J L, Melcher E A, Sundeen M, Schwartz S. Effects of high-fiber diet on fecal blood content (HemQuant assay) in healthy subjects. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 929-932.

**83.**-Atkin W S, Cuzick J, Northover J M A, Whynes D K. Prevención del cáncer colorrectal mediante una única sigmoidoscopia. *Lancet* 1993; 23: 94-99.

**84.**-Piqué J. Diagnóstico clínico. En: Grau J J, Piqué J M. (eds.). *Monografías clínicas en Oncología. Cáncer colorrectal*. Barcelona: Edic. Doyma; 1990: 19-29.

**85.**-Soyer P, Levesque M, Elias D, Aeitoun G, Roche A. Preoperative assessment of resectability of hepatic metastases from colonic carcinoma: CT portography vs sonography and dynamic CT. *Am J Roent* 1992; 159: 741-744.

**86.**-Zeng Z, Cohen A M, Urmacher C. Usefulness of carcinoembryonic antigen monitoring despite normal preoperative values in node-positive colon cancer patients. *Dis Colon Rectum* 1993; 36: 1063-1068.

**87.**-Cooper H S. Intestinal neoplasms. En: Sterberg S S, ed. *Diagnostic surgical pathology*. Nueva York: Raven Press, 1989: 1015-1055.

**88.**-Morson B C, Dawson I M P. *Gastrointestinal pathology*. 2ª ed. Oxford: Blackwell Scientific Publi, 1979.

- 89.**-Bolin S, Frazen L, Nilsson E, Sjö Dahl R. Carcinomas of the colon and rectum. Tumors missed by radiologic examination in 61 patients. *Cancer* 1988; 61: 1999-2008.
- 90.**-Ekelund G R, Pihl B. Multiple carcinomas of the colon and rectum. *Cancer* 1974; 33: 1630-1634.
- 91.**-Muto T, Bussey H J R, Morson B C. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1975; 36: 2251-2270.
- 92.**-Faltermann K W, Hill C B, Markey J C, Fox J W, Cohn I. Cancer of the colon, rectum, and anus: a review of 2313 cases. *Cancer* 1974; 34: 951-959.
- 93.**-Campo E, Miquel R. Anatomía patológica. En: Grau J J, Piqué J M. (eds.). *Monografías clínicas en Oncología. Cáncer colorrectal*. Barcelona: Edic. Doyma; 1990: 63-76.
- 94.**-Jass J R, Atkin W S, Cizick J. The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. *Histopathology* 1986; 10: 437-459.
- 95.**-Kirkham N. Colorectal signet ring cell carcinoma in young people. *J Pathol* 1988; 155: 93-94.
- 96.**-Halvorsen T B, Seim E. Influence of mucinous components on survival in colorectal adenocarcinomas: a multivariate analysis. *J Clin Pathol* 1988; 41: 1068-1072.
- 97.**-Schwartz A M, Orestein P M. Small-cell undifferentiated carcinoma of the colon. A clinicopathological study of the rectosigmoid colon. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109: 629-632.
- 98.**-Burke A B, Shekitka K M, Sobin L H. Small-cell Carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1991; 95: 315-321.
- 99.**-Hickey W F, Corson J M. Squamous cell carcinoma arising in a duplication of the colon. Case report and literature review of squamous cell carcinoma of the colon and of malignancy complicating colonic duplication. *Cancer* 1981; 47: 602-609.
- 100.**-Park C H, Reid J D. Adenocarcinoma of the colon with choriocarcinoma in the sigmoid colon. *Cancer* 1980; 46: 570-575.
- 101.**-Hellstrom H R, Fisher E R. Physaliferous variant of carcinoma of colon. *Cancer* 1964; 27: 259.
- 102.**-Peomin V, Thakerngpol K, Pacharee P, Stitnimankarn T. Adenosquamous carcinoma and carcinoidal differentiation of the colon. Report of a case. *Cancer* 1983; 52: 1122-1125.
- 103.**-Riddell R H, Levin B. Ultrastructure of the "transitional" mucosa adjacent to large bowel carcinoma. *Cancer* 1977; 40: 2509-2522.
- 104.**-Dawson P A, Filipe M I. An ultrastructural and histochemical study of the mucous

membrane adjacent to and remote from carcinoma of the colon. *Cancer* 1976; 37: 2388-2398.

**105.**-Williams G T. Transitional mucosa of the large intestine. *Histopathology* 1985; 9: 1237-1243.

**106.**-Sawady J, Friedman M I, Katzin W E, Mendelsohn G. Role of the transitional mucosa of the colon in differentiating primary adenocarcinoma from carcinomas metastatic to the colon. An immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* 1991; 15: 136-144.

**107.**-Deans G T, Parks T G, Rowlands B J, Spence R A J. Factores pronósticos en el cáncer colorrectal. *Br J Surg (Ed. Esp.)* 1992; 8: 271-277.

**108.**-Williams S T, Beart R W. Staging of colorectal cancer. *Semin Surg Oncol* 1992; 8: 89-93.

**109.**-Kirklin J W, Docherty M B, Waugh J M. The role of the peritoneal reflection in the prognosis of carcinoma of the rectum and sigmoid colon. *Surg Gynecol Obstet* 1949; 88: 326-331.

**110.**-Estapé J. Cáncer de intestino grueso, intestino delgado y ano. En: *Cáncer. Diagnóstico de extensión. Estrategia terapéutica*. 1ª ed. Barcelona: Salvat Edit; 1982: 329-349.

**111.**-Rifà J, Avellà A. Factores pronósticos de cáncer colorrectal. *Gastroenterol Hepatol* 1992; 15: 32-78.

**112.**-Moreaux J, Catala M. Les cancers coliques. Résultats du traitement chirurgical et prognostic. Cinq cent soixante.dix-neuf observations. *Pres Med* 1985; 14: 463-466.

**113.**-Phil E, Hughes E S, McDermott F T, Milne B J, Korner J M, Prece A B. Carcinoma of the colon. Cancer specific long-term survival. A series of 615 patients treated by one surgeon. *Ann Surg* 1980; 192: 114-117.

**114.**-Griffin M R, Berstralh E J, Coffey R J, Beart R W, Melton L J. Predictors of survival after resection of carcinoma of the colon and rectum. *Cancer* 1987; 60: 2318-2324.

**115.**-Gardner B, Feldman J, Spivak Y. Investigations of factors influencing prognosis of colon cancer *Am J Surg* 1987; 153: 541-544.

**116.**-Chute C G, Willett W C, Colditz G A, Stampfer M J, Rosner B, Speizer F E. A prospective study of reproductive history and exogenous estrogens on the risk of colorectal cancer in women. *Epidemiology* 1991; 201-207.

**117.**-Ries L G, Pollack E S, Young J L. Cancer patient survival: surveillance, epidemiology, and end results program, 1973-1979. *J Natl Cancer Inst* 1983; 70: 693-707.

**118.**-Dayal H, Polissar L, Yang C Y, Dahlberg S, Race, socioeconomic status, and prognosis factors for survival from colo-rectal cancer. *J Chron Dis* 1987; 40: 857-864.

**119.**-Enblad P, Enblad P, Adami H O, Glimelius B, Krusemo U, Pahlman L. Relationship



between age and survival in cancer of the colon and rectum with special reference to patients less than 40 years of age. *Br J Surg* 1990; 77: 611-616.

**120.**-Griffin P M, Liff J M, Greenberg R S, Clark W S. Adenocarcinomas of the colon and rectum in persons under 40 years old. A population-based study. *Gastroenterology* 1991; 100: 1033-1040.

**121.**-Pratt C B, Rivera G, Shanks E, Johnson W W, Howarth C, Terrell W, Kumar P M. Colorectal carcinoma in adolescents implications regarding etiology. *Cancer* 1977; 40: 2464-2472.

**122.**-Jensen H E, Nielsen J, Balslev I. Carcinoma of the colon in old age. *Ann Surg* 1971; 171: 107-115.

**123.**-Steinberg M S, Barkin J S, Kaplan R S, Stablein D M. Prognostic indicators of colon tumors. The gastrointestinal tumor study group experience. *Cancer* 1986; 57: 1866-1870.

**124.**-Kelley W E, Brown P W, Lawrence W. Penetrating obstructing and perforating carcinomas of the colon and rectum. *Arch Surg* 1981; 116: 381-384.

**125.**-Dutton R W, Hreno A, Hampson L G. Mortality and prognosis of obstructing carcinoma of the large bowel. *Am J Surg* 1976; 131: 36-41.

**126.**-Fitchett C W, Hoffman G C. Obstructing malignant lesions of the colon. *Surg Clin North Am* 1986; 66: 807-820.

**127.**-Willett C, Tepper J E, Cohen A, Orlow E, Welch C. Obstructive and perforative colonic carcinoma: patterns of failure. *J Clin Oncol* 1985; 3: 379-384.

**128.**-Pescaroti M, Maria G, Beltrani B. Site, emergency, and duration of symptoms in the prognosis of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1982; 25: 33-40.

**129.**-Halvorsen T B, Seim E. Tumor site: a prognostic factor in colorectal cancer?. A multivariate analysis. *Scand J Gastroenterol* 1987; 22: 124-128.

**130.**-Alley P G, McNee R K. Age and sex differences in right colon cancer. *Dis Colon Rectum* 1986; 29: 227-229.

**131.**-Medical Research Council. Clinico pathological features of prognostic significance in operable rectal cancer in 17 centers in U.K. (Third report of the M. C. R. Trial, on behalf of the Working Party). *Br J Cancer* 1984; 50: 435-442.

**132.**-Minsky B D, Mies C, Rich T A. Potentially curative surgery if colon cancer: patterns of failure and survival. *J Clin Oncol* 1988; 6: 106-118.

**133.**-Okuno M, Ikehara T, Nagayama M, Sakamoto K, Kato Y, Umeyana K. Colorectal carcinoma in young adults. *Am J Surg* 1987; 154: 264-268.

**134.**-Copeland E M, Miller L D, Jones R S. Prognostic factors in the carcinoma of the colon

and rectum. *Am J Surg* 1968; 116: 875-881.

**135.**-Adloff M, Arnaud J P, Ollier J C, Schloegel M. Les cancers du colon. Etude retrospective portant sur 11222 malades operés. *J Chir Paris* 1990; 127: 565-571.

**136.**-Hermaneck P, Guggenmoos-Holzmann I, Gall F P. Prognostic factors in rectal carcinoma. A contribution to the further development of tumor classification. *Dis Colon Rectum* 1989; 32: 593-599.

**137.**-Chapuis P H, Fisher R, Dent O F, Newland R C, Bokey E L, Pheils M T. An evaluation of the American Joint Committee (pTNM) staging method for cancer of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum* 1986; 29: 6-10.

**138.**-Nathanson S D, Schultz L, Tilley B, Kambouris A. Carcinomas of the colon and rectum. A comparison of staging classification. *Am Surg* 1986; 52: 428-433.

**139.**-Sasaki O, Atkin W S, Jass J R. Mucinous carcinoma of the rectum. *Histopathology* 1987; 11:259-272.

**140.**-Symonds D A, Vickery A L. Mucinous carcinoma of the colon and rectum. *Cancer* 1976; 37: 1891-1900.

**141.**-Chapuis P H, Dent O F, Ficher R. A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer. *Vr J Surg* 1985; 72: 698-702.

**142.**-Crissman J D, Zarbo R J, Ma C K, Visscher D W. Histopathologic parameters and DNA analysis in colorectal adenocarcinomas. *Pathol Annu* 1989; 24: 103-147.

**143.**-Moertel C G, O'Fallon J R, Go V L, O'Connell M J, Thynne G S. The preoperative carcinoembryonic antigen test in the diagnosis staging, and prognosis of colorectal cancer. *Cancer* 1986; 58: 603-610.

**144.**-Cady B, Stone MD, McDermott WV, Jenkins R L, Bothe A, Lavin P T, Lovett E J, Steele G D. Technical and biological factors in disease-free survival after hepatic resection for colorectal cancer metastases. *Arch Surg* 1992; 127: 561-568.

**145.**-Rieger A, Wahren B. CEA levels at recurrence and metastases; importance for detecting secondary disease. *Scand J Gastroenterol* 1975; 10: 869-874.

**146.**-Iino H, Fukayama M, Maeda Y, Koike M, Mori T, Takahashi T, Kikuchi-Yanoshita R, Miyaki M, Mizuno S, Watanabe S. Molecular genetics for clinical management of colorectal carcinoma. 17p, 18q, and 22q loss of heterozygosity and decreased DCC expression are correlated with the metastatic potential. *Cancer* 1994; 73: 1324-1331.

**147.**-Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu Z F, Lewitt R C, Sistonen P, Kinzler K W, Vogelstein B, Hamilton S R. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994; 331: 213-221.

**148.**-Campo E, Miquel R, Jares P, Bosch F, Juan M, Leone A, Vives J, Cardesa A, Yague J.

Prognostic significance of the loss of heterozygosity of Nm23-H1 and p53 genes in human colorectal carcinomas. *Cancer* 1994; 73: 2913-1921.

**149.**-Bosari S, Viale G, Bossi P, maggioni M, Coggi G, Murray JJ, Lee A K. Cytoplasmic accumulation of p53 protein: an independent prognostic indicator of colorectal adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 681-687.

**150.**-Domínguez Iglesias F, Riera Velasco J R, Junco Petrement P, Tojo Ramallo S, Díaz-Faes Cervero M. Influencia en el pronóstico a corto plazo de la sobreexpresión de la proteína p53 en carcinomas colorrectales *Rev Esp Enf Digest* 1994; 86: 796-802.

**151.**-Miwa M, Takenaka S, Ito K, Fujiwara K, Kogure K, Tokunaga A, Hozumi M, Fujimura S, Sugimura T. Spontaneous colon tumors in rats. *J Natl Cancer Inst* 1976; 56: 615-621.

**152.**-Wells H G, Slye M, Holmes H F. Comparative pathology of cancer of the alimentary canal, with report of cases in mice. *Am J Cancer* 1938; 33: 223-238.

**153.**-Martin M S. Experimental intestinal carcinogenesis. *Cancer J* 1992; 5: 5-10.

**154.**-King E S J, Varasdi G. Experimentally induced tumors of the intestine. *Aust New Zeal J Surg* 1959; 29: 38-53.

**155.**-Greene F L, Lamb L S, Barwick M. Colorectal cancer in animal models. A review. *J Surg Res* 1987; 43: 476-487.

**156.**-Donham K J, Berg J W, Will L A, Leiniger J R. The effects of long-term ingestion of asbestos on the colon of F344 rats. *Cancer* 1980; 45: 1073-1084.

**157.**-Schmähl D. Combination effects in chemical carcinogenesis (experimental results). *Oncology* 1976; 33: 73-76.

**158.**-Lisco H, Brues A, Finkel M, Hansen W. Carcinoma of the colon in rats following the feeding of radioactive yttrium. *Cancer Res* 1947; 7: 721-732.

**159.**-Lorenz E, Stewart H L. Intestinal carcinoma and other lesions in mice following oral administration of 1, 2, 5, 6-dibenzanthracene and 20-methylcholantrene. *J Natl Cancer Inst* 1941-1942; 1: 17-40.

**160.**-Laqueur G, Mickelsen G, Whitting G, Kurland L. Carcinogenic properties of nuts from *Cycas Circinalis* L. Indigenous to Guam. *J Nat Cancer Inst* 1963; 31: 919-950.

**161.**-Druckrey H, Preussmann R, Matzkies F, Ivankovie S. Selective erzeugung von darmkrebs bei ratten durch 1,2-Dimethyl-hydrazin. *Naturwissenschaften* 1967; 54: 285-286.

**162.**-Druckrey H. Production of colonic carcinomas by 1,2 dialkylhydrazines and azoalxylkanes. En: Burdette W J (ed). *Carcinomas of the colon and antecedent epithelium*. 1<sup>a</sup> ed. Springfield: Charles C Thomas Publisher; 1970: 267-279.

**163.**-Narisawa T, Sato T, Hayakawa M, Sakuma A, Nakano H. Carcinoma of the colon and

rectum of rats by rectal infusion of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Gann* 1971; 62: 231-234.

**164.**-Tsunoda A, Shibusawa M, Tsunoda Y, Yasuda N, Koike T. Reduced growth rate of dimethylhydrazine-induced colon tumors in rats. *Cancer Res* 1992; 52: 696-700.

**165.**-Gilbert J M, Thompson E M, Slavin G, Kark A E. Inhibition of experimental colorectal cancer by razoxane (ICRF-159). *Br J Surg* 1984; 71: 600-603.

**166.**-Pratesi G, Deschner E E. The antitumoral activity of 4'-doxydoxorubicin compared to doxorubicin and 5-fluorouracil on methylazoxymethanol acetate-induced colon tumors in CF1 mice. *Cancer* 1984; 54: 18-24.

**167.**-Pories S E, Ramchurren N, Summerhayes I, Steele G. Animal models for colon carcinogenesis. *Arch Surg* 1993; 128: 647-653.

**168.**-Toth B. 1,1-Dimethylhydrazine (unsymmetrical) carcinogenesis in mice. Light microscopic and ultrastructural studies on neoplastic blood vessels. *J Natl Cancer Inst* 1973; 50: 181-194.

**169.**-Toth B. Hydrazines and related compounds in colonic carcinogenesis. En: Malt R A, Williamson R C N (eds). *Colonic Carcinogenesis*. 1<sup>st</sup> ed. Lancaster: MTP Press Limited; 1982: 165-176.

**170.**-Frazier D E, Tarr M J, Olsen R G. The in vitro and in vivo effects of 1,1-dimethylhydrazine (UDMH) on murine lymphocyte subsets and Ia antigen expression. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1991; 13: 25-46.

**171.**-Toth B. The large bowel carcinogenic effects of hydrazines and related compounds occurring in nature and in the environment. *Cancer* 1977; 40: 2427-2431.

**172.**-Fiala E S. Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1,2-Dimethylhydrazine and Azoxymethane. *Cancer* 1977; 40: 2436-2445.**172.**-Williamson R C, Bauer F L, Terpstra O T, Ross J S, Malt R A. Contrasting effects of subtotal enteric bypass, enterectomy, and colectomy on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis. *Cancer Res* 1980; 40: 538-543.

**173.**-Ward J M, Yamamoto R S, Benjamin T, Brown C A, Weisburger J H. Experimentally induced cancer of the colon in rats and mice. *J A V M A* 1974; 164: 729-732.

**174.**-Laqueur G L, Matsumoto. Neoplasm in females Fisher rats following intraperitoneal injection of methylazoxymethanol. *J Natl Cancer Inst* 1966; 37: 217-232.

**175.**-Ip C, Hayes C, Budnick R M, Ganther H E. Chemical form of selenium, critical metabolites, and cancer prevention. *Cancer Res* 1991; 51: 595-600.

**176.**-LaMont J T, O'Gorman T A. Experimental colon cancer. *Gastroenterology* 1978; 75: 1157-1169.

- 177.**-O'Donnell R W, Cockerell G L. Establishment and biological properties of a Guinea pig colonic adenocarcinoma cell line induced by N-Methyl-N-nitrosourea. *Cancer Res* 1981; 41: 2372-2377.
- 178.**-Amberger H. Different autochthonous models of colorectal cancer in the rat. *J Cancer Res Clin* 1986; 111: 157-159.
- 179.**-Tatsuta M, Yamamura H, Ichii M, Taniguchi H. Effect of prolonged administration of gastrin on experimental carcinogenesis in rat colon induced by intrarectal instillation of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Res* 1983; 43: 2258-2260.
- 180.**-Zusman I, Zimber A, Nyska A. Role of morphological methods in the analysis of chemically induced colon cancer in rats. *Acta Anat* 1991; 142: 351-356.
- 181.**-Kanazawa K, Mitsouka T, Arai K, Yamamoto T, Hino Y. Gastroenterol Amounts of intestinal microflorae in relation to colon carcinogenesis. An experimental study. *Gastroenterol Jpn* 1980; 15: 177-183.
- 182.**-Kikkawa N, Sasai H. Histogenesis of MMNG induced rat colon adenoma and carcinoma. En: Malt R A, Williamson R C N (eds). *Colonic Carcinogenesis*. 1<sup>a</sup> ed. Lancaster: MTP Press Limited; 1982: 221-234.
- 183.**-Spitz S, Maguigan W H, Dobriner K. The carcinogenic action of benzidine. *Cancer* 1950; Sep: 789-804.
- 184.**-Newberne P M, Rogers A E. Rat colon carcinomas associated with aflatoxin and marginal vitamin A. *J Natl Cancer Inst* 1973; 50: 439-448.
- 185.**-Newberne P N, Suphakarn V. Preventive role of vitamin A in colon carcinogenesis in rats. *Cancer* 1977; 40: 2553-2556.
- 186.**-Weisburger J H, Fiala E S. Experimental colon carcinogens and their mode of action. En: Autrup H, Willimas G M, eds. *Experimental colon carcinogenesis*. 1<sup>a</sup> ed. Boca Ra-ton: CRC Press, 1983: 27-50.
- 187.**-Green J A, Carthew P, Heuillet E, Simpson J L, Manson M M. Cytokeratin expression during AFB1-induced carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1990; 11: 1175-1182.
- 188.**-Spjut H J, Spratt J S. Endemic and morphologic similarities existing between spontaneous colonic neoplasms in man and 3-2'-dimethyl-4-aminobiphenyl induced colonic neoplasms in rats. *Ann Surg* 1965; 161: 309-324.
- 189.**-Navarrete A, Spjut H J. Effect of colostomy on experimentally produced neoplasms of the colon of the rat. *Cancer* 1967; 20: 1466-1472.
- 190.**-Nigro N D, Bull A W. Experimental intestinal carcinogenesis. *Br J Surg* 1985; 72 (Suppl. Sep): S36-S37.
- 191.**-Fiala E S, Bobotas G, Kulakis C, Weisburger J H. Separation of 1,2-Dimethylhy-drazine

metabolites by high-pressure liquid chromatography. *J Chromatography* 1976; 117: 181-185.

