



## AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento más sincero al Dr. Josep M<sup>a</sup> Reñé Espinet y a la Dra. Carmen Piñol Felis, directores y verdaderos padres de este proyecto. Ellos saben que sin su entusiasmo, implicación personal y apoyo no hubiese podido llevarlo a cabo.

Al Dr. Ramón Egido por su inestimable colaboración en la selección de las muestras y los aspectos anatomopatológicos del estudio.

A Ana Martínez, por ser “imprescindible” en el laboratorio, y por su eterna sonrisa.

Al Dr. Xavier Gómez Arbonés por ayudarnos a solucionar las dudas en el insondable mundo de la citometría de flujo.

Al Dr. Juan Buenestado García, por servirme de ejemplo para completar esta tesis y por ser como es.

Para finalizar, pero no en último lugar, a mis padres, Joaquín y Teresa, por su cariño y apoyo a lo largo de estos años, por su ilusión y confianza en mí, que al final han dado sus frutos.

Este trabajo ha sido subvencionado con una ayuda de la Universidad de Lleida 97/0812(1997-2000).

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CCR .....	7
2. SECUENCIA ADENOMA-CARCINOMA .....	11
3. GENÉTICA Y CCR .....	14
3.1 Nivel cromosómico. Contenido de ADN .....	14
3.2 Nivel genético .....	14
4. PROLIFERACIÓN, DIFERENCIACIÓN Y DESTRUCCIÓN CELULAR. SU PAPEL EN EL CCR .....	18
5. APOPTOSIS .....	20
5.1 Concepto y principios básicos .....	20
5.2 Apoptosis en la mucosa intestinal normal .....	22
5.3 Papel de la apoptosis en la enfermedad gastrointestinal.....	23
5.4 Diferencias del patrón de apoptosis entre intestino delgado y grueso y su incidencia en procesos neoplásicos .....	24
5.5 Técnicas de detección de apoptosis .....	24
5.6 Influencia sobre la apoptosis de los fármacos anticancerosos .....	27
5.7 Objetivos terapéuticos potenciales en el proceso de apoptosis .....	28
6. CITOMETRÍA DE FLUJO (CMF) .....	29
6.1 Ciclo celular .....	29
6.2 Conceptos y principios básicos .....	29
6.3 Historia de la citometría de flujo (CMF).....	30
6.4 Características generales de los citómetros de flujo.....	30
6.5 Aplicaciones de la CMF .....	34

---

6.6 Valor clínico y pronóstico de la CMF en el CCR humano.....	36
<b>JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO.....</b>	<b>37</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
1. MUESTRAS .....	39
1.1 Obtención de las muestras .....	39
1.2 Preparación de las muestras .....	40
1.3 Procesamiento de las muestras para apoptosis .....	42
1.4 Procesamiento de las muestras para CMF .....	44
1.5 Tinción de las muestras para estudio histológico convencional.....	45
2. CITOMETRÍA DE FLUJO .....	46
2.1 Características del citómetro de flujo .....	46
2.2 Alineación del citómetro .....	46
2.3 Características del test de lectura .....	46
2.4 Lectura por el citómetro de flujo .....	46
2.5 Interpretación de los resultados de la lectura por citómetro de flujo .....	47
2.6 Análisis de los histogramas del contenido en ADN mediante el programa informático .....	47
3. APOPTOSIS .....	48
3.1 Cuantificación de la apoptosis .....	48
3.2 Índice de apoptosis .....	49
4. VARIABLES DEL ESTUDIO .....	50
4.1 Variable tipo de muestra .....	50

4.2	Variables	clínico-demográficas
.....50		
4.3	Variables anatomopatológicas	.....50
4.4	Variables citométricas	.....51
4.5	Variables de apoptosis	.....51
5.	BASE DE DATOS Y TRATAMIENTO DE LA MISMA	.....52
5.1	Recogida de datos	.....52
5.2	Creación de la base de datos	.....52
6.	ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	.....56
6.1	Variables cuantitativas y cualitativas	.....56
6.2	Variables cualitativas	.....56
6.3	Variables cuantitativas	.....56
6.4	Análisis multivariante	.....56

## **RESULTADOS.....57**

### **I. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.....57**

1.	MUESTRAS DE MUCOSA COLÓNICA NORMAL.....	57
1.1	Variables clínicas y demográficas	.....57
.....57		
1.2	Variables anatomopatológicas	.....57
1.3	CMF	.....57
1.3.1	Contenido de ADN	.....57
1.3.2	Análisis del ADN: fase S del ciclo celular	.....57
.....57		
1.4	Apoptosis	.....57
1.4.1	Distribución de apoptosis	.....57
1.4.2	Índice de apoptosis	.....58

2.					PÓLIPOS	59
2.1	Variables	clínicas	y	demográficas		59
2.2	Variables anatomopatológicas					59
2.2.1	Generales					59
2.2.2	De los pólipos					60
2.3	Citometría de flujo (CMF)					62
2.3.1	CMF de los pólipos sin cáncer focal					62
2.3.1.1	Contenido de ADN					62
2.3.1.2	Análisis del ADN: fase S del ciclo celular					62
2.3.2	CMF de los pólipos con cáncer focal					64
2.3.2.1	CMF de la <i>Porción adenomatosa</i> pólipos con cancer focal					64
2.3.2.2	CMF <i>Porción adenomatosa</i> pólipos con carc. intramucoso					68
2.3.2.3	CMF de la <i>Porción adenomatosa</i> pólipos con carc. invasor					70
2.3.2.4	CMF de la <i>Porción tumoral</i> pólipos con cancer focal					72
2.3.2.5	CMF de la <i>Porción tumoral</i> pólipos con carc. intramucoso					75
2.3.2.6	CMF de la <i>Porción tumoral</i> pólipos con carcinoma invasor					77
2.4	Apoptosis					79
2.4.1	Apoptosis en pólipos sin cáncer focal					79
2.4.1.1	Distribución de apoptosis					79
2.4.1.2	Índice de apoptosis					79
2.4.2	Apoptosis en pólipos con cáncer focal					80
2.4.2.1	Distribución de apoptosis <i>porción adenomatosa</i> pólipos con cáncer focal					80
2.4.2.2	Distribución de apoptosis en <i>porción tumoral</i> pólipos con cáncer focal					80
2.4.2.3	Índice de apoptosis en pólipos con cáncer focal					80
2.4.2.4	Apoptosis en pólipos con carcinoma intramucoso					82
2.4.2.5	Apoptosis en pólipos con carcinoma invasor					83
<b>II. ESTUDIO ESTADÍSTICO COMPARATIVO</b>						84
1.	GRUPO DE MUESTRAS DE MUCOSA COLÓNICA NORMAL					85
1.1	Comparación del análisis por CMF con el resto de variables					85

1.2 Comparación de la distribución de la apoptosis con el resto de variables .....	87
1.3 Comparación del I.A. por zonas glandulares .....	89
2. GRUPO DE PÓLIPOS .....	90
2.1 Pólipos sin cáncer focal .....	90
2.1.1 Comparación del análisis por CMF con el resto de variables .....	90
2.1.2 Comparación de distribución de la apoptosis con resto de variables .....	93
2.1.3 Comparación de I.A. con resto de variables en pólipos sin cáncer .....	95
2.1.4 Comparación de I.A. por zonas glandulares en pólipos sin cáncer .....	96
2.2 Pólipos con cáncer focal .....	97
2.2.1 Comparación en la distribución de la apoptosis con el resto de variables en la <i>porción adenomatosa</i> de los pólipos con cáncer focal .....	97
2.2.2 Comparación en la distribución de la apoptosis con el resto de variables en la <i>porción tumoral</i> de los pólipos con cáncer focal .....	98
2.2.3 Comparación del índice de apoptosis con el resto de las variables en los pólipos con cáncer focal .....	99
2.2.4 Comparación del índice de apoptosis por zonas glandulares en los pólipos con cáncer focal .....	100
2.2.5 Comparación del análisis por CMF entre la <i>porción adenomatosa</i> y la <i>porción tumoral</i> de los pólipos con cáncer focal .....	102
2.2.6 Comparación de la distribución de la apoptosis entre la <i>porción adenomatosa</i> y la <i>porción tumoral</i> de los pólipos con cáncer focal .....	102
2.2.7 Comparación del índice de apoptosis entre la <i>porción adenomatosa</i> y la <i>porción tumoral</i> de los pólipos con cáncer focal .....	103
2.2.8 Comparación del índice de apoptosis con el resto de variables en los pólipos con carcinoma intramucoso .....	103

2.2.9 Comparación del índice de apoptosis con el resto de variables en los pólipos con carcinoma invasor .....	104
<b>3 .COMPARACIÓN ENTRE LOS GRUPOS .....</b>	<b>106</b>
3.1 Comparación entre el grupo de muestras de colon normal, pólipos y pólipos con cáncer focal.....	106
3.1.1 Según resultados de CMF .....	106
3.1.2 Según el resultado de la apoptosis .....	106
3.2 Comparación entre el grupo de muestras de colon normal, pólipos y pólipos sin cáncer focal .....	109
3.2.1 Según resultados de CMF .....	109
3.2.2 Según el resultado de la apoptosis .....	109
3.2.3 Estudio de regresión logística .....	109
3.3 Comparación entre el grupo de muestras de colon normal y pólipos con cáncer focal .....	111
3.3.1 Según resultados de CMF .....	111
3.3.2 Según el resultado de la apoptosis .....	111
3.3.3 Estudio de regresión logística .....	112
3.4 Comparación entre el grupo de pólipos sin carcinoma y el grupo de pólipos con cáncer focal .....	114
3.4.1 Según resultados de CMF .....	114
3.4.2 Según el resultado de la apoptosis .....	114
3.4.3 Estudio de regresión logística .....	115
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>117</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>133</b>



---

<b>RESUMEN .....</b>	<b>134</b>
Resum.....	137
Abstract.....	140
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>143</b>
<b>ANEXO. FOTOGRAFÍAS .....</b>	<b>153</b>

## INTRODUCCIÓN

### 1.EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE COLON

Los tumores malignos son en la actualidad la primera causa de muerte en los países desarrollados (1,2). El cáncer colorrectal (CCR) es la neoplasia más frecuente del tubo digestivo. En Estados Unidos, el CCR es la segunda causa de muerte por cáncer; en hombres ocupa el tercer lugar, sólo superado por el cáncer de pulmón y el de próstata. Cada año se diagnostican 130.000 nuevos casos, de los que 56.000 pacientes mueren a causa de la enfermedad. Se calcula que un 6% de la población en EE.UU. desarrollará CCR a lo largo de su vida (3). En España, los resultados son superponibles en varones; entre las mujeres el CCR constituye la segunda causa de mortalidad por cáncer, sólo superado por el cáncer de mama (4). Se estima que se diagnostican 20.000 nuevos casos de CCR en España cada año, y que el CCR afecta a uno de cada 10.000 españoles. Muestra una incidencia creciente en los últimos treinta años, y en la actualidad supone el 15% de los nuevos diagnósticos de cáncer (5). En 2001 se publicaron datos referentes a la incidencia de CCR y la mortalidad por dicha causa en los Países Bajos, comparándolos con los de otras regiones de la Unión Europea (EU) y el resto del mundo. Objetivaron un descenso desde 1980 en la incidencia de cáncer gástrico y rectal y un aumento de incidencia de cáncer en otras localizaciones, entre ellas colon. No obstante los resultados resultaban confusos, pues la incidencia se modificaba en función del nivel socioeconómico de la serie analizada (6).

Como vemos, existen importantes diferencias entre las incidencias de CCR en los distintos países, siendo esta patología especialmente frecuente en las áreas de mayor desarrollo económico, como EE.UU., Europa occidental, Australia o Nueva Zelanda (7,8). De hecho, en Europa constituye la segunda neoplasia en frecuencia (9). Las diferencias de incidencia observadas entre distintas áreas geográficas podrían estar sesgadas, al basarse en datos de los registros de tumores puestos en marcha en cada país. La ausencia de registros adecuados en países menos desarrollados podría justificar, aunque sólo en parte, el menor número de casos detectado en Asia, África o Sudamérica.

Múltiples estudios han intentado explicar esta variación epidemiológica apelando a factores genéticos y ambientales; de hecho, las diferencias no son tan marcadas cuando nos centramos únicamente en el estudio del cáncer rectal. Aquí, las distancias entre países económicamente más o menos favorecidos se acortan.

Entre los factores ambientales más estudiados destaca la influencia de la dieta. Un estudio realizado en México entre 1991 y 1995 valoró la influencia de la dieta de una región del norte del país, rica en fibras vegetales, sobre la incidencia de CCR. En dicha población se detectaron 20 nuevos casos de CCR /100.000 habitantes durante dicho período, una cifra sensiblemente inferior a la de otras regiones del país con menor consumo de fibra en su dieta (10). Como éste, son múltiples los estudios publicados en los últimos años sobre diversos productos dietéticos que parecen actuar como elementos modificadores en la incidencia de CCR, favoreciendo su aparición, como los oxidantes; otros por el contrario podrían actuar como agentes protectores, como los productos ricos en fito-estrógenos, como la soja, fuente de isoflavonas (11), por citar un ejemplo.

Muchos estudios, sobre todo en Estados Unidos, han analizado el papel que la raza puede jugar en la incidencia de CCR. Citaremos el estudio de Mayberry (12), que analiza datos de más de 1.000 pacientes (454 de raza negra, 521 de raza blanca) del *National Cancer Institute Black/White Cancer Survival* intentando a) determinar qué características pueden contribuir a las diferencias entre las tasas de supervivencia por CCR en negros y blancos y b) confirmar si las diferencias se mantienen tras ajustar los datos para esas características. Partía de un riesgo de muerte en pacientes de raza negra un 50% superior a los de raza blanca. Tras ajustar los resultados en función de factores socio-económicos, comorbilidad, estadio al diagnóstico, características del tumor y tratamiento aplicado, las diferencias se redujeron, pero persistía un exceso de mortalidad del 20% a favor de la raza negra. Sin embargo, no se apreciaban diferencias entre ambas razas en cuanto a supervivencia cuando existía enfermedad metastásica. El estudio concluye la necesidad de trabajos más centrados en el estadio de la enfermedad en el momento del diagnóstico y el cumplimiento terapéutico en cada raza (12). Resultados similares se aprecian en los estudios de Cooper (13) y Chen (14). Se han realizado estudios sobre la influencia de otros factores ambientales tan diversos como el ejercicio físico, que podría disminuir la incidencia de CCR (15) o el clima, pero no entraremos a analizarlos.

Si valoramos las tasas de incidencia estandarizada por edad dentro del territorio español, también existen diferencias significativas entre las distintas comunidades autónomas, siempre teniendo en cuenta que la fiabilidad de los datos depende en primer lugar del rigor de funcionamiento de los registros de cáncer, y en segundo lugar, de las estadísticas de mortalidad. En la Tabla 1. se recogen datos acerca de la incidencia de CCR en distintas provincias españolas, comparándolas entre sí.

	CÁNCER DE COLON		CÁNCER DE RECTO	
	Varones	Mujeres	Varones	Mujeres
GUIPUZCOA	19,3	11,3	14	6,5

ASTURIAS	18,8	11,2	13,3	6
TARRAGONA	16,6	12,9	10,4	8,1
NAVARRA	15,4	15,6	12,3	6,7
MALLORCA	13,6	10,1	11,8	7,5
MURCIA	12,8	11,4	11	8
GRANADA	10,3	8	6,9	4,8

Tabla 1. Incidencia de cáncer colorrectal en España. Tasas de incidencia por 100.000 habitantes ajustadas por edad según sexo. Registros de base poblacional (1986-1987)

Como en el resto del mundo, en España la incidencia del CCR es progresiva. Por desgracia, existen pocas series publicadas sobre incidencia y mortalidad de CCR en nuestro país. Entre ellos, destacaremos el publicado en 1997, realizado (16) basándose en los registros poblacionales de cáncer de Zaragoza (1963-1990) y Navarra (1973-1991) y los de mortalidad del conjunto de España (1953-1992). Se observó un incremento anual medio en la incidencia de 7,06% y 3,33% en hombres y 3,72% y 2,63% en mujeres en Zaragoza y Navarra respectivamente.

En Inglaterra se comprobó que la mayor incidencia de CCR no se justificaba por el envejecimiento poblacional, sino que se daba en cada uno de los grupos de edad (17).

En cuanto a las tasas de mortalidad, tienen una distribución global similar a las tasas de incidencia. En el estudio antes mencionado (16) la evolución de la mortalidad en España muestra un incremento anual medio de 1,62% para hombres y 0,85% para mujeres. Según datos dados a conocer en Agosto de 2003, España ocupa el penúltimo lugar en Europa en supervivencia por cáncer de colon, con una tasa de mortalidad sólo superada por Portugal. Esta tendencia ascendente, más marcada en el sexo masculino, se corresponde con la observada en otros países occidentales, y es proporcionalmente inferior al aumento de la incidencia. Ello puede justificarse en parte por la mayor oferta terapéutica, pero fundamentalmente por la mayor cantidad de diagnósticos precoces. Sin embargo, la población incluida en programas de detección precoz es todavía en la actualidad muy reducida (3-4%), lo que podría explicar las preocupantes cifras de nuestro país en cuanto a tasas de mortalidad.

El CCR es infrecuente por debajo de los 50 años de edad, pero a partir de entonces su incidencia aumenta rápidamente. La edad de corte ideal establecida en los estudios epidemiológicos es de 65 años. En cuanto al segmento colónico afectado, la mayoría de neoplasias se localizan a nivel distal (colon descendente/sigma), sobre todo en los países desarrollados, por causas aún no aclaradas (18,19). Los últimos estudios muestran una tendencia a la mayor aparición de neoplasias proximales (colon derecho/transverso), aunque ello podría justificarse por el perfeccionamiento de las técnicas endoscópicas, que permitirían el acceso directo a dichas regiones.

Todo lo citado explica el importante coste humano, económico y sanitario que supone el CCR. Durante las últimas décadas gran parte de los esfuerzos investigadores se centran tanto en la prevención como en la búsqueda de nuevas posibilidades terapéuticas para dicho proceso.

Para que los programas de detección precoz del CCR sean eficaces deben responder a dos cuestiones: a) ¿a qué población aplicarlos? y b) ¿cuál es la técnica diagnóstica más adecuada?

Numerosos comités de expertos han intentado responder a estas cuestiones. La importancia de este tema para la salud pública queda reflejada en el gran número de revisiones al respecto que durante el año 2002 se editaron en Estados Unidos, como las del *Research Triangle Institute/University of North Carolina* para la *Agency for Healthcare Research and Quality* (20) o las publicadas por Loren (21), Pignone (22) o Trowbridge (23). Todos ellos coinciden en incluir en programas de detección precoz a

los familiares en primer grado de pacientes con diagnóstico de CCR (24). Menos claras están las cosas en cuanto a la técnica de elección a utilizar. El abanico de pruebas disponibles se ha ampliado recientemente con el desarrollo de nuevas técnicas, como el TAC helicoidal o la RMN adaptadas, que permiten la realización de colonoscopias virtuales (25) o la determinación de diversas sustancias en heces. Un ejemplo de estas últimas técnicas es la desarrollada por Coleman en 2002 (26), basada en la detección en heces de la proteína 2 minicromosoma de mantenimiento (MCM2), que sólo se produce en células tumorales. Sin embargo, esta técnica, al igual que otras similares, aún no se encuentra disponible para su utilización en la población general.

Hasta el momento, la técnica que por unanimidad parece demostrar mejores resultados y relación coste/beneficio en la detección precoz de CCR es la colonoscopia, aunque algunos autores difieren, como el grupo noruego de Thiis (27). En Octubre de 2002 presentaron en Ginebra los resultados preliminares de un estudio de detección precoz basado en la realización de colonoscopia convencional y exéresis de las lesiones polipoideas detectadas, siendo el primer objetivo el descenso de la mortalidad global. A los tres años de seguimiento no se objetivaba un descenso significativo de la misma, aunque aún no se han expuesto los resultados definitivos. En la actualidad, se dispone de varias técnicas endoscópicas. El estudio de McGrath (28), también dado a conocer a finales de 2002, examinó cuatro técnicas (colonoscopia con endoscopio flexible hasta ángulo esplénico, sigmoidoscopia, colonoscopia virtual y colonoscopia convencional) buscando la más idónea para su utilización en programas de detección precoz. Tras valorar objetivos clínicos y económicos, la colonoscopia convencional es la que sigue arrojando mejores resultados.

Así, es evidente que un mayor conocimiento de la epidemiología y la fisiopatología del adenocarcinoma de colon permitirá en un futuro próximo la mejora de las estrategias diagnósticas, terapéuticas y fundamentalmente profilácticas, al permitir seleccionar mejor la población de riesgo y los tratamientos más idóneos en cada caso.

## 2.SECUENCIA ADENOMA-CARCINOMA

Ya desde los primeros años de la investigación oncológica se plantearon importantes controversias en cuanto a la fisiopatología de la enfermedad. Desde un principio, los investigadores asociaron claramente dos entidades, el adenoma y el adenocarcinoma colorrectales. Se ha establecido que la mayor incidencia de desarrollo de neoplasia es a partir de lesiones adenomatosas. El pólipo adenomatoso se considera una lesión neoplásica, cuya evolución tanto cronológica como histológica se asocia a un predecible riesgo de degeneración carcinomatosa.

Dos teorías enfrentadas intentaban desvelar el mecanismo íntimo de la asociación adenoma-adenocarcinoma:

- Algunos autores, como Riddel (29,30), opinan que neoplasias colorrectales pueden surgir en ausencia de adenomas benignos. Las células neoplásicas lo son desde un primer momento, encontrándose en el lecho intestinal y aumentando únicamente en número a lo largo del tiempo. No es necesario un paso secuencial desde el adenoma hasta el adenocarcinoma. Consideran que la lesión adenomatosa posee desde el principio el potencial requerido para convertirse en una lesión invasiva. En su trabajo, Bronner y colaboradores (31), intentan explicar este fenómeno. Según estos autores todos los adenomas están formados por epitelio displásico, es decir, por epitelio neoplásico todavía confinado a la membrana basal. Por convención, un epitelio displásico de tamaño macroscópico se denomina adenoma. La neoplasia surgiría de una lesión displásica, que podría ser plana y por lo tanto, no visible como adenoma macroscópico-pólipo.

-Otros autores defienden la teoría secuencial, según la cual la mucosa intestinal normal evoluciona en un primer momento hacia un epitelio displásico y posteriormente a un epitelio neoplásico con o sin invasión local, a partir del cual se produce la diseminación de la enfermedad. El paso inicial en la malignización es la aparición de un foco de displasia de bajo grado. Este paso es irreversible (32), pero puede darse progresión hacia una displasia de alto grado, que según la mayoría de los patólogos es indistinguible del carcinoma “in situ”. Desde el punto de vista histológico, podemos definir tres grados de displasia, siguiendo los criterios de Morson (33):

- Displasia leve*: se caracteriza por la presencia de células con núcleo engrandecido, levemente hipercromático y con disminución de la polaridad. La secreción de moco, si bien se encuentra algo disminuida, aún se conserva si la comparamos con la de la mucosa normal. No existe pleomorfismo del núcleo o disminución de la diferenciación estructural. Se identifican con facilidad las células en mitosis.

- Displasia moderada*: la principal diferencia con la displasia leve es la casi completa desaparición de la mucina. El núcleo pierde su polaridad, y se sitúa junto a la superficie luminal de la célula colónica. Existe pluriestratificación nuclear con hipercromatismo, pero sin obvio pleomorfismo. Existe una disminución de la diferenciación estructural, y son muy numerosas las mitosis.

- Displasia severa*: disposición “back to back” de las glándulas, que muestran tendencia a fusionarse entre sí. Los espacios glandulares varían enormemente en sus dimensiones, adoptando un aspecto “ramificado” o “compacto”. Los núcleos son polimorfos, pluriestratificados y con pérdida completa de la polaridad. Las mitosis son también muy numerosas.

La rotura de la limitante de la mucosa convierte a esta lesión en un carcinoma microinfiltrante. La progresión en profundidad le llevará a alcanzar la *muscularis mucosae*. En este punto ya existen vasos y linfáticos, por lo que el carcinoma se convierte en infiltrante y susceptible de invadir a distancia.

La evolución de mucosa normal a adenoma y su posterior transformación a cáncer de colon requiere de 7 a 12 años. Esta evolución cronológica ofrece, por tanto, la oportunidad de extirpar los pólipos premalignos (34).

El estudio de Goh (35), realizado en 1986 sobre 269 adenomas y 203 adenocarcinomas intentaba, mediante el estudio de la ploidia de ADN de las lesiones por citometría de flujo, establecer la veracidad de ambas teorías, sin llegar a resultados concluyentes.

En cualquier caso, sólo el tejido adenomatoso presente en el pólipo puede malignizar. Su potencial degenerativo depende fundamentalmente de dos factores:

- a) *tamaño*, de tal manera que a mayor tamaño existe una mayor superficie donde pueden darse fenómenos de displasia severa; además, un mayor tamaño implica un tiempo de evolución más largo. Y,
- b) *tipo histológico*: los tres tipos de adenoma (tubular, tubulo-veloso y veloso), representan una secuencia en la que el riesgo de malignidad aumenta progresivamente.

Respecto al riesgo de degeneración carcinomatosa es interesante el trabajo de Atkin y colaboradores (36) con un seguimiento de 14 años sobre 1618 casos de lesiones polipoideas, que valora la aparición del carcinoma en función del tamaño y la histología de la lesión.

Un paciente con adenoma tiene posibilidades de presentar otro sincrónico (30-50%) o metacrónico (30-40%). En general, los nuevos pólipos crecen muy despacio, tardando 2-3 años en alcanzar 1 cm., y 7-10 años en desarrollar un cáncer macroscópico (37). Mencionaremos el trabajo de Martínez y colaboradores (38), realizado a partir de muestras obtenidas de 1.287 hombres y mujeres durante un período de tres años. Se trata de un estudio prospectivo, que utilizando tanto muestras frescas como parafinadas pretendía determinar qué factores influyen en la aparición de recurrencias (considerando como tal la aparición de lesiones de alto grado de malignidad) en pacientes a los que se realiza una polipectomía endoscópica. Los parámetros analizados fueron el número de lesiones en el momento de la primera exploración, la localización, el tamaño y la histología de las mismas. Concluyeron que los pólipos proximales y aquellos de mayor tamaño (>1cm) eran los que presentaban un mayor riesgo de reaparición de lesiones malignas en el futuro. De este estudio se extraen otras conclusiones interesantes que comentaremos en otros apartados.

Respecto a la potencial malignización de los pólipos no adenomatosos (hamartomatosos e hiperplásicos), se considera que la misma se debe a la expresión del componente adenomatoso presente en alguno de ellos (39,40).

La colonoscopia constituye en la actualidad no sólo la técnica diagnóstica de elección, sino un arma fundamental en el tratamiento estándar de los pólipos mediante polipectomía endoscópica, salvo en aquellos casos en que resulte técnicamente imposible. La resección completa de un pólipo conlleva- lógicamente- la desaparición de su potencial premaligno. Debemos, sin embargo, distinguir un caso especial, que es el del pólipo malignizado. Este tema ha suscitado numerosas controversias y discusiones entre expertos.

Según Bond (37), aunque el carcinoma haya penetrado a través de la *muscularis mucosae*, **la polipectomía es curativa cuando cumple los siguientes criterios:**

- a) la polipectomía se considere completa
- b) el estudio histológico sea completo
- c) el cáncer no sea pobremente diferenciado
- d) no haya evidencia de invasión venosa o linfática
- e) no existan células neoplásicas en el margen de resección

A pesar de la fuerte sospecha clínica, hasta hace poco no se ha podido demostrar que la polipectomía endoscópica reduce la incidencia de cáncer ( en la zona de colon vigilada por endoscopia) entre los pacientes sometidos a esta técnica (32,41).

En el momento actual, la teoría secuencial es la más unánimemente aceptada en términos generales. A pesar de ello, existen aún importantes discusiones sobre los factores ambientales, bioquímicos, histológicos y en último término genéticos implicados en esta secuencia epitelio sano-displasia-adenoma-cáncer.

