

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICAS**

CARRERA DE BIOQUÍMICA

INSTITUTO SELADIS



**DETERMINACIÓN GENÉTICA MOLECULAR DE LA
PREDISPOSICIÓN A PADECER CÁNCER
COLORRECTAL MEDIANTE LA REACCIÓN EN
CADENA DE LA POLIMERASA EN SUS VARIANTES:
TIEMPO REAL Y CON TRANSCRIPCIÓN REVERSA**

Tesis de grado para la obtención del Grado de Licenciatura

POR: RICHARD QUISPE ARUHUITO

**TUTORAS: XIMENA TABORGA MANRIQUE *M.Sc.*
SUSANA REVOLLO ZEPITA *M.Sc. Ph.D.***

LA PAZ – BOLIVIA

Julio, 2017

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO SELADIS

DETERMINACIÓN GENÉTICA MOLECULAR DE LA
PREDISPOSICIÓN A PADECER CÁNCER
COLORRECTAL MEDIANTE LA REACCIÓN EN
CADENA DE LA POLIMERASA EN SUS VARIANTES:
TIEMPO REAL Y CON TRANSCRIPCIÓN REVERSA

Presentada por: Univ. RICHARD QUISPE ARUHUITO

Para optar el grado académico de Licenciatura en Bioquímica

Nota numeral:.....

Nota literal:.....

Ha sido aprobado con distinción

Director de carrera de Bioquímica: Dr. Bernardo Nicolás Torrico Arzady

TUTORAS: XIMENA TABORGA MANRIQUE *M.Sc.*
SUSANA REVOLLO ZEPITA *M.Sc. Ph.D.*

Tribunal: Dr. Luis Fernando Sosa Tordoya

Tribunal: Dr. Yohel Jiménez Velarde

Tribunal: Dra. Carmiña Heidi García de Salgueiro

***EL FRACASO NO ME SOBRECGERÁ NUNCA SI MI
DETERMINACIÓN PARA ALCANZAR EL ÉXITO ES LO
SUFICIENTEMENTE PODEROSA (OG MANDINO).***

AGRADECIMIENTOS

En principio un agradecimiento a Dios por estar en el corazón de todas las personas que realizan ciencia y del mundo entero.

Un eterno agradecimiento a mi familia que frente a las adversidades, caídas y retos que nos da la vida continúan batallando a mi lado y así iluminando mi trayectoria vital.

A mi tutora la Dra. Susa Revollo por haberme abierto las puertas del laboratorio de Genética Molecular que me dio lugar a conocer varias instituciones y profesionales de distintas áreas de la salud y empresarial.

A mi tutora la Dra. Ximena Taborga por haberme brindado toda su ayuda en el proceso del trabajo, por depositar su confianza en mi persona en la idea de poder cambiar el transcurso de la investigación en salud, por brindarme su apoyo no sólo en el trabajo sino también en la vida cotidiana, por todo el conocimiento que llegué a adquirir durante el trabajo a la par día tras día, por todo ello estaré agradecido toda la vida con la promesa de no defraudar esa confianza depositada MUCHAS GRACIAS.

Al personal del Instituto de Gastroenterología Boliviano Japonés de La Paz por abrirme las puertas de la unidad de endoscopía. Al Dr. Ernesto Loza, al Dr. Carlos Trujillo, al Dr. Rafael Ortuño, al Dr. Oscar Calderón, a la Dra. Amparo Rejas, a la Dra. Moira Ibargüen, a la Dra. Rosmery Carvallo, a la Lic. Maura Vitrón, al Lic. Juvenal Mamani y a todo el personal del área de endoscopía y al Instituto en su totalidad.

A las Dras. Emy Tapia y Analía Mamani y al Dr. Luis Aguilar, del Servicio de Endoscopía del Hospital Luis Uría de la Oliva, y al Dr. Carlos Tito del Policlínico “9 de abril” por brindarme un apoyo para desarrollar la presente investigación.

Al personal de las Curtiembres “Bonanza” y Brangus, por haberme brindado su cooperación para realizar el estudio de genotoxicidad.

Al Dr. Omar Rocabado por todo el asesoramiento de las técnicas moleculares.

A mis tribunales la Dra. Heidy Garcia, Fernando Sosa y Yohel Jiménez por haberme brindado su conocimiento, tiempo y paciencia en la corrección del presente trabajo.

Al Dr. Miguel Estensoro y la Dra. Giovana Dorigo por ser los docentes que me dieron un grito de aliento durante el transcurso de la carrera de Bioquímica.

A mis profesores del área de oncología, a la Dra. Gaby Miranda y a la Lic. Martha Limachi por brindarme su conocimiento sobre el manejo de pacientes con cáncer.

Un agradecimiento especial a mi Maestra la Dra. Lena Morillas Guzmán, reconocida Oncóloga Clínica, quien me abrió las puertas de su centro oncológico para poder ampliar mi visión del verdadero rol Bioquímico en el área de la sanidad.

Finalmente a mis amigos y compañeros del Instituto **SELADIS**, Centro **ONCOVIDA** y Laboratorio **ENDOLAB** por haber completado mi formación tanto en el área de investigación, clínica y de laboratorio un inmenso agradecimiento a todas estas personas que hoy en día forman parte de mi vida cotidiana.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	iv
TABLA DE CONTENIDOS.....	vi
INDICE DE FIGURAS Y FOTOS.....	viii
INDICE DE GRAFICOS.....	ix
INDICE DE CUADROS.....	x
INDICE DE TABLAS.....	x
INDICE DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN.....	xii
SUMMARY.....	xiv
1. INTRODUCCION.....	1
2. ANTECEDENTES.....	5
3. JUSTIFICACION.....	11
4. MARCO TEÓRICO.....	13
4.1 Bases Moleculares del Cáncer.....	13
4.2 El Cáncer Colorrectal.....	23
4.2.1 Anatomía y Fisiología del Intestino Grueso.....	23
4.2.2 Factores de Riesgo que Predisponen al Cáncer Colorrectal.....	26
4.2.3 Factores que Previenen el Cáncer Colorrectal.....	33
4.2.4 Concepto de Cáncer Colorrectal.....	34
4.2.5 Los Estadios en el Cáncer Colorrectal.....	36
4.2.6 Diagnóstico del Cáncer Colorrectal.....	38
4.2.7 La Citoqueratina 20 (CK-20).....	40
4.3 Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (CCHNP), Síndrome de Lynch.....	42
4.3.1 Fundamento de CCHNP.....	44

4.4 Diagnóstico molecular del cáncer colorrectal – La Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	49
4.5 PCR cuantitativa o PCR en tiempo real (qPCR).....	56
4.6 PCR-TR (PCR con Transcripción Reversa).....	58
4.7 Nested PCR (PCR anidado).....	59
5. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	60
5.1 Hipótesis.....	60
5.2 Objetivos.....	61
6. METODOLOGÍA.....	62
6.1 Población de Estudio.....	61
6.2 Aspectos éticos.....	62
6.3 Criterios de Inclusión.....	63
6.4 Criterios de Exclusión.....	63
6.5 Muestras.....	63
6.6 Métodos de laboratorio.....	64
6.6.1 Determinación del marcador CK-20 mediante la PCR con transcripción reversa (PCR-TR) anidada.....	64
6.6.1.1 Determinación de CA 19.9.....	70
6.6.1.2 Endoscopia e Histopatología.....	70
6.6.2 Determinación del marcador Bat 25 mediante la qPCR.....	71
7. RESULTADOS.....	74
7.1 Resultados del marcador CK-20.....	74
7.1.1 Resultados del Marcador CA 19.9.....	79
7.1.2 Resultados del diagnóstico clínico (histopatología y endoscopia).....	79
7.1.3 Resultados de las Encuestas para el análisis de CK-20.....	81
7.1.4 Estadísticas en Relación con los Resultados Obtenidos de CK-20 en Sangre.....	82
7.2 Resultados del marcador de MSI “BAT 25”.....	86

8. DISCUSIÓN.....	91
8.1 Determinación del marcador CK-20 a través de la técnica de PCR-TR.....	91
8.2 Determinación del marcador de Inestabilidad Microsatelital (BAT 25).....	96
9. CONCLUSIONES.....	99
10. RECOMENDACIONES.....	100
ANEXOS.....	101
REFERENCIAS BLIOGRÁFICAS.....	112

ÍNDICE DE FIGURAS Y FOTOS

Figura 1. Incidencia y Mortalidad de Cáncer en hombres.....	5
Figura 2. Incidencia y Mortalidad de cáncer en mujer.....	6
Figura 3. Incidencia y mortalidad del cáncer colorrectal en el mundo.....	7
Figura 4. Las tres fases del ciclo celular.....	13
Figura 5. Fases de la mitosis.....	15
Figura 6. Intestino Grueso y sus partes.....	24
Figura 7. Estructura General de las distintas capas del tracto gastrointestinal.....	25
Figura 8. Alimentos Grasos.....	27
Figura 9. Carnes cocidas a temperaturas elevadas.....	28
Figura 10. Modelo genético del cáncer colorrectal.....	31
Figura 11. Formación de un carcinoma de colon.....	34
Figura 12. Aldred Scott Warthin, Henry T. Lynch.....	42
Figura 13. Pedigrí de la familia G.....	43
Figura 14. Complejos de Enzimas de reparación del ADN.....	46
Figura 15. Resbalamiento durante la replicación del DNA.....	48
Figura 16. La PCR.....	50

Figura 17. Etapa de desnaturalización.....	51
Figura 18. Hibridación de los primers en la cadena de ADN.....	51
Figura 19. Fase de elongación.....	52
Figura 20. Primer termociclador.....	52
Figura 21. Equipo de PCR en tiempo real.....	57
Figura 22. Alineamiento de primers.....	67
Figura 23. Alineamiento de los primers Forward y Reverse utilizados para la amplificación del marcador Bat 25.....	72
Figura 24. Amplificación de ADN utilizando los primers para CK-20.....	74
Figura 25. qPCR de los controles negativos en el análisis del marcador Bat 25.....	86
Figura 26. Amplificación logarítmica del fragmento Bat 25.....	87
Figura 27. Curvas melting del fragmento Bat 25.....	88
Figura 28. Árbol Genealógico de la paciente F058.....	91

FOTOS

Foto 1. Corrida electroforética de CK-20.....	75
Foto 2. Corrida electroforética de la amplificación de CK-20 en biopsias.....	76
Foto 3. Corrida electroforética de la amplificación de CK-20 con muestras y controles.....	77

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Número de casos de cáncer digestivo en el IGBJ.....	8
Gráfico 2. Diagnóstico histopatológico de pacientes con sintomatología colónica del Instituto de Gastroenterología Boliviano Japonés de La Paz.....	74
Gráfico 3. Actividad a la que se dedican los pacientes.....	81
Gráfico 4. Antecedentes patológicos de los pacientes.....	83

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Resultados de CK-20 de acuerdo al género.....	82
Cuadro 2. Resultados de CK-20 de acuerdo a antecedentes patológicos.....	83
Cuadro 3. Resultados de CK-20, según consumo de “alimentos rápidos”.....	84
Cuadro 4. Resultados de CK-20, según ex fumadores (más de 1 año).....	85
Cuadro 5. Resultados de CK-20, según el hábito de consumir bebidas alcohólicas.	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ciclinas, Quinasas e Inhibidores de quinasas dentro del ciclo celular.	17
Tabla 2. Clasificación de los estadios en el que se encuentra el tumor e invasión	37
Tabla 3. Clasificación de Dukes modificada.....	37
Tabla 4. Clasificación de los Filamentos intermedios.....	41
Tabla 5. Criterios de Amsterdam y Bethesda.....	45
Tabla 6. Concentraciones de la mix para transcribir el ARN a ADN.....	66
Tabla 7. Primers utilizados en la amplificación del ADN de citoqueratina 20...	67
Tabla 8. Concentraciones de la master mix utilizada en la PCR.....	68
Tabla 9. Concentraciones utilizadas en la amplificación de ADN para la determinación de inestabilidad microsatelital.....	73
Tabla 10. Resultados del marcador CK-20.....	78
Tabla 11. Resultados de CK-20 en sangre de pacientes y voluntarios.....	79
Tabla 12. Resultados obtenidos de CA19.9 en pacientes con sintomatología compatible de CCR (pacientes de la unidad endoscópica).....	79
Tabla 13. Resultados del marcador CA 19.9 en suero en comparación con los resultados de CK-20 en sangre, resultados clínicos de los pacientes con sintomatología compatible con cáncer colorrectal, edad y sexo.....	80
Tabla 14. Descripción clínica de los 3 pacientes positivos para MSI (Bat 25)...	90

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Certificado de Aval Ético.....	101
Anexo 2: Consentimiento Informado.....	102
Anexo 3: Preparación de solución de Lisis en la extracción de ARN.....	103
Anexo 4: Resultados de las Tm de los 139 voluntarios.....	104
Anexo 5: Resultados de las Tm de los 61 pacientes del centro ONCOVIDA...	105
Anexo 6. Curvas melting del fragmento Bat 25.....	106
Anexo 7. Tm de pacientes controles.....	107
Anexo 8: Resultados de los pacientes para el marcador CK-20.....	108

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad que cobra muchas vidas en el mundo, es originado por un trastorno genómico, adquirido o heredado, que da lugar a una multiplicación anárquica e incontrolada de las células. Actualmente existen diferentes pruebas que permiten diagnosticar y hacer seguimiento de la enfermedad, entre estos destacan las pruebas moleculares, a través de las cuales se puede identificar, por ejemplo, la presencia de citoqueratina 20 (CK-20) en sangre periférica como un marcador útil para diagnóstico y determinación de metástasis; por otro lado, a través del estudio de mutaciones en los genes de reparación, con previo análisis de inestabilidad microsatelital, se puede establecer si una persona tiene predisposición al desarrollo de cáncer de colon hereditario como es el síndrome de Lynch.

Esta investigación se basó en el uso de técnicas genéticas y moleculares que sirvieron para establecer la predisposición genética a la enfermedad, con este fin se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa para determinar CK-20 en sangre y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) con el agente intercalante Sybr Green para determinar inestabilidad microsatelital a través del marcador Bat 25.

El 20% de los pacientes estudiados resultó positivo para CK-20, la mayoría de los cuales fueron diagnosticados con enfermedad inflamatoria del intestino (EII), concluyendo que la CK-20 puede ser utilizada como un marcador coadyuvante en el seguimiento de CCR y como un marcador de EII en pacientes con riesgo de desarrollar CCR.

Mediante la qPCR se identificó una temperatura melting distinta en 3 de los 200 pacientes estudiados, estos pacientes cumplen parcialmente con los criterios de Amsterdam lo que ayuda a establecer el síndrome de Lynch; sin embargo la confirmación del diagnóstico requiere de un análisis de fragmentos y secuenciación.

Por último se estableció que uno de los factores de riesgo que más predispone al desarrollo de la enfermedad es el hábito a consumir tabaco.

Palabras clave: Cáncer Colorrectal, Enfermedad Inflamatoria del Intestino, Síndrome de Lynch, BAT25, CK-20.

SUMMARY

Colorectal cancer (CCR) is a disease that takes many lives in the world, is caused by a genomic disorder, acquired or inherited, that leads to an anarchic and uncontrolled multiplication of cells. There are currently several tests that allow the diagnosis and follow-up of the disease, among them molecular tests, through which the presence of cytokeratin 20 (CK-20) in peripheral blood can be identified as a useful marker For diagnosis and determination of metastasis; On the other hand, through the study of mutations in repair genes, with previous analysis of microsatellite instability, it can be established if a person is predisposed to the development of hereditary colon cancer such as Lynch syndrome.

This research was based on the use of genetic and molecular techniques that served to establish the genetic predisposition to the disease. For this purpose the reverse transcription polymerase chain reaction was used to determine CK-20 in blood and the real-time polymerase chain reaction (qPCR) with the Sybr Green intercalating agent to determine microsatellite instability through the marker Bat 25.

20% of the patients studied were positive for CK-20, most of whom were diagnosed with inflammatory bowel disease (IBD), concluding that CK-20 can be used both as adjuvant marker in the follow-up of CCR and as An IBD marker in patients at risk of developing CCR.

Through the qPCR a different melting temperature was identified in 3 of the 200 patients studied, these patients partially fulfilled the Amsterdam criteria which helps to establish Lynch syndrome; however confirmation of the diagnosis requires fragment analysis and sequencing.

Finally, it was established that one of the risk factors that most predisposes to the development of the disease is the habit to consume tobacco.

Key words: Colorectal Cancer, Inflammatory Bowel Disease, Lynch Syndrome, BAT25, CK-20.

1. INTRODUCCION

El cáncer es una de las enfermedades con la tasa de mortalidad más elevada a nivel mundial. Entre los distintos tipos de esta enfermedad el cáncer colorrectal (CCR) ocupa el tercer lugar ya que en el mundo alrededor de 694.000 personas fallecen por causa de esta enfermedad (OMS, 2015) y de manera anual se diagnostica alrededor de 1 millón de personas con CCR. Se considera que la incidencia del CCR se verá incrementada en los años siguientes debido al creciente número poblacional en el mundo (Herrera M. G. y col., 2013).

Según datos oficiales del Ministerio de Salud de Bolivia, durante la gestión 2015 se diagnosticaron; 2.618 casos de cáncer cervicouterino, 2.006 de cáncer de mama, 1.044 de próstata, 1.110 de vesícula biliar, 1.151 de estómago, 374 de ovario, 352 de pulmón, 343 de linfomas (Ministerio de salud del Estado Plurinacional de Bolivia, 2016). Los últimos datos del Registro Nacional de Cáncer, estima que el número de casos nuevos de CCR a nivel nacional es de 315 (Registro Nacional de Cáncer, 2012).

El cáncer se origina a partir de un trastorno genómico que da lugar a una multiplicación celular anárquica e incontrolada, estas células son consideradas como propias del organismo, pero de crecimiento anormal. El CCR tiene como principio la formación de pólipos adenomatosos y las alteraciones dentro de sus células dan lugar a la formación de un carcinoma (Ocaña P. E. y Gassó C. M., 2011).

Esta enfermedad predomina en personas del sexo masculino y adultos mayores de 45 años y alrededor del 55% de los casos ocurren en países desarrollados (GLOBOCAN, 2012). Entre los factores de riesgo que promueven la evolución de la enfermedad se encuentran: la edad, la dieta rica en grasas y calorías, las carnes rojas cocidas a temperaturas elevadas, el hábito tabáquico, el hábito alcohólico, entre otros. Por otro lado el deporte, el consumir fibra, frutas y verduras disminuye el riesgo de contraer la enfermedad (García D. I., 2009; Navarro S. y col., 2012; Valdés A. y col., 2012; Morgan G. y col., 2008).

El CCR es originado por mutaciones de dos tipos: 1) Esporádicas, efecto de diversos factores ambientales y 2) Hereditarias, por alteraciones genéticas transmitidas genealógicamente, un ejemplo claro es el síndrome de Lynch.

El cáncer colorrectal hereditario no polipósico (CCHNP), también conocido como síndrome de Lynch, está asociado a tumor de colon de localización proximal, este síndrome es considerado una enfermedad genética, transmitida por herencia autosómica dominante. Entre los genes implicados en el CCHNP están el MLH-1 (mutL homólogo 1) y el MSH-2 (mutS homólogo 2), si la estructura genómica de estos genes presenta alteraciones (mutación) una persona tiene la predisposición genética a padecer CCR (Alazzouzi H., 2006). Precediendo a la identificación de mutaciones en los genes de reparación se realiza el análisis de inestabilidad microsatelital (MSI); en los estudios realizados por diferentes autores los marcadores de MSI que mejores resultados han dado son el BAT25 y el BAT 26 (Toledo G. D. y Cruz-Bustillo C. D., 2005).

En muchos institutos de investigación del mundo se realizan investigaciones sobre marcadores moleculares que puedan brindar un mejor monitoreo del cáncer, entre ellos se encuentra la citoqueratina 20 (CK-20), marcador que podría ser utilizado en la determinación de metástasis a distancia.

La CK-20 es un polipéptido que se expresa, comúnmente, en células del epitelio gastrointestinal, urotelio y células de Merckel. La expresión de este marcador en el carcinoma colorrectal es distinta en relación a los carcinomas gástricos; en el CCR existe una expresión constante mientras que en los adenocarcinomas gástricos se expresa en menor cantidad. En un equilibrio homeostático celular CK-20 no se halla presente en sangre periférica, esta es la razón para que este marcador sea considerado útil para el diagnóstico diferencial y metástasis a distancia de CCR (Garrido S. M. y col., 2008).

En la actualidad la técnica para diagnosticar CCR es la rectosigmoidoscopia, la colonoscopia y la histopatología, además de los marcadores séricos más utilizados, el CEA y el CA-19.9, sin embargo, existen técnicas moleculares que pueden brindar un

aporte al seguimiento de la enfermedad tal es el caso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La PCR es una técnica utilizada para amplificar el ácido desoxirribonucleico (ADN) además de que puede ser empleada en la identificación de alteraciones genéticas involucradas en el desarrollo de cáncer. Esta técnica tiene otras utilidades dentro del estudio de esta enfermedad como por ejemplo coadyuvar en el seguimiento de metástasis a distancia.

La elevada tasa de mortalidad del CCR se debe a que la enfermedad generalmente se diagnostica en estadios avanzados, por tal razón el tratamiento se torna más complicado. Para diagnosticar la enfermedad existen técnicas convencionales que pueden ser empleadas tales como la rectosigmoidoscopia y la colonoscopia, a través de las cuales se busca la presencia de una posible neoplasia. Una limitante de estas técnicas es el tamaño del tumor, ya que este debe medir al menos 1 mm para ser observado con el endoscopio. Según la American Society Cancer Oncology (ASCO) los estudios serológicos utilizados en el seguimiento de la enfermedad no son específicos para el cáncer colorrectal ya son utilizados para otros tipos de cáncer, entre ellos, el antígeno siálico de Lewis (CA 19.9) y el antígeno carcinoembrionario (CEA) (Perea G. J., 2009; World Gastroenterology Organization, 2007).

Si bien existen técnicas para el diagnóstico del cáncer y seguimiento de la enfermedad, en la actualidad estas técnicas están siendo reemplazadas por técnicas moleculares como la PCR que son más prácticas que las técnicas convencionales, en el futuro se espera que las técnicas moleculares puedan brindar las herramientas necesarias para aplicar un mejor tratamiento.

Esta investigación justifica el por qué en Bolivia no se han desarrollado estudios moleculares para el diagnóstico temprano del cáncer a pesar de que esta enfermedad va en aumento cotidianamente. Actualmente los estudios sobre la epidemiología del cáncer en Bolivia son escasos, y los pocos estudios realizados están basados en casos clínicos,

sin embargo, ningún estudio está dirigido a la prevención como es la detección del síndrome de Lynch o Enfermedades Inflammatorias del Intestino (EII) que son factores que predisponen a padecer cáncer colorrectal, las cuales pueden ser detectadas de manera molecular.

Por lo expuesto, en la presente investigación se utilizó técnicas genéticas moleculares en el diagnóstico preventivo de cáncer colorrectal para determinar: 1) Si el marcador CK-20 puede ser utilizado en el diagnóstico preventivo de cáncer de colon, 2) si CK-20 es útil para determinar si el estilo de vida influye en la aparición de EII enfermedad considerada como factor predisponente para padecer CCR y 3) si la PCR en tiempo real utilizando el fluoróforo Sybr Green es útil para realizar un screening de pacientes que tienen predisposición a padecer síndrome de Lynch.

2. ANTECEDENTES

Según la Organización Mundial de la Salud el cáncer colorrectal se encuentra en cuarta posición entre los distintos tipos de cáncer de las Américas. Cada año se reportan alrededor de 240.000 nuevos casos y 112.000 muertes y se calcula que en el año 2030 la incidencia de la enfermedad aumentará en un 60% (OMS, 2016).

A nivel mundial el CCR se encuentra en tercer lugar en los hombres (Fig. 1) y en segundo lugar en las mujeres (Fig. 2) (GLOBOCAN, 2012).

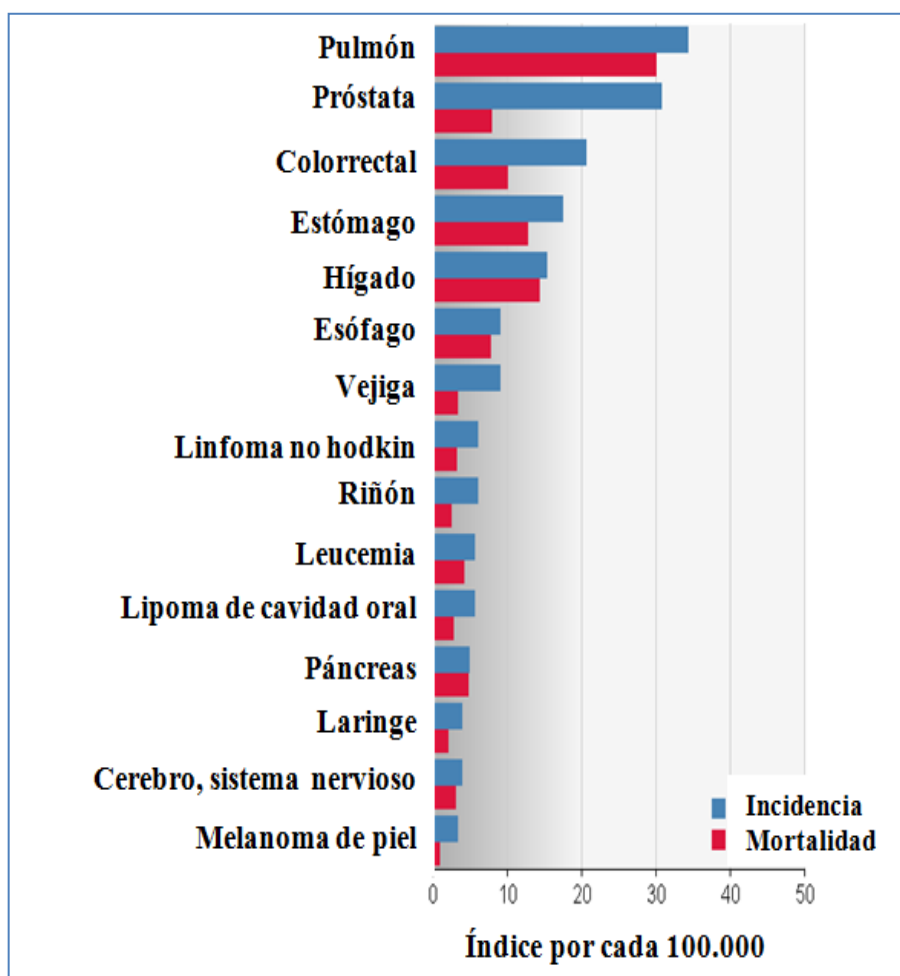


Figura 1. Incidencia y Mortalidad del Cáncer en hombres. Fuente: GLOBOCAN, 2012

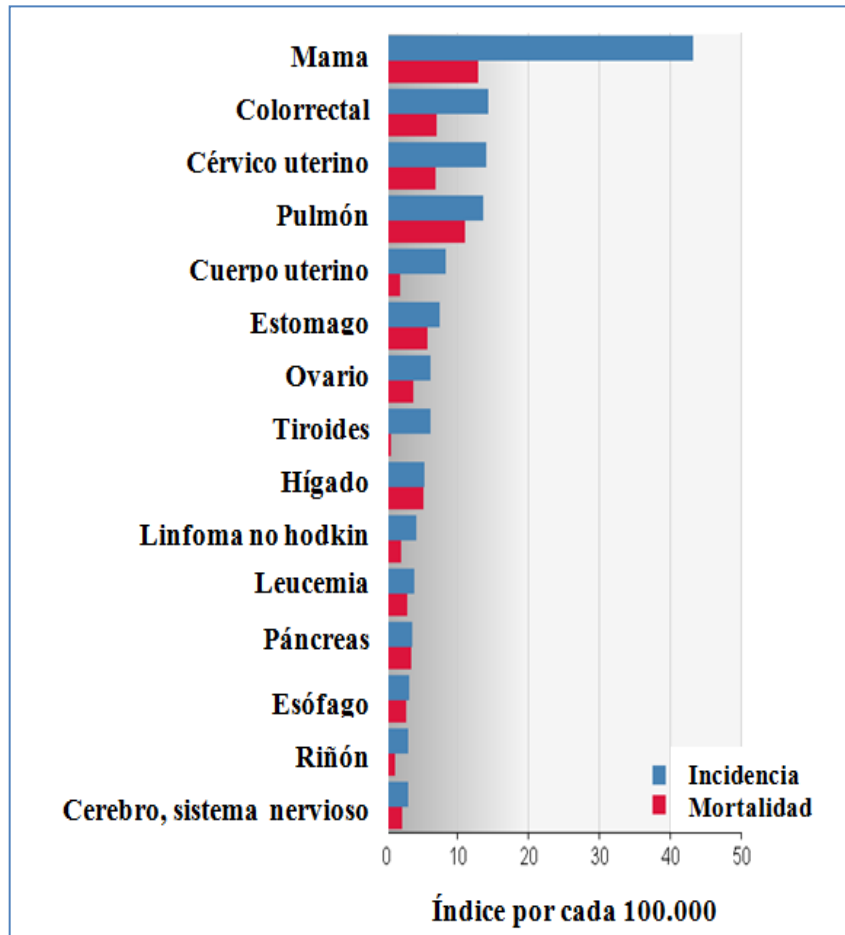


Figura 2. Incidencia y Mortalidad de cáncer en mujeres. Fuente: GLOBOCAN, 2012

La incidencia de cáncer colorrectal es más frecuente en los países desarrollados como Canadá, Estados Unidos, Australia y Europa (Fig. 3) (Laura L., 2008; WHO, 2012). Según la Organización Panamericana de la Salud en Bolivia los tipos de cáncer más reportados son: el cáncer de cuello uterino, cáncer de estómago y cáncer de pulmón (OPS, 2011).

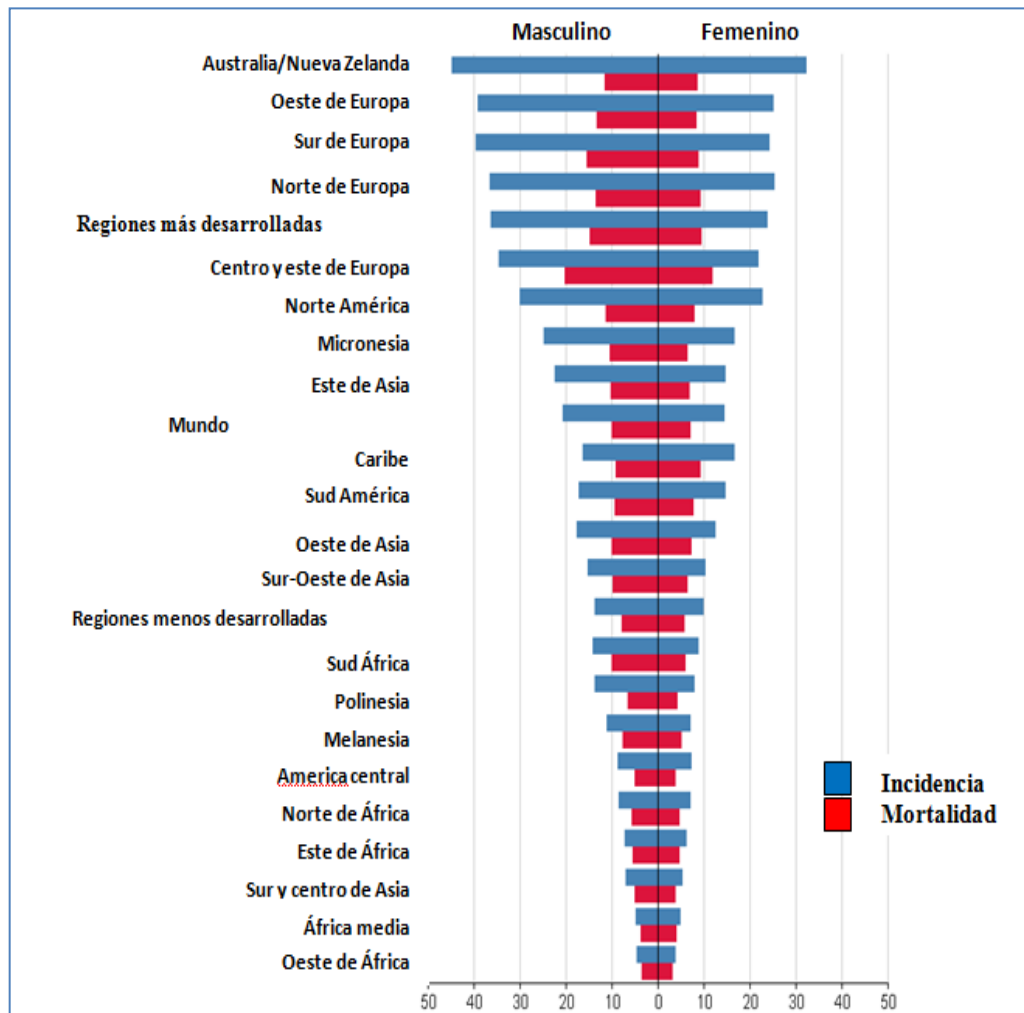


Figura 3. Incidencia y mortalidad del cáncer colorrectal en el mundo, se puede observar que la mayor cantidad de los casos se encuentran en los países de mayor desarrollo, encontrándose en décima posición Sud América. Fuente: WHO, 2012.

Según el Servicio Departamental de Salud (SEDES) la incidencia de cáncer en el departamento de La Paz se ha incrementado en los últimos años, durante la gestión 2014 se reportaron 2047 casos de cáncer frente a 1600 casos reportados en el año 2013 (SEDES- 2014). Por otro lado, el Instituto de Gastroenterología Boliviano Japonés (IGBJ) de La Paz reportó que entre los casos de cáncer digestivo el CCR se encuentra en segunda posición después del cáncer gástrico (Graf. 1) (IGBJ, 2015).