**192.**-Turusov V S, Lanko N S, Parfenov Y D, Gordon W P, Nelson S D, Hillery P S, Keefer L K. Carcinogenicity of deuterium-labeled 1,2-dimethylhydrazine in mice. *Cancer Res* 1988; 48: 2162-2167.

**193.**-Maskens A F. Confirmation of the two-step nature of chemical carcinogenesis in the rat colon adenocarcinoma model. *Cancer Res* 1981; 41: 1240-1245.

**194.**-Dube M, Madarnas P, Rola-Pleszczynski M, Nigam V N. An animal model of Kaposi's sarcoma. Immune status of CD1 mice undergoing dimethyl hydrazine treatment to induce angiosarcomas and other malignancies. *Anticancer Res* 1992; 12: 105-112.

**195.**-Kanazawa K, Yamamoto T, Sato S. Experimental induction of colonic carcinomas in rats. Analysis of factors influencing upon the incidence. *Jpn J Exp Med* 1975; 45: 439-456.

**196.**-Blake J R S, Reeve R S, Hardcastle J D, Dawson I M P, Metcalf M J, Thompson M J. A study of the effect of colotomy and mucosal field changes in experimental colon cancer. *Clin Oncol* 1980; 6: 113-123.

**197.**-Glauert H P, Weeks J A. Dose-and time-response of colon carcinogenesis in Fischer-344 rats after a single dose of 1,2-dimethylhydrazine. *Toxicol Lett* 1989; 48: 283-287.

**198.**-Celik C, Mittelman A, Paolini N S, Lewis D, Evans J T. Effects of 1,2-dimethylhydrazine on jejunocolic transposition in Sprague-Dawley rats. *Cancer Res* 1981; 41: 2908-2911.

**199.**-Rubio C A, Nylander G. Further studies on the carcinogenesis of the colon of the rat with special reference to the absence of intestinal contents. *Cancer* 1981; 48: 951-953.

**200.**-Lewin M R, Ferulano G P, Cruse J P, Clark. Experimental colon carcinogenesis is facilitated by endogenous factors in the intestinal contents. *Carcinogenesis* 1981; 2: 1363-1366.

**201.**-Buhr H J, Hupp T, Beck N. Gastrointestinal tumours after stapler vs vicryl anastomoses in carcinogen-treated rats. *Eur J Surg Oncol* 1990; 16: 493-496.

**202.**-O'Donnell A F, O'Donnell P R, Royston D, Johnston D H, Barnard R, Bouchier-Hayes D. La técnica de sutura utilizada afecta a la producción de células de las criptas en el segmento perianastomótico del colon y a la formación de tumores. *Br J Cancer (ed. esp.)* 1991; 6: 216-219.

**203.**-Pozharisski K M. The significance of nonspecific injury for colon carcinogenesis in rats. *Cancer Res* 1975; 35: 3824-3830.

**204.**-Rokitansky A, Trubel W, Buxbaum P, Moeschl P. 1,2-Dimethylhydrazine-induced carcinogenesis influence by different colonic anastomoses in rats. *Eur Surg Res* 1989; 29: 184-189.

- 205.**-Hagihara P F. Experimental colitis as a promoter in large-bowel tumorigenesis. *Arch Surg* 1982; 117: 1304-1307.
- 206.**-Ross J S. Experimental large intestinal adenocarcinoma induced by hydrazines and human colorectal cancer: a comparative study. En: Malt R A, Williamson R C N (eds). *Colonic Carcinogenesis*. 1<sup>a</sup> ed. Lancaster: MTP Press Limited;1982: 187-210.
- 207.**-Gilbert J M. Experimental colorectal cancer as a model of human disease. *Ann R Coll Surg Engl* 1987; 69: 48-53.
- 208.**-Pozharisski K M. Morphology and morphogenesis of experimental epithelial tumors of the intestine. *J Natl Cancer Inst* 1975; 54: 1115-1135.
- 209.**-Ward J M. Morphogenesis of chemically induced neoplasms of the colon and small intestine in rats. *Lab Invest* 1974; 30: 505-513.
- 210.**-Rowlatt C, Cruse J P, Barton T, Sadrudin A A, Lewin M R. Comparison of the significance of three histopathological thresholds of malignancy in experimental colorectal tumors. *Gut* 1989; 30: 845-853.
- 211.**-Deschner E E. Experimentally induced cancer of the colon. *Cancer* 1974; 34: 824-828.
- 212.**-Goldrosen M. Murine colon adenocarcinoma. Immunobiology of metastases. *Cancer* 1980; 45: 1223-1228.
- 213.**-Onoue Y, Kashima Y, Aizawa K, Hatakeyama K. A new rat colon cancer cell line metastasizes spontaneously: biologic characteristics and chemotherapeutic response.
- 214.**-Viñas J, Fortuny J C, Panades M J, Piñol C, Prim M, Fermiñán A, Corbella G, Calderó J, Egido R. Appearance of ear tumors in Sprague-Dawley rats treated with 1,2-dimethylhydrazine when used as a model for colonic carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1992; 13: 493-495.
- 215.**-Gunning W T, Castonguay A, Godblatt P J, Stoner G D. Strain A/J mouse lung adenoma growth patterns vary when induced by different carcinogens. *Toxicol Pathol* 1991; 19: 168-175.
- 216.**-Toth B, Malick L, Shimizu H. Production of intestinal and other tumors by 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride in mice. I. A light and transmission electron microscopic study of colonic neoplasms. *Am J Pathol* 1976; 84: 69-86.
- 217.**-Barton T P, Cruse J P, Lewin M R. Changes in serum lipids related to the presence of experimental colon cancer. *Br J Cancer* 1987; 56: 451-454.
- 218.**-Berenblum I, Bonser G M. Experimental investigation of "aniline cancer". *J Indust Hyg Toxicol* 1937; 19: 86-92.
- 219.**-Maskens A P. Multistep models of colorectal carcinogenesis. En: Malt R A, Williamson R C N (eds). *Colonic Carcinogenesis*. 1<sup>a</sup> ed. Lancaster: MTP Press Limited;1982: 211-

219.

**220.**-Fiala E S, Kulakis C, Bobotas G, Weisburger J H. Brief communication: detection and estimation of azomethane in expired air of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats. *J Natl Cancer Inst* 1976; 56: 1271-1273.

**221.**-Oravec C T, Jones C A, Huberman E. Activation of the colon carcinogen 1,2-Dimethylhydrazine in a rat colon cell-mediated mutagenesis assay. *Cancer Res* 1986; 46: 5068-5071.

**222.**-Chan P C, Cohen L A, Narisawa T, Weisburger J H. Early effects of a single intrarectal dose of 1,2-Dimethylhydrazine in mice. *Cancer Res* 1976; 36: 13-17.

**223.**-Nakagawa Y, Watanabe H, Takahashi T, Ito A, Dohi K. Carcinogenicity of 1,2-dimethylhydrazine in colorectal tissue heterotopically transplanted into the glandular stomach of rats. *Jpn J cancer Res* 1992; 83: 24-30.

**224.**-Ucchedu A, Murgia C, Licheri S, Dessy E, Ghinami E, Scattone S, Cagetti M. Incidenza delle neoplasie coliche indotte da 1,2-dimetilhidrazina nel ratto: influenza della stipsi. *G Chir* 1991; 12: 572-574.

**225.**-Stralka D, Strobel H W. Characterization of cytochrome P450-dependent dimethylhydrazine metabolism in human colonmicrosomes. *Cancer* 1991; 68: 2363-2369.

**226.**-Wattenberg L W. Brief communication: Inhibition of Dimethylhydrazine-induced neoplasia of the large intestine by Disulfiram. *J Natl Cancer Inst* 1975, 54: 1005-1006.

**227.**-Fiala E S, Bobotas G, Kulakis C, Wattenberg W, Weisburger J H. Effects of disulfiram and related compounds on the metabolism in vivo of the colon carcinogen 1,2- Dimethylhydrazine. *Bio Pharma* 1977; 26: 1763-1768.

**228.**-Wattenberg L W, Lam L K, Fladmoe A V, Borchert P. Inhibitors of colon carcinogenesis. *Cancer* 1977; 40: 2432-2435.

**229.**-McLellan E, Bird R P. Effect of disulfiram on 1,2-dimethylhydrazine and azoxime-thane-induced aberrant crypt foci. *Carcinogenesis* 1991; 12: 969-972.

**230.**-Davies R J, Sandle G I, Thompson S M. Inhibition of the Na<sup>+</sup>, K<sup>(+)</sup>-ATP ase pump during induction of experimental colon cancer. *Cancer Biochem Biophys* 1991; 12: 81-94.

**231.**-Davies R J, Weidema W F, Sandle G I, Palmer L, Deschner E E, DeCosse J J. Sodium transport in a mouse model of colonic carcinogenesis. *Cancer Res* 1987; 47: 4646-4650.

**232.**-Davies R J, Juncosa R D, Kaplan D, Pempinello C, Asbun H, Pilch Y H. Colonic epithelial impedance analysis in a murine-model of large bowel cancer. *Arch Surg* 1986; 121: 1253-1258.

**233.**-Goller D A, Weidema W F, Davies R J. Transmural electrical potential difference as an early marker in colon cancer. *Arch Surg* 1986; 121: 345-350.



- 234.**-Evans J T. Differential susceptibility of mouse strains to induction of multiple large bowel neoplasms by 1,2-dimethylhydrazine. En: Malt R A, Williamson R C N (eds). Colonic Carcinogenesis. 1<sup>a</sup> ed. Lancaster: MTP Press Limited;1982: 177-186.
- 235.**-James J T, Shamsuddin A M, Trump B F. Comparative study of the morphologic, histochemical and proliferative changes induced in the large intestine of ICR/Ha and C57 BL/Ha mice by 1,2-dimethylhydrazine. J Natl Cancer Inst 1983; 71: 955-964.
- 236.**-Moon R C, Fricks C M. Influence of gonadal hormones and age on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. Cancer 1977; 40: 2502-2508.
- 237.**-Beniashvili D. Induction of renal tumors in monkeys as a result of probable prenatal effects of 1,2-dimethylhydrazine. Vopr Onkol 1989 (Abst); 35: 1450-1454.
- 238.**-Smirnova I O, Turusov V S. 1,2-Dimethylhydrazine carcinogenesis in neonatally androgenized CBA mice. Carcinogenesis 1988; 9: 1927-1929.
- 239.**-Hull C C, Galloway P, Gordon N, Gerson S L, Hawkins N, Stellato T A. Splenectomy and the induction of murine colon cancer. Arch Surg 1988; 123: 462-464.
- 240.**-Pence B C, Tsai S Y, Richard B C. Effects of dietary fat on hepatic microsomal metabolism of 1,2-dimethylhydrazine. Cancer Lett 1991; 59: 225-229.
- 241.**-Kroes R, Beems R B, Bosland M C, Bunnik G S, Sinkeldam E J. Nutritional factors in lung, colon, and prostate carcinogenesis in animal models. Fed Proc 1986; 45: 136-141.
- 242.**-Zhao L P, Kushi L H, Klein R D, Prentice R L. Quantitative review of studies of dietary fat and rat colon carcinoma. Nutr Cancer 1991; 15: 169-177.
- 243.**-Broitman S A, Vitale J J, Vavrousek-Jakuba E, Gottlier L S. Polyunsaturated fat, cholesterol and large bowel tumorigenesis. Cancer 1977; 40: 2455-2463.
- 244.**-Lindner M A. A fish oil diet inhibits colon cancer in mice. Nutr Cancer 1991; 15: 1-11.
- 245.**-Nigro N D. Animal studies implicating fat and fecal steroids in intestinal cancer. Cancer Res 1981; 41: 3769-3770.
- 246.**-Sugano M, Watanabe M, Yoshida K, Tomioka M, Miyamoto M, Kritchevsky D. Influence of dietary cis and trans fats on DMH-induced colon tumors, steroid excretion, and eicosanoid production in rats prone to colon cancer. Nutr Cancer 1989; 12: 177-187.
- 247.**-Nutter R L, Kettering J D, Aprecio R M, Weeks D A, Gridley D S. Effects of dietary fat and protein on DMH-induced tumor development and immune responses. Nutr Cancer 1990; 13: 141-152.
- 248.**-Kuratko C, Pence B C. Rat colonic status: interaction of dietary fats with 1,2-dimethylhydrazine challenge. J Nutr 1992; 122: 278-282.

- 249.**-Newberne P M. Dietary fat, immunological response, and cancer in rats. *Cancer Res* 1981; 41: 3783-3785.
- 250.**-Weindruch R, Albanes D, Kritchevsky D. The role of calories and caloric restriction in carcinogenesis. *Hematol Oncol Clin North Am* 1991; 5: 79-89.
- 251.**-Kritchevsky D. Influence of caloric restriction and exercise on tumorigenesis in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990; 193: 35-38.
- 252.**-Beth M, Berger M R, Schmahl D. Influence of some dietary constituents in chemical carcinogenesis in rats. En: Schmahl D, ed. *Combination effects in chemical carcinogenesis*. 1<sup>a</sup> ed. Weinheim: VCM Publishers 1988: 231-265.
- 253.**-Papenburg R, Bounous G, Flieszer D, Gold P. Dietary milk proteins inhibit the development of dimethylhydrazine-induced malignancy. *Tumour Biol* 1990; 11: 129-136.
- 254.**-Samelson S L, Nelsson R L, Nyhus L M. Protective role of faecal pH in experimental colon carcinogenesis. *J Royal Society Med* 1985; 78: 230-233.
- 255.**-Cameron I L, Ord V A, Hunter K E, Padilla G M, Heitman D W. Suppression of a carcinogen 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced increase in mitotic activity in the colonic crypts of rats by addition of dietary cellulose. *Cancer Res* 1989; 49: 991-995.
- 256.**-Heitman D W, Ord V A, Hunter K E, Cameron I L. Effect of dietary cellulose on cell proliferation and progression of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Res* 1989; 49: 5581-5585.
- 257.**-Freeman H J, Spiller G A, Kim Y S. A Double-blind study on the effect of purified cellulose dietary fiber on 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colonic neoplasia. *Cancer Res* 1987; 38: 2912-2917.
- 258.**-Alink G M, Kuiper H A, Hollanders V M, Koeman J H. Effect of heat processing and of vegetables and fruit in human diets on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 1993; 14: 519-524.
- 259.**-Goldin B, Gorbach S L. Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, lactobacillus supplements, and dimethylhydrazine. *Cancer* 1977; 40: 2421-2426.
- 260.**-Klurfeld D M. Dietary fiber-mediated mechanisms in carcinogenesis. *Cancer Res* 1992; 52 (Suppl 1): S2055-S2059
- 261.**-Morvay K, Szenteleki K, Torok G, Pinter A, Borzsonyi M, Reinhard N, Nagy L, Juhasz F. The role of bile in the development of colon cancer induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Orv Hetil* 1989; 130 (Abst): 2033-2035.
- 262.**-Sugezawa A, Kaibara N. Possible mechanism for the cocarcinogenic effect of bile acids: increased intracellular uptake of methylcholantrene by C3H/10T1/2 fibroblasts in vitro. *Oncology* 1991; 48: 138-143.

- 263.**-Guillem J G, O'Brian C A, Fitzer C J, Johnson M D, Forde K A, Gerfo P, Weinstein B. Studies on protein Kinase C and colon carcinogenesis. *Arch Surg* 1987; 122: 1475-1478.
- 264.**-Morvay K, Szentleleki K, Torok G, Pinter A, Borzsonyi M, Nawroth R. Effect of change of fecal bile acid excretion achieved by operative procedures on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. *Dis Colon Rectum* 1989; 32: 860-863.
- 265.**-Morvay K, Szentleleki K, Torok G, Pinter A. Effect of small bowel resection on fecal bile acid excretion and on experimental colon tumour in rats. *Acta Chir Hung* 1990; 31: 25-31.
- 266.**-Barton T, Cruse J P, Lewin M R. The relationship between faecal bile acids and the development of experimental colon cancer. *Br J Exp Pathol* 1988; 69: 149-154.
- 267.**-Jacobs M M. Inhibitory effects of selenium on 1,2-dimethylhydrazine and methylazoxymethanol colon carcinogenesis. *Cancer* 1977; 40: 2557-2564.
- 268.**-Jacobs M M. Inhibition of colon carcinogenesis. En: Autrup H, Willimas G M, eds. *Experimental colon carcinogenesis*. 1<sup>a</sup> ed. Boca Raton: CRC Press, 1983: 281-292.
- 269.**-Jao S W, Lee W, Ho Y S. Effect of germanium on 1,2-dimethylhydrazine-induced intestinal cancer in rats. *Dis Colon Rectum* 1990; 33: 99-104.
- 270.**-Newmark H L, Lipkin M. Calcium, vitamin D, and colon cancer. *Cancer Res* 1992; 52 (Suppl 1): S2067-S2070.
- 271.**-McIntosh G H. Colon cancer: dietary modifications required for a balanced protective diet. *Prev Med* 1993; 22: 767-774.
- 272.**-Sitrin M D, Halline A G, Abrahams C, Brasitus T A. Dietary calcium and vitamin D modulate 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis in the rat. *Cancer Res* 1991; 51: 5608-5613.
- 273.**-Appleton G V N, Davies P W, Bristol J B, Williamson R C N. Inhibition of intestinal carcinogenesis by dietary supplementation with calcium. *Br J Surg* 1987; 74: 523-525.
- 274.**-Wargovich M J, Lynch P M, Levin B. Modulating effects of calcium in animal models of colon carcinogenesis and short-term studies in subjects at increased risk for colon cancer. *Am J Clin Nutr* 1991; 54 (Suppl 1): S202-S205.
- 275.**-Appleton G V N, Bristol J B, Williamson R C N. Increased dietary calcium and small bowel resection have opposite effects on colonic cell turnover. *Br J Cancer* 1986; 73: 1018-1021.
- 276.**-Behling A R, Kaup S M, Choquette L L, Greger J L. Lipid absorption and intestinal tumour incidence in rats fed on varying levels of calcium and butterfat. *Br J Nutr* 1990; 64: 505-513.
- 277.**-Llor X, Jacoby R F, Teng B B, Davidson N O, Sitrin M D, Brasitus T A. K-ras muta-

tions in 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic tumors: effects of supplemental dietary calcium and vitamin D deficiency. *Cancer Res* 1991; 4305-4309.

**278.**-Santamaria L, Bianchi A. Cancer chemoprevention by supplemental carotenoids in animals and humans. *Prev Med* 1989; 18: 603-623.

**279.**-Imaida K, Hirose M, Yamaguchi S, Takahashi S, Ito N. Effects of naturally occurring antioxidants on combined 1,2-dimethylhydrazine and 1-methyl-1-nitrosourea-initiated carcinogenesis in F344 male rats. *Cancer Lett* 1990; 55: 53-59.

**280.**-Santamaria L A, Santamaria A B. Cancer chemoprevention by supplemental carotenoids and synergism with retinol in mastodynia treatment. *Med Oncol Tumor Pharmacoter* 1990; 7: 153-167.

**281.**-Newberne P M, Rogers A E. Rat colon carcinomas associated with aflatoxin and marginal vitamin A. *J Natl Cancer Inst* 1973; 50: 439-448.

**282.**-Newberne P M, Bueche D, Riengropitak S, Schragger T F. The influence of dietary levels of vitamin A and fat on colon cancer. *Nutr Cancer* 1990; 13: 235-242.

**283.**-Cook M G, McNamara P. Effect of dietary vitamin E on Dimethylhydrazine-induced colonic tumors in mice. *Cancer Res* 1980; 40: 1329-1331.

**284.**-McIntosh G H. The influence of dietary vitamin E and calcium status on intestinal tumors in rats. *Nutr Cancer* 1992; 17: 47-55.

**285.**-Slater G, Kang J, Cohen G, Szporn A, Aufses A H. In vivo ethane production in vitamin E-deficient rats with DMH-induced colon cancer. *JSurg Oncol* 1987; 36: 142-147.