Si en un primer momento los estudios se centraron en la búsqueda de factores de riesgo macroscópicos (que tomó gran impulso tras la utilización generalizada en clínica de las técnicas endoscópicas) y posteriormente histológicos ( tanto en piezas quirúrgicas como en las obtenidas por colonoscopia), hace ya dos décadas que los esfuerzos se centran en niveles moleculares.

### **3. GENÉTICA Y CCR**

Los progresos de la tecnología científica han proporcionado una oportunidad para investigar a nivel molecular la biopatología de los pólipos, lo que ha suministrado alguna de las bases experimentales más fuertes de la hipótesis adenoma-carcinoma. Estos estudios han identificado **alteraciones genotípicas y fenotípicas asociadas con la génesis tumoral en el colon.**

La evolución desde el adenoma al carcinoma se produce por una acumulación de alteraciones genéticas que tienen lugar en los primeros, algunas generales, otras que afectan a genes específicos.

#### 3.1. NIVEL CROMOSÓMICO. CONTENIDO DE ADN (PLOIDIA)

Si nos centramos en la dotación genética de los tejidos estudiados a nivel cromosómico, analizaremos el contenido de ADN de las células implicadas.

**La aneuploidia** (o contenido anormal de ADN) se presenta en casi la mitad de adenomas colorrectales y a menudo es un marcador de mal pronóstico (42). Aunque la mayor parte de los adenomas son diploides (contienen células con una cantidad normal de ADN) (43,35), el 25 a 35 % pueden tener una población celular aneuploide (44-46). La presencia de aneuploidia en un adenoma ha sido asociada con un mayor tamaño del mismo (47), displasia severa (35), histología vellosa (43), presencia de adenocarcinoma invasor en adenomas (47) y antecedentes familiares de cáncer de colon (46). Los estudios encaminados a determinar el grado de aneuploidia y proliferación en adenomas colorrectales y carcinomas parecen sostener el concepto de que existe una **evolución en la ploidia de ADN en la secuencia adenoma-carcinoma.** En este sentido cabe mencionar el trabajo de Tomita (48). Este autor investigó la secuencia de progresión del pólipo hiperplásico hasta el adenocarcinoma mediante un análisis de la ploidia de ADN. Los resultados obtenidos mostraron que el grado de diploidia decrecía desde los pólipos hiperplásicos hasta los adenomas vellosos a la vez que aumentaba el grado de aneuploidia. Así, la progresión polifásica desde adenoma hasta adenocarcinoma estaba parcialmente reflejada en el patrón de la ploidia del ADN, desde los pólipos hiperplásicos hasta el adenoma velloso.

Los trabajos que determinan el grado de aneuploidia y proliferación en adenomas colorrectales (43-45,49-51) presentan resultados variables. Mayoritariamente estas variaciones son debidas a las técnicas empleadas, falta de estandarización en el análisis, e interpretación de los resultados. Por otra parte estos estudios no discriminan entre la región cancerosa y la región adenomatosa en cuanto a la ploidia de ADN en los adenomas con cáncer focal. Por consiguiente la frecuencia variable de aneuploidia puede ser motivada por la presencia concomitante de cáncer en el pólipo adenomatoso.

#### 3.2 NIVEL GENÉTICO

Si durante los años 70 y 80 se establecieron las bases histológicas de la secuencia adenoma-carcinoma de colon, fue sólo a partir de los años 90 cuando se descubrieron los mecanismos genéticos y bioquímicos implicados en dicho proceso (52).

Hasta el momento se han descrito tres grupos fundamentales de genes/proteínas que intervienen en la carcinogénesis:

- oncogenes
- genes supresores de tumor
- genes reparadores de ADN

A continuación describiremos brevemente cada uno de estos grupos.



## ONCOGENES

Los oncogenes son copias de genes celulares normales que han sido activadas por una mutación. La activación de uno de los alelos de un oncogén puede interferir el normal crecimiento celular y favorecer la transformación neoplásica.

Si bien en los adenomas se ha observado aumentada la expresión del oncogén *c-myc* y disminuida la del *c-fos*, la alteración de oncogenes mejor estudiada y más común en los tumores colónicos es la del *k-ras*. Este oncogén codifica una pequeña proteína de unión dependiente de GTP, que habitualmente funciona como mediadora en la transmisión de señales desde la membrana celular hasta los objetivos intracelulares. Por lo común experimenta mutaciones puntuales en sitios particulares.

Mutaciones puntuales en el gen *K-ras* se han observado aproximadamente en el 40 ó 50% de los adenomas o carcinomas colorectales esporádicos. Las mutaciones del *Ki-ras* también ocurren en aproximadamente un 20 a 50 % de especímenes de biopsia con displasia procedentes de enfermos con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y en el 24-50% de los casos de EII asociada a cáncer. Algunos estudios que comparaban porciones de mucosa displásica adyacentes a un cáncer colorrectal con la zona tumoral descubrieron mutaciones similares del *K-ras* en ambas porciones. Por el contrario, no se detectan mutaciones del *Ki-ras* en mucosa colónica libre de displasia. El grupo de Giaretti (53) encuentra una correlación directa entre el grado de aneuploidía y proliferación celular con la mutación del gen *k-ras* en adenomas colorrectales.

El análisis de mutaciones en el DNA obtenido a partir de restos celulares en heces se ha propuesto como una posible herramienta de screening en el CCR. Sidransky y colaboradores (54) fueron los primeros en demostrar la fiabilidad de este procedimiento detectando mutaciones del *Ki-ras* en heces de pacientes con adenomas o adenocarcinomas colónicos. Las mutaciones del *Ki-ras* se encontraron también en las heces de un 15% de pacientes seleccionados con pancolitis de larga evolución. Por el momento se precisa más información antes de introducir esta técnica de detección dentro de los protocolos de diagnóstico precoz de CCR o EII.

Sólo el 9% de los adenomas pequeños exhiben mutaciones del gen *ras*, en comparación con el 58 % de los adenomas de más de 1cm y el 47% de los cánceres de colon (55); por consiguiente, **la activación del *k-ras* puede tener lugar en un estadio intermedio de la génesis tumoral, tal vez contribuyendo al crecimiento del adenoma.** Que un gran número de adenomas y cánceres no posean mutaciones en el gen *ras* indica que deben desempeñar algún papel otros acontecimientos genéticos.

## GENES SUPRESORES DE TUMOR

Los genes supresores de tumor son genes celulares normales que se consideran implicados en la regulación de la proliferación, diferenciación y muerte celular; tienen la misión de suprimir el desarrollo tumoral, por lo que su inactivación por mutación o delección alélica, promueve la génesis tumoral. La inactivación de los dos alelos de los genes supresores de tumor generalmente ocurre por separado y mediante mecanismos diferentes (típicamente se produce la mutación de un alelo y la delección del otro). La pérdida de función de los genes supresores de tumor localizados en los cromosomas 5q, 18q y 17p es importante en la génesis de tumores colorrectales. La delección alélica, también conocida como pérdida de heterocigocidad o LOH, y la mutación de algunos genes como el p53, el APC (adenomatous polyposis coli) y el DDC (Deleted in Colorectal Cancer) se han asociado con la carcinogénesis colónica, independientemente de la existencia de EII coexistente.

### *Gen p53*

La delección alélica del cromosoma 17p, en el locus p53, es la región más común de pérdida alélica en los nuevos cánceres colorrectales. El gen codifica una fosfoproteína nuclear que actúa como un factor de transcripción. El gen p53 no mutado previene la expansión clonal de células mutadas. Ante una lesión del ADN, se incrementa la expresión de la proteína p53 normal, que a su vez regula la transcripción de genes que inducen la apoptosis. Así, el gen p53 evita que las células con ADN dañado completen su ciclo celular y se repliquen, si su ADN no puede ser reparado.

Las mutaciones en el gen p53 ocurren en aproximadamente el 50% de los cánceres humanos, y hasta en un 80-90% de casos de CCR. Sin embargo, sólo se detectan en el 20-40% de los adenomas colónicos. Como los adenomas rara vez muestran delección 17 p (55), **esta alteración es probable que tenga lugar en un paso tardío de la evolución adenoma-cáncer.**

Las mutaciones del p53 o delecciones del cromosoma 17p se han detectado también en un 45-100% de casos de enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa) cuando se asocian a CCR.

La frecuencia de aparición de mutaciones del p53 en mucosa displásica es directamente proporcional al grado de displasia, pasando de un 5-10% en los casos de displasia mínima o inexistente a un 30% en los casos de displasia leve y hasta un 50% en los casos de displasia moderada/severa.

### ***Gen APC (adenomatous polyposis coli)***

El gen APC se localiza en el brazo largo del cromosoma 5 (5q). Las mutaciones de este gen son responsables de la poliposis familiar y el Síndrome de Gardner. El gen APC codifica una proteína con múltiples funciones. Se piensa que la proteína APC juega un papel en la regulación de la apoptosis, pues se ha comprobado que la transferencia de un gen APC normal a una célula con sus dos genes APC mutados induce la apoptosis. La delección 5q se detecta en el 50 a 85% de los adenomas y carcinomas colónicos esporádicos (55). Estudios realizados sobre pocos pacientes detectaron delección 5q en un 30-50% de pacientes con displasias severas y carcinomas asociados a colitis ulcerosa (CU).

### ***DDC***

El gen DDC se localiza en el brazo largo del cromosoma 18 (18q). La secuencia proteica DDC es homóloga a las moléculas de adhesión y por lo tanto se piensa que interviene en la adhesión intercelular. La delección de una región que incluya el locus DDC se produce en un 70% de las neoplasias colónicas esporádicas. Esta proporción se mantiene en el caso de carcinomas de colon asociados a colitis ulcerosa (56).

### **GENES REPARADORES DE ADN**

Este grupo de genes, el más recientemente descrito de los implicados en la carcinogénesis, incluye entre otros el MSH-2, MLH-1, PMS-1, PMS-2 y el GTBP. Todos ellos codifican proteínas implicadas en la reparación de las lesiones del ADN, en concreto la separación de las parejas de bases. Esta separación puede producirse espontáneamente durante la replicación del ADN o ser inducida por mutágenos externos. La pérdida de función de cualquiera de estas proteínas puede acarrear una inestabilidad genómica. Las mutaciones de los genes reparadores de ADN se han relacionado con los casos de carcinoma colorrectal hereditario no asociado a poliposis familiar. El papel de estos genes en los casos de carcinoma de colon esporádico aún no se ha establecido con claridad, pero en un 15 % de los casos se detectan inestabilidades microsátélites (MIS), que se consideran un marcador de mutaciones en los genes reparadores (57). Las MIS se han detectado también en un 20-45% de epitelios displásicos procedentes de pacientes con carcinoma asociado a colitis ulcerosa (56). Se

ha propuesto incluso la clasificación de los tumores colorrectales en función del grado de inestabilidad microsatélite (S), distinguiendo entre los de alta (MSI-H), baja (MSI-L) o nula (MSS) inestabilidad.

Las zonas de inestabilidad son debidas a una incorrecta replicación de las secuencias repetidas de nucleótidos, causando a su vez un aumento o disminución del tamaño de dicha secuencia. Si esta secuencia es la encargada de controlar el crecimiento o la diferenciación celular (como es el caso del gen receptor TGF) o la apoptosis (como el gen *bax*), aumenta la predisposición de la célula a una transformación neoplásica.

Sin embargo, todo lo anteriormente citado se encuentra en un proceso de continua revisión. Hoy en día existe la tendencia a considerar el cáncer colorrectal como una enfermedad heterogénea (58). Si se definen subtipos de CCR, podrían también diferir la estrategias terapéuticas diseñadas para cada uno de ellos. Día a día se describen nuevos genes implicados en el proceso de carcinogénesis, así como nuevos mecanismos de activación o inactivación genómica, como es el caso de la metilación. En la revisión sobre el tema publicada por Jass y colaboradores se recoge una serie de genes con función muy diversa y cuya metilación ha sido descrita en el CCR en diferentes trabajos. Entre ellos citaremos los siguientes: hMLH1, ER, p16, p14, HPP1/TPEF, MGMT, THBS1, APC, COX-2, CDH1, RIZ1, RASSF1A. Dicha revisión cuestiona también en qué fase de la secuencia epitelio normal-adenoma-cáncer colorectal debemos colocar cada una de las mutaciones descritas hasta ahora. Así, considera que existen indicios suficientes de que existen alteraciones más precoces que la mutación del gen APC implicadas en el mismo. Hermsen y colaboradores apuntan en la misma dirección (59). En su estudio, realizado sobre muestras correspondientes a 66 adenomas colorrectales, 46 adenomas malignizados y 36 carcinomas colorrectales, con la finalidad de identificar los genes implicados en la malignización de los adenomas colorrectales, cuestionan las bases genéticas hasta el momento unánimemente aceptadas. Probablemente pasarán varios años hasta que podamos establecer con seguridad qué papel desempeña cada uno de ellos en el proceso de tumorigénesis.

En todo caso, el trabajo de Hermsen (59) sí coincide con estudios previos en que lo importante en este proceso es la **acumulación de varias alteraciones** genéticas, más que su orden cronológico específico. Tal vez la evidencia más precisa de que los carcinomas de colon se originan de adenomas previos es la observación de que las células cancerosas de un pólipo maligno comparten un patrón idéntico de alteraciones moleculares al de las células adenomatosas vecinas, pero adquieren mutaciones adicionales que se consideran decisivas para el comportamiento maligno (60).

## **4.PROCESOS DE PROLIFERACIÓN, DIFERENCIACIÓN Y DESTRUCCIÓN CELULAR. PAPEL EN EL DESARROLLO DE CCR**

Todos los factores histológicos, genéticos y bioquímicos descritos hasta el momento actúan a través de una vía común. Es decir, todos ellos actúan sobre tres fases o procesos que son los que a la larga determinan el comportamiento de un determinado tejido. Estos procesos son *la proliferación, la diferenciación y la muerte celular programada o apoptosis*. Desde hace años, se considera un buen modelo experimental la concepción de la cripta colónica como un tubo que puede dividirse longitudinalmente en tres secciones o tercios. Podemos co-relacionar cada fase del desarrollo histológico con una de las tres regiones glandulares, en función del proceso evolucionario predominante:

- cripta-proliferación
- tercio medio-diferenciación
- superficie-destrucción

Como ya hemos mencionado, podemos estudiar estos tres procesos a distintos niveles

- histológico
- bioquímico
- molecular/genético

Como ejemplo, nos centraremos en el proceso de proliferación, que en condiciones normales predomina en el tercio basal glandular. A nivel histológico podremos medir el grado de proliferación contabilizando las células que se encuentran en fase de replicación, utilizando métodos diversos, como el recuento mediante citometría de flujo (CMF) del número de mitosis, o la tinción específica Ki-67. Si deseamos estudiar este mismo proceso de proliferación a nivel cromosómico, lo que determinaremos por ejemplo es el contenido de ADN de este grupo celular; para ello también podríamos valernos de la CMF. Finalmente, si nos centramos en un nivel genético o molecular, podremos aplicar técnicas específicas para detectar la actividad de los genes implicados en procesos de proliferación, como Bcl-2, PCNA, DNA-polimerasa alfa o Ag NOR , entre otros.

Este mismo patrón podríamos aplicarlo también a los procesos de diferenciación y destrucción celular. En el caso de ésta última, que en condiciones de normalidad predomina en el tercio superior glandular y la superficie luminal epitelial, si nos centramos en el nivel histológico, podemos determinar el número de células apoptóticas mediante las diferentes técnicas disponibles.

Es el desequilibrio entre estos procesos (proliferación, diferenciación y destrucción) el que conduce a la aparición de una neoplasia. Si en un gráfico colocamos en un platillo de la balanza los factores que inducen y en el otro los que frenan el desarrollo tisular, se entiende claramente este frágil equilibrio. No obstante, tampoco esto es cierto al cien por cien. En algunos casos se observa un aumento de la proliferación en tejidos normales y un aumento de la supresión en tejidos neoplásicos. Ello se debe a que no debemos hablar del proceso proliferación/destrucción en términos absolutos, sino siempre en términos relativos. En el estudio de Risio y Rossini (61) realizado sobre un total de 147 muestras (107 adenomas colorrectales con carcinoma invasivo, 20 muestras de mucosa normal y 20 carcinomas avanzados), en el que se determinaba el grado de proliferación celular mediante diversas técnicas, se comprobó un aumento estadísticamente significativo de la proliferación celular en la secuencia mucosa normal- displasia leve- displasia severa, así como en la secuencia displasia severa-carcinoma avanzado. Sin embargo, no puede decirse lo mismo para la secuencia displasia severa-cáncer precoz. En las muestras de tejido de cáncer precoz se

observó una disminución muy marcada de la proliferación celular, que podría atribuirse a variaciones en el microambiente de la submucosa, cambios provocados por la invasión tumoral (reacción desmoplásica en el estroma), alteraciones de la microcirculación, con disminución del aporte sanguíneo o a la existencia de un clon celular con baja proliferación en el seno del adenoma, que constituiría el carcinoma “in situ”.

Es también interesante el estudio retrospectivo que Moss y colaboradores (62) realizaron sobre muestras de biopsias gástricas antrales parafinadas, con el objetivo de medir el efecto del *H. Pylori* sobre la apoptosis en dichos tejidos. Se tomaron muestras tanto positivas como negativas para la presencia de *H. Pylori*, y se compararon ambos grupos. Los resultados obtenidos sugerían que el *H. Pylori* inducía la apoptosis en el tejido. El resultado final, no obstante, era la hiperproliferación epitelial compensatoria, lo que justificaría un potencial premaligno en las colonizaciones crónicas por *H. Pylori*.

## **5. APOPTOSIS**

### 5.1. CONCEPTO Y PRINCIPIOS BÁSICOS

En los últimos años la mayor parte de los trabajos se han concentrado en estudiar la cinética celular en la mucosa normal y neoplásica (63). Como ya se ha mencionado, el proceso de regeneración de la mucosa colónica asegura la proliferación del colonocito en las partes basales de las criptas, su diferenciación y migración a lo largo del eje de las mismas hasta la superficie del epitelio y finalmente la pérdida celular por exfoliación a la luz intestinal o la muerte celular a nivel intraepitelial (64). Sin embargo, son menos conocidos los mecanismos de la pérdida celular en el intestino.

Es fundamental la noción de que las células no existen únicamente en dos estados; “viva” o “muerta”, sino que también presentan estados intermedios, como el de célula “lesionada”. Es en esta situación en la que nosotros podemos ejercer nuestra influencia, inclinando la balanza hacia la muerte o la supervivencia celular, siendo la célula susceptible a nuestras manipulaciones terapéuticas.

Pero, ¿qué entendemos por “muerte celular”? La palabra muerte sólo se aplica con propiedad a organismos en los que puede ser definida inequívocamente en términos de cese de funciones cerebrales, cardíacas y respiratorias. Esta definición no puede aplicarse al hablar de células. En ese caso, puede definirse como un “cese completo de toda actividad metabólica” (65). Aunque esta definición puede aplicarse a todos los casos de muerte celular, conviene diferenciar entre dos términos : necrosis y apoptosis o muerte celular programada.

**Necrosis** : hasta hace poco, la necrosis era la única forma de muerte celular reconocida. Es causada habitualmente por agentes nocivos externos tales como toxinas bacterianas, citokinas u oxidantes derivados de células inflamatorias, y agentes lesivos químicos o físicos, como el calor o la radiación. Durante la necrosis la célula se deforma y fragmenta, liberando su contenido y provocando a su vez una reacción inflamatoria en cadena, con el consiguiente daño tisular. Aunque la necrosis se describió hace más de cien años, los mecanismos celulares de la misma no centraron la atención de los investigadores hasta los últimos 20 años, probablemente debido a la falta de técnicas adecuadas para su estudio. En la actualidad, sin embargo, dichos mecanismos se conocen, e incluso nos encontramos en disposición de modificar ciertos eventos bioquímicos que inducen la necrosis. La lesión celular inducida por agentes oxidantes o por hipoxia ha sido una de las más estudiadas. El daño celular incluye la pérdida de función mitocondrial, aumento del calcio libre intracelular (66), descenso de ATP (67), daño del ADN y peroxidación de lípidos y proteínas (68). Estos acontecimientos inducen el colapso metabólico, daño del citoesqueleto, y finalmente la ruptura de la membrana plasmática. Algunos de estos procesos son reversibles, existiendo una oportunidad de prevenir la necrosis.

Es importante destacar que existen algunas diferencias en el proceso necrótico entre las distintas extirpes celulares.

**Apoptosis** : En 1972, Kerr et al. describieron un segundo tipo de muerte celular, a la que denominaron “apoptosis”, también conocida como “muerte celular programada” (69). La palabra apoptosis es un neologismo, derivado de dos vocablos griegos que hacían referencia a la caída de las hojas en otoño. La apoptosis representa una muerte celular fisiológica resultante de la evolución en organismos multicelulares , útil para remodelar los tejidos durante su desarrollo, conservando la homeostasia de los mismos, cambiando las células envejecidas y suprimiendo las células con daño genético no reparable. A diferencia de la necrosis, la apoptosis se encuentra bajo control genético,y

puede ser desencadenada por una serie de hormonas y citocinas, que actúan mediante la unión a receptores (70). Esto permite que la apoptosis se limite a determinadas células o tejidos en distintas etapas del desarrollo. Estos conceptos han contribuido a valorar la importancia de la apoptosis en los estados de salud y enfermedad, resumida en los siguientes puntos:

- 1) la atrofia de un órgano mediante la disminución del número de células es el resultado de un incremento de la apoptosis, mientras que la proliferación celular puede asociarse con una inhibición molecular de la misma
- 2) diversos procesos inmunológicos, tóxicos o infecciosos pueden activar los mecanismos proapoptóticos existentes en la célula originando muerte celular y destrucción del tejido, y
- 3) la transformación maligna puede ocurrir en parte por la inhibición de la apoptosis y de la muerte de las células con daño genético.

### Regulación de la apoptosis

Como hemos mencionado, la apoptosis puede ser regulada por diversos agentes, que se recogen en las siguientes tablas (70).

Inhibidores fisiológicos	Genes virales	Agentes farmacológicos
1. factores de crecimiento	1. adenovirus E1B	1. Calpain inhibitors
2. matriz extracelular	2. Baculovirus p35	2. inhibidores de proteasa de la cisteína
3. ligando CD40	3. Baculovirus IAP	3. promotores de tumor PMA fenobarbital $\alpha$ -hexaclorociclohexano
4. aminoácidos neutros	4. Cowpox virus crmA	
5. Zinc	5. virus Epstein-Barr BHRF1, LMP-1	
6. estrógenos	6. african swine fever virus LMW5-HL	
7. andrógenos	7. herpesvirus $\gamma$ 1 34.5	

Tabla 2 . Factores inhibidores de apoptosis

Activadores fisiológicos	Agentes lesivos	Agentes terapéuticos	Toxinas
1. Ligando Fas TNF	1. calor	1. quimioterápicos Cisplatino bleomicina, citosina Arabinósido, Metotrexate Vincristina doxorubicina	1. etanol
2. fact crecimiento $\beta$	2. virus		2. péptido amiloide $\beta$
3. neurotransmisores Glutamato Dopamina N-metil-D-aspartato	3. toxina bacteriana		
	4. oncogenes <i>Myc, rel, E1A</i>		
4. $\downarrow$ fact. crecimiento	5. Supresor tumoral p53		
5. pérdida adhesión	6. célula T citolítica	2. Radiación UV	
6. calcio	7. oxidantes	3. Radiación gamma	
7. glucocorticoides	8. $\downarrow$ nutrientes		
		9. radicales libres	

Tabla 3 . Factores inductores de apoptosis

En general, la apoptosis no afecta simultáneamente a una gran cantidad de células contiguas, sino que se produce de forma asincrónica, en células aisladas.

La apoptosis es un proceso activo, irreversible, caracterizado por una progresiva fragmentación del genoma y degradación estructural de la célula, la cual es completa después de 4 horas (71).

Las células eliminadas mediante la apoptosis se transforman en los llamados “cuerpos apoptóticos”, que son fagocitados por los macrófagos (72), evitándose así la ruptura de la membrana plasmática y la consiguiente liberación de sustancias quimiotácticas e inflamatorias lesivas para el tejido circundante, lo que constituye otra diferencia fundamental con la necrosis. Todo ello explica por qué este proceso tardó tanto en ser descrito; el hecho de afectar a células aisladas y la falta de respuesta inflamatoria en el tejido circundante dificultan la detección de células apoptóticas. Incluso cuando la apoptosis se produce de forma masiva, sólo algunas células apoptóticas pueden ser detectadas en las muestras histológicas, debido a la rapidez del proceso.

### **Mecanismo de apoptosis**

La apoptosis requiere de la activación de endonucleasas (73), que fragmentan el ADN en fragmentos de 300 Kb y 50 Kb (74), así como en otros múltiplos de 200 pares de bases (75).

## **5.2. APOPTOSIS EN LA MUCOSA INTESTINAL NORMAL**

Como ya describimos, las células del epitelio intestinal se originan en la base de la cripta, y migran hacia la superficie, desde donde son eliminadas. Durante muchos años resultó incierto el papel que la apoptosis jugaba en el proceso de pérdida celular. Por una parte, los estudios con microscopía electrónica no lograban detectar los cambios morfológicos característicos de la apoptosis en los tejidos en estudio. Sin embargo, otros grupos de investigación detectaron fragmentación del ADN (76,77) en las células de la superficie vellosa intestinal, mediante una técnica de inmunofijación con TdT-dUTP-biotina. Esta fragmentación de ADN se interpretó como un indicador de apoptosis. Existían una serie de razones para cuestionar dicha interpretación: la técnica citada no proporciona información sobre el peso molecular de los fragmentos de ADN, por lo que no pueden identificarse las secciones características de la apoptosis; también en la necrosis se detectan fragmentos de ADN. Además algunos estudios sólo han podido detectar fragmentos de ADN en el tercio inferior de la cripta. A favor del papel que desempeña la apoptosis en la regulación de la población normal de células intestinales está el descubrimiento de que en las fases más iniciales de la apoptosis, incluso antes del inicio de la fragmentación del ADN, se produce un despegamiento celular de la membrana basal y de las células contiguas (78), por lo que las células con los cambios morfológicos propios de la apoptosis se detectarían con más facilidad en la luz intestinal (79).

Numerosos trabajos intentan establecer la existencia de patrones diferentes de apoptosis entre las criptas intestinales de tejidos normales y adenomatosos. En este sentido, el trabajo de Moss (80), comparaba el porcentaje de apoptosis y la distribución de la misma en muestras de mucosa colónica normal (10 casos), pólipos hiperplásicos (6 casos), pólipos adenomatosos (16 casos, 7 de ellos con displasia severa) y carcinoma colorectal (33 casos). En cuanto a los resultados obtenidos, no existían diferencias significativas entre la mucosa normal y los pólipos hiperplásicos, siendo las células apoptóticas un 3% del total, y localizándose con claro predominio (87%) en el tercio glandular superficial. Este patrón se invertía en el caso de los pólipos adenomatosos, con claro predominio de la apoptosis en la base del adenoma y una práctica ausencia de



células apoptóticas en superficie. Los autores manejaban dos posibles hipótesis para explicar este hecho: la primera, según la cual la apoptosis se concentra en la base glandular por ser allí donde se produce un mayor número de mutaciones genéticas durante el desarrollo del adenoma. La disminución de la apoptosis en la región luminal reflejaría el fracaso en el control de dichas alteraciones, con el consiguiente desarrollo adenomatoso, generalmente en forma de pólipo. Una segunda opción, apoyada por el estudio del grupo de Lipkin (81), se decanta por una inversión en el sentido de migración celular. Si consideramos que el crecimiento glandular normal es hacia la superficie, por analogía parece lógico pensar que cuando los patrones de proliferación y apoptosis se invierten en la cripta adenomatosa, las células de dichas criptas pueden migrar en sentido contrario. El grupo de Lipkin demostró este fenómeno en el caso de la poliposis familiar. Las células con ADN mutado y no controlado mediante la apoptosis iniciarían una migración hacia la base de la glándula, con el consiguiente crecimiento de la lesión en profundidad. Esta migración anómala se produciría en una fase relativamente precoz de la carcinogénesis. Volviendo al trabajo de Moss (80), en el caso de los carcinomas observaron una disminución global de la apoptosis, con una distribución randomizada de las células apoptóticas a lo largo de la lesión. Sí se apreciaron zonas con distribución muy irregular de la apoptosis (muy aumentada o muy disminuida) en los tejidos adyacentes al carcinoma.