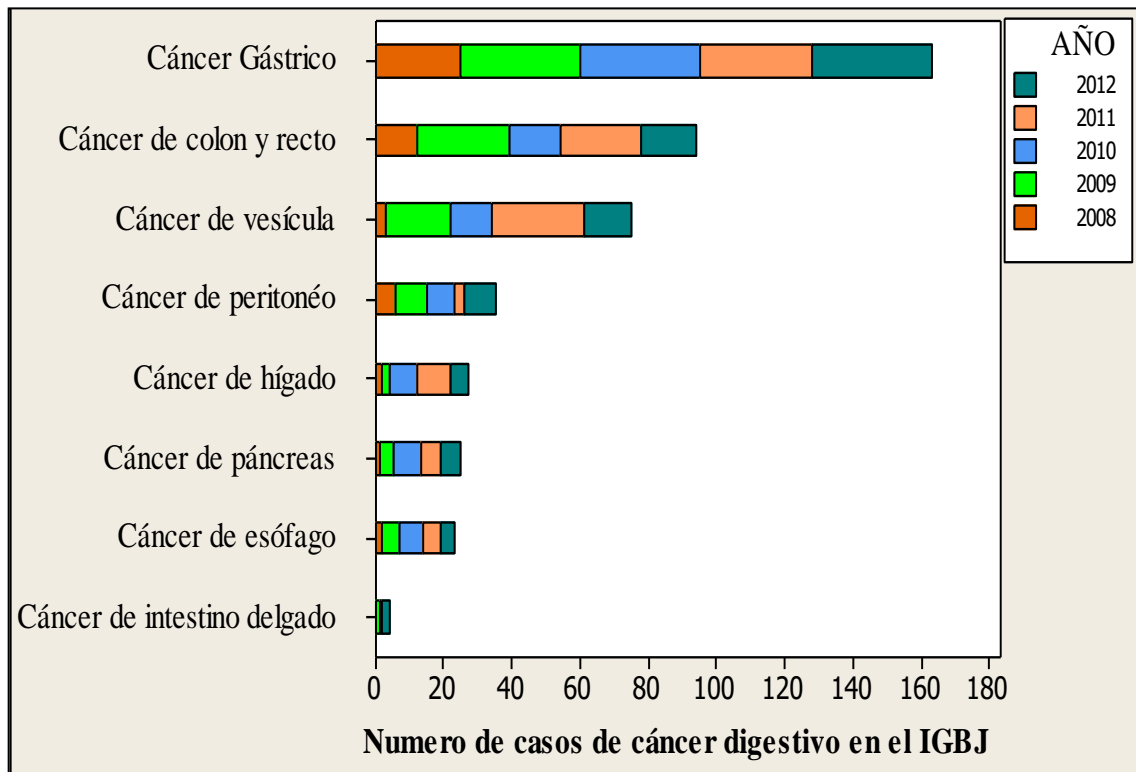


Gráfico 1. Se puede observar que el cáncer colorrectal se encuentra en segundo lugar después del cáncer gástrico en pacientes atendidos en el Instituto de Gastroenterología Boliviano Japonés (IGBJ) de la ciudad de La Paz. Fuente: Unidad de Epidemiología del IGBJ, 2015.

Entre los años 1978-1982 el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital N° 1, de la Caja Nacional de Salud (CNS) de Bolivia realizó un estudio clínico patológico de 26 casos de cáncer colorrectal. En este estudio se correlacionaron los datos con las historias clínicas encontrando 11 casos con cáncer de colon, 14 casos con cáncer de recto y 1 caso que comprometía recto, colón e íleon (Ríos D. J. y Rivero C. G., 1992).

El Hospital Obrero N° 2 de la Caja Nacional de Salud y el Instituto de Gastroenterología Boliviano Japonés realizaron un análisis de 131 historias clínicas de pacientes con diagnóstico de CCR. Las regiones del intestino grueso afectadas por el cáncer fueron: 32% en recto, 27% en el colon descendente y sigmoideo, 25% en el colon ascendente y ciego y por último, 16% en el colon transversal. Los síntomas más frecuentes fueron:

dolor, proctorragia, pérdida de peso y alteraciones del tránsito (Guzmán B. P. y col., 2006).

El creciente número de casos de CCR se debe en principio al diagnóstico tardío de la enfermedad, en estadios avanzados en los que existe diseminación de células tumorales hacia órganos adyacentes (metástasis). La gran cantidad de muertes reportadas por cáncer son atribuidas a la metástasis de la enfermedad, es por esta razón que se realiza investigaciones de marcadores que coadyuven en el seguimiento, uno de los cuales es la CK-20.

Estudios sobre CK-20 demuestran que este marcador se encuentra presente en etapas en las que existe riesgo de metástasis (Giribaldi G. y col., 2006; Garrido S. y col., 2008). La gran cantidad de publicaciones sobre dicho marcador son realizadas con pacientes que cursan distintos estadios de CCR; pero en estos estudios las EII no son consideradas.

Las EII son un riesgo para padecer CCR debido a la acumulación de mutaciones en genes relacionados con el cáncer, dando lugar a la adquisición de nuevas cualidades en las células del epitelio intestinal (Castells A. y col. 2004). Los estudios basados en CK-20 están dirigidos principalmente al riesgo de recurrencia y sobrevida global, sin considerar a las EII como un factor influyente en los resultados, aunque en estas enfermedades podría darse una positividad de CK-20 en pacientes que no han sido diagnosticados con CCR (Kowalewska M. y col., 2008).

Actualmente existe la necesidad de realizar investigaciones sobre distintos marcadores, por esta razón se realizan estudios genéticos para determinar si un paciente tiene la predisposición de padecer cáncer, tal como el síndrome de Lynch.

El síndrome de Lynch es una enfermedad hereditaria en la cual existen mutaciones dentro de los genes de reparación del ADN. Para determinar la presencia de mutaciones en estos genes se realiza un previo análisis de los marcadores de MSI (Toledo G. D. y Cruz-Bustillo C.D., 2005).

Los estudios sobre el síndrome de Lynch en Sud América indican que aproximadamente el 4% de los casos de CCR son causados por este síndrome. Los estudios sobre mutaciones en los genes de reparación demuestran que en un 37% las mutaciones se hallan en los genes MLH1 y MSH2 estudiados en familias afectadas, que concuerdan con los criterios de Amsterdam y/o Bethesda (Ñique C. C. y col., 2014).

La Investigación de nuevos marcadores que coadyuven en el seguimiento del cáncer continúa siendo una labor cotidiana de los investigadores, con el objetivo principal de diagnosticar la enfermedad en etapas tempranas, tal es el caso de las investigaciones sobre las EII y el síndrome de Lynch en el CCR.

En Sud América los estudios sobre cáncer hereditario son limitados para países en vías de desarrollo que no cuentan con recursos suficientes para llevar a cabo dichas investigaciones. En Bolivia los estudios sobre el CCR están basados principalmente en la endoscopía y la histopatología; sin embargo, no se han utilizado técnicas moleculares que permitan coadyuvar al diagnóstico de este u otros tipos de cáncer (The Angiogenesis Foundation, 2014).

3. JUSTIFICACION

Las costumbres socio-culturales en nuestro medio conducen a que las personas con problemas gastrointestinales recurran a remedios caseros o medicamentos de venta libre que alivian el malestar; sin embargo la causa persiste y si se trata de un tumor va aumentando paulatinamente su volumen, y en otros casos podría tratarse de una enfermedad autoinmune. Cuando ya no se puede controlar los síntomas y los pacientes acuden al médico generalmente el cáncer se encuentra en un estadio avanzado.

Según los datos estadísticos de Bolivia en las últimas gestiones los casos de cáncer se han incrementando y entre ellos el CCR. Estos datos son preocupantes ya que los problemas digestivos son cada vez mayores en nuestra población (SDIS-SEDES, 2014; IGBJ, 2015).

En estadios avanzados de la enfermedad las células tumorales migran a órganos adyacentes que complican el tratamiento. En el diagnóstico del cáncer se utilizan diferentes tipos de marcadores para verificar si existe metástasis, en el CCR son utilizados los marcadores CEA y CA 19.9, sin embargo no se recomienda la utilización de estos marcadores de forma individual porque son utilizados en otros tipos de cáncer (Bruner N. y col., 2013).

Entre los estudios dirigidos a la detección de metástasis a distancia se encuentra el marcador CK-20, que se expresa en gran cantidad en el epitelio intestinal y puede ser hallado en tejido sanguíneo cuando hay daño de las células intestinales. Este marcador es una alternativa para el diagnóstico de la enfermedad a través del estudio de sangre periférica. Los estudios previos sobre el marcador no consideran la relación de las queratinas con las EII (Majumdar D. y col., 2012).

En Bolivia, si bien se realizan estudios epidemiológicos de Cáncer no existen datos sobre casos de etiología hereditaria. El síndrome de Lynch es una enfermedad genética causada por mutaciones dentro de los genes de reparación de ADN, una persona con

síndrome de Lynch tiene el 80% de riesgo de padecer CCHNP (American Cancer Society, 2014).

El CCHNP representa entre el 2 y el 4% de los casos de CCR, la técnica gold estándar para diagnosticar mutaciones es la secuenciación de los genes de reparación (Ñique C.C. y col., 2014), otra alternativa es la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), utilizando el fluoróforo Sybr Green, usando este fluoróforo se puede determinar la temperatura de fusión (T_m), temperatura a la cual el 50% del fragmento de ADN amplificado esta desnaturalizado, por lo que se esperaría un T_m distinto para los diferentes tamaños de fragmentos que se amplifiquen (Pinilla B. G. y col., 2008). En nuestro medio no existen estudios genéticos relacionados con los tipos de cáncer hereditario como el síndrome de Lynch.

La detección temprana del cáncer colorrectal es fundamental para prevenir su desarrollo, es así, que el paciente con predisposición genética a padecer la enfermedad recibiría un diagnóstico de mejor calidad. Las pruebas moleculares benefician al paciente y sus familiares, por otro lado el médico podría realizar un seguimiento adecuado del paciente como también de aquellos familiares que sean predisponentes a padecer la enfermedad.

Considerando lo expuesto, en el presente trabajo se ha optimizado una técnica molecular para detectar CK-20 en sangre periférica a través de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (PCR-TR), considerándola como técnica que coadyuva al diagnóstico y seguimiento de micrometástasis en pacientes con cáncer colorrectal y optimización de la técnica de PCR en tiempo real utilizando el fluoróforo Sybr Green para la detección de inestabilidad microsatelital del marcador BAT 25 como un indicador de alteraciones en los genes que predisponen a padecer síndrome de Lynch.

4. MARCO TEORICO

4.1 Bases Moleculares del Cáncer

El cáncer se produce por mutaciones en el ADN, estas mutaciones principalmente se encuentran involucradas con los factores que regulan el ciclo celular, por lo cual es esencial entender este proceso y los componentes moleculares que participan en él (Monzón O. y col., 2011).

El Ciclo Celular

El ciclo celular es una secuencia de eventos que ocurre de manera ordenada y controlada en la vida de una célula, en este proceso el ADN es replicado de manera fidedigna (Peña C. Y. Y., 2013). Dentro del ciclo celular existen diferentes puntos de control que se encargan del buen funcionamiento celular. El ciclo celular se divide en interface, mitosis y citocinesis (Fig. 4) (Monzón O. y col., 2011).

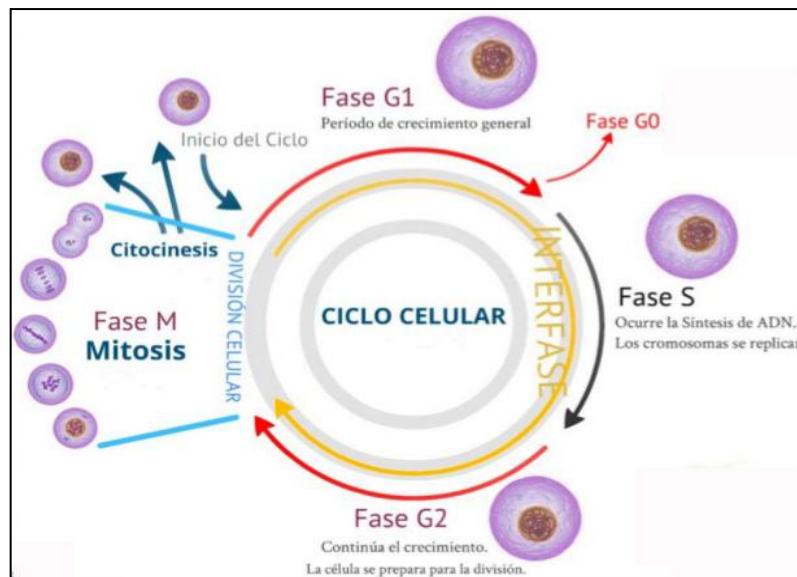


Figura 4. Las tres fases del ciclo celular: la interface (fase G1, S y G2), la mitosis y la citocinesis que da lugar a la formación de 2 células hijas. Fuente: www.acercaciencia.com/2012/10/15/ciclo-celular.

Interface

En la Interface la célula comienza con la organización intracelular para dar inicio a la división celular, la misma está compuesta por sub fases:

- En la **Fase G1**, la célula verifica si se encuentra en condiciones óptimas para continuar con la división e ingresar a la fase S, en algunos casos la célula puede ingresar a la **fase G0** o quiescente donde es incapaz de dividirse.
- En la **Fase S** o fase de síntesis, se da la replicación del ADN y la duplicación de los centrosomas. Al finalizar la fase dentro del núcleo existe el doble de ADN, las proteínas nucleares también son incrementadas. Esto permite a la célula dividirse de forma fidedigna (Rodríguez F. L. y col., 2004).
- En la **Fase G2**, la célula aumenta de tamaño, este proceso se inicia con la condensación del ADN para dar forma a los cromosomas, los centrosomas se dirigen a lugares opuestos, se ensamblan las estructuras que formarán el citoesqueleto y las proteínas que formaran parte del huso mitótico. En esta fase la célula aumenta de tamaño (Megías M. y col., 2015).

Mitosis

En la mitosis se reparte a las células hijas el material genético que se duplicó en la interface (Fig. 5). Esta fase se subdivide en:

- **Profase**, los cromosomas se condensan por completo y se forma el huso mitótico.
- **Metafase**, la membrana nuclear se fragmenta, los cromosomas se unen al huso mitótico mediante sus cinetocoros formando la línea ecuatorial de la célula.

- **Anafase**, las dos cromátidas hermanas se separan y son arrastradas a los polos opuestos de la célula.
- **Telofase**, se produce la dispersión del huso mitótico, la envoltura nuclear comienza a formarse nuevamente (Nuñez V. R. y Escalona M. J., 2002).

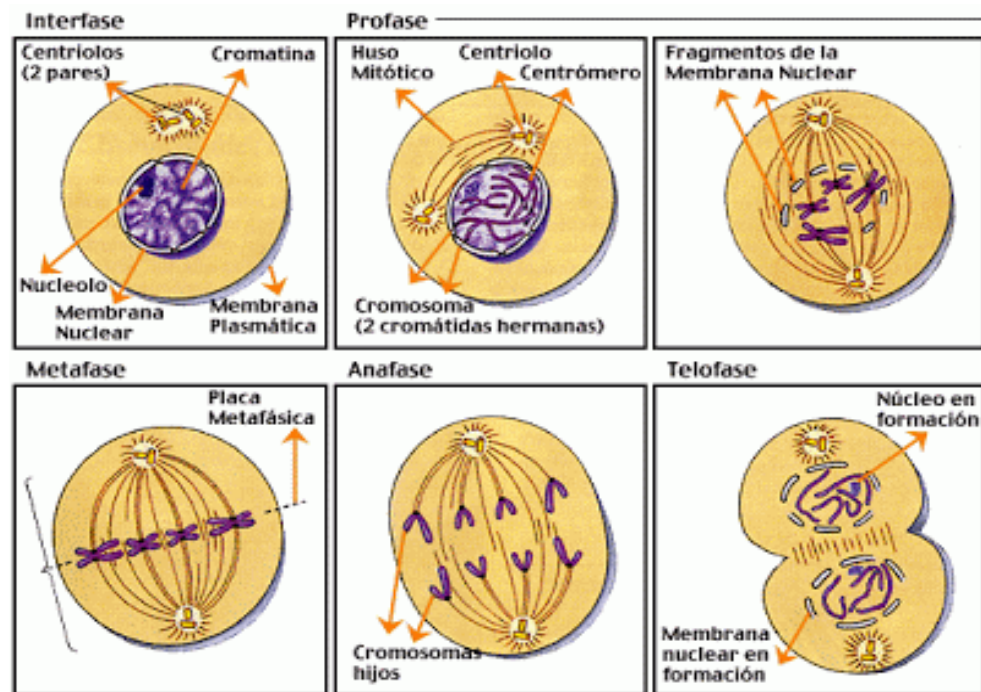


Figura 5. Fases de la mitosis. Fuente: cienciasic.blogspot.com.

Citocinesis

Esta es la fase final del ciclo celular en la cual la célula se divide por completo, comienza en la anafase, la célula adquiere una forma estrangulada produciéndose un surco en la superficie celular denominado surco de escisión que es perpendicular a la disposición del huso mitótico. El estrangulamiento permite a la célula dividirse por completo en dos células hijas (Megías M. y col., 2015).

Regulación del ciclo celular

En el ciclo celular existen diferentes puntos de control que permiten a la célula duplicarse de manera correcta, una alteración dentro de las proteínas encargadas de este control puede dar lugar al inicio del cáncer.

Las proteínas más importantes en la regulación del ciclo celular son las ciclinas, las ciclinas dependientes de quinasas y los inhibidores de quinasas.

- **Las Ciclinas**, denominadas de este modo por la manera en que aparecen y desaparecen dentro del ciclo celular (Lomanto D. L. y col., 2003) están encargadas de controlar el ciclo celular a través de la activación de moléculas, reparación del ADN y regulación de la transcripción.
- **Las Ciclinas Dependientes de Quinasas (CDKs)** forman una sola macromolécula con las ciclinas dando lugar al complejo CDK-ciclina, esta macromolécula debe ser fosforilada para su activación (Maestre F. C., 2009).
- **Los Inhibidores de Quinasas (CKI)** fueron las últimas proteínas que fueron descubiertas, estas se unen al complejo CDK-ciclina inhibiendo su actividad. El complejo CDK-ciclina y los CKI son muy importantes en la regulación del ciclo celular (Sanz G. S., 2006). En la tabla 1 se describen las regulaciones de las ciclinas unidas a las CDKs y sus inhibidores.

Tabla 1. Ciclinas, Quinasas e Inhibidores de quinasas dentro del ciclo celular. Fuente:Rodriguez F. L. y col. 2004

Ciclinas	Quinasa	Inhibidores	Fase que regulan
Ciclina A	Activa CDK2 y CDC2	p21, p27	S a M
Ciclina B1	Activa CDC2	p21, p27	Progresión a M
Ciclina B2	NC	NC	Progresión a M
Ciclina C	Activa CDK8	p21, p27	G1 – NC
Ciclina D1	Activa CDK4	p15, p16, p18, p19, p21, p27	G1
Ciclina D2 Y D3	Activan CDK6	p15, p16, p21, p27	G1
Ciclina E	Activan CDK2	p21, p27	Progresión a S
Ciclina F	NC	NC	G2 progresión a M
Ciclina G1 y G2	Reparación del DNA	NC	S-NC
Ciclina H	Activa CDK7, regulación de la transcripción y reparación del DNA	NC	S-NC
Ciclina I	NC	NC	NC
Ciclina K	Regulación de la transcripción y activación de CDKs	NC	NC
Ciclina T1 y T2	Activa CDK 9	NC	NC

Entre otros componentes encargados de la regulación del ciclo celular están: el factor de elongación de la transcripción, la pRb y la p53:

- **El factor de elongación de la transcripción E2F**, es un regulador de la transcripción de genes que actúan en la proliferación, diferenciación y muerte celular, la función más importante del E2F es la regulación de la fase G1 a fase S (Rodríguez F. L. y col., 2004; Alvarado M. J. y Mayani H., 2006).
- **El gen de la proteína retinoblastoma (pRb)**, es un gen supresor de tumores que inhibe la proliferación celular, tiene una función postranscripcional (pRb), la

fosforilación de esta proteína es necesaria para la unión con otras proteínas involucradas en la regulación del ciclo (Peralta Z. O., 1997).

- **La proteína p53**, es una fosfoproteína nuclear encargada de controlar el paso de la fase G1 a la fase S, es un supresor de tumor reconocido como “el guardián del genoma”. En la fase G1 se encuentra localizada en el citoplasma, en el inicio de la fase S migra hacia el núcleo (Gallego P.R. y col., 2010; Quintela S. D. y col., 2001; Pérez-Carro R. A. y col., 2000). La p53 se encuentra implicada en la regulación del ciclo celular y previene la acumulación de alteraciones genéticas mediante la apoptosis evitando la replicación del ADN dañado (Valbuena G. A., 2008).

Muerte Celular

La muerte celular es un proceso muy importante en el ciclo celular, se produce de dos formas; la necrosis y la apoptosis. En la necrosis la célula es dañada por agentes externos (químicos, físicos) y la apoptosis o muerte celular programada es un proceso que mantiene el equilibrio celular sin causar daño alguno (Contreras V. D. D., 2013). En la cascada de activación del proceso apoptótico se encuentran implicados los receptores celulares denominados DRs (Death Receptors) entre ellos la CD95, TNFR, DR3, DR4 y DR5 (Roseto A. y Brenner C., 1999).

Varias moléculas participan en la apoptosis, entre ellas la p53, la Bcl2 y las caspasas:

La p53 se incrementa en casos de daño al ADN, hipoxia, exposición a agentes tóxicos, radiaciones UV, presencia de dímeros de ciclobutano piridina entre otros (Gómez L. M. y col., 2004; López M. y col., 2001).

La Bcl2 es una familia de reguladores de la muerte celular que codifica una proteína localizada en la membrana mitocondrial. Se han encontrado casos de cáncer relacionados con anomalías en estos reguladores (Espinosa B. M., 2014).

Las caspasas (cisteína aspartato proteasas) son una familia de cisteína proteasas que participan en la inducción de la apoptosis, están dentro de la célula en forma inactiva conocidas como zimógenos (procaspasas) (Calderón V. R., 2005).

En la activación de la apoptosis existen 2 vías principales que son: La vía Intrínseca relacionada con la mitocondria, en la que los componentes más importantes son la Bcl-2 y la citocromo C (Masyelly R. y col., 2009) y la vía Extrínseca que se encuentra relacionada con los receptores de muerte celular DRs. (Meresman G., 2011).

Oncogenes y Genes Supresores

Los Oncogenes (del griego Onkos = tumor) son genes involucrados en la formación del cáncer, provienen de los genes sin alteración conocidos como protooncogenes que son genes codificadores de proteínas que actúan favoreciendo el ciclo celular. La formación de oncogenes afecta a los procesos de proliferación y muerte celular que pueden llegar a descontrolarse (Manjarrez H. A., 1998).

En otro grupo se encuentran los genes supresores de tumor los cuales tienen como función controlar la multiplicación celular, en caso de existir mutación dentro de estos genes la proliferación celular se descontrola lo que implica desarrollo tumoral (Brandan N. y col, 2014).

La célula está expuesta a diferentes factores de riesgo que pueden ocasionar mutaciones dentro de los genes, un gen mutado puede causar un desequilibrio de la duplicación celular, por consiguiente, la aparición de un tumor, más aún, cuando las mutaciones presentes en el material genético involucran la funcionalidad de los genes supresores de tumores. Las células normales atraviesan por diferentes pasos para convertirse en células neoplásicas, este proceso corresponde a la carcinogénesis (Kinzler K. W. y Vogelstein B., 1996).

Carcinogénesis

El cáncer es una enfermedad con anormalidades dentro de la maquinaria celular y en específico en el material genético (ADN). En el proceso de la división celular se van añadiendo nuevas mutaciones que inducen a la célula a adquirir nuevas cualidades que darán lugar a la inmortalización celular e invasión de tejidos adyacentes (Ferbeyre B. L. y Salinas G. J., 2005). El cáncer es de origen monoclonal, es decir, que las alteraciones genéticas comienzan en una sola célula. Las alteraciones dentro del material genético son ocasionadas principalmente por la exposición a factores del medio ambiente, el 80% de los cánceres esporádicos es ocasionado por contaminantes tales como el humo de cigarrillo que puede producir cáncer de pulmón y cáncer de vejiga. Los químicos carcinógenos actúan inhibiendo o activando enzimas dentro de la regulación celular, los cambios producidos en la célula influyen en la activación de oncogenes (Martin de Civetta M. T., y Domingo C. J., 2011).

En el cáncer colorrectal son necesarias más de 5 mutaciones para que se llegue a formar el tumor (Michael J. R., 1993; Li R. y col., 2000).

La carcinogénesis consta de tres etapas:

- **Iniciación:** en esta etapa la célula puede ser atacada por agentes externos que causan daños dentro del material genético, estos daños serán heredados a las siguientes generaciones celulares, esta etapa implica la expresión de oncogenes que darán lugar al inicio de una posterior neoplasia.
- **Promoción:** después de que la célula sufre daño en su material genético, se produce una segunda etapa en la cual la célula adquiere la capacidad de proliferación descontrolada, sin embargo, esta proliferación no solo se da por alteraciones intracelulares, es más bien un conjunto de cambios tanto intracelulares como extracelulares (metabolitos que se encuentran en el exterior de la célula) estos aspectos darán lugar al desarrollo incontrolado de la célula.

- **Progresión:** según la transformación que van sufriendo las células, estas van acumulando nuevas alteraciones genéticas que les permitirán adquirir nuevas cualidades, y a su vez, el desarrollo de la neoplasia hacia tejidos adyacentes (Gandur N., 2011; Campos S. M., 2012).

Células Neoplásicas

Las células neoplásicas son células en las cuales el material genético se encuentra alterado. El proceso para que una célula se convierta en una célula neoplásica puede dividirse en tres fases: tumor primario benigno, cáncer *in situ*, tumor maligno.

- **Tumor Primario Benigno**

En esta etapa se da lugar a la acumulación de mutaciones dentro del material genético de la célula. A nivel intracelular existe una cascada de señalización que permite a la célula tener un equilibrio en la regulación de sus funciones, estas cascadas de señalización están involucradas en la formación tumoral según las alteraciones que se produzcan (Hanahan D. y Weinberg R. A., 2000). Cuando la cascada de señalización se ve afectada, las mutaciones en los genes que forman parte de ella son capaces de activar la transcripción de oncogenes que promoverán la formación de una célula neoplásica, esta célula al contener mutaciones en su material genético da lugar a la división de células que contienen las mismas mutaciones, de este modo, en el transcurso de las posteriores divisiones la célula va acumulando mutaciones. Este proceso es el inicio de la formación del cáncer, razón por la cual es denominado como tumor primario benigno (Barault L. y col., 2008; Hernández M. M. y Ríos H. M., 1999).

- **Cáncer *In Situ***

Posterior a la acumulación de mutaciones dentro de la célula, esta adquiere la capacidad de dividirse de forma indefinida; sin embargo, un tumor es considerado en primer lugar como benigno ya que no tiene la capacidad de invasión a otros tejidos, es decir, que el

tumor se encuentra localizado en el sitio en el que se inició el cáncer, por esta razón se lo denomina Cáncer *in situ*.

- **Tumor maligno**

La acumulación de mutaciones que se producen en el ADN permite que el tumor adquiera la capacidad invasiva, razón por la que se lo considera ya como un tumor maligno (Spirio L. y col., 1993). Las razones por las que una célula adquiere nuevas cualidades se describen a continuación.

Escape a la muerte celular programada

Las células tumorales van adquiriendo nuevas mutaciones que les permiten evadir los mecanismos de apoptosis y duplicarse de manera incontrolada. Los receptores celulares, como el factor de crecimiento tipo insulina, se encuentran implicados en la proliferación celular y apoptosis, una anomalía dentro de estos receptores puede dar paso a la formación de una célula cancerosa (Alison J. B. y col., 1999). Entre otros receptores se encuentran los DRs que están involucrados en la apoptosis, errores en los genes de estos receptores pueden dar lugar al cáncer (Avi A. y Vishva M. D., 1999).

Inmortalidad celular

Los telómeros son secuencias que se encuentran en los extremos de los brazos de los cromosomas, cuando estos se acortan lo suficiente se produce la muerte celular (Counter C. M. y col., 1992). En las células neoplásicas los telómeros se mantienen de un solo tamaño permitiéndole adquirir a la célula una inmortalidad, esto ocurre gracias a la activación de la enzima telomerasa, que añade hexanucleótidos en las porciones terminales del ADN (Bryan T. M. y Cech T. R., 1999). En la inmortalización celular también se produce una recombinación de secuencias que permite la extensión y la estabilización telomérica (Bryan T. M. y col., 1995).

Angiogénesis

La angiogénesis es el proceso por el cual se generan nuevos vasos sanguíneos en los tumores. Es estimulada por factores de crecimiento como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante y el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) (Aktar A. M. y col., 2007). Todos los tumores sólidos atraviesan por un proceso de transformación neoplásica que produce un crecimiento tumoral que va invadiendo tejido adyacente (Ribatti D. y col., 2013).

Invasión tisular y metástasis

Durante el desarrollo del tumor las células neoplásicas pueden llegar a infiltrarse en el torrente sanguíneo, tejidos adyacentes y sistema linfático, de este modo las células neoplásicas pueden ser transportadas a sitios distantes donde formarán nuevas colonias. La metástasis es causante del 90% de las muertes por cáncer. En el proceso de metástasis se encuentran implicadas diferentes moléculas de adhesión celular como las CAMs (cell adhesión molecules), E-cadherinas e integrinas (Sakao S. y Tatsumi K., 2011; Johnson J. P., 1991; Gerhard C. y Henrik S., 1999; Varner J. A. y Cheresch D. A., 1996).

4.2 El Cáncer Colorrectal

4.2.1 Anatomía y Fisiología del Intestino Grueso

El intestino grueso tiene un tamaño aproximado de 1.5 m de largo y 6.5 cm de diámetro, se encuentra localizado en el abdomen formando parte del aparato digestivo. Se divide en seis partes: ciego, colon ascendente, colon transverso, colon descendente, colon sigmoideo y el recto, de manera general se puede dividir en dos partes: el colon derecho (ciego, colon ascendente, dos tercios del colon transverso) y colon izquierdo (un tercio del colon transverso, colon descendente, colon sigmoideo y el recto) (Fig. 6) (Smith C. G. y col., 2013).

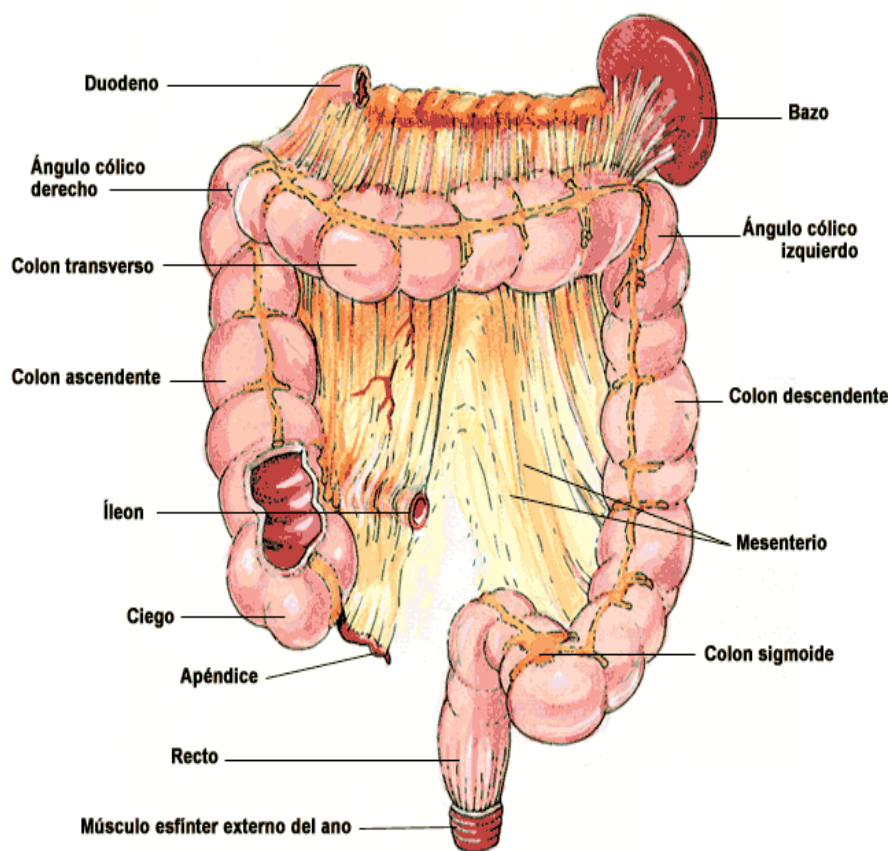


Figura 6. Intestino Grueso y sus partes. Fuente: interpreteenergetico.wordpress.com/tag/intestino-grueso.

Entre las funciones del intestino grueso se encuentran: la formación de heces fecales, absorción de agua y absorción de nutrientes que fueron procesadas en el intestino delgado (Instituto Catalán de Oncología, 2009). La absorción de agua es mayor en la región del colon proximal, la cual va disminuyendo conforme avanza hasta el colon distal, este proceso es muy importante para la formación de las heces fecales. La diferencia de absorción en las regiones del colon puede deberse principalmente a la mayor cantidad de vasos sanguíneos existentes en el colon proximal (Skinner S.A. y O'Brien P. E., 1996).

La pared del intestino grueso está conformada por cuatro capas: la mucosa, la submucosa, la muscular y la serosa (Fig. 7) (Martínez de Victoria M. E. y col., 2005). Entre la pared muscular del colon y la pared muscular del recto existe una diferencia: en la región del colon la pared muscular es gruesa, en cambio la pared del recto es más delgada.

La relación anatómica del recto con diferentes órganos pélvicos implica diagnósticos de estadios avanzados en el cáncer de recto, además, en muchos de los casos, diferentes órganos adyacentes se encuentran involucrados en el cáncer. Esta es la razón por la que se debe saber la localización del cáncer y el estadio en el que se encuentra el tumor y a partir de estos datos elegir el tratamiento adecuado (Charúa G. L. y col., 2009).