**286.**-Belleli A, Shany S, Levy J, Guberman R, Lamprecht S A. A protective role of 1,25-dihydroxvitamin D3 in chemically induced rat colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1992; 13: 2293-2298.

**287.**-Jacobs M M. Potassium inhibition of DMH-induced small intestinal tumors in rats. *Nutr Cancer* 1990; 14: 95-101.

**288.**-Deschner E E, Ruperto J, Wong G, Newmark H L. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis* 1991; 12: 1193-1196.

**289.**-Caderni G, Bianchini F, Mancina A, Spagnesi M T, Dolara P. Effect of dietary carbohydrates on the growth of dysplastic crypt foci in the colon of rats treated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res* 1991; 51:3721-3725.

**290.**-Billings P C, Newberne P, Kennedy A. Protease inhibitor suppression of colon and anal gland carcinogenesis induced by dimethylhydrazine. *Carcinogenesis* 1990; 11: 1083-1086.

**291.**-Craven P A, DeRubertis F R. Effects of aspirin on 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1992; 13: 541-546.

- 292.**-Skinner S A, Penney A G, O'Brien P E. Sulindac inhibits the rate of growth and appearance of colon tumors in the rat. *Arch Surg* 1991; 126: 1094-1096.
- 293.**-Moorghen M, Ince P, Finney K J, Sunter J P, Watson A J, Appleton D R. The effect of sulindac on colonic tumour formation in dimethylhydrazine-treated mice. *Acta Histochem Suppl* 1990; 39: 195-199.
- 294.**-Andrianopoulos G D, Nelson R L, Barch D H, Nyhus L M. Sulfasalazine alters the character of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinoma in rats. *Anticancer Res* 1989; 9: 1725-1728.
- 295.**-Daniel F B, Reddy T V, Stober J A, Olson G R. Site-specific modulation of carcinogen-induced gastrointestinal tract nuclear anomalies in B6C3F1 mice by chloroform. *Anticancer Res* 1991; 11: 665-670.
- 296.**-Heitman D W, Grubbs B G, Heitman T O, Cameron I L. Effects of 1,2-Dimethylhydrazine treatment and feeding regimen on rat colonic epithelial cell proliferation. *Cancer Res* 1983; 43: 1153-1162.
- 297.**-Cameron I L, Ord V A, Hunter K E, Van Nguyen M, Padilla G M, Heitman D W. Quantitative contribution of factors regulating rat colonic crypt epithelium: role of parenteral and enteral feeding, caloric intakes, dietary cellulose level and the colon carcinogen DMH. *Cell Tissue Kinet* 1990; 23: 227-235.
- 298.**-Andrianopoulos G, Nelson R L, Bombeck C T, Souza G. The influence of physical activity in 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis in the rat. *Anticancer Res* 1987; 7: 849-852.
- 299.**-Andrianopoulos G D, Nelson R L, Misumi A, Bombeck C T, Nyhus L M. Effect of activity-stress on experimental rat colon carcinogenesis: early histopathologic changes and colon tumor induction. *Cancer Detect Prev* 1988; 13: 31-39.
- 300.**-Sharp J G, Crouse D A. Apparent synergism between radiation and the carcinogen 1,2-dimethylhydrazine in the induction of colonic tumors in rats. *Radiat Res* 1989; 117: 304-317.
- 301.**-Jacoby R F, Llor X, Teng B B, Davidson N O, Brasitus T A. Mutations in the K-ras oncogene by 1,2-dimethylhydrazine in preneoplastic and neoplastic rat colonic mucosa. *J Clin Invest* 1991; 87: 624-630.
- 302.**-Okamoto M, Ohtsu H, Miyaki M, Yonezawa H. No allelic loss at the p53 locus in 1,2-dimethylhydrazine-induced mouse colon tumors: PCR-SSCP analysis with sequence-tagged microsatellite site primers. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1483-1486.
- 303.**-Pozharisski K M. Tumours of the intestine. En: Turusov V S, ed. *Pathology of tumours in laboratory animals*. Vol. 1. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1973: 119-140.
- 304.**-Hebel R, Stromberg M W. *Anatomy and embryology of the laboratory rat*. Worthesee: Biomed, cop; 1986.

- 305.**-Barkla D H, Tutton J M. Surface changes in the descending colon of rats treated with dimethylhydrazine. *Cancer Res* 1977; 37: 262-271.
- 306.**-Ehsanullah M, Filipe M I, Gazzard B. Mucin secretion in inflammatory bowel disease: correlation with disease activity and dysplasia. *Gut* 1982; 23: 485-489.
- 307.**-Martin B F. The goblet cell pattern in the large intestine. *Anat Rec* 1961; 140: 1-15.
- 308.**-Lindström C G, Rosengren J E, Fork F T. Colon of the rat. An anatomic, histologic and radiographic investigation. *Acta Radiol Diagnosis* 1979; 20: 523-536.
- 309.**-Shamsuddin A K M, Trump B F. Colon epithelium. I. Light microscopic, histochemical, and ultrastructural features of normal colon epithelium of male fisher 344 rats. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66: 375-388.
- 310.**-Hollmann K H. Uber den feinbau des rectumepithels. *Z Zellforsch* 1965; 68: 502-542.
- 311.**-Altmann G G. Morphological observations on mucussecreting nongoblet cells in the deep crypts of the rat ascending colon. *Am J Anat* 1983; 167: 95-117.
- 312.**-Thomopoulos G N, Schutte B A, Spicer S S. Light and electron microscopic cytochemistry of the glicoconjugates in the rectosigmoid colonic epithelium of the mouse and rat. *Am J Anat* 1983; 168: 239-256.
- 313.**-Traynor O J, Costa N L, Wood C B. A scanning electron microscopy study of changes in the colonic mucus layer during chemical carcinogenesis. *Cancer* 1983; 51: 1847-1853.
- 314.**-Cooke T, Kirkham N, Stainthorp D H, Inman C, Goeting N, Taylor I. Detection of early neoplastic changes in experimentally induced colorectal using scanning electron microscopy and cell kinetic studies. *Gut* 1984; 25: 748-755.
- 315.**-Toth B, Malick L. Production of intestinal and other tumours by 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride in mice. II. Scanning electron microscopic and cytochemical study of colonic neoplasms. *Br J Exp Pathol* 1976; 57: 696-705.
- 316.**-Tutton P J M, Barkla D H. Regulation of cell kinetics and colon cancer. En: Autrup H, Williams G M, eds. *Experimental colon carcinogenesis*. 1<sup>a</sup> ed. Boca Raton: CRC Press; 1983: 199-214.
- 317.**-Tutton P J M, Barkla D H. Cell proliferation in the descending colon of dimethylhydrazine treated rats and in dimethylhydrazine induced adenocarcinomata. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1976; 21: 147-160.
- 318.**-Cooper H S, Farano P, Coapman R A. Peanut lectin binding sites in colons of patients with ulcerative colitis. *Arch Pathol Lab Med* 1987; 111: 270-275.
- 319.**-Lindström C G, Rosengren J-E, Ekberg O. Experimental colonic tumours in the rat. III. Induction time, distribution and appearance of induced tumours. *Acta Radiol Diagnos* 1978;

19: 799-811.

**320.**-Teague C A. Morphological changes during chemical induction of colon cancer. En: Autrup H, Willimas G M, eds. Experimental colon carcinogenesis. 1<sup>a</sup> ed. Boca Raton: CRC Press, 1983: 107-124.

**321.**-Blake J R S, Reeve R S, Hardcastle J D, Dawson I M P, Metcalf M J, Thompson M J. A study of the effect of colotomy and mucosal field changes in experimetal colon cancer. Clin Oncol 1980; 6: 113-123.

**322.**-Wiebecke B, Krey U, Löhrs U, Eder M. Morphological and autoradiographical investigations on experimental carcinogenesis and polyp development in the intestinal tract of rats and mice. Virchows Arc A 1973; 360: 179-192.

**323.**-Fisher E R, Paulson J D, McCoy M M. Genesis of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer. A light and electron microscopic study. Arch Pathol Lab Med 1981; 105: 29-37.

**324.**-Damjanov I. Lectin cytochemistry and histochemistry. Lab Invest 1987; 57: 5- 20.

**325.**-Feizi T, Childs A. Carbohydrates as antigenic determinats of glycoproteins. Biochem J 1987; 245: 1-11.

**326.**-Hughes R C. Glycoproteins as components of cellular membranes. Prog Biophys Mol Biol 1973; 26: 189-268.

**327.**-Tauber R, Reutter W, Gerok W. Role of membrane glycoproteins in mediating trophic responses. Gut 1987; 28: 71-77.

**328.**-Freeman H J, Kim Y, Kim Y S. Glycoprotein metabolism in normal proximal and distal rat colon and changes associated with 1,2-Dimethylhydrazine-induced colonic neoplasia. Cancer Res 1978; 38: 3385-3390.

**329.**-Boland C R, Montgomery C K, Kim Y S. A cancer-associated mucin alteration in benign colonic polyps. Gastroenterology 1982; 82: 664-672.

**330.**-Montgomery R, Conway T W, Spector A A. Carbohydrate synthesis and biopolymers. En: Biochemistry. A case-oriented approach. 5<sup>a</sup> ed. St. Louis: C. V. Mosby Co. 1990: 299-340.

**331.**-Roth J. Cytochemical localization of terminal N-Acetil-D-galactosamine residues in cellular compartments of intestinal goblet cells: implications for the topology of O-glycosylation. J Cell Biol 1984; 98: 399-406.

**332.**-Hanover J A, Lennarz W J. Transmembrane assembly of membrane and secretory glycoproteins. Arch Byochem Biophys 1981; 211: 1-19.

**333.**-Hanover J A, Lennarz W J, Young J D. Synthesis of N-and O-linked glycopeptides in oviduct membrane preparations. J Biol Chem 1980; 255: 6713-6716.

- 334.**-Montgomery R, Conway T W, Spector A A. (lipids). En: Biochemistry. A case-oriented approach. 5<sup>a</sup> ed. St. Louis: C. V. Mosby Co. 1990:
- 335.**-Watkins W M. Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis, and P blood group systems. *Adv Hum Genet* 1980; 10: 1-136.
- 336.**-Oriol R, Le Pendu J, Mollicone R. Genetics of ABO, H, Lewis, X and related antigens. *Vox Sang* 1986; 51: 161-171.
- 337.**-Salmon Ch, Cartron J P, Rouger Ph. Biochimie génétique des antigènes ABH, Lewis et associés. En: Les groupes sanguins chez l'homme. 2<sup>a</sup>ed. Paris: Masson 1990; 105-110.
- 338.**-Itzkowitz S H, Dahiya R, Byrd J C, Kim Y S. Blood group antigen synthesis and degradation in normal and cancerous colonic tissue. *Gastroenterology* 1990; 99: 431-442.
- 339.**-Salmon Ch, Cartron J P, Rouger Ph. Le système Lewis. En: Les groupes sanguins chez l'homme. 2<sup>a</sup>ed. Paris: Masson 1990; 180-195.
- 340.**-Hansson GC, Zopf D. Biosynthesis of the cancer associated sialyl-Lea antigen. *J Biol Chem* 1985; 260: 9388-9392.
- 341.**-Law K L, Smith D F. III<sup>6</sup>NeuAcLc4Cer in human SW1116 Colorectal carcinoma cells: a possible oncofetal antigen that is not dependent on lewis gene expression. *Arch Biochem Biophys* 1987, 258: 315-323.
- 342.**-Yazawa S, Takayuki A, Miyamoto Y, Matta K L. The presence of CA 19-9 in serum and saliva from Lewis blood-group negative cancer patients. *Jpn J Cancer Res* 1988; 79: 538-543.
- 343.**-Salmon Ch, Cartron J P, Rouger Ph. Les antigens I et i. En: Les groupes sanguins chez l'homme. 2<sup>a</sup>ed. Paris: Masson 1990; 198-211.
- 344.**-Fischer J, Klein P J, Vierbuchen M, Skutta B, Uhlenbruck G, Fischer R. Characterization of glycoconjugates of human gastrointestinal mucosa by lectins. I. Histochemical distribution of lectin binding sites in normal alimentary tract as well as in benign and malignant gastric neoplasms. *J Histochem Cytochem* 1984; 32: 681-689.
- 345.**-Cordon Cardo C, Lloyd K O, Sakamoto J, McGroarty M E, Old L J, Melamed M R. Immunohistologic expression of blood-group antigens in normal human gastrointestinal tract and colonic carcinoma. *Int J Cancer* 1986; 37: 667-676.
- 346.**-Szulman A E. The histological distribution of the blood group substances in man as disclosed by immunofluorescence. III. The A, B, and H antigens in embryos and fetuses from 18mm in length. *J Exp Med* 1964; 119: 503-515.
- 347.**-Yuan M, Itzkowitz S H, Palekar A, Shamsuddin A M, Phelps P C, Trump B F, Kim Y S. Distribution of blood group antigens A, B, H, Lea and Leb in normal, fetal, and malignant colonic tissue. *Cancer Res* 1985; 45: 4499-4511.



- 348.**-Schoentag R, Primus F J, Kuhns W. ABH and Lewis blood group expression in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1987; 47: 1695-1700.
- 349.**-Dabelsteen E, Graem N, Clausen H, Hakomori S. Structural variations of blood group A antigens in human normal colon and carcinomas. *Cancer Res* 1988; 48: 181-187.
- 350.**-Szulman A E. The histological distribution of blood group substances A and B in man. *J Exp Med* 1960; 111: 785-800.
- 351.**-Yonezawa S, Nakamura T, Tanaka S, Sato E. Glycoconjugate with *Ulex europaeus* agglutinin-I-binding sites in normal mucosa, adenoma, and carcinoma of the human large bowel. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69:777-785.
- 352.**-Blasco E, Torrado J, Cosme A, Alvarez E, Zugasti A, Gutierrez-Hoyos A, Arenas J I. Expression of Lewis antigenic determinants in colorectal adenocarcinomas. *Exp Cell Biol* 1989; 57: 153-158.
- 353.**-Clausen H, Hakomori S, Graem N, Dabelsteen E. Incompatible A antigen expressed in tumors of blood group O individuals: immunological, immunohistologic, and enzymatic characterization. *J Immunol* 1986; 136: 326-330.
- 354.**-Compton C, Wyatt R, Konugres A, Ehrental D, Durda P. Immunohistochemical studies of blood group substance H in colorectal tumors using a monoclonal antibody. *Cancer* 1987; 59: 118-127.
- 355.**-Kim Y S, Isaacs R, Perdomo J M. Alterations of membrane glycopetides in human colonic adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 4869-4873.
- 356.**-Kim Y S, Isaacs R. Glycoprotein metabolism in inflammatory and neoplastic diseases of the human colon. *Cancer Res* 1975; 35: 2092-2097.
- 357.**-Kiang D T, Kennedy B J, Edstrom R D. Level of blood group synthetic enzymes in human colon carcinoma. *Proc Soc Exp Biol Med* 1978; 157: 411-414.
- 358.**-Kuhns W J, Schoentag R. Carcinoma-related alterations of glycosyltransferases in human tissues. *Cancer Res* 1981; 41: 2767-2772.
- 359.**-Wolf B C, Salem R R, Sears H F, Horst D A, Lavin P T, Herlyn M, Itzkowitz S H, Schlom J, Steele G D. The expression of colorectal carcinoma associated antigens in the normal colonic mucosa. An immunohistochemical analysis of regional distribution. *Am J Pathol* 1989; 135: 111-119.
- 360.**-Ruggiero F, Cooper H S, Steplewski Z. Immunohistochemical study of colorectal adenomas with monoclonal antibodies against blood group antigens (Sialosyl-Le<sup>a</sup>, Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, Le<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup>, A, B, and H). *Lab Invest* 1988; 59: 96-103.
- 361.**-Ernst C, Atkinson B, Wysocka M, Blaszczyk M, Herlyn M, Sears H, Steplewski Z, Koprowski H. Monoclonal antibody localization of Lewis antigens in fixed tissue. *Lab Invest* 1984; 50: 394-400.

- 362.**-Nakayama J, Ota M, Honda T, Katsuyama T. Histochemical demonstration of sugar residues by lectin and immunohistochemical techniques for blood group antigens in human colon. *Histochem J* 1987; 19: 454-464.
- 363.**-Cooper H S, Farano P, Coapman R A. Peanut lectin binding sites in colons of patients 394. Colony P C, Steely J. Lecting binding patterns in developing rat colon. *Gastroenterology* 1987; 92: 1116-1126.
- 364.**-Pearse A G E. The periodic acid-Schiff technique. En: *Histochemistry, Theoretical and Applied*. Vol 1. 3<sup>a</sup> ed. Edinburgh: J&A Churchill, 1968: 659-660
- 365.**-Culling C F A, Reid P E. The histochemistry of colonic mucins. *J Histochem Cytochem* 1979; 27: 1177-1179.
- 366.**-Xu H, Sakamoto K, Shamsuddin A M. Detection of the tumor marker D-galactose-beta-(1,3)-N-acetyl-D-galactosamine in colonic cancer and precancer. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 1234-1238.
- 367.**-Spicer S S, Horn R G, Leppi T J. Histochemistry of connective tissue mucopolysaccharides. En: Wagner B M, Smith, eds. *The connective tissue*. Baltimore: William&Wilkins, 1967; 251-303.
- 368.**-Spicer S S. Diamine methods for differentiating mucosubstances histochemically. *J Histochem Cytochem* 1965; 8: 18-35.
- 369.**-Roth J. Light and electron microscopic localization of glycoconjugates with gold-labeled reagents. *Scan Micros Int*
- 370.**-Beyer T A, Sadler J E, Rearick J I, Paulson J C, Hill R L. Glycosyltransferases and their use in assessing oligosaccharide-structure and structure-function relationships. *Adv Enzymol* 1981; 52: 23-175.
- 371.**-Leathem A J C, Atkins N J. Lectin binding to paraffin sections: En: Bullock G R, Petrusz P, eds. *Techniques in immunocytochemistry*. 1<sup>a</sup> ed. Vol 1. Berlin: Walter de Gruyter, 1981: 3-10.
- 372.**-Yonezawa S, Matsushita Y, Muramatsu H, Arita Y, Nakamura T, Muramatsu T, Sato E. Correlation between glycoconjugate expression and fucosyltransferase activity in human colorectal carcinoma. *Acta Pathol Jpn* 1987; 37: 1249-1261.
- 373.**-Stillmark H. *Über Rizin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus communis L. Und einigen anderen Euphorbiaceen*. Inaug Dis Dorpat, 1888.
- 374.**-Rüdiger H. Lectins-An introduction. En: Bog-Hansen T C, Spengler G A, eds. *Lectins: Biology, biochemistry, clinical biochemistry*. 1<sup>a</sup> ed. Vol. 1. Berlin: Walter de Gruyter, 1981: 3-10.
- 375.**-Stadler B M, Liechti J, Bonnard G D. T cell stimulating lectins are mitogen inducers but

not mitogens. En: Bog-Hansen T C, Spengler G A, eds. Lectins: Biology, biochemistry, clinical biochemistry. 1ª ed. Vol. 3. Berlin: Walter de Gruyter, 1983; 37-43.

**376.**-Sharon N, Lis H. Lectins: cell agglutinating and sugar-specific proteins. Science 1972; 177: 949-959.

**377.**-Boyd W C, Shapleigh E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). Science 1954; 119: 419.

**378.**-Kocourek J, Horejsi V. A note on the recent discussion on definition of the term lectin. En: Bog-Hansen T C, Spengler G A, eds. Lectins: Biology, biochemistry, clinical biochemistry. 1ª ed. Vol. 3. Berlin: Walter de Gruyter, 1983; 3-8.

**379.**-Franz H, Ziska P. Combining sites containing proteins. En: Bog-Hansen T C, Spengler G A, eds. Lectins: Biology, biochemistry, clinical biochemistry. 1ª ed. Vol. 1. Berlin: Walter de Gruyter, 1981: 17-21.

**380.**-Kocourek J. Historical background. En: Liener I E, Sharon N, Goldstein I J, eds. The lectins. 1ª ed. Orlando: Academic Press, Inc. 1986: 3-32.

**381.**-Gallagher J T. Carbohydrate-binding properties of lectins: A possible approach to lectin nomenclature and classification. Biosci Rep 1984; 4: 621-632.

**382.**-Calderó J, Campo E. Lectinas: utilidad en histología e histopatología. Patologia 1990; 23: 127-135.

**383.**-Ryder S D, Smith J A, Rhodes E G, Parker N, Rhodes J M. Proliferative responses of HT29 and Caco2 human colorectal cells to a panel of lectins. Gastroenterology 1994; 106: 85-93.

**384.**-Lis H, Sharon N. Biological properties of lectins. En: Liener I E, Sharon N, Goldstein I J, eds. The lectins. 1ª ed. Orlando: Academic Press, Inc. 1986: 266- 291.

**385.**-Koninkx J F, Hendriks H G, van Rossum J M, van den Ingh T S, Mouwen J M. Interaction of legume lectins with the cellular metabolism of differentiated Caco-2 cells. Gastroenterology 1992; 102: 1516-1523.