### 5.3.PAPEL DE LA APOPTOSIS EN LA ENFERMEDAD GASTROINTESTINAL

Se ha demostrado que la apoptosis tiene un papel destacado en algunas enfermedades intestinales. Así, la *Shigella flexneri* evita la respuesta inmune fisiológica induciendo la apoptosis en los fagocitos del huésped, con la consiguiente formación de los abscesos característicos de la disentería (82). No se ha comprobado que otros patógenos actúen de forma similar.

La administración prolongada de laxantes con antraquinona produce la *melanosis coli*. Algunos trabajos han demostrado que el pigmento que tiñe la mucosa es lipofucsina, localizada en los lisosomas de los macrófagos, y que proviene de los cuerpos apoptóticos a partir de las células del epitelio colónico (83).

La apoptosis también se ha implicado en la enfermedad injerto-contra-huésped y en las lesiones intestinales asociadas al SIDA, incluyendo la enteropatía asociada a SIDA (84,85).

Numerosos trabajos se han centrado en el papel que juega la apoptosis en la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal (E.I.I). La EII “per se” puede conllevar patrones de ploidia y apoptosis que difieren de la normalidad, tema tratado entre otros en los trabajos de Iwamoto (86) Pérez-Machado (87), Ina (88) e Itoh (89).

Por fin, existen evidencias de que la inhibición de la apoptosis puede jugar un papel importante en el desarrollo de neoplasias; dentro de ellas, se ha prestado una especial atención a los tumores colónicos. Como se describirá a continuación, no sólo se han objetivado mutaciones en los genes que controlan la apoptosis en los tejidos neoplásicos, sino que dichas mutaciones dificultan la destrucción de células tumorales mediada por quimioterápicos.

### 5.4.DIFERENCIAS DEL PATRÓN DE APOPTOSIS ENTRE INTESTINO DELGADO Y GRUESO Y SU INCIDENCIA EN PROCESOS NEOPLÁSICOS

Existen diferencias marcadas en cuanto al número y posición de las células apoptóticas entre intestino grueso y delgado, que justificarían la distinta incidencia de neoplasias en ambos territorios (68). Las teorías más antiguas justificaban la mayor frecuencia de neoplasias colónicas por el tiempo prolongado de exposición de la mucosa a los agentes carcinógenos (90). La elevada concentración bacteriana en el colon favorece la producción de carcinógenos endógenos, como los compuestos nitrogenados y los ácidos biliares conjugados. Las bacterias son mucho más escasas en el intestino delgado (91).

Es también muy interesante el trabajo de Potten (92), que contempla una distinta respuesta de ambas mucosas intestinales en ratones ante un mismo agente carcinógeno, en lo que a apoptosis se refiere. Así, los carcinógenos inducen mayor apoptosis en el intestino delgado. Además, varía la posición de las células apoptóticas entre las criptas de ambos tejidos. En el intestino delgado, la posición de mayor apoptosis es la posición 4, que coincide con el nivel al que presumiblemente se sitúa la célula madre o stem cell. En el colon, sin embargo la apoptosis afecta predominantemente a las células en posición 8, a un nivel superior al de la stem cell. Es decir, la lesión del ADN induce la apoptosis de forma más precoz en el intestino delgado. La célula madre colónica con mutaciones en su ADN tiene la oportunidad de dividirse y formar clones potencialmente malignos antes de alcanzar en la cripta la posición en la que se induce su apoptosis. Esta menor capacidad para eliminar clones de células malignas explicaría en parte la alta incidencia del cáncer de colon.

## 5.5. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE APOPTOSIS

Una vez establecida la importancia del papel que puede jugar la apoptosis en el desarrollo de diversas patologías colónicas, es interesante describir los distintos métodos de los que se dispone en la actualidad para la detección de las células apoptóticas. Nos centraremos en tres grandes grupos de técnicas:

### *IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LA APOPTOSIS*

El fenómeno de la apoptosis se detectó en un principio por una serie de cambios morfológicos, que constituían una de las principales características definitorias del proceso. Los primeros signos de la muerte celular programada son la condensación del material nuclear, con una acumulación de material de alta densidad en el borde del núcleo (93). Ello se acompaña de una compactación del citoplasma, con una concentración de las organelas mientras disminuye el volumen citoplasmático. Se pierden microvellosidades en superficie, al mismo tiempo que la célula se desprende de las células vecinas. La membrana nuclear se fragmenta hasta su desaparición, dispersándose sus fragmentos en el citoplasma. Ocasionalmente, la propia célula se fragmenta en diversos cuerpos apoptóticos, algunos de los cuales contienen restos nucleares; otros contienen únicamente citoplasma. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por las células vecinas, que no han de pertenecer necesariamente al sistema mononuclear fagocítico. Dos hallazgos característicos de la apoptosis son la ausencia de reacción inflamatoria y la supresión de células aisladas. Como ya mencionamos, ambos hechos la diferencian de la necrosis.

En general, la producción de cuerpos apoptóticos se realiza muy rápidamente, transcurriendo sólo algunos minutos desde su inicio hasta su final (94,95). Además, muchos de los cambios descritos sólo pueden apreciarse mediante microscopía electrónica, por lo que la detección de células apoptóticas en muestras histológicas convencionales es muy dificultosa. Ello se complica aún más por la gran variabilidad morfológica que pueden presentar los cuerpos de apoptosis, que además pueden detectarse aislados, o en el interior de otras células tras ser fagocitados. Suelen ser

redondeados u ovalados, de tamaño variable, y se reconocen más fácilmente cuando contienen fragmentos de cromatina. Numerosas publicaciones describen sus características (65,69,72,73,96).

### *IDENTIFICACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA MEDIANTE ELECTROFORESIS*

En las células apoptóticas se producen cambios en la estructura de la cromatina. Los distintos fragmentos en los que se fracciona el ADN pueden ser aislados mediante electroforesis (75). Las zonas de fragmentación, con obtención de múltiplos de 180-200 pares de bases, suelen coincidir con las regiones de unión entre un nucleosoma y el siguiente. El peso molecular de las cadenas así obtenidas permite diferenciarlas de los fragmentos que aparecen durante la necrosis.

Como paso previo a la migración mediante electroforesis de los fragmentos de ADN, éste debe ser extraído y purificado a partir de las células apoptóticas. Este proceso debe realizarse cuidadosamente, pues el tratamiento físico de las muestras puede por sí sólo inducir la fragmentación del ADN. Los fragmentos de ADN obtenidos se someten a una electroforesis en gel de agarosa. Una vez realizada la migración de las bandas, se procede a un tñido de las mismas, mediante bromuro de etidio, por ejemplo. Para mejorar la sensibilidad de la técnica pueden aplicarse técnicas de Southern-blot. Los fragmentos de ADN migrados se transfieren a una membrana, donde se ponen en contacto con un radiotrazador. El siguiente paso consiste en un revelado con rayos X. Con este proceso se consigue mejorar la sensibilidad de la prueba hasta ocho veces.

Otras técnicas alternativas de detección, menos extendidas, incluyen la utilización de densitómetros sobre muestras de gel tñido, o métodos de inmunofijación (97). Un método alternativo consiste en analizar la degradación del ADN mediante citometría de flujo (98-102). Esta técnica se explicará en detalle a continuación.

La degradación del genoma es el resultado de la digestión por una endonucleasa. Se realizaron distintos intentos para aislarla y purificarla mediante las técnicas descritas.

Todo lo dicho es aplicable en términos generales. Como excepción, se ha observado que en algunas células apoptóticas los fragmentos de ADN obtenidos son de un peso molecular mucho mayor, de 300 ó 500 kilobases (103). Estas cadenas no pueden detectarse mediante la electroforesis convencional, y deben utilizarse geles especiales que permiten la migración de fragmentos de ADN de mayor tamaño.

### *IDENTIFICACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DEL GENOMA IN SITU*

Como ya mencionamos, se hacían necesarios métodos para detectar las células apoptóticas en el material histológico, sobre secciones no fragmentadas de tejido. Para solventar este problema, numerosos grupos de investigación desarrollaron técnicas que pueden identificar los fragmentos de ADN en material histológico y citológico, basándose en el hecho de que los núcleos de las células apoptóticas contienen numerosos “puntos de corte” en su dotación genómica a consecuencia de la acción de la endonucleasa. Estos métodos han recibido diversos nombres (104,105), pero todos ellos se engloban bajo el de “In situ End-Labeling techniques” (ISEL).

Múltiples artículos han establecido la utilidad de dichas técnicas para la detección de apoptosis, tanto en células en suspensión, como en muestras frescas o parafinadas (106,107).

Todas las variantes tienen en común la tinción de ciertos terminales que se unen a las regiones donde se fracciona el ADN, tras reacciones mediadas por polimerasas. De entre todas las técnicas descritas, para nuestro trabajo hemos seleccionado una variante de la técnica TUNEL, que se describirá en el apartado de material y métodos (76). La técnica TUNEL debe ser utilizada de forma conjunta con el examen morfológico simple de las muestras, para excluir artefactos de tinción.

La detección de la fragmentación genómica por la técnica TUNEL permite obtener *dos patrones diferentes de apoptosis* de las células colónicas: a) cuerpo apoptótico fagocitado por otras células epiteliales o mononucleares, y b) desprendimiento de células apoptóticas con cambios morfológicos sutiles a la luz colónica.

### **CASPASAS Y OTRAS TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE APOPTOSIS**

La determinación de la activación de las moléculas que disparan el proceso de apoptosis ha adquirido gran importancia en la detección de apoptosis (108).

Las caspasas son una serie de cistein-proteasas que se encuentran en forma de zimógeno en todas las células (109). Existen al menos 14 caspasas diferentes, incluidas en tres grupos en función del tipo de sustrato por el que tienen afinidad: grupo I (caspasa-1, -4 y -5), grupo II (caspasa-3 y -7) y grupo III (caspasa-6, -8, -9 y -10). Las caspasas -11, -12, -13 y -14 no se han incluido por el momento en un grupo determinado. La activación de las caspasas tiene lugar de una forma secuencial, conocida coloquialmente como la “cascada de las caspasas”. Por su función en dicho proceso hablamos de caspasas “iniciadoras”, “inflamatorias” (que, salvo excepciones, no intervienen en la apoptosis) y caspasas “efectoras”. En este último grupo se incluye la caspasa-3, fundamental en el proceso de apoptosis. De hecho, la determinación de la activación de la caspasa-3 es un evento que tiene una alta correlación con la inducción de apoptosis. La caspasa-3 es activada durante la mayoría de los procesos apoptóticos y es considerada la principal caspasa efectora. Su activación es esencial para la fragmentación del ADN, la condensación de la cromatina y la desestructuración de la membrana.

Las pro-caspasas se encuentran en diversos compartimentos intracelulares (mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, núcleo y citosol). Después de ser activadas, algunas de ellas sufren una translocación, situándose en otros compartimentos celulares donde se unen a sus ligandos específicos. Estos ligandos son entre otros los citados a continuación.

#### Proteínas ligadas a caspasas durante la muerte celular

- Proteínas estructurales
- Proteínas de señal
- Reguladores de la transcripción y la translación
- Reguladores de la replicación y el ciclo celular
- Reguladores de la reparación del ADN
- Reguladores del metabolismo del ARN
- Reguladores de la interacción intercelular
- Reguladores de las citokinas pro-inflamatorias
- Reguladores de apoptosis
- Otros

Aunque existen procesos de muerte celular independientes de las caspasas, la mayoría de los modelos experimentales de apoptosis incluyen la activación de las mismas. Sin embargo, hasta el momento, nunca se ha demostrado activación de las caspasas durante la necrosis celular. Así, la detección de activación de las mismas podría ser utilizada como un criterio para diferenciar necrosis y apoptosis. Por el momento, precisa de técnicas complementarias para obtener resultados fiables.

Existen diferentes métodos para la determinación de la activación de las caspasas, entre los que citaremos:

- **Detección de caspasas activadas mediante inmuno-blot:** pueden utilizarse anticuerpos específicos para determinar la actividad de las diferentes caspasas, así como

péptidos específicos para demostrar el grado de actividad enzimática. Esta técnica puede aplicarse a cultivos celulares, secciones de tejido y biopsias. La mayor ventaja de esta técnica es su especificidad y sus mayores inconvenientes el alto costo económico y el tiempo de dedicación que precisa.

- **Unión a sustratos sintéticos:** existen kits comercializados, consistentes en sustratos sintéticos que se unen a las caspasas activadas. Tras la unión, se aplican técnicas de lectura mediante espectrofotometría o fluorescencia. Para una correcta interpretación deben utilizarse siempre muestras “control”, pues las determinaciones de actividad son relativas, es decir comparan la actividad entre las diferentes muestras. Esta técnica puede aplicarse a cultivos celulares, tejidos procedentes de biopsias y caspasas activadas “in vitro”. Para aplicarla “in vivo” se precisa un paso previo con homogenización del tejido. En líneas generales es un método cuantitativo, conveniente, relativamente rápido y sensible. Además, se dispone de kits comerciales para detección de la actividad de la caspasa-3.

- **Inhibidores de las caspasas y marcaje específico (affinity labeling):** pueden usarse para determinar la importancia de las caspasas para la apoptosis en general o para una fase concreta de la misma. Los inhibidores pueden ser tóxicos para las células y por este motivo siempre debe utilizarse una muestra control. Los inhibidores se unen a sitios específicos de forma reversible o irreversible. Entre los métodos de lectura, el ELISA es uno de los más fiables. Entre las principales limitaciones de la técnica se encuentran su toxicidad y su especificidad limitada en algunas ocasiones. El desarrollo en el futuro de nuevos inhibidores sin estos inconvenientes mejorará considerablemente su rendimiento.

- **Detección de los dominios de los sustratos de las caspasas mediante inmuno-blot:** permite medir de forma indirecta la actividad de las caspasas, mediante la medición de la cantidad de sustratos de las mismas disponibles dentro de la célula, gracias a la utilización de anticuerpos específicos. Se trata de un método costoso, cuya mayor ventaja es poder determinar los niveles de varios sustratos simultáneamente.

- **Investigación de la activación de caspasas en células íntegras mediante la utilización de fluorescencia y/o citometría de flujo:** puede también medirse mediante inmunohistoquímica utilizando anticuerpos contra los productos del proceso de activación. Los anticuerpos contra la caspasa-3 activada se encuentran comercializados. En la actualidad se están desarrollando mejoras para aplicar esta técnica “in vivo”. Esta técnica tiene la ventaja de permitir identificar e incluso separar la cantidad de células que contienen caspasas activadas en una población.

## 5.6. INFLUENCIA SOBRE LA APOPTOSIS DE FÁRMACOS ANTICANCEROSOS

La inducción de la muerte celular en células seleccionadas es el principio fundamental que rige los tratamientos quimioterápicos. Dicho objetivo se logra en parte estimulando un incremento de la apoptosis. Por este mecanismo actúan diversos fármacos, como actinomicina-D, clorambucil, metotrexate, cisplatino, etopóxido, vincristina, 5-fluoracilo, melfalán o prednisolona, además de agentes físicos como la radioterapia.

En lo que se refiere a tumores del tubo digestivo, los resultados obtenidos difieren según el órgano diana. Ijri y Potten (110) demostraron la inducción de apoptosis en células intestinales provocada por agentes quimioterápicos, dependiendo la localización de los cuerpos apoptóticos del agente empleado. Así, la apoptosis se detecta a distintos niveles según se utilicen antibióticos citotóxicos (posición 4-5 de la cripta), agentes alquilantes (posición variable de la célula apoptótica) o antimetabolitos (posiciones 8 a 11).

Por otra parte, las características genotípicas y fenotípicas de una determinada célula intestinal condicionan su respuesta a un fármaco determinado. Así, las mutaciones del p53 no sólo juegan un papel fundamental en el desarrollo del cáncer colorrectal, sino que también pueden disminuir la respuesta al tratamiento de un determinado tumor. Las células con proteína p53 dañada o ausente no desarrollan apoptosis tras ser sometidas a agresiones externas como la irradiación o los quimioterápicos. La expresión del gen bcl-2 inhibe la acción del 5-fluoracilo. Estos dos ejemplos deben hacernos replantear los criterios con los que se selecciona a los pacientes candidatos a recibir tratamiento con radio- o quimioterapia. Hasta el momento nos basábamos en la localización del tumor o el tipo histológico. En un futuro próximo podríamos basarnos en el análisis del p53 u otros genes que regulan la apoptosis para seleccionar a los pacientes más susceptibles a la terapia.

### 5.7. OBJETIVOS TERAPÉUTICOS POTENCIALES EN EL PROCESO DE APOPTOSIS

Dentro de la secuencia de alteraciones genéticas capaces de modificar la apoptosis, algunas presentan un perfil de intervención más favorable.

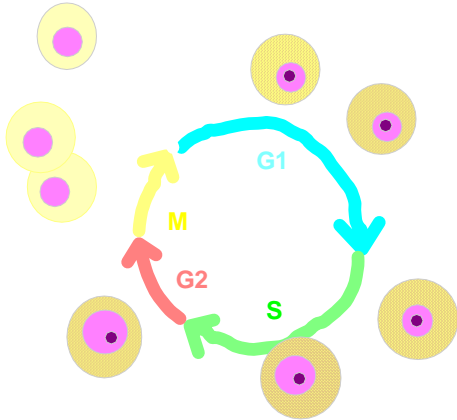
En primer lugar se han realizado ensayos para paliar los defectos del gen p53 y su proteína correspondiente. Una posibilidad es reproducir la función de la proteína p53, lo que se ve dificultado por el aún imperfecto conocimiento de sus mecanismos de acción. Otra alternativa consiste en transferir p53 “salvaje” a las células mutadas para restaurar su capacidad de desarrollar apoptosis ante las agresiones externas (fármacos, radiaciones...). En los últimos tiempos, la terapia génica se encuentra en pleno desarrollo, aunque aún son precisos muchos esfuerzos para obtener resultados en la clínica diaria.

El bcl-2 puede inhibir la apoptosis impidiendo la activación de una proteasa, la enzima convertidora de la interleukina-1 $\beta$ . Quizá en un futuro puedan desarrollarse fármacos con un efecto similar sobre las proteasas que inhiben la apoptosis.

## **6. CITOMETRÍA DE FLUJO**

Antes de proceder a la descripción de esta técnica, se recordarán algunos conceptos biológicos básicos.

### 6.1. CICLO CELULAR



En el ciclo celular se distinguen varias fases: las células en “fase de reposo” (G0) se excluyen del ciclo; las células en fase de síntesis proteica (G1a) o síntesis de ARN (G1b) se recuperan de una división y/o se preparan para iniciar otro ciclo .

Las células se dice que están en fase S cuando se encuentran en proceso de síntesis de material genético o ADN ; las células en fase G2 han completado la síntesis de ADN y por tanto poseen una cantidad doble de lo normal de ADN. Por último, las células en fase M están sufriendo

la división celular (111). Según el tipo y función de la célula, ésta tiene mayor o menor actividad proliferativa. El ciclo celular puede variar bajo la influencia de fármacos, radiaciones, hipertermia u otros agentes externos (112).

### 6.2. CONCEPTO Y PRINCIPIOS BÁSICOS

La técnica de la CMF fue desarrollada en las décadas de los años 60 y 70 en los Estados Unidos y Alemania, como un avance importante de la biología celular (113). Es una técnica que permite el estudio combinado de distintas características morfológicas, estructurales y funcionales de las células incluidas en un flujo de líquido isotónico. Pero es desde hace aproximadamente treinta años cuando los avances en inmunología, oncología y hematología, así como el desarrollo de la tecnología de los anticuerpos monoclonales (114) y fluorocromos han permitido la aplicación de la CMF en la investigación biomédica y en la práctica clínica.

Se define como citómetro de flujo el aparato que es capaz de medir componentes y propiedades celulares que fluyen en suspensión. Existen citómetros que poseen, además, la capacidad de separar partículas de forma selectiva, a partir de una suspensión líquida ; se denominan “sorters”.

Los principios de la citometría de flujo no son complicados (115). Es esencial disponer de una suspensión de células o partículas individuales, de modo que la dificultad para obtenerla es un factor limitante para el empleo de la técnica. Las células o partículas (núcleos, organelas, cromosomas, etc...) son marcadas por colorantes fluorescentes capaces de excitarse con una fuente luminosa de alta energía.

La suspensión celular, convenientemente procesada y teñida, se inyecta en la cámara de flujo del citómetro, que está hidrodinámicamente enfocada para que las células atraviesen de forma individual y sucesiva un punto en el que interaccionan físicamente con un haz de luz monocromática, dispersándola en todas las direcciones. La luz dispersada hacia delante (llamada “forward scatter a 0 grados”) está relacionada con el tamaño celular. La luz dispersada a 90 ° del eje del haz luminoso (“light scatter a 90°”) se relaciona con la estructura interna y la complejidad citoplasmática.

La excitación de los fluorocromos se produce en el punto de interacción entre la célula y el haz lumínico, dando como resultado la emisión de una luz de longitud de onda superior a la incidente. Dicha luz es recogida a 90°. Las longitudes de onda seleccionadas para su estudio son dirigidas mediante espejos (dicróicos) adecuados a

detectores fotomultiplicadores. Las longitudes de onda no deseadas son bloqueadas por filtros ópticos. Si se dispone de múltiples fluorocromos, excitables con la fuente de luz única, pueden unirse a las células permitiendo de este modo medidas fluorescentes simultáneas de varios parámetros en una sola célula.

Las señales eléctricas analógicas son convertidas en señales digitales y procesadas por un ordenador, con el fin de generar histogramas correlacionados con los parámetros deseados y efectuar el análisis de los mismos.

Las ventajas que proporciona la CMF frente a otros métodos que emplean fluorocromos incluyen la objetividad, elevada sensibilidad y velocidad de análisis, posibilidad de realizar mediciones simultáneas sobre una sola célula y separación celular en los “sorters”. Las desventajas y limitaciones son los altos costes de instrumentalización y la incapacidad de visualizar las células que estamos analizando.

### 6.3. HISTORIA DE LA CMF

Los intentos de abrir camino a una citología analítica o cuantitativa se remontan a los trabajos de Caspersson en 1936, desarrollados posteriormente por Pollister y Ris (116). Se comenzó cuantificando los ácidos nucleicos en células sin teñir mediante microespectrofotometría, utilizando rayos ultravioletas como fuente de energía. Más tarde se aprovechó con el mismo fin la reacción de Feulgen y, posteriormente, sustancias fluorescentes que se intercalan directamente con los ácidos nucleicos de forma estequiométrica, es decir, la reacción colorimétrica es proporcional a la cantidad de ADN (117). A pesar del porcentaje significativo de falsos negativos, la citometría estática ha ido progresando hasta nuestros días.

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

El primero en utilizar histogramas biparamétricos y desarrollar un sistema capaz de separar selectivamente partículas en función de sus características citométricas (el “sorter neumático”) fue Kamensky en 1965. Posteriormente Fulwyler desarrolló el “sorter electrostático”, basado en la tecnología de las impresoras de chorro de tinta. Es el sistema empleado en la actualidad en la mayoría de sorters.

En 1967-68 Van Dilla (118) describió el primer citómetro de flujo con configuración ortogonal (perpendicularidad de los ejes de iluminación, paso de muestra y detección de fluorescencia), y fue el primero en obtener un histograma de ADN por CMF.

Durante la década de los años ochenta se produce un importante avance en la aplicación de la CMF en varias áreas de la biología, genética, zoología, botánica, etc. (119).

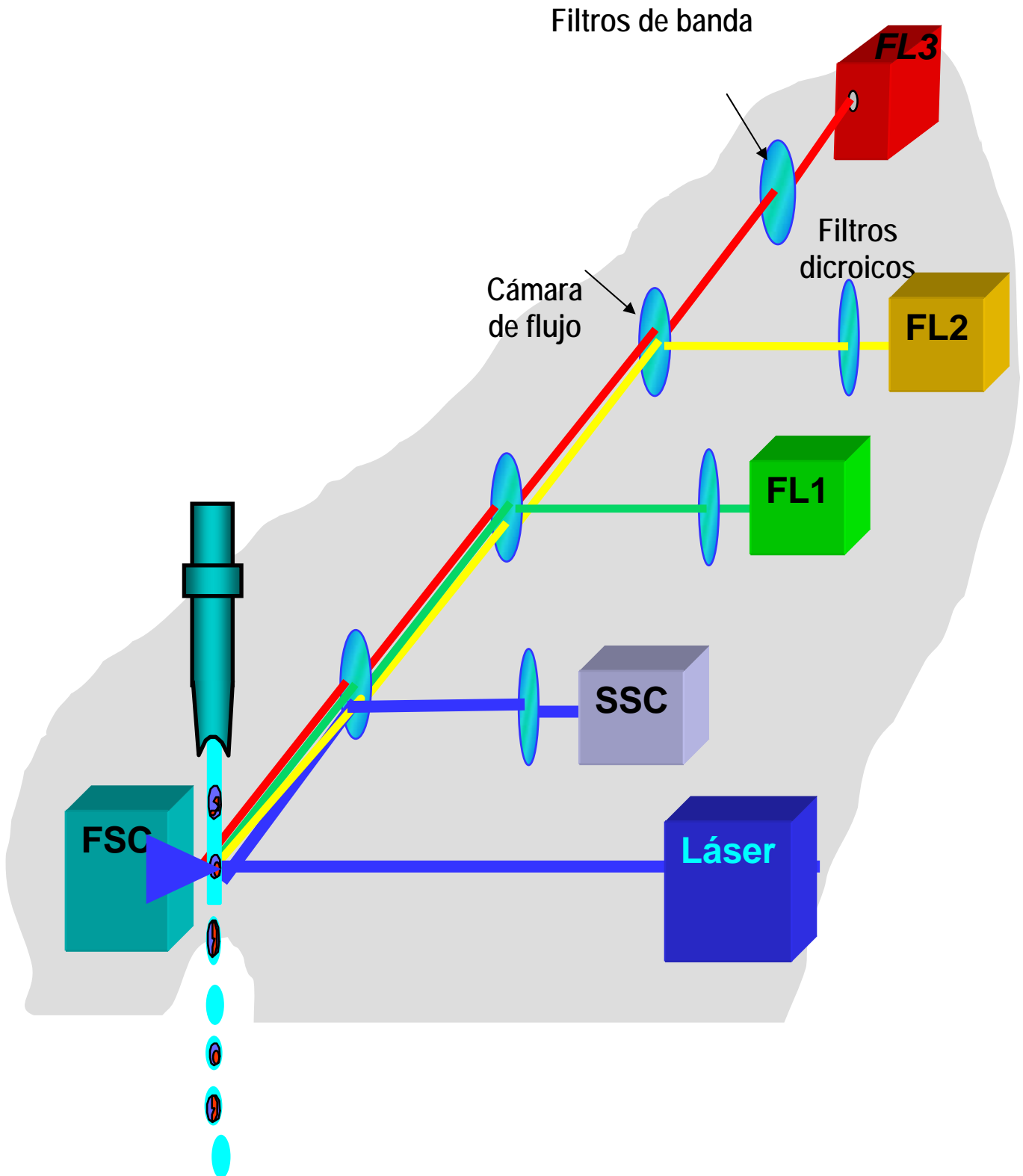
### 6.4. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CITÓMETROS DE FLUJO

Un citómetro de flujo está integrado por cuatro componentes:

- 1-compartimento fluídico o sistema hidráulico
- 2-fuente luminosa
- 3-sistema óptico
- 4-soporte informático para el análisis de datos



Figura 2. Representación esquemática de un citómetro de flujo



### SISTEMA HIDRÁULICO

Está compuesto por la cámara de flujo y el sistema de presión y de inyección de la muestra. Las cámaras de flujo son diferentes según sea la fuente de iluminación del citómetro. Los aparatos equipados con láser utilizan cámaras en que la inyección de la muestra pasa a través de un capilar que se estrecha y centra el flujo de la misma.