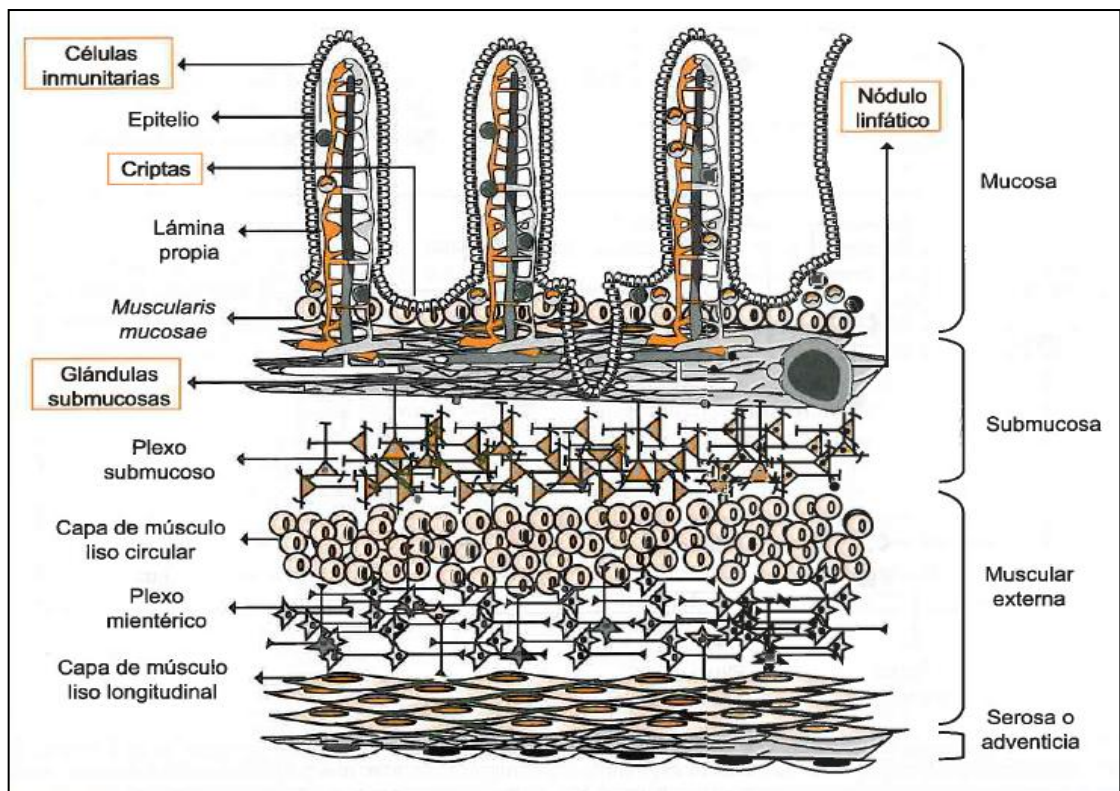


Figura 7. Estructura General de las distintas capas del tracto gastrointestinal. **Fuente:** Martínez V. M. E. y col. 2005.

En relación a la histología del colon, la cantidad de células caliciformes productoras de mucina es mayor en la región del colon sigmoideo y el recto, en comparación con el colon ascendente, transverso y ciego. Esta característica puede explicarse por el tránsito de los alimentos ya que en el colon sigmoideo y el recto son las últimas regiones por donde atraviesan los desechos de los alimentos, por esta razón estas regiones necesitan una mayor protección contra agentes físicos y químicos (Tomio A. y Isamu K., 1989).

Existen diferentes tipos de componentes que pueden llegar a dañar el intestino grueso ya sean de tipo químico o productos de desdoblamiento bacteriano, la proporcionalidad de las mismas son diferentes en distintas regiones del intestino grueso. En el colon distal y el recto se forma la mayor parte de productos de fermentación. La cantidad de mucopolisacaridos neutros predominan en el lumen del colon derecho, en el recto predominan las mucinas y los ácidos grasos de cadena corta. Existe una gran cantidad de células endocrinas en el epitelio de revestimiento del recto en relación a otros segmentos del intestino, es así que el intestino tiene una función variable en sus distintos segmentos, la diversa funcionalidad del intestino da una idea sobre la etiología del desarrollo cancerígeno, consecuencia del daño de la estructura genómica (Shamsuddin A. M. y col., 1981; Stigliano V. y col., 2008).

4.2.2 Factores de Riesgo que Predisponen al Cáncer Colorrectal

Un factor de riesgo es aquello que incrementa la probabilidad de desarrollar una determinada enfermedad, por ejemplo: una mala alimentación, consumir cigarrillos, consumir bebidas alcohólicas, exposición a agentes tóxicos, etc., son algunos factores de riesgo que pueden causar daños dentro de nuestro organismo y predisponer a la persona a desarrollar una enfermedad.

Entre los factores de riesgo para llegar a padecer cáncer colorrectal se encuentran: la alimentación, el estilo de vida, factores genéticos, la edad y las EII (Rodrigo L. y Riestra S., 2007).

Alimentación

Dentro de la etiología del cáncer colorrectal se debe mencionar que el tipo de alimento que se consume es muy importante ya que puede influir en gran medida en el desarrollo de la enfermedad, en este grupo los más importantes son: la dieta excesiva en grasas y el consumo excesivo de carnes expuestas a temperaturas elevadas como las parrilladas.

- Grasas

El aumento de lípidos saturados en la alimentación aumenta el riesgo de padecer cáncer colorrectal (Fig. 8), ya que al ingerir alimentos ricos en grasas se estimula la liberación de una mayor cantidad de ácidos biliares que pueden desgatar el tejido intestinal, como respuesta a ello el organismo produce una mayor cantidad de células para compensar el daño, por lo que se promueve un daño dentro del material genético. Por otro lado, la ingesta de lípidos poliinsaturados puede brindar una protección al tejido del colon inhibiendo la señal de la proteincinasa y restituyendo la respuesta del receptor II del factor de crecimiento transformante (TGF) (Morgan V.G. y col., 2008; Ogino S., y col., 2008).



Figura 8. Alimentos Grasos. Fuente: www.google.com.bo/search?q=alimentacion.

- **Carnes Rojas (Parrilladas)**

Las carnes rojas que se exponen a temperaturas elevadas (parrilladas) (Fig. 9) generan sustancias mutagénicas (aminas heterocíclicas, hidrocarburos aromáticos policíclicos) que pueden ocasionar daños en la estructura del ADN, estos agentes causan daño a través de la transferencia de grupos metilo o etilo a los átomos nucleofílicos de las bases nitrogenadas, en otros casos se insertan entre las bases del ADN y distorsionan la estructura de la misma, lo que puede afectar el marco de lectura, de este modo las sustancias mutagénicas de las parrilladas pueden inducir el desarrollo del cáncer colorrectal (Rodrigo L. y Riestra S., 2007).



Figura 9. Carnes cocidas a temperaturas elevadas. Fuente:

www.google.com.bo/search?q=alimentación

Estilo de Vida

El estilo de vida de una persona puede influir en el desarrollo del cáncer colorrectal, por ejemplo un paciente que fuma y consume bebidas alcohólicas corre mayor riesgo de desarrollar cáncer comparado con una persona que no tiene los mismos hábitos, así también, una persona con sobrepeso es más propensa que una persona de peso normal.

- **El tabaco**

El consumo de cigarrillo causa aproximadamente 1.5 millones de muertes por año en el mundo (Ministerio de Salud de Chile, 2012). La probabilidad de fallecer con CCR a causa de fumar tabaco es de 30 al 40% mayor comparado con las personas que no consumen tabaco (Hano G.O. y col., 2011). La nicotina estimula los B-adrenoreceptores que provocan la elevación de la ciclooxigenasa-2 (COX2), la prostaglandina- E2 (PGE2) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factores que favorecen el crecimiento del tumor, aumentando la vascularización de las mismas (Amarillo H. A. y col., 2008). El incremento de la proteína COX-2 es considerado como un evento temprano de la carcinogénesis del colon (Fuentes A. A. y col., 2008). La sobreexpresión de COXs está relacionado con una disminución de la funcionalidad de la E-caderina que produce un desprendimiento de las células tumorales y la diseminación de las células a otros tejidos, promoviendo, de esta forma, la proliferación celular en otros tejidos (Gerhard C. y Henrik S., 1999; Passalacqua H. C. y col., 2010). La PGE2 es un importante modulador de la proliferación celular y de transformación maligna se forma a partir de la acción catalítica de las COXs que promueven la conversión de ácido araquidónico en prostanoides (Alejandro S. J., 2008).

- **El alcohol**

El alcohol es una sustancia que ocasiona daños a diferentes niveles, al ingresar al organismo por vía oral, tiene una acción directa sobre el revestimiento gastrointestinal ocasionando daños en el epitelio si se consume en exceso. También incrementa la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos generando una hiperlipidemia que conlleva a la formación de un hígado graso, el resultado de la lipogénesis puede provocar obesidad. Por otro lado, el alcohol causa daño a nivel mitocondrial disminuyendo la funcionalidad de la enzima acetaldehído deshidrogenasa que da lugar a un incremento de la concentración de acetaldehído, el cual es un compuesto reactivo que causa daños a nivel celular si no es eliminado. El consumo excesivo de alcohol también inhibe la función del

folato y la metionina que son componentes importantes dentro de la funcionalidad de la célula. El alcohol es una sustancia que tiene diferentes mecanismos de acción dentro del organismo, sin embargo, los mecanismos mencionados son quizá los más importantes en el desarrollo de CCR (Téllez M. J. y Cote M. M., 2006).

El alcohol no solo influye en la predisposición a padecer cáncer colorrectal sino también en otros tipos de cáncer, el consumir bebidas alcohólicas en cantidades excesivas ocasiona daños a nivel celular, específicamente genómico, el resultado de ello puede causar el desarrollo de cáncer (Galiano de Sánchez M. T., 2005).

- **La Obesidad**

La obesidad es un factor de riesgo para llegar a desarrollar diferentes tipos de enfermedades como las cardiovasculares, diabetes y también cáncer colorrectal. En la mayoría de los casos las personas que sufren de obesidad se alimentan de comidas ricas en grasas y, como se explicó anteriormente el consumo excesivo de grasas pueden influir en la aparición del cáncer colorrectal. Las personas obesas tienen una gran cantidad de tejido adiposo, esta gran cantidad de ácidos grasos incrementa el estrés oxidativo que influye en la aparición de errores dentro del material genético, lo cual puede conllevar al desarrollo de cáncer colorrectal (Rodrigo L. y Riestra S., 2007).

Factores Genéticos

Existen genes involucrados en la formación del CCR, las mutaciones dentro de estos genes pueden llegar a transmitirse de generación en generación. Las personas con antecedentes familiares de la enfermedad tienen mayor probabilidad de desarrollar la patología. Entre los genes involucrados en el cáncer colorrectal se encuentran: el gen de la *poliposis adenomatosa coli* (APC), el gen *carcinoma colorrectal deleted* (DCC) y el gen de la proteína del tumor p53, estos genes están involucrados en la supresión tumoral. Entre los oncogenes involucrados se encuentran el gen sarcoma de rata Kirsten viral oncogén homólogo del KRas y la beta catenina (CTNNB1). En el cáncer colorrectal

hereditario se encuentran alteraciones dentro de los genes de reparación MMR (Mismatch repair) (Fig. 10) (Palacio R. K. y Muñeton P. C., 2012; Juárez V. C. y Rosales R. M., 2014). Todos los genes mencionados han sido reportados como predictores de cáncer colorrectal por diferentes autores.

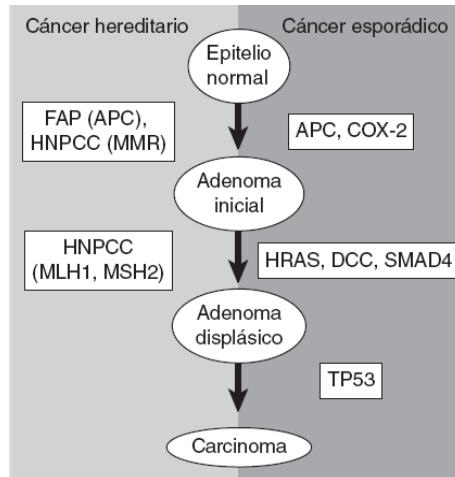


Figura 10. Modelo genético del cáncer colorrectal, se puede observar los genes involucrados en la aparición del carcinoma de colon. En el cáncer hereditario (genes predisponentes) se encuentran involucrados el gen APC causante de la poliposis adenomatosa familiar FAP y los genes MMR (MSH2, MLH1) causantes del cáncer colorrectal hereditario no poliposico CCHNP. En el cáncer esporádico están involucrados los genes APC, de la COX 2, de la cascada RAS, el DCC, SMAD4 y la p53. Fuente: Juárez V. C. I. y col., 2014.

La Edad

La edad es un factor de riesgo en el cáncer colorrectal ya que durante el transcurso del tiempo una persona puede acumular mutaciones que dan lugar a la enfermedad es por esta razón que los casos de CCR se incrementan en personas adultas, por lo cual se ha visto que es mucho mejor realizar la colonoscopia, de forma preventiva, a partir de los 40 años mejorándose así el pronóstico de la enfermedad (Torres Z. N. y col. 2006).

La Enfermedad Inflamatoria del Intestino

La colitis ulcerativa crónica y la enfermedad de Crohn son patologías similares al cáncer colorrectal. El riesgo de contraer CCR a partir de estas patologías se incrementa conforme pasa el tiempo. Es recomendable realizarse una colonoscopia para descartar la formación de pólipos en el intestino grueso.

Las EII son patologías inflamatorias que afectan el tracto intestinal, son consideradas como patologías importantes ya que existe un deterioro severo de la calidad de vida del enfermo, además de que son un riesgo para el desarrollo de CCR (Sepúlveda S. E. y col. 2008). Estas enfermedades tienen una etiología desconocida (Thoreson R. y Cullen J. J., 2007), se presentan con frecuencia en el sexo femenino y en la mayoría de los casos en adultos jóvenes (Figueroa C. y col., 2005).

En estas enfermedades el proceso inflamatorio puede afectar todo el espesor de la pared del tubo digestivo, desde la mucosa hasta la serosa, con una posible formación de fisuras, fístulas o abscesos (Pérez T. C. y col., 2008). Las EII comúnmente solo afectan a la mucosa y submucosa del intestino grueso; sin embargo puede llegar a extenderse a capas más profundas lo cual puede ocasionar una peritonitis (Silbernagl F. y Lang F., 2013).

La colitis ulcerosa (CU) puede convertirse en CCR después de 8 a 10 años. Los síntomas de la CU que se presentan con más frecuencia son: diarrea sanguinolenta, tenesmo, dolor abdominal tipo cólico, fiebre y pérdida de peso. Los signos graves que se pueden presentar son: fiebre elevada, retraso del crecimiento, distensión abdominal, timpanismo, dolor en la región abdominal (Medina B. E. y col., 2009).

4.2.3 Factores que Previenen el Cáncer Colorrectal

Existen factores que pueden llegar a disminuir el riesgo de desarrollar el CCR entre ellos la dieta rica en frutas, verduras y fibra pueden ser factores que previenen el cáncer.

- Fibra

La ingesta de fibra disminuye el tiempo del tránsito de los alimentos por el intestino grueso, disminuyendo la exposición a agentes cancerígenos. El ácido deoxicólico y litocólico son productos de la secreción biliar considerados como agentes carcinogénicos produciendo cambios en el pH del tracto digestivo lo que puede ir desgastando la pared del epitelio intestinal y posteriormente ocasionar daños en la estructura genómica. La fibra aumenta el tamaño del bolo fecal, reduce la mutagenicidad de los ácidos biliares secundarios incrementando la concentración de ácidos grasos de cadena corta anticancerígenos (Maillo O. C., 1995).

- Actividad Física

El sedentarismo es un factor de riesgo para la aparición de diferentes tipos de enfermedades, según la OMS la inactividad física es causante del 21 al 25% de los casos de cáncer de mama y de colon, las causas todavía están siendo estudiadas, pero en el CCR es probable que se deba a un tránsito intestinal más lento del bolo alimenticio lo cual conlleva a una mayor exposición a posibles agentes cancerígenos (Serra M. L. y col., 1994). Una persona debería realizar ejercicio por lo menos 30 minutos al día para poder gozar de los beneficios que previenen el desarrollo del cáncer (Friedenreich C. y col., 2006).

- Frutas y Verduras

Las Frutas y Verduras contienen una gran cantidad de vitaminas y minerales que tienen funciones protectoras y previenen el desarrollo del cáncer como por ejemplo: los beta

carotenos, la vitamina C, la vitamina E, el calcio, etc. (Peña C. Y. Y., 2013; Galiano de Sánchez M. T., 2005).

4.2.4 Concepto de Cáncer Colorrectal

El CCR es una formación maligna que se produce en la mucosa del colon o en el recto. La teoría de la carcinogénesis colónica, Hipotesis de Vogelstein, sugiere que la enfermedad es producida por una secuencia de pasos, comenzado con una hiperplasia celular en la mucosa colónica que da lugar a la formación de un pólipo (Fig. 11) (Casimiro C., 2002):

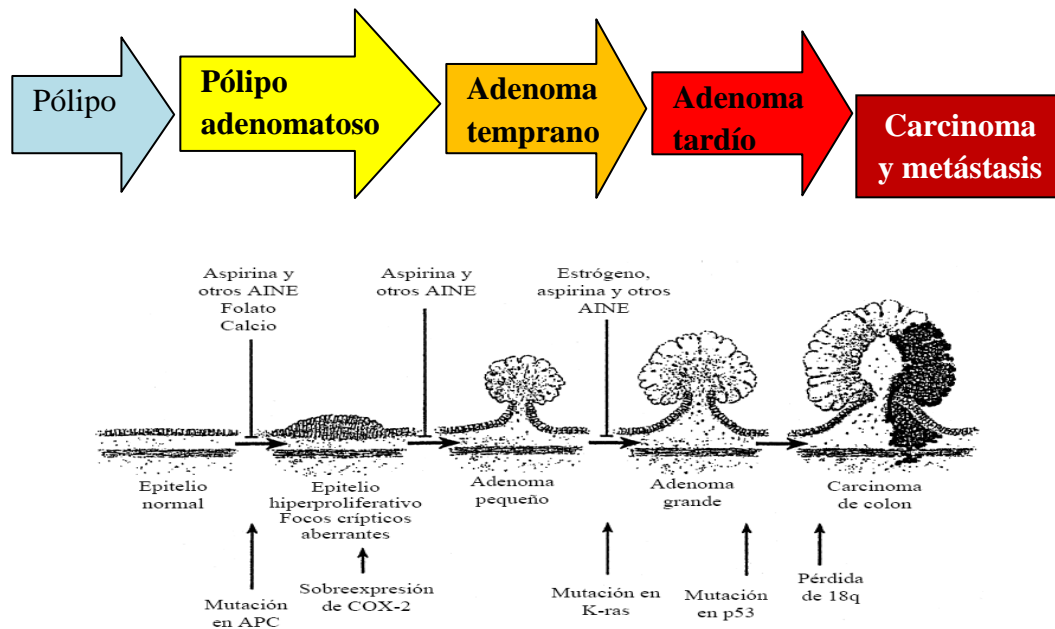


Figura 11. Formación de un carcinoma de colon. Los Antiinflamatorios no esteroideos (AINES) como la Aspirina está relacionado con la inhibición del desarrollo del tumor y también en la inhibición de factores que influyen en el desarrollo cancerígeno como la COX2. Las mutaciones en el desarrollo del tumor se van produciendo en diferentes genes que promueven el desarrollo del cáncer colorrectal como: la APC, Kras y la p53. Fuente: Casimiro C., 2002.

La enfermedad se va desarrollando a lo largo del tiempo, en caso de no ser detectada en etapas tempranas la luz del intestino puede llegar a acortarse, etapa en la cual la enfermedad se torna más peligrosa. Puede transcurrir hasta 10 años antes de que un

pólipo benigno se transforme en un pólipo maligno. Con el transcurso del tiempo los pólipos sufren alteraciones genéticas celulares que implican la formación del cáncer. El principal problema del CCR es el diagnóstico tardío de la enfermedad debido a que el paciente realiza la consulta en etapas ya avanzadas del cáncer. Los síntomas del CCR pueden ser clasificados en tres grupos, de acuerdo a la región colónica en la que se encuentre:

- **Cáncer de colon derecho.**- diarrea crónica, sangrado microscópico, anemia hipocroma, astenia, adinamia, anorexia, edema, se puede percibir una masa palpable en el cuadrante de la fosa iliaca derecha, presencia de dolor localizado. En caso de compromiso duodenal existe vómitos alimentarios y biliosos.
- **Cáncer de colon izquierdo.**- constipación, diarrea, alteración de las heces fecales, sangre macroscópica en las deposiciones, dolor abdominal tipo cólico que desaparecen con la evacuación de gases.
- **Cáncer de recto.**- proctorragia, sensación de defecación incompleta, dolor pelviano bajo, anormalidades en las heces fecales e incremento de la frecuencia de evacuaciones (Jensen B. C., 2008).

Dentro de los modelos etiológicos del cáncer colorrectal se encuentran los siguientes:

- **CCR Esporádico**, cuando la persona es diagnosticada con la enfermedad y no tiene ningún antecedente familiar de cáncer.
- **CCR Hereditario**, relacionado con genes mutados que han sido transmitidos por un familiar (Cruz-Bustillo C. D., 2004).

Dentro del desarrollo del CCR existen diferentes vías que dan lugar a la enfermedad:

- **La vía supresora o tradicional**

En esta vía existe una alteración de los protooncogenes y genes supresores de tumores. Los genes que presentan una mayor alteración y que dan lugar al CCR son: **la p53, K-**

Ras y APC (Cárdenas C. W., 2006), el más frecuente es el gen sarcoma de rata Kirsten viral oncogén homólogo (KRAS).

- **La vía genética o mutadora**

Dentro de esta vía se encuentran involucrados los genes MMR, las mutaciones genéticas dentro de estos genes dan lugar a una enfermedad hereditaria, una gran cantidad de mutaciones se producen en los genes MLH1 y MSH2. El síndrome de Lynch también llamado CCHNP, es una enfermedad hereditaria causada por alteraciones en los genes de reparación. En el síndrome de Lynch ambos sexos tanto femenino como masculino corren el mismo riesgo de ser afectados (The University of Texas MD Anderson Cancer Center, 2008; Roa S. J. C. y col., (2008).

- **La vía epigenética**

Esta vía se caracteriza por las metilaciones que se producen en el ADN y las modificaciones de histonas, ambos mecanismos están involucrados en la modulación de complejos remodeladores de la cromatina. Como consecuencia de las metilaciones los genes no se llegan a transcribir (García R. R. y col., 2012).

4.2.5 Los Estadios en el Cáncer Colorrectal

Es necesario saber los estadios del cáncer colorrectal ya que de acuerdo a esto se tomará decisiones en el tratamiento y además es útil como referencia para el diagnóstico de laboratorio. En las tablas 2 y 3 se puede observar la clasificación de los estadios utilizados en el diagnóstico del cáncer colorrectal (Guía clínica del cáncer colorrectal del Hospital Reina Sofía, 2005; Guías de práctica clínica en cáncer de Cataluña, 2008).

Tabla 2. Clasificación de los estadios en el que se encuentra el tumor y la invasión de la misma.

Fuente: Guías de práctica clínica en cáncer de Cataluña, 2008.

Categoría T (Tumor Primario)	
Estadio	Invasión
Tx	No se puede valorar el tumor primario
T0	No hay indicios de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ intraepitelial
T1	Tumor que invade la submucosa
T2	Tumor que invade la capa muscular
T3	Tumor que invade, a través de la capa muscular, la subserosa
T4	Tumor que invade directamente otros órganos y estructuras
Categoría N (Ganglios Linfáticos Regionales)	
Nx	No se pueden valorar los ganglios regionales
N0	Sin metástasis ganglionares regionales
N1	Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos regionales
Categoría M (Metástasis)	
Mx	No se puede valorar la presencia de metástasis a distancia
M0	No se detectan metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
Agrupación por estadios	
0	Tis N0 M0
I	T1-2 N0 M0
IIA	T3 N0 M0
IIB	T4 N0 M0
IIIA	T1-2 N1 M0
IIIB	T3-4 N1 M0
IIIC	Cualquier T N1 M0
IV	Cualquier T, Cualquier N M1

Tabla 3. Clasificación de Dukes modificada. Fuente: Paredes C. A. y col., 2004.

Estadio	Invasión
Estadio A	Extensión limitada a la mucosa
Estadio B1	Compromiso hasta la muscular propia
Estadio B2	Penetración completa de la muscular propia, comprometiendo grasa pericolónica
Estadio C1	Igual que B1 más presencia de ganglios linfáticos metastásicos.
Estadio C2	Igual que B2 más presencia de ganglios linfáticos metastásicos
Estadio D	Infiltración de órganos vecinos y/o metástasis a distancia

4.2.6 Diagnóstico del Cáncer Colorrectal

La Endoscopia

Los avances de la tecnología han contribuido en gran medida al diagnóstico de las enfermedades, una de las técnicas de gran utilidad en el diagnóstico de enfermedades digestivas es la endoscopia, con la cual se puede ver el interior del organismo mediante un instrumento denominado endoscopio, que consiste en un tubo delgado que tiene una pequeña cámara en un extremo, mediante la cual el manipulador puede observar las imágenes del interior del cuerpo en el monitor de una computadora. Existen diferentes tipos de endoscopios que permiten observar distintas partes del organismo; el colonoscopio se utiliza para ver el interior del intestino grueso y el sigmoidoscopio se utiliza para ver estructuras del recto y el colon sigmoideo (American Cancer Society, 2015).

Las nuevas herramientas son de gran ayuda al momento de diagnosticar una patología. La colonoscopia es una técnica con una sensibilidad de más del 90%, esta técnica permite observar imágenes de alta definición sobre lesiones del intestino grueso, de tal modo que esta técnica se han convertido en una herramienta que permite realizar diagnósticos de alta calidad, seguridad y eficiencia (Hernández G. A., 2013). Sin embargo, cuando el diámetro de los pólipos es muy pequeño, menor a 1 mm, existe la posibilidad de que pasen desapercibidos (World Gastroenterology Organisation, 2007). Otro riesgo de la endoscopia es la infiltración de microorganismos al interior del cuerpo sobre todo patógenos oportunistas (Manual de prevención de infecciones en procedimientos endoscópicos, 2008). La limpieza del equipo debe realizarse de la mejor manera posible utilizando soluciones que permitan eliminar los patógenos existentes en el equipo. Tanto el equipo como los materiales de limpieza deben ser los adecuados para llegar a realizar un diagnóstico óptimo y evitar riesgos de transmitir los patógenos (OLYMPUS, 2013).

Algunas recomendaciones al momento de realizarse una colonoscopia son:

- Preparado de dos días con dietas solo líquidas
- Beber abundante agua
- No consumir lácteos ni bebidas coloreadas
- Realizar una limpieza del colon con la ayuda de enemas

(Ospina N. J. y Villamizar S. J., 2010)

Otras técnicas de diagnóstico

Entre los estudios que se pueden realizar en el CCR se encuentran:

- **La Tomografía computarizada**, es un estudio de radiografía que permite tomar imágenes transversales del cuerpo permitiendo saber si el CCR se ha propagado a otros órganos.
- **La Ecografía**, en este estudio se utilizan ondas sonoras y ecos que producen imágenes en los órganos internos, es utilizada para detectar tumores en la región del abdomen a excepción del colon, sin embargo, se pueden utilizar dos tipos especiales de ecografías para la detección de CCR: la ecografía (ultrasonido) endorrectal y la ecografía intraoperativa.
- **La Resonancia magnética**, técnica en la que se utiliza ondas de radio e imanes potentes, puede ser utilizada en la detección de cáncer rectal y ver si el tumor se ha diseminado a estructuras adyacentes.
- **La Radiografía de Tórax**, es utilizada para ver si existe propagación en los pulmones.
- **La Tomografía por emisión de positrones**, en esta técnica se utiliza un azúcar radiactivo conocido como flúor desoxiglucosa. La radiactividad es muy baja, es utilizada para ver si existe diseminación en otras áreas del cuerpo de manera general.
- **La Angiografía** es utilizada para examinar presencia de vasos sanguíneos.

(American Cancer Society, 2014).

Marcadores Séricos

- CEA

El Antígeno Carcinoembrionario se encuentra presente en la superficie celular en el cáncer de colon y en otros tumores del tracto digestivo, puede encontrarse en circulación sanguínea, es utilizado en el seguimiento del cáncer colorrectal, pero, no puede ser utilizado como un marcador de diagnóstico en el screening de pacientes sanos (Brunner N. y col., 2013; Locker G. Y. y col., 2006).

- CA 19.9

El CA 19.9 es el antígeno sializado del grupo sanguíneo Lewis (CA 19.9), este marcador puede ser utilizado en el seguimiento de cáncer pancreático y cáncer colorrectal, sin embargo no se recomienda la utilización de CA 19.9 en el seguimiento de cáncer colorrectal de forma individual ya que su expresión no se limita a este tejido (Brunner N. y col., 2013; Locker G. Y. y col., 2006).

4.2.7 La Citoqueratina 20 (CK-20)

En la actualidad se realizan estudios de marcadores que puedan coadyuvar en el seguimiento de la enfermedad, una de las técnicas que se está utilizando es la Reacción en Cadena de la Polimerasa y sus variantes, esta técnica es altamente sensible ya que detecta cantidades mínimas de ADN (en el orden de los nanogramos) lo cual es útil para detectar células circulantes que no sean comunes del tejido, en este caso la presencia de CK-20 en sangre y también en tejido linfático.

El citoesqueleto celular está conformado por microfilamentos de actina, microtúbulos de tubulina y filamentos intermedios (Aquino P. C. y Jurado S. F., 2008). Los filamentos intermedios son utilizados en el diagnóstico de enfermedades y en la actualidad se realizan estudios para coadyuvar el seguimiento del cáncer por ejemplo la CK-20 para el

diagnóstico de micrometástasis. Los filamentos intermedios pueden expresarse en diferentes tipos celulares, de ahí la importancia que tienen las queratinas para ser utilizadas en el seguimiento del cáncer (Tabla. 4).

Tabla 4. Clasificación de los Filamentos intermedios. Fuente: Aquino P. C. y Jurado S. F., 2008.

Tipo	Filamento intermedio	Localización
I	Queratina acidas	Epitelio
II	Queratinas básicas	Epitelio
III	Vicentina	Células mesenquimatosas y embrionarias.
	Desmina	Musculo liso y miocardio
	Periferina	Neuronas
	Proteína fibrilar glial acida	Astroцитos y células gliales
IV	Neurofilamentos (I, M, H) a-internexina	Neuronas
V	Laminina	Células nucleadas
VI	Nestina	Neuroepitelio, musculo estriado, células madre.

Entre las queratinas se pueden diferenciar 20 tipos (K1, K2... K20). Las 8 primeras queratinas son básicas y las restantes son acidas. Las citoqueratinas son utilizados como biomarcadores para la detección de cáncer (Cruz T. P. y col., 2008). La CK-20 es una proteína ácida tipo I de 46 KDa (Cid M. P. y col., 2002) y se encuentra expresada principalmente en el epitelio gastrointestinal, urotelio y células de merckel (Cantos S. B. y col., 2006).

4.3 Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (CCHNP), Síndrome de Lynch

Alfred Warthin, patólogo de la Facultad de Medicina de Michigan, en 1913 publicó un árbol genealógico que estaba basado en la familia de su costurera, a quien predijo que moriría con algún tipo de cáncer porque tenía antecedentes familiares con cáncer y fue así. Esta familia fue denominada la Familia G (Scott W. A., 1925). En 1971 Henry T. Lynch, actualizó la información de la familia G y también realizó estudios en dos familias estadounidenses (familia N y M), de ahí el nombre de síndrome de Lynch (Fig. 12 y 13) (Lynch H. T., 2006; Lynch H. T. y Krush A. J., 1971).