**386.**-Goldstein I J, Hayes C E. The lectins: carbohydrate binding proteins of plants and animals. Adv Carbohydr Chem Biochem 1987; 35: 127-135.

**387.**-McCoy J P. Contemporary laboratory applications of lectins. BioTechniques 1986; 4: 252-258.

**388.**-Roth J. Application of lectin-gold complexes for electron microscopic localization of glycoconjugates on thin sections. Histochem Cytochem 1983; 31: 987-999.

**389.**-Bruel M T, Meiniel R, Meiniel A, David D. Ontogenical study of the chick embryo subcommissural organ by lectin-histofluorescence and electronmicroscopy. J Neural Transm 1987; 70: 145-168.

- 390.**-Rushfeldt C, Smedsrod B. Distribution of colon cancer cells permanently labeled by lectin-mediated endocytosis of a trap label. *Cancer Res* 1993; 53: 658-662.
- 391.**-Bresalier R S, Boland C R, Kim Y S. Regional differences in normal and cancer-associated glycoconjugates of the human colon. *J Natl Cancer Inst* 1985; 75: 249-260.
- 392.**-Freeman H J, Lotan R, Kim Y S. Application of lectins for detection of goblet cell glycoconjugate differences in proximal and distal colon of the rat. *Lab Invest* 1980; 42: 405-412.
- 393.**-Calderó J, Campo E, Calomarde X, Torra M. Distribution and changes of glycoconjugates in rat colonic mucosa during development, a histochemical study using lectins. *Histochemistry* 1988; 90: 261-270.
- 394.**-Colony P C, Steely J. Lectin binding patterns in developing rat colon. *Gastroenterology* 1987; 92: 1116-1126.
- 395.**-Suprasert A, Fujioka T, Yamada K. The histochemistry of glycoconjugates in the colonic epithelium of the chicken. *Histochemistry* 1987; 86: 491-497.
- 396.**-Nanci A, Zalzal S, Smith C E. Application of backscattered electron imaging and lectin-gold cytochemistry to visualize the distribution of glycoconjugates in a basal lamina. *Scanning Microscopy* 1987; 1: 1963-1970.
- 397.**-González-Campora R, Sanchez F, Martin I, Mora J, Montero C, Galera-Davidson H. Lectin histochemistry of the thyroid gland. *Cancer* 1988; 62: 2354-2362.
- 398.**-Mazzuca M, Lhermitte M, Lafitte J J, Roussel P. Use of lectins for detection of glycoconjugates in the glandular cells of the human bronchial mucosa. *Histochem Cyto-chem* 1982; 30: 956-966.
- 399.**-Hageman P, Bobrow L, van der Valk M A, Misdorp W, Hilkins J. Reactions with lectins on benign and malignant lesions of the human breast. Relation with the presence of differentiation antigens of the mammary gland. En: Bog-Hansen T C, Spengler G A, eds. *Lectins: Biology, biochemistry, clinical biochemistry*. 1<sup>a</sup> ed. Vol. 3. Berlin: Walter de Gruyter, 1983; 105-118.
- 400.**-Leathem A J, Brooks S A. Predictive value of lectin binding on breast cancer recurrence and survival. *Lancet* 1987; 1054-1056.
- 401.**-Stanley M W, Kiang D T, Sibley R K. Peanut lectin binding in breast carcinoma. Lack of correlation with estrogen receptor content. *Cancer* 1986; 58: 2046-2051.
- 402.**-Ree H J. Lectin histochemistry of malignant tumors. II. Concanavalin A: A new histochemical marker for macrophage-histiocytes in follicular lymphoma. *Cancer* 1983; 51: 1639-1646.
- 403.**-Ree H J, Hsu S. Lectin histochemistry of malignant tumors. I. Peanut agglutinin (PNA)

receptors in follicular lymphoma and follicular hyperplasia: an immunohistochemical study. *Cancer* 1983; 51: 1631-1638.

**404.**-Ree H J, Raine L, Crowley J P. Lectin binding patterns in diffuse large cell lymphoma. *Cancer* 1983; 52: 2089-2099.

**405.**-Hartman A L, Nakane P K. Immunological methods in scanning electron microscopy using peroxidase. En: Bullock G R, Petrusz P, eds. *Techniques in immunocytochemistry*. 1<sup>a</sup> ed. Vol. 2. London: Academic Press, Inc. 1983: 103-116.

**406.**-Molday R S. Labeling of cell surface antigens for SEM. En: Bullock G R, Petrusz P, eds. *Techniques in immunocytochemistry*. 1<sup>a</sup> ed. Vol. 2. London: Academic Press, Inc. 1983: 117-154.

**407.**-Bernhard W, Avrameas S. Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of concanavalin A. *Exp Cell Res* 1971; 64: 232-236.

**408.**-Geoghegan W D, Ackerman G A. Absorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, wheat germ agglutinin, and goat-anti-human immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level: a new method, theory and application. *J Histochem Cytochem* 1977; 25: 1187-1200.

**409.**-Roth J, Lucocq J M, Charest P M. Light and electron microscopic demonstration of sialic residues with the lectin from *Limax flavus*: a cytochemical affinity technique with the use of fetuin-gold complexes. *Histochem Cytochem* 1984; 32: 1167-1176.

**410.**-Brown D, Orci L. Interactions of lectins with specific cell types in toad urinary bladder. Surface distribution revealed by colloidal probes and label fracture. *Histochem Cytochem* 1986; 34: 1057-1062.

**411.**-Handley D A. The development and application of colloidal golds as a microscopic probe. En: Hayat M A, ed. *Colloidal gold. Principles, methods, and applications*. Vol. 1. 1<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic Press, Inc. 1989; 1-12.

**412.**-Faulk W P, Taylor G M. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry* 1971; 8: 1081-1083.

**413.**-Horisberger M. Colloidal gold as a tool in molecular biology. *Trends Biochem Sci* 1983; 8: 395-397.

**414.**-Horisberger M, Rosset J, Bauer H. Colloidal gold granules as markers for cell surface receptors in scanning electron microscope. *Experientia (Basel)* 1975; 31: 1147-1148.

**415.**-Benhamou N. Preparation and application of lectin-gold complexes. En: Hayat M A, ed. *Colloidal gold. Principles, methods, and applications*. Vol. I. 1<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic Press, Inc. 1989; 96-145.

**416.**-Hodges G M, Southgate J, Toulson E C. Colloidal gold-a powerful tool in scanning

electron microscope immunocytochemistry: an overview of bioapplications. *Scanning microscopy* 1987; 1: 301-318.

**417.**-Roth J. The colloidal gold marker system for light and electron microscopic cytochemistry. En: Bullock G R, Petrusz P, eds. *Techniques in immunocytochemistry*. 1<sup>a</sup> ed. Vol. 2. London: Academic Press, Inc. 1983: 217-284.

**418.**-Handley D A. Methods for synthesis of colloidal gold. En: Hayat M A, ed. *Colloidal gold. Principles, methods, and applications*. Vol. I. 1<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic Press, Inc. 1989; 13-33.

**419.**-Zsigmondy R, Thiesen P A: *Das Kolloidales gold*. Akadem Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1905.

**420.**-Stathis E C, Fabrikanos A: Preparation of colloidal gold. *Chem Ind (London)* 1958; 27: 860-861.

**421.**-Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspension. *Nature Phys Sci* 1973; 241: 20-22.

**422.**-Horisberger M. Colloidal gold for scanning electron microscopy. En: Hayat M A, ed. *Colloidal gold. Principles, methods, and applications*. Vol. 1. 1<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic Press, Inc. 1989; 217-229.

**423.**-Walther P, Müller M. Detection of small (5-15 nm) gold-labelled surface antigens using backscattered electrons. *Science of Biological Specimen Preparation* 1986; 195-201.

**424.**-De Harven E, Soligo D. Backscattered electron imaging of the colloidal gold marker on cell surfaces. En: Hayat M A, ed. *Colloidal gold. Principles, methods, and applications*. Vol. 1. 1<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic Press, Inc. 1989; 230-251.

**425.**-Kessimian N, Langner B J, McMillan P N, Jauregui H O. Lectin binding to parietal cells of human gastric mucosa. *J Histochem Cytochem* 1986; 34: 237-243.

**426.**-Roth J. Application of immunocolloids in light microscopy. II. Demonstration of lectin-binding sites in paraffin sections by the use of lectin-gold and glycoprotein-gold complex. *J Histochem Cytochem* 1983; 31: 547-552.

**427.**-Merchenthaler F, Gallyas F, Liposits Z. Silver intensification in immunocytochemistry. En: Bullock G R, Petrusz P, eds. *Techniques in immunocytochemistry*. 1<sup>a</sup> ed. Vol. 4. London: Academic Press, Inc. 1989: 217-251.

**428.**-Scopsi L. Silver-enhanced colloidal gold method. En: Hayat M A, ed. *Colloidal gold. Principles, methods, and applications*. Vol. I. 1<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic Press, Inc. 1989; 252-297.

**429.**-Hacker G W. Silver-enhanced colloidal gold for light microscopy. En: Hayat M A, ed. *Colloidal gold. Principles, methods, and applications*. Vol. I. 1<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic Press, Inc. 1989; 298-323.

- 430.**-Horisberger M, Tacchini-Volanthen M. Stability and steric hindrance of lectin-labelled gold markers in transmission and scanning electron microscopy. En: Bog-Hansen T C, Spengler G A, eds. *Lectins: Biology, biochemistry, clinical biochemistry*. 1<sup>a</sup> ed. Vol. 3. Berlin: Walter de Gruyter, 1983; 189-197.
- 431.**-Studer D, Hermann R. Colloidal gold particles detected on highly structured surfaces of large samples by backscattered electrons in the scanning electron microscope. *Science Biol Specimen Preparation* 1987; 1: 203-207.
- 432.**-Goldstein I J, Poretz R D. Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. En: Liener I E, Sharon N, Goldstein I J, eds. *The lectins*. 1<sup>a</sup> ed. Orlando: Academic Press, Inc. 1986: 35-247.
- 433.**-Nakayama J, Okano A, Maeda H, Miyachi M, Ota H, Katsuyama T, Kanai M. Griffonia simplicifolia agglutinin-2-binding glycoprotein as a novel carbohydrate antigen of human colonic carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1990; 81: 388-395.
- 434.**-Fozard J B J, Dixon M F, Axon A T R, Giles G R. Lectin and mucin histochemistry as an aid to cancer surveillance in ulcerative colitis. *Histopathology* 1987; 11: 385-394.
- 435.**-Lotan R, Skutelsky E, Danon D, Sharon N. The purification, composition, and specificity of the anti-T-lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *J Biol Chem* 1975; 250: 8518-8523.
- 436.**-Jass J R, Allison L J, Stewart S M, Lane M R. *Ulex europaeus* agglutinin-1 binding in hereditary bowel cancer. *Pathology* 1993; 25: 114-119.
- 437.**-Cazal P, Lalaurie M. Recherches sur quelques phytoagglutinines spécifiques des groupes sanguins ABO. *Acta Haematol (Basel)* 1952; 8: 73-80.
- 438.**-Pereira M E, Kisailus E, Gruezo F, Kabat E A. Immunochemical studies on the combining site of the blood group H-specific lectin 1 from *Ulex europaeus* seeds. *Arch Bio-chem Biophysics* 1978; 185: 108-115.
- 439.**-Calderó J, Campo E, Ascaso C, Ramos J, Panadés M J, Reñé J M. Regional distribution of glycoconjugates in normal, transitional and neoplastic human colonic mucosa. A histochemical study using lectins. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1989; 415: 347-356.
- 440.**-Bresalier R S, Boland C R, Kim Y S. Regional differences in normal and cancer-associated glycoconjugates of the human colon. *J Natl Cancer Inst* 1985; 75: 249-260.
- 441.**-Yang K, Cohen L, Lipkin M. Lectin soybean agglutinin: measurements in colonic epithelial cells of human subjects following supplemental dietary calcium. *Cancer Lett* 1991; 56: 65-69.
- 442.**-Kellokumpu I, Karhi K, Andersson L C. Lectin-binding sites in normal, hyperplastic, adenomatous and carcinomatous human colorectal mucosa. *Acta Pathol Microbiol Immunol*

Scand A 1986; 94: 271-280.

**443.**-Ota H, Nakayama J, Katsuyama T, Kanai M. Histochemical comparison of specificity of three bowel carcinoma-reactive lectins, Griffonia simplicifolia agglutinin-II, peanut agglutinin and Ulex europaeus agglutinin-I. Acta Pathol Jpn 1988; 38: 1547-1559.

**444.**-Gebbers J-O, Laissue J A. Mixed hyperplastic and neoplastic polyp of the colon. An immunohistological study. Virchows Arch A 1986; 410: 189-194.

**445.**-Campo E, Condom E, Palacin A, Quesada E, Cardesa A. Lectin binding patterns in normal and neoplastic colonic mucosa. A study of Dolichos biflorus, peanut agglutinin, and wheat germ agglutinin. Dis Colon Rectum 1988; 31: 892-899.

**446.**-Boland C R, Lance P, Levin B, Riddell R H, Kim Y S. Abnormal goblet cell glycoconjugates in rectal biopsies associated with an increased risk of neoplasia in patients with ulcerative colitis: early results of a prospective study. Gut 1984; 25: 1364-1371.

**447.**-Lance P, Lev R. Colonic oligosaccharide structure deduced from lectin-binding studies before and after desialylation. Hum Pathol 1991; 22: 307-312.

**448.**-Orntoft T F, Langkilde N C, Wiener H, Ottosen P D. Cellular localization of PNA binding in colorectal adenomas: comparison with differentiation, nuclear: cell height ratio and effect of desialylation. APMIS 1991; 99: 275-281.

**449.**-Ryder S D, Parker N, Ecclestone D, Haqqani M T, Rhodes J M. Peanut lectin stimulates proliferation in colonic explants from patients with inflammatory bowel disease and colon polyps. Gastroenterology 1994; 106: 117-124.

**450.**-Jacobs L R, Huber P W. Regional distribution and alterations of lectin binding to colorectal mucin in mucosal biopsies from controls and subjects with inflammatory bowel disease. J Clin Invest 1985; 75: 112-118.

**451.**-Rhodes J M, Black R R, Savage A. Glycoprotein abnormalities in colonic carcinomata, adenomata, and hyperplastic polyps shown by lectin peroxidase histochemistry. J Clin Pathol 1986; 39: 1331-1334.

**452.**-Sams J S, Lynch H T, Burt R W, Lanspa S J, Boland C R. Abnormalities of lectin histochemistry in familial polyposis coli and hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Cancer 1990; 66: 502-508.

**453.**-Kellokumpu I H. Differences in lectin reactivities of cellular glycoconjugates between primary human colorectal carcinomas and their metastases. Cancer Res 1986; 46: 4620-4625.

**454.**-Cooper HS. Peanut lectin-binding sites in large bowel carcinoma. Lab Invest 1982; 47: 383-390.

**455.**-Grigolato P, Benetti A, Berenzi A, Villanacci V, Tardanico R. PNA: a marker of neoplastic progression and differentiation in the gastro-intestinal tract. Int J Biol Markers 1990; 5: 81-84.



- 456.**-Cooper H S, Reuter V E. Peanut-lectin-binding sites in polyps of the colon and rectum. Adenomas, hyperplastic polyps, and adenomas with in situ carcinomas. *Lab Invest* 1983; 49: 655-661.
- 457.**-Boland C R. Lectin histochemistry in colorectal polyps. *Prog Clin Biol Res* 1988; 279: 277-287.
- 458.**-Ahnen D J, Warren G H, Greene L J, Singleton J W, Brown W R. Search for a specific marker of mucosal dysplasia in chronic ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1987; 93: 1346-55.
- 459.**-Fozard J B J, Dixon M F, Axon A T R, Giles G R. Lectin and mucin histochemistry as an aid to cancer surveillance in ulcerative colitis. *Histopathology* 1987; 11: 385-394.
- 460.**-Jessup J M, Qi K F, Kanellopoulos K, Cleary K, Hickey C, Reading C L. *Ulex europaeus* type I agglutinin detects carcinoembryonic antigen in extracts of human colorectal carcinoma. *J Cell Biochem* 1988; 37: 193-202.
- 461.**-Kuroki T, Kubota A, Miki Y, Yamamura T, Utsunomiya J. Lectin staining of neoplastic and normal background colorectal mucosa in nonpolyposis and polyposis patients. *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 679-684.
- 462.**-Freeman H J, Kim Y, Kim Y S. Glycoprotein metabolism in normal proximal and distal rat colon and changes associated with 1,2-Dimethylhydrazine-induced colonic neoplasia. *Cancer Res* 1978; 38: 3385-3390.
- 463.**-Calderó J, Campo E, Viñas J, Cardesa A. Lectin-binding sites in neoplastic and non-neoplastic colonic mucosa of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats. *Lab Invest* 1989; 61: 670-676.
- 464.**-Freeman H J. Lectin histochemistry of 1,2-Dimethylhydrazine-induced rat colon neoplasia. *J Histochem Cytochem* 1983; 31: 1241-1245.
- 465.**-Kotake K. Lectin histochemistry of 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colonic neoplasia and human colorectal neoplasia. *Nippon Geka Gakkai Zasshi (Abst)* 1988; 89: 534-546.
- 466.**-Shioda Y, Brown W R, Ahnen D J. Serial observations of colonic carcinogenesis in the rat. Premalignant mucosa binds *Ulex europaeus* agglutinin. *Gastroenterology* 1987; 92: 1-12.
- 467.**-Boland C R, Ahnen D J. Binding of lectins to goblet cell mucin in malignant and premalignant colonic epithelium in the CF-1 mouse. *Gastroenterology* 1985; 89: 127-137.
- 468.**-Balzer T, Sandforth F, Gutchmidt S, Riecken E O. Changes in the lectin-binding pattern of PNA-agglutinin and UEA-1 during the DMH-induced carcinogenesis in the normal appearing colonic mucosa of the rat. *Eur J Clin Invest* 1988; 18: 196-201.
- 469.**-Bybee A, Thomas N S B. Cell cycle regulation. *Blood Reviews* 1991; 5: 177-192.

- 470.**-Tur G E, Sato Y, Fukuoka T, Andoh H, Kotanagi H, Koyama K. Effect of the combination of hyperthermia and irradiation on human colon cancer cells. *J Surg Oncol* 1994; 56: 128-131.
- 471.**-Xiang J, Spanier S S, Benson N A, Braylan R C. Flow cytometric analysis of DNA content and soft-tissue using nuclear suspensions. *Cancer* 1987; 59: 1951-1958.
- 472.**-Marcote E, Campos A, Carrato A, Arlandis F, Vierna J. Significación pronóstica de la ploidía del ADN y de la fase S en el cáncer de mama. *Cir Esp* 1993; 53: 88-96.
- 473.**-Vera-Román J M. Uso de la citometría de flujo en la oncología actual. *Med Clin* 1987; 88: 544-546.
- 474.**-Van Dilla M A, Trujillo T T, Mullaney P F, Coulter J R. Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement. *Science* 1967; 163: 1213-1214.
- 475.**-Gómez A, García J, Orfao de Matos A. El análisis del ADN mediante citometría de flujo en la patología colorrectal maligna. *Cir Esp* 1991; 50: 132-136.
- 476.**-Givan A L. *Flow cytometry. First principles.* Wiley- Liss, Inc 1992 (1ª ed), New York.
- 477.**-Ensley J F, Maciorowski Z, Hassan M, Pietraszkiewicz H, Sakr W, Heilbrun L K. Variations in DNA aneuploid cell content during tumor dissociation in human colon and head and neck cancers analyzed by flow cytometry. *Cytometry* 1993; 14: 550-558.
- 478.**-Daver A, Bocquillon P G, Pagé M, Dalifard I, Chassevent A, Litas P, Cellier P, Bertrand G, Larra F, George P, Chabrun B, Ronceray J, Delaby J, Bressollette M, Roques J F, Barthe J P. Flow cytometric studies of colorectal tumors using fine needle aspiration. *Anticancer Res* 1987; 7: 531-534.
- 479.**-Skoog S J, Evans C P, Hayward I J, Griffin J L, Hitchcock C L. Flow cytometry of fine needle aspirations of the Sprague-Dawley rat testis: defining normal maturation and the effects of multiple biopsies. *J Urol* 1991; 146: 620-623.
- 480.**-Remvikos Y, Magdelénat H, Zajdela A. DNA flow cytometry applied to fine needle sampling of human breast cancer. *Cancer* 1988; 61: 1629-1634.
- 481.**-Hedley D W, Friedlander M L, Taylor I W, Musgrove E A. Method for analysis of cellular DNA content in paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983; 31: 1333-1335.
- 482.**-Gonchoroff N J, Ryan J J, Kimlinger T K, Witzig T E, Greipp P R, Meyer J S, Katzmann J A. Effect of sonication on paraffin-embedded tissue preparation for DNA flow cytometry. *Cytometry* 1990; 11: 642-646.
- 483.**-Mc Intire T L, Goldey S H, Benson N A, Braylan R C. Flow cytometry analysis of DNA in cells obtained from deparaffinized formalin-fixed lymphoid tissues. *Cytometry* 1987; 8: 474-578.