El sistema de fluido es usualmente un tampón salino isotónico. Los citómetros poseen mecanismos que permiten al observador efectuar pequeñas modificaciones en la posición de la cámara de flujo y en la trayectoria del haz de luz para ajustar al máximo la intercepción de los mismos. Cuando la célula pasa a través de la luz del láser, los transductores convierten señales ópticas y fluorescentes en señales eléctricas. Estos pulsos eléctricos son posteriormente amplificados, integrados y registrados por medio de un conversor analógico-digital para que puedan ser analizados por un computador. Cada célula es considerada un evento apropiado, que es proporcional a la intensidad de la señal. En este sentido una intensidad continua de fluorescencia es convertida en impulsos digitales discontinuos o canales, cuyo número está entre 256 (8 bits) y 1024 (10 bits). Cada canal representa un cierto rango de intensidad de luz, y la señal de una célula se registra en uno u otro canal dependiendo de la intensidad de la misma. A partir de los datos se genera un histograma de distribución de las células de la población analizada en función de los diferentes valores del parámetro estudiado que imprime el número de eventos por canal (intensidad) (120).

### SISTEMA ÓPTICO:

El sistema óptico está constituido por la *fente de luz*, los *filtros* necesarios para discriminar la señal lumínica y llevarla al detector adecuado y, por último, los *fotodetectores*, que se encargan de recoger la luz. La iluminación de las partículas a medida que fluyen a través de una fuente de luz es la responsable de la generación y difusión de las señales fluorescentes en las que el análisis por CMF está basado.

Las **fuentes de luz** primaria usadas más frecuentemente en CMF son láseres de argón de baja intensidad (488nm, 15 mW), refrigerados por aire, y lámparas de mercurio. Cada láser es capaz, en función de su longitud de onda, de excitar un colorante en particular.

El paso de una célula por delante del haz de rayo láser va a proporcionar información sobre las distintas características celulares en relación a la dispersión de la luz que provoca y a la emisión de la luz por los fluorocromos presentes en las células y excitados por el láser. La luz dispersada es recogida por las lentes colectoras, y mediante los filtros ópticos de la bancada óptica es desviada a los fotodetectores (120).

Los **filtros ópticos** son los que seleccionan la longitud de onda que llega a cada fotodetector y le confiere la especificidad de lectura de una u otra fluorescencia. Existen *filtros coloreados o de absorción*, que absorben la luz de una determinada longitud de onda. Los *filtros de interferencia o dicroicos* reflejan la luz que tiene una longitud de onda superior o inferior a la que dejan pasar.

Los **fotodetectores** pueden ser de dos tipos: los *fotomultiplicadores*, que detectan la señal de fluorescencia y la luz dispersa a 90° y los *fotodetectores diodos*, que detectan generalmente la dispersión frontal de la luz.

### SUSPENSIÓN CELULAR:

Para el estudio por CMF en primer lugar es necesario obtener una suspensión de células o núcleos de la muestra a analizar que sea representativa, de alta calidad, sin contaminaciones y de buen rendimiento (121). Aunque tales células en suspensión son fácilmente preparadas para especímenes fluidos como son la sangre periférica o los tejidos linfoides, es más difícil su obtención de los tumores sólidos, de disgregación

más compleja. Se han descrito diferentes métodos para disgregar **tejido sólido y fresco** y convertirlo en una suspensión de células o núcleos, rompiendo los enlaces intercelulares. Estos métodos se basan en la disgregación mecánica aislada, por ejemplo, en muestras obtenidas mediante aspiración con aguja fina (122-124); o combinada con disgregación enzimática o con detergentes, dependiendo de las características del tejido a analizar. Todos estos agentes y su procesado producen diferentes grados de lesión celular que dificultan un cálculo preciso de las fases del ciclo celular (125), una de las principales fuentes de error en la determinación de la ploidia de ADN en tumores sólidos, que depende de la concentración enzimática y el tiempo de incubación (121).

En 1983 Hedley (126) publicó la técnica de determinación del ADN en **piezas incluidas en parafina**, modificada posteriormente por otros autores (127). Este método utiliza la *digestión con pepsina*. La utilización de este material presenta gran número de ventajas para la realización de estudios clínicos. En primer lugar, pueden investigarse grandes series de pacientes en los que es posible realizar un seguimiento retrospectivo, conocida ya la evolución clínica de los enfermos. Además, si se desea estudiar lesiones poco frecuentes el uso de material archivado nos permite recoger una casuística adecuada. Desde el punto de vista técnico estos histogramas son más difíciles de interpretar por la variabilidad de la intensidad de la fluorescencia en cada muestra, la existencia de más detritus; ello hace que la deflexión G0/G1 sea más irregular y de base más amplia ( con mayor coeficiente de variación) lo que puede enmascarar algunas aneuploidias y alteraciones de la fase S (128-130). Otra limitación es que sólo pueden estudiarse los parámetros nucleares, ya que el citoplasma se destruye cuando los cortes gruesos tienen que trocearse muy finamente y digerirse con enzimas proteolíticas; de forma que el grosor del corte de tejido afecta la calidad del resultado obtenido (131). La edad del bloque no influye, al menos en períodos inferiores a 10 años (132), aunque la fluorescencia disminuye con el tiempo (133).

*Otros métodos de digestión enzimática* han sido desarrollados para obtener suspensiones nucleares incluidas en parafina, y digeridas con tripsina (134).

Por lo general la mayoría de los autores considera que la información recibida de los cortes de parafina es igual de reproducible que la obtenida de tejido fresco congelado (135-137), aunque algunos de ellos defienden como más fiables los resultados obtenidos a partir de tejido fresco (19,138,139).

#### **COLORANTES:**

Diversos tipos de tinciones fluorescentes están a nuestro alcance para el análisis del ADN; el más empleado es el yoduro de propidio (PI), que puede ser excitado por una luz láser a una longitud de onda de 488 nm.

El **yoduro de propidio**, el fluorocromo utilizado en este estudio, es del tipo intercalante, que se une al material genético de doble cadena intercalándose entre las dos bases; presenta especificidad por el ADN y ARN de doble cadena. La muestra requiere un tratamiento previo con ARNasa si sólo se desea medir ADN (140). El espectro de excitación se encuentra en el azul/verde-rojo, y precisa de células muertas y fijadas puesto que no atraviesa las membranas íntegras, lo que sirve para discriminar células viables de no viables. El PI no es fluorescente a menos que esté enlazado a ácido nucleico de doble cordón y cuando está unido a ADN es mucho más fluorescente que en suspensión.

A través de la CMF podemos determinar dos tipos de **propiedades celulares**: las *intrínsecas*, que son aquellas que podemos medir sin necesidad de añadir reactivos exógenos, como pueden ser el tamaño o la granularidad, y las *extrínsecas*, como la medición del contenido de ADN, que precisa la adicción de un reactivo. Tanto las extrínsecas como las intrínsecas pueden ser *estructurales*, como en el caso del contenido de ADN, o *funcionales*, como en el caso del estado redox o la actividad enzimática. Para los estudios multiparamétricos en una determinada población se utilizan las propiedades **intrínsecas y estructurales**.

Una de las aplicaciones más conocidas de la CMF es la diferenciación de poblaciones celulares en una muestra heterogénea (131,141). La heterogeneidad tumoral sigue siendo de interés para el clínico; entre un 20 y un 30% de los tumores colorectales son heterogéneos (142).

La detección de antígenos de superficie celular mediante la utilización de anticuerpos monoclonales conjugados con distintos fluorocromos es otra de las aplicaciones de la CMF, técnica utilizada ampliamente para el estudio de subpoblaciones linfocitarias (143).

#### *ESTUDIO DEL CONTENIDO DE ADN Y FASES DEL CICLO CELULAR POR CMF*

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

- 1-por un lado, permite conocer la distribución de una población celular a lo largo de distintas fases del ciclo celular
- 2-por otro lado, determinar la existencia o no de aneuploidias

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

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

El **análisis del contenido de ADN** se basa en: 1) las células en diferentes estadios del ciclo celular poseen diferente contenido de ADN, y éste es un hecho predecible 2) los fluorocromos se unen de forma estequiométrica, es decir, la intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de fluorocromo, que a su vez lo es al contenido de ADN celular y 3) las células normales son euploides, la presencia de aneuploidia es un buen marcador de malignidad.

Existe cierta discordancia entre el resultado teórico y el obtenido, debido a la variabilidad biológica en la tinción y la lectura; por ello, se definió el **coeficiente de variación (CV)**, que nos da una idea de la aproximación de los resultados obtenidos a la realidad, y que hace necesaria la utilización de programas informáticos para discriminar correctamente el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular.

#### *APLICACIONES DE LA CMF EN EL DIAGNÓSTICO TUMORAL*

Mediante la CMF se mide el contenido en ADN, y, por tanto, las anomalías cromosómicas, siempre que éstas se traduzcan en un cambio del contenido de ADN que no escape al poder de resolución del citómetro. Para el estudio de la ploidia la medición del contenido en ADN se realizará sobre una gran cantidad de núcleos y es independiente de la actividad proliferativa del tumor (144).

Diversos estudios han comprobado, mediante la utilización de la CMF, el gran porcentaje de aneuploidia, incluso superior al 90% en tumores sólidos, constituyendo un parámetro de alta sensibilidad y especificidad. El grado de ploidia se relaciona con el diagnóstico histopatológico, sexo, edad, y actividad proliferativa.

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

De las aplicaciones de la CMF, la más extensamente estudiada es la correlación entre el contenido de ADN y pronóstico (145,146). El **índice de ADN**, resultado de la división del contenido de las células tumorales en fase G1 y el contenido de ADN de las células euploides de la misma fase, es el índice pronóstico más empleado. Un índice de 1 es sinónimo de diploidia (147). Otra de las aplicaciones de la CMF es el estudio de la proliferación celular mediante la medición del porcentaje de células en fase S. Esta aplicación también ha sido ampliamente correlacionada con el pronóstico de los distintos tumores (148-153).

#### *VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA CMF*

Las ventajas de la CMF son:

- permite medir de forma objetiva y automatizada parámetros celulares (119). Los resultados son reproducibles de un centro a otro, siempre que se sigan procesos estandarizados (154)
- rapidez de ejecución, ya que pueden estudiarse hasta 2.000 células por segundo
- sensibilidad
- el análisis de ploidia de ADN es independiente de la actividad proliferativa celular
- muestra menor coeficiente de variación para poblaciones homogéneas que las técnicas estáticas (116).

Los inconvenientes de la CMF son:

- necesidad de una suspensión celular monodispersa
- contaminación con poblaciones celulares no malignas. No permite diferenciar con claridad células euploides tumorales, linfocitos, células infectadas y epitelio normal
- no se preserva la arquitectura del tejido
- posibilidad de error por una pobre discriminación de dobletes (dos núcleos adherentes, registrados como uno solo por CMF) de las células en fase G2M del ciclo celular
- alto coste de los equipos (155)

## 6.6. VALOR CLÍNICO Y PRONÓSTICO DE LA CMF EN EL CCR HUMANO

Con la intención de mejorar la supervivencia de los enfermos con CCR es necesario encontrar factores adicionales independientes para predecir la evolución tras haber sido sometidos a una resección con fines curativos. De ahí el interés en establecer el valor pronóstico del contenido de ADN (ploidía) de los tumores. Wolley (156) realizó el primer estudio prospectivo sobre el valor pronóstico de la determinación de ADN por CMF en CCR. Este autor demostró que los tumores aneuploides mostraban una rápida evolución clínica hacia enfermedad diseminada y muerte.

Desde entonces, diversos autores han seguido la misma línea de investigación, pero sin que haya podido establecerse un patrón uniforme que defina los modelos de histograma tumoral. Emblad (157) admite tres tipos de histogramas: aneuploide, diploide y casi-diploide, tomando como modelo las curvas de ploidía obtenidas por CMF. Albe (158) describe también tres tipos: diploide, diploide con S alta y aneuploide, siguiendo los criterios de la *Conference on Analytical Cytology and Cytometry IX* y del *VI International Symposium on Flow Cytometry*. Hoy en día se ha desestimado el término “casi diploide”.

La gran mayoría de los trabajos realizados, tanto en muestras en fresco como en muestras incluidas en parafina indican una tendencia clara de que los tumores con un contenido casi normal de ADN (diploide) tienen mejor pronóstico que los de composición de ADN anormal (aneuploide) (159-165), aunque el verdadero valor predictivo se encuentra en el índice de ADN (161,162,166). Algunos autores, como Bauer (167), consideran que la existencia de ganglios positivos o metástasis son factores pronósticos más potentes que cualquier parámetro de actividad del ADN. Los estudios de Stipa (168) consideran que la aneuploidia de ADN no es una variable pronóstica independiente capaz de predecir la supervivencia a largo plazo en pacientes sometidos a resección radical, aunque otros trabajos no coinciden con esta opinión (159,160,163). La mayoría de los estudios apuntan una tendencia hacia una frecuencia creciente de aneuploidia de ADN en estadios altos de Dukes (164,169,170), y en los tumores localizados en colon descendente y recto (169,171,172).

Otros autores no encuentran correlación entre la aneuploidia e índice de ADN y el grado de proliferación celular o los estadios de Dukes (173-175).

En general, la frecuencia de aneuploidia de un tumor no se correlaciona con las variables clínicas como sexo y edad, aunque el hallazgo de aneuploidia se asocia a peor pronóstico en pacientes jóvenes (<40 años) (176).

La presencia de CCR aneuploide varía según el tipo y preparación de las muestras y oscila entre un 35 y un 75% (156,173,176).

Se ha observado asociación entre el grado de atipia celular y el aumento en la proporción de aneuploidias en CCR (177).

Los tumores aneuploides presentan valores de % fase S superiores a los diploides (169).

Los tumores aneuploides muestran en general altas concentraciones plasmáticas de CEA (178).

Otra utilidad de la CMF es la identificación de lesiones premalignas asociadas a ADN anormal como la enfermedad inflamatoria (179) o la enfermedad polipósica (180).

## **JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

Pocos artículos en la literatura han demostrado su interés por el estudio de la proliferación celular y la muerte celular programada de las lesiones preneoplásicas del colon.

Durante la última década numerosos trabajos investigan el papel que diversos oncogenes, genes supresores de tumor, marcadores de proliferación celular e inhibidores de la misma juegan en el desarrollo de lesiones cancerosas a partir de un pólipo adenomatoso colo-rectal preexistente.

De todos ellos destacan por sus posibles aplicaciones diagnósticas y terapéuticas los dedicados al estudio citométrico del contenido de ADN celular en la secuencia adenoma-cáncer colorrectal. El establecimiento definitivo del papel que juega la inhibición de la apoptosis en dicha secuencia podría también condicionar el manejo clínico futuro de los pacientes afectados de pólipos adenomatosos colo-rectales.

El presente trabajo pretende establecer de forma simultánea la influencia del contenido de ADN celular y la inhibición de la muerte celular programada en la secuencia adenoma-cáncer colorectal, correlacionando ambos con variables clínico-demográficas y anatomopatológicas.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

1. El estudio del contenido de ADN y proliferación celular por citometría de flujo puede ser un indicador importante para el diagnóstico precoz de transformación maligna de los pólipos colorrectales.
2. El fracaso o inhibición de la apoptosis favorece el crecimiento celular y puede conducir a la formación de pólipos colorrectales así como a su transformación maligna.

## OBJETIVOS

Para corroborar las hipótesis previamente planteadas se ha pretendido:

1. Determinar los patrones normales de proliferación celular de los segmentos de intestino grueso humano: colon derecho, colon transverso, colon izquierdo, y recto-sigma, describiendo las posibles diferencias entre los distintos segmentos colónicos.

2. Estudiar el contenido en ADN ( ploidia de ADN ) y fases del ciclo celular (actividad proliferativa: fase S ) por citometría ,de muestras parafinadas obtenidas a partir de pólipos colónicos extraídos mediante polipectomía endoscópica.

3. Analizar la ploidia de ADN y proliferación celular de las regiones adenomatosa y tumoral en el subgrupo de los pólipos colorrectales con carcinoma focal (intramucoso o invasor).

4. Intentar establecer la existencia de alguna posible relación entre los resultados obtenidos mediante el estudio citométrico y las variables clínico-demográficas (edad, sexo) y anatomopatológicas (localización, histología, grado de displasia, tamaño, implantación, presencia o ausencia de cáncer focal).

5. Establecer la distribución topográfica de la apoptosis (previa determinación de tres zonas glandulares: superficial, media y basal) en la mucosa colónica normal y en los pólipos colorrectales.

6. Determinar la distribución topográfica de la región adenomatosa y tumoral en el subgrupo de los pólipos colorrectales con carcinoma focal (intramucoso o invasor).

7. Cuantificar la apoptosis mediante el índice de apoptosis tanto en la mucosa colónica normal como en el grupo de pólipos con o sin cáncer focal.

8. Comprobar si existe relación entre los resultados obtenidos mediante el estudio de la apoptosis (distribución topográfica e índice de apoptosis) y las variables demográficas y anatomopatológicas descritas previamente.



# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. MUESTRAS

### 1.1.OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

#### 1.1.A.PÓLIPOS

Mediante la búsqueda en el registro de polipectomías endoscópicas de la Sección de Digestivo del Servicio de Medicina Interna y en el registro informatizado del Servicio de Anatomía Patológica de nuestro Hospital (Hospital Universitario de 400 camas) se preseleccionaron un total de 183 muestras parafinadas correspondientes a pólipos extirpados mediante polipectomía endoscópica entre los años 1996 y 2001.

El estudio anatómico-patológico de dichas muestras fue realizado previa obtención de los cortes estándar y tinción con H-E por el personal del Servicio de Anatomía Patológica.

Un total de 46 bloques debieron ser desestimados por agotamiento de la pieza parafinada o por limitación técnica. En el caso de los 36 pólipos con áreas de degeneración cancerosa iniciales (carcinoma intramucoso o microinvasor), se procesaron por separado los segmentos con y sin degeneración neoplásica, perdiéndose 3 muestras por obtención de secciones de tamaño insuficiente tras dicho proceso.

Así, se partió de un número total de muestras válidas de 134 pólipos, 33 de ellos con áreas de degeneración cancerosa.

#### 1.1.B.CONTROLES

Se obtuvieron un total de 128 muestras de mucosa normal, de tres procedencias:

a-muestras obtenidas mediante biopsia endoscópica en pacientes sometidos a colonoscopia en nuestro centro en los que no se objetivó patología orgánica tras realización de la prueba ( 18 casos)

b- muestras obtenidas mediante biopsia endoscópica en pacientes sometidos a colonoscopia en los Hospitales San Jorge y Miguel Servet de Zaragoza, siempre que no se objetivase patología orgánica tras la realización de la prueba (106 casos)

c- muestras obtenidas a partir de bloques parafinados del archivo del servicio de Anatomía Patológica de nuestro centro, obtenidos a partir de piezas quirúrgicas, siempre que correspondiesen a pacientes sin patología colónica neoplásica, inflamatoria o atrófica (4 muestras)

### 1.2.PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

### 1.2.A.PROTOCOLO DE INCLUSIÓN EN PARAFINA

Esta técnica previa sólo se realizó sobre las muestras frescas de mucosa normal obtenidas mediante biopsia endoscópica. Se utilizó el siguiente protocolo:

- La inclusión se inició con la deshidratación de las muestras en alcoholes de gradación creciente (50,70,80 y 90%), y finalmente se realizaron tres cambios en alcohol absoluto.
- Una vez deshidratadas las muestras, se aclararon mediante pasos sucesivos en xilol para extraer el agente deshidratante.
- Finalmente se formaron los bloques siguiendo el procedimiento habitual, procurando la orientación más favorable dentro de los moldes.

### 1.2.B PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA APOPTOSIS

#### **-PÓLIPOS**

Un total de 134 muestras fueron procesadas para estudio de muerte celular programada.

De cada bloque parafinado se obtuvieron 2 cortes de 4  $\mu\text{m}$  para el estudio de apoptosis.

#### **-CONTROLES:**

En el caso de las muestras de mucosa normal obtenida mediante biopsia endoscópica hubo que realizar como paso previo a su procesamiento, tanto para estudio de apoptosis como de citometría de flujo la inclusión en bloques de parafina.

Del total de 128 muestras normales obtenidas, sólo 100 pudieron ser analizadas para estudio de apoptosis (por muestra insuficiente u orientación incorrecta de las glándulas colónicas que dificultaba la lectura).

Una vez formados los bloques de parafina, se procedió a la obtención de dos cortes de 4  $\mu\text{m}$ . de grosor para realización del estudio de apoptosis.

### 1.2.C PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA CITOMETRÍA DE FLUJO

#### **-PÓLIPOS:**

En cuanto al estudio de contenido de ADN mediante citometría de flujo , 2 de las 134 muestras debieron ser desestimadas por muestra insuficiente o dificultades en la preparación de las muestras previas a la lectura citométrica (una de ellas correspondiente a un pólipo con carcinoma invasor y la otra a uno con carcinoma intramucoso).

Se procedió a la obtención de 2 cortes de 50  $\mu\text{m}$  de cada muestra para la CMF.

En el caso de los pólipos con carcinoma intramucoso o invasor, se obtuvieron secciones independientes tras tinción y verificación de las dos zonas.

#### **-CONTROLES:**

Sólo en 115 de las 128 muestras pudo realizarse el estudio citométrico, por tamaño insuficiente de la muestra.

Se realizaron asimismo 5 cortes de 50 $\mu\text{m}$  de grosor de cada uno de los bloques parafinados previamente obtenidos.

## 1.2.D PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA ESTUDIO HISTOLÓGICO

### **-PÓLIPOS:**

Se obtuvieron 2 cortes de 5 $\mu$ m de grosor para su posterior tinción y estudio histológico. En la mayoría de los casos dichos cortes ya habían sido obtenidos y teñidos con la técnica de H-E dentro del proceso diagnóstico de rutina del centro.

### **-CONTROLES:**

De cada uno de los bloques parafinados se obtuvieron 2 cortes de 5 $\mu$ m de grosor.

### **1.3.PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA APOPTOSIS**

**Se utilizó una modificación del método TUNEL ( Gavrieli Y, 1992 ), aplicándose a todas las muestras el siguiente protocolo:**

1. Desparafinar e hidratar las muestras
  - 1.1 colocar en la estufa de 60°C durante 30 minutos
  - 1.2 Xilol 10 minutos
  - 1.3 Xilol 5 minutos
  - 1.4 Alcohol 96° 5 minutos
  - 1.5 Alcohol 96° 5 minutos
  - 1.6 Alcohol 70° 5 minutos
  - 1.7 Alcohol 70° 5 minutos
  - 1.8 Agua destilada 5 minutos
  - 1.9 Agua destilada 5 minutos
  
2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 8% 5 minutos (manipulación con guantes) en cubeta vertical. Preparación de la solución con 3,75 ml. De H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 100 ml. de agua bidestilada
  
3. Agua destilada 5 minutos
  
4. Agua destilada 5 minutos
  
5. TdT buffer 5 minutos. Se preparan 10 ml de la solución stock y 90 ml de agua bidestilada. (Trisma base 30 mM pH 7,2 140 mM Cacodilato sódico, 1mM de cobaltoclorhídrico)
 

Preparación de la solución stock:

  - 3,64 g de Trisma base
  - 29,96 g de cacodilato sódico
  - 0,24 de cobaltoclorhídrico
  - aforar hasta 100 ml de agua bidestilada

Se siguió este orden: disolver el trisma en 40 ml de agua bidestilada, añadir el cacodilato sódico y dejar disolver; añadir el cobaltoclorhídrico. Añadir agua bidestilada hasta 95cc y ajustar el pH a 7,2 con ClH puro. Por último, aforar hasta 100cc en un matraz. La solución, de color rosado, se conserva hasta su utilización en nevera un tiempo máximo de un mes.
  
6. Reacción TUNEL una hora a 37°C en estufa en cámara húmeda
 

Preparación de la solución:

  - 1060µl de agua bidestilada
  - 125µl de solución stock de TdT buffer
  - 12,5µl de biotin-16-dUTP® (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)
  - 3,75µl de Terminal transferasa® (TdT) (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)

Se obtiene un volumen total de 1,2 ml.

Debe evitarse que se descongelen el bio-dUTP y el TdT. Para ello, se mantienen en hielo. En un eppendorf se coloca el agua destilada y la solución de TdT buffer. Se descongelan con las manos el bio-dUTP y el TdT y se añaden.

Los portas se secan con papel secante alrededor de la muestra y se delimitan unos pocillos incluyendo la muestra, en los que se deposita la solución tunel.

7. Solución stop 15 minutos (50 ml).  
Preparación de la solución:  
(300 mM de ClNa, 30 mM de citrato sódico)  
-1,75 g de ClNa  
-0,88g de citrato sódico  
-añadir 100 ml de agua bidestilada
8. PBS 0,1 M 5 minutos.
9. PBS suplementado con un 1% de albúmina bovina 10 minutos.
10. Reacción Avidina, Biotina, Peroxidasa con Vectastain Elite ABC Kit standard pk-6100® (Vector Laboratories, Inc, Burlingame)  
Preparación de la solución (debe prepararse 30 minutos antes y mantenerse a oscuras)  
-10µl A+10µl B+ 1 ml de PBS  
Se coloca la solución dentro de los pocillos
11. Lavado PBS 5 minutos.
12. Lavado PBS 5 minutos.
13. Diaminobencidina (DAB). Debe manipularse con guantes y mascarilla y en campana, por ser cancerígena por inhalación-en polvo- y contacto de la solución.  
Preparación de la solución:  
3g de DAB en 120ml de agua destilada. Se prepararon alícuotas de 1,25 ml y se congelaron hasta su uso. En cada proceso de tinción se descongelaron 2 alícuotas y se añadían a una cubeta con 250 ml de PBS. En el momento de usar añadir 8 gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%. Debe controlarse de forma individualizada la tinción DAB, en función del tamaño y número de muestras (5-10 minutos)  
El material que ha contenido DAB se inactiva con lejía viva durante 24 horas.
14. Agua bidestilada 5 minutos. Inactivación posterior con lejía del material.
15. Agua bidestilada 5 minutos de la tinción reservada a la apoptosis.
16. A continuación se procede al contrastado de las muestras con Hematoxilina de Harris durante 3 minutos.
17. Deshidratar y montar las muestras.

#### **1.4.PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA CITOMETRÍA DE FLUJO**

**Tinción de ADN:** se aplicó una modificación de la técnica de Hedley ( Hedley DW, 1983 ): tal y como se describe a continuación:

1. Las secciones de tejido parafinado de 50  $\mu\text{m}$  de grosor obtenidas de cada muestra se colocaron en un tubo convenientemente etiquetado.
2. Se procedió a la desparafinación sumergiendo las secciones de tejido en tubos de cristal con 5 ml. de xilol durante 10 minutos. Se procede a su decantamiento y se repite este paso con 10 ml. de xilol. Nuevamente se decanta y se eliminan los restos de xilol mediante lavados con alcohol absoluto.
3. Rehidratar sumergiendo sucesivamente las secciones en:
 

etanol 100%.....	5 minutos
etanol 95%.....	5 minutos
etanol 96%.....	5 minutos
etanol 70%.....	10 minutos
etanol 50%.....	10 minutos
agua destilada.....	10 minutos
4. Se decanta el agua y se disgregan mecánicamente las piezas con ayuda de un batidor.
5. Se tratan con 4 ml. de solución de pepsina (Pepsin, SIGMA®) al 0,5% en cloruro sódico al 0,9% en agua destilada y ajustando el pH a 1,5. Se colocan los tubos en un baño maría a 37°C durante 40 minutos, con agitaciones intermitentes en vórtex.
6. Se centrifugan a temperatura ambiente durante 10 minutos a 2.000r.p.m en una centrífuga clínica.
7. Se decanta y resuspende el tejido en PBS, y se agita nuevamente en el vórtex para liberar los núcleos celulares de los fragmentos de tejidos.
8. Se filtra la suspensión a través de una malla de nylon de 50  $\mu\text{m}$  de poro. El filtrado tiene la misión de remover los agregados celulares y el tejido insuficientemente disgregado que pudiera obstruir la cámara de flujo del citómetro.
9. Se determina la concentración de la suspensión de núcleos con un contador celular o hemocitómetro. Si es necesario, puede añadirse PBS o centrifugar y resuspender en tampón hasta que al concentración final de núcleos esté en el rango de  $3-10 \times 10^6$  células/ml.
10. Nuevamente se decanta y resuspende con 2 ml de solución de yoduro de propidio y RNAsa (DNA pep Reagent, COULTER®), dejando actuar 20 minutos a temperatura ambiente y en lugar oscuro.
11. Se pasa la suspensión a través de una jeringa de aguja fina, para separar los núcleos y evitar la formación de dobletes.