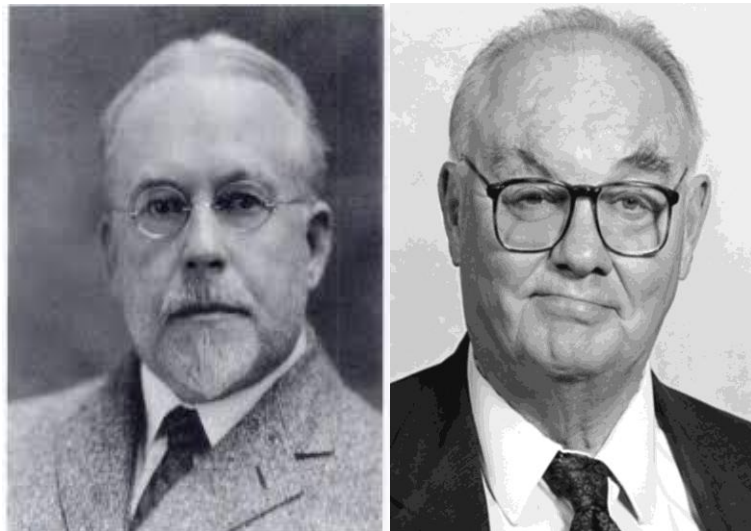


Figura 12. Aldred Scott Warthin, Henry T. Lynch. Fuente: www.google.com.bo/search?q=Aldred+Warthin&rlz

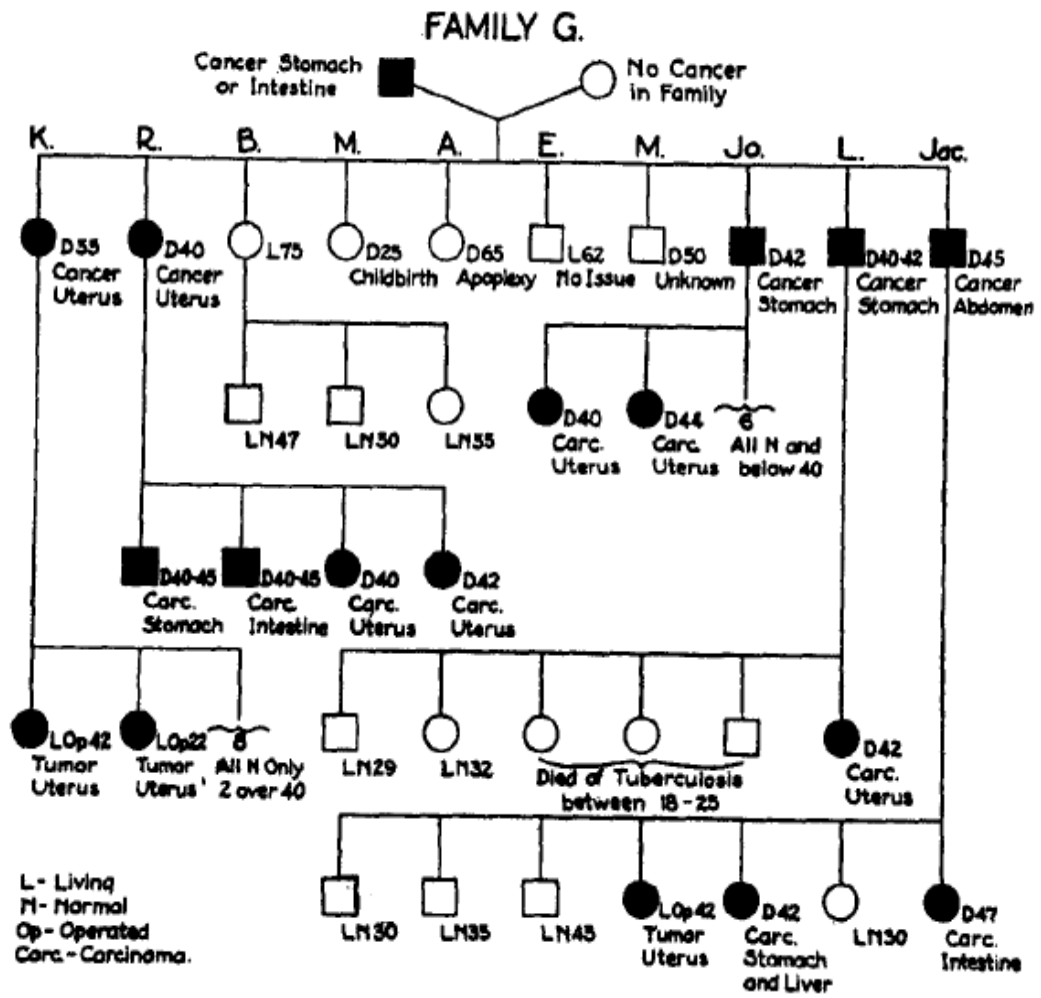


Figura 13. Pedigrí de la familia G, en negro se puede observar los familiares que tuvieron cáncer y las edades a las cuales se diagnosticó la enfermedad. Árbol genealógico según Alfred Scott Warthin, 1925.

Posteriormente se realizaron diferentes tipos de estudios que aportaron al conocimiento de la enfermedad hereditaria. Se realizó estudios donde se identificó la importancia de los microsatélites, y se describió un locus en el cromosoma 2p15-16 en el que se encontraba un gen que predisponía a padecer el síndrome de Lynch, un segundo locus que se hallaba en el cromosoma 3p21 estaba relacionado con los genes MMR que tienen una función de identificación y reparación de errores de bases desapareadas (Thorson A. G. y col., 1999).

4.3.1 Fundamento de CCHNP

El CCHNP, también llamado síndrome de Lynch, es una enfermedad hereditaria que se transmite de forma autosómica dominante y forma parte del 3% de los casos de CCR. La característica de esta enfermedad es que se relaciona con otros tipos de cáncer como el cáncer de endometrio, ovárico, gástrico, urotelial, de intestino delgado y carcinoma biliar ya que la alteración de los genes involucrados en el cáncer colorrectal hereditario también se encuentran en los tipos de cáncer mencionados (Jarvinen H. J. y col., 2009).

Las mutaciones causantes del CCHNP se encuentran en los genes MMR. Para la determinación de mutaciones dentro de estos genes se utilizan los marcadores de MSI, la MSI se produce por un aumento o disminución de secuencias cortas repetidas (STRs, short tandem repeats) del ADN, esta MSI también nos indica una acumulación de mutaciones en los genes encargados de la regulación celular los cuales juegan un rol importante en la iniciación y progresión del cáncer (Wijnen J. y col., 1997; Dominguez M. V. y col., 2009).

Para la determinación del CCHNP se utiliza los criterios de Amsterdam que nos indican las características que debe tener un paciente para llegar a desarrollar la enfermedad, así también, los criterios de Bethesda incluyen el diagnóstico histopatológico de la enfermedad (Tabla 5) (Den Bakker M. A. y col., 2003).

Tabla 5. Criterios de Amsterdam y Bethesda. Fuente: Alonso S. A., 2006

Criterios de Amsterdam I	Criterios de Amsterdam II	Criterios de Bethesda
Tres familiares con cáncer colorrectal, uno de ellos en primer grado de parentesco con los otros dos.	Tres familiares con cáncer asociado a CCHNP* (colorrectal, endometrial, intestino delgado, uréter o pelvis renal), uno en primer grado de los otros dos.	1. Cáncer colorrectal diagnosticado antes de los 50 años.
Al menos 2 generaciones afectadas.	Al menos 2 generaciones afectadas.	2. Cáncer colorrectal u otro cáncer asociado a CCHNP* sincrónicos o metacrónicos, sin tener en cuenta la edad.
Al menos 1 cáncer colorrectal diagnosticado antes de los 50 años.	Al menos 1 cáncer diagnosticado antes de los 50 años.	3. Cáncer colorrectal con morfología de alta MSI (caracterizada por la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor, carcinoma con diferenciación mucinosa o en anillo de sello, reacción linfocitaria peritumoral tipo Crohn-like, patrón de crecimiento medular) antes de los 60 años.
Poliposis excluida.	Poliposis excluida.	4. Cáncer colorrectal con uno o más familiares en primer grado con cáncer colorrectal u otro cáncer relacionado con CCHNP*, uno de los cánceres diagnosticado antes de los 50 años.
		5. Cáncer colorrectal con dos o más familiares con cáncer colorrectal o cánceres asociado a CCHNP*, sin tener en cuenta la edad
* Incluye endometrio, ovario, gástrico, intestino delgado, tracto urinario, tracto biliar, páncreas, cerebro y glándula sebácea.		

Los Genes de Reparación

El CCHNP es producido por mutaciones en la línea germinal que son transmitidas de generación en generación. La mayor parte de las mutaciones se producen en los genes de reparación MLH1 y MSH2 y con menor frecuencia en los genes MSH6 y PMS2. Las mutaciones producidas dentro de los genes de reparación conllevan a una incapacidad de reparar errores producidos durante la replicación (Herman J. G. y col., 1998; Kane M. F. y col., 1997).

- Mecanismo de Reparación

El MSH2 forma un heterodímero con el MSH6 (mutS homolog 6) que es conocido también como MutS α y el MSH2 unido con el MSH3 forman el heterodímero MutS β , estas reconocen pequeñas y grandes deleciones e inserciones respectivamente. El MLH1 se une con PMS2 (segregación postmeiotica 2) este heterodímero se une al complejo MutS α o MutS β , todo el complejo se desplaza por la secuencia del ADN y van reparando los errores existentes en la secuencia. Los complejos que han sido menos estudiados en comparación con los ya mencionados son los complejos hMLH1- hPMS1 y hMLH1-hMLH3 que se unen al complejo MutS α o MutS β , debido a que las mutaciones dentro de estos genes tienen una baja penetrancia en el desarrollo del cáncer (Vaish M., 2007; Yang Q. y col., 2004). La disfuncionalidad de estas proteínas se ven involucradas en fallas dentro de los mecanismos reguladores del ciclo celular, conllevado a la formación del cáncer (Fig. 14) (Talseth P. B. y col., 2010).

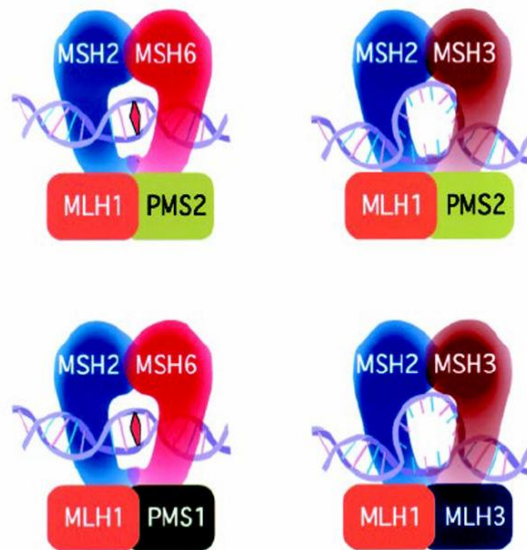


Figura 14. Complejos de Enzimas de reparación del ADN. Fuente: Talseth P. B. y col., 2010

La presencia de MSI es utilizada como un marcador para determinar mutaciones dentro de los genes de reparación (Wagner A. y col., 2003)

Inestabilidad Microsatelital

Los microsatélites, conocidos también como STRs, son secuencias de ADN repetidas de uno hasta seis bases, forman secuencias arriba de 100 nucleótidos, se encuentran localizados en todo el genoma y constituyen aproximadamente el 3% del genoma humano (Fan H. y Chu J., 2007).

Los microsatélites se clasifican de acuerdo al tipo de repeticiones que presentan:

- Los de estructura simple son aquellas que tienen una misma secuencia de repetición. Por ejemplo: **ATGATGATGATGATGATGATGATGATG.**
- Los de estructura compuesta son repeticiones similares y solo varían en un nucleótido. Por ejemplo: **CAATCAATCAATCAAGCAAGCAAG.**
- Los de estructura compleja presentan distintos tipos de repeticiones de diferente tamaño y secuencia. Por ejemplo: **CAATCAATCAAGCAAGGCACACAAT**
(Paredes L. M., 2014).

La MSI fue descrita en el cáncer colorrectal. Alrededor del 90% de CCHNP presentan MSI causada por una mala función de los genes de reparación (Ou C. Y. y col., 1999). La MSI es utilizada en la determinación de mutaciones dentro de los genes MMR (Suwa K. y col., 1999).

Existen diferentes mecanismos que explican los errores dentro de los microsatélites, como por ejemplo: los errores producidos durante la recombinación genética, el crossin-over desigual, el slippage de la ADN polimerasa durante la replicación o reparación. Estas fallas dentro del material genético pueden dar lugar a un aumento o disminución de nucleótidos en el microsatelite, estos errores son reparados por los genes de reparación, si existe mutación dentro de los genes de reparación se produce una MSI (Fig. 15) (Oliveira E. J. y col., 2006).

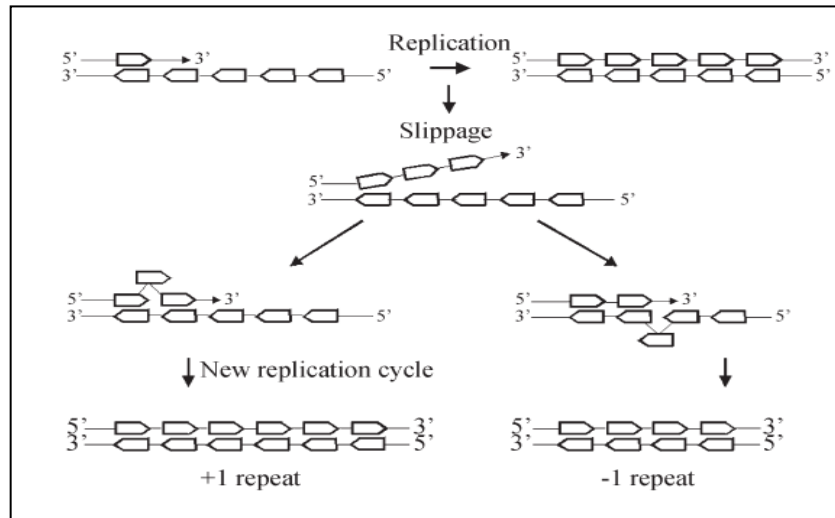


Figura 15. Resbalamiento durante la replicación del DNA. En el momento de la replicación la DNA polimerasa puede añadir más o menos nucleótidos en la secuencia repetitiva del microsatélite, estos errores son reparados por los genes MMR, si existe una alteración dentro de estos genes el error persiste y es denominado inestabilidad microsatelital. Fuente: Oliveira E. J. y col., 2006.

- Marcador Bat 25

Los marcadores que se utilizan para diagnosticar MSI en el síndrome de Lynch son los recomendados por el panel de Bethesda en 1997: BAT-25, BAT-26, D2S123, D5S346, y D17S250, los más utilizados son el BAT-25 y el BAT-26.

El marcador BAT-25 se encuentra en el gen c-kit localizado en el cromosoma 4 (4q11-12), la secuencia de este marcador contiene de 7 a 25 Timinas. El Bat-25 es el alelo más común, se reportó casos en los que existe ausencia o adición de 1 hasta 2 nucleótidos dentro de la secuencia nucleotídica del microsatélite.

4.4 Diagnóstico molecular del cáncer colorrectal – La Reacción en Cadena de la Polimerasa

Con el transcurso del tiempo la tecnología va mejorando y contribuyendo cada vez más a las necesidades del ser humano, una de las técnicas que se ha utilizado para realizar diferentes tipos de estudios dentro del área de la Biología Molecular, es la Reacción en Cadena de la Polimerasa, conocida también como PCR (por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction). La PCR es una herramienta muy útil en los estudios sobre cáncer (Arredondo P. R., 1993).

La PCR es utilizada con frecuencia en diferentes áreas de la medicina, fue descrita por Kary Mullis en el año 1983. Por sus estudios sobre la PCR, este investigador recibió el premio Nobel en el año 1993 (Pinilla B. G. y col., 2008). En el año 1989 la revista Science nombró a la enzima “DNA polimerasa” como la molécula del año, por su utilidad y el empleo de la misma en una gran cantidad de investigaciones (Catasús L. y Matias Guiu, X., 1997).

Años antes (1970) la síntesis de ADN fue descrita por Kleppe K. y colaboradores, estos investigadores describieron de forma detallada como lograr sintetizar ADN a partir de otra copia, el problema principal fue, el no haber utilizado una enzima termoestable que permitiera amplificar una gran cantidad de ADN (Kleppe K. y col., 1971).

Extracción de ADN

En la actualidad existen una gran cantidad de técnicas para extraer el material genético de las células, todas estas técnicas tienen como fundamento romper la membrana celular y poder aislar el material genético.

Los kits de extracción de las empresas tienen como principio utilizar columnas de intercambio iónico que permiten aislar el material genético en una columna que está cargada positivamente al cual el material genético se va adhiriendo ya que se encuentra

cargado de forma negativa. Posteriormente el material genético suspendido en la columna, es lavado con tampones y resuspendido en un buffer que mantiene la estabilidad.

Cuantificación de material genético

Después de la extracción del material genético, se procede con la cuantificación de la misma. Uno de los equipos que actualmente se utiliza es el Qubit en el cual se emplea un fluoróforo que se intercala en el material genético (ADN o ARN). La fluorescencia emitida es captada por el equipo y es proporcional a la concentración obtenida en la extracción.

Fundamento de la PCR

La PCR es una técnica que se usa para la amplificación de un fragmento de ADN. La amplificación comienza con una cadena molde de ADN de la cual se formaran dos copias idénticas a la anterior, la concentración de ADN se eleva exponencialmente y es representada por la formula “ 2^n ” (donde n representa el número de ciclos utilizados en la PCR), por ejemplo, si utilizamos 5 rondas de amplificación 2^5 el resultado para 1 fragmento de ADN serían 32 copias, pero, en una extracción de ADN no solo tenemos 1 copia, de este modo la cantidad de ADN que se obtiene en una PCR es grande. Debido a que la PCR consiste en la duplicación de ADN esta puede ser considerada como una replicación in vitro (Fig. 16).

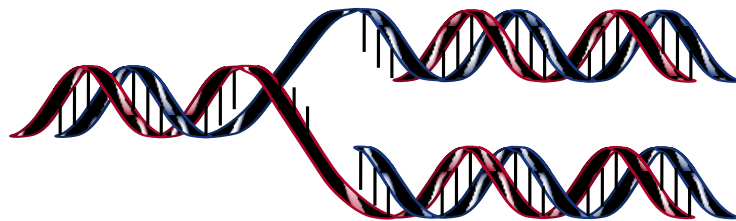


Figura 16. La PCR puede ser considerada como una replicación in vitro debido a la inducción de duplicación de material genético (ADN).

Fases de la PCR

La PCR tiene tres fases principales que son:

- Desnaturalización

Etapa en la que por acción del calor, la doble cadena de ADN se rompe para dar lugar a dos simples cadenas. Las temperaturas utilizadas en esta etapa oscilan entre los 92°C y 95°C temperaturas a las cuales la estructura secundaria del ADN se separan para poder dar lugar a la duplicación in vitro (Fig. 17) (Torres T. A. y Eugenia B. B., 1995).

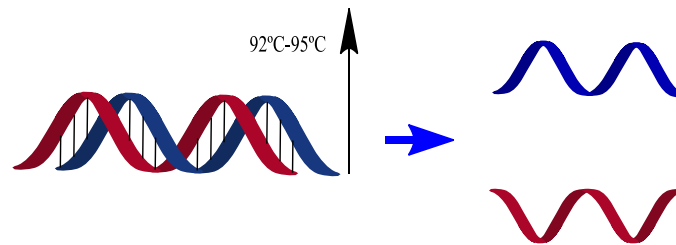


Figura 17. Etapa de desnaturalización

- Hibridación

Es la etapa en la cual los cebadores se alinean con la secuencia de ADN, las temperaturas que se utilizan están entre 40°C y 60°C de acuerdo a la T_m de los cebadores (Fig. 18) (Espinosa A. L. 2004).

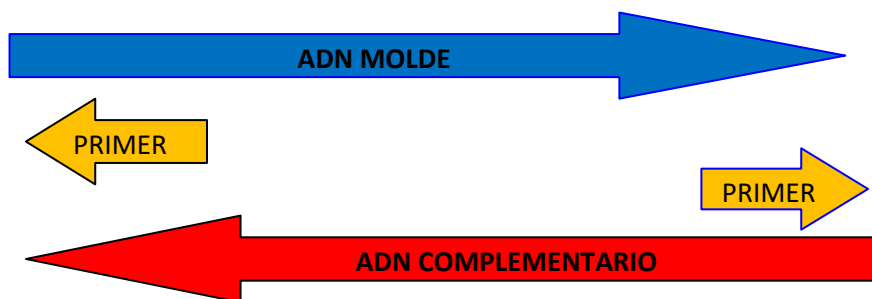


Figura 18. Hibridación de los primers en la cadena de ADN

- **Elongación**

Etapa en la que la enzima termoestable comienza con la formación de una copia del ADNss (ADN simple cadena), la temperatura comúnmente utilizada en esta etapa es de 72°C ya que a esta temperatura la enzima tiene mayor funcionalidad (Fig. 19) (Tamay de Dios L. y col., 2013).

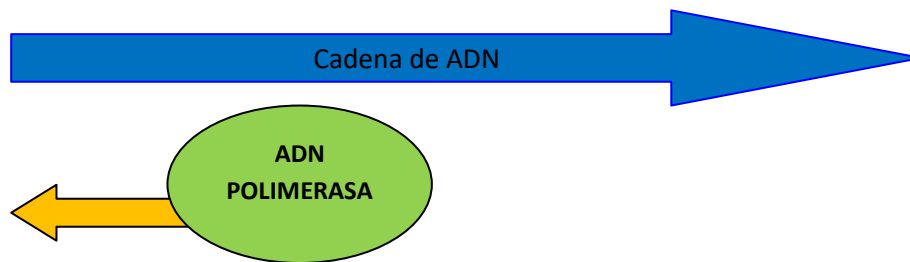


Figura 19. Fase de elongación en la que la enzima actúa para dar lugar a una cadena complementaria.

El equipo que se utiliza para los cambios de temperatura es el termociclador, que nos permite programar diferentes tipos de temperatura (Fig. 20).

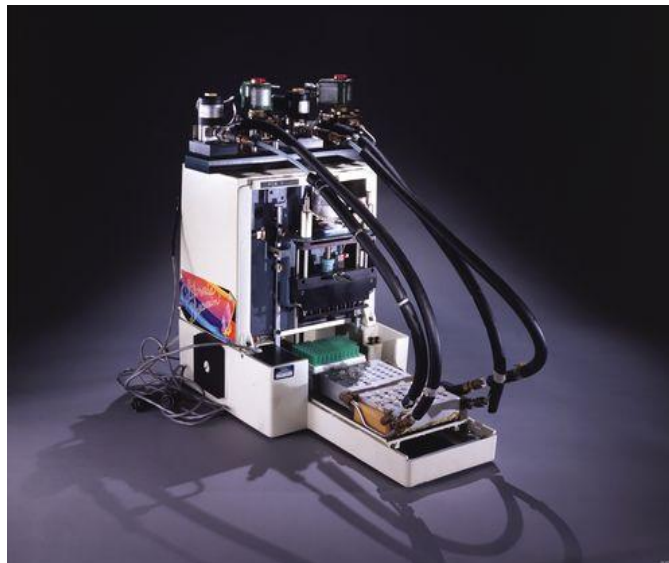


Figura 20. Primer termociclador construido por Kary Mullis y su equipo en la compañía Cetus en 1985. Fuente: blogs.20minutos.es/ciencias-mixtas/2014/10/21/el-inventor-de-la-pcr-y-su-mapache-alienigena/.

Este equipo funciona mediante el sistema peltier, que consiste en placas semiconductoras en las que se produce una variación de temperatura, a causa del movimiento de electrones de mayor y menor velocidad (Sandoval G. A., Espinosa J. E., Barahona A. J., 2008).

Componentes de la PCR

Los componentes más importantes en la PCR son:

- Cebadores

El resultado óptimo de la PCR depende mucho del diseño correcto de los cebadores, los cuales darán lugar a la formación de una nueva cadena de ADN. Algunas reglas que se deben seguir en el diseño de los cebadores o primers son las siguientes:

- Los cebadores pueden tener una longitud aproximada de 18-24 bases.
- El contenido de Guanina y Citosina debe ser entre 40 y 60%.
- Los cebadores deben tener una temperatura melting (T_m) similares, la T_m es la temperatura a la cual el 50% de la secuencia de ADN se encuentra desnaturalizado, esta temperatura es importante en la PCR para la hibridación de los cebadores al ADN.
- Se debe prevenir la formación de estructuras secundarias entre los cebadores.
- Evitar las repeticiones de nucleótidos.

La concentración de los cebadores que se utilizan en la PCR está en el rango de 0.05 a 1 μ M (Arredondo P. R., 1993), la concentración elevada de cebadores puede producir resultados inespecíficos, se debe considerar esto al momento de optimizar la PCR. Es necesario calcular la T_m de los cebadores para poder utilizarlos (optimización) en la fase de hibridación. Se pueden usar las siguientes fórmulas para la determinación de la temperatura melting:

- $T_m = 2^\circ\text{C} (A + T) + 4^\circ\text{C} (G + C)$

En la cual se asume una concentración de sal 0.9 M

- $T_m = 81.5 + 0.41 (\%GC) - 500/L + 16.6 \log[M]$

En donde L es la longitud de oligonucleótidos y M es la concentración de cationes monovalentes, esta fórmula puede aplicarse cuando los oligonucleótidos son largos.

- $T_m = (\Delta H/\Delta S + R \ln C) - 273.15$

Esta fórmula se basa en un análisis termodinámico, probablemente sea la forma más exacta de calcular la Temperatura de fusión de los cebadores ΔH es la variación de entalpia, ΔS es la variación de la entropía, R es la constante de los gases (1.987 cal.K-1mol-1), y C es la concentración molar de los oligonucleótidos (Cortazar M. A. y Silva R. E., 2004).

En la actualidad existen diversos tipos de programas informáticos que nos ayudan a diseñar cebadores, calcular temperaturas, etc. de tal manera que la PCR se realice de manera eficiente (Martin G. E. 2015).

- **Enzima polimerasa**

En la PCR es necesaria una enzima que actúe en la catalización de la amplificación de ADN. Anteriormente se utilizaba el fragmento “Klenow” de la enzima de *Escherichia coli*, la cual es un ADN termolábil que a temperaturas mayores de 94°C pierde su función. Debido a este inconveniente se buscó una enzima que sea capaz de resistir temperaturas elevadas, razón por la que se utilizó la DNA polimerasa termoestable obtenida a partir de *Thermus aquaticus* también conocida como Taq. Existen otros tipos de Taq las cuales han sido mejoradas mediante ingeniería genética (Dorado P. G. 2015). La concentración de la Taq polimerasa en la PCR es de 1 a 2,5 U/μL (Catasús L. y Matias Guiu, X., 1997).

- **Cloruro de magnesio**

La presencia de cationes divalentes en la PCR es muy importante ya que actúan de diferentes formas:

- Permite que los desoxinucleósidos Trifosfato (dNTPs) ingresen a la cadena de ADN en forma de desoxinucleósidos Monofosfatos (dNMPs).
- Los fosfatos liberados actúan como una forma de energía, la cual es proporcionada a la PCR.
- Actúan como activadores de la Taq polimerasa.

La concentración que se utiliza en la PCR es de 0.5 a 5mM. Cuando el magnesio se encuentra en bajas concentraciones provoca un bajo rendimiento de la PCR, en cambio cuando las concentraciones son elevadas puede formarse productos inespecíficos.

- **Nucleótidos.**

Los dNTPs (desoxinucleosidos trifosfatos) son los ladrillos de construcción de la cadena de ADN, se van incorporando según la Taq polimerasa avanza a lo largo de la cadena molde de ADN, la concentración de los dNTPs utilizados en la PCR es de 20 a 200uM si la concentración de los dNTPs es mayor a 50mM puede llegar a inhibir la actividad de la ADN polimerasa (Arredondo P. R., 1993).

- **Buffer de PCR**

La solución amortiguadora más utilizada es el Tris-HCl, KCl, debido a la mayor estabilidad que esta mezcla confiere a la solución para que se lleve a cabo la reacción. En la PCR, generalmente se parte de una solución concentrada 10 veces (10X) (Rodríguez S. I. y Barrera S. H., 2004).

- **Otros Aditivos**

Formamida: puede utilizarse en una concentración de 1% a 5%, nos permite estabilizar la estructura secundaria del ADN.

BSA (Bovine Serum Albumin): la albumina sérica bovina es utilizada para captar inhibidores de la Taq polimerasa, se usa en concentraciones mayores a 0.8 µg/µL.

DMSO (Dimetil Sulfoxido): permite reducir las estructuras secundarias, se lo utiliza en casos de que exista una gran cantidad de GCs, la concentración que se utiliza es de 2 y 10%, mayores concentraciones pueden llegar a inhibir la función de la taq polimerasa (Espinosa A. L., 2004).

4.5 PCR cuantitativa o PCR en tiempo real (qPCR)

Dentro de la investigación de cáncer, una técnica innovadora es la PCR en tiempo real, tiene diversas aplicaciones que pueden utilizarse en el estudio del cáncer de colon.

La qPCR es una técnica derivada de la PCR convencional, fue descrita por Higuchi y colaboradores grabando la formación del ADN con la ayuda de agentes intercalantes. Se lo denomina qPCR porque se detecta la amplificación del ADN conforme transcurre la PCR. También es útil porque proporciona la concentración de ADN que se ha llegado a obtener previa calibración del equipo según las copias que se obtengan, los datos pueden ser analizados mediante una computadora sin ser necesario realizar la corrida electroforética, por lo tanto se reduce el riesgo de contaminación del análisis (Tamay de Dios L. y col., 2013). El equipo de PCR en tiempo real puede observarse en la figura 21.



Figura 21. Equipo de PCR en tiempo real Step One Plus de Life Technologies.

Según el método que se utilice tenemos dos opciones de químicas, las no específicas y las específicas:

- **Químicos no específicos**, se usan agentes intercalantes que se unen al ADN de forma general, en ausencia de ADN no emiten fluorescencia, en presencia de ADN se unen al surco menor de la cadena y la fluorescencia emitida por estos agentes se incrementa hasta 1000 veces. El agente intercalante más utilizado es el fluoróforo Sybr Green, el problema del Sybr Green es que puede unirse a otras sustancias que se encuentren en la reacción como los dímeros de primers. Para evitar estos tipos de errores se debe tener mucho cuidado al momento de la optimización de la PCR. Una ventaja de Sybr Green, es que, nos permite observar la curva melting, temperatura en la cual se desnaturaliza por completo la cadena de ADN blanco (Vinueza B. C., 2009), es decir que T_m es única para cada secuencia, esta técnica se utiliza para observar amplificaciones inespecíficas.
- **Químicos Específicos**, siguen el principio “FRET” (Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente) que consisten en el uso de sondas de nucleótidos (secuencias cortas de nucleótidos), este método se divide en 2 grupos: los de hidrólisis y los de hibridación (Castro S. G., 2010).

De hidrólisis: Utilizan oligonucleótidos que se encuentran marcados con un fluoróforo reportero y un quencher o apagador, por ejemplo los fluoróforos reporteros; FAM, VIC, NED y los apagadores; TAMRA, BHQ, DABCYL. Cuando la DNA polimerasa se pone en contacto con la sonda, el reportero se libera y se produce la fluorescencia que va a ser captada por el equipo, en este grupo los más utilizados son las sondas Taqman, sondas Scorpions y Molecular Beacons (Aguilera P. y col., 2010).

De hibridación: se utiliza dos sondas, una lleva el reportero y la otra un apagador, en este caso las sondas se hibridan en la secuencia blanco donde los dos fluoróforos se encuentran adyacentes, la fluorescencia es emitida cuando ambas son liberadas (Castro S. G., 2010).

4.6 PCR-TR (PCR con Transcripción Reversa)

El ADN está compuesto por regiones codificantes y no codificantes de proteínas, las regiones codificantes son transcritas en un ARN, por lo tanto si realizamos una retro transcripción del ARN solo se obtiene ADN de las regiones codificantes y no así de las regiones que no codifican, de esta forma la calidad del material genético con la que se trabaja es mucho mejor que si se trabajara con el ADN nativo (con regiones codificantes y no codificantes).

En la PCR-TR se trabaja con Ácido Ribonucleico (ARN), el cual es convertido en ADN y posteriormente amplificado. Los componentes utilizados en la transcripción reversa son:

- **Reversa Transcriptasa:** Es una enzima que nos permite convertir el ARN en ADN (Greif G. 2015).
- **Los Oligonucleótidos:** son necesarios para la transformación de ARN ya que actúan como cebadores, existen 3 tipos de cebadores que pueden ser utilizados en

la transcripción reversa: **los Hexámeros** (Random Primers) son secuencias cortas de 6 nucleótidos que se unen a sitios distintos del ARN obteniéndose una transcripción que contiene diferentes regiones del ADN. **Los Oligo-DT** son secuencias compuestas de varias timinas (de 12 a 18) que se unen a la cola de poliadeninas del ARN mensajero obteniéndose ADN sólo del ARN mensajero. Los **Oligonucleótidos específicos** son cebadores que se diseñan a partir de la secuencia blanco que se desee transcribir (Gómez L. E. 2011).

4.7 Nested PCR (PCR anidado)

Esta técnica es utilizada para aumentar la sensibilidad de la PCR, ya que se realiza dos rondas de ciclos: en la primera ronda se utiliza un par de primers que amplifica la región en la que se encuentra nuestro blanco, esto nos permite amplificar una gran cantidad de material genético (ADN). En la segunda ronda utilizamos el material amplificado en la primera ronda haciendo uso de otro par de primers lo que nos permitirá amplificar una región dentro de la región ya amplificada y de esta forma se obtiene una cantidad mayor de la región blanco que se esté buscando (Somma M. y Querci M., 2015).

5. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

5.1 Hipótesis

La CK-20 se encuentra en pacientes con EII y es considerada como un factor predisponente a padecer CCR.

La CK-20 es un marcador que puede ser empleado para determinar si el estilo de vida (hábito tabáquico, hábito alcohólico, alimentación) influye en la aparición de factores que predisponen a padecer CCR (EII).

La PCR en tiempo real que emplea el fluoróforo Sybr Green es una herramienta útil en nuestro medio para realizar un screening de pacientes que tienen predisposición a padecer síndrome de Lynch.

5.2 Objetivos

- Objetivo General

Determinar genética y molecularmente la predisposición a padecer cáncer colorrectal mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sus variantes: tiempo real y con transcripción reversa.

- Objetivos Específicos

- ❖ Optimizar la técnica de PCR con transcripción reversa (anidada) para determinar la presencia del marcador CK-20 en sangre periférica de pacientes con sintomatología compatible con cáncer colorrectal.
- ❖ Determinar si existe relación entre las EII y el CCR.
- ❖ Determinar en qué medida los hábitos nocivos del paciente (consumo de tabaco, bebidas alcohólicas, alimentos ricos en grasas) predisponen al desarrollo de cáncer colorrectal.
- ❖ Optimizar la técnica de qPCR (Real Time PCR o PCR cuantitativo) para determinar inestabilidad microsatelital (Bat 25).

6. METODOLOGÍA

6.1 Población de Estudio

Se trabajó con dos poblaciones:

Para la determinación de CK-20 en sangre periférica, se trabajó con un total de 90 pacientes: 82, que acudieron a la unidad de endoscopia del Instituto de Gastroenterología Boliviano Japonés de La Paz IGBJ, hospital Luis Uría de la Oliva (LUO) y Policlínico 9 de abril, y 8 voluntarios aparentemente sanos que solicitaron participar del proyecto. Las muestras se obtuvieron durante las gestiones 2014 y 2015.

- Controles positivos: Biopsias de 36 pacientes con anomalías en el epitelio intestinal (intestino grueso).
- Controles negativos: Sangre de 40 pacientes aparentemente sanos.