- 484.**-4. Ferrer-Roca O, Ballester-Guardia E, Martín Rodríguez J A. Consideraciones técnicas en la evaluación pronóstica de la citometría de flujo sobre material extraído de bloques de parafina. *Patología* 1989; 22: 263-265.
- 485.**-Berrocal A, González Barón M, Barón J M, Ordóñez A. Aplicaciones de la citometría de flujo en oncología. *Oncología* 1991; 14: 279-288.
- 486.**-Carretero F. La citometría de flujo en el control de calidad de la criopreservación. *Biol Clin Hematol* 1985; 7: 121-134.
- 487.**-Vindelov L L, Christensen I J, Nissen N I. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 1983; 3: 323-327.
- 488.**-Tagawa Y, Nakazaki T, Yasutake T, Matsuo S, Tomita M. Comparison of pepsin and trypsin digestion on paraffin-embedded tissue preparation for DNA flow cytometry. *Cytometry* 1993; 14: 541-549.
- 489.**-Joensuu H, Alanen K A, Klemi P J, Aine R. Evidence for false aneuploid peaks in flow cytometric analysis of paraffin-embedded tissue. *Cytometry* 1990; 11: 431-437.
- 490.**-Alanen K A, Joensuu H, Klemi P J. Autolysis is a potential source of false aneuploid peaks in flow cytometry DNA histograms. *Cytometry* 1989; 10: 417-425.
- 491.**-Ciancio G, Pollack A, Block N L. Flow cytometric analysis of DNA and nuclear protein in paraffin-embedded tissue. *Cytometry* 1993; 14: 205-209.
- 492.**-Göttlinger C, Mechtold B, Radbruch A. Operation of a flow cytometer. En: Radbruch A, ed. *Flow cytometry and cell sorting*. 1ª ed. Berlin: Springer-Verlag, 1992: 7-23.
- 493.**-Lowett E J, Schnitzer B, Keren DF, Flint A, Hudson J L, McClatchey K D. Application of flow cytometry to diagnostic pathology. *Lab Invest* 1984; 50: 115-140.
- 494.**-Kreicbergs A, Tribukait B, Willems J, Bauer H C. DNA flow analysis of soft tissue tumors. *Cancer* 1987; 59: 128-133.
- 495.**-Emdin S O, Stenling R, Roos G. Prognostic value of DNA content in colorectal carcinoma. A flow cytometric study with some methodologic aspects. *Cancer* 1987; 60: 1282-1287.
- 496.**-Nguyen H N, Sevin B U, Averette H E, Ramos R, Ganjei P, Perras J. Evidence of tumor heterogeneity in cervical cancers and lymph node metastases as determined by flow cytometry. *Cancer* 1993; 71: 2543-5450.
- 497.**-Larsson L I. *Immunocytochemistry: Theory and practice*. 1ª ed. Boca Raton: CRC Press, Inc. 1988: 77-130.
- 498.**-Barlogie B, Raber M N, Schumann J, Johnson T S, Drewinko B, Swartzendruber D E, Göhde W, Andreef M, Freireich E J. Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* 1983; 43: 3982-3997.

- 499.**-Paganelli G M, Lalli E, Facchini A, Biasco G, Santucci R, Brandi G, Barbara L. Flow cytometry and in vitro tritiated thymidine labeling in normal rectal mucosa of patients at high risk of colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 220-224.
- 500.**-Bibbo M, Michelassi F, Bartels P H, Dytch H, Bania C, Lerma E, Montag A G. Karyometric marker features in normal-appearing glands adjacent to human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1990; 50: 147-151.
- 501.**-Fukunaga M, Shimoda T, Nikaido T, Ushigome S, Ishikawa E. Soft tissue vascular tumors. *Cancer* 1993; 71: 2233-2241.
- 502.**-Dimanche-Boitrel M T; Pelletier H, Genne P, Petit J M, LeGrimellec C, Canal P, Ardiet C, Bastian G, Chauffert B. Confluence-dependent resistance in human colon cancer cells: role of reduced drug accumulation and low intrinsic chemosensitivity of sorting cells. *Int J Med* 1992; 50: 677-682.
- 503.**-Pearson J W, Fogler W E, Volker K, Usui N, Goldenberg S K, Gruys E, Riggs C W, Komschlies K, Wiltrout R H, Tsuruo T. Reversal of drug resistance in a human colon cancer xenograft expressing MDR1 complementary DNA by in vivo administration of MRK-16 monoclonal antibody. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 1386-1391.
- 504.**-Tagawa Y, Kawazoe N, Nishida T, Tomita M, Kobayashi M, Kuramoto S, Ihara O, Oohara T. Classification of DNA histogram perturbed with 5-FU and its clinical application. *Gan To Kagaku Ryoho* 1991; 18 (Abs.): 2101-2107.
- 505.**-Goerlach A, Krauer K G, McKenzie I F, Pietersz G A. In vitro antitumor activity of 2'-deoxy-5-fluorouridine-monoconjugates. *Bioconjug Chem* 1991; 2: 96-101.
- 506.**-Koss L G, Grenebaum E. Measuring DNA in human cancer. *JAMA* 1986; 225: 3158-3159.
- 507.**-Barlogie B, Drewinko B, Schumann J, Göhde W, Dosik G, Latreille J, Johnson DA. Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. *Am J Med* 1980; 69: 195-203.
- 508.**-Raber M N, Barlogie B. DNA flow cytometry of human solid tumors. En: *Flow cytometry and sorting*. 2<sup>nd</sup>ed. Wiley-liss, Inc, 1990: 745-754.
- 509.**-Wersto R P, Liblit R L, Deitch D, Koss L G. Variability in DNA measurements in multiple tumor samples of human colonic carcinoma. *Cancer* 1991; 67: 106-115.
- 510.**-Frankfurt OS. Flow cytometry analysis of DNA damage and the evaluation of cytotoxicity of alkylating agents. *Cancer Res* 1987; 47: 5537-5541.
- 511.**-Sobrero A F, Aschele C, Guglielmi A P, Mori A M, Melioli G G, Rosso R, Bertino J R. Synergism and lack of cross-resistance between short-term and continuous exposure to fluorouracil in human colon adenocarcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1937-1944.
- 512.**-Wheless L L, Coon J S, Cpox C, Deitch A D, de Vere R W, Koss L G, Melamed M R,

O'Connell M J, Reeder J E, Weinstein R S, Wersto R P. Measurement variability in DNA flow cytometry of replicate samples. *Cytometry* 1989; 10: 731-738.

**513.**-Díaz F J, García-Alonso I, Iturburu I, Portugal V, Alonso A, Echevarría A, Méndez J. Valor pronóstico del ADN nuclear de 106 tumores colorrectales, medido por microespectrofotometría. *Rev Esp Enf Digest* 1993; 83: 4211-428.

**514.**-Dorman A, Graham D, Curran B. Ploidy of smooth muscle tumors: retrospective analysis study of formalin fixed, paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol* 1990; 43: 465-468.

**515.**-Bauer K D, Bagwell C B, Giaretti W, Melamed M, Zarbo R J, Witzig T E, Rabinovitch P S. Consensus review of the clinical utility of DNA flow cytometry in colorectal cancer. *Cytometry* 1991; 14: 486-491.

**516.**-Wolley R C, Schreiber K, Koss L G, Karas M, Sherman A. DNA distribution in human colon carcinoma and its relationship to clinical behavior. *J Natl Cancer* 1982; 69: 15-22.

**517.**-Emblad P, Glimelius B, Bengtsson A. The prognostic significance of DNA content in carcinoma of the rectum and rectosigmoid. *Acta Chir Scand* 1987 1987; 153: 453-458.

**518.**-Levin B. Ulcerative colitis and colon cancer: biology and surveillance. *J Cell Biochem Suppl* 1992; 16: 47-50.

**519.**-Albe X, Vassilakos P, Helfer-Guarnori. Independent prognostic value of ploidy in colorectal cancer. A prospective study using image cytometry. *Cancer* 1990; 66:1168-1175.

**520.**-Rowley S, Newbold K M, Gearty J, Keighley M R, Donovan I A, Neoptolemos J P. Comparison of deoxyribonucleic acid ploidy and nuclear expressed p62 c-myc oncogene in the prognosis of colorectal cancer. *World J Surg* 1990; 14: 545-551.

**521.**-Shutte B, Reynders M M, Wiggers T. Retrospective analysis of the prognostic significance of DNA content and proliferative activity in large bowel carcinoma. *Cancer Res* 1987; 47: 5494-5496.

**522.**-Tshushima K, Nagorney D M, Rainwater L M. Prognostic significance of nuclear doxyribonucleic acid ploidy patterns in resected hepatic masses from colorectal carcinoma. *Surgery* 1987; 1023: 635-643.

**523.**-Banner B F, Tomás de la Vega J E, Roseman D L, Coon J S. Should flow cytometric DNA analysis precede definitive surgery for colon carcinoma. *Ann Surg* 1985; 202: 740-744.

**524.**-Scott N A, Rainwater L M, Wieand H D. The relative prognostic value of flow cytometric DNA analysis and conventional clinicopathologic criteria in patients with operable rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1987; 30: 513-520.

**525.**-Wiggers T, Arends J W, Schutte B, Volovics L, Bosman F T. A multivariate analysis of pathologic prognostic indicators in large bowel cancer. *Cancer* 1988; 61: 386-395.

- 526.**-Deans G T, Williamson K, Heatley M, Hamilton P, Arthurs K, Crockard A, Patterson C C, Rowlands B J, Parks G, Spence R A. The role of flow cytometry in carcinoma of the colon and rectum. *Surg Gynecol Obstet* 1993; 177: 377-382.
- 527.**-Melamed M R, Enker W E, Banner P. Flow cytometry of colorectal carcinoma with three-year follow-up. *Dis Colon Rectum* 1986; 29: 184-186.
- 528.**-Bauer K D, Lincoln S T, Vera-Román J M. Prognostic implications of proliferative activity and DNA aneuploidy in colonic adenocarcinoma. *Lab Invest* 1987; 57: 329-335.
- 529.**-Stipa S, Danesi D T, Modini C, Cicconetti F, Mauro F, Schillaci A, Mecozzi A, Nicolanti V, Stipa F, Mancini M. The importance of heterogeneity and of multiple site sampling in the prospective determination of deoxyribonucleic acid flow cytometry. *Surg Gynecol Obstet* 1993; 176: 427-434.
- 530.**-D'Agnano I, Cosimelli M, La Pera A, Cavaliere F, Mannella E, Giannarelli D, Cavaliere R, Zupi G. Flow cytometric analysis of DNA content and cell kinetics in colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 1993; 13: 699-703.
- 531.**-Costa A, Faranda A, Scalmati A, Quagliuolo V, Colella G, Poz de Leon M, Silvestrini R. Autoradiographic and flow cytometric assessment of cell proliferation in primary colorectal cancer: relationship to DNA ploidy and clinico-pathological features. *Int J Cancer* 1992; 50: 719-723.
- 532.**-Bosari S, Lee A K, Wiley B D, Heatley G J, Silverman M L. Flow cytometric and image analyses of colorectal adenocarcinomas. A comparative study with clinical correlations. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 187-194.
- 533.**-Kouri M. DNA ploidy of colorectal carcinoma by tumour site, gender and history of noncolorectal malignancies. *Oncology* 1993; 50: 41-45.
- 534.**-Frankfurt O S, Arbuck S G, Chin J L, Greco W R, Pavelic Z P, Slocum H K, Mittelman A, Piver S M, Pontes E J, Rustum Y M. Prognostic applications of DNA flow cytometry for human solid tumors. *Ann N Y Acad Sci* 1986; 468: 276-290.
- 535.**-Jones D J, Moore M, Schofield P F. Prognostic significance of DNA ploidy in colorectal cancer: a prospective flow cytometry study. *Br J Surg* 1988; 75: 28-33.
- 536.**-Kearney T J, Price E A, Lee S, Silberman A W. Tumor aneuploidy in young patients with colorectal cancer. *Cancer* 1993; 72: 42-45.
- 537.**-Armitage N C, Ballantyne K C, Sheffield J P, Evans D F. A prospective evaluation of the effect of tumor cell DNA content on recurrence in colorectal cancer. *Cancer* 1991; 67: 2599-2604.
- 538.**-Scott N A, Wieand H S, Moertel C G, Cha S S, Beart R W, Lieber M M. Colorectal Cancer. Dukes Stage, tumor site, preoperative plasma CEA level, and patient prognosis related to tumor DNA ploidy pattern. *Arch Surg* 1987; 122: 1375-1379.

- 539.**-Heimann T M, Miller F, Martinelli G, Mester J, Kurtz R J, Szporn A, Fasy T. Significance of DNA content abnormalities in small rectal cancers. *Am J Surg* 1990; 159: 199-203.
- 540.**-García J, Muñoz de la Espada J B, Orfao A, Ciudad J, Gómez A. Correlación clínico-biológica y características del ADN en 74 pacientes con cáncer colorrectal. (citometría de flujo de piezas en fresco). *Cir Esp* 1992; 51: 16-20.
- 541.**-Giaretti W, Danova M, Geido E, Mazzini G, Sciallero S, Aste H, Scivetti P, Riccardi A, Marsano B, Merlo F, d'Amore E. Flow cytometric DNA index in the prognosis of colorectal cancer.
- 542.**-Kokal W, Sheibani K, Terz J, Harada J R. Tumor DNA content in the prognosis of colorectal cancer. *JAMA* 1986; 255: 3123-3127.
- 543.**-Witzig T E, Loprinzi C L, Gonchoroff N J, Reiman H M, Cha S S, Wieand H S, Katzmann J A, Paulsen J K, Moertel C G. DNA ploidy and cell kinetic measurements as predictors of recurrence and survival in stages B2 and C colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 1991; 68: 879-888.
- 544.**-Hiddemann W, Bassewitz V, Kleinemeier H-J, Schulte-Brochterbeck E, Hauss J, Lingemann B, Büchner T, Grundmann E. DNA stemline heterogeneity in colorectal cancer. *Cancer* 1986; 58: 258-263.
- 545.**-Bianchi A, Mallofre C, Serrano A, Diloy R, Suñol J, Barja J, Ubach M. Estudio de la proliferación celular en pacientes con cáncer colorrectal solitario, sincrónico y con pólipos. *Rev Esp Enf Dig* 1992; 82: 401-404.
- 546.**-Bianchi A, Mallofre C, Serrano A, Suñol J, Barja J, Ubach M. Estudio del DNA como factor pronóstico en cáncer colo-rectal. Análisis retrospectivo de 34 pacientes. *Rev Esp Enf Digest* 1993; 84: 100-104.
- 547.**-Meling G I, Rognum T O, Clausen O P F, Chen Y, Lunde O C, Schlichting E. Association between DNA aneuploidy pattern and cellular atypia colorectal carcinomas: a new clinical application of DNA flow cytometric study. *Cancer* 1991; 67: 1642-9.
- 548.**-Streffler C, van Beuningen D, Gross E, Schabronath J, Eigler F W, Rebmann A. Predictive assays for the therapy of rectum carcinoma. *Radiother Oncol* 1986; 5: 303-310.
- 549.**-Quirke P, Durdey P, Dixon M F, Dyson J E D, Williams N S, Bird C C. The prognostic significance of DNA aneuploidy and cell proliferation in rectal adenocarcinomas. *J Pathol* 1987; 151: 285-292.
- 550.**-Fischbach W, Mössner J, Seyschab H, Höhn H. Tissue carcinoembryonic antigen and DNA aneuploidy in precancerous and cancerous colorectal lesions. *Cancer* 1990; 65: 1820-1824.
- 551.**-Hammarberg C, Slezak P, Tribukait B. Early detection of malignancy in ulcerative colitis. *Cancer* 1984; 53: 291-295.

- 552.**-Levine D S, Rabinovitch P S, Haggitt R C, Blount P L, Dean P J, Rubin C E, Reid B J. Distribution of aneuploid cell populations in ulcerative colitis with dysplasia or cancer. *Gastroenterology* 1991; 101: 1198-1210.
- 553.**-Brostrom O. Ulcerative colitis and colon cancer: the role of surveillance. *Ann Med* 1989; 21: 309-311.
- 554.**-Melville D M, Jass J R, Shepherd N A, Northover J M, Capellaro D, Richman P I, Lennard-Jones J E, Ritchie J K, Andersen S N. Dysplasia and deoxyribonucleic acid aneuploidy in the assessment of precancerous changes in chronic ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1988; 95: 668-675.
- 555.**-Fozard J B, Quirke P, Dixon M F, Giles G R, Bird C C. DNA aneuploidy in ulcerative colitis. *Gut* 1986; 27: 1414-1418.
- 556.**-Ahnen D J. Abnormal DNA content as a biomarker of large bowel cancer risk and prognosis. *J Cell Biochem Suppl* 1992; 16: 143-150.
- 557.**-Sciallero S, Brumo S, Di Vinci A, Geido E, Aste H, Giaretti W, Flow cytometric DNA ploidy in colorectal adenomas and family history of colorectal cancer. *Cancer* 1988; 61: 114-120.
- 558.**-Quirke P, Fozard J B J, Dixon M F, Dyson J E D, Giles G R, Bird C C. DNA aneuploidy in colorectal adenomas. *Br J Cancer* 1986; 53: 477-481.
- 559.**-Ingh van den H, Griffioen G, Cornelisse C J. Flow cytometric detection of aneuploidy in colorectal adenomas. *Cancer Res* 1985; 45: 3392-3397.
- 560.**-Schwartz D, Banner B F, Roseman D L, Coon J S. Origin of multiple primary colon carcinomas. A retrospective flow cytometric study. *Cancer* 1986; 58: 2082-2088.
- 561.**-Waynforth H B, Flecknell P A. Anaesthesia and postoperative care. En: *Experimental and Surgical technique in the rat*. 2<sup>a</sup> ed. London: Academia Press, 1992:100-152.
- 562.**-Glauert A M. Introduction. En: *Fixation, dehydration and embedding of biological specimens*. 1<sup>a</sup> ed. North-Holland Publishing Company, 1987: 1-4.
- 563.**-Glauert A M. Fixatives. En: *Fixation, dehydration and embedding of biological specimens*. 1<sup>a</sup> ed. North-Holland Publishing Company, 1987: 6-65.
- 564.**-Goldstein J L, Newbury D E, Echlin P, Joy D C, Fiasi Ch, Lifshin E. Coating Techniques for SEM and microanalysis. En: *Scanning electron microscopy and X ray microanalysis*. 1<sup>a</sup> ed. New York: Plenum Press, 1984: 461-494.
- 565.**-Goldstein J L, Newbury D E, Echlin P, Joy D C, Fiasi Ch, Lifshin E. Preparation of biological samples for scanning electron microscopy. En: *Scanning electron microscopy and X ray microanalysis*. 1<sup>a</sup> ed. New York: Plenum Press, 1984: 495-539.
- 566.**-Filipe M I, Lake B D. *Histochemistry in pathology*. London: Churchill Livingstone;



1983: 311-314.

**567.**-Roth J. Light and electron microscopic localization of glycoconjugates with gold-labeled reagents. *Scanning Microsc Intern* 1987; 1: 695-704.

**568.**-Slot J W, Geuze H J. Sizing protein A-colloidal gold probes for immunoelectron microscopy. *J Cell Biol* 1981; 533-536.

**569.**-Schawrtz D. Métodos estadísticos para médicos y biólogos. En: *Monografias de bioestadística y psicología matemática*. Doménech J M, Riba M D, eds. Editorial Herder: Barcelona, 1988.

**570.**-Colton T. *Estadística en medicina*. Salvat Editores: Barcelona, 1979.

**571.**-Suzuki K, Murakita H, Hagino M, Satou F, Katou T, Kholi Y. Mucosubstances and lectin histochemistry of DMH induced colonic tumor in rats. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 1991; 88 (Abs): 1404-1412.

**572.**-Chang W W L. The mode of growth and compartmentalization of neoplastic glands during experimental colon carcinogenesis. *Am J Pathol* 1986; 124: 420-426.

**573.**-Laumonier R. Significance of precancerous lesions in the colon and rectum. *Biomedicine* 1975; 22: 358-367.

**574.**-Spjut H J, Smith M N. A comparative electronmicroscopic study of human and rat colonic polyps and carcinomas. *Exp Mol Pathol* 1977; 19-34.

**575.**-Pereira M A, Khoury M D. Prevention by chemopreventive agents of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon. *Cancer Letters* 1991; 61: 27-33.

**576.**-Glickman L T, Senterman M K, Fleischer D M. 1, 2 -Dimethylhydrazine-induced nuclear aberrations in A/J and C57BL/6J mouse colonic crypts. *JNCI* 1987; 79: 499-507.

**577.**-Sandforth F, Heimpel S, Balzer T, Gutschmidt S, Riecken E O. Characterization of stereomicroscopically identified preneoplastic lesions during dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis. *Eur J Clin Invest* 1988; 18: 655-662.