## **1.5. TINCIÓN DE LAS MUESTRAS PARA ESTUDIO HISTOLÓGICO CONVENCIONAL**

## TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA

La tinción de H-E se utiliza habitualmente como tinción de rutina para la visión del aspecto morfológico de las secciones de parafina y del estado del tejido a estudiar.

### Preparación de los colorantes

#### A. *Hematoxilina de Harris*

- cristales de hematoxilina 5gr
- alcohol 100% 50ml
- alumbre potásico 100 gr
- agua destilada 1000ml
- óxido de mercurio 2,5gr

Procedimiento: se disuelve la hematoxilina en el alcohol, el alumbre en el agua y se mezcla con la ayuda del calor. Se retira al minuto y se agita, añadiéndose a continuación lentamente el óxido de mercurio. Se recalienta lentamente hasta que la solución adquiere un color púrpura oscuro, retirándola rápidamente del calor y sumergiéndola en un recipiente con agua fría. La tinción estará lista para su uso tan pronto como se enfríe. Se añaden 2-4 ml de ácido acético glacial por cada 100 ml de solución a fin de mejorar la tinción de los núcleos celulares. Se filtra la hematoxilina antes de ser usada.

#### B. *Eosina alcohólica*

Se prepara la solución stock, formada de:

- eosina Y, soluble en agua 1gr
  - agua destilada 20 ml
- se disuelve y añade
- alcohol 95% 80 ml

La solución de trabajo se prepara como sigue:

- solución stock de eosina 1 parte
- alcohol 80% 3 partes

justo antes de su uso se añaden 0,5 ml de ácido acético glacial por cada 100 ml

### Protocolo de tinción

Los portas se colocan en cestillas de tinción y se desparafinan sumergiéndolas en xilol durante 15 minutos, repitiendo este paso dos veces. Posteriormente las muestras se rehidratan con concentraciones decrecientes de alcohol hasta llegar a agua destilada, procediéndose seguidamente a la tinción:

1. Hematoxilina Harris 15 minutos
2. Lavado en agua corriente 5 minutos
3. Aclarado con CIH (4 ml en 250ml de alcohol 96%)
4. Lavado en agua corriente 10 minutos
5. Eosina alcohólica 5 minutos

Se deshidratan las muestras con concentraciones crecientes de alcohol y xilol y se montan con DPX.

## **2. CITOMETRÍA DE FLUJO**

Las muestras, una vez teñidas con yoduro de propidio adquieren una determinada cantidad de fluorocromo en proporción a su contenido en DNA. Con el citómetro de flujo se pretende la medición de manera rápida y objetiva de la fluorescencia emitida por los núcleos. A partir de estos datos se realiza el análisis de la ploidia y de las fases del ciclo celular.

### **2.1. CARACTERÍSTICAS DEL CITÓMETRO DE FLUJO**

Para el análisis se ha empleado un citómetro de flujo EPICS PROFILE I (Izasa-Coulter®) –luz a 488 nm de 15mW, capacidad para medir tres canales de fluorescencia, *forward scatter* y *side scatter*) implementado con el paquete “Power Pack” (cuarto fotomultiplicador, histogramas logarítmicos de cuatro décadas, discriminador de señal de pico), lo que equivale a convertirlo en un PROFILE II. Es un citómetro de cámara cerrada sin *sorter*.

### **2.2. ALINEACIÓN DEL CITÓMETRO**

Previamente a procederse a la lectura se realizaba una calibración de la alineación del sistema con bolas fluorescentes de látex (DNA-check EPICS®)

### **2.3. CARACTERÍSTICAS DEL TEST DE LECTURA**

- volumen de muestra aspirada: 180 µl
- velocidad de inyección de la muestra: 10 µl/min (velocidad baja)
- presión de fluido de arrastre: 7,40 psi
- potencia de láser: 15 mW
- voltaje de los fotomultiplicadores: SS:400V, FL3:800V
- parámetros seleccionados: LSS, LFS, FL3P, FL3
- ganancias: FL3:1,5 , FL3P:1
- discriminadores: para FL3 en el canal 50
- parada a los eventos: parada a los 50.000 eventos
- regiones amorfas (bitmaps) de adquisición: FL3-FL3P: para discriminación de dobles. LSS-LFS: adquisición en función de tamaño y complejidad celular.
- Histogramas: cuatro histogramas
  - histograma biparamétrico de LSS-LFS
  - histograma biparamétrico de FL3-LFS para comprobar la calidad de la tinción (independencia del canal de FL3 y tamaño nuclear)
  - dos histogramas monoparamétricos, ambos FL3 (uno sin bitmaps activados y otro activando bitmaps LSS-LFS).

### **2.4. LECTURA POR EL CITÓMETRO DE FLUJO**

Las muestras se analizaron según el test definido. La adquisición de los datos se realizó tras 60 segundos del inicio del paso de las muestras para que se estabilizara el flujo.



## **2.5. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA LECTURA POR CITÓMETRO DE FLUJO**

En el estudio por citometría de flujo de las muestras (pólipos sin malignizar/secciones malignizadas/mucosa normal) teñidas con yoduro de propidio se obtienen histogramas monoparamétricos con la distribución de la fluorescencia proporcional al contenido de ADN de los núcleos analizados.

Para una correcta cuantificación de la cinética celular se ha aplicado un programa informático específico para la interpretación del ciclo celular (MULTICYCLE®, Phoenix Flow Systems). Este programa emplea procedimientos matemáticos capaces de sustraer la señal debida a núcleos cortados y otros detritus.

## **2.6. ANÁLISIS DE LOS HISTOGRAMAS DEL CONTENIDO EN ADN MEDIANTE EL PROGRAMA INFORMÁTICO**

Para cada uno de los histogramas seleccionados se identificó la presencia de uno o más picos correspondientes a células en fase G0G1. La presencia de un único pico se considera como un histograma diploide y si aparecen más de un pico se considera el histograma aneuploide.

El programa informático obtiene los valores mejor ajustados al histograma y con menor error calculando el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular.

Para el análisis por CMF se analizaron para cada histograma un mínimo de 10.000 células.

### **3. APOPTOSIS**

Tras la tinción de las muestras mediante la técnica TUNEL modificada, se procedió a la lectura de las mismas mediante microscopía óptica.

#### **3.1. CUANTIFICACIÓN DE LA APOPTOSIS.**

Tras revisar las preparaciones con microscopio óptico a bajo aumento se seleccionaron las áreas más representativas de cada muestra. El análisis cuantitativo fue realizado en diversas áreas utilizando el objetivo de x40 aumentos.

La tinción de TUNEL se consideró positiva al identificar las células con el núcleo teñido de color marrón de forma homogénea o granular, sin diferenciar en nuestro estudio entre cuerpos y núcleos de apoptosis.

Las células apoptóticas TUNEL positivas presentes en el interior de la membrana basal se incluyeron en el conteo, desestimando las localizadas en el estroma adyacente o aquellas expulsadas a la luz colónica.

Los fragmentos nucleares TUNEL positivos con apariencia agrupada, en ocasiones rodeados por un halo (cuerpo apoptótico) y los fragmentos positivos de mayor tamaño ( $2,5\mu\text{m}$ ) fueron considerados todos ellos células apoptóticas, ya que ambos representan los restos de una célula simple, y su conteo se añadió al de las células TUNEL positivas de apariencia normal.

Las glándulas fueron divididas para la cuantificación en tres regiones proporcionales (tercio superior, medio e inferior) mediante la utilización de un micrómetro ocular (escala  $10/10\text{mm}^2$ ).

Dado que los grupos de estudio no fueron igualmente representados, el conteo fue realizado sobre una media de  $143,14 \pm 28,51$  células en el tercio superior (mínimo:48-máximo:206),  $134,85 \pm 24,07$  células en el tercio medio (mínimo:75-máximo:204) y  $127,66 \pm 21,55$  células en el tercio inferior (mínimo:78-máximo:170), en el grupo de muestras normales.

En el grupo de pólipos sin carcinoma focal, el conteo se hizo sobre una media de  $165,43 \pm 43,09$  células (mínimo:91-máximo:290) en el tercio superior, de  $306,73 \pm 124,91$  células (mínimo:127-máximo:720) en el tercio medio y de  $252,80 \pm 100,77$  células (mínimo:114-máximo:557) en el tercio inferior.

En el caso del grupo de pólipos con carcinoma focal el recuento fue el siguiente:  $182,83 \pm 40,76$  células (mínimo:111-máximo:271) en el tercio superior,  $201,79 \pm 55,69$  (mínimo:111-máximo:375) en el tercio medio y  $202,68 \pm 60,05$  células (mínimo:108-máximo:376) en el tercio inferior. En el subgrupo de pólipos con carcinoma intramucoso el conteo se efectuó sobre una media de  $176,34 \pm 41,08$  células (mínimo:111-máximo:270) en el tercio superior;  $188,19 \pm 47,21$  células (mínimo:111-máximo:316) en el tercio medio y  $186,25 \pm 47,24$  células (mínimo:108-máximo:299) en el tercio inferior. En el subgrupo de pólipos con carcinoma invasor los conteos fueron respectivamente de  $214,59 \pm 60,55$  (mínimo:116-máximo:375),  $218,15 \pm 67,07$  (mínimo:112-máximo:376) y  $207,23 \pm 58,00$  (mínimo:112-máximo:376).

En el grupo de pólipos con carcinoma focal el conteo también se realizó por separado de las regiones adenomatosa y tumoral y por tercios glandulares. De esta forma los conteos se efectuaron sobre una media de  $203,12 \pm 31,93$  (mínimo:150-máximo:271) en tercio superior;  $223,52 \pm 44,85$  (mínimo:157-máximo:341) en tercio medio y  $179,55 \pm 60,82$  (mínimo:108-máximo:376) en tercio inferior para la parte adenomatosa. En la región tumoral el conteo se realizó sobre una media de  $162,55 \pm$

38,82 (mínimo:111-máximo:268) en tercio superior;  $180,06 \pm 57,56$  (mínimo:111-máximo:375) en tercio medio y  $179,55 \pm 60,82$  células (mínimo:108-máximo:376) en tercio inferior.

### **3.2. ÍNDICE DE APOPTOSIS**

El índice de apoptosis (IA) fue expresado como el porcentaje de células TUNEL positivas en relación con el número total de células examinadas en el campo.

## **4. VARIABLES DEL ESTUDIO**

### **4.1. VARIABLE TIPO DE MUESTRA**

- Mucosa normal
- Pólipo

### **4.2. VARIABLES CLÍNICO-DEMOGRÁFICAS**

- a) **Sexo:** variable cualitativa con dos categorías:
- Hombre
  - Mujer
- b) **Edad:** variable cuantitativa discreta, se agrupó en dos categorías
- < 65 años
  - ≥ 65 años

### **4.3. VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS**

A) **Generales:** Localización / segmento digestivo. Variable cualitativa con cuatro categorías:

- colon derecho o ascendente
- colon transverso
- colon izquierdo o descendente
- recto-sigma

B) **De los pólipos:**

B.a. *Tipo histológico:* variable cualitativa con tres categorías:

- adenomatoso
- túbulo-velloso
- adenoma vellosos

B.b. *Grado de displasia:* variable cualitativa con tres categorías:

- leve
- moderada
- severa

B.c. *Presencia de adenocarcinoma:* variable cualitativa. Se distinguirán 3 categorías:

- ausencia de carcinoma
- presencia de carcinoma intramucoso
- presencia de carcinoma invasor

B.d. *Tamaño:* se expresó en forma de variable cuantitativa con tres grupos de valores predeterminados:

- <1cm
- 1-2 cm
- >2cm

B.e *Implantación:* variable cualitativa . 2 categorías:

- sésil
- pediculado

#### **4.4. VARIABLES CITOMÉTRICAS**

1-**Estudio del contenido en ADN**, definiendo como índice de ADN (ID) al cociente entre la moda del pico  $G_0G_1$  de la población problema y la moda del pico  $G_0G_1$  del control (en %). A partir de ahí, se define:

- a) ADN diploide si ID igual a 1
- b) ADN aneuploide si ID diferente de 1

#### **2-Estudio de las fases del ciclo celular:**

- a) En caso de existir un único pico de fase  $G_0G_1$ , se considera la muestra diploide y se recoge el *porcentaje de células en fase S*.
- b) En caso de existir dos o más picos de  $G_0G_1$ , se considera la presencia de aneuploidia y se recoge el *porcentaje de células en fase S de la población diploide*.

El **coeficiente de variación** (CV) se utilizó para la valoración de la calidad del histograma, desechándose aquéllos con un CV superior a 10.

#### **4.5. VARIABLES DE APOPTOSIS**

- a) **Presencia de apoptosis:** variable cualitativa con dos valores, “+” y “-“. Se analiza de forma total y por zonas.
- b) **Índice de apoptosis:** variable cuantitativa, analizada de forma global y por zonas.
- c) **Distribución topográfica**, según tercios glandulares:
  - tercio basal
  - tercio medio
  - tercio apical

---

## **5. BASE DE DATOS Y TRATAMIENTO DE LA MISMA**

### **5.1. RECOGIDA DE DATOS**

Los datos referentes a las muestras analizadas se recogieron en unas hojas pre-diseñadas, conteniendo las variables a analizar. Se diseñaron 2 hojas diferentes, una de ellas para muestras de mucosa normal y la otra para los pólipos. Ambas se reproducen a continuación (figuras 3, 4 y 5).

Las hojas de recogida de datos incluyen además información clínica considerada de interés para el seguimiento posterior de los pacientes, pero que no se utilizó en el tratamiento estadístico posterior, por no constituir el objetivo de esta tesis.

### **5.2. CREACIÓN DE LA BASE DE DATOS**

Se diseñó una base de datos matricial e informatizada en la que se incluyeron los valores recogidos de cada una de las muestras analizadas. En el caso de los pólipos con una región malignizada, ambas secciones fueron introducidas por separado en la base de datos, convenientemente identificadas, para facilitar el estudio estadístico posterior.

Se empleó un sistema de filas y columnas capaz de ser leído en el programa informático SPSS 9.0 para Windows (1999). Todos los datos se introdujeron como dígitos alfanuméricos que en las variables cuantitativas representaban el valor de la variable y en las cualitativas una determinada categoría de las mismas.

VALOR DEL ESTUDIO CITOMÉTRICO DEL CONTENIDO EN ADN Y FASE S EN LOS PÓLIPOS COLÓNICOS CON CÁNCER FOCAL. PAPEL DE LA APOPTOSIS EN LA SECUENCIA ADENOMA-CÁNCER DE COLON. **PÓLIPOS**

NºHCª:..... Nº Biopsia: ..... Nº orden: .....

Nombre: ..... Edad: .....(años) Sexo:  Hombre  Mujer

Fecha biopsia: ...../...../..... Fecha actualización: ...../...../..... Seguimiento: ..... meses

**MACROSCOPIA:**

LOCALIZACIÓN del pólipo:  Colon derecho  Colon transverso  Colon izquierdo  Recto-sigma

PÓLIPO:  Sesil  Pediculado

TAMAÑO del pólipo:  < 1 cm  
 1-2 cm  
 > 2 cm

**MICROSCOPIA-ANATOMÍA PATOLÓGICA:**

TIPO HISTOLÓGICO pólipo:  Adenomatoso  Túbulo-veloso  Adenoma veloso

GRADO DISPLASIA:  Leve  Moderada  Severa

Presencia adenocarcinoma:  No  Carcinoma intramucoso  Carcinoma invasor

Borde / base libre de invasión:  Sí  No

Confirmación de presencia de adenocarcinoma en pieza quirúrgica:  Sí  No

Comentarios:.....

**TRATAMIENTO-EVOLUCIÓN**

Recidiva :  Sí  No

Resección de otros pólipos:  No  Sí- polipectomía endoscópica. Fecha:...../...../.....  
 Sí- cirugía. Fecha:...../...../.....

Cirugía tras estudio AP:  No  Sí. Fecha:...../...../..... Tipo intervención:.....

Otros tratamientos tras diagnóstico de adenocarcinoma :  Quimioterapia  Radioterapia  Quimio+Radioterapia

Fallecimiento:  No  Sí. Fecha:...../...../..... Causa:.....

Figura 3. Reproducción de hoja de recogida de datos (1) correspondiente a pólipos.

VALOR DEL ESTUDIO CITOMÉTRICO DEL CONTENIDO EN ADN Y FASE S EN LOS PÓLIPOS COLÓNICOS CON CÁNCER FOCAL. PAPEL DE LA APOPTOSIS EN LA SECUENCIA ADENOMA-CÁNCER DE COLON. **PÓLIPOS (continuación)**

**CITOMETRÍA DE FLUJO:**

**POLIPO**

Número test/disco:.....

Índice ADN:.....

CV pico G0G1:.....%

% fase G0G1:.....

% fase S:.....

% fase G2M:.....

**CARCINOMA**

Número test/disco:.....

Índice ADN:.....

CV pico G0G1: .....%

% fase G0G1: .....

% fase S:.....

% fase G2M:.....

Histograma no válido

Comentarios:.....

.....

Figura 4. Reproducción de hoja de recogida de datos (2) correspondiente a pólipos.



VALOR DEL ESTUDIO CITOMÉTRICO DEL CONTENIDO EN ADN Y FASE S EN LOS PÓLIPOS COLÓNICOS CON CÁNCER FOCAL. PAPEL DE LA APOPTOSIS EN LA SECUENCIA ADENOMA-CÁNCER DE COLON. **CONTROLES**

NºHCª:..... Nº Biopsia: ..... Nº orden: .....

Nombre: ..... Edad: .....(años) Sexo:  Hombre  Mujer

Fecha biosia: ...../...../..... Fecha actualización: ...../...../..... Seguimiento: ..... meses

**MACROSCOPIA:**

LOCALIZACIÓN del pólipo:  Colon derecho  
 Colon transversal  
 Colon izquierdo  
 Recto-sigma

**TRATAMIENTO-EVOLUCIÓN:**

Desarrollo posterior de patología colo-rectal neoplásica/pólipo/EII:  Sí  
 No

Tipo de patología: .....

Diagnóstico:.....

Fallecimiento:  No

Sí. Fecha:...../...../..... Causa:.....

**CITOMETRÍA DE FLUJO:**

**PÓLIPO**

Número test/disco:.....

Índice ADN:.....

CV pico G0G1:.....%

% fase G0G1:.....

% fase S:.....

% fase G2M:.....

**CARCINOMA**

Número test/disco:.....

Índice ADN:.....

CV pico G0G1: .....%

% fase G0G1: .....

% fase S:.....

% fase G2M:.....

Histograma no válido

Comentarios:.....

Figura 5. Reproducción de hoja de recogida de datos (3) correspondiente a controles.

## **6. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

Una vez llevada a cabo la recogida de datos en las hojas diseñadas a tal fin, se procedió al procesamiento de los mismos, distinto en dependencia del tipo de variable de que se trate. Los valores de las distintas variables se compararon entre los distintos grupos, mediante las pruebas pautadas:

### **6.1. VARIABLES CUANTITATIVAS Y CUALITATIVAS**

Para comparar entre dos grupos se utilizó la prueba de la t de Student, si se cumplían las condiciones de aplicación, y en caso contrario la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney. Para comparar más grupos se aplicó, si se reunían las condiciones, el análisis de varianza; si no se cumplían, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis.

### **6.2. VARIABLES CUALITATIVAS**

Para comparar dichas variables entre dos grupos se utilizó la prueba de independencia del Chi cuadrado o, en su defecto, la prueba exacta de Fisher. Entre más de dos grupos se utilizó también la prueba del Chi cuadrado, agrupando categorías en el caso de que no se cumplieran las condiciones de aplicación.

### **6.3. VARIABLES CUANTITATIVAS**

Para el estudio de relación entre variables cuantitativas se empleó la prueba de correlación bivariada mediante el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman.

### **6.4. ANÁLISIS MULTIVARIANTE**

Se aplicaron modelos de regresión logística múltiple para el estudio de la correlación de todas las variables que formaban parte del diseño experimental.

Para todas las pruebas usadas el grado de significación estadística se consideró para  $p < 0.05$ .

La representación de los datos se llevó a cabo mediante tablas y gráficos.

# ***I. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA***

## **1. MUESTRAS DE MUCOSA COLÓNICA NORMAL**

### **1.1 VARIABLES CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS**

Se obtuvieron un total de 128 muestras de mucosa colónica normal, con la siguiente distribución en función de las variables clínicas:

#### **1.1.a sexo**

A continuación se expone el número de casos y porcentaje en cada grupo analizado:

-varones: 74 casos (57,8%)

-mujeres: 54 casos (42,2%)

#### **1.1.b edad**

El promedio de edad de los individuos en que se obtuvieron las muestras fue de 55,98 con un rango de 20 a 87. El número de casos y su porcentaje para cada grupo de edad son los siguientes:

-<65 años:96 muestras (75%)

-≥65 años:32 muestras (25%)

### **1.2. VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS**

La única variable anatomopatológica analizada en las muestras de mucosa colónica normal fue la localización. La distribución de las mismas (n=128) fue la siguiente:

#### **1.2.a localización/segmento digestivo**

-colon ascendente: 36 muestras (28,1%)

-colon transversal :32 muestras (25%)

-colon descendente:31 muestras (24,2%)

-recto-sigma:29 muestras (22,7%).

### **1.3. CITOMETRÍA DE FLUJO**

De las 128 muestras, 115 fueron procesadas para estudio de contenido de ADN y % fase S mediante citometría de flujo. El resto de las muestras debieron deshecharse por muestra insuficiente, o pérdida de material durante la manipulación.

#### *1.3.1 CONTENIDO DE ADN*

Todas las muestras analizadas ( 35 muestras de colon ascendente, 27 de colon transversal, 24 de colon descendente y 29 de recto-sigma) fueron DIPLOIDES.

#### *1.3.2 ANÁLISIS DEL ADN: FASE S DEL CICLO CELULAR*

El porcentaje medio de células en fase S para el grupo de muestras normales fue de 5,55, con una D.S. de 2,00. El valor mínimo fue de 1,4 y el máximo de 12,3.

### **1.4.APOPTOSIS**

#### *1.4.1 DISTRIBUCIÓN DE APOPTOSIS*

Tan sólo 100 muestras fueron valorables para estudio de apoptosis. De éstas, 56 (56%) resultaron positivas para la técnica y 44 (44%) negativas.

#### **1.4.1.a distribución de apoptosis según regiones glandulares**

Considerando las 100 muestras en conjunto, la distribución de positividad /negatividad de apoptosis en los tres segmentos glandulares fue la siguiente:

-tercio superior :

*negativos (no se detectó apoptosis): 46 casos (46%)*

*positivos (detección de apoptosis mediante técnica TUNEL):54 casos (54%)*

-tercio medio:

*negativos:93 casos (93%)*

*positivos:7 casos (7%)*

-tercio basal:

*negativos:99 casos (99%)*

*positivos:1 caso (1%)*

Como puede observarse, la detección de apoptosis es mayor en el tercio glandular superior.

#### 1.4.2. ÍNDICE DE APOPTOSIS (I.A.)

La media del I.A. en el grupo de muestras normales fue de 0,1708, con una D.S. de 0,3636 y con un valor mínimo de 0 y un valor máximo de 2,10.

El número promedio de células analizadas fue de 135,2, con una D.S. de 25,59. El valor mínimo fue 48 y el máximo 206.

En este grupo de muestras de mucosa normal la cantidad total de células contadas fue 40.565; de ellas, 74 fueron consideradas células apoptóticas.

#### 1.4.2.a La media obtenida de I.A. por zonas glandulares fue la siguiente:

-zona superior: I.A.:0,45, con una D.S de 0,48 (mínimo:0, máximo:2,10)

-zona media: I.A.: 0,052, con una D.S. de 0,19 (mínimo:0, máximo:0,95)

-zona inferior: I.A.:0,0086, con una D.S. de 0,086 (mínimo:0, máximo:0,86)

A continuación se expondrán los resultados de I.A. obtenidos al agrupar las muestras según las variables anatomopatológicas analizadas.

#### 1.4.2.b Índice de apoptosis según variables anatomopatológicas

En la tabla 4 se recogen también los índices de apoptosis obtenidos en cada uno de los segmentos intestinales estudiados.

Variabes	Categorías	I.A. (v. medio)	I.A (v. Máximo)	I.A. (v.mínimo)	Desv.típica
Localización	C.A. (31)	0,1404	1,60	0	0,3179
	C.T. (24)	0,1623	1,20	0	0,3187
	C.D. (21)	0,0095	1,10	0	0,2606
	R-S (24)	0,2840	2,10	0	0,4956

Tabla 4. Índice de apoptosis en las muestras de mucosa colónica normal (n=100)

## 2. PÓLIPOS

Las características de los 134 pólipos estudiados fueron las siguientes:

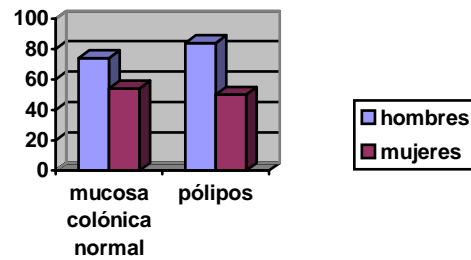
### 2.1.VARIABLES CLÍNICO-DEMOGRÁFICAS

Analizaremos en primer lugar la distribución que siguieron los pólipos seleccionados para el estudio en función de las variables clínicas sexo y edad. Los diagramas de barras adjuntos permiten comparar la distribución por sexo y edad tanto de las muestras de mucosa colónica normal como de los pólipos.

#### 2.1.a Sexo:

-Hombre: 84 casos (62,7%)

-Mujer: 50 casos (37,3%)

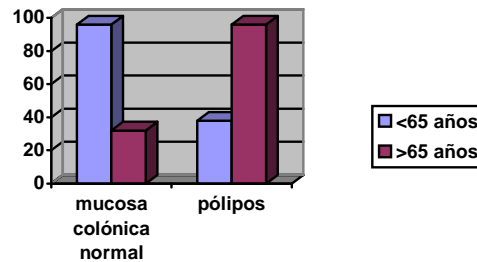


Gráfica 1. Distribución pólipos por sexo

#### 2.1.b Edad:

-<65 años: 38 casos (28,4%)

-≥65 años: 96 casos (71,6%)



Gráfica 2. Distribución pólipos por edad

### 2.2.VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS

En el caso de los pólipos, el número de variables anatomopatológicas analizadas fue mayor que en el de las muestras de mucosa colónica normal. Los resultados obtenidos se detallan a continuación.