La segunda población estuvo conformada por 200 voluntarios: 61 familiares de pacientes con cáncer (mama, útero, colon) reclutados del Centro de Enfermedades Neoplásicas ONCOVIDA, 139 voluntarios que se encontraban expuestos a factores de riesgo: 1) agentes químicos (reclutados de las curtiembres Bonanza y Brangus) y 2) personas alcohólicas, fumadores y voluntarios sanos, en este último grupo también había 38 personas que tenían familiares con algún tipo de cáncer, totalizando un 49,5% con esta característica. A los 200 voluntarios se realizó el análisis de MSI (Bat25) y análisis genético mediante los criterios de Amsterdam. Las muestras fueron obtenidas en las gestiones 2014 y 2015.

Previo a la toma de muestra se realizó un cuestionario a los participantes del proyecto

6.2 Aspectos éticos

Esta tesis forma parte del proyecto “Implementación de pruebas moleculares para el diagnóstico precoz de cáncer de colon en el Instituto Gastroenterológico Boliviano

Japonés” el cual cuenta con el aval ético del Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Mayor de San Andrés (Anexo 1). Previo a la toma de muestra de sangre periférica se informó a los pacientes, en forma verbal y escrita, sobre el proyecto y se les solicitó firmar un conocimiento informado (Anexo 2).

6.3 Criterios de Inclusión

Para la obtención de sangre periférica: Pacientes con sintomatología compatible con CCR, familiares de pacientes con cualquier tipo de cáncer y voluntarios que accedieron a participar del proyecto.

Para biopsias: Pacientes que presentaban una anormalidad en el epitelio intestinal (pólipo).

6.4 Criterios de Exclusión

Se excluyeron a todos los pacientes que no dieron su consentimiento para participar en el presente trabajo.

Pacientes que se encontraban en tratamiento con fármacos.

6.5 Muestras

- Biopsias

Las biopsias fueron obtenidas por los gastroenterólogos especialistas en el área, estas biopsias fueron sólo de los pacientes que presentaban anormalidades en el epitelio intestinal observadas durante el transcurso de la colonoscopia y/o rectosigmoidoscopia. Las biopsias se almacenaron en EDTA-GUANIDINA a -20°C hasta su posterior procesamiento, estas muestras fueron utilizadas como controles positivos para la determinación de CK-20 por su expresión en el epitelio intestinal.

- **Sangre**

Para la determinación de CK-20 se extrajo 5mL de sangre:

2 mL de sangre total sobre 2 mL de EDTA-GUANIDINA conservadas a -20°C hasta su posterior procesamiento.

3 mL de sangre total obtenidos para separar el suero del paquete globular, el cual fue empleado en el análisis del marcador CA 19.9.

Para la determinación de MSI (BAT25):

2 mL de sangre sobre 2 mL de EDTA-Guanidina que se conservó hasta el momento del procesamiento a -20°C.

6.6 Métodos de laboratorio

Antes de iniciar con el procedimiento de trabajo para la determinación de CK-20 se realizó una revisión de los registros de la unidad de Histopatología del IGBJ (con autorización del jefe de la unidad), con la finalidad de observar la relación del CCR con las EIL.

6.6.1 Determinación del marcador CK-20 mediante la PCR con transcripción reversa (PCR-TR) anidada

Esta técnica fue utilizada para la determinación de CK-20 en sangre periférica. Los pasos efectuados fueron:

- **Análisis *in silico* de la PCR para CK-20**

Antes del análisis de laboratorio se realizó una PCR “*in silico*” de CK-20, obteniendo una corrida virtual de la PCR.

- **Extracción de ARN**

La extracción de ARN se realizó mediante el Kit PureLink® Viral ARN/ADN de Invitrogen tal como se describe a continuación:

Se procesó 200 µL de sangre total a la cual se le añadió 25 µL de proteinasa K para la desnaturalización de proteínas y 200 µL de solución de lisis (conteniendo 5.6 µg de carrier de ARN) para lisar las células presentes en la sangre extraída del paciente.

Se homogenizó la mezcla empleando un vortex y se llevó a incubación durante 15 minutos a 56°C. Al lisado se añadió 250 µL de etanol absoluto, la mezcla se homogenizó e incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.

La solución anterior se transfirió a una columna de intercambio iónico junto con un tubo colector y se centrifugó 3 minutos a 10 000 rpm.

Seguidamente se realizó dos lavados con 500 µL de buffer “W5” centrifugando durante 2 minutos a 10 000 rpm (en cada lavado). El excedente de buffer de lavado se eliminó mediante centrifugación de 3 minutos a 12 000 rpm. La columna se transfirió a un tubo estéril de microcentrífuga de 1,5 mL y se añadió 25 µL de Agua libre de RNasa (E3) y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Finalmente se centrifugó la columna a máxima velocidad por 1 minuto. El ARN obtenido se conservó a -20°C hasta su posterior procesamiento.

- **Cuantificación de ARN**

La cuantificación de ARN se realizó mediante el cuantificador Qubit (life technologies). Con este propósito, 5 µL de la muestra que contenía el ARN extraído se mezclaron con 195 µL de buffer y fluoróforo (199 µL + 1 µL respectivamente).

- **Transcripción reversa**

Para la transcripción reversa se modificó el protocolo descrito por Soeth y col, 1997.

El protocolo se describe a continuación:

Se incubó 10 μ L de la extracción de ARN por 10 minutos a 70°C con el propósito de desnaturalizar la estructura secundaria del ARN, e inmediatamente se llevó a hielo.

La transcripción se realizó en un volumen final de 20 μ L (10 μ L ARN+10 μ L mix) las concentraciones de la mezcla de reactivos (mix) se describen a continuación.

Tabla 6. Concentraciones de la mix para transcribir el ARN a ADN.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final
5X First-Strand Buffer	5X	1,25 X
DTT	0,1 M	0,01M
hexámeros Random	3 μ g/ μ l	0,15 μ g/ μ l
dNTPs	10mM	0,5mM
transcriptasa reversa	200U/ μ l	10U/ μ l

La mezcla se incubó a 20°C por 5 minutos, a 37°C por 60 minutos y a 94°C por 5 minutos.

El ADN transcrito se almacenó a -20°C hasta el momento de procesamiento.

- **Amplificación del ADN mediante PCR Anidado**

Las secuencias de los primers utilizados en la amplificación del ADN fueron obtenidos del artículo publicado por Garrido (Garrido S. y col, 2008), (Tabla7), mismas que fueron analizadas en los bancos de genes de Japón y Europa y sometidas al programa BLAST del banco de genes de Estados Unidos (NCBI) y alineadas mediante software de Genética, para comprobar el diseño correcto de las mismas (Fig. 22).

Tabla 7. Primers utilizados en la amplificación del ADN de citoqueratina 20.

Primers	Secuencia
CK-1	5'CAAATTGAAGAGCTGCGAAGTCAG 3'
CK-4	5'CCATGTTACTCCGAATCTGCATC 3'
CK-2	5'GTCAATGTGGAGGTTGGATGCTG 3'
CK-3	5'CAGAGAGCTCAACAGCGACTG 3'



Figura 22. Alineamiento de primers. En color rojo los primers forward y en amarillo los primers reverse.

La amplificación de ADN se realizó en una primera ronda con los primers CK-1 y CK-4. La amplificación obtenida se sometió a una segunda PCR con los primers CK-2 y CK-3, con la finalidad de obtener una mayor cantidad de ADN. Las concentraciones de la mix de PCR pueden observarse en la tabla 8.

Tabla 8. Concentraciones de la master mix utilizada en la PCR.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Buffer PCR	10X	1X
dNTPs	10 mM	200 μ M
MgCl ₂	25 mM	1.5mM
primer CK	100 μ M	0.4 μ M
primer CK	100 μ M	0.4 μ M
Taq-pol	5U/UL	0.025U/ μ L

La primera ronda de amplificación se realizó con 10 μ L de ADN de la transcripción, empleando los primers CK-1 y CK-4 (amplicón de 673 pb) para un volumen final de 50 μ L.

Las temperaturas utilizadas fueron: una primera fase de desnaturalización inicial a 94°C durante 10 min, una segunda fase de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 65°C por 1 min y elongación a 72°C por 1 min, seguido de una tercera fase de extensión final a 72°C por 10 min.

La segunda ronda de amplificación se realizó con 10 μ L de ADN de la primera PCR empleando los primers CK-2 y CK-3 (amplicón de 339pb) para un volumen final de 50 μ L. Las temperaturas utilizadas para la amplificación fueron las mismas que la primera ronda.

En cada protocolo de PCR se procedió de la siguiente manera:

- Preparación de máster mix.
- Adición de una alícuota de las muestras de ADN sobre la máster mix y
- Amplificación del material genético.

Las muestras que se utilizaron en el proceso de la amplificación fueron:

Control negativo: ADN extraído de un organismo filogenéticamente lejano (*Mycobacterium tuberculosis*).

Control positivo: ADN extraído de una biopsia de un tumor maligno (cáncer de colon).

Control del agua utilizada en la preparación de la mix.

Control del agua utilizada en la extracción de ADN a partir de las muestras.

Muestra X: Muestra de ADN extraído de sangre de los pacientes con sintomatología compatible con cáncer colorrectal.

- **Electroforesis en gel de Agarosa**

Los fragmentos fueron separados mediante un gel de agarosa al 1.5% preparados con TBE 1X. En cada pozo del gel se cargaron 7 µl de ADN amplificado en la PCR, la muestra se mezcló con azul de bromofenol. El voltaje utilizado fue 5V/cm, medido de electrodo a electrodo. La corrida se realizó durante 40 minutos.

Para la visualización de los fragmentos de ADN se utilizó el fluoróforo Sybr Green, agente que se intercala con el ADN y emite una fluorescencia al ser expuesto a luz UV.

- **Análisis estadístico**

Los cálculos para obtener la especificidad y sensibilidad de la PCR-TR anidada para determinar CK-20 en sangre periférica se describe a continuación.

$$\textit{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN} \times 100\%$$

$$\textit{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP} \times 100\%$$

Para el análisis estadístico de los resultados del marcador CK-20 se utilizó la Prueba Exacta de Fisher. Esta prueba estadística fue utilizada para comprobar si la variable “Resultado de CK-20” con otra variable (género, alimentación, hábitos) tiene relación. Para este fin se utilizó una tabla de contingencia 2x2, a través de la cual se obtuvo el valor p. La razón por la que se utilizó este estadístico fue porque la Prueba Exacta de Fisher nos proporciona un valor p exacto en todos los tamaños de muestras analizadas.

Valor p. Este valor nos indica si existe una asociación entre las variables estudiadas, en nuestro caso permite determinar si el resultado de CK-20 positivo tiene asociación con las variables estudiadas. El valor p menor al nivel de significancia (alfa) se considera significativo.

Alfa (α). El valor utilizado para los cálculos estadísticos fue de 0.05. Utilizando este valor la posibilidad de encontrar un “falso negativo” es solo 5%.

6.6.1.1 Determinación de CA 19.9

La técnica de Quimioluminiscencia fue realizada en el laboratorio de Endocrinología y Biomarcadores del Instituto SELADIS. Esta técnica se utilizó para la determinación de CA 19.9. En total se analizaron 77 muestras (suero) solo de los pacientes que requerían el estudio, este marcador se analizó con la finalidad de comparar los resultados obtenidos del marcador CK-20 frente a un marcador comúnmente utilizado en el seguimiento de cáncer colorrectal como es el marcador CA 19.9.

6.6.1.2 Endoscopia e Histopatología

La endoscopia fue realizada por especialistas gastroenterólogos, en caso de observarse una anormalidad en el tejido intestinal se obtuvo una biopsia para el examen histopatológico. Las biopsias obtenidas de los pacientes fueron procesadas en la unidad de Histopatología del Instituto de Gastroenterología Boliviano Japonés La Paz. Los resultados de estas técnicas fueron utilizados para comparar con los resultados obtenidos en la PCR para CK-20.

6.6.2 Determinación del marcador Bat 25 mediante la qPCR

Esta técnica fue utilizada para la determinación de MSI en el marcador BAT25 los pasos realizados fueron:

- Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante el KIT PureLink® Genomic DNA de Invitrogen mediante los siguientes pasos:

Se trabajó con 200 µL de sangre total a la cual se adicionó 20 µL de proteinasa K y 20 µL de RNasa, se mezcló con vortex hasta obtener una solución homogénea y posteriormente se incubó 2 minutos a temperatura ambiente, a esta mezcla se añadió 200 µL de PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer y se mezcló hasta obtener una solución homogénea, se llevó a incubar a 55°C durante 15 minutos, a esta solución se añadió 200 µL de etanol absoluto y se mezcló.

El volumen anterior se transfirió a una columna de intercambio iónico la cual se llevó a centrifugar por 1 minuto a 10 000 rpm. Posteriormente se realizó 2 lavados con 500 µL de Wash Buffer 1 y Wash Buffer 2, en cada lavado se centrifugó la columna a 10 000 rpm por 3 minutos y 12 000 rpm por 5 min respectivamente. Finalmente la columna se llevó a un tubo estéril de microcentrífuga al cual se añadió 25 µL de PureLink™ Genomic Elution Buffer incubando a temperatura ambiente por 5 minutos, posteriormente la columna se llevó a centrifugación a máxima velocidad por 1 minuto. El ADN obtenido se conservó a -4°C hasta su posterior procesamiento.

- Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN obtenido en la extracción se realizó mediante el cuantificador Qubit (life technologies) con 5 µL de la extracción de ADN y 195 µL de buffer y fluoróforo (199 µL y 1 µL respectivamente).

- Amplificación del ADN mediante qPCR

La determinación de MSI se realizó mediante la qPCR utilizando el agente intercalante Sybr Green, técnica a través de la cual se puede determinar la T_m de la región que se está buscando.

La amplificación de ADN se realizó con master mix de life technologies, 2 μ l de la muestra de ADN (concentración de 2ng/ μ l en promedio), primer forward TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT, primer reverse TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC, las secuencias fueron obtenidas del artículo de Dietmaier y col. (1997), mismas que fueron analizadas en el banco de genes NCBI y alineadas mediante el programa Geneious (Fig. 23).

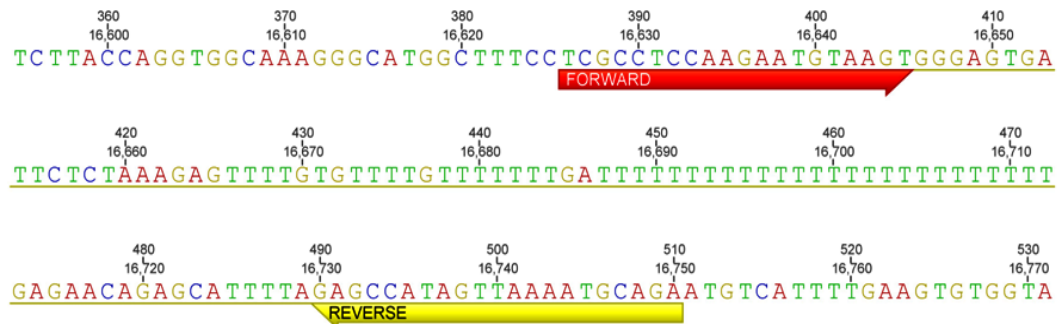


Figura 23. Alineamiento de los primers Forward y Reverse utilizados para la amplificación del marcador Bat 25.

La reacción se realizó en un volumen final de 10 μ l, las concentraciones utilizadas se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Concentraciones utilizadas en la amplificación de ADN para la determinación de inestabilidad microsatelital.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
MIX PCR	2X	1X
primer F	20uM	1,8uM
primer R	20uM	1,8uM

Las temperaturas utilizadas para la amplificación fueron: 94°C de desnaturalización inicial durante 10 min; 45 ciclos de 94°C durante 45 segundos y 55°C durante 30 segundos.

Para la curva melting se utilizaron temperaturas de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto y desnaturalización a 95°C por 15 segundos.

Para cada protocolo de q PCR se procedió de la siguiente manera:

- Preparación de master mix.
- Una alícuota de las muestras de ADN sobre la preparación de la master mix y
- Amplificación del material genético.

Las muestras que se utilizaron en el proceso de la amplificación fueron:

- **Control negativo:** ADN extraído de un organismo filogenéticamente lejano (*Mycobacterium tuberculosis*).
- Control del agua utilizada en la preparación de la mix.
- Control del agua utilizada en la extracción de muestras.
- **Muestra X:** ADN extraído de sangre de los pacientes y voluntarios.

El análisis de la amplificación de la qPCR fue realizado a través del software incorporado en el termociclador de tiempo real.

7. RESULTADOS

7.1 Resultados del marcador CK-20

Según la revisión de los registros de la unidad Histopatología del IGBJ correspondientes a los años 2013 a 2015, se reportó una gran cantidad de EII y una gran cantidad de adenocarcinomas de colon asociados a una EII (Graf. 2).

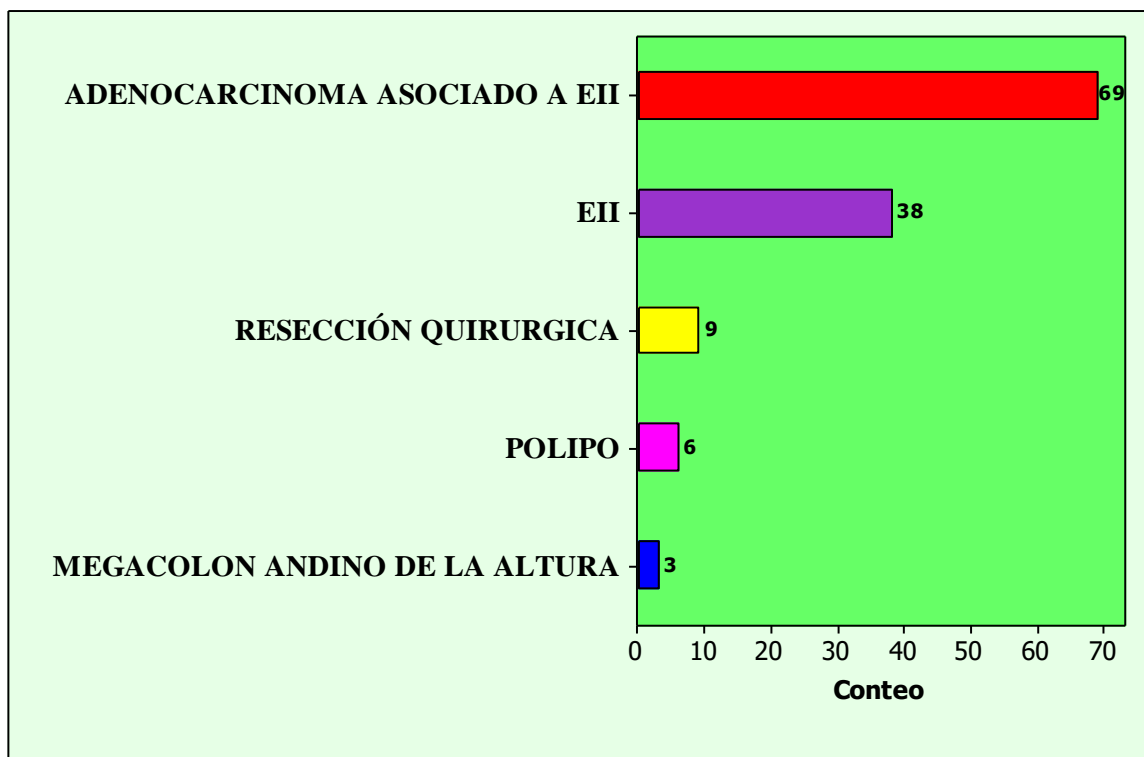


Gráfico 2. Diagnóstico histopatológico de pacientes con sintomatología colónica del Instituto de Gastroenterología Boliviano Japonés de La Paz, correspondiente a los años 2013 a 2015.

- **Resultados del análisis *In silico* de la PCR**

Se compara los resultados obtenidos de la amplificación de CK-20 y un análisis *in silico*.

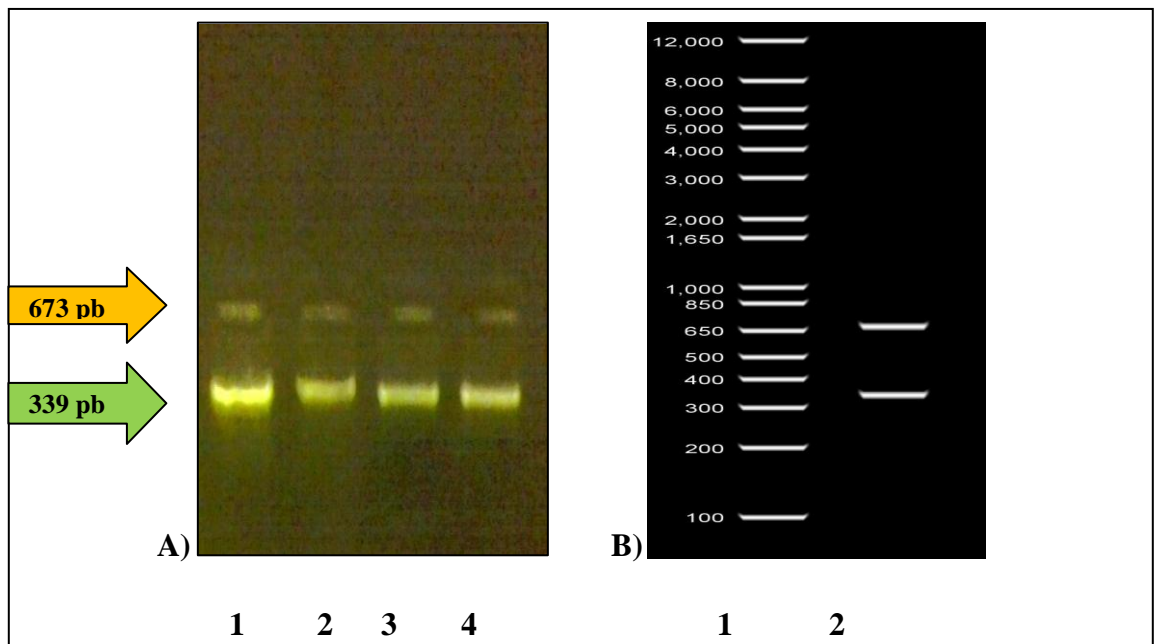


Figura 24. A. Foto. Imagen de la corrida electroforética donde se puede observar las bandas pesadas de 673 pb y las bandas livianas de 339 pb, los cuatro carriles 1, 2, 3, 4 corresponden a la amplificación de ADN utilizando los primers para CK-20. La muestra de ADN fue obtenida de una resección quirúrgica de un adenocarcinoma de colon. **B.** Imagen de un gel virtual realizado “*in silico*” mediante el banco de genes NCBI: carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 fragmentos de CK-20 banda pesada de 673pb y banda liviana de 339pb.

- **Resultados de los controles positivos**

En total se analizaron 36 biopsias de pacientes que presentaron anomalías en el epitelio intestinal. El 100 % de las biopsias dio un resultado positivo para CK-20.

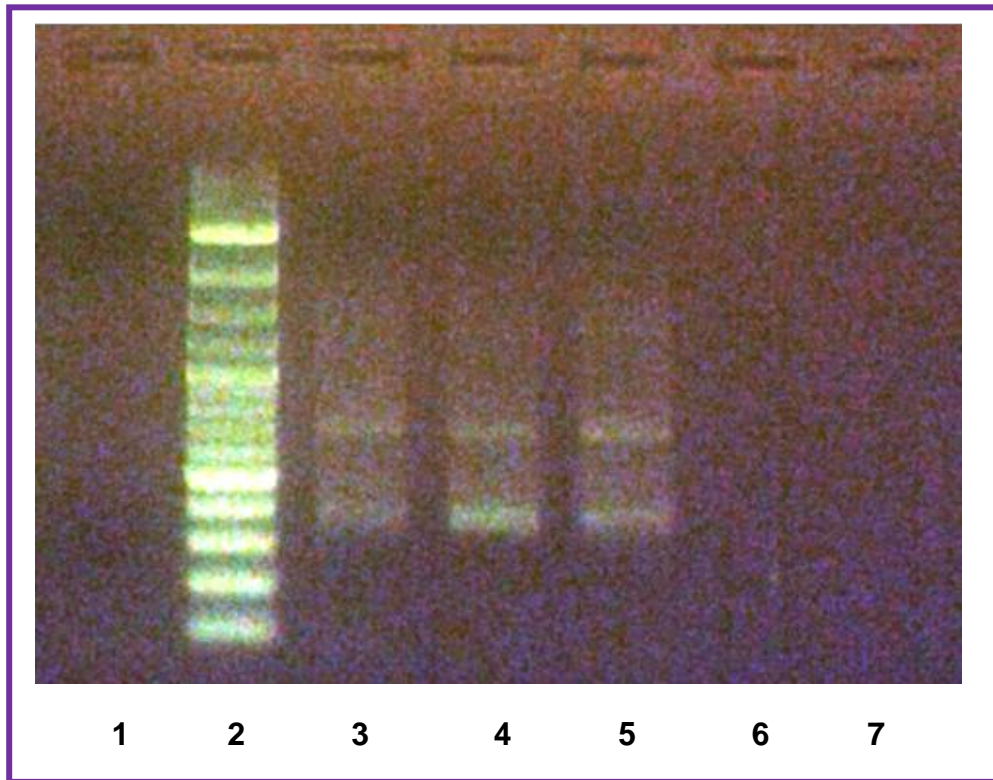


Foto 2. Corrida electroforética de la amplificación de CK-20 en biopsias: carril 1 control negativo, carril 2 peso molecular, carriles 3, 4, 5 biopsias, carril 6 control del agua utilizada en la master mix, carril 7 control del agua utilizada en la extracción de material genético.

- **Resultados de los controles negativos**

Como controles negativos se analizaron 40 muestras de pacientes que no presentaban ningún tipo de enfermedad ni sintomatología similar al cáncer colorrectal, de los 40 pacientes, 39 resultaron negativos para la amplificación del marcador CK-20 y uno resultó positivo para el marcador.

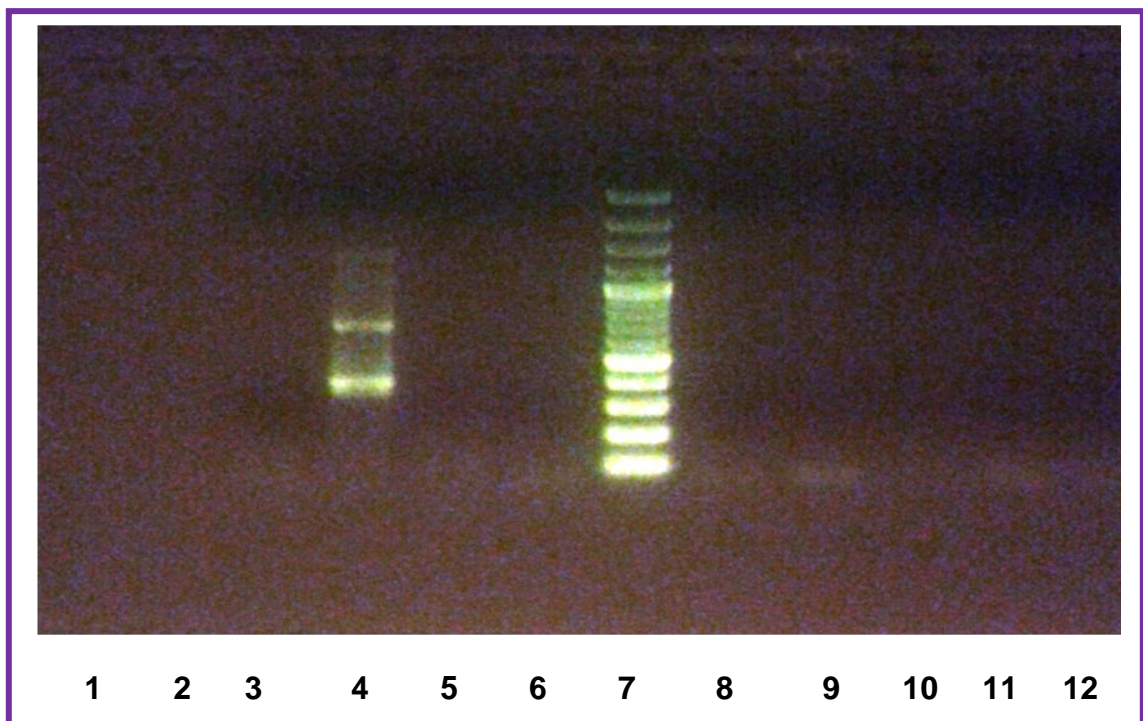


Foto 3. Carril 1 control negativo, carril 2 control del agua empleada en la preparación de la master mix, carril 3 control del agua utilizada en la extracción de material genético, carril 4 control positivo, carriles 5, 6, 8, 9, 10, 11 y 12 muestras de voluntarios sanos, carril 7 peso molecular.

- **Sensibilidad y Especificidad de la prueba de PCR-TR anidada para el marcador CK-20**

El análisis de los resultados obtenidos se describen a continuación (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados del marcador CK-20.

Resultados obtenidos mediante la técnica PCR-TR	Número de Muestras		Total de los resultados de las muestras procesadas
	Controles Positivos (B*)	Controles Negativos (SPAS*)	
POSITIVO para el marcador CK-20	36 (VP*)	1 (FP*)	37
NEGATIVO para el marcador CK-20	0 (FN*)	39 (VN*)	39
Total de muestras procesadas	36	40	76

* (B) Biopsias de pacientes con anomalías en el intestino grueso, (SPAS) Sangre de pacientes aparentemente sanos, (VP) verdaderos positivos, (FN) falsos negativos, (FP) falsos positivos, (VN) verdaderos negativos.

Mediante la técnica realizada en el trabajo, las 36 biopsias analizadas resultaron positivas para el marcador CK-20, (verdaderos positivos). No se debe olvidar que CK-20 se expresa normalmente en el epitelio intestinal, razón por la cual se utilizaron biopsias como controles positivos.

De los 40 controles negativos (pacientes aparentemente sanos) 39 resultaron negativos (VN) y 1 control resultó positivo (FN).

Mediante el análisis de las muestras positivas y negativas se determinó que la sensibilidad de la técnica de PCR-TR anidada para el marcador CK-20 es de 100%, y tiene una especificidad de 97.5%.

- **Análisis de CK-20 en sangre de pacientes con sintomatología compatible con cáncer colorrectal.**

Los resultados de los pacientes con sintomatología compatible con cáncer colorrectal para la amplificación de CK-20 se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Resultados de CK-20 en sangre de pacientes y voluntarios.

PARTICIPANTE	NEGATIVO CK-20	POSITIVO CK-20	TOTAL
PACIENTES	66 (73.33%)	16 (17,78%)	82 (91,11%)
VOLUNTARIOS	6 (6,67%)	2 (2,22%)	8 (8,89%)
TOTAL	72 (80,00%)	18 (20,00%)	90 (100,00%)

De los 90 pacientes a los que se les realizó la prueba de citoqueratina 20 en sangre, 18 resultaron positivos, de los cuales 2 eran voluntarios que presentaban una sintomatología similar al CCR y con antecedentes clínicos que se relacionan con la positividad del marcador utilizado.

7.1.1 Resultados del Marcador CA 19.9

Los resultados obtenidos de esta prueba se pueden observar en la tabla 12.

Tabla 12. Resultados obtenidos de CA19.9 en pacientes con sintomatología compatible de CCR (pacientes de la unidad endoscópica).

Resultado de CA 19.9	TOTAL
NEGATIVO	73 (94.81%)
POSITIVO	4 (5.19%)
TOTAL	77 (100%)

7.1.2 Resultados del diagnóstico clínico (histopatología y endoscopia) para observar la relación del CCR con las EII

A través de los resultados histopatológicos y colonoscópicos, ambos reportados por los médicos especialistas del IGBJ, se observó que la gran mayoría de los pacientes positivos para CK-20 estuvo relacionado con una EII y los 3 casos de CCR y pólipo se asociaban a una inflamación intestinal.

En la tabla 13 se muestra la comparación de los 18 pacientes positivos para CK-20 con los resultados del marcador CA19.9 y el diagnóstico clínico del paciente.

Tabla 13. Resultados del marcador CA 19.9 en suero en comparación con los resultados de CK-20 en sangre, resultados clínicos de los pacientes con sintomatología compatible con cáncer colorrectal, edad y sexo.

S E X O	E D A D	/C/ de CA 19.9 U/ml	CA 19,9	CK-20 en sangre	OBSERVACIONES y/o diagnóstico clínico
M	47	4,6	NEG	POS	Cáncer de rectosigmoide, asociado a colitis crónica activa
F	67	<2,50	NEG	POS	EII*
F	65	2,84	NEG	POS	EII*
F	27	3,65	NEG	POS	EII*
F	28	<2,50	NEG	POS	EII*
F	88	>1000	POS	NEG	Tratamientos anteriores para Gastritis, Neumonía, no se encontró anomalías en el estudio colonoscópico.
F	73	62	POS	POS	Operación de Vesícula no se encontró anomalías en el estudio colonoscópico.
F	76	<2,50	NEG	POS	EII*
F	80	40	POS	NEG	Tratamientos para gastritis no se encontró anomalías en el estudio colonoscópico.
F	65	<2,50	NEG	POS	EII*
F	46	<2,50	NEG	POS	EII*
F	36	<2,50	NEG	POS	EII*
F	66	9,23	NEG	POS	EII*
M	44	4,59	NEG	POS	EII*
M	34	45	POS	NEG	Tratamiento para la Diabetes no se encontró anomalías en el estudio colonoscópico.
F	43	<2,50	NEG	POS	EII*
F	54	6,81	NEG	POS	EII*
F	59	<2,50	NEG	POS	EII*
F	57	2,55	NEG	POS	EII*
M	49	<2,50	NEG	POS	Antecedentes de úlcera duodenal y Neurofibromatosis.
F	21	<2,50	NEG	POS	Dolor abdominal, presencia de sangre en las heces fecales.