**578.**-Delapierre F, Laumonier R, Tayot J. Étude ultrastructural de côlon préneoplasique (carcinogénèse par la 1,2-diméthylhydrazine). *An Anat Pathol* 1978; 23: 309-332.

**579.**-Barkla D H, Tutton P J M. Surface changes in the descending colon of rats treated with dimethylhydrazine. *Cancer Res* 1977; 37: 262-271.

**580.**-Hoskins L C, Zamcheck N. Studies on gastric mucins in health and disease. *Ann NY Acad Sci* 1963; 106: 767-774.

**581.**-Filipe M I. Mucous secretion in rat colonic mucosa during carcinogenesis induced by dimethylhydrazine. A morphological study. *Br J Cancer* 1975; 32: 60-77.

- 582.**-McGarrity T J, Via E A, Colony P C. Qualitative and quantitative changes in sialomucins during 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rat. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79: 1375-1382.
- 583.**-Filipe M I, Branfoot A C. Abnormal patterns of mucuc secretion in apparently normal mucosa of large intestine with carcinoma. *Cancer* 1974; 34: 282-290.
- 584.**-Shamsuddin A K M, Trump B F. Colon epithelium II. In vivo studies of colon carcinogenesis. Light microscopic, histochemical and ultrastructural studies of histogenesis of azoxymethane induced colon carcinomas in Fisher 344 rats. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66: 389-393.
- 585.**-Fischbach W, Rubsam B, Mossner J, Wunsch H P, Seyschab H, Hohn H. DNA aneuploidy and proliferation in spontaneous human and dimethylhydrazine-induced murine colorectal carcinogenesis. *Z Gastroenterol* 1991; 29: 533-537.
- 586.**-Shankey T V, Rabinovitch P S, Badwell B. Guidelines for implemetation of clinical DNA cytometry. *Cytometry* 1993; 14: 472-477.
- 587.**-Seckinger D, Sugarbaker E, Frankfurt O. DNA content in human cancer. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 619-626.
- 588.**-Enker W E. Flow cytometric determination of tumor cell DNA content and proliferative index as prognostic variables in colorectal cancer. *Perspect Colon Rectal Surg* 1990; 3: 1-28.
- 589.**-Bianchi A, Mallofre C, Soler T, Diloy R, García A, Suñol J, Barja J, Hidalgo L, Ubach M. Alteraciones de la proliferación celular de la mucosa sana en pacientes con cáncer colorrectal. *Rev Esp Enf Digest* 1994; 85: 431-434.
- 590.**-Oscarson J E, Veen H F, Ross J S, Malt R A. Ileal resection potentiates 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis. *Ann Surg* 1979; 189: 503-508.
- 591.**-Deshner E E. Cell turnover and colon tumor development. *Prev Med* 1987; 16: 580-585.
- 592.**-Glickman L t, Suissa S, Fleiszer D M. Proliferative characteristics of colonic crypt cells in C57BL/6J and A/J mice as predictors of subsequent tumor formation. *Cancer Res* 1987; 47: 4766-4770.
- 593.**-McGarrity T J, Peiffer L P, Colony P C. Cellular proliferation in proximal and distal rat colon during 1,2-dimethylhydrazine-induced carcinogenesis. *Gastroenterology* 1988; 95: 343-348.
- 594.**-Bianchi A, Mallofre C, Soler T, Diloy R, García A, Suñol J, Barja J, Hidalgo L, Ubach M. Alteraciones de la proliferación celular de la mucosa sana en pacientes con cáncer colorrectal. *Rev Esp Enf Digest* 1994; 85: 431-434.
- 595.**-McGowan P F, Hurst R F, Bass R A, Hemstreet G P, Lane M M, Zompa E, Murray C K, Postier R G. Early detection of colorectal cancer by quantitative fluorescence image analysis of exfoliated cells. *Am J Surg* 1990; 159: 172-176.

**596.**-Baril A, Boucheron S, Dumollard J M, Billard F. A quantitative study of epithelial alterations during the early stages of experimental colonic tumorigenesis in mice. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1990; 59: 377-382.

## IX. ANEXO

### VARIABLES

**número:** número de orden de rata

**grupo:** grupos de estudio

- 1: grupo A
- 2: grupo B
- 3: grupo C
- 4: grupo D
- 5: grupo E

**tto:** tratamiento

- No: ratas control no inyectadas
- D-N: muestra macroscópicamente normal de ratas inyectas con DMH
- D-T: muestra tumoral de ratas inyectadas con DMH
- PRE: muestra preneoplásica
- EDTA: ratas control inyectadas con EDTA

**semana:** semanas de tratamiento

**sexo:** macho  
hembra

**Local:** localización de la muestra

- Ciego: ciego
- C.A.: colon ascendente
- C.T.: colon transverso
- C.D.: colon descendente

**Macro:** aspecto macroscópico tumoral

- p. sesil: pólipo sesil
- p. pedulado: pólipo pedunculado
- t. exofítico: tumor exofítico
- t. ulcerado: tumor ulcerado

**Histo:** tipo histológico

- Adenocarcinoma: adenocarcinoma
- C. mucinoso: carcinoma mucinoso
- C. in situ: carcinoma *in situ*
- D. leve: displasia leve
- D. moderada: displasia moderada
- D. severa: displasia severa

**Dif:** diferenciación celular tumoral

- mod: moderadamente diferenciado
- poco: pobremente diferenciado

**Dukes:** estadio tumoral según la clasificación de Dukes

Dukes A  
Dukes B  
Dukes C

**Tamaño:** tamaño

grande  $\leq 0,8$

pequeño  $< 0,8$

**Placa:** presencia de placa linfoide

si: presencia de placa linfoide asociada

no: ausencia de placa linfoide asociada

**otrost:** presencia de otros tumores sincrónicos colorrectales

si: presencia

no: ausencia

**id:** presencia de tumores sincrónicos de intestino delgado

si: presencia

no: ausencia

**meta:** presencia de metástasis

si: presencia

no: ausencia

**gmt:** marcaje con la lectina *Glycine max*  
de los tumores en M.O.

Todo: marcaje de todo el tumor

Areas: marcaje heterogéneo del tumor

No: ausencia de marcaje

**gmmt:** marcaje con la lectina *Glycine max*  
de la mucosa transicional en M.O.

Si: marcaje

No: ausencia de marcaje

**gmn:** marcaje con la lectina *Glycine max*  
de la mucosa normal en M.O.

Si: marcaje

No: ausencia de marcaje

**bst:** marcaje con la lectina *Griffonia simplicifolia-II*  
de los tumores en M.O.

Todo: marcaje de todo el tumor

Areas: marcaje heterogéneo del tumor

No: ausencia de marcaje

**bsmt:** marcaje con la lectina *Griffonia simplicifolia-II*  
de la mucosa transicional en M.O.

Si: marcaje

No: ausencia de marcaje

**bsn:** marcaje con la lectina *Griffonia simplicifolia-II* de la mucosa normal en M.O.

Si: marcaje

No: ausencia de marcaje

**pt:** marcaje con la lectina *Arachis hypogaea* de los tumores en M.O.

Todo: marcaje de todo el tumor

Areas: marcaje heterogéneo del tumor

No: ausencia de marcaje

**pmt:** marcaje con la lectina *Arachis hypogaea* de la mucosa transicional en M.O.

Si: marcaje

No: ausencia de marcaje

**pn:** marcaje con la lectina *Arachis hypogaea* de la mucosa normal en M.O.

Si: marcaje

No: ausencia de marcaje

**ut:** marcaje con la lectina *Ulex europaeus-I* de los tumores en M.O.

Todo: marcaje de todo el tumor

Areas: marcaje heterogéneo del tumor

No: ausencia de marcaje

**umt:** marcaje con la lectina *Ulex europaeus-I* de la mucosa transicional en M.O.

Si: marcaje

No: ausencia de marcaje

**un:** marcaje con la lectina *Ulex europaeus-I* de la mucosa normal en M.O.

Si: marcaje

No: ausencia de marcaje

**megm:** marcaje con la lectina *Glycine max* de los tumores en MES

Si: marcaje

No: ausencia de marcaje

**mebs:** marcaje con la lectina *Griffonia simplicifolia-II* de los tumores en MES

Si: marcaje

No: ausencia de marcaje

**mep:** marcaje con la lectina *Arachis hypogaea* de los tumores en MES

Si: marcaje

No: ausencia de marcaje

**meu:** marcaje con la lectina *Ulex europaeus-I* de los tumores en MES

Si: marcaje

No: ausencia de marcaje

**pas:** tinción AB-PAS de los tumores colorrectales

P/A: tinción mixta PAS y AB

AB: tinción con azul alzian

A-P: tinción combinada AB-PAS

PAS: tinción con PAS

no: ausencia de tinción

**g1:** % de células en fase  $G_0G_1$

**g2:** % de células en fase  $G_2M$

**s:** % de células en fase S

**ip:** índice de proliferación celular (fase  $G_2M$ +fase S)

número	grupo	tto	semana	sexo	local	macro
2	1	NO TTO	.	macho	C.A.	.
2	1	NO TTO	.	macho	C.T.	.
3	1	NO TTO	.	macho	Ciego	.
3	1	NO TTO	.	macho	C.A.	.
3	1	NO TTO	.	macho	C.T.	.
3	1	NO TTO	.	macho	C.D.	.
4	1	NO TTO	.	hembra	Ciego	.
4	1	NO TTO	.	hembra	C.T.	.
4	1	NO TTO	.	hembra	C.D.	.
5	1	NO TTO	.	macho	Ciego	.
5	1	NO TTO	.	macho	C.A.	.
5	1	NO TTO	.	macho	C.T.	.
6	1	NO TTO	.	hembra	C.A.	.
7	1	NO TTO	.	hembra	Ciego	.
7	1	NO TTO	.	hembra	C.A.	.
7	1	NO TTO	.	hembra	C.D.	.
8	1	NO TTO	.	hembra	Ciego	.

8	1	NO TTO	.	hembra	C.A.	.
8	1	NO TTO	.	hembra	C.T.	.
1	2	D-N	21	macho	C.T.	.
2	2	D-T	18	hembra	C.A.	t. exofítico
2	2	D-T	18	hembra	C.A.	t. exofítico
2	2	D-N	18	hembra	C.T.	.
2	2	D-N	18	hembra	C.D.	.
5	2	D-T	24	macho	ciego	t. ulcerado
6	2	D-T	26	macho	Ciego	t. exofítico
6	2	D-T	26	macho	C.A.	t. exofítico
6	2	D-N	26	macho	C.T.	.
6	2	D-N	26	macho	C.D.	.
6	2	D-T	26	macho	C.D.	t. ulcerado
7	2	D-N	26	macho	Ciego	.
7	2	D-T	26	macho	C.A.	p. sesil
7	2	D-N	26	macho	C.D.	.
7	2	D-T	26	macho	C.D.	p. pedunculado
8	2	D-T	27	macho	C.A.	t. exofítico
8	2	D-N	27	macho	C.T.	.
8	2	D-T	27	macho	C.T.	t. exofítico
9	2	D-N	28	macho	Ciego	.
9	2	D-T	28	macho	C.A.	t. exofítico
9	2	D-N	28	macho	C.T.	.
9	2	D-T	28	macho	C.T.	t. exofítico
9	2	D-T	28	macho	C.D.	p. sesil
10	2	D-N	29	macho	Ciego	.
10	2	D-N	29	macho	C.A.	.
10	2	D-T	29	macho	C.T.	p. sesil
10	2	D-N	29	macho	C.D.	.
10	2	D-N	29	macho	C.D.	.
10	2	D-T	29	macho	C.D.	t. exofítico
10	2	D-T	29	macho	C.D.	p. sesil
11	2	D-T	29	macho	C.A.	t. exofítico
11	2	D-T	29	macho	C.A.	t. exofítico
11	2	D-N	29	macho	C.T.	.



**Tabla 9-1**

número	Grupo	tto	semana	sexo	local	macro
11	2	D-N	29	macho	C.D.	.
11	2	D-T	29	macho	C.D.	p. pedunculado
11	2	D-T	29	macho	C.D.	p. pedunculado
12	2	D-T	29	macho	Ciego	t. exofítico
12	2	D-T	29	macho	C.A	p. sesil
12	2	D-T	29	macho	C.T.	t. ulcerado
12	2	D-T	29	macho	C.D.	t. exofítico
12	2	D-T	29	macho	C.D.	p. sesil
13	2	D-N	30	macho	C.T.	.
13	2	D-T	30	macho	C.T.	t. exofítico
13	2	D-T	30	macho	C.T.	p. sesil
13	2	D-N	30	macho	C.D.	.
13	2	D-T	30	macho	C.D.	t. exofítico
13	2	D-T	30	macho	C.D.	t. exofítico
14	2	D-N	30	hembra	Ciego	.
14	2	D-T	30	hembra	Ciego	.
14	2	D-T	30	hembra	C.A.	t. ulcerado
14	2	D-T	30	hembra	C.A.	t. ulcerado
14	2	D-T	30	hembra	C.T.	t. exofítico
14	2	D-T	30	hembra	C.T.	t. exofítico
14	2	D-N	30	hembra	C.D.	.
14	2	D-T	30	hembra	C.D.	p. pedunculado
15	2	D-N	30	hembra	Ciego	.
15	2	D-N	30	hembra	C.T.	.
15	2	D-N	30	hembra	C.T.	.
15	2	D-T	30	hembra	C.T.	t. exofítico
15	2	D-T	30	hembra	C.T.	.
15	2	D-N	30	hembra	C.D.	.
16	2	D-T	30	hembra	C.A.	t. exofítico
16	2	D-T	30	hembra	C.D.	p. sesil
17	2	D-N	31	hembra	Ciego	.
17	2	D-T	31	hembra	C.T.	p. pedunculado
17	2	D-N	31	hembra	C.D.	.
17	2	D-T	31	hembra	C.D.	t. exofítico

17	2	D-T	31	hembra	C.D.	p. pedunculado
18	2	D-T	31	hembra	C.A.	t. exofítico
19	2	D-T	31	hembra	C.A.	t. exofítico
18	2	D-N	31	hembra	C.T.	.
18	2	D-T	31	hembra	C.T.	t. exofítico
18	2	D-N	31	hembra	C.D.	.
19	2	D-T	31	hembra	C.T.	p. sesil
19	2	D-N	31	hembra	C.D.	.
21	2	D-T	23	macho	C.A.	p. pedunculado
21	2	D-N	23	macho	C.T.	.
21	2	D-T	23	macho	C.T.	p. pedunculado
22	2	D-T	22	macho	Ciego	t. ulcerado
22	2	D-T	22	macho	C.A.	p. pedunculado
22	2	D-N	22	macho	C.D.	.
22	2	D-T	22	macho	C.D.	p. pedunculado
24	2	D-T	24	macho	C.A.	t. ulcerado
24	2	D-T	24	macho	C.T.	.
24	2	D-T	24	macho	C.D.	t. exofítico
26	2	D-N	25	macho	Ciego	.

**Tabla 9-2**

número	grupo	tto	semana	sexo	local	macro
26	2	D-N	25	macho	C.T.	.
26	2	D-N	25	macho	C.D.	.
27	2	D-T	27	macho	C.T.	t. ulcerado
27	2	D-T	27	macho	C.T.	t. ulcerado
28	2	D-N	28	macho	Ciego	.
29	2	D-N	29	macho	C.A.	.
29	2	D-T	29	macho	C.D.	p. pedunculado
30	2	D-T	30	macho	C.A.	p. pedunculado
30	2	D-N	30	macho	C.D.	.
30	2	D-T	30	macho	C.D.	t. exofítico
32	2	D-N	32	hembra	Ciego	.
32	2	D-N	32	hembra	C.A.	.
32	2	D-T	32	hembra	C.A.	t. exofítico
32	2	D-N	32	hembra	C.T.	.

32	2	D-N	32	hembra	C.D.	.
33	2	D-N	33	hembra	Ciego	.
33	2	D-T	33	hembra	Ciego	p. sesil
33	2	D-N	33	hembra	C.D.	.
34	2	D-T	33	hembra	C.A.	p. pedunculado
36	2	D-T	33	hembra	C.A.	t. ulcerado
36	2	D-T	33	hembra	C.T.	p. pedunculado
36	2	D-N	33	hembra	C.D.	.
37	2	D-T	33	hembra	C.A.	p. pedunculado
38	2	D-T	33	hembra	C.A.	p. pedunculado
39	2	D-T	34	hembra	C.A.	p. sesil
40	2	D-T	34	hembra	C.A.	p. pedunculado
40	2	D-T	34	hembra	C.A.	p. sesil
41	2	D-T	34	hembra	Ciego	p. sesil
41	2	D-T	34	hembra	C.T.	p. pedunculado
43	2	D-T	34	hembra	C.A.	p. pedunculado
46	4	D-T	29	macho	C.T.	t. exofítico
50	4	D-T	29	macho	C.A.	t. ulcerado
52	4	D-T	30	macho	C.A.	t. exofítico
53	4	D-T	30	macho	C.A.	p. sesil
56	4	D-T	31	hembra	Ciego	t. exofítico
56	4	D-T	31	hembra	C.A.	p. sesil
56	4	D-T	31	hembra	C.T.	t. exofítico
57	4	D-T	32	hembra	C.A.	p. sesil
58	4	D-T	32	hembra	Ciego	p. sesil
58	4	D-T	32	hembra	Ciego	p. sesil
60	4	D-T	32	hembra	C.A.	p. pedunculado
61	4	D-T	33	hembra	C.A.	t. ulcerado
62	4	D-T	33	hembra	Ciego	t. exofítico
63	4	D-T	33	hembra	C.A.	p. sesil
3	3	PRENEOP	2	hembra	C.A.	.
3	3	PRENEOP	2	hembra	C.T.	.
3	3	PRENEOP	2	hembra	C.D.	.
6	3	PRENEOP	4	macho	Ciego	.
6	3	PRENEOP	4	macho	C.A.	.
6	3	PRENEOP	4	macho	C.T.	.

6	3	PRENEOP	4	macho	C.D.	.
11	3	PRENEOP	6	hembra	Ciego	.
11	3	D-T	6	hembra	Ciego	.

**Tabla 9-3**

número	grupo	tto	semana	sexo	local	macro
11	3	PRENEOP	6	hembra	C.T.	.
11	3	PRENEOP	6	hembra	C.D.	.
12	3	D-T	6	hembra	Ciego	.
12	3	D-T	6	hembra	C.T.	.
13	3	D-T	8	macho	C.A.	.
15	3	PRENEOP	8	hembra	C.T.	.
15	3	PRENEOP	8	hembra	C.D.	.
22	3	D-T	12	macho	C.D.	.
22	3	D-T	12	macho	C.T.	p. sesil
27	3	D-T	16	hembra	C.D.	p. pedunculado
29	3	D-T	16	macho	C.A.	p. sesil
31	3	D-T	16	hembra	C.T.	.
33	3	D-T	18	macho	C.T.	t. exofítico
34	3	D-T	18	macho	C.T.	t. exofítico
36	3	D-T	18	hembra	C.D.	.
37	3	D-T	20	hembra	C.T.	p. sesil
37	3	D-T	20	hembra	C.T.	.
38	3	D-T	20	hembra	Ciego	.
38	3	D-T	20	hembra	C.A.	.
38	3	D-T	20	hembra	C.T.	.
39	3	D-T	20	macho	Ciego	p. sesil
39	3	D-T	20	macho	Ciego	p. sesil
39	3	D-T	20	macho	C.A.	.
39	3	D-T	20	macho	C.T.	.
40	3	D-T	20	hembra	Ciego	.
40	3	D-T	20	hembra	C.T.	p. sesil
40	3	D-T	20	hembra	C.T.	.
41	3	D-T	24	macho	C.T.	P. sesil
41	3	D-T	24	macho	C.T.	.
41	3	D-T	24	macho	C.D.	p. sesil

48	3	D-T	22	macho	Ciego	p. sesil
48	3	D-T	22	macho	C.T.	p. pedunculado
48	3	D-T	22	macho	C.D.	p. pedunculado
48	3	D-T	22	macho	C.D.	t. exofítico
48	3	D-T	22	macho	C.D.	t. exofítico
48	3	D-T	22	macho	C.D.	p. sesil
49	3	D-T	22	hembra	Ciego	p. pedunculado
49	3	D-T	22	hembra	C.A.	p. sesil
49	3	D-T	22	hembra	C.T.	p. sesil
49	3	D-T	22	hembra	C.D.	p. sesil
50	3	D-T	24	macho	C.A.	p. pedunculado
50	3	D-T	24	macho	C.T.	.
50	3	D-T	24	macho	C.D.	t. exofítico
51	3	D-T	24	macho	Ciego	p. sesil
51	3	D-T	24	macho	C.A.	p. pedunculado
52	3	D-T	24	hembra	C.T.	p. sesil
53	3	D-T	26	macho	Ciego	.
53	3	D-T	26	macho	C.A.	.
54	3	D-T	24	macho	Ciego	p. sesil
55	3	D-T	26	hembra	Ciego	p. pedunculado
55	3	D-T	26	hembra	C.T.	t. exofítico
56	3	D-T	26	hembra	C.D.	t. exofítico
57	3	D-T	28	macho	Ciego	p. pedunculado

**Tabla 9-4**

número	grupo	tto	semana	sexo	local	macro
57	3	D-T	28	macho	C.D.	t. exofítico
57	3	D-T	28	macho	C.D.	t. exofítico
58	3	D-T	28	hembra	C.T.	t. exofítico
59	3	D-T	28	hembra	C.T.	p. sesil
60	3	D-T	30	macho	C.A.	p. pedunculado
60	3	D-T	30	macho	C.D.	t. ulcerado
60	3	D-T	30	macho	C.D.	p. sesil
62	3	D-T	30	hembra	C.A.	p. pedunculado
62	3	D-T	30	hembra	C.A.	t. ulcerado
62	3	D-T	30	hembra	C.D.	p. sesil

62	3	D-T	30	hembra	C.D.	p. sesil
63	3	D-T	32	macho	Ciego	.
63	3	D-T	32	macho	C.T.	t. exofítico
64	3	D-T	32	hembra	C.A.	p. sesil
64	3	D-T	32	hembra	C.D.	p. sesil
65	5	EDTA	36	macho	C.T.	.
66	5	EDTA	36	macho	C.T.	.
66	5	EDTA	36	macho	C.D.	.
67	5	EDTA	37	macho	C.D.	.
75	5	EDTA	44	hembra	Ciego	.
75	5	EDTA	44	hembra	C.T.	.
75	5	EDTA	44	hembra	C.D.	.
76	5	EDTA	44	hembra	Ciego	.
76	5	EDTA	44	hembra	C.A.	.
76	5	EDTA	44	hembra	C.T.	.
76	5	EDTA	44	hembra	C.D.	.
77	5	EDTA	45	hembra	C.T.	.
77	5	EDTA	45	hembra	C.D.	.
78	5	EDTA	45	hembra	C.A.	.
78	5	EDTA	45	hembra	C.T.	.
79	5	EDTA	45	hembra	C.T.	.
79	5	EDTA	45	hembra	C.D.	.