#### 2.2.1 GENERALES

##### 2.2.1.a Localización/segmento digestivo

La distribución de las muestras (pólipos) en función de su localización / segmento digestivo fue la siguiente:

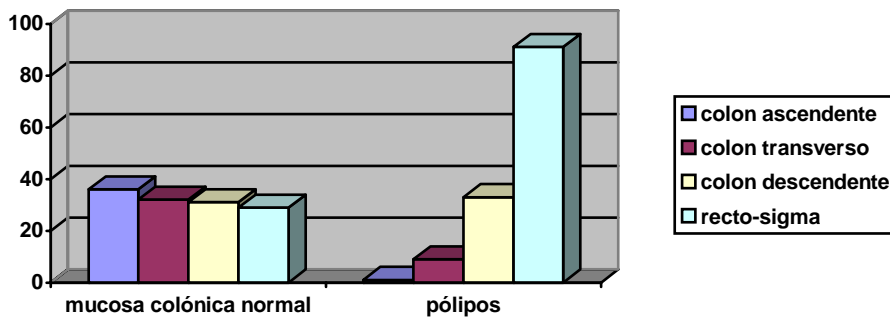
-colon derecho o ascendente :1 caso

-colon transverso:9 casos

-colon izquierdo o descendente:33 casos

-recto-sigma:91 casos

El diagrama de barras adjunto permite comparar los resultados obtenidos con respecto al grupo de muestras de mucosa normal:



Gráfica 3. Comparación de distribución de muestras de mucosa normal y pólipos por segmentos colónicos

### 2.2.2 DE LOS PÓLIPOS

Pasaremos a continuación a detallar las variables anatomopatológicas analizadas exclusivamente en el grupo de los pólipos:

#### 2.2.2.a. Tipo histológico:

- adenomatoso:22 casos
- túbulo-veloso:94 casos
- adenoma veloso:18 casos

#### 2.2.2.b. Grado de displasia:

- leve: 21 casos
- moderada: 40 casos
- severa: 73 casos

#### 2.2.2.c. Presencia de adenocarcinoma:

- ausencia de carcinoma :101 casos
- presencia de carcinoma intramucoso: 16 casos
- presencia de carcinoma invasor: 17 casos

#### 2.2.2.d. Tamaño:

- <1cm:54 casos
- 1-2 cm :48casos
- >2cm :32 casos

#### 2.2.2.e Implantación:

- sésil: 33 casos
- pediculado:101 casos

La tabla 5 resume los principales datos en cuanto a las variables clínicas, epidemiológicas y anatomopatológicas de los pólipos a estudio.

LOCALIZACIÓN	EDAD		SEXO		IMPLANTACIÓN		TAMAÑO			HISTOLOGÍA			DISPLASIA			CARCINOMA		
	<65	≥65	HOM-BRE	MUJER	SESIL	PEDIC	<1	1-2	>2	T	T-V	V	LEVE	MOD.	SEVERA	NO	IN SITU	INVA-SOR
CA (n=1)	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
CT (n=9)	6	3	3	6	4	5	7	2	0	1	8	0	1	4	4	7	2	0
CD (n=33)	6	27	25	8	7	26	12	11	10	9	19	5	3	12	18	25	2	6
RS (n=91)	26	65	55	36	22	69	35	34	22	12	66	13	17	24	50	68	12	11
TOTAL (134)	38	96	84	50	33	101	54	48	32	22	94	18	21	40	73	101	16	17

Tabla 5. Variables anatomopatológicas de los pólipos, en función de su localización por segmentos intestinales

## **2.3.CITOMETRÍA DE FLUJO**

Se realizó por separado el estudio de contenido de ADN y porcentaje de células en fase S dentro del grupo de los pólipos, analizando de forma independiente los que contenían o no cáncer focal.

### *2.3.1. CITOMETRÍA DE FLUJO DE LOS PÓLIPOS SIN CÁNCER FOCAL*

#### **2.3.1.1 Contenido de ADN**

Se analizaron un total de 101 pólipos con estas características. De ellos, 93 (92,1%) fueron diploides en cuanto a su contenido de ADN. Los 8 pólipos restantes (7,9%) fueron aneuploides en cuanto a su contenido de ADN.

#### **2.3.1.2 Análisis del ADN: fase S del ciclo celular**

En todos los pólipos con contenido diploide de ADN pudo determinarse el porcentaje de células en fase S. De los 8 pólipos con contenido de ADN aneuploide, en 4 no pudo analizarse dicho porcentaje por dificultades de lectura e interpretación del histograma. Así pues, el total de pólipos sin cáncer focal en los que se determinó el tanto por ciento de fase S fue de 97.

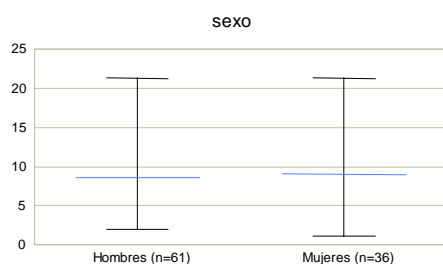
Considerando en conjunto los 97 pólipos sin cáncer focal, el porcentaje de células en fase S fue de 8,7299, con un valor máximo de 21,3; un valor mínimo de 1,1 y una desviación típica de 3,719.

#### *2.3.1.2.a –Porcentaje de células en fase S en pólipos sin cáncer focal según variables clínico-demográficas:*

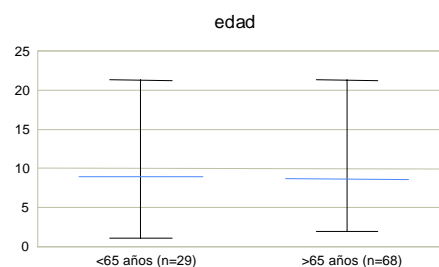
La tabla 6 recoge los resultados del análisis de ADN de los pólipos sin cáncer focal, agrupados según sus variables clínico-demográficas y anatomopatológicas.

Los siguientes diagramas de cajas reflejan los datos obtenidos (Gráficas 4-5)

Gráfica 4.% fase S polipos sin malignizar n=97



Gráfica 5.% fase S polipos no malignizados n=97



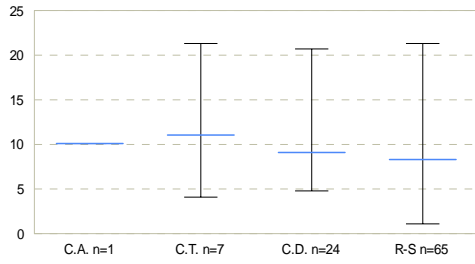
#### *2.3.1.2.b –Porcentaje de células en fase S en pólipos sin cáncer focal según variables anatomopatológicas*

Los siguientes diagramas de cajas reflejan los resultados obtenidos. En la tabla 6 se recogen los datos del análisis de ADN realizado. (Gráficas 6-10)



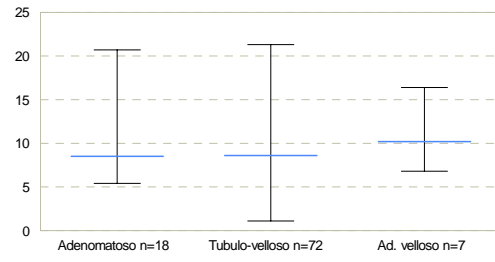
Gráfica 6

% fase S polipos no malignizados n=97  
localizacion/segmento digestivo



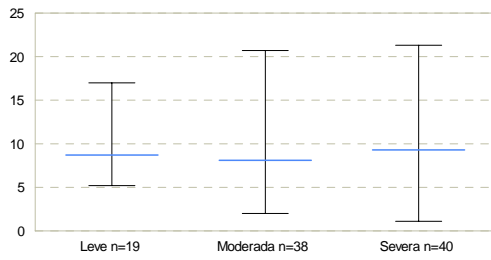
Gráfica 7

% fase S polipos no malignizados n=97  
tipo histológico



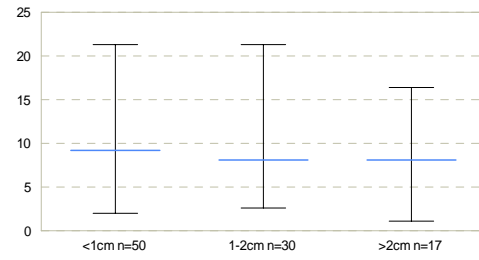
Gráfica 8

% fase S polipos no malignizados n=97  
grado de displasia



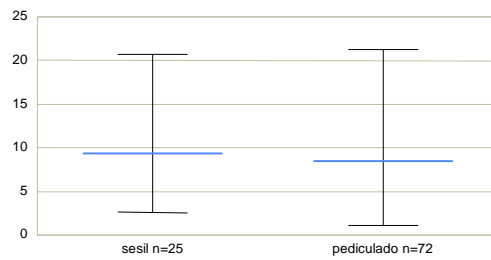
Gráfica 9

% fase S polipos no malignizados n=97  
Tamaño



Gráfica 10 % fase S polipos no malignizados n=97

Implantacion



### 2.3.2. CITOMETRÍA DE FLUJO DE LOS PÓLIPOS CON CÁNCER FOCAL

En el grupo de los pólipos con cáncer focal se procesaron de forma independiente las regiones adenomatosa y con carcinoma. Consideraremos en primer lugar el análisis de contenido de ADN y % fase celular en la región adenomatosa del conjunto de pólipos con carcinoma, independientemente del tipo de afectación neoplásica. Posteriormente se analizan los mismos datos diferenciando los dos tipos de afectación neoplásica.

#### 2.3.2.1 CMF de la PORCIÓN ADENOMATOSA de los pólipos con cáncer focal

##### 2.3.2.1.1-Contenido de ADN

De los 33 pólipos con cáncer focal seleccionados inicialmente (16 con carcinoma intramucoso, 17 con carcinoma microinvasor), sólo en 31 pudo realizarse la determinación de contenido de ADN mediante citometría de flujo. Las dos muestras restantes debieron desecharse por muestra insuficiente.

De las 31 muestras valorables, 21 (67,7%) mostraban un contenido diploide de ADN. Las 10 muestras restantes (32,3%) eran aneuploides.

De las 10 muestras con contenido aneuploide de ADN, 3 (9,7% del total de muestras valorables) mostraban un patrón de multiploidia.

##### 2.3.2.1.1.a-Contenido de ADN de la porción adenomatosa de los pólipos con cáncer focal según variables clínico-demográficas

La tabla 6 recoge los datos en cuanto a contenido de ADN de la porción adenomatosa de los pólipos con cáncer focal tras agruparlos en función de las variables sexo y edad.

##### 2.3.2.1.1.b-Contenido de ADN de la porción adenomatosa de los pólipos con cáncer focal según variables anatomopatológicas

Asimismo, la tabla 6 refleja la información obtenida en cuanto a contenido de ADN de las diferentes muestras en función de las variables anatomopatológicas.

			Diploides	% Diplo.	Aneuploid.	% Aneuplo.
VARIABLES CLÍNICAS	Sexo	Hombres	14	77,80	4	22,20
		Mujeres	7	53,80	6	46,20
	Edad	<65	5	62,50	3	37,50
≥65		16	69,60	7	30,40	
VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS	Segmento digestivo	C.A.				
		C.T.	1	50,00	1	50
		C.D.	7	87,50	1	12,50
		R-S	13	61,90	8	38,10
	Tipo histológico	Adenoma	2	66,70	1	33,30
		T-V	12	70,60	5	29,40
		Velloso	7	63,60	4	36,40
	Displasia	Leve	0	0	1	100
		Moderada	0	0	1	100
		Severa	21	72,40	8	27,60
	Tamaño	<1cm	3	100	0	0
		1-2cm	8	57,10	6	42,90
		>2cm	10	71,40	4	28,60
	Implantación	Sesil	4	66,70	2	33,30
		Pediculado	17	68	8	32

Tabla 6.Distribución del contenido de ADN de pólipos con cáncer focal (porción adenomatosa)

### 2.3.2.1.2 Análisis de ADN: fase S del ciclo celular

De las 31 muestras valorables para contenido de ADN sólo en 26 (13 con carcinoma intramucoso, 13 con carcinoma invasor) pudo determinarse el porcentaje de células en fase S, por dificultades técnicas de interpretación del histograma.

Considerando en conjunto los 26 pólipos con cáncer focal con histograma valorable en su porción adenomatosa, el porcentaje de células en fase S obtenido fue de 12,0885, con un valor máximo de 34,80 , un valor mínimo de 4,00 y una desviación típica de 8,5703.

#### 2.3.2.1.2.a- Porcentaje de células en fase S en la porción adenomatosa de los pólipos con cáncer focal según variables clínico-demográficas

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 7. Los siguientes diagramas de cajas (gráficas 11-12) reflejan los datos referentes a la distribución según las variables clínicas sexo y edad.

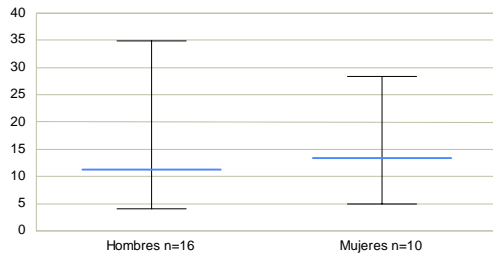
#### 2.3.2.1.2.b- Porcentaje de células en fase S en la porción adenomatosa de los pólipos con cáncer focal según variables anatomopatológicas

La tabla 7 refleja los resultados obtenidos, que se recogen también en los siguientes diagramas de cajas (gráficas 13-17).

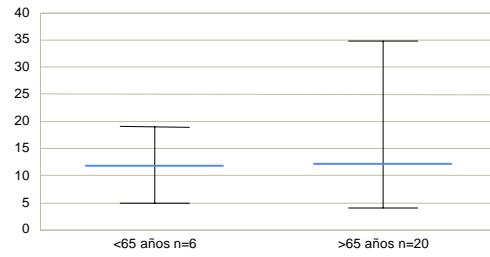
			%fase S	V.máximo	V.mínimo	D.típica
VARIABLES CLÍNICAS	Sexo	Hombres	<b>11,29</b>	34,80	4,00	9,25
		Mujeres	<b>13,37</b>	28,30	4,90	7,66
	Edad	<65	<b>11,75</b>	19,00	4,90	5,10
		≥65	<b>12,19</b>	34,80	4,00	9,47
VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS	Segmento digestivo	C.A.				
		C.T.	<b>6,60</b>			
		C.D.	<b>9,30</b>	16,30	4,80	3,72
		R-S	<b>13,72</b>	34,80	4,00	10,01
	Tipo histológico	Adenoma	<b>8,80</b>	10,80	6,80	2,83
		T-V	<b>11,32</b>	31,20	4,00	7,28
		Velloso	<b>14,09</b>	34,80	4,90	11,29
	Displasia	Leve	<b>19,00</b>			
		Moderada				
		Severa	<b>11,81</b>	34,80	4,00	8,63
	Tamaño	<1cm	<b>8,33</b>	10,30	6,60	1,86
		1-2cm	<b>13,16</b>	31,20	4,00	9,24
		>2cm	<b>12,04</b>	34,80	4,80	9,15
Implantación	Sesil	<b>8,96</b>	16,30	5,20	4,53	
	Pediculado	<b>12,83</b>	34,80	4,00	9,20	

Tabla 7. Análisis ADN: porcentaje de células en fase S de la porción adenomatosa de los pólipos con cáncer focal

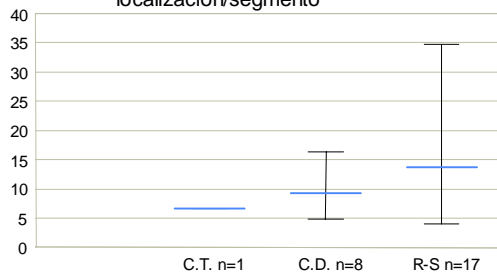
Gráfica 11. % fase S p. adenomatosa polipos con c. focal  
n=26  
sexo



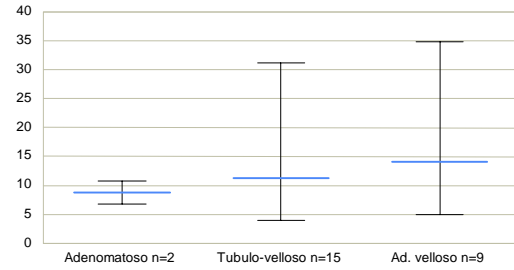
Gráfica 12. % fase S p. adenomatosa polipos con c. focal  
n=26  
edad



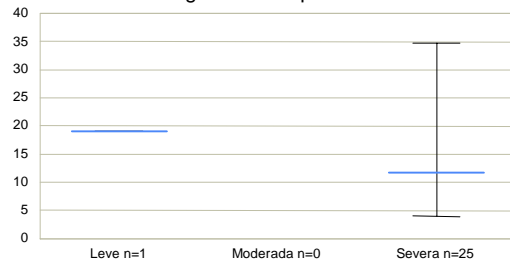
Gráfica 13. % fase S p. adenomatosa polipos con c. focal  
n=26  
localizacion/segmento



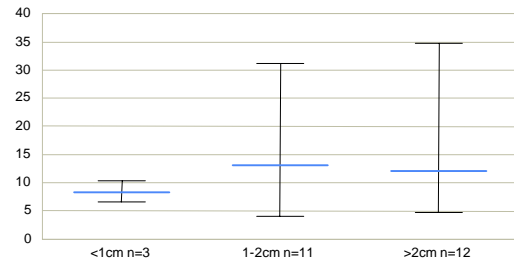
Gráfica 14. % fase S p. adenomatosa polipos con c. focal  
n=26  
tipo histológico



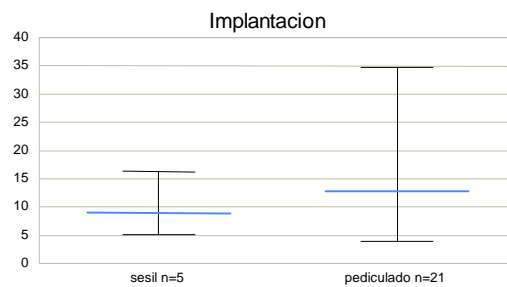
Gráfica 15. % fase S p. adenomatosa polipos con c. focal  
n=26  
grado de displasia



Gráfica 16. % fase S p. adenomatosa polipos con c. focal  
n=26  
Tamaño



Gráfica 17. % fase S p. adenomatosa polipos con c. focal  
n=26  
Implantacion



### 2.3.2.2. CMF de la PORCIÓN ADENOMATOSA de los pólipos con carcinoma intramucoso

#### 2.3.2.2.1 Contenido de ADN

De los 16 casos analizados, 9 (56,3%) eran diploides en cuanto a su contenido de ADN. Los 7 casos restantes (43,8%) fueron aneuploides. De estos 7 casos, 3 –18,8% del total- presentaron un contenido de ADN multiploide.

#### 2.3.2.2.1.a-Contenido de ADN de la porción adenomatosa de los pólipos con carcinoma intramucoso según variables clínico-demográficas

La tabla 8 refleja la distribución de las muestras en cuanto a su contenido de ADN al agruparlas según las variables sexo y edad.

#### 2.3.2.2.1.b-Contenido de ADN de la porción adenomatosa de los pólipos con carcinoma intramucoso según variables anatomopatológicas

La tabla 8 recoge también la distribución ploidia / aneuploidia en función de las variables anatomopatológicas

			Diploides	% Diplo.	Aneuploid.	% Aneuplo.
VARIABLES CLÍNICAS	Sexo	Hombres	6	66,70	3	33,30
		Mujeres	3	42,90	4	57,10
	Edad	<65	2	40,00	3	60,00
		≥65	7	63,60	4	36,40
VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS	Segmento digestivo	C.A.				
		C.T.	1	50,00	1	50,00
		C.D.	2	100	0	0
		R-S	6	50,00	6	50,00
	Tipo histológico	Adenoma	0	0	1	100
		T-V	6	66,70	3	33,30
		Velloso	3	50,00	3	50,00
	Displasia	Leve	0	0	1	100
		Moderada	0	0	1	100
		Severa	9	64,30	5	35,70
	Tamaño	<1cm	2	100	0	0
		1-2cm	3	37,50	5	62,50
		>2cm	4	66,70	2	33,30
	Implantación	Sesil	4	100	0	0
		Pediculado	5	41,70	7	58,30

Tabla 8. Distribución del contenido de ADN de los pólipos con carcinoma intramucoso (porción adenomatosa)

### 2.3.2.2.2 Análisis del ADN: fase S del ciclo celular

Considerando los 13 casos valorables el porcentaje de células en fase S obtenido fue de 13,90 , con un valor máximo de 34,80, un valor mínimo de 4,80 y una desviación típica de 9,4749.

2.3.2.2.2.a-*Porcentaje de células en fase S en la porción adenomatosa de los pólipos con carcinoma intramucoso (n=13) según variables clínico-demográficas*

La tabla 9 refleja los resultados obtenidos.

2.3.2.2.2.b-*Porcentaje de células en fase S en la porción adenomatosa de los pólipos con carcinoma intramucoso (n=13) según variables anatomopatológicas*

Dichos porcentajes se recogen también a continuación (tabla 9).

			%fase S	V.máximo	V.mínimo	D.típica
VARIABLES CLÍNICAS	Sexo	Hombres	<b>11,59</b>	34,80	4,80	10,87
		Mujeres	<b>16,60</b>	28,30	8,80	7,58
	Edad	<65	<b>14,97</b>	19,00	10,30	4,38
		≥65	<b>13,58</b>	34,80	4,80	10,72
VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS	Segmento digestivo	C.A.				
		C.T.	<b>6,60</b>			
		C.D.	<b>6,25</b>	7,70	4,80	2,05
		R-S	<b>16,16</b>	34,80	5,20	9,73
	Tipo histológico	Adenoma				
		T-V	<b>11,00</b>	19,00	4,80	4,99
		Velloso	<b>17,28</b>	34,80	5,20	12,65
	Displasia	Leve	<b>19,00</b>			
		Moderada				
		Severa	<b>13,48</b>	34,80	4,80	9,77
	Tamaño	<1cm	<b>8,45</b>	10,30	6,60	2,62
		1-2cm	<b>15,14</b>	28,30	7,70	8,58
		>2cm	<b>14,68</b>	34,80	4,80	11,88
	Implantación	Sesil	<b>7,13</b>	10,30	5,20	2,21
		Pediculado	<b>16,91</b>	34,80	4,80	9,98

Tabla 9. Análisis ADN: porcentaje de células en fase S de la porción adenomatosa de los pólipos con carcinoma intramucoso

## 2.3.2.3 CMF de la PORCIÓN ADENOMATOSA de los pólipos con carcinoma invasor

## 2.3.2.3.1 Contenido de ADN

De los 17 casos analizados, sólo en 15 pudo determinarse el contenido de ADN. Los otros dos casos se desecharon por muestra insuficiente. De los 15 casos valorables, 12 (80%) presentaban un contenido diploide de ADN. Los tres restantes (20%) eran aneuploides.

## 2.3.2.3.1.a-Contenido de ADN de la porción adenomatosa de los pólipos malignizados con carcinoma invasor según variables clínico-demográficas

Información reflejada en tabla 10.

## 2.3.2.3.1.b-Contenido de ADN de la porción adenomatosa de los pólipos malignizados con carcinoma invasor según variables anatomopatológicas

La tabla 10 refleja la distribución del contenido de ADN al agrupar las muestras en función de las variables anatomopatológicas

			Diploides	% Diplo.	Aneuploid.	% Aneuplo.
VARIABLES CLÍNICAS	Sexo	Hombres	8	88,90	1	11,10
		Mujeres	4	66,70	2	33,30
	Edad	<65	3	100	0	0
		≥65	9	75,00	3	25,00
VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS	Segmento digestivo	C.A.				
		C.T.				
		C.D.	5	83,30	1	16,70
		R-S	7	77,80	2	22,20
	Tipo histológico	Adenoma	2	100	0	0
		T-V	6	75,00	2	25,00
		Velloso	4	80,00	1	20,00
	Displasia	Leve				
		Moderada				
		Severa	12	80,00	3	20,00
	Tamaño	<1cm	1	100	0	0
		1-2cm	5	83,30	1	16,70
		>2cm	6	75,00	2	25,00
	Implantación	Sesil	0	0	2	100
		Pediculado	12	92,30	1	7,70

Tabla 10. Distribución del contenido de ADN de pólipos con carcinoma invasor (porción adenomatosa)



### 2.3.2.3.2 Análisis del ADN: fase S del ciclo celular

El porcentaje obtenido al considerar las 13 muestras valorables fue de 10,2769 con un valor máximo de 31,20 , un valor mínimo de 4,00 y una desviación típica de 7,4926.

#### 2.3.2.3.2.a- Porcentaje de células en fase S en la porción adenomatosa de los pólipos con carcinoma invasor (n=13) según variables clínico-demográficas

Los porcentajes obtenidos al agrupar las muestras en función de las variables sexo y edad se muestran a continuación (tabla 11).

#### 2.3.2.3.2.b- Porcentaje de células en fase S en la porción adenomatosa de los pólipos con carcinoma invasor (n=13) según variables anatomopatológicas

La tabla 11 refleja los resultados obtenidos

			%fase S	V.máximo	V.mínimo	D.típica
VARIABLES CLÍNICAS	Sexo	Hombres	<b>11,06</b>	31,20	4,00	8,46
		Mujeres	<b>8,53</b>	16,30	4,90	5,28
	Edad	<65	<b>8,53</b>	12,60	4,90	3,87
		≥65	<b>10,80</b>	31,20	4,00	8,38
VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS	Segmento digestivo	C.A.				
		C.T.				
		C.D.	<b>10,32</b>	16,30	6,80	3,68
		R-S	<b>10,24</b>	31,20	4,00	10,05
	Tipo histológico	Adenoma	<b>8,80</b>	10,80	6,80	2,83
		T-V	<b>11,61</b>	31,20	4,00	9,19
		Velloso	<b>7,70</b>	12,60	4,90	7,49
	Displasia	Leve				
		Moderada				
		Severa	<b>10,28</b>	31,20	4,00	7,49
	Tamaño	<1cm	<b>8,10</b>			
		1-2cm	<b>11,52</b>	31,20	4,00	10,24
		>2cm	<b>9,40</b>	16,30	4,90	5,11
	Implantación	Sesil	<b>16,30</b>			
Pediculado		<b>9,78</b>	31,20	4,00	7,59	

Tabla 11 . Análisis ADN: porcentaje de células en fase S de la porción adenomatosa de los pólipos con carcinoma invasor

## 2.3.2.4 CMF de la PORCIÓN TUMORAL de pólipos con cáncer focal

Consideraremos en conjunto la porción malignizada de los pólipos, sin diferenciar el carcinoma intramucoso e invasor. Posteriormente, analizaremos ambos grupos de forma independiente.

## 2.3.2.4.1 Contenido de ADN

De las 33 muestras iniciales (16 con carcinoma intramucoso, 17 con carcinoma invasor) , en 3 casos no pudo realizarse la determinación de contenido de ADN en la porción tumoral por muestra insuficiente.

Las 30 muestras restantes presentaron los siguientes resultados de lectura:

17 casos- contenido diploide de ADN (56,7%)

13 casos- contenido aneuploide de ADN (43,3%)

De los 13 casos con contenido aneuploide de ADN, uno de ellos (3,3% del total valorable) presentaba multiploidia.

## 2.3.2.4.1.a-Contenido de ADN de la porción tumoral de los pólipos con cáncer focal según variables clínico-demográficas

En la tabla 12 se recogen los datos referentes al contenido de ADN de las 30 muestras, agrupadas según las variables sexo y edad.

## 2.3.2.4.1.b-Contenido de ADN de la porción tumoral de los pólipos con cáncer focal según variables anatomopatológicas

Dicha información se muestra en la tabla adjunta (tabla 12)

			Diploides	% Diplo.	Aneuploid.	% Aneuplo.
VARIABLES CLÍNICAS	Sexo	Hombres	7	38,90	11	61,10
		Mujeres	10	83,30	2	16,70
	Edad	<65	6	75,00	2	25,00
		≥65	11	50,00	11	50,00
VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS	Segmento digestivo	C.A.				
		C.T.	2	100	0	0
		C.D.	4	50,00	4	50,00
		R-S	11	55,00	9	45,00
	Tipo histológico	Adenoma	0	0	3	100
		T-V	11	68,80	5	31,20
		Velloso	6	54,50	5	45,50
	Displasia	Leve	1	100	0	0
		Moderada	0	0	1	100
		Severa	16	57,10	12	42,90
	Tamaño	<1cm	3	100	0	0
		1-2cm	9	69,20	4	30,80
		>2cm	5	35,70	9	64,30
	Implantación	Sesil	4	66,70	2	33,30
Pediculado		13	54,20	11	45,80	

Tabla 12. Distribución del contenido de ADN de los pólipos con cáncer focal (porción tumoral)

### 2.3.2.4.2 Análisis del ADN: fase S del ciclo celular

La muestra con contenido multiploide de ADN hubo de desestimarse para la determinación del porcentaje de células en fase S, por lo que el número total de muestras analizadas fue de 29.