* Enfermedad inflamatoria del intestino

7.1.3 Resultados de las Encuestas para el análisis de CK-20

- Datos demográficos

Según las encuestas realizadas a los pacientes, la edad media es de 51 años y la mínima de 18 años.

Una característica de los pacientes que presentan sintomatología compatible con cáncer colorrectal es la actividad a la que se dedican, en su gran mayoría son personas jubiladas y amas de casa, estos datos nos indican que una gran cantidad de pacientes con problemas digestivos son mayores de edad.

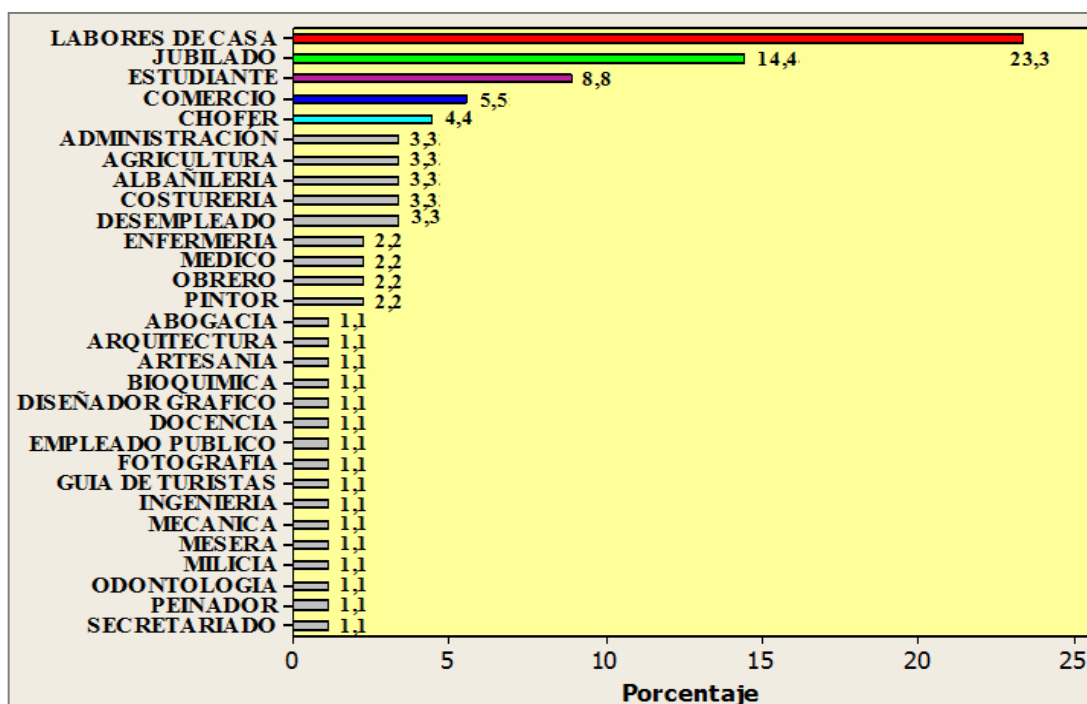


Gráfico 3. Actividad a la que se dedican los pacientes

- Datos clínicos

De los 90 pacientes 42 (46,7%) refieren no haber tenido ningún problema de salud, 48 pacientes (53,3%) tenían antecedentes de problemas digestivos tales como problemas vesiculares, gástricos y en general malestares digestivos.

38 pacientes (42.4%) tuvieron un familiar con algún tipo de cáncer, dentro de este grupo los tipos de cáncer más frecuentes son: cáncer de útero, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata y cáncer desconocido.

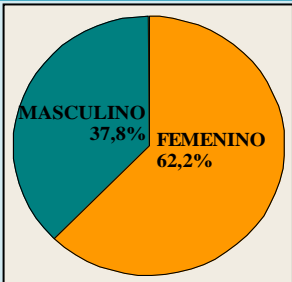
Los principales síntomas de los pacientes fueron: dolor abdominal, distensión abdominal, diarrea, pirosis, vómitos, náuseas, gases y disminución de peso.

7.1.4 Estadísticas en Relación con los Resultados Obtenidos de CK-20 en Sangre

- Resultados de CK-20 según Género

Los pacientes que acudieron a la unidad de endoscopia son en su gran mayoría del género femenino (cuadro 1). Los resultados estadísticos nos indican que no existe una relación entre género y el resultado de CK-20. Mediante el análisis de este resultado se puede indicar que ambos géneros tienen la probabilidad de desarrollar una EII que puede predisponer al cáncer. Sin embargo, la mayoría de los pacientes que acuden al hospital por malestares intestinales son del género femenino.

Cuadro 1. Resultados de CK-20 de acuerdo al género.

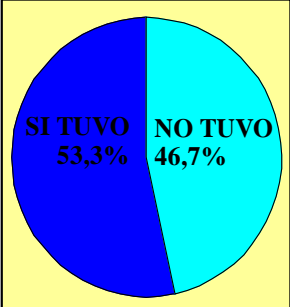
Género de los pacientes	Resultados de CK-20			
	GENERO	NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL
	FEMENINO	41(45,56%)	15(16,67%)	56(62,22 %)
	MASCULINO	31(34,44%)	3(3,33%)	34(37,78%)
	TOTAL	72(80,00%)	18(20,00%)	90(100,00%)
	Prueba exacta de Fisher: Valor P > 0,05			

- Resultados de CK-20 según antecedentes patológicos

El valor p obtenido entre los resultados de CK-20 y antecedentes patológicos es mayor a 0.05 lo que nos indica que no existe una asociación entre estas variables (cuadro 2). Pero algo que llama la atención, es que, la gran mayoría de estos pacientes tuvieron

problemas de vesícula (Gráfico 4), los problemas vesiculares han sido relacionados como predisposición a desarrollar cáncer colorrectal.

Cuadro 2. Resultados de CK-20 de acuerdo a antecedentes patológicos.

Antecedentes patológicos	Resultados de CK-20			
	Problemas de salud	NEGATIVO	POSITIVO	Total
	NO	37(41,11%)	5(5,56%)	42(46,67%)
	SI	35(38,89%)	13(14,44%)	48(53,33%)
	Total	72(80,00%)	18(20,00%)	90(100,00%)
	Prueba exacta de Fisher: Valor P > 0,05			

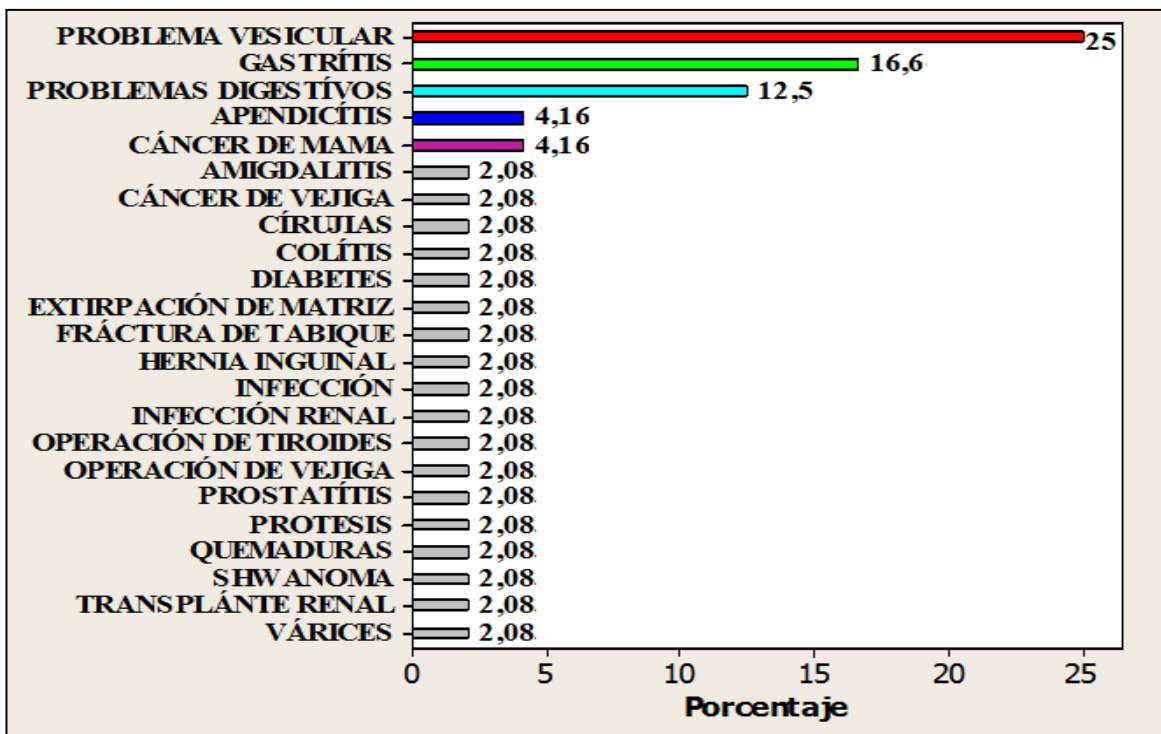
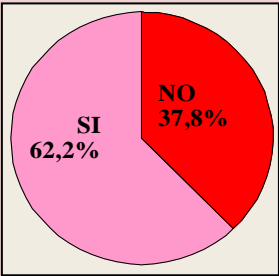


Gráfico 4. Antecedentes patológicos de los pacientes.

- **Resultados de CK-20 según la alimentación del paciente**

No existe una asociación estadística (valor p mayor a 0.05) entre los resultados de CK-20 y los alimentos consumidos; sin embargo una gran cantidad de pacientes consumen alimentos que se encuentran al paso, conocidos también como “alimentos rápidos”, lo particular de estos alimentos es el contenido elevado de grasas y carnes expuestas a temperaturas elevadas, en el cuadro 3 se puede observar que una gran cantidad de pacientes consumen estos tipos de alimentos.

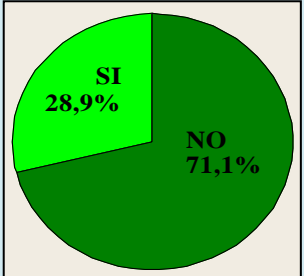
Cuadro 3. Resultados de CK-20, según consumo de “alimentos rápidos”

Consumo de Alimentos rápidos	Resultados de CK-20			
	Consume	NEGATIVO	POSITIVO	Total
	NO	30(33,33%)	4(4,44%)	34(37,78%)
	SI	42(46,67%)	14(15,56%)	56(62,22%)
	Total	72(80,00%)	18(20,00%)	90(100,00%)
Prueba exacta de Fisher: Valor P >0.05				

- **Resultados de CK-20 en ex fumadores**

No existe relación entre fumadores recientes y el resultado de CK-20 positivo; sin embargo, existe una asociación con ex fumadores que consumieron tabaco durante más de 1 año y al menos 1 cigarrillo al día. Estos resultados nos indican que el consumo de cigarrillos tiene un efecto acumulativo y puede ser considerado como un factor que predispone a padecer la enfermedad (cuadro 4).

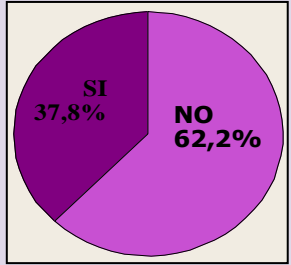
Cuadro 4. Resultados de CK-20, según ex fumadores (más de 1 año).

Ex Fumadores (más de 1 año)	Resultados de CK-20			
	Fumaba	NEGATIVO	POSITIVO	Total
	NO	55(61,11%)	9(10,00%)	64(71,11%)
	SI	17(18,89%)	9(10,00%)	26(28,89%)
	Total	72(80,00%)	18(20,00%)	90(100,00%)
	Prueba exacta de Fisher: Valor P <0.05 (Significativo)			

- **Resultados de CK-20 y habito de consumir bebidas alcohólicas**

No se encontró asociación entre el hábito de consumir bebidas alcohólicas y los resultados de CK-20, de acuerdo al Cuestionario de Identificadores Diagnóstico (CID) (Muracén D. I. y col., 2001) el 37,8% de los pacientes son bebedores sociales (cuadro 5),

Cuadro 5. Resultados de CK-20, según el hábito de consumir bebidas alcohólicas.

Consumo de bebidas alcohólicas	Resultados de CK-20			
	bebidas alcohólicas	NEGATIVO	POSITIVO	Total
	NO	43(47,78%)	13(14,44%)	56(62,22%)
	SI	29(32,22%)	5(5,56%)	34(37,78%)
	Total	72(80,00%)	18(20,00%)	90(100,00%)
	Prueba exacta de Fisher: Valor P >0.05			

7.2 Resultados del marcador de MSI “BAT 25”

De los 200 voluntarios analizados 132 (66%) no tenían problemas de salud y participaron como voluntarios para descartar la posibilidad de desarrollar la enfermedad (síndrome de Lynch), el resto de los voluntarios presentaron problemas de salud vinculados con problemas digestivos. El 49.5% del total de voluntarios refirieron tener antecedentes familiares con algún tipo de cáncer, el más frecuente fue el de C6lon.

La edad promedio de los voluntarios fue de 37 (el rango de edad fue de 13 a 78 a1os).

- Resultados de la qPCR para el marcador Bat 25

La amplificaci6n del marcador BAT 25 puede observarse en las figuras 25, 26 y 27.

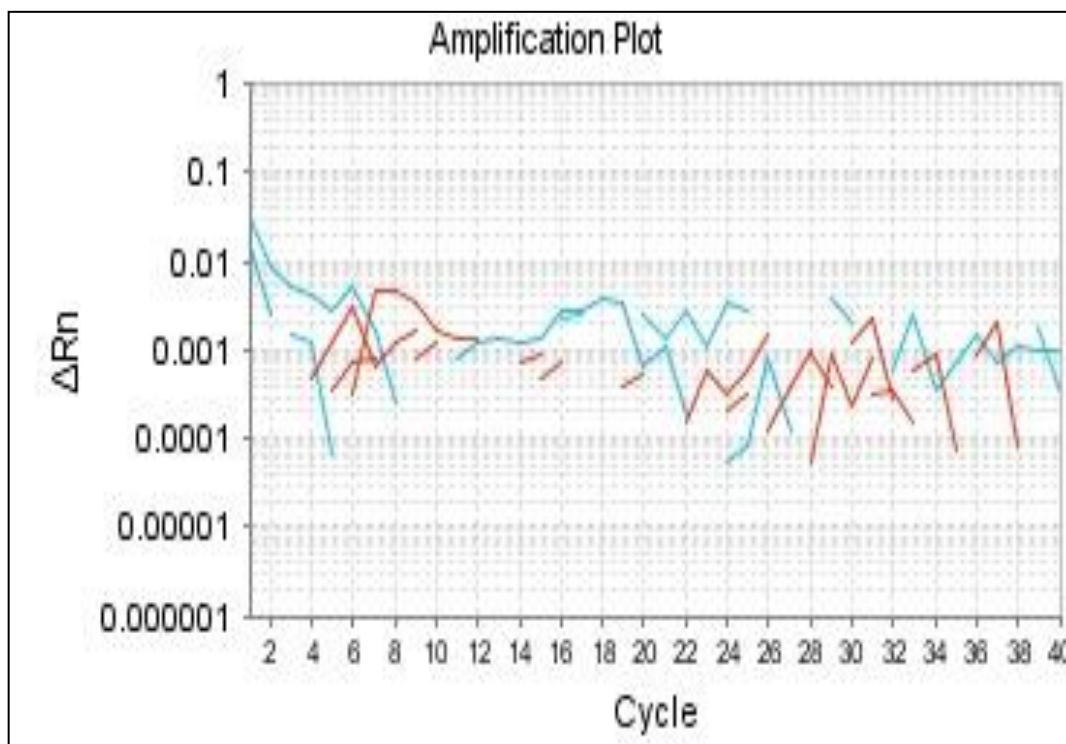


Figura 25. qPCR de los controles negativos en el an1lisis del marcador Bat 25

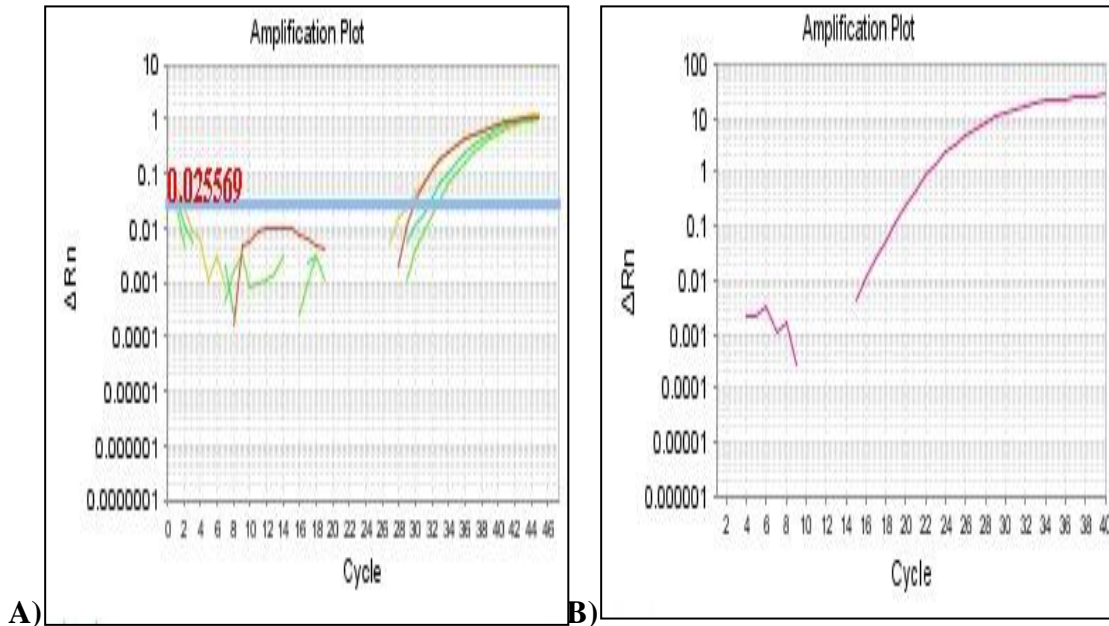


Figura 26. A) Amplificación logarítmica del fragmento Bat 25 obtenido en el equipo Step One Plus. En esta figura se puede observar en el eje Y la fluorescencia emitida (ΔRn) por la amplificación de la secuencia del marcador BAT 25 en unión con el fluoróforo sybr green, la línea celeste corresponde al cálculo promedio ($\Delta Rn=0.0255$) de la fluorescencia emitida para la amplificación del marcador en las muestras, en el eje X se encuentran los ciclos de la PCR en la que se inició la amplificación. B) control interno, se utilizó la β globina.

- **Análisis de la temperatura de fusión (T_m , del inglés temperatura melting)**

De acuerdo a las temperaturas melting obtenidas de todos los pacientes con antecedentes familiares con cáncer, solo tres presentaban una temperatura característica distinta a los demás ($T_m=71^\circ\text{C}$) (Figura 27) (las tres curvas de pacientes aparentemente positivos pueden verse en los Anexos 4, 5 y 6).

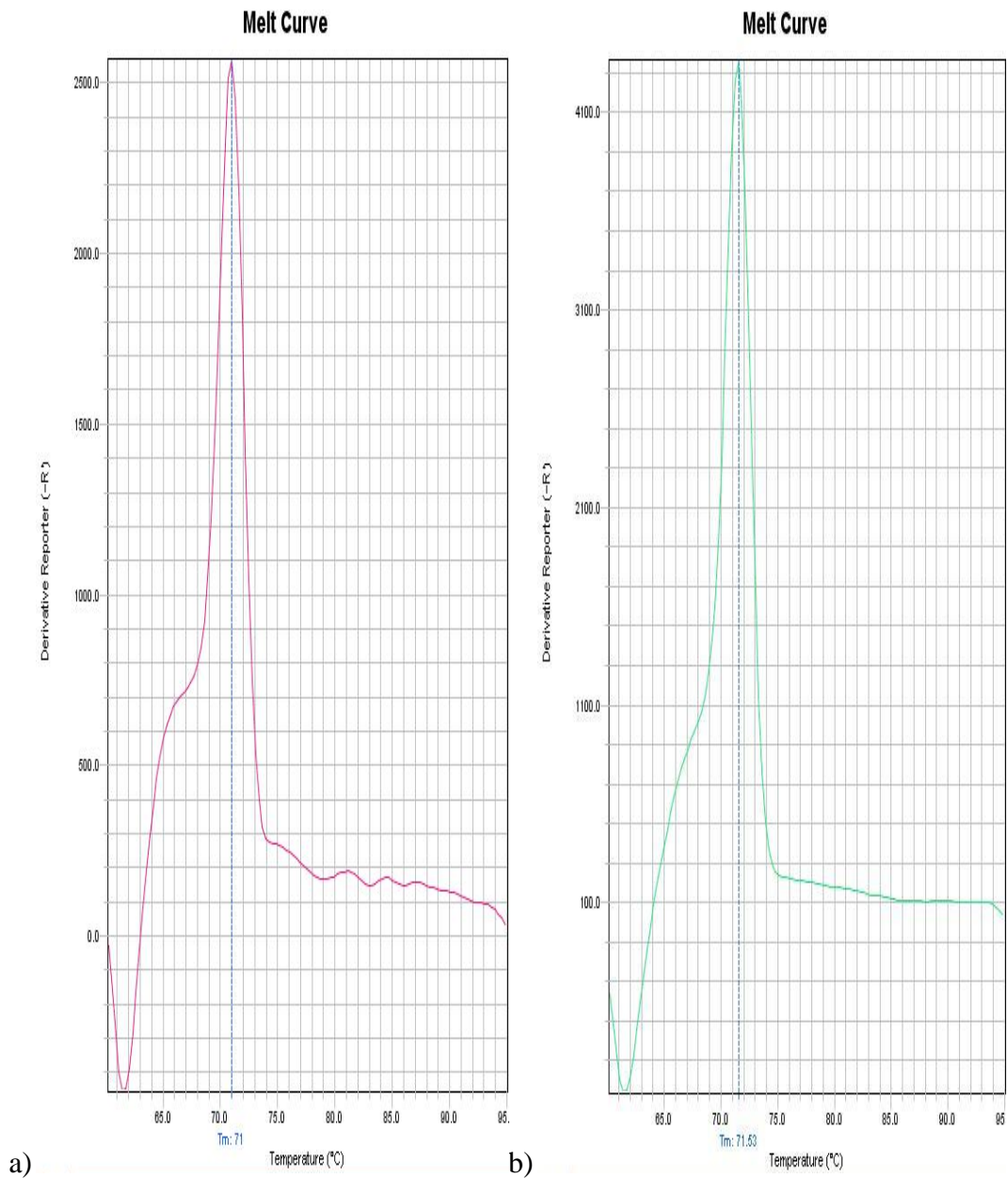


Figura 27. Curvas melting del fragmento Bat 25 obtenido del equipo Stepone plus, en estas figuras se puede observar la intensidad de fluorescencia emitida al desnaturalizar el ADN blanco a una temperatura determinada (ordenadas y abscisas respectivamente): a) Paciente aparentemente positivo para MSI con un T_m de 71°C , b) Paciente aparentemente negativo para MSI con un T_m de $71,53^{\circ}\text{C}$.

- **Resultados de pacientes según los criterios de Amsterdam**

Después de obtener los resultados de la qPCR (Tm) de los 3 pacientes aparentemente positivos para MSI se procedió a realizar un análisis detallado de las historias clínicas.

Dentro del grupo de voluntarios con antecedentes familiares de cáncer, los tres pacientes mencionados cumplían parcialmente con los criterios de Amsterdam (F053, F057 y F058) 2 tenían parentesco, madre (F057) e hija (F058). El caso más importante es la paciente F058 que presenta una variedad de síntomas relacionados con el síndrome de Lynch (tabla 14).

Las características de la paciente F058 concuerdan parcialmente con los criterios de Amsterdam: ha sido diagnosticada con una Gastritis severa atrófica, presenta enfermedad celíaca y a través de la colonoscopia se ha detectado la presencia de pólipo en el intestino.

En la figura 28 se muestra el árbol genealógico de la paciente F058. La madre “F057” fue diagnosticada con endometriosis, enfermedad que se relaciona con alteraciones en los genes de reparación del ADN (MLH1). Los bisabuelos maternos, fueron diagnosticados con cáncer gastrointestinal y cáncer de colon y la abuela materna presenta sintomatología gastrointestinal. Por otro lado, existen también antecedentes de cáncer en la familia del padre además de un pariente con enfermedad celiaca.

La probabilidad es muy alta para atribuir este caso a anomalías genéticas que han sido heredadas a la paciente.

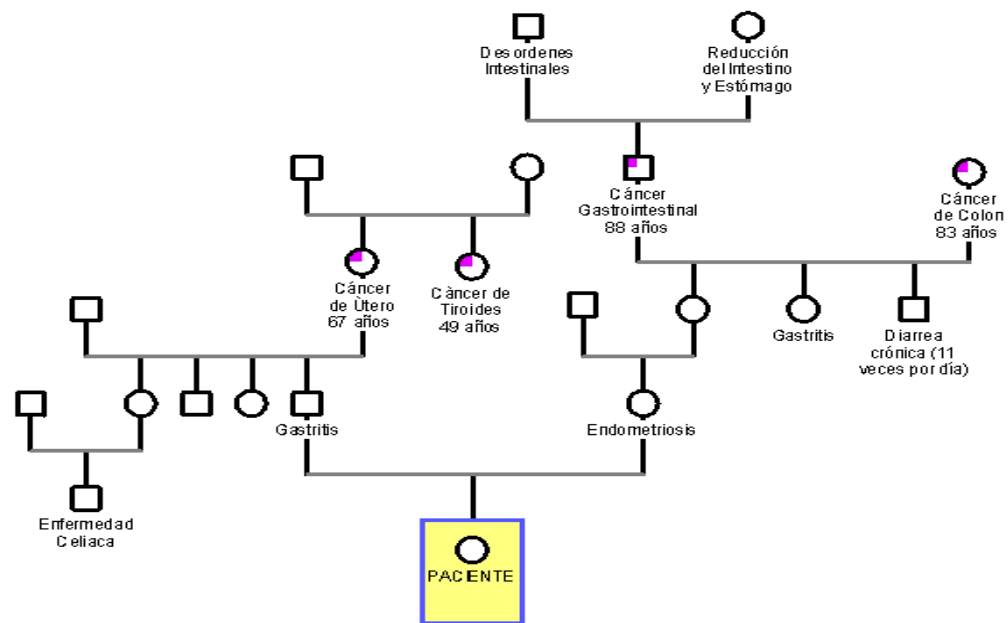


Figura 28. Árbol Genealógico de la paciente F058.

Tabla 14. Descripción clínica de los 3 pacientes positivos para MSI (Bat 25).

Código del paciente	Edad	Antecedentes Patológicos del paciente	Síntomas que presenta el paciente	Familiares diagnosticados con cáncer	Tipo de cáncer de los familiares
F053	34	operación de vesícula	Estreñimiento	mamá, tía abuela	cáncer de colon
F057	36	endometriosis	Ninguno	abuela, abuelo	cáncer de colon, cáncer gastrointestinal
F058	13	Gastritis, enfermedad celíaca, pólipo	Estreñimiento, calcificación vertebral, sangre en heces.	bisabuelos por parte de la madre y del padre	cáncer de colon, estómago, útero

En comparación con otros voluntarios que tienen antecedentes familiares con cáncer, estos tres pacientes tienen un Tm característico. Los resultados obtenidos deben ser confirmados con la técnica de análisis de fragmentos para determinar la inestabilidad microsatelital y secuenciación de los genes de reparación de ADN (MSH2 y MLH1), debido a que la técnica gold estándar para diagnosticar síndrome de Lynch es la secuenciación.

8. DISCUSIÓN

8.1 Determinación del marcador CK-20 a través de la técnica de PCR-TR

Un gran número de investigadores realiza diferentes tipos de estudios para ver la relación de las queratinas con el cáncer y específicamente para determinar si estas pueden ser utilizadas como marcadores de metástasis a distancia. La CK-20 podría ser utilizada en el diagnóstico de metástasis a distancia del CCR ya que este marcador se expresa en gran cantidad en los epitelios gástricos, intestinales, ureterales y en las células de merckel (García T. J. y Hernández C., 2002; Garrido S. y col., 2008). En el presente trabajo el porcentaje de positivos para CK-20 en biopsias de intestino grueso obtenidas mediante la técnica de PCR-TR anidado fue del 100%. Esta técnica ha sido utilizada por muchos autores para la determinación de este marcador (Soeth E. y col., 1997; García D. I., 2009). Asimismo, en un estudio realizado por Morsi M. I. y col. (2006) los autores concluyeron que la PCR-TR es una técnica eficaz para la determinación de CK-20.

Se siguen realizando estudios moleculares sobre este marcador, pero por el momento no se tienen resultados concluyentes que permitan aprobarlo como tal por las sociedades de cancerología en el mundo. Dimmler, por ejemplo, reportó resultados positivos de CK-20 en pacientes aparentemente sanos (Dimmler, A. y col., 2001; Bustin, S.A. y col., 2000), mientras que otros, como Giribaldi y col. reportaron que no existe una relación entre la presencia de CK-20 y metástasis, en tanto que, en pacientes sanos, los resultados eran negativos (Giribaldi G. y col., 2006).

Por otro lado, los estudios de CK-20 en sangre periférica se han realizado en su gran mayoría en pacientes que cursan por diferentes etapas del CCR, pero, pocos estudios sobre este marcador fueron realizados en pacientes con EII o una sintomatología que tenga relación con el cáncer. En 1998 Funaki N. O. y colaboradores, trabajaron con 5 pacientes controles que tenían una enfermedad inflamatoria del intestino, los resultados fueron negativos para CK- 20 en los 5 casos (Funaki N. O. y col., 1998). Este grupo no es representativo para analizar la relación de una EII con la positividad de CK-20 por

esta razón en el presente estudio se consideró trabajar con una mayor cantidad de población diagnosticada con una EII.

Las EII son consideradas como un riesgo para el desarrollo de CCR, pueden estar presentes muchos años y conforme transcurre el tiempo, el riesgo de desarrollar CCR va incrementado, después de los 10 años el riesgo es del 2%, después de 20 años 8% y después de 30 años, 18%. La característica de estas enfermedades en relación con el CCR es la sintomatología. La patología se diferencia a través de estudios complementarios como la colonoscopia y la histopatología (Carter A. B. y col., 2009).

Según los datos epidemiológicos obtenidos de la unidad de Histopatología del Instituto de Gastroenterología Boliviano Japonés de La Paz, los casos de adenocarcinomas están asociados a una inflamación intestinal y una gran cantidad de pacientes son diagnosticados con una EII, sin embargo, el tener esta enfermedad no indica que todos los pacientes van a desarrollar cáncer de colon. Por factores genéticos solo algunos podrían tener una mayor predisposición a desarrollar la enfermedad (Gráficos 2 y 3).

El CCR es clasificado de acuerdo a las capas de tejido que esta invade (T), la implicación de los ganglios linfáticos (N) y el riesgo de metástasis (M), en este caso si las células tumorales van afectando las capas del revestimiento intestinal se corre el riesgo de que las células se infiltren en el torrente sanguíneo que podrían ser transportadas a otros órganos como el pulmón o el hígado. Las EII comúnmente solo afectan a la mucosa y submucosa del epitelio intestinal, sin embargo, cuando la enfermedad se prolonga puede llegar a afectar capas más profundas del epitelio como la muscular y la serosa, lo que implica que las células del epitelio intestinal podrían ser liberadas en el torrente sanguíneo, estas células que son propias del intestino grueso podrían estar siendo detectadas por las técnicas moleculares como la PCR-TR lo que nos induce a suponer que esta técnica es altamente sensible, capaz de detectar cantidades mínimas de ADN. Los resultados obtenidos en el presente trabajo y de otros autores quizá puedan ser atribuidos al grado de lesión del epitelio intestinal y no particularmente del cáncer colorrectal o de otro tipo de cáncer estudiado con este marcador.

En un estudio realizado por Vlems F. A. y col. (2002) 10 de 47 pacientes controles dieron resultados positivos para CK-20 de los cuales 4 presentaban una enfermedad distinta al CCR (enfermedad de crohn, pólipos adenomatosos y colitis ulcerativa), los resultados de CK-20 en el presente trabajo no se limitan a ser hallados en pacientes con CCR, el marcador puede ser hallado también en pacientes con EII, con patologías relacionadas con el marcador y con una sintomatología similar al cáncer colorrectal (dolor abdominal, sangre en heces).

En el presente trabajo, de los 90 pacientes, 18 resultaron positivos para CK-20: 1 caso de cáncer de recto, 14 pacientes con EII diagnosticados por estudios de colonoscopia e histopatología, 2 voluntarios positivos: en el primer caso, una voluntaria aparentemente sana que presentaba dolores abdominales en forma esporádica y presentaba sangre en heces; el segundo caso, un voluntario con antecedente de úlcera duodenal y neurofibromatosis, finalmente 1 paciente positivo para CK-20 y CA 19.9 que tuvo una operación de vesícula. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación CK-20 no solo podría estar presente en sangre periférica de pacientes con diagnóstico de CCR, existe la posibilidad de que este marcador pueda ser encontrado en sangre periférica de pacientes que cursan procesos inflamatorios y, específicamente, EII que podrían estar afectando capas más profundas del epitelio intestinal y por esta razón las células estarían siendo liberadas al torrente circulatorio.

Es así que CK-20 no solo podría ser utilizado en pacientes con metástasis a distancia o en coadyuvancia de diagnóstico de pacientes con cáncer desconocido como indicaban los resultados de todos los estudios realizados hasta el momento, CK-20 podría estar presente en pacientes que son más predisponentes a padecer cáncer colorrectal a partir de una EII.