**Tabla 9-5**

número	histo	dif	Dukes	tamaño	placa
2	.	.	.	.	.
2	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.
4	.	.	.	.	.
4	.	.	.	.	.
4	.	.	.	.	.
5	.	.	.	.	.
5	.	.	.	.	.

5	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	.
8	.	.	.	.	.
8	.	.	.	.	.
8	.	.	.	.	.
1	.	.	.	.	.
2	C. mucinoso	.	Dukes A	grande	no
2	D. moderada	.	.	pequeño	no
2	.	.	.	.	.
2	.	.	.	.	.
5	C. mucinoso	.	Dukes A	grande	no
6	C. mucinoso	.	Dukes B	pequeño	no
6	Adenocarcinoma	moderado	Dukes B	pequeño	no
6	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.
6	C. mucinoso	.	Dukes C	pequeño	no
7	.	.	.	.	.
7	Adenocarcinoma	moderado	Dukes A	pequeño	no
7	.	.	.	.	.
7	D. moderada	.	.	pequeño	si
8	Adenocarcinoma	moderado	Dukes A	pequeño	no
8	.	.	.	.	.
8	C. mucinoso	.	Dukes B	pequeño	no
9	.	.	.	.	.
9	Adenocarcinoma	moderado	Dukes B	pequeño	no
9	.	.	.	.	.
9	Adenocarcinoma	moderado	Dukes C	pequeño	no
9	Adenocarcinoma	moderado	Dukes A	pequeño	no
10	.	.	.	.	.
10	.	.	.	.	.
10	Adenocarcinoma	moderado	Dukes C	grande	no
10	.	.	.	.	.
10	.	.	.	.	.

10	Adenocarcinoma	moderado	Dukes A	pequeño	no
10	D. moderada	.	.	pequeño	si
11	Adenocarcinoma	poco	Dukes C	pequeño	no
11	Adenocarcinoma	moderado	Dulces B	pequeño	no
11	.	.	.	.	.

**Tabla 9-6**

número	histo	dif	Dukes	tamaño	placa
11	.	.	.	.	.
11	C. in situ	.	.	pequeño	no
11	D. moderada	.	.	pequeño	si
12	C. mucinoso	.	Dulces C	pequeño	no
12	C. mucinoso	.	Dukes B	pequeño	no
12	C. mucinoso	.	Dukes C	grande	no
12	C. mucinoso	.	Dukes B	pequeño	no
12	D. moderada	.	.	pequeño	no
13	.	.	.	.	.
13	Adenocarcinoma	moderado	Dukes A	pequeño	no
13	D. moderada	.	.	pequeño	no
13	.	.	.	.	.
13	Adenocarcinoma	moderado	Dukes A	pequeño	no
13	Adenocarcinoma	moderado	Dukes A	pequeño	no
14	.	.	.	.	.
14	D. leve	.	.	pequeño	no
14	C. mucinoso	.	Dukes A	grande	no
14	C. mucinoso	.	Dukes C	pequeño	no
14	C. in situ	.	.	pequeño	no
14	C. mucinoso	.	Dukes A	grande	no
14	.	.	.	.	.
14	D. severa	.	.	pequeño	no
15	.	.	.	.	.
15	.	.	.	.	.
15	.	.	.	.	.
15	C. mucinoso	.	Dukes C	grande	no
15	D. severa	.	.	pequeño	no
15	.	.	.	.	.



16	C. mucinoso	.	Dukes C	grande	no
16	Adenocarcinoma	poco	Dukes B	pequeño	no
17	.	.	.	.	.
17	C. in situ	.	.	pequeño	no
17	.	.	.	.	.
17	Adenocarcinoma	moderado	Dukes A	grande	no
17	D. moderada	.	.	grande	si
18	Adenocarcinoma	moderado	Dukes A	pequeño	si
19	C. mucinoso	.	Dukes C	grande	no
18	.	.	.	.	.
18	C. mucinoso	.	Dukes C	grande	no
18	.	.	.	.	.
19	C. mucinoso	.	Dukes B	pequeño	no
19	.	.	.	.	.
21	Adenocarcinoma	moderado	Dukes A	pequeño	no
21	.	.	.	.	.
21	D. moderada	.	.	pequeño	no
22	C. mucinoso	.	Dukes C	grande	no
22	Adenocarcinoma	moderado	Dukes B	pequeño	si
22	.	.	.	.	.
22	Adenocarcinoma	moderado	Dukes B	pequeño	no
24	Adenocarcinoma	moderado	Dukes B	grande	no
24	.	.	.	.	.
24	Adenocarcinoma	moderado	Dukes A	grande	no
26	.	.	.	.	.

**Tabla 9-7**

número	histo	dif	Dukes	tamaño	placa
26	.	.	.	.	.
26	.	.	.	.	.
27	C. mucinoso	.	Dukes C	grande	no
27	Adenocarcinoma	poco	Dukes B	grande	no
28	.	.	.	.	.
29	.	.	.	.	.
29	D. severa	.	.	pequeño	no
30	C. mucinoso	.	Dukes C	grande	no

30	.	.	.	.	.
30	Adenocarcinoma	poco	Dukes C	grande	no
32	.	.	.	.	.
32	.	.	.	.	.
32	Adenocarcinoma	poco	Dukes C	grande	no
32	.	.	.	.	.
32	.	.	.	.	.
33	.	.	.	.	.
33	Adenocarcinoma	poco	Dukes C	pequeño	no
33	.	.	.	.	.
34	C. mucinoso	.	Dukes C	pequeño	no
36	Adenocarcinoma	moderado	Dukes A	pequeño	no
36	Adenocarcinoma	poco	Dukes B	pequeño	no
36	.	.	.	.	.
37	Adenocarcinoma	moderado	Dukes B	pequeño	no
38	C. in situ	.	.	pequeño	no
39	Adenocarcinoma	moderado	Dukes A	pequeño	no
40	C. in situ	.	.	pequeño	no
40	Adenoma	.	.	grande	no
41	D. severa	.	.	pequeño	no
41	Adenocarcinoma	moderado	Dukes A	pequeño	no
43	Adenocarcinoma	moderado	Dukes C	grande	no
46	Adenocarcinoma	poco	Dukes A	pequeño	no
50	C. mucinoso	.	Dukes A	grande	no
52	Adenocarcinoma	poco	Dukes A	pequeño	no
53	Adenocarcinoma	moderado	Dukes A	pequeño	no
56	C. mucinoso	.	Dukes C	grande	no
56	C. mucinoso	.	Dukes B	pequeño	no
56	C. mucinoso	.	Dukes B	pequeño	no
57	C. mucinoso	.	Dukes A	pequeño	si
58	D. moderada	.	.	pequeño	si
58	D. moderada	.	.	pequeño	si
60	D. moderada	.	.	pequeño	si
61	C. mucinoso	.	Dukes C	grande	no
62	C. mucinoso	.	Dukes C	grande	no
63	D. moderada	.	.	pequeño	si

3	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.
11	.	.	.	.	.
11	D. leve	.	.	.	no

**Tabla 9-8**

número	histo	dif	Dukes	tamaño	placa
11	.	.	.	.	.
11	.	.	.	.	.
12	D. leve	.	.	.	no
12	D. leve	.	.	.	si
13	D. leve	.	.	.	si
15	.	.	.	.	.
15	.	.	.	.	.
22	D. moderada	.	.	.	si
22	D. moderada	.	.	.	si
27	C. mucinoso	.	Dukes A	pequeño	no
29	D. moderada	.	.	.	si
31	D. moderada	.	.	.	si
33	C. mucinoso	.	Dukes A	pequeño	no
34	C. mucinoso	.	Dukes B	grande	no
36	D. moderada	.	.	.	si
37	Adenocarcinoma	moderado	Dukes A	pequeño	no
37	D. leve	.	.	.	no
38	D. moderada	.	.	.	no
38	D. leve	.	.	.	no
38	D. moderada	.	.	.	no
39	D. moderada	.	.	pequeño	si
39	D. moderada	.	.	pequeño	si
39	D. moderada	.	.	pequeño	si

39	D. moderada	.	.	.	no
40	D. moderada	.	.	.	no
40	D. moderada	.	.	pequeño	si
40	D. moderada	.	.	.	no
41	C. in situ	.	.	pequeño	no
41	D. moderada	.	.	pequeño	si
41	D. leve	.	.	pequeño	no
48	D. leve	.	.	.	no
48	D. severa	.	.	.	no
48	Adenocarcinoma	moderado	Dukes A	grande	no
48	Adenocarcinoma	moderado	Dukes B	pequeño	no
48	Adenocarcinoma	moderado	Dukes B	grande	no
48	Adenocarcinoma	moderado	Dukes B	pequeño	no
49	D. moderada	.	.	pequeño	si
49	D. severa	.	.	pequeño	si
49	C. mucinoso	.	Dukes C	pequeño	no
49	D. moderada	.	.	pequeño	si
50	C. in situ	.	.	grande	si
50	D. severa	.	.	pequeño	no
50	Adenocarcinoma	moderado	Dukes B	grande	si
51	D. severa	.	.	grande	si
51	C. in situ	.	.	pequeño	no
52	D. moderada	.	.	pequeño	si
53	D. moderada	.	.	.	no
53	D. moderada	.	.	.	no
54	D. moderada	.	.	pequeño	no
55	D. severa	.	.	pequeño	si
55	C. mucinoso	.	Dukes B	pequeño	si
56	Adenocarcinoma	moderado	Dukes B	grande	no
57	C. mucinoso	.	.	pequeño	no

**Tabla 9-9**

número	histo	dif	Dukes	tamaño	placa
57	Adenocarcinoma	moderado	Dukes B	pequeño	no
57	Adenocarcinoma	moderado	Dukes B	pequeño	no

58	C. mucinoso	.	Dukes B	grande	no
59	Adenocarcinoma	moderado	Dukes A	pequeño	si
60	C. in situ	.	.	pequeño	no
60	Adenocarcinoma	moderado	Dukes C	grande	no
60	D. severa	.	.	pequeño	si
62	C. in situ	.	.	pequeño	no
62	Adenocarcinoma	moderado	Dukes B	pequeño	no
62	C. mucinoso	.	Dukes B	grande	si
62	D. moderada	.	.	.	no
63	D. moderada	.	.	.	no
63	C. mucinoso	.	Dukes C	grande	no
64	D. severa	.	.	pequeño	si
64	D. moderada	.	.	pequeño	si
65	.	.	.	.	.
66	.	.	.	.	.
66	.	.	.	.	.
67	.	.	.	.	.
75	.	.	.	.	.
75	.	.	.	.	.
75	.	.	.	.	.
76	.	.	.	.	.
76	.	.	.	.	.
76	.	.	.	.	.
76	.	.	.	.	.
77	.	.	.	.	.
77	.	.	.	.	.
78	.	.	.	.	.
78	.	.	.	.	.
79	.	.	.	.	.
79	.	.	.	.	.

**Tabla 9-10**

número	otrostit	ID	metas	gmt	gmmt	gmn
2	.	.	.	.	.	.
2	.	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.	.

3	.	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.	.
4	.	.	.	.	.	.
4	.	.	.	.	.	.
4	.	.	.	.	.	.
5	.	.	.	.	.	.
5	.	.	.	.	.	.
5	.	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	.	.
8	.	.	.	.	.	.
8	.	.	.	.	.	.
8	.	.	.	.	.	.
1	.	.	.	.	.	.
2	si	no	no	.	.	.
2	si	no	no	.	.	.
2	si	no	no	.	.	.
2	si	no	no	.	.	.
5	si	no	no	áreas	si	.
6	si	si	si	áreas	.	.
6	si	si	si	áreas	si	si
6	si	si	si	.	.	.
6	si	si	si	.	.	.
6	si	si	si	todo	si	.
7	no	no	no	.	.	.
7	no	no	no	áreas	no	.
7	no	no	no	.	.	.
7	no	no	no	no	no	Si
8	si	si	no	.	.	.
8	si	si	no	.	.	.
8	si	si	no	áreas	si	si
9	si	si	si	.	.	.
9	si	si	si	.	.	.

9	si	si	si	.	.	.
9	si	si	si	.	.	.
9	si	si	si	.	.	.
10	si	si	si	.	.	.
10	.	.	.	.	.	.
10	si	si	si	todo	.	.
10	si	si	si	.	.	.
10	si	si	si	.	.	.
10	si	si	si	todo	si	si
10	si	si	si	.	.	.
11	si	si	no	.	.	no
11	si	si	no	.	.	.
11	si	si	no	.	.	.

**Tabla 9-11**

número	otrostit	ID	metas	Gmt	gmmt	gmn
11	si	si	no	.	.	.
11	si	si	no	.	.	.
11	si	si	no	.	.	.
12	si	si	si	.	.	.
12	si	si	si	.	.	.
12	si	si	si	no	no	si
12	si	si	si	.	.	.
12	si	si	si	.	.	.
13	si	si	si	.	.	.
13	si	si	si	.	.	.
13	si	si	si	.	.	.
13	si	si	si	.	.	no
13	si	si	si	.	.	.
14	si	si	no	.	.	.
14	si	si	no	.	.	.
14	si	si	no	.	.	.
14	si	si	no	.	.	.
14	si	si	no	todo	si	no
14	si	si	no	.	.	.

14	si	si	no	.	.	.
14	si	si	no	.	.	.
15	no	no	si	.	.	.
15	no	no	si	.	.	.
15	no	no	si	.	.	.
15	no	no	si	todo	si	.
15	no	no	si	.	.	.
15	no	no	si	.	.	.
16	si	no	si	no	no	.
16	si	no	si	no	no	si
17	si	no	si	.	.	.
17	si	si	no	todo	si	si
17	si	si	no	.	.	.
17	si	si	no	todo	si	no
17	si	si	no	.	.	.
18	no	no	no	.	.	.
19	si	no	si	.	.	.
18	si	no	si	.	.	.
18	si	no	si	.	.	.
18	si	no	si	.	.	.
19	si	no	si	.	.	.
19	si	si	no	.	.	.
21	si	si	no	.	.	.
21	si	si	no	.	.	.
21	si	si	no	.	.	.
22	si	si	si	áreas	si	.
22	si	si	si	no	no	no
22	si	si	si	.	.	.
22	si	si	si	áreas	.	.
24	si	no	no	todo	si	.
24	si	no	no	.	.	.
24	si	no	no	áreas	si	si
26	si	.	no	.	.	.

**Tabla 9-12**

número	otrostit	ID	metas	gmt	gmmt	gmn
--------	----------	----	-------	-----	------	-----



26	si	.	no	.	.	.
26	si	.	no	.	.	.
27	no	no	si	áreas	.	.
27	no	no	si	áreas	.	.
28	.	.	.	.	.	.
29	no	no	no	.	.	.
29	no	no	no	.	.	.
30	si	no	si	todo	no	no
30	si	no	si	.	.	.
30	si	no	si	.	.	.
32	no	no	si	.	.	.
32	no	no	si	.	.	.
32	no	no	si	.	.	.
32	no	no	si	.	.	.
32	no	no	no	.	.	.
33	no	si	si	.	.	.
33	no	si	si	.	.	.
33	no	si	si	.	.	.
34	no	si	no	.	.	.
36	si	no	no	no	si	.
36	si	no	no	áreas	si	.
36	si	no	no	.	.	.
37	no	no	no	todo	si	si
38	no	no	no	.	.	.
39	no	si	no	todo	si	si
40	si	no	no	todo	si	si
40	si	no	no	no	si	si
41	si	no	si	.	.	.
41	si	no	si	.	.	.
43	no	no	si	.	.	.
46	no	no	no	.	.	.
50	no	si	no	todo	.	.
52	no	no	no	todo	si	si
53	no	no	no	todo	si	si
56	si	no	si	.	.	.
56	si	no	si	.	.	.

56	si	no	si	.	.	.
57	no	no	no	no	si	si
58	si	no	no	áreas	si	si
58	si	no	no	todo	si	si
60	no	no	no	todo	si	si
61	no	si	si	.	.	.
62	no	no	si	áreas	si	si
63	no	no	no	áreas	si	si
3	.	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.	.
11	no	no	no	.	.	.
11	no	no	no	.	.	.

**Tabla 9-13**

número	otrostit	ID	metas	gmt	gmmt	gmn
11	no	no	no	.	.	.
11	.	.	.	.	.	.
12	si	no	no	.	.	.
12	si	no	no	.	.	.
13	no	no	no	.	.	.
15	no	no	no	.	.	.
15	no	no	no	.	.	.
22	si	no	no	.	.	.
22	si	no	no	.	.	.
27	no	no	no	.	.	.
29	no	no	no	.	.	.
31	no	no	no	.	.	.
33	no	no	no	todo	si	si
34	no	no	no	áreas	si	.
36	no	no	no	.	.	.
37	si	no	no	.	.	.

37	si	no	no	.	.	.
38	si	no	no	.	.	.
38	si	no	no	.	.	.
38	si	no	no	.	.	.
39	si	no	no	.	.	.
39	si	no	no	áreas	si	si
39	si	no	no	.	.	.
39	si	no	no	.	.	.
40	si	no	no	.	.	.
40	si	no	no	todo	si	si
40	si	no	no	.	.	.
41	si	si	no	todo	si	si
41	si	si	no	.	.	.
41	si	si	no	.	.	.
48	si	no	no	.	.	.
48	si	no	no	.	.	.
48	si	si	no	.	.	si
48	si	si	no	áreas	si	.
48	si	si	no	.	.	.
48	si	si	no	todo	si	.
49	si	si	si	.	.	.
49	si	si	si	.	.	si
49	si	si	si	áreas	si	si
49	si	si	si	.	.	.
50	si	si	si	.	.	.
50	si	si	si	.	.	.
50	si	si	si	todo	si	si
51	si	si	si	áreas	si	si
51	si	si	si	todo	si	si
52	no	no	si	.	.	.
53	si	no	no	.	.	.
53	si	no	no	.	.	.
54	no	no	no	.	.	.
55	si	no	no	.	.	.
55	no	no	no	todo	si	si
56	no	no	no	áreas	si	si

57	si	si	no	todo	no	no
----	----	----	----	------	----	----

**Tabla 9-14**

número	otrostit	ID	metas	gmt	gmmt	gmn
57	si	si	no	no	si	.
57	si	si	no	.	.	.
58	si	no	no	todo	si	si
59	no	no	no	.	.	.
60	si	no	no	no	si	si
60	si	no	no	áreas	.	.
60	si	no	no	.	.	si
62	si	no	no	.	.	si
62	si	no	no	.	.	.
62	si	no	no	todo	si	si
62	si	no	no	.	.	.
63	si	no	si	.	.	.
63	si	no	si	todo	si	si
64	si	no	no	.	.	.
64	si	no	no	todo	no	no
65	.	.	.	.	.	.
66	.	.	.	.	.	.
66	.	.	.	.	.	.
67	.	.	.	.	.	.
75	.	.	.	.	.	.
75	.	.	.	.	.	.
75	.	.	.	.	.	.
76	.	.	.	.	.	.
76	.	.	.	.	.	.
76	.	.	.	.	.	.
76	.	.	.	.	.	.
77	.	.	.	.	.	.
77	.	.	.	.	.	.
78	.	.	.	.	.	.
78	.	.	.	.	.	.
79	.	.	.	.	.	.
79	.	.	.	.	.	.