Considerando las 29 muestras de forma global, se obtuvo un porcentaje de células en fase S de 14,4862, con un valor máximo de 46,60, un valor mínimo de 3,30 y una desviación típica de 11,9245.

#### 2.3.2.4.2.a- Porcentaje de células en fase S en la porción tumoral de los pólipos con cáncer focal según variables clínico-demográficas

Al agrupar las muestras en función de las variables sexo y edad, los resultados obtenidos son los siguientes (tabla 13), reflejados en las gráficas 18 y 19.

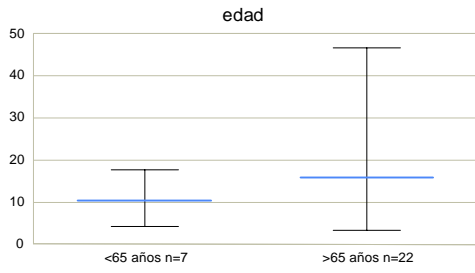
#### 2.3.2.4.2.b- Porcentaje de células en fase S en la porción tumoral de los pólipos con cáncer focal según variables anatomopatológicas

La tabla 13 muestra los resultados obtenidos. Los diagramas de cajas (gráficas 20-24) permiten apreciar los porcentajes de células en fase S en función de las variables anatomopatológicas analizadas.

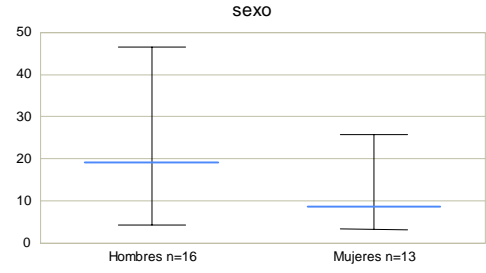
			%fase S	V.máximo	V.mínimo	D.típica
VARIABLES CLÍNICAS	Sexo	Hombres	<b>19,24</b>	46,60	4,30	13,63
		Mujeres	<b>8,64</b>	25,80	3,30	5,69
	Edad	<65	<b>10,37</b>	17,70	4,30	5,84
		≥65	<b>15,80</b>	46,60	3,30	13,13
VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS	Segmento digestivo	C.A.				
		C.T.	<b>5,50</b>	6,10	4,90	0,85
		C.D.	<b>17,14</b>	35,60	4,30	11,09
		R-S	<b>14,32</b>	46,60	3,30	12,70
	Tipo histológico	Adenoma	<b>35,70</b>	46,60	24,90	10,85
		T-V	<b>11,20</b>	36,20	3,30	8,98
		Velloso	<b>13,38</b>	40,70	3,40	10,55
	Displasia	Leve	<b>5,80</b>			
		Moderada	<b>46,60</b>			
		Severa	<b>13,62</b>	40,70	3,30	10,48
	Tamaño	<1cm	<b>6,37</b>	8,70	4,30	2,21
		1-2cm	<b>14,72</b>	46,60	3,30	14,81
		>2cm	<b>16,13</b>	40,70	6,20	9,60
	Implantación	Sesil	<b>11,38</b>	25,80	6,10	8,21
		Pediculado	<b>15,13</b>	46,60	3,30	12,60

Tabla 13. Análisis de ADN: porcentaje de células en fase S de la porción tumoral de los pólipos con cáncer focal (n=29)

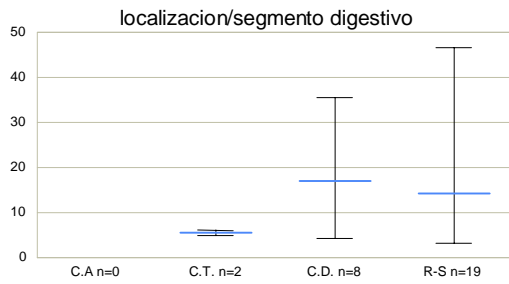
Gráfica 18. % fase S p. tumoral pólipos con c.focal n=29



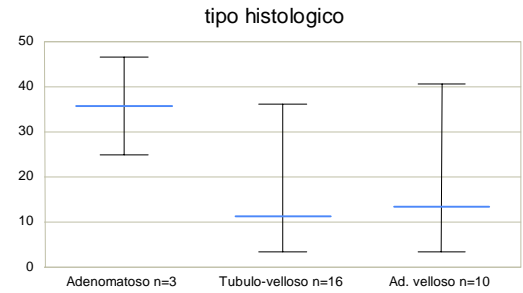
Gráfica 19. % fase S p. tumoral pólipos con c. focal n=29



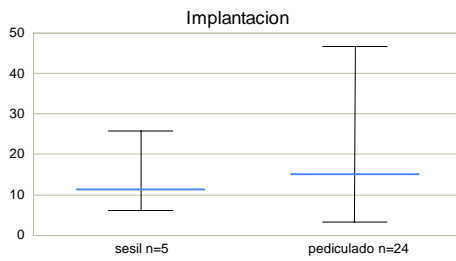
Gráfica 20. % fase S p. tumoral pólipos con c. focal n=29



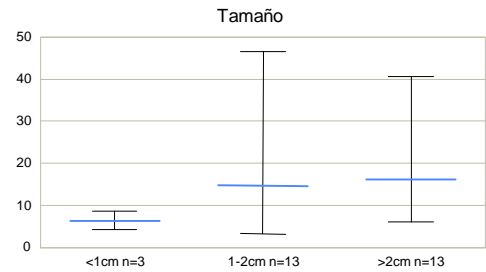
Gráfica 21. % fase S p. tumoral pólipos con c. focal n=29



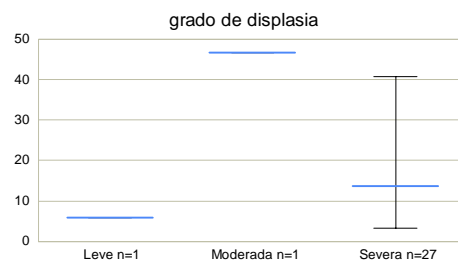
Gráfica 22. % fase S p. tumoral pólipos con c.focal n=29



Gráfica 23. % fase S p. tumoral pólipos con c.focal n=29



Gráfica 24. % fase S p. tumoral pólipos con c.focal n=29



## 2.3.2.5 CMF de la PORCIÓN TUMORAL de pólipos con carcinoma intramucoso

## 2.3.2.5.1 Contenido de ADN

De los 16 casos estudiados, 10 (62,5%) fueron diploides y 6 (37,5%) aneuploides en cuanto a su contenido de ADN. De ellos, un caso (6,3% del total) presentaba multiploidia.

## 2.3.2.5.1.a-Contenido de ADN de la porción tumoral de los pólipos con carcinoma intramucoso según variables clínico-demográficas

Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla 14.

## 2.3.2.5.1.b-Contenido de ADN de la porción tumoral de los pólipos con carcinoma intramucoso según variables anatomopatológicas

La tabla 14 recoge la información referente al contenido de ADN de las 16 muestras al agruparlas en función de las variables anatomopatológicas.

			Diploides	% Diplo.	Aneuploid.	% Aneuplo.
VARIABLES CLÍNICAS	Sexo	Hombres	4	44,40	5	55,60
		Mujeres	6	85,70	1	14,30
	Edad	<65	4	80,00	1	20,00
		≥65	6	54,50	5	45,50
VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS	Segmento digestivo	C.A.				
		C.T.	2	100	0	0
		C.D.	1	50,00	1	50,00
		R-S	7	58,30	5	41,70
	Tipo histológico	Adenoma	0	0	1	100
		T-V	7	77,80	2	22,20
		Velloso	3	50,00	3	50,00
	Displasia	Leve	1	100	0	0
		Moderada	0	0	1	100
		Severa	9	64,30	5	35,70
	Tamaño	<1cm	2	100	0	0
		1-2cm	6	75,00	2	25,00
		>2cm	2	33,30	4	66,70
	Implantación	Sesil	3	75,00	1	25,00
		Pediculado	7	58,30	5	41,70

Tabla 14. Contenido de ADN de la porción tumoral de los pólipos con carcinoma intramucoso

### 2.3.2.5.2 Análisis del ADN: fase S del ciclo celular

El resultado obtenido al analizar las 14 muestras de forma global fue de 13,6929. Se observó un valor máximo de 46,60, con un valor mínimo de 3,40 y una desviación típica de 13,2910.

#### 2.3.2.5.2.a- Porcentaje de células en fase S en la porción tumoral de los pólipos con carcinoma intramucoso según variables clínico-demográficas

Los resultados obtenidos al agrupar las 14 muestras en función de las variables sexo y edad son los plasmados en la tabla 15.

#### 2.3.2.5.2.b- Porcentaje de células en fase S en la porción tumoral de los pólipos con carcinoma intramucoso según variables anatomopatológicas

La tabla 15 recoge también los datos referentes a las distintas variables anatomopatológicas.

			%fase S	V.máximo	V.mínimo	D.típica
VARIABLES CLÍNICAS	Sexo	Hombres	<b>19,97</b>	46,60	6,10	16,84
		Mujeres	<b>7,41</b>	9,80	3,40	2,66
	Edad	<65	<b>9,18</b>	17,30	4,90	5,65
		≥65	<b>15,50</b>	46,60	3,40	15,23
VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS	Segmento digestivo	C.A.				
		C.T.	<b>5,50</b>	6,10	4,90	0,85
		C.D.	<b>11,30</b>	15,30	7,30	5,66
		R-S	<b>15,81</b>	46,60	3,40	15,18
	Tipo histológico	Adenoma	<b>46,60</b>			
		T-V	<b>9,68</b>	17,30	4,90	4,49
		Velloso	<b>13,54</b>	40,70	3,40	15,39
	Displasia	Leve	<b>5,80</b>			
		Moderada	<b>46,60</b>			
		Severa	<b>11,61</b>	40,70	3,40	10,00
	Tamaño	<1cm	<b>7,40</b>	8,70	6,10	1,84
		1-2cm	<b>12,47</b>	46,60	3,40	15,23
		>2cm	<b>17,92</b>	40,70	6,50	13,44
	Implantación	Sesil	<b>7,10</b>	8,70	6,10	1,40
Pediculado		<b>15,49</b>	46,60	3,40	14,58	

Tabla 15. Análisis ADN: porcentaje de células en fase S de la porción tumoral de los pólipos con carcinoma intramucoso

## 2.3.2.6 CMF de la PORCIÓN TUMORAL de pólipos con carcinoma invasor

## 2.3.2.6.1 Contenido de ADN

De los 17 casos a analizar sólo pudo determinarse el contenido de ADN en 14. De ellos, 7 casos eran diploides (50%) y el resto aneuploides (50%).

## 2.3.2.6.1.a-Contenido de ADN de la porción tumoral de los pólipos con carcinoma invasor según variables clínico-demográficas

Al agrupar las 14 muestras valorables en función de las variables sexo y edad se obtuvieron los siguientes contenidos de ADN (Tabla 16).

## 2.3.2.6.1.b-Contenido de ADN de la porción tumoral de los pólipos con carcinoma invasor según variables anatomopatológicas

La tabla 16 refleja los resultados obtenidos en cuanto a contenido de ADN para las distintas variables anatomopatológicas.

			Diploides	% Diplo.	Aneuploid.	% Aneuplo.
VARIABLES CLÍNICAS	Sexo	Hombres	3	33,30	6	66,70
		Mujeres	4	80,00	1	20,00
	Edad	<65	2	66,70	1	33,30
		≥65	5	45,50	6	54,50
VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS	Segmento digestivo	C.A.				
		C.T.				
		C.D.	3	50,00	3	50,00
		R-S	4	50,00	4	50,00
	Tipo histológico	Adenoma	0	0	2	100
		T-V	4	57,10	3	42,90
		Velloso	3	60,00	2	40,00
	Displasia	Leve				
		Moderada				
		Severa	7	50,00	7	50,00
	Tamaño	<1cm	1	100	0	0
		1-2cm	3	60,00	2	40,00
		>2cm	3	37,50	5	62,50
	Implantación	Sesil	1	50,00	1	50,00
Pediculado		6	50,00	6	50,00	

Tabla 16. Contenido de ADN de la porción tumoral de los pólipos con carcinoma invasor

### 2.3.2.6.2 Análisis de ADN: fase S del ciclo celular

Fueron valorables un total de 15 muestras. Al considerarlas de forma global se obtuvo un porcentaje de células en fase S de 15,2267 ; valor máximo de 36,20 , valor mínimo de 3,30 y desviación típica de 10,9150.

#### 2.3.2.6.2.a- Porcentaje de células en fase S en la porción tumoral de los pólipos con carcinoma invasor según variables clínico-demográficas

Los datos a este respecto se recogen en la tabla 17.

#### 2.3.2.6.2.b- Porcentaje de células en fase S en la porción tumoral de los pólipos con carcinoma invasor según variables anatomopatológicas

Al agrupar las muestras en función de las distintas variables anatomopatológicas se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla adjunta (tabla 17).

			%fase S	V.máximo	V.mínimo	D.típica
VARIABLES CLÍNICAS	Sexo	Hombres	<b>18,67</b>	36,20	4,30	11,61
		Mujeres	<b>10,07</b>	25,80	3,30	8,04
	Edad	<65	<b>11,97</b>	17,70	4,30	6,91
		≥65	<b>16,04</b>	36,20	3,30	11,80
VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS	Segmento digestivo	C.A.				
		C.T.				
		C.D.	<b>19,08</b>	35,60	4,30	12,15
		R-S	<b>12,66</b>	36,20	3,30	9,88
	Tipo histológico	Adenoma	<b>30,25</b>	35,60	24,90	7,57
		T-V	<b>12,73</b>	36,20	3,30	12,14
		Velloso	<b>13,22</b>	17,70	8,90	3,76
	Displasia	Leve				
		Moderada				
		Severa	<b>15,23</b>	36,20	3,30	10,92
	Tamaño	<1cm	<b>4,30</b>			
		1-2cm	<b>17,33</b>	36,20	3,30	15,15
		>2cm	<b>15,01</b>	25,80	6,20	7,15
Implantación	Sesil	<b>17,80</b>	25,80	9,80	11,31	
	Pediculado	<b>14,83</b>	36,20	3,30	11,27	

Tabla 17. Análisis de ADN: porcentaje de células en fase S de la porción tumoral de los pólipos con carcinoma invasor



## **2.4. APOPTOSIS**

### **2.4.1 APOPTOSIS EN LOS PÓLIPOS SIN CÁNCER FOCAL**

Se realizó estudio de apoptosis en 101 pólipos sin cáncer focal

#### **2.4.1.1. Distribución cualitativa de apoptosis por zonas glandulares**

Considerando las 101 muestras en conjunto, la distribución de positividad /negatividad para la determinación de apoptosis en las tres zonas glandulares fue la siguiente:

-tercio superior :

*negativos: 23 (22,8%)*

*positivos:78 (77,2%)*

-tercio medio:

*negativos:20 (19,8%)*

*positivos:81 (80,2%)*

-tercio basal:

*negativos:48 (47,5%)*

*positivos:53 (52,5%)*

#### **2.4.1.2 Índice de apoptosis (I.A.)**

La media del I.A. en el grupo de pólipos sin cáncer focal fue de 0,6607, con una D.S. de 0,8138, un valor mínimo de 0 y un valor máximo de 7,02. El número promedio de células analizadas fue de 241,6 con una D.S. de 112. El valor mínimo fue 91 y el máximo 720. En este grupo de pólipos el número de células contadas fue de 73.221; de ellas, 416 se consideraron células apoptóticas.

La media obtenida de I.A. por zonas glandulares fue la siguiente:

-Zona superior: I.A: 0,9993 con una D.S. de 0,9531 (mínimo:0-máximo:4,31).

-Zona media: I.A: 0,5810 con una D.S. de 0,4926 (mínimo:0-máximo:1,97).

-Zona inferior: I.A: 0,4019 con una D.S. de 0,8117 (mínimo:0-máximo:7,02).

## 2.4.2. APOPTOSIS EN LOS PÓLIPOS CON CÁNCER FOCAL

### 2.4.2.1 DISTRIBUCIÓN DE APOPTOSIS en la **PORCIÓN ADENOMATOSA** de los **pólipos con cáncer focal**

Del total de 33 muestras, 20 (60,6%) resultaron con tinción positiva para apoptosis y 13 (39,4%), con tinción negativa.

Considerando las 33 muestras en conjunto, la distribución de positividad /negatividad de apoptosis en las tres regiones glandulares fue la siguiente:

-tercio superior :

*negativos:* 25 (75,8%)

*positivos:* 8 (24,2%)

-tercio medio:

*negativos:* 30 (90,9%)

*positivos:* 3 (9,1%)

-tercio basal:

*negativos:* 19 (57,6%)

*positivos:* 14 (42,4%)

### 2.4.2.2 DISTRIBUCIÓN DE APOPTOSIS en la **PORCIÓN TUMORAL** de los **pólipos con cáncer focal**

Del total de 33 muestras, 14 (42,4%) resultaron con tinción positiva para apoptosis y 19 (57,6%) negativa.

Considerando las 33 muestras en conjunto, la distribución de positividad /negatividad de apoptosis en los tres segmentos glandulares fue la siguiente:

-tercio superior :

*negativos:* 26 (78,8%)

*positivos:* 7 (21,2%)

-tercio medio:

*negativos:* 26 (78,8%)

*positivos:* 7 (21,2%)

-tercio basal:

*negativos:* 22 (66,7%)

*positivos:* 11 (33,3%)

### 2.4.2.3. ÍNDICE DE APOPTOSIS de los PÓLIPOS CON CÁNCER FOCAL

La media del I.A. en el grupo de pólipos con cáncer focal (considerando conjuntamente las porciones adenomatosa y tumoral) fue de 0,2125 con una D.S. de 0,4290 y un valor mínimo de 0; valor máximo de 2,74. El número promedio de células analizadas fue de 195,77, con una D.S. de 53,3; el valor mínimo fue 108 y el máximo 376. En este grupo la cantidad total de células contadas fue de 38.762; de ellas, 86 se consideraron apoptóticas.

La media obtenida por regiones glandulares fue la siguiente:

-Zona superior: I.A: 0,2615, con una D.S. de 0,5651 (mínimo:0-máximo:2,74).

-Zona media: I.A: 0,1220 con una D.S. de 0,3276 (mínimo:0-máximo:1,84).

-Zona inferior: I.A: 0,2540 con una D.S. de 0,3442 (mínimo:0-máximo:1,13).

Considerando sólo la PARTE ADENOMATOSA de todos los pólipos con cáncer focal, la media de I.A. fue de 0,1956, con un D.S. de 0,4112, y con un valor mínimo de 0 y un máximo de 2,17. El número total de células contadas fue de 21.531, de las cuales 44 resultaron ser apoptóticas.

La media obtenida por zonas glandulares fue la siguiente:

- Zona superior: I.A: 0,2498 con una D.S. de 0,5222 (mínimo:0-máximo:2,17).
- Zona media: I.A: 0,087 con una D.S. de 0,3453 (mínimo:0-máximo:1,84).
- Zona inferior: I.A: 0,2491 con una D.S. de 0,3287 (mínimo:0-máximo:1,05).

Al considerar solamente la PARTE TUMORAL de todos los pólipos con cáncer focal la media del I.A. fue de 0,2293, con una D.S. de 0,4474 y con unos valores mínimo y máximo de 0 y 2,74 respectivamente. El número total de células contadas fue de 17.231; de ellas, sólo 42 fueron apoptóticas.

La media obtenida por zonas glandulares fue la siguiente:

- Zona superior: I.A: 0,2731 con una D.S. de 0,6130 (mínimo:0-máximo:2,74).
- Zona media: I.A: 0,1560 con una D.S. de 0,3105 (mínimo:0-máximo:0,95).
- Zona inferior: I.A: 0,2598 con una D.S. de 0,3640 (mínimo:0-máximo:1,13).

#### 2.4.2.4 APOPTOSIS EN PÓLIPOS CON CARCINOMA INTRAMUCOSO

##### 2.4.2.4.1 Distribución de apoptosis en la PORCIÓN ADENOMATOSA de los pólipos con carcinoma intramucoso

Del total de 16 muestras, 8 (50%) resultaron con tinción positiva y 8 (50%) con tinción negativa para apoptosis.

Considerando las 16 muestras en conjunto, la distribución de positividad/negatividad de apoptosis en las tres zonas glandulares fue la siguiente:

-tercio superior :

*negativos: 14 (87,5%)*

*positivos: 2 (12,5%)*

-tercio medio:

*negativos: 16 (100%)*

-tercio basal:

*negativos: 10 (62,5%)*

*positivos: 6 (37,5%)*

Dado el bajo número de efectivos de este grupo, no se fragmentó la distribución por las respectivas variables clínico-demográficas y anatomopatológicas.

##### 2.4.2.4.2 Distribución de apoptosis en la PORCIÓN TUMORAL de los pólipos con carcinoma intramucoso

Del total de 16 muestras, sólo 2 (12,5%) resultaron con tinción positiva y 14 (87,5%) con tinción negativa para apoptosis.

Considerando las 16 muestras en conjunto, la distribución de positividad/negatividad de apoptosis en las tres zonas glandulares fue la siguiente:

-tercio superior :

*negativos: 16 (100%)*

-tercio medio:

*negativos: 15 (93,8%)*

*positivas: 1 (6,2%)*

-tercio basal:

*negativos: 15 (93,8%)*

*positivos: 1 (6,2%)*

De igual forma que en el apartado precedente, no se procedió a la fragmentación según variables de estudio.

##### 2.4.2.4.3 ÍNDICE DE APOPTOSIS de los pólipos con carcinoma intramucoso

La media de I.A. en el grupo de pólipos con carcinoma intramucoso fue de 0,083 con una D.S. de 0,2433 y con un valor mínimo de 0 y un valor máximo de 1,24. El número promedio de células analizadas fue de 183,59 con una DS de 45. El valor mínimo fue 108 y el máximo 316. El número total de células contadas fue de 17.625 y de ellas 18 fueron apoptóticas.

La media obtenida por zonas glandulares fue la siguiente:

-Zona superior: I.A: 0,055 con una D.S. de 0,2373 (mínimo:0-máximo:1,24).

-Zona media: I.A: 0,020 con una D.S. de 0,1140 (mínimo:0-máximo:0,65).

-Zona inferior: I.A: 0,1753 con una D.S. de 0,3139 (mínimo:0-máximo:1,13).

#### 2.4.2.5 APOPTOSIS EN LOS PÓLIPOS CON CARCINOMA INVASOR

##### 2.4.2.5.1 *Distribución de apoptosis en la PORCIÓN ADENOMATOSA de los pólipos con carcinoma invasor*

Del total de 17 muestras, 12 (70,6%) resultaron con tinción positiva y 5 (29,4%) con tinción negativa para apoptosis.

Considerando las 17 muestras en conjunto, la distribución de positividad/negatividad de apoptosis en las tres zonas glandulares fue la siguiente:

-tercio superior :

*negativos: 11 (64,7%)*

*positivos: 6 (35,3%)*

-tercio medio:

*negativos: 14 (82,4%)*

*positivos: 3 (17,6%)*

-tercio basal:

*negativos: 9 (52,9%)*

*positivos: 8 (47,1%)*

Dado el bajo número de efectivos de este grupo, no se fragmentó la distribución por las respectivas variables clínico-demográficas y anatomopatológicas.

##### 2.4.2.5.2 *Distribución de apoptosis en la PORCIÓN TUMORAL de los pólipos con carcinoma invasor*

Del total de 17 muestras, 12 (70,6%) también resultaron positivas y 5 (29,4%) negativas para apoptosis.

La distribución de positividad/negatividad de apoptosis en las tres zonas glandulares fue como sigue:

-tercio superior :

*negativos: 10 (58,8%)*

*positivos: 7 (41,2%)*

-tercio medio:

*negativos: 11 (64,7%)*

*positivas: 6 (35,3%)*

-tercio basal:

*negativos: 7 (41,2%)*

*positivos: 10 (58,8%)*

De igual forma que en el apartado precedente, no se procedió a la fragmentación según variables de estudio.

##### 2.4.2.5.3 *ÍNDICE DE APOPTOSIS de los pólipos con carcinoma invasor*

La media de I.A. en el grupo de pólipos con carcinoma invasor fue de 0,3336 con una D.S. de 0,5222 y con un valor mínimo de 0 y un valor máximo de 2,74. El número promedio de células analizadas fue de 207,23 con una DS de 58. El valor mínimo fue 112 y el máximo 376. El número total de células contadas fue de 21.137, de las cuales 68 fueron apoptóticas. La media obtenida por zonas glandulares fue la siguiente:

-Zona superior: I.A: 0,4550 con una D.S. de 0,7048 (mínimo:0-máximo:2,74).

-Zona media: I.A: 0,2178 con una D.S. de 0,4239 (mínimo:0-máximo:1,84).

-Zona inferior: I.A: 0,3281 con una D.S. de 0,3593 (mínimo:0-máximo:1,13).

## RESULTADOS

### ***II. ESTUDIO ESTADÍSTICO COMPARATIVO***

Antes de proceder a la comparación de las variables estudiadas, analizaremos las diferencias entre el conjunto de muestras de mucosa normal y pólipos en cuanto a las variables clínicas sexo, edad y localización, con el fin de determinar si la distribución de las muestras es homogénea para dichas variables.

-*Sexo*: comparación de distribución de las muestras mucosa normal/pólipos en cuanto a la variable sexo:  $p=0,420$  (N.S.)

-*Edad*: comparación de distribución de las muestras mucosa normal/pólipos en cuanto a la variable edad:  $p=0,001$

-*Localización*: comparación de distribución de las muestras mucosa normal/pólipos en cuanto a la variable localización:  $p=0,001$

Existen diferencias significativas en cuanto a la distribución de las muestras mucosa normal/ pólipos por las variables mencionadas. Por lo tanto, no puede realizarse un estudio comparativo del resto de variables analizadas (tanto las referentes a estudio de ploidia y porcentaje de células en fase S como las variables de apoptosis) diferenciando según las variables clínicas e histológicas mencionadas (edad y localización). Utilizaremos los resultados obtenidos en las muestras de mucosa normal únicamente para establecer un patrón de normalidad tanto para CMF como para apoptosis para cada uno de los cuatro segmentos colónicos. Se realizará asimismo estudio comparativo entre la mucosa normal y el resto de muestras sin tener en cuenta la distribución en cuanto a edad y localización.

Una vez realizado este análisis preliminar procederemos al estudio comparativo entre las siguientes muestras:

# **1. GRUPO DE MUESTRAS DE MUCOSA COLÓNICA NORMAL**

## **1.1 COMPARACIÓN DEL ANÁLISIS POR CMF CON EL RESTO DE VARIABLES**

### *1.1.1 CONTENIDO DE ADN*

No procede el estudio comparativo, pues todas las muestras de mucosa normal poseen contenido diploide de ADN

### *1.1.2 PORCENTAJE DE CÉLULAS EN FASE S*

Con la finalidad de facilitar el estudio comparativo, expondremos a continuación los resultados al analizar el porcentaje de células en fase S según las variables clínico-demográficas y anatomopatológicas.

#### **a-según variables clínico-demográficas**

En la tabla 18 se exponen los resultados obtenidos al distribuir las muestras en función de las variables sexo y edad.

#### **b-según variables anatomopatológicas**

Analizando por separado las muestras correspondientes a los distintos segmentos de intestino grueso, los porcentajes de células en fase S fueron los reflejados en la tabla 18.