Por otro lado, entre los casos que resaltan en el presente trabajo se encuentran: La comparación de los resultados de CK-20 y CA19.9 en un caso que dio positivo en ambos marcadores en una paciente con antecedentes de operación de vesícula, la operación

podría haber influido en la infiltración de CK-20 hacia el torrente sanguíneo, la cual fue detectada por la técnica de PCR-TR anidado. Otro caso que resalta es la de una paciente que durante el estudio de la colonoscopia no presentaba anormalidades en el epitelio intestinal, y CK-20 negativo, dio niveles de CA 19.9 elevados, resultado que podría ser atribuido a una enfermedad pancreática, es de este modo que la necesidad de utilizar marcadores que coadyuven en el seguimiento de una enfermedad es muy necesario (Tabla 13).

- **Género y edad**

Según la OMS la mayor parte de las personas que desarrollan cáncer colorrectal son del género masculino (OMS, 2015) y en la mayoría de los casos se desarrolla en personas mayores de 50 años de edad (American Cancer Society, 2014), por otro lado las EII son más frecuentes en el sexo femenino y el rango de edad es de 33 a 45 años (Aladrén B. S. y col., 2007), en este trabajo la mayoría de los pacientes que presentan sintomatología compatible con cáncer colorrectal fueron del género femenino y de diferentes edades. El resultado de CK-20 positivo fue en su mayoría para el género femenino y con un promedio de 51 años de edad. Estos resultados concuerdan con los datos de las enfermedades inflamatorias del intestino, el cual constituye un riesgo para el desarrollo del cáncer colorrectal.

- **Antecedentes Patológicos**

Según las encuestas realizadas a los pacientes en este trabajo dentro del grupo de personas con antecedentes de tratamientos, una gran cantidad de los pacientes tuvo problemas vesiculares y gastritis. Se ha relacionado a la bacteria *H. pylori* con patologías como: la gastritis, cáncer gástrico y úlcera péptica. Es por esta razón que se han realizado diferentes estudios sobre esta bacteria, los estudios no son concluyentes, pero, no se descarta la posibilidad de que esta bacteria pueda causar daños en epitelio intestinal y de esta forma aumentar el riesgo del desarrollo del cáncer colorrectal (Urrego D.J. y col., 2014). Las encuestas realizadas a los pacientes indican que una gran cantidad de personas tienen problemas gastrointestinales, en su mayoría vesiculares y

gástricos. En el medio los problemas digestivos van aumentando, y así también el riesgo para desarrollar algún tipo de cáncer gastrointestinal.

- **Alimentación**

El consumo de frutas y verduras por los pacientes reflejado en este trabajo fueron altos, los alimentos procesados son consumidos muy poco, sin embargo el 62.2% de los pacientes consumen alimentos que constituyen un riesgo para el desarrollo de cáncer colorrectal, tales como carnes rojas, parrillas, hamburguesas, salchichas, etc.

El consumir frutas, verduras y fibra contribuyen a la prevención del cáncer colorrectal. Las carnes cocidas a temperaturas elevadas (parrillas) producen sustancias mutagénicas que pueden causar daños en el ADN lo cual es un riesgo para el desarrollo de cáncer colorrectal. El consumo de embutidos también es un factor de riesgo, probablemente por las nitrosaminas que contienen estos alimentos (Rodrigo L. y Riestra S., 2007)

- **Consumo de alcohol y tabaco**

El consumir bebidas alcohólicas más de dos veces al día aumenta el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal (Morgan V. G. y col., 2008). En el presente trabajo el 37,8% de los pacientes fueron catalogados como bebedores sociales según el CID y no así como dependientes alcohólicos, hábito que influye en la aparición de CCR (Muracén D. I. y col., 2001).

Por otro lado, el cigarrillo tiene una gran cantidad de agentes mutagénicos que pueden causar daños en el ADN, el consumir tabaco constituye un riesgo muy grande para desarrollar cáncer colorrectal. Si se consumen más de 35 paquetes de cigarrillos al año, este hábito se vuelve un verdadero riesgo (Morgan V. G. y col., 2008). En el presente trabajo se consideró como “fumadores” a todos aquellos pacientes que consumían al menos 1 cigarrillo por día, por un tiempo mayor o igual a 1 año y como “ex fumadores” a aquellos pacientes que dejaron el tabaco durante más de 1 año. En este trabajo se halló una asociación entre el resultado positivo de CK-20 y ex fumadores ($p < 0.05$). Estos

resultados concuerdan con la etiología de las EII ya que se indica que el riesgo de desarrollar la enfermedad aumenta en aquellos pacientes que tienen antecedentes de haber fumado (Moreira A. M., 2007). Estos resultados no son algo nuevo ya que es bien conocido que la gran mayoría de los casos de cáncer son atribuidos al consumo de tabaco.

- **Signos y Síntomas**

Entre los signos y síntomas que se pueden presentar en el cáncer colorrectal están: Dolor abdominal, diarrea, presencia de sangre en las heces fecales, estreñimiento, disminución del diámetro de las heces, cólicos, debilidad, cansancio y pérdida inexplicable de peso (American Cancer Society, 2014). Los pacientes incluidos en este trabajo en su mayoría presentaban dolores abdominales, estreñimiento y presencia de sangre en la materia fecal, sin embargo, estas características también se encuentran presentes en los pacientes que cursan un proceso inflamatorio de intestino para lo cual es necesario un análisis complementario como la colonoscopia y la histopatología para descartar la posibilidad de un cáncer.

8.2 Determinación del marcador de Inestabilidad Microsatelital (BAT 25)

Entre las personas que padecen cáncer colorrectal del 5 al 10% presentan alteraciones genéticas que son heredadas de familiares que tuvieron cáncer, estas mutaciones pueden ocasionar el desarrollo del cáncer en edades más tempranas. El CCHNP también conocido como síndrome de Lynch representa entre el 2 y el 4% de los tipos de cáncer colorrectal (American Cancer Society, 2014), este síndrome es ocasionado por mutaciones en los genes de reparación MMR (Juárez V.C. y Rosales R.M, 2014). La detección de mutaciones en los genes de reparación se realiza la detección de MSI, estas son repeticiones de nucleótidos que fueron alterados durante la replicación (Ñique C.C. y col., 2014). Entre los marcadores más utilizados se encuentra el BAT25 que contiene de 7 a 25 Timinas repetidas y está localizado en el oncogén c-Kit (Toledo G. D. y Cruz-Bustillo C.D., 2005). La técnica definitiva para determinar CCHNP es la secuenciación;

sin embargo, en Sud América existen países que no cuentan con recursos suficientes para realizar estos tipos de estudios (Ñique C.C. y col., 2014). En Bolivia no existen trabajos de investigación genéticos relacionados con cáncer hereditario, debido, entre otras cosas, a que los recursos con los que se cuentan son limitados.

Una de las técnicas que se está utilizando en la actualidad es la qPCR, en este trabajo se utilizó la qPCR con el fluoróforo Sybr Green. Esta técnica nos proporciona la T_m (temperatura a la cual el 50% del ADN se encuentra desnaturalizado) que es distinta para cada fragmento de ADN. Se utilizó esta técnica debido a que es menos costosa que la secuenciación, lo cual es conveniente para la población de nuestro medio.

Según estudios realizados sobre el síndrome de Lynch, los pacientes que cumplen con los criterios de Amsterdam resultan en su mayoría positivos para esta enfermedad (Wielandt A. M. y col., 2012), en el presente estudio del número total de voluntarios con familiares con cáncer, solo tres pacientes concordaban parcialmente con los criterios de Amsterdam, además a este análisis se adicionó el resultado de la T_m obtenida la cual fue distinta a las Temperaturas obtenidas del resto de los pacientes con antecedentes familiares de cáncer. La temperatura obtenida en la qPCR acompañada con los criterios de Amsterdam y un asesoramiento genético podrían ser utilizados como un dato para seleccionar a pacientes con síndrome de Lynch para que, posteriormente y si fuera necesario, puedan realizarse un estudio de secuenciación. Cabe aclarar que la temperatura obtenida en este trabajo a través de la qPCR no significa necesariamente que la persona presente MSI o mutaciones genéticas en los genes de reparación debido a que la diferencia en la secuencia de los marcadores es muy pequeña. La técnica definitiva para determinar alteraciones genéticas es la secuenciación.

El síndrome de Lynch se transmite de forma autosómica dominante y se puede expresar en etapas tempranas de edad. Según estudios genéticos, la MSI no solo puede estar presente en el síndrome de Lynch, también puede encontrarse en pacientes con cáncer gástrico. De acuerdo a los resultados obtenidos el caso más relevante es la de una paciente menor de edad con antecedentes familiares con cáncer (criterios de

Amsterdam). Además en estudios anteriores la paciente tuvo problemas de gastritis y se encontró la presencia de pólipo en la colonoscopia. Según el análisis genético en este trabajo, la paciente sería una candidata para el análisis de mutaciones en genes involucrados en el síndrome de Lynch (MMR) mediante la secuenciación y además se debería realizar estudios sobre el cáncer gástrico difuso hereditario ocasionado por mutaciones en el gen CDH1.

Según el árbol genealógico de la paciente un número considerable de los familiares tienen antecedentes de problemas digestivos y cáncer (Fig. 30). Algo que resalta en el árbol genealógico materno es la patología similar entre los familiares, otra característica es la endometriosis que presenta la madre y la Tm obtenida mediante la qPCR que fue idéntica a la de su hija que presenta los problemas mencionados. La endometriosis es una patología que puede producirse por errores dentro de los genes MMR y representa un riesgo para desarrollar cáncer de endometrio (Martini M. y col., 2002). Según los criterios de Bethesda el cáncer de endometrio está vinculado con el CCHNP, por tanto hay un riesgo de transmisión hereditaria a posteriores generaciones (Soliman P. y Lu K., 2007).

9. CONCLUSIONES

Se ha determinado, a través de un estudio genético y molecular en pacientes que tienen antecedentes familiares de cáncer de colon y/o con antecedentes clínicos, la presencia del marcador CK-20 en sangre periférica y una aparente alteración relacionada con el síndrome de Lynch (MSI). Lo cual indica una probable predisposición a padecer CCR.

Se ha optimizado la técnica de PCR-TR anidada para detectar la presencia de CK-20 en sangre de pacientes que presentan síntomas compatibles con cáncer colorrectal.

Se ha determinado que las EII tienen una relación con el CCR considerándolas como un factor que predispone a padecer la enfermedad, hallando un 17,8% de casos positivos de CK-20 mediante PCR-TR en personas que padecen EII.

Mediante el análisis de CK-20 se ha determinado que el hábito que constituye el riesgo más importante para padecer EII, y por tanto, predispone al cáncer colorrectal es el hábito de consumir tabaco.

Se ha optimizado la técnica de qPCR para la determinación de Inestabilidad Microsatelital (Bat25), a través de la cual se obtuvo una Tm de 71 en 3 pacientes que cumplían parcialmente con los criterios de Amsterdam. El análisis de MSI mediante la técnica de qPCR es una herramienta que puede ser utilizada conjuntamente con los criterios de Amsterdam y el asesoramiento genético de un profesional experto en el área, sin embargo, la técnica final para diagnosticar a un paciente con síndrome de Lynch es el análisis de fragmentos de los marcadores de MSI y la secuenciación de los genes de reparación.

10. RECOMENDACIONES

En la actualidad las nuevas tecnologías han contribuido en gran medida a realizar investigaciones de alta calidad y eficiencia, una de esas herramientas en el área de la biología molecular es la PCR, desde que Keple y colaboradores trabajaron en la optimización de esta técnica hasta el premio nobel recibido por Kary Mullis se le han ido realizando mejoras a la PCR, tal es el caso de la PCR-TR, PCR anidada y la qPCR las cuales son herramientas potentes utilizadas por una gran cantidad de investigadores.

Esta investigación constituye el primer estudio de predisposición genética en la que se utilizaron técnicas moleculares incluyendo también un análisis genético de pacientes con cáncer, este trabajo es solo el principio de todos los estudios que pueden llegar a ser realizados en el área de oncología.

Cabe recalcar que este estudio es básico en comparación con los trabajos de países del primer mundo, por esta razón se recomienda a las autoridades del Ministerio de Salud y Universidades del área de salud dar énfasis a los trabajos del área oncológica y también a otras áreas del campo de salud.

Además, se recomienda validar la PCR-TR anidada debido a que es una técnica muy útil para determinar marcadores como la CK-20.

Para el síndrome de Lynch se debe realizar un estudio detallado de los genes implicados en la enfermedad y necesariamente deben ser secuenciados.

ANEXOS

Anexo 1: Certificado de Aval Ético.



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE LA UMSA
CEI - UMSA



CEI.UMSA.AVAL ÉTICO 14/2013

CERTIFICADO DE AVAL ÉTICO

A quien corresponda:

El Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Mayor de San Andrés (CEI-UMSA), tiene a bien informar que fue presentado para su evaluación y aval ético el proyecto concursable titulado: “IMPLEMENTACIÓN DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE CÁNCER DE COLON EN EL INSTITUTO GASTROENTEROLÓGICO BOLIVIANO-JAPONÉS”, por el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Seladis - UMSA, cuya Investigadora Responsable es la Dra. Susana Revollo Zepita Ph.D.

Dicho proyecto fue evaluado bajo la normativa en ética de la investigación vigente para estudios que involucran seres humanos.

Una vez verificadas las correcciones hechas por el equipo investigador, en base a las observaciones del CEI-UMSA, es que se tiene a bien certificar que el mencionado proyecto cumple con los requisitos éticos exigidos en la normativa, por lo que los miembros del CEI-UMSA otorgan el **CERTIFICADO DE AVAL ÉTICO** al mencionado proyecto, cumpliendo así con uno de los requisitos de la V CONVOCATORIA DE FONDOS CONCURSABLES IDH 2013 – 2014.

Es cuanto tengo a bien certificar para los fines consiguientes del Concurso.

POR EL CEI-UMSA


Dra. Jacqueline Cortez G.
COORDINADORA



La Paz, 29 de octubre de 2013

Av. Villazón Nº 195, Monoblock, Piso 1 Telf. (591-2) 2440493
e-mail: cei@umsa.bo - La Paz - Bolivia

Anexo 2: Consentimiento Informado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO (para pacientes del IGBJ e individuos sanos)

Yo _____, con CI _____ expedido en _____, manifiesto que he sido informado sobre los objetivos del proyecto **Implementación de pruebas moleculares para el diagnóstico precoz de cáncer de colon en pacientes que son atendidos en la Unidad de Patología del Instituto Gastroenterológico Boliviano Japonés**, que lleva a cabo el laboratorio de Biología Molecular del Instituto SELADIS y que está bajo la responsabilidad de la Dra. Susana Revollo.

Se me ha informado que el Proyecto tiene como objetivo implementar métodos moleculares para realizar el diagnóstico precoz del cáncer de colon mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. He sido informado de los beneficios y riesgos de mi participación en el Proyecto, así mismo, que se me hará conocer los resultados y que mis datos personales serán manejados confidencialmente y estarán protegidos según las normas vigentes de bioética.

Se me ha informado que mi participación en el Proyecto es voluntaria, que no recibiré remuneración material, ni económica ni de otro tipo, pero sí se me entregarán los resultados de mis pruebas laboratoriales. Que mi participación durará sólo el momento en que tomen la muestra y efectúen la encuesta y que en cualquier momento puedo retirar mi consentimiento o seguir participando en el mismo sin que esta acción signifique ningún perjuicio para mi persona.

He tenido la oportunidad de hacer preguntas libremente, para despejar todas mis dudas y declaro haber recibido suficiente información. He sido informado por la Dra. Ximena Taborga, Co-responsable del Proyecto y personal del equipo, sobre aspectos vinculados con el Proyecto.

Se me ha informado que en caso de tener preguntas o quejas de los participantes o los representantes del Proyecto, durante la investigación, puedo acudir al Instituto SELADIS, o llamar a los teléfonos que aparecen en la Hoja de Información y que será atendido en cuanto lo requiera.

Después de haber leído la información contenida en esta hoja doy mi consentimiento a participar en este proyecto.

Nombres y apellidos _____ CI _____

Dirección _____

Firma

Responsable de la obtención del consentimiento informado _____

CI _____ Fecha _____

Firma

Anexo 3: Preparación de solución de Lisis en la extracción de ARN.

Para preparar la solución de lisis se utilizó el carrier proporcionado en el Kit de extracción. El carrier de ARN es un reactivo que permite separar de manera exclusiva una gran cantidad de ARN adhiriendo la molécula a resina de intercambio iónico, se preparó una solución del carrier con tampón de lisis L22 para utilizarlo con posterioridad en la extracción, los cálculos se realizaron con la siguiente fórmula:

N (número de muestras) \times 0.21 mL (volumen de tampón de lisis requerido) = A mL (Volumen de “Lysis Buffer” (L22) para preparar la solución).

A mL \times 28 μ L/mL = B μ L (Volumen del carrier de RNA (1 μ g/ μ L) para añadir a “Lysis Buffer” (L22)

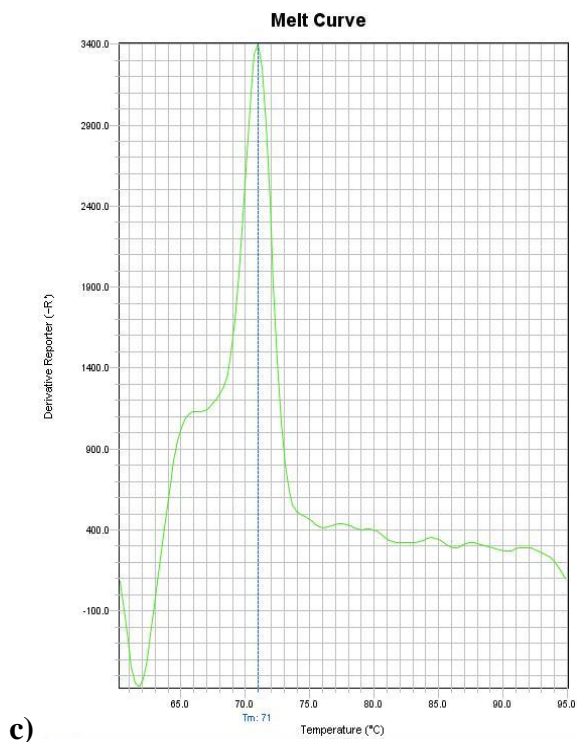
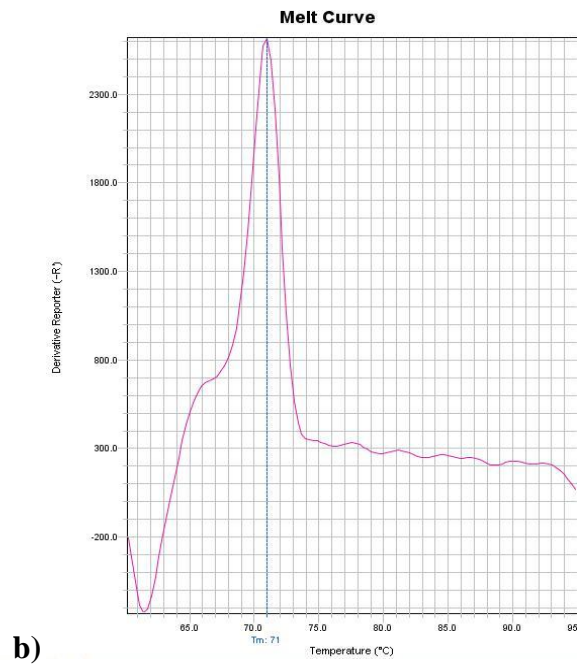
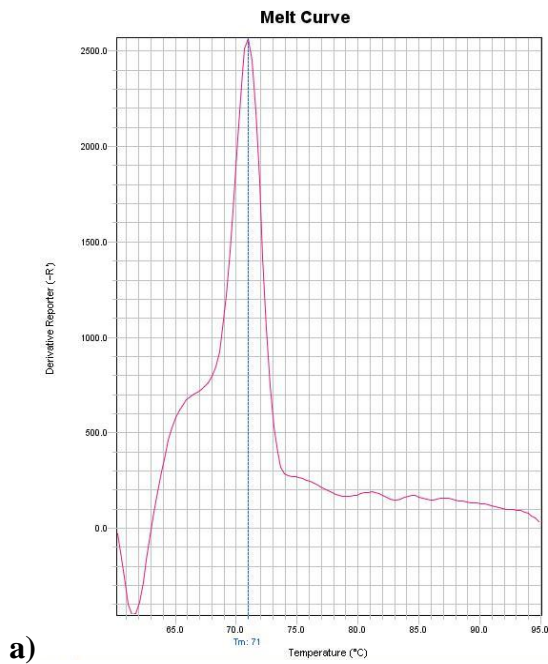
Anexo 4: Resultados de las Tm de los 139 voluntarios que participaron en el proyecto.

CODIGO	Tm	CODIGO	Tm	CODIGO	Tm	CODIGO	Tm
A001	70,97	A037	71,1	A073	70,55	A110	71,14
A002	71,12	A038	71,1	A074	70,4	A111	71,44
A003	70,97	A039	71,45	A075	70,55	A112	71,29
A004	70,97	A040	70,25	A076	70,4	A113	71,14
A005	70,97	A041	70,56	A077	70,55	A114	70,7
A006	70,97	A042	70,55	A078	70,55	A115	70,7
A007	70,97	A043	70,1	A079	70,55	A116	71,14
A008	71,12	A044	*	A080	70,25	A117	70,99
A009	70,82	A045	70,4	A081	70,55	A118	*
A010	70,97	A046	70,1	A082	70,55	A119	71,09
A011	70,97	A047	70,39	A083	70,85	A120	71,39
A012	70,82	A048	70,25	A084	70,7	A121	71,09
A013	70,82	A049	70,1	A085	70,7	A122	71,24
A014	70,97	A050	*	A086	70,7	A123	71,24
A015	71,29	A051	70,41	A087	70,7	A124	71,09
A016	70,39	A052	70,1	A088	70,7	A125	71,24
A017	71,14	A053	70,25	A090	70,55	A126	71,24
A018	70,99	A054	70,69	A091	70,55	A127	71,39
A019	71,14	A055	70,69	A092	70,1	A128	71,09
A020	70,84	A056	70,69	A093	70,7	A129	70,94
A021	71,44	A057	70,55	A094	70,55	A130	71,39
A022	71,14	A058	70,69	A095	70,7	A131	70,94
A023	71,44	A059	*	A096	70,7	A132	71,09
A024	71,44	A060	70,84	A097	70,55	A133	71,09
A025	71,44	A061	70,69	A098	70,99	A134	71,24
A026	70,99	A062	70,84	A099	70,84	A135	71,24
A027	70,7	A063	70,84	A100	70,84	A136	71,39
A028	71,44	A064	70,4	A101	*	A137	71,53
A029	71,3	A065	70,99	A102	71,29	A138	71,09
A030	70,55	A066	70,7	A103	71,14	A139	71,09
A032	71,3	A068	70,55	A105	71,14	(*) Ausencia de amplificación.	
A033	71,15	A069	70,84	A106	70,99		
A034	70,7	A070	70,55	A107	70,99		
A035	71,3	A071	70,25	A108	71,14		
A036	71,3	A072	70,84	A109	71,14		

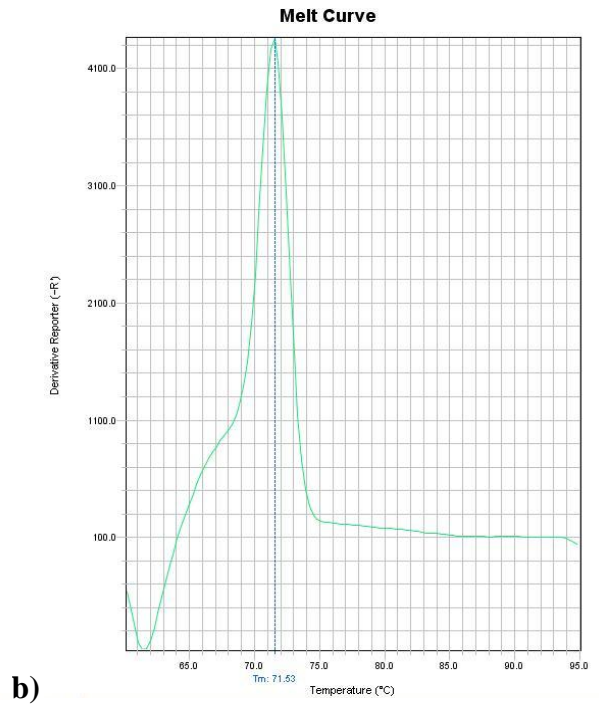
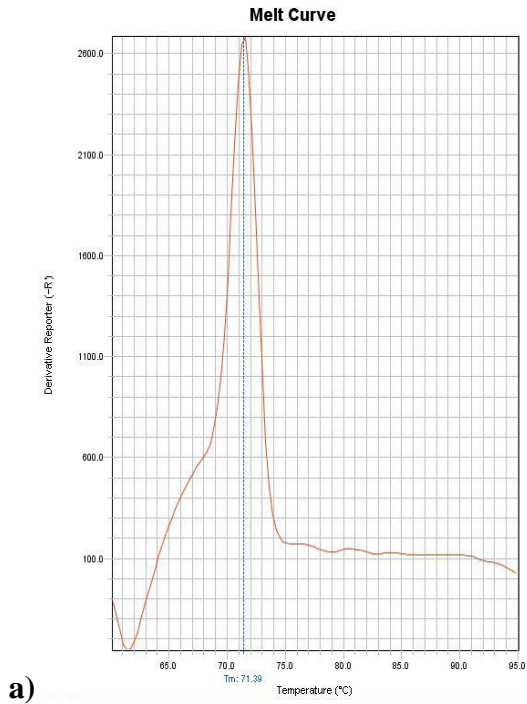
Anexo 5: Resultados de las Tm de los 61 pacientes que tenían antecedentes familiares con cáncer reclutados del centro ONCOVIDA.

CODIGO	Tm	CODIGO	Tm
F001	70,4	F037	70,71
F002	70,7	F038	70,55
F003	70,7	F039	70,71
F004	70,7	F040	71,01
F005	70,1	F041	70,85
F006	71,24	F042	*
F007	70,7	F043	*
F008	70,1	F044	*
F009	70,4	F045	70,26
F010	70,84	F046	70,41
F011	70,7	F047	70,41
F012	70,7	F048	*
F013	70,7	F049	70,41
F014	70,55	F050	70,41
F015	70,7	F051	71,14
F016	70,55	F052	70,11
F017	69,95	F053	71
F018	70,84	F054	*
F019	70,7	F055	70,26
F020	70,4	F056	*
F021	70,55	F057	71
F022	*	F058	71
F023	70,69	F059	71,24
F024	*	F060	71,39
F025	70,25	F061	71,39
F027	*	(*) Ausencia de amplificación.	
F028	70,84		
F029	70,7		
F030	70,55		
F031	70,56		
F032	71,01		
F033	*		
F034	70,55		
F035	*		
F036	70,41		

Anexo 6. Curvas melting del fragmento Bat 25 obtenido del equipo Step One plus de los tres casos aparentemente positivos con un T_m de 71°C (estos pacientes cumplen parcialmente con los criterios de Amsterdam).

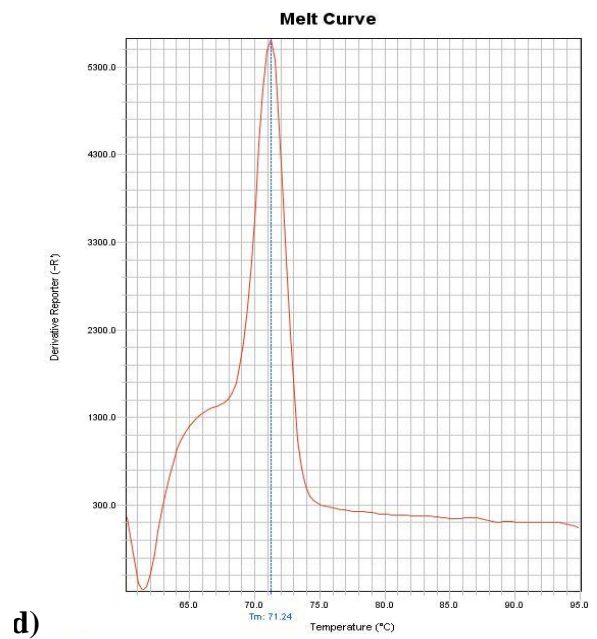
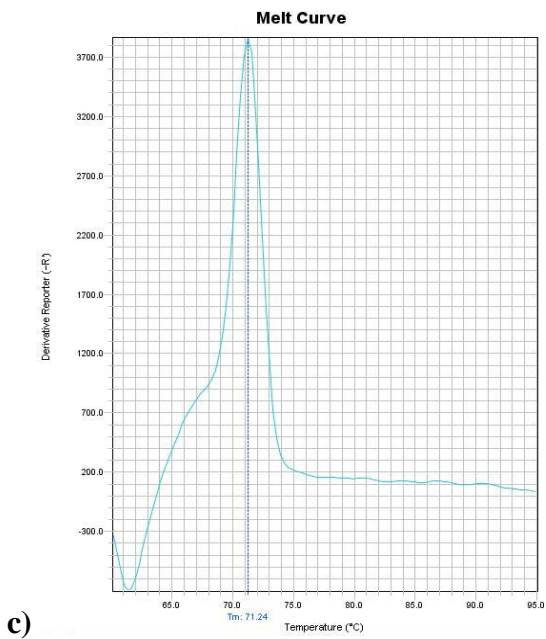


Anexo 7. Tm de pacientes controles que aparentemente no presentan la alteración en el marcador BAT25.



a)

b)



c)

d)

Anexo 8: Resultados de los pacientes para el marcador CK-20.

Nro.	CODIGO	HISTOPATOLOGIA Y COLONOSCOPIA	SANGRE CK-20
1	P001	Cáncer de rectosigmoide, asociado a colitis crónica activa	POSITIVO
2	P002	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
3	P003	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
4	P004	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
5	P005	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
6	P006	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
7	P007	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
8	P008	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
9	P009	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
10	P010	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
11	P011	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
12	P012	EII	NEGATIVO
13	P013	EII	POSITIVO
14	P014	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
15	P015	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
16	P016	EII	POSITIVO
17	P017	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
18	P018	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
19	P019	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
20	P020	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
21	P021	EII	NEGATIVO
22	P022	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
23	P023	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
24	P024	EII	NEGATIVO
25	P025	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
26	P026	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
27	P027	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
28	P028	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
29	P029	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
30	P030	EII	POSITIVO
31	P031	EII	POSITIVO
32	P032	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
33	P033	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
34	P034	EII	NEGATIVO

35	P035	EII	POSITIVO
36	P036	Cáncer de colon, asociado a colitis crónica activa	NEGATIVO
37	P037	EII	NEGATIVO
38	P038	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
39	P039	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
40	P040	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
41	P041	Pólipo asociado a colitis crónica activa	NEGATIVO
42	P042	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
43	P043	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
44	P044	EII	POSITIVO
45	P045	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
46	P046	EII	POSITIVO
47	P047	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
48	P048	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
49	P049	EII	POSITIVO
50	P050	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
51	P051	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
52	P052	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
53	P053	EII	POSITIVO
54	P054	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
55	P055	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
56	P056	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
57	P057	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
58	P058	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
59	P059	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
60	P060	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
61	P061	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
62	P062	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
63	P063	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
64	P064	EII	POSITIVO
65	P065	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
66	P066	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
67	P067	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
68	P068	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
69	P071	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
70	P073	EII	POSITIVO
71	P075	EII	POSITIVO

72	P076	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
73	P077	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
74	P078	EII	NEGATIVO
75	P079	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
76	P080	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
77	P082	EII	POSITIVO
78	P083	EII	POSITIVO
79	P084	EII	POSITIVO
80	P085	EII	NEGATIVO
81	P086	EII	NEGATIVO
82	P087	Sin anormalidades en el estudio colonoscópico	NEGATIVO
83	A056	Antecedentes de ulcera duodenal y neurofibromatosis	POSITIVO
84	A061	Dolor abdominal, presencia de sangre en heces fecales	POSITIVO
85	A034	Paciente aparentemente sano	NEGATIVO
86	A053	Paciente aparentemente sano	NEGATIVO
87	A060	Paciente aparentemente sano	NEGATIVO
88	A062	Paciente aparentemente sano	NEGATIVO
89	A063	Paciente aparentemente sano	NEGATIVO
90	A069	Paciente aparentemente sano	NEGATIVO

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aguilera, P., Ruiz, T. M., Rocha, M. M. G., Pineda, O. B., y Chánez, C. M. (2010). PCR en tiempo real. *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología*, 175-201.
- Aktar, A. M., Choy, H., Habib, A. A., y Saha, D. (2007). SNS-032 Prevents tumor cell-Induced Angiogenesis By inhibiting vascular endotelial growth factor. *Neoplasia*, 9(5), 370-381.
- Aladrén, B. S., Gassull, M. A., Gomollón, F. (2007). Epidemiología de las enfermedades inflamatorias intestinales. Factores ambientales internos y externos en su patogenia. *ARAN*, 3, 29-50.
- Alazzouzi, H. (2006). La inestabilidad genómica en cáncer (Tesis de Doctorado). Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- Alejandro, S. J. (2008). Quimioprevención en cáncer de colon. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 7(4), 20-21.
- Alison, J. B., Sue, M. F. y Robert, C. B. (1999). The IGF axis and programmed cell death. *Immunology and cell Biology*, 77, 256-262.
- Alvarado, M. J. A., y Mayani, H. (2006). El ciclo celular y su papel en la biología de las células progenitoras hematopoyéticas. *Gac Méd Méx*, 143(2), 149-161.
- Amarillo, H. A., Fourcans, S., Katsini, B. R., Manson, R. R., y Amarillo, H. R. (2008). Tabaquismo y cáncer colorrectal. *Revista Mexicana de Coloproctología*, 14(2), 57-62.
- American Cancer Society. (2014). *Cáncer Colorrectal*.
- American Cancer Society. (2015). *Endoscopia*.
- Aquino, P. C. G., y Jurado, S. F. (2008). citoqueratinas en dermatología. *Dermatologia Rev Mex*, 52(6), 254-262.
- Arredondo, P. R. (1993). La reacción en cadena de la polimerasa, PCR: un impacto reciente en la biología molecular. *UNAM*, 3-14.
- Avi, A., y Vishva, M. D. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. Elsevier, *Cell Regulation*, 11, 255-260.
- Barault, L., Veyrie, N., Jooste, V., Lecorre, D., Chapusot, C., Ferraz, J., Lièvre, A., Cortet, M., Bouvier, A., Rat, P., Roignot, P., Faivre, J., Laurent-Puig, P., y Piard, F. (2008). Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3OH kinase)

signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *Int. J. Cancer*, 122, 2255-2259.