**Tabla 9-15**

número	bst	bsmt	bsn	pt	pmt	pmn	ut	umt	un	meg	meb
2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6	áreas	si	.	todo	.	.	áreas	no	no	.	.
6	áreas	no	si	áreas	no	no	todo	no	no	.	.
6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6	todo	si	.	.	.	.	todo	no	no	.	.
7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8	áreas	no	no	.	.	no	todo	no	no	.	.	.
9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
9	.	.	si	no	no	no	no	no	no	.	.	.
9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
10	áreas	.	.	áreas	si	.	todo	no	no	.	.	.
10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
10	áreas	si	si	todo	si	si	no	no	no	.	.	.
10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11	.	.	si	.	.	.	no	no	si	.	.	.
11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

**Tabla 9-16**

número	bst	bsmt	bsn	pt	pmt	pmn	ut	umt	un	meg	meb
11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12	no	no	si	.	.	.	áreas	no	si	.	.
12	todo	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
13	áreas	si	.	.	.	.	.	.	.	.	.
13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
13	.	.	no	.	.	.	.	.	no	.	.
13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
14	todo	si	.	.	.	.	todo	si	si	.	.	.
14	todo	si	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
14	todo	si	si	todo	si	si	todo	si	no	.	.	.
14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15	todo	si	.	todo	si	si	todo	si	.	.	.	.
15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16	no	no	no	.	.	.	áreas	no	si	.	.	.
17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17	todo	si	si	todo	si	no	.	.	no	.	.	.
17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17	todo	no	.	todo	si	no	áreas	no	si	.	.	.
17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18	.	.	si	.	.	.	.	.	si	.	.	.
19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18	no	si	si	.	.	.	todo	si	.	.	.	.
18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
21	.	.	.	todo	.	.	.	.	.	.	.	.
22	áreas	si	.	.	.	.	todo	no	no	.	.	.
22	todo	si	si	áreas	no	no	áreas	no	.	.	.	.
22	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
22	áreas	.	.	.	.	.	áreas	.	.	.	.	.
24	todo	si	.	todo	no	.	todo	no	no	.	.	.
24	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

24	áreas	no	.	áreas	no	no	.	.	.	.	.
26	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

**Tabla 9-17**

número	bst	bsmt	bsn	pt	pmt	pnn	ut	umt	un	meg	meb
26	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
27	áreas	.	.	todo	.	.	todo	.	.	.	.
27	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
28	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
29	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
29	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
30	áreas	si	si	.	.	.	áreas	no	no	.	.
30	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
30	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
32	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
32	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
32	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
32	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
32	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
33	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
33	.	.	.	.	.	.	todo	.	.	.	.
33	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
34	.	.	.	.	.	.	áreas	no	no	.	.
36	áreas	si	.	.	.	.	áreas	si	si	.	.
36	.	.	.	.	.	.	todo	si	.	.	.
36	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
37	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
38	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
39	todo	si	si	todo	no	no	no	si	si	.	.
40	no	si	si	.	.	.	no	no	si	.	.
40	no	si	si	todo	si	no	no	no	si	.	.
41	no	si	si	no	no	no	no	no	.	.	.
41	.	.	.	todo	no	no	todo	si	.	.	.
43	.	.	.	.	.	.	no	.	.	.	.
46	áreas	.	.	todo	.	.	todo	.	.	.	.



50	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
52	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
53	áreas	no	.	áreas	no	no	todo	si	no	.	.
56	.	.	.	.	.	.	áreas	no	si	.	.
56	no	no	si	.	.	.	áreas	si	si	.	.
56	áreas	.	.	.	.	.	áreas	no	si	.	.
57	áreas	si	si	todo	no	si	todo	no	no	.	.
58	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
58	no	si	si	.	.	.	.	.	.	.	.
60	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
61	todo	si	.	todo	si	si	todo	.	.	.	.
62	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
63	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

**Tabla 9-18**

número	bst	bsmt	bsn	pt	pmt	pmn	ut	umt	un	meg	meb
11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
22	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
22	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
27	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
29	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

31	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
33	áreas	si	si	no	no	no	áreas	si	si	.	.	.
34	áreas	si	.	no	si	.	todo	si	si	.	.	.
36	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
37	áreas	si	si	áreas	no	si	todo	si	si	todo	.	.
37	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
38	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
38	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
38	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
39	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
39	no	si	si	.	.	.	.	.	.	.	.	.
39	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
39	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
40	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
40	.	.	.	.	.	.	áreas	si	si	.	.	.
40	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
41	.	.	.	.	.	.	no	no	si	todo	.	.
41	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
41	.	.	.	.	.	.	no	si	si	.	.	.
48	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
48	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
48	no	si	si	no	no	no	todo	si	no	.	.	.
48	áreas	si	.	no	no	no	todo	si	.	.	.	.
48	áreas	.	.	áreas	no	.	áreas	no	.	todo	no	.
48	áreas	si	.	áreas	si	.	áreas	si	no	.	.	.
49	.	.	.	.	.	.	.	.	.	todo	.	.
49	.	.	.	no	no	no	no	si	si	.	.	.
49	.	.	si	.	.	si	.	.	no	.	no	.
49	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
50	.	.	.	.	.	.	.	.	.	no	.	.
50	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
50	todo	si	si	no	no	no	áreas	no	no	.	.	.
51	no	si	si	no	si	no	áreas	si	si	.	.	.
51	todo	si	si	no	si	si	todo	si	si	.	.	.
52	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
53	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

53	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
54	.	.	.	.	.	.	todo	no	si	.	áreas
55	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
55	.	.	.	.	.	si	todo	no	si	.	.
56	áreas	si	si	áreas	si	si	.	.	.	.	no
57	todo	si	si	todo	si	si	todo	si	si	.	áreas

**Tabla 9-19**

número	bst	bsmt	bsn	pt	pmt	pmn	ut	umt	un	meg	meb
57	no	si	si	todo	si	si	.	.	.	todo	.
57	áreas	no	.	áreas	si	.	.	.	.	.	.
58	áreas	si	si	áreas	si	si	todo	si	si	áreas	.
59	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
60	.	.	si	todo	.	.	.	.	si	.	no
60	áreas	.	.	.	.	si	áreas	.	.	no	.
60	.	.	si	.	.	si	.	.	si	.	no
62	.	.	si	no	si	si	.	.	si	.	.
62	.	.	si	áreas	si	si	todo	si	si	.	.
62	todo	si	si	áreas	si	no	áreas	no	no	.	.
62	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
63	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
63	.	.	.	todo	si	.	áreas	si	si	areas	.
64	.	.	.	.	.	si	.	.	si	.	.
64	áreas	si	si	.	.	si	.	.	si	.	.
65	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
66	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
66	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
67	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
75	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
75	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
75	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
76	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
76	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
76	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
76	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
77	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

77	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
78	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
78	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
79	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
79	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

**Tabla 9-20**

número	mep	meu	pas	g1	g2
2	.	.	.	88.40	5.80
2	.	.	.	92.00	4.70
3	.	.	.	89.50	3.40
3	.	.	.	84.20	6.00
3	.	.	.	88.80	5.70
3	.	.	.	83.10	8.30
4	.	.	.	83.90	5.20
4	.	.	.	92.80	1.70
4	.	.	.	87.70	4.30
5	.	.	.	86.50	5.60
5	.	.	.	92.40	4.10
5	.	.	.	89.50	3.00
6	.	.	.	95.30	3.00
7	.	.	.	85.10	7.90
7	.	.	.	93.80	3.50
7	.	.	.	85.60	6.10
8	.	.	.	89.60	4.70
8	.	.	.	87.80	7.30
8	.	.	.	90.20	5.40
1	.	.	.	79.40	11.20
2	.	.	.	90.00	4.10
2	.	.	.	.	.
2	.	.	.	.	.
2	.	.	.	88.10	6.20
5	.	.	.	87.40	4.80
6	.	.	.	82.20	8.00
6	.	.	.	93.10	3.40
6	.	.	.	87.40	6.20

6	.	.	.	88.70	6.70
6	.	.	.	83.10	8.50
7	.	.	.	85.30	6.20
7	.	.	.	.	.
7	.	.	.	82.90	4.20
7	.	.	.	.	.
8	.	.	.	89.80	3.80
8	.	.	.	86.30	5.00
8	.	.	.	82.20	8.60
9	.	.	.	86.00	8.10
9	.	.	.	.	.
9	.	.	.	88.00	5.50
9	.	.	.	82.00	7.50
9	.	.	P/A	83.00	9.40
10	.	.	.	83.80	5.40
10	.	.	.	81.60	8.10
10	.	.	.	87.00	4.50
10	.	.	.	85.00	8.60
10	.	.	.	85.30	5.00
10	.	.	.	87.10	4.00
10	.	.	.	.	.
11	.	.	.	90.50	3.00
11	.	.	.	.	.
11	.	.	.	85.20	5.50

**Tabla 9-21**

número	mep	meu	pas	g1	g2
11	.	.	.	81.60	8.10
11	.	.	.	.	.
11	.	.	.	.	.
12	.	.	.	.	.
12	.	.	.	92.60	2.70
12	.	.	.	85.70	6.10
12	.	.	.	.	.
12	.	.	.	.	.
13	.	.	.	85.10	6.40

13	.	.	.	89.50	3.50
13	.	.	.	.	.
13	.	.	.	91.80	3.90
13	.	.	.	90.30	5.10
13	.	.	.	.	.
14	.	.	.	84.20	7.20
14	.	.	.	.	.
14	.	.	AB	.	.
14	.	.	AB	87.80	3.70
14	.	.	.	.	.
14	.	.	.	89.60	2.70
14	.	.	.	84.30	7.10
14	.	.	.	.	.
15	.	.	.	85.90	5.80
15	.	.	.	79.90	9.10
15	.	.	.	88.20	7.50
15	.	.	AB	83.80	10.00
15	.	.	.	.	.
15	.	.	.	82.90	7.70
16	.	.	A-P	87.50	6.10
16	.	.	no	.	.
17	.	.	.	90.50	5.00
17	.	.	.	.	.
17	.	.	.	89.40	4.50
17	.	.	no	.	.
17	.	.	.	.	.
18	.	.	.	89.00	2.10
19	.	.	.	88.50	3.40
18	.	.	.	93.10	8.70
18	.	.	.	90.10	2.60
18	.	.	.	88.10	3.40
19	.	.	P/A	.	.
19	.	.	.	85.20	5.10
21	.	.	.	92.50	2.50
21	.	.	.	83.70	9.10
21	.	.	.	.	.

22	.	.	.	.	.
22	.	.	AB	.	.
22	.	.	.	89.50	4.10
22	.	.	.	.	.
24	.	.	.	86.20	5.80
24	.	.	.	92.30	2.60
24	.	.	no	.	.
26	.	.	.	88.10	5.70

**Tabla 9-22**

número	mep	meu	pas	g1	g2
26	.	.	.	92.00	4.60
26	.	.	.	83.20	8.70
27	.	.	P/A	82.50	5.80
27	.	.	P/A	85.50	3.20
28	.	.	.	91.80	3.50
29	.	.	.	88.40	7.40
29	.	.	.	.	.
30	.	.	no	.	.
30	.	.	.	89.40	3.20
30	.	.	.	.	.
32	.	.	.	84.20	5.50
32	.	.	.	87.50	3.30
32	.	.	.	90.20	4.90
32	.	.	.	85.10	4.70
32	.	.	.	90.80	3.00
33	.	.	.	85.60	3.40
33	.	.	.	.	.
33	.	.	.	90.00	4.90
34	.	.	AB	.	.
36	.	.	.	90.90	1.20
36	.	.	.	88.80	4.40
36	.	.	.	90.20	5.80
37	.	.	.	.	.
38	.	.	.	.	.
39	.	.	no	.	.

40	.	.	PAS	.	.
40	.	.	.	.	.
41	.	.	no	.	.
41	.	.	no	.	.
43	.	.	.	.	.
46	.	.	.	.	.
50	.	.	A-P	.	.
52	.	.	.	.	.
53	.	.	A-P	.	.
56	.	.	A-P	.	.
56	.	.	P/A	.	.
56	.	.	.	.	.
57	.	.	.	.	.
58	.	.	.	.	.
58	.	.	.	.	.
60	.	.	.	.	.
61	.	.	P/A	.	.
62	.	.	no	.	.
63	.	.	P/A	.	.
3	.	.	.	91.20	3.20
3	.	.	.	89.30	4.00
3	.	.	.	93.60	1.70
6	.	.	.	89.00	4.70
6	.	.	.	91.00	4.00
6	.	.	.	89.20	4.70
6	.	.	.	91.20	3.70
11	.	.	.	89.60	4.20
11	.	.	.	.	.

**Tabla 9-23**

número	mep	meu	pas	g1	g2
11	.	.	.	91.80	3.70
11	.	.	.	87.50	4.80
12	.	.	.	.	.
12	.	.	.	.	.
13	.	.	.	.	.



15	.	.	.	87.70	4.30
15	.	.	.	88.50	4.50
22	.	.	.	.	.
22	.	.	.	.	.
27	.	.	.	.	.
29	.	.	.	.	.
31	.	.	.	.	.
33	.	.	no	.	.
34	.	.	P/A	.	.
36	.	.	.	.	.
37	.	.	no	.	.
37	.	.	.	.	.
38	.	.	.	.	.
38	.	.	.	.	.
38	.	.	.	.	.
39	.	.	.	.	.
39	.	todo	.	.	.
39	.	áreas	.	.	.
39	.	.	.	.	.
40	.	.	.	.	.
40	.	.	P/A	.	.
40	.	.	.	.	.
41	.	.	AB	.	.
41	.	.	.	.	.
41	.	.	.	.	.
48	.	.	.	.	.
48	.	.	.	.	.
48	todo	.	no	.	.
48	.	no	no	87.90	3.30
48	.	.	A-P	.	.
48	.	.	no	.	.
49	.	.	no	.	.
49	.	.	no	.	.
49	.	.	.	.	.
49	.	.	.	.	.
50	.	.	.	.	.

50	.	.	.	.	.
50	áreas	.	P/A	.	.
51	.	no	.	.	.
51	.	no	.	.	.
52	.	.	.	.	.
53	.	.	.	.	.
53	.	.	.	.	.
54	.	.	.	.	.
55	.	.	.	.	.
55	todo	.	.	.	.
56	todo	.	.	.	.
57	.	.	.	.	.

**Tabla 9-24**

número	mep	meu	pas	g1	g2
57	todo	.	.	.	.
57	.	áreas	.	.	.
58	.	.	AB	.	.
59	.	.	.	.	.
60	.	.	.	.	.
60	.	áreas	P/A	.	.
60	.	.	no	.	.
62	.	.	.	.	.
62	.	no	no	.	.
62	.	.	AB	.	.
62	.	.	.	.	.
63	.	.	.	.	.
63	.	áreas	.	.	.
64	todo	.	.	.	.
64	todo	todo	PAS	.	.
65	.	.	.	90.30	3.60
66	.	.	.	90.40	5.20
66	.	.	.	87.40	8.80
67	.	.	.	88.80	7.10
75	.	.	.	91.10	5.30
75	.	.	.	92.30	3.00

75	.	.	.	94.80	2.10
76	.	.	.	86.70	4.50
76	.	.	.	86.80	8.30
76	.	.	.	85.50	3.70
76	.	.	.	93.20	3.40
77	.	.	.	89.30	4.80
77	.	.	.	89.30	3.60
78	.	.	.	88.40	7.20
78	.	.	.	90.20	3.90
79	.	.	.	87.90	3.00
79	.	.	.	91.00	2.80

**Tabla 9-25**

número	s	ip
2	5.80	11.60
2	4.70	8.00
3	3.40	10.50
3	6.00	15.80
3	5.50	11.20
3	8.60	16.90
4	10.90	16.10
4	5.50	7.20
4	8.00	12.30
5	7.90	13.50
5	3.50	7.60
5	7.50	10.50
6	1.70	4.70
7	7.00	14.90
7	2.70	6.20
7	8.30	14.40
8	5.70	10.40
8	4.90	12.20
8	4.40	9.80
1	9.40	20.60
2	5.90	10.00
2	.	.

2	.	.
2	5.70	11.90
5	7.80	12.60
6	9.80	17.80
6	3.50	6.90
6	6.30	12.50
6	4.60	11.30
6	8.40	16.90
7	8.50	14.70
7	.	.
7	12.90	17.10
7	.	.
8	6.40	10.20
8	8.70	13.70
8	9.20	17.80
9	5.90	14.00
9	.	.
9	6.50	12.00
9	10.50	18.00
9	7.60	17.00
10	10.80	16.20
10	10.30	18.40
10	8.50	13.00
10	6.40	15.00
10	9.70	14.70
10	8.90	12.90
10	.	.
11	6.50	9.50
11	.	.
11	9.30	14.80

**Tabla 9-26**

número	s	ip
11	10.30	18.40
11	.	.
11	.	.

12	.	.
12	4.70	7.40
12	8.20	14.30
12	.	.
12	.	.
13	8.50	14.90
13	7.00	10.50
13	.	.
13	4.30	8.20
13	4.60	9.70
13	.	.
14	8.60	15.80
14	.	.
14	.	.
14	8.50	12.20
14	.	.
14	7.70	10.40
14	8.60	15.70
14	.	.
15	8.30	14.10
15	11.00	20.10
15	4.30	11.80
15	6.20	16.20
15	.	.
15	9.40	17.10
16	6.40	12.50
16	.	.
17	4.50	9.50
17	.	.
17	6.10	10.60
17	.	.
17	.	.
18	8.90	11.00
19	8.10	11.50
18	8.70	16.90
18	7.30	9.90

18	8.50	11.90
19	.	.
19	9.70	14.80
21	5.00	7.50
21	7.20	16.30
21	.	.
22	.	.
22	.	.
22	6.40	10.50
22	.	.
24	8.00	13.80
24	5.10	7.70
24	.	.
26	6.20	11.90

**Tabla 9-27**

<b>número</b>	<b>s</b>	<b>ip</b>
26	3.40	8.00
26	8.10	16.80
27	11.70	17.50
27	11.30	14.50
28	4.70	8.20
29	4.20	11.60
29	.	.
30	.	.
30	7.40	10.60
30	.	.
32	10.30	15.80
32	9.20	12.50
32	4.90	9.80
32	10.20	14.90
32	6.20	9.20
33	11.00	14.40
33	.	.
33	5.10	10.00
34	.	.

36	7.90	9.10
36	6.80	11.20
36	4.00	9.80
37	.	.
38	.	.
39	.	.
40	.	.
40	.	.
41	.	.
41	.	.
43	.	.
46	.	.
50	.	.
52	.	.
53	.	.
56	.	.
56	.	.
56	.	.
57	.	.
58	.	.
58	.	.
60	.	.
61	.	.
62	.	.
63	.	.
3	5.60	8.80
3	6.70	10.70
3	4.70	6.40
6	6.30	11.00
6	5.00	9.00
6	6.10	10.80
6	5.10	8.80
11	6.20	10.40
11	.	.

**Tabla 9-28**

número	s	ip
11	4.50	8.20
11	7.70	12.50
12	.	.
12	.	.
13	.	.
15	8.00	12.30
15	7.00	11.50
22	.	.
22	.	.
27	.	.
29	.	.
31	.	.
33	.	.
34	.	.
36	.	.
37	.	.
37	.	.
38	.	.
38	.	.
38	.	.
39	.	.
39	.	.
39	.	.
39	.	.
40	.	.
40	.	.
40	.	.
41	.	.
41	.	.
41	.	.
48	.	.
48	.	.
48	.	.
48	8.80	12.10
48	.	.



48	.	.
49	.	.
49	.	.
49	.	.
49	.	.
50	.	.
50	.	.
50	.	.
51	.	.
51	.	.
52	.	.
53	.	.
53	.	.
54	.	.
55	.	.
55	.	.
56	.	.
57	.	.

**Tabla 9-29**

número	s	ip
57	.	.
57	.	.
58	.	.
59	.	.
60	.	.
60	.	.
60	.	.
62	.	.
62	.	.
62	.	.
62	.	.
63	.	.
63	.	.
64	.	.
64	.	.

65	6.10	9.70
66	4.40	9.60
66	3.80	12.60
67	4.10	11.20
75	3.60	8.90
75	4.70	7.70
75	3.10	5.20
76	8.80	13.30
76	4.90	13.20
76	10.80	14.50
76	3.40	6.80
77	5.90	10.70
77	7.10	10.70
78	4.40	11.60
78	5.90	9.80
79	9.10	12.10
79	6.20	9.00

**Tabla 9-30**