Brandan, N., Juaristi, J., Aguirre, V., y Romero, B. M. (2002). *Oncogenes y genes supresores de tumores*. Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Medicina, Cátedra de Bioquímica.

Brunner, N., Duffy, M. J., Haglund, C., Holten, A. M., y Jorgen, N. H. (2013). Marcadores tumorales en cáncer colorrectal. *Acta Bioquím Clin Latinoam*, 47(3), 595-607.

Bryan, T. M., Englezou, A. Gupta, J., Bacchetti, S., y Reddel, R. R. (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *The EMBO Journal*, 14(17), 4240-4248.

Bryan, T. M., y Cech, T. R. (1999). Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Elsevier*, 11, 318-324.

Bustin, S.A., Gyselman, V.G., Siddiqi, S., Dorudi, S. (2000). Cytokeratin 20 is not tissue-specific marker for the detection of malignant epithelial cells in the blood of colorectal cancer patients. *Int J Surg Investig*, 2, 49-57.

Calderon, V. R. (2005). La apoptosis en biología y patología. *Revista Peruana de cardiología*, 31(2), 119-128.

Campos, S. M. (2012). Utilidad pronóstica de la detección de células tumorales circulantes (CTCS) en pacientes con tumores sólidos de origen epitelial (Tesis de Doctorado). Universidad de Jaén, España.

Cantos, S. B., Sánchez, R. A., Maximiano, A. C., Hurtado, N. A., y Sánchez, Y. M. R. (2006). Carcinoma de origen desconocido: diagnóstico y manejo terapéutico. *Oncología*, 29(3), 95-106.

Cárdenas, C. W. A. (2006). Análisis de la inestabilidad de microsatélites mediante el marcador BAT-26 en una muestra de pacientes diagnosticados con cáncer gástrico o colorrectal en el hospital universitario de Santander (Trabajo de grado). Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Bucaramanga,

Carter, A. B., Misyak, S. A., Hontecillas, R., y Bassaganya, R. J. (2009). Dietary modulation of inflammation-induced colorectal cancer through PPAR γ . *PPAR Research*, 1, 1-9.

Casimiro, C. (2002). Factores etiopatogénicos en el cáncer colorrectal. Aspectos genéticos y clínicos. *Nutr. Hosp.*, 17(2), 63-71.

Castells, A., Marzob, M. B., Bellasc, F. J., Amadord, Á., Lanase, J. J., Mascortf, J., Ferrándizg, P., Alonsob, V., Piñola, M., Fernándezh, X., Bonfillb, J. M., Piquéa. (2004). Guía de práctica clínica sobre la prevención del cáncer colorrectal. *Gastroenterol Hepatol*, 27(10), 73-634.

Castro S. G. R. (2010). Estandarización de la técnica RT-PCR a tiempo real para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Tesis de grado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.

Catasús, L., y Guiu, M. (1997). Técnicas moleculares para la obtención de DNA y reacción en cadena de la polimerasa. *Servicio de Anatomía Patológica*, 30(2), 163-168.

Charúa, G. L., Lagunes, G. A. A., Villanueva, H. J. A., Jiménez, B. B., Avendaño, E. O., y Charúa, L. E. (2009). Comportamiento epidemiológico del cáncer de colon y recto en el hospital general de México. Análisis de 20 años: 1988-2007. *Rev Gastroenterol Mex*, 74(2), 99-104.

Cid, M. P., Ortíz, R. A., Antón, B. I., San Miguel, F. P., Álvarez, A. C., Zungri, T. E. De la Fuente, B. A. (2002). Expresión coordinada de citoqueratina 7 y 20 en el carcinoma transicional de vejiga: utilidad diagnóstica. *Actas Urol Esp*, 26(4), 279-284.

Contreras, V. D. D. (2013). Histopatología de la apoptosis. Principios generales de la apoptosis el "suicidio celular". *Morfología*, 5(2), 6-21.

Cortazar, M. A., y Silva, R. E. P. (2004). Métodos físico-químicos en biotecnología PCR. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, México.

Counter, C. M., Avilion, A. A., Lefevre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B., y Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *The EMBO Journal*, 11(5), 1921-1929.

Cruz, T. P. A., Villegas, G. V. E., y Ramirez, C. S. R. (2008). Fundamento biológico y aplicación clínica de los marcadores tumorales séricos. *Rev. Cienc. Salud. Bogotá (Colombia)*, 6(2), 85-98.

Cruz-Bustillo, C. D. (2004). Molecular genetics of colorrectal cancer. *Revista española de enfermedades digestivas*, 96(1), 48-59.

Den Bakker, M. A., Seynaeve, C., Kliffen, M., Dinjens, W. N. M. (2003). Microsatellite instability in a pleomorphic rhabdomyosarcoma in a patient with hereditary non-polyposis colorrectal cancer. *Histopathology*, 43, 297-299.

Dimmler, A., Gerhards, R., Betz, C., Gunther, K., Reingruber, B., Horbach, T., Baumann, I., Kirchner, T., Hohenberger, W., Papadopoulos, T. (2001). Transcription of cytokeratins 8, 18, and 19 in bone marrow and limited expression of cytokeratins 7 and 20 by carcinoma cells: inherent limitations for RT-PCR in the detection of isolated tumor cells. *Lab Invest*, 8, 1351–136.

Dominguez, M. V., Bastos, E. P., Silva, S. D., y Rossi, B. M. (2009). Métodos de investigación molecular en la detección de mutaciones germinativas en cáncer colorrectal hereditario. *Rev gastroenterol Peru*, 29(3), 1-15.

Dorado, P. G. (2015). Amplificación de DNA mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, 1-18.

Espinosa, A. L. (2004). Guía práctica sobre la técnica de PCR. Las herramientas moleculares, 317-340.

Espinosa, M. B. (2014). Apoptosis, muerte celular fisiológica, reseña histórica y actualidad. *Revista de educación en Biología*, 16(2), 153-159.

Fan, H., y Chu, J. (2007). A brief review of short tandem repeat mutation. *Geno. Prot. Bioinfo.*, 5(1), 7-14.

Ferbeyre, B. L. y Salinas, G. J. (2005). Bases genéticas y moleculares del cáncer / 2a. parte. *Gamo*, 4(3), 76-81.

Figueroa, C., Quera, P. R., Valenzuela, E. J., y Jensen, B. C. (2005). Enfermedades inflamatorias intestinales: Experiencia de dos centros chilenos. *Rev Méd Chile*, 133, 1295-1304.

Friedenreich, C., Norat, T., Steindorf, K., Boutron, R. M., Pischon, T., Mazuir, M., Clavel, C. F., Linseisen, J., Boeing, H., Bergman, M., Fons, J. N. Tjonneland, A., Overvad, K., Mendez, M., Quirós, R., Martinez, C., Dorronsoro, M., Navarro, C., Barricarte, G. A., Bingham, S., Khaw, K., Allen, N., Key, T., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., Orfanou, N., Krogh, V., Palli, D., Tumino, R., Panico, S., Vineis, P., Bas, B. H., Peeters, P. H. M., Monninkhof, E., Berglund, G., Manjer, J., Ferrari, P., Slimani, N., Kaaks, R., y Riboli, E. (2006). Physical activity and risk of colon and rectal cancers: The European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15(12), 2398-2407.

Fuentes A. A., Ruiz M. J. y López B. H. (2008). Factores hormonales asociados a cáncer colorrectal. *Gamo*, 7(4), 16-19.

- Funaki, N., Tanaka, J., Ohshio, G., Onodera, H., Maetani, S., y Imamura, M. (1998). Cytokeratin 20mRNA in peripheral venous blood of colorrectal carcinoma patients. *British Journal of cancer*, 77(8), 1327-1332.
- Galiano de Sánchez, M. T. (2005). Cáncer Colorrectal (CCR). *Rev Colombiana de Gastroenterología*, 20(1), 43-53.
- Gallego, P. R., Pinazo, D. M. D., y Serrano, M. (2010), El ciclo celular y el gen p53. Aproximación a la oftalmología molecular. *Elsevier Doyma*, 85(7), 229-231.
- Gandur, N. (2011). Introducción a la oncología. Breve historia del cáncer. Definiciones. *Manual de enfermería oncológica*, 7-9.
- García, D. I. (2009). Evaluación e importancia clínica de la detección de micrometastasis linfáticas en pacientes con cáncer colorrectal. Determinación de citoqueratina 20 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnica de inmunohistoquímica (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona. España.
- García, R. R., Ayala, R. P. A., Perdomo, V. S. P., y Post, D. (2012). Epigénica: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana, *Rev. Cienc. Salud*, 10(1), 59-71.
- García, T. J., y Hernández, C. (2002). La inmunohistoquímica en el cáncer metastásico. Laboratorio de Patología Molecular NOVAPATH. Caracas-Venezuela.
- Garrido, S. M., Ramírez, V. P., Risueño, A. C., Orellana, U. E., Galindo, A. H., y Álvarez, Z. M. (2008). Detección de micrometástasis por RT-PCR de citokeratina 20 y su correlación con la sobrevida global en pacientes portadores de cáncer colorrectal. *Rev Med Chile*, 136, 482-490.
- Gerhard, C., y Henrik, S. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour suppressor gene. *Elsevier Science*, 73-75.
- Giribaldí, G., Procida, S., Ulliers, D., Mannu, F., Volpatto, R., Mandili, G., Fanchini, L., Bertetto, O., Fronda, G., Simula, L., Rimini, E., Cherchi, G., Bonello, L., Maule, M. M., y Turrini, F. (2006). Specific detection of cytokeratin 20-positive cells in blood of colorrectal and breast cancer patients by a high sensitivity Real-time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction Method. *Journal of Molecular Diagnostics*, 8(1), 105-112.
- GLOBOCAN. (2012). El cáncer en el mundo.
- Gómez, L. E. (2011). La transcriptasa inversa: historia de un descubrimiento. *Virología*, 14 (2), 18-23.

Gómez, L. M., Fernández, G. E. J., y Jordán J. (2004). La proteína p53 en procesos neurodegenerativos en sus 25 años de historia. *Rev NEUROL*, 39(3), 243-250.

Greif, G. (2015). PCR; Reacción en cadena de la polimerasa. Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur Montevideo, 1-19.

Guía clínica del cáncer colorrectal del Hospital Reina Sofía. (2005). Protocolo cáncer colorrectal; Diagnóstico, tratamiento y seguimiento. Servicio Andaluz de Salud. Cordoba.

Guías de práctica clínica en cáncer de Cataluña. (2008). Onco Guía de colon y recto. Generalit de Catalunya, Departament de Salut. www.gencat.cat/salut.

Guzmán, B. P., Patiño, N. R., Quinteros, V. R., Heredia, A. R., y Chuquimia, L. (2006). Cáncer de colon y recto en el hospital obrero N°2 de la C.N.S. y el instituto gastroenterológico boliviano japonés. *Gaceta Medica Boliviana*, 16-22.

Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2000), The hallmarks of cáncer. *Cell Press*, 100, 57-70.

Hano, G, O. M., Wood, R. L., Galbán, G. E., y Abreu, V. M. (2011). Factores de riesgo para el cáncer colorrectal. *Revista Cubana de Medicina*, 50(2), 118-132.

Herman, J. G., Umar, A., Polyak, K., Graff, J. R., Ahuja, N., Issa, J. J., Markowitz, S., Willson, J. K. V., Hamilton, S. R., Kinzler, K. W., Kane, M. F., Kolodner, R. D., Vogelstein, B., Kunkel, T. A., y Baylin, S. B. (1998). Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorrectal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 6870-6875.

Hernández, G. A. (2013). Lesiones neoplásicas del colon: Diagnóstico y tratamiento endoscópico. *Revista de Gastroenterología de Mexico*, 78(1), 16-18.

Hernández, M. M., y Rios, H. M. (1999). Oncogenes y cáncer. *Rev Cubana Oncol.*, 15(2), 131-139.

Herrera, M. G., Gamboa, M. M., Duran, B. G., y Monge, C. C. (2013). Tamizaje de cáncer colorrectal. *Revista médica de costa rica y centroamerica LXX*, 606, 273-280.

Instituto Catalán de Oncología. (2009). El cáncer colorrectal Un cáncer que se puede prevenir. Ministerio de Educación y Ciencia de España, 4-27.

Instituto de Gastroenterología Boliviano Japonés (IGBJ). (2015). Número de casos de cáncer digestivo. Unidad de Epidemiología del IGBJ de La Paz – Bolivia.

Jarvinen, H. J., Renkonen, S. L., Aktán, C. K., Peltomaki, P., Aatomen, L. A., y Pekka, M. J. (2009). Ten years after mutation testing for Lynch síndrome: cancer incidence and outcome in mutation-positive and mutation negative family members. *J Clin Oncol*, 27, 4793-4797.

Jensen, B. C. (2008). Cáncer de colon y recto. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades digestivas, Sociedad chilena de Gastroenterología, 233-245.

Johnson, J. P. (1991). Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer and Metastasis Reviews*, 10, 11-22.

Juárez, V. C. I., y Rosales, R. M. A. (2014). Cáncer colorrectal (CCR): alteraciones genéticas y moleculares. *Gaceta Médica de México*, 150, 154-164.

Kane, M. F., Loda, M., Gaida, G. M., Lipman, J., Mishra, R., Goldman, H., Jessup, J. M., y Kolodner, R. (1997). Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and Mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Research*, 57, 808-811.

Kinzler, K. W., y Vogelstein, B. (1996). Lesson from hereditary colorrectal cáncer. *Cell Press*, 87, 159-170.

Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., y Khorana, H. G. (1971). Repair replication of short synthetic DNA's as catalysed by DNA polymerases. *J mol Biol*, 56, 341-361.

Laura L., Tirado G. y Mohar B. A. (2008). Epidemiología del cáncer de colon y recto. *Gamo*, 7(4), 3-11.

Li, R., Sonik, A., Stindi, R., Rasnick, D., y Duesberg, P. (2000). Aneuploidy vs. Gene mutation hypothesis of cancer recent study claims but is found to support aneuploidy. *PNAS*, 97(7), 3236-3241.

Locker, G. Y., Hamilton, S., Harris, J., Jessup, J. M., Kemeny, N., Macdonald, J. S., Somerfield, M. R., Hayes, D. F., y Bast, R. C. (2006). ASCO 2006 Update of recomendations for the use of tumor markers in Gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol*, 24, 5313-5327.

Lomanto, D. L. D, Ortiz, C. O. L., Bretón, P. C. O., Gómez, L. A. I., y Mesa, C. V. M. (2003). El ciclo celular. *Med UNAB*, 6(16), 21-29.

López, M., Anzola, M., Cuevas-Salazar, N., Aguirre, J. M., y Martínez de Pancorbo, M. (2001). p53, un gen supresor tumoral. *Gaceta Medica de Bilbao*, 98(1), 21-27.

Lynch, H. T, y Krush, A. J. (1971) Cancer family “G” revisited: 1895-1970. *Cancer*, 27(6), 1505-1511.

Maestre, F. C. (2009). Ciclo celular y neurodegeneración: implicación de la E3 ubiquitina ligasa APC/C-Cdh1 en la excitotoxicidad (Tesis de Doctorado). Universidad de Salamanca, España.

Maillo, O. C. L. (1995). Biología molecular del cáncer colorrectal esporádico: análisis de la inestabilidad genómica y de las pérdidas de heterocigosidad (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina. España.

Majumdar, D., Tiernan, J. P., Lobo, A. J., Evans, C. A., Corfe, B. M. (2012). Keratins in colorrectal epithelial function and disease. *Int. J. Exp. Pathol.*, 93, 305-318.

Manjarrez, H. A. (1998). Oncogenes. *Revista especializada en ciencias de la salud*, 1(2), 41-45.

Manual de prevención de infecciones en procedimientos endoscópicos. (2008). Sistema CIH. COCEMI.FEMI.

Martín de Civetta, M. T., Domingo, C. J. (2011). Carcinogénesis. *Salud pública de México*, 53(5), 405-414.

Martin, G. E. (2015). Introducción al diseño de primers. *Introducción a la Bioinformática*, 1-12.

Martínez de Victoria M. E., Mañas A. M. y Yago T. M. (2005). Digestión y absorción. *Fisiología de la digestión*, 250-293.

Martini, M., Ciccarone, M., Garganese, G., Maggiore, C., Evangelista, A., Rahimi, S., Zannoni, G., Vittori, G., y Larocca, L. M. (2002). Possible involvement of hMLH, p16 INK 4a and PTEN in the malignant transformation of endometriosis. *Int. J. Cancer*, 102, 398-406.

Masyelly, R., Siham, S., y Lisbeth, B. (2009). Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación. *Revista Médica de la extensión Portuguesa*, 4(3), 92-106.

Medina, B. E., Fuentes, L. D., Suárez, C. L., y Prieto, B. G. (2009). Enfermedad inflamatoria intestinal. *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNP-AEP*, 151-160.

Megías, M., Molist, P. y Pombal, M. A. (2015). Ciclo celular. *Atlas de histología vegetal y animal*, webs.uvigo.es/mmegias/inicio.html.

Meresman, G. (2011). Relevancia de la apoptosis en la reproducción femenina. *Investigación Clínica*, 52(3), 274-290.

Michael, J. R. (1993). How many mutations are required for tumorigenesis implications from human cáncer data. *Molecular Carcinogenesis*, 7, 139-146.

Ministerio de Salud de Chile. (2012). Primer Informe de Registros poblaciones de cáncer de Chile. Unidad de vigilancia de enfermedades no transmisibles y estudios, Departamento de epidemiología, División Planificación Sanitaria, Subsecretaría de Salud Pública.

Ministerio de salud del Estado Plurinacional de Bolivia. (2016). Datos del Cáncer en Bolivia.

Monzón, O. G., Mora, P. E., Torrez, T. L., Dary, G. L., y Rubi, C. (2011). Bases moleculares del cáncer. *Repertorio de medicina y cirugía*, 20(4), 210-216.

Moreira, A. M. (2007). *Colitis Ulcerosa y Enfermedad de Crohn*. Universidad de Barcelona. España.

Morgan V. G. y Silva U. A. (2008). Factores de riesgo para cáncer colorrectal. *Gamo*, 7(4), 12-15.

Morsi, M. I., Youssef, A. I., Hassouna, M. E., El-Sedafi, A. S., Ghazal, A. A., y Zaher, E. (2006). Telomerase activity, Cytokeratin 20 and Cytokeratin 19 in Urine cells of bladder cancer patients. *Journal of the Egyptina Nat. Cancer Inst.*, 18(1), 82-93.

Muracén, D. I., Martínez, J. A., Aguilar, M. J. M., Gonzáles, R. M. R. (2001). Pesquisaje de alcoholismo en un área de salud. *Rev Cubana Med Gen Integr*, 17(1), 62-67.

Navarro, S., Pérez, S. P., Cajal, S. R., Salazar, R., García, F. J., Musulén, P. E., García, C. R., Payá, A., y García, A. P. (2012). Recomendación para la determinación de biomarcadores en el carcinoma colorrectal. Consenso nacional de la sociedad española de anatomía patológica y de la sociedad española de oncología médica. *Rev Esp Patol.*, 45(3), 130-144.

Núñez, V. R., y Escalona, M. J. R. (2002). *Ciclo celular*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina, México.

Ñique, C. C., Sánchez, R. F., Lettieri, B., Wernhoff, P., Dominguez, V. M. (2014). Caracterización molecular de cáncer colorrectal hereditario en Perú. *Rev Gastroenterol Perú*, 34(4), 299-303.

Ocaña, P. E., y Gassó, C. M. (2011). Cáncer colorrectal: mutaciones en KRAS y EGFR. *Ed Cont Lab Clin*, 14, 32-44.

Ogino, S., Noshō, K., Meyerhardt, J. A., Kirkner, G. J., Chan, A. T., Kawasaki, T., Giovannucci, E. I., Loda, M., y Fuchs, C. S. (2008). Cohort study of fatty acid synthase expression and patient survival in colon cancer. *J Clin Oncol*, 26(35), 5713-5720.

Oliveira, E. J., Gomes, P. J., Imaculada, Z. M., Vencovsky, R., y Carneiro, V. M. L. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29(2), 294-307.

OLYMPUS. (2013). Manual sobre el método de endoscopia. Instrucciones de utilización asociadas con el sistema.

OPS. 2011. Enfermedades no transmisibles en las Américas: Indicadores básicos 2011. Washington D.C.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2015). Cáncer Colorrectal

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). Cáncer Colorrectal.

Ospina, N. J., y Villamizar, S. J. (2010). Indicaciones de procedimientos endoscópicos. *Gastroenterología de Bolsillo. Hospital cardiovascular del niño de Cundimarca*.

Ou, C. Y., Chang, J. G., Tseng, H. H., Wei, H. J., Su, T. H., Hsu, T. Y., Chang, C. P., Lee, H. H. (1999). Analysis of microsatellite instability in cervical cancer. *Int J Gynecol*, 9, 67-71.

Palacio, R. K. A. y Muñeton, P. C. M. (2011). Bases moleculares del cáncer colorrectal. *Latreia*, 25(2), 137-148.

Paredes, C. A., Gallegos, B. F., y Gálvez, D. (2004). *Gastroenterología, Medicina Interna. Unidad de Gastroenterología. Universidad de la Frontera. Temuco Chile*.

Paredes, L. M. (2014). Análisis mutacional de microsatelites humanos. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá-Colombia.

Passalacqua, H. C., Aravena, C. T., Castillo, T. S. (2010). Genética del cáncer del colon. *Rev Hosp Clin Univ Chile*, 21, 162-169.

Peña, C. Y. Y. (2013). El ciclo celular y su papel en el desarrollo, crecimiento, restitución y reparación de tejidos. Propuesta de aula para los estudiantes de ciclo tres (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.

Peralta, Z. O., Behena, R. M., Diaz, B. C. E. y Madrid, M. V. (1997). Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud pública de México*, 39(5), 451-462.

Perea, G. J. (2009). Caracterización clínica, molecular e inmunofenotípica del cáncer colorrectal en menores de 45 años (Tesis de Doctorado). Universidad de Salamanca, España.

Pérez, T. C., Puebla, M. A., y Miján de la Torre, A. (2008). Tratamiento nutricional en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Nutr Hosp*, 23(5), 417-427.

Pérez-Carro, R. A., Lozano, R. A., García, C. T., y Labella, C. T. (2000). "El gen supresor p53 como valor pronostico en el carcinoma epidermoide de laringe: estudio molecular". Hospital clínico universitario de Santiago de Compostela, www.sgorl.org.

Pinilla, B. G., Cubillo, K., y Rodríguez, M. (2008). Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa. *Publicación científica en ciencias biomédicas*, 6(9), 101-212.

Quintela, S. D., López, S. J. J., y Senra, V. A. (2001). La proteína p53 y el cáncer de mama. Revisión crítica. *Rev Senología y Patol Mam*, 14(2), 71-77.

Registro Nacional de Cáncer. (2012), Casos de cáncer de colon. Programa de enfermedades no transmisibles, Ministerio de Salud del Estado Plurinacional de Bolivia.

Ribatti, D., Nico, B., Ranieri, G., Sprcchia, G., y Vacca, A. (2013). The role of angiogenesis in human non-hodgkin lymphomas. *Neoplasia*, 15(3), 231-238.

Ríos, D. J., y Rivero, C. G. (1992). Estudio clinicopatológico de 26 casos de cáncer colorrectal. *Cuadernos*, 38, 19-24.

Roa, S. J. C., García, M. P., Melo, A. A., Tapia, E. O., Villaseca, H. M., Araya O. J. C., y Guzmán, C. P. (2008). Estudio de patrones de metilación génica en tumores del tubo digestivo. *Rev med Chile*, 136(4), 451-458.

Rodrigo, L., y Riestra, S. (2007). Dieta y cáncer de colon. *Rev Esp Enferm Dig*, 99(3), 183-189.

Rodríguez, F. L., Hernández, B. E., y Reyes, E. J. A. (2004). El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer. *Biotecnología Aplicada*, 21, 60-69.

Rodríguez, S. I. P., y Barrera, S. H. A. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, 7(3), 323-335.

Roseto, A., y Brenner, C. (1999). Apoptosis o la muerte celular programada. *Progresos en Pediatría: Medicina molecular*, 97(4), 253-275.

Sakao, S., y Tatsumi, K. (2011). Vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension: Multiple cancer-like pathways possible treatment modalities. *International Journal of Cardiology*, 147, 4-12.

Sandoval, G. A. P., Espinosa, J. E., y Barahona, A. (2008). Celdas peltier: Una alternativa para sistemas de enfriamiento con base en semiconductor. *Instituto de electrónica. Universidad tecnológica de la mixteca*. 1-9.

Sanz, G. S. M. (2006). Control del ciclo celular y fisiopatología vascular papel de los supresores de crecimiento P2/KIP1 y p53 (Tesis de doctorado). Universidad de Valencia, España.

Scott, W. A. (1925). The further study of a cancer family. *J Cancer Res*, 9, 279-286.

Sepúlveda, S. E., Beltrán, C. J., Peralta, A., Rivas, P., Rojas, N., Figueroa, C., Quera, R., Hermoso, M. A. (2008). Enfermedad inflamatoria intestinal: Una mirada inmunológica. *Rev Méd Chile*, 136, 367-375.

Serra, M. L., Cambra, E. S., Saltó, E., Roura, E., Rodríguez, F., Vallbona, C., y Salleras, L. (1994). Consejo y prescripción de ejercicio físico. *Med Clin Barcelona*, 102(1), 100-108.

Servicio Departamental de Información en Salud (SDIS). (2014). Datos Estadísticos de Cáncer en Bolivia. Servicio Departamental de Salud (SEDES).

Shamsuddin, A. M., Phelps, B. A. P., y Trump, M. D. B. (1982). Human large intestinal epithelium. *Human Pathology*, 13(9), 790-803.

Silbernagl, S., y Lang, F. (2013). Inflamaciones intestinales crónicas. *Editorial Medica Panamericana*, 3, 170-171.

Skinner, S. A., y O'Brien, P. E. (1996). The microvascular structure of the normal colon in rats and humans. *Journal of surgical Research*, 61, 482-490.

Smith, C. G., Fisher, D., Claes, B., Maughan, T. S., Ldziaszczyk, S., Peuternan, G., Harris, R. James, M. D., Meade, A., Jasani, B., Adan, R. A., Kenny, S., Kaplan, R., Lambrechts, D., y Chadle, J. P. (2013). Somatic Profiling of the epidermal growth factor receptor pathway in tumors from patients with advanced colorectal cancer treated with chemotherapy cetuximab. *Clin Cancer Res*, 19(15), 4103-4113.

Soeth, E., Vogel, L., Roder, C., Juhl, H., Marxsen, J., Kruger, U., Henne-Bruns, D., Kremer, B., y Kalthoff, H. (1997). Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. *Cancer Research*, 57, 3106-3110.

Soliman, P. T., y Lu, K. (2007). Cáncer de endometrio asociado con defecto en la reparación del ADN mal apareado. *Ostet Gynecol Clin N Am*, 34, 701-715.

Somma, M., y Querci, M. (2015). Análisis de la presencia de Organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos - Reacción en cadena de la polimerasa. *World Health Organization Regional Office for Europe*, 1, 3-32.

Spirio, L., Olschwang, S., Groden, J., Robertson, M., Samowitz, W., Joslyn, G., Gelbert, L., Thliveris, A., Carlson, M., Otterud, B., Lynch, H., Watson, P., Lynch, P., Laurent-Puig, P., Burt, R., Hughes, J. P., Thomas, G., Leppert, M., y White, R. (1993). Alleles of the APC Gene: An attenuated form of familial polyposis. *Cell Press*, 75, 951-957.

Stigliano, V., Assisi, D., Cosimelli, M., Palmirotta, R., Giannarelli, D., Mottolese, M., Sanchez, M. L., Mancini, R., y Casale, V. (2008). Survival of hereditary non-polyposis colorectal cancer patients compared whit sporadic colorectal cancer patients. *Journal of experimental y clinical cancer research*, 27(39), 1-5.

Suwa, K., Ohmori, M., y Miki, H. (1999). Microsatellite alterations in various sarcomas in japanese patients. *J Orthop Sci*, 4, 223-230.

Talseth, P. B. A., McPhillips, M., Groombridge, C., Spigelman, A., y Scott, R. J. (2010). MSH6 and PMS2 mutation positive Australian Lynch síndrome families: novel mutations, cancer risk and age of diagnosis of colorrectal cancer. *Hereditary Cancer in clinical practice*, 8(5), 1-10.

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, 2(2), 70-78.

Téllez, M. J., Cote, M. M. (2006). ALCOHOL ETÍLICO: Un tóxico de alto riesgo para la salud humana socialmente aceptado. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb*, 54, 32-47.

The Angiogenesis Foundation. (2014). Mejorando los resultados del tratamiento y manejo del cáncer colorrectal metastasico en América Latina. www.angio.org.

The University of Texas MD Anderson Cancer Center (2008). Síndrome de Lynch (Cáncer colorrectal hereditario sin poliposis HNPCC). Patient Education Office, 1-5.

Thoreson, R., y Cullen, J. J. (2007). Fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal: revisión. *Surg Clin N Am*, 87, 575-585.

Thorson, A. G., Knezetic, J. A., y Lynch, H. T. (1999). A century of progress in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch Syndrome). *Diseases of the Colon y Rectum*, 42(1), 1-9.

Toledo, G. D., y Cruz-Bustillo, C. D. (2005). La inestabilidad en microsatélites: algunos aspectos de su relación con el cáncer colorrectal hereditario no-polipoide. *Rev Cubana Invest Biomed*, 24(2), 1-15.

Tomio, A., y Isamu, K. (1989). Morphometrical and cell kinetic studies of normal human colorectal mucosa: Comparison between the proximal and the distal large intestine. *The Japanese society of pathology*, 725-730.

Torres, T. A., y Eugenia B. B. (1995). Reacción en cadena de la polimerasa. *Elementos*, 3(23), 16-21.

Torres, Z. N. M., Yan, Q. E. F., Díaz, P. J. A., y Burgos, C. O. A. (2006). Factores pronósticos de sobrevivencia en cáncer colorrectal resecable obstructivo y no obstructivo. *Rev Gastroenterol. Perú*, 26, 363-372.

Urrego, D. J., Otero, R. W., y Gómez, Z. M. (2014). *Helicobacter pylori* y cáncer de colon: Revisión. *Rev Col Gastroenterol*, 29(3), 255-261.

Vaish, M. (2007). Mismatch repair deficiencias transforming stem cells into cancer stem cells and therapeutic implications. *Molecular cancer*, 6(26), 1-8.

Valbuena, G. A. (2008). Regulación de la quinasa humana VRK1 por p53 y su implicación en la progresión del ciclo celular (Tesis de doctorado). Universidad de Salamanca, España.

Valdés, A., García, C. V., Simó, C., Cifuentes, A., y Ibáñez, C. (2012). Compuestos de la dieta y su efecto en cáncer de colon: Evaluación foodómica mediante técnicas de transcriptómica y metabolómica. *CTA*, 33(2), 51-66.

Varner, J. A., Chersesh, D. A. (1996). Integrins and cancer. *Current Biology*, 8, 724-730.

Vinueza, B. C. (2009). PCR en tiempo real: la nueva era de la información genética celular. *Revista electrónica de Veterinaria*, 10(2), 1-13.

Vlems, F. A., Diepstra, J. H. S., Cornelissen, I. M. H. A., Ruers, T. J. M., Ligtenberg, M. J. L., Punt, C. J. A., Van Krieken, J. H. J. M., Wobbes, Th., y Van Muijen, G. N. P. (2002). Limitations of cytokeratin 20 RT-PCR to detect disseminated tumour cells in

blood and bone marrow of patients with colorectal cancer: expression in controls and downregulation in tumour tissue. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 55, 156-163.

Wagner, A., Barrows, A., Wijnen, J. Th., Van der Klift, H., Franken, P. F. Verkuijnen, P., Nakagawa, H., Geugien, M., Jaghmohan, C. S., Breukel, C., Meijers, H. H., Morreau, H., Van Puijbroek, M., Burn, J., Coronel, S., Kinarski, Y., Okimoto, R., Watson, P., Lynch, J. F., Chapelle, A., Lynch, H. T., y Fodde, R. (2003). Molecular analysis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the United States: High mutation detection rate among clinically selected families and characterization of an American Founder Genomic Deletion of the MSH2 gene. *Am J. Hum. Genet.*, 72, 1088-1100.

Wielandt, A. M., Zárate, A. J., Hurtado, C., Orellana, P., Alvarez, K., Pinto, E. Contreras, L. Carvalán, A., Kronberg, U., y López, K. F. (2012). Síndrome de Lynch: selección de pacientes para el estudio genético mediante análisis de inestabilidad microsatelital e inmunohistoquímica. *Rev Med Chile*, 140, 1132-1139.

Wijnen, J., Khan, P. M., Vasen, H., Van der Klift, H., Mulder, A., Leeuwen, C. I. V., Bakker, B., Losekoot, M., Moller, P., y Fodde, R. (1997). Hereditary nonpolyposis colorectal cancer families not complying with the Amsterdam criteria show extremely low frequency of mismatch-repair-gene mutations. *Am. J. Hum. Genet.*, 61, 329-335.

World Gastroenterology Organisation. (2007). Tamizaje del cáncer colorrectal.

World Health Organisation (WHO). (2012). International Agency for Research on cancer.

Yang, Q., Zhang, R., Wang, X. W., Linke, S. P., Sengupta, S., Hickson, I. D., Pedrazzi, G., Perrera, C., Stagliar, I., Littman, S. J., Modrich, P., Harris, C. (2004). The mismatch DNA repair heterodimer, hMSH2/6, regulates BLM helicase. *Oncogene*, 23, 3749-3756.