Variables	Categorías	Fase S	V. máximo	V.mínimo	Desv.típica
Sexo	Hombres(66)	<b>5,66</b>	10,40	1,40	1,88
	Mujeres(49)	<b>5,42</b>	12,30	1,80	2,18
Edad	<65 (86)	<b>5,77</b>	12,30	1,40	2,07
	≥65 (29)	<b>4,95</b>	9,00	1,80	1,69
Localización	C.A. (35)	<b>6,44</b>	12,30	3,50	2,13
	C.T (27)	<b>5,66</b>	9,50	2,90	1,77
	C.D (24)	<b>5,84</b>	7,70	3,80	1,17
	R-S (29)	<b>4,16</b>	9,00	1,40	1,96

Tabla 18. % fase S en muestras de mucosa colónica normal

A continuación realizaremos el estudio comparativo:

◆ Comparación entre el porcentaje de células en fase S entre las distintas muestras de mucosa normal fraccionándolas según variables clínico-demográficas:

-*sexo*:  $p=0,442$  (NS)

-*edad*:  $p=0,053$  (NS)

◆ Comparación entre el porcentaje de células en fase S entre las distintas muestras de mucosa normal fraccionándolas según variables anatomopatológicas:

-*localización*:  **$p<0,001$** . Existen diferencias estadísticamente significativas entre las distintas muestras de mucosa normal tras agruparlas según su localización.

Realizando estudio comparativo de los valores de porcentaje de células en fase S entre los segmentos de intestino grueso tomados de dos en dos se obtienen diferencias estadísticamente significativas entre los valores en *recto-sigma* y cada uno de los otros segmentos (colon ascendente-  $p<0,001$  ; colon transversal-  $p=0,002$  ; colon descendente-  $p<0,001$ ). Sin embargo no existían diferencias estadísticamente significativas al comparar el resto de segmentos entre sí. Por lo tanto **en el segmento de recto-sigma es donde existe menor índice de proliferación (menor porcentaje de células en fase S).**



## 1.2 COMPARACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA APOPTOSIS CON EL RESTO DE VARIABLES

Al igual que en el apartado anterior, previamente a la exposición de los resultados del estudio comparativo, reproduciremos los resultados referentes a la distribución de apoptosis:

### a-distribución de apoptosis en las distintas regiones glandulares según variables clínico-demográficas

La distribución cualitativa de la apoptosis (positividad/negatividad para la tinción) por tercios glandulares al clasificar las muestras según las variables clínicas planteadas (sexo y edad) se recoge en la tabla 19.

### b-distribución de apoptosis en las zonas glandulares según variables anatomopatológicas

Asimismo, en la tabla 19 se reflejan los resultados obtenidos en cuanto a la distribución cualitativa de la apoptosis en cada uno de los segmentos glandulares al agrupar las muestras en función de la variable anatomopatológica establecida, es decir, según la localización o segmento intestinal.

Variable	categoría	Apoptosis zona sup.		Apoptosis zona med.		Apoptosis zona inf.	
		+	-	+	-	+	-
Sexo	Hombre (n=61)	36 (59,00%)	25 (41,00%)	6 (9,80%)	55 (90,20%)	0 (0%)	61 (100%)
	Mujer (n=39)	18 (46,20%)	21 (53,80%)	1 (2,60%)	38 (97,40%)	1 (2,60%)	38 (97,40%)
Edad	<65 (n=73)	39 (53,40%)	34 (46,60%)	6 (8,20%)	67 (91,80%)	1 (1,40%)	72 (98,60%)
	≥65 (n=27)	15 (55,60%)	12 (44,40%)	1 (3,70%)	26 (96,30%)	0 (0%)	27 (100%)
Localización	C.A. (n=31)	16 (51,60%)	15 (48,40%)	1 (3,20%)	30 (96,80%)	0 (0%)	31 (100%)
	C.T. (n=24)	13 (54,20%)	11 (45,80%)	3 (12,50%)	21 (87,50%)	0 (0%)	24 (100%)
	C.D. (n=21)	6 (28,60%)	15 (71,40%)	1 (4,80%)	20 (95,20%)	1 (4,80%)	20 (95,20%)
	R-S (n=24)	19 (79,20%)	5 (20,80%)	2 (8,30%)	22 (91,70%)	0 (0%)	24 (100%)

Tabla 19. Distribución cualitativa de apoptosis en los distintos tercios glandulares para las muestras de mucosa colónica normal

◆Comparación de la distribución de apoptosis de las muestras de mucosa normal por tercios glandulares y en función de las variables clínico-demográficas:

-*Sexo*: no se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la distribución de la apoptosis según el segmento glandular y el sexo:

tercio superior:  $p=0,208$  (NS)

tercio medio:  $p=0,164$  (NS)

tercio basal:  $p=0,209$  (NS)

-*Edad*: tampoco se observaron diferencias significativas al comparar la distribución de la apoptosis según el segmento glandular y la edad:

tercio superior:  $p=0,849$  (NS)

tercio medio:  $p=0,432$  (NS)

tercio basal:  $p=0,541$  (NS)

◆Comparación de la distribución de apoptosis de las muestras de mucosa normal por tercios glandulares y en función de la variable anatomopatológica:

-*localización*: tercio superior:  $p=0,009$

tercio medio:  $p=0,568$  (NS)

tercio basal:  $p=0,284$  (NS)

Así pues, existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto al patrón de apoptosis únicamente en el tercio superior glandular (en muestras de la localización recto-sigma). Al realizar el análisis comparativo de la distribución de apoptosis agrupada entre los cuatro segmentos colónicos sólo se obtenían diferencias estadísticamente significativas entre la localización recto-sigma y cada una de las tres restantes ( $p=0,017$ ), pero no entre CA, CT y CD entre sí.

Por tanto, **la mayor área de apoptosis se observa en el tercio superior de la localización recto-sigma** del grupo de muestras de colon normal.

### 1.3. COMPARACIÓN DEL ÍNDICE DE APOPTOSIS (I.A.) POR ZONAS GLANDULARES

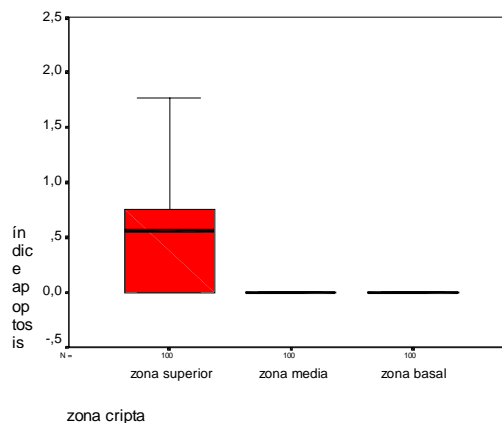
Se analizó el I.A. por zonas glandulares en cada uno de los segmentos intestinales. Los resultados más llamativos corresponden al tercio superior, tal y como se aprecia en la tabla 20.

	Índice de apoptosis			Desviación típica
	Valor medio	Valor máximo	Valor mínimo	
C.A. (n=31)	0,40	1,60	0	0,44
C.T. (n=24)	0,39	1,20	0	0,40
C.D. (n=21)	0,21	1,10	0	0,36
R-S (n=24)	0,79	2,10	0	0,56

Tabla 20. Distribución de I.A. en el tercio superior en los distintos segmentos intestinales

El I.A. muestra diferencias significativas entre los tres segmentos glandulares.

- ◆ Tercio superior vs tercio medio  $p < 0,001$
- ◆ Tercio superior vs tercio basal  $p < 0,001$
- ◆ Tercio medio vs tercio basal  $p = 0,032$



Gráfica 25: media del IA de las muestras de mucosa normal en los distintos tercios glandulares

**El mayor I.A. corresponde al tercio superior de la localización recto-sigma.**

## 2. GRUPO DE PÓLIPOS

### 2.1. PÓLIPOS SIN CÁNCER FOCAL

#### 2.1.1 COMPARACIÓN DEL ANÁLISIS POR CMF CON EL RESTO DE VARIABLES

##### 2.1.1.1 Contenido de ADN

Al igual que en apartados anteriores, expondremos a continuación los resultados a comparar:

##### a-Contenido de ADN de pólipos sin cáncer focal según variables clínico-demográficas

La distribución en cuanto al contenido de ADN de los 101 pólipos para cada una de las variables clínicas analizadas (sexo y edad) se recoge en la tabla 21.

##### b-Contenido de ADN de pólipos sin cáncer focal según variables anatomopatológicas

La tabla 21 recoge también los resultados obtenidos al agrupar los pólipos en función de las distintas variables anatomopatológicas y analizar su contenido de ADN.

			Diploides	% Diplo.	Aneuploid.	% Aneuplo.
VARIABLES CLÍNICAS	Sexo	Hombres	58	90,60	6	9,40
		Mujeres	35	94,60	2	5,40
	Edad	<65	28	96,60	1	3,40
		≥65	65	90,30	7	9,70
VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS	Segmento digestivo	C.A.	1	100	0	0
		C.T.	6	85,70	1	14,30
		C.D.	23	92,00	2	8,00
		R-S	63	92,60	5	7,40
	Tipo histológico	Adenoma	17	89,50	2	10,50
		T-V	70	93,30	5	6,70
		Velloso	6	85,70	1	14,30
	Displasia	Leve	19	95,00	1	5,00
		Moderada	37	94,90	2	5,10
		Severa	37	88,10	5	11,90
	Tamaño	<1cm	47	92,20	4	7,80
		1-2cm	29	90,60	3	9,40
		>2cm	17	94,40	1	5,60
	Implantación	Sesil	25	96,20	1	3,80
		Pediculado	68	90,70	7	9,30

Tabla 21. Distribución del contenido de ADN de pólipos sin cáncer focal

Dado que el número de resultados aneuploides se observó sólo en 8 casos, no se realizó comparación entre el contenido de ADN y la mayoría de las variables, a excepción de la histología, tamaño, grado de displasia e implantación, no existiendo en estos casos diferencias significativas ( $p=0,695$ ;  $p=0,891$ ;  $p=0,457$ ;  $p=0,372$  respectivamente).

### 2.1.1.2 Porcentaje de células en fase S (% fase S)

Se recogen en la siguiente tabla los resultados correspondientes a el porcentaje de células en fase S (%faseS) en función de las variables clínico-demográficas y anatomopatológicas:

			%fase S	V.máximo	V.mínimo	D.típica
VARIABLES CLÍNICAS	Sexo	Hombres	<b>8,56</b>	21,30	2,00	3,23
		Mujeres	<b>9,02</b>	21,30	1,10	4,47
	Edad	<65	<b>8,92</b>	21,30	1,10	3,83
		≥65	<b>8,65</b>	21,30	2,00	3,69
VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS	Segmento digestivo	C.A.	<b>10,10</b>			
		C.T.	<b>11,06</b>	21,30	4,10	6,38
		C.D.	<b>9,11</b>	20,70	4,80	3,70
		R-S	<b>8,32</b>	21,30	1,10	3,34
	Tipo histológico	Adenoma	<b>8,58</b>	20,70	5,40	3,68
		T-V	<b>8,62</b>	21,30	1,10	3,77
		Velloso	<b>10,23</b>	16,40	6,80	3,40
	Displasia	Leve	<b>8,74</b>	17,00	5,20	2,80
		Moderada	<b>8,13</b>	20,70	2,00	3,22
		Severa	<b>9,30</b>	21,30	1,10	4,46
	Tamaño	<1cm	<b>9,25</b>	21,30	2,00	3,93
		1-2cm	<b>8,19</b>	21,30	2,60	3,55
		>2cm	<b>8,16</b>	16,40	1,10	3,33
	Implantación	Sesil	<b>9,37</b>	20,70	2,60	4,12
		Pediculado	<b>8,51</b>	21,30	1,10	3,57

Tabla 22. Análisis ADN: porcentaje de células en fase S de los pólipos sin cáncer focal

◆ Comparación de % fase S entre los pólipos sin carcinoma agrupándolos en función de variables clínico-demográficas:

-*sexo*:  $p=0,881$  (NS)

-*edad*:  $p=0,584$  (NS)

◆ Comparación de % fase S entre los pólipos sin carcinoma agrupándolos en función de variables anatomopatológicas:

-*localización*:  $p=0,638$  (NS)

-*tipo histológico*:  $p=0,387$  (NS)

-*grado de displasia*:  $p=0,368$  (NS)

-*tamaño*:  $p=0,417$  (NS)

-*implantación*:  $p=0,271$  (NS)

Así pues, no se aprecia ninguna diferencia estadísticamente significativa en cuanto al porcentaje de células en fase S dentro del grupo de pólipos sin carcinoma entre sí en función de las variables clínico-demográficas y anatomopatológicas analizadas.

### 2.1.2. COMPARACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA APOPTOSIS CON EL RESTO DE VARIABLES

Variables clínicas	Categoría	Apoptosis zona sup.		Apoptosis zona med.		Apoptosis zona bas.	
		+	-	+	-	+	-
Sexo	Hombre (n=64)	46 (71,09%)	18 (28,10%)	51 (79,70%)	13 (20,30%)	30 (46,90%)	34 (53,10%)
	Mujer (n=37)	32 (86,50%)	5 (13,50%)	30 (81,10%)	7 (18,90%)	23 (62,20%)	14 (37,80%)
Edad	<65 (n=29)	23 (79,30%)	6 (20,70%)	21 (72,40%)	8 (27,60%)	15 (51,70%)	14 (48,30%)
	≥65 (n=72)	55 (76,40%)	17 (23,60%)	60 (83,30%)	12 (16,70%)	38 (52,80%)	34 (47,20%)

Tabla 23 . Distribución de apoptosis en pólipos sin cáncer focal según sexo y edad

Variables AP	Categoría	Apoptosis zona sup.		Apoptosis zona med.		Apoptosis zona bas.	
		+	-	+	-	+	-
Localización/ segmento digestivo	C.A. (n=1)	1 (100%)		1 (100%)		1 (100%)	
	C.T. (n=7)	6 (85,70%)	1 (14,30%)	4 (57,10%)	3 (42,90%)	4 (57,10%)	3 (42,90%)
	C.D. (n=25)	17 (68,00%)	8 (32,00%)	21 (84,00%)	4 (16,00%)	10 (40,00%)	15 (60,00%)
	R-S (n=68)	54 (79,40%)	14 (20,60%)	55 (80,90%)	13 (19,10%)	38 (55,90%)	30 (44,10%)
Tipo histológico	Ad. (n=19)	11 (57,90%)	8 (42,10%)	18 (94,70%)	1 (5,30%)	6 (31,60%)	13 (68,40%)
	T-V (n=75)	61 (81,30%)	14 (18,70%)	57 (76,00%)	18 (24,00%)	44 (58,70%)	31 (41,30%)
	V (n=7)	6 (85,70%)	1 (14,30%)	6 (85,70%)	1 (14,30%)	3 (42,80%)	4 (57,20%)
Displasia	Leve (n=20)	19 (95,00%)	1 (5,00%)	16 (80,00%)	4 (20,00%)	11 (55,00%)	9 (45,00%)
	Mod. (n=39)	26 (66,70%)	13 (33,30%)	32 (82,00%)	7 (18,00%)	17 (43,60%)	22 (56,40%)
	Severa (n=42)	33 (78,60%)	9 (21,40%)	33 (78,60%)	9 (21,40%)	25 (59,50%)	17 (40,50%)
Tamaño	<1cm (n=51)	36 (70,60%)	15 (29,40%)	40 (78,40%)	11 (21,60%)	19 (37,30%)	32 (62,70%)
	1-2cm (n=32)	27 (84,40%)	5 (15,60%)	24 (75,00%)	8 (25,00%)	23 (71,90%)	9 (28,10%)
	>2cm (n=18)	15 (83,30%)	3 (16,70%)	17 (94,40%)	1 (5,60%)	11 (61,10%)	7 (38,90%)
Implantación	Sesil (n=26)	19 (73,00%)	7 (27,00%)	19 (73,00%)	7 (27,00%)	11 (42,30%)	15 (57,70%)
	Pedic. (n=75)	59 (78,70%)	16 (21,30%)	62 (82,70%)	13 (17,30%)	42 (56,00%)	33 (44,00%)

Tabla 24 . Distribución de apoptosis en pólipos sin cáncer focal según variables anatomopatológicas

Las tablas previamente expuestas (tablas 23 y 24) reflejan la distribución de la apoptosis (atendiendo a la positividad o negatividad de la tinción) en los distintos tercios glandulares al agrupar las 101 muestras analizadas en función de las variables clínico-demográficas y anatomopatológicas.

A continuación procederemos al estudio comparativo:

◆ Comparación en cuanto a la distribución de apoptosis dentro de los pólipos sin carcinoma distribuidos por tercios glandulares según variables clínico-demográficas:

- sexo*: tercio superior:  $p=0,092$  (NS)  
tercio medio:  $p=0,866$  (NS)  
tercio basal:  $p=0,138$  (NS)
- edad*: tercio superior:  $p=0,751$  (NS)  
tercio medio:  $p=0,213$  (NS)  
tercio basal:  $p=0,924$  (NS)

◆ Comparación en cuanto a la distribución de apoptosis dentro de los pólipos sin carcinoma por tercios glandulares según variables anatomopatológicas:

- localización: tercio superior:  $p=0,577$  (NS)  
tercio medio:  $p=0,417$  (NS)  
tercio basal:  $p=0,416$  (NS)
- tipo histológico: tercio superior:  $p=0,080$  (NS)  
tercio medio:  $p=0,174$  (NS)  
tercio basal:  $p=0,094$  (NS)
- grado de displasia: tercio superior:  $p=0,047$   
tercio medio:  $p=0,926$  (NS)  
tercio basal:  $p=0,346$  (NS)
- tamaño: tercio superior:  $p=0,274$  (NS)  
tercio medio:  $p=0,229$  (NS)  
tercio basal:  $p=0,006$
- implantación: tercio superior:  $p=0,558$  (NS)  
tercio medio:  $p=0,290$  (NS)  
tercio basal:  $p=0,228$  (NS)

Así pues, se obtienen diferencias significativas en cuanto a la distribución de apoptosis en tercio superior en relación con el grado de displasia y en el tercio basal si lo relacionamos con el tamaño. Analizando no obstante con más detenimiento estos resultados, al comparar los grados de displasia entre sí dos a dos, se aprecian diferencias significativas entre el grado de displasia leve (19 tinciones positivas) y el grado de displasia moderada (26 tinciones positivas,  $p=0,022$ ).

En cuanto al tamaño, sólo se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los pólipos de <1cm (19 muestras con tinción positiva) y los de 1-2 cm (23 muestras con tinción positiva,  $p=0,002$ ), no existiendo diferencias destacables al comparar los restantes grupos de tamaños entre sí.



### 2.1.3. COMPARACIÓN DEL ÍNDICE DE APOPTOSIS CON EL RESTO DE VARIABLES EN LOS PÓLIPOS SIN CÁNCER FOCAL

En las siguientes tablas se expone el índice de apoptosis (I.A.) de los pólipos sin cáncer focal según variables clínico-demográficas y anatomopatológicas:

VARIABLES	Categorías	I.A. (v. medio)	I.A. (v. máximo)	I.A. (v.mínimo)	Desv.típica
Sexo	Hombres (n=64)	0,65	7,02	0	0,88
	Mujeres (n=37)	0,68	2,96	0	0,69
Edad	<65 (n=29)	0,65	7,02	0	0,92
	≥65 (n=72)	0,67	4,31	0	0,77

Tabla 25. Índice de apoptosis (I.A.) en pólipos sin cáncer focal según sexo y edad

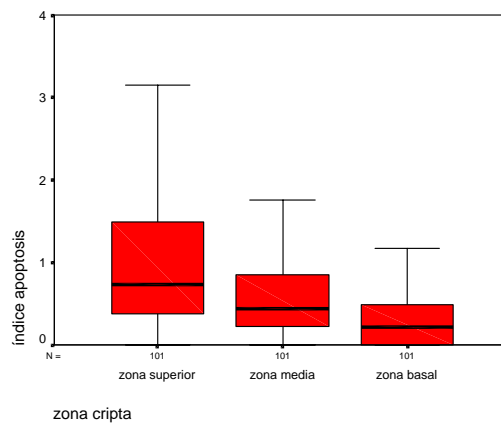
VARIABLES	Categorías	I.A. (v.medio)	I.A. (v.máximo)	I.A. (v.mínimo)	Desv. típica
Localización	C.A. (n=1)	1,08	1,84	0,54	0,68
	C.T. (n=7)	0,53	2,86	0	0,68
	C.D. (n=25)	0,64	4,31	0	0,93
	R-S (n=68)	0,68	7,02	0	0,78
Histología	Aden. (n=19)	0,63	3,82	0	0,77
	T-V (n=75)	0,70	7,02	0	0,85
	Velloso (n=7)	0,35	1,21	0	0,31
Displasia	Leve (n=20)	0,82	7,02	0	1,09
	Moderada (n=39)	0,62	4,00	0	0,82
	Severa (n=42)	0,63	2,56	0	0,63
Tamaño	<1cm (n=51)	0,61	4,31	0	0,79
	1-2cm (n=32)	0,79	7,02	0	0,98
	>2cm (n=18)	0,57	2,11	0	0,49
Implantación	Sesil (n=26)	0,69	4,31	0	0,91
	Pediculado (n=75)	0,65	7,02	0	0,78

Tabla 26. Índice de apoptosis (I.A.) en pólipos sin cáncer focal según variables anatomopatológicas

Los pólipos con aneuploidia ( $x=0,4165$  con D.S. de  $0,5131$ ) tenían menor índice de apoptosis (I.A.) que los diploides ( $x=1,0494$  con D.S. de  $0,9671$ ), siendo la diferencia significativa ( $p=0,050$ ). No se hallaron diferencias significativas con el resto de variables, tanto clínico-demográficas como anatomopatológicas.

#### 2.1.4. COMPARACIÓN DEL ÍNDICE DE APOPTOSIS POR ZONAS GLANDULARES EN LOS PÓLIPOS SIN CÁNCER FOCAL

Mediante la prueba de Kruskal-Wallis, la comparación de las medias del I.A. por zonas glandulares resultó ser significativa ( $p<0,001$ ). La significancia se mantiene al analizar las tres zonas entre sí dos a dos (superior versus media:  $p=0,002$ ; superior versus basal:  $p<0,001$ ; media versus basal:  $p<0,001$ ).



Gráfica 26: media del IA de los pólipos sin cáncer focal en los distintos tercios glandulares

## 2.2. PÓLIPOS CON CÁNCER FOCAL

### 2.2.1. COMPARACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA APOPTOSIS CON EL RESTO DE VARIABLES EN LA PORCIÓN ADENOMATOSA DE LOS PÓLIPOS CON CÁNCER FOCAL

Las tablas 27 y 28 reflejan la distribución cualitativa de apoptosis por zonas glandulares en la porción adenomatosa de los pólipos con cáncer focal según variables clínico-demográficas y anatomopatológicas.

Variables AP	Categoría	Apoptosis zona sup.		Apoptosis zona med.		Apoptosis zona bas.	
		+	-	+	-	+	-
Localización/ segmento digestivo	C.A. (n=0)						
	C.T. (n=2)		2 (100%)		2 (100%)	2 (100%)	
	C.D. (n=8)	2 (25,00%)	6 (75,00%)	1 (12,50%)	7 (87,50%)	3 (37,50%)	5 (62,50%)
	R-S (n=23)	6 (26,00%)	17 (74,00%)	2 (8,70%)	21 (91,30%)	9 (39,10%)	14 (60,90%)
Tipo histológico	Ad. (n=3)		3 (100%)		3 (100%)	2 (66,70%)	1 (33,30%)
	T-V (n=19)	7 (36,8%)	12 (63,20%)	2 (10,50%)	17 (89,50%)	8 (42,10%)	11 (57,90%)
	V (n=11)	1 (9,10%)	10 (90,90%)	1 (9,10%)	10 (90,90%)	4 (36,40%)	7 (63,60%)
Displasia	Leve (n=1)		1 (100%)		1 (100%)		1 (100%)
	Mod. (n=1)		1 (100%)		1 (100%)	1 (100%)	
	Severa (n=31)	8 (25,80%)	23 (74,20%)	3 (9,70%)	28 (90,30%)	13 (41,90%)	18 (58,10%)
Tamaño	<1cm (n=3)	1 (33,30%)	2 (66,70%)		3 (100%)	3 (100%)	
	1-2cm (n=16)	5 (31,20%)	11 (68,80%)	1 (6,20%)	15 (93,80%)	6 (37,50%)	10 (62,50%)
	>2cm (n=14)	2 (14,30%)	12 (85,70%)	2 (14,30%)	12 (85,70%)	5 (35,70%)	9 (64,30%)
Implan- tación	Sesil (n=7)	1 (14,30%)	6 (85,70%)	1 (14,30%)	6 (85,70%)	3 (42,80%)	4 (57,20%)
	Pedic. (n=26)	7 (27,00%)	19 (73,00%)	2 (7,70%)	24 (92,30%)	11 (42,30%)	15 (57,70%)

Tabla 27. Distribución de apoptosis en pólipos con cáncer focal (porción adenomatosa) según variables anatomopatológicas

Variables clínicas	Categoría	Apoptosis zona sup.		Apoptosis zona med.		Apoptosis zona bas.	
		+	-	+	-	+	-
Sexo	Hombre (n=20)	6 (30,00%)	14 (70,00%)		20 (100%)	10 (50,00%)	10 (50,00%)
	Mujer (n=13)	2 (15,40%)	11 (84,60%)	3 (23,00%)	10 (77,00%)	4 (31,00%)	9 (69,00%)
Edad	<65 (n=9)	4 (44,40%)	5 (55,60%)		9 (100%)	7 (77,80%)	2 (22,20%)
	≥65 (n=24)	4 (16,70%)	20 (83,30%)	3 (12,50%)	21 (87,50%)	7 (29,20%)	17 (70,80%)

Tabla 28 . Distribución de apoptosis en pólipos con c. focal (p Adenomatosa) según variables clínicas

A partir de los resultados allí reflejados, se procedió al estudio comparativo. Se empleó la prueba de Xi cuadrado para comparar la distribución de la apoptosis, tanto agrupada como distribuida por zonas glandulares, y las variables clínico-demográficas y anatomopatológicas. No se han observado diferencias estadísticamente significativas.

### 2.2.2. COMPARACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA APOPTOSIS CON EL RESTO DE VARIABLES EN LA PORCIÓN TUMORAL DE LOS PÓLIPOS CON CÁNCER FOCAL

Reflejaremos a continuación en las tablas 29 y 30 la distribución cualitativa de apoptosis por zonas glandulares en la porción tumoral de los pólipos con cáncer focal según variables clínico-demográficas y anatomopatológicas a partir de la cual se realizó el estudio comparativo.

Variables clínicas	Categoría	Apoptosis zona sup.		Apoptosis zona med.		Apoptosis zona bas.	
		+	-	+	-	+	-
Sexo	Hombre (n=20)	6 (30,00%)	14 (70,00%)	5 (25,00%)	15 (75,00%)	8 (40,00%)	12 (60,00%)
	Mujer (n=13)	1 (7,70%)	12 (92,30%)	2 (15,40%)	11 (84,60%)	3 (23,10%)	10 (76,90%)
Edad	<65 (n=9)	2 (22,20%)	7 (77,80%)	2 (22,20%)	7 (77,80%)	5 (55,50%)	4 (44,50%)
	≥65 (n=24)	5 (21,00%)	19 (79,00%)	5 (21,00%)	19 (79,00%)	6 (25,00%)	18 (75,00%)

Tabla 29 . Distribución de apoptosis en pólipos con cáncer focal (p tumoral) según variables clínicas

Variables AP	Categoría	Apoptosis zona sup.		Apoptosis zona med.		Apoptosis zona bas.	
		+	-	+	-	+	-
Localización/ segmento digestivo	C.A. (n=0)						
	C.T. (n=2)		2 (100%)		2 (100%)		2 (100%)
	C.D. (n=8)	2 (25,00%)	6 (75,00%)	3 (37,50%)	5 (62,50%)	3 (37,50%)	5 (62,50%)
	R-S (n=23)	5 (22,00%)	18 (78,00%)	4 (17,40%)	19 (82,60%)	8 (34,80%)	15 (65,20%)
Tamaño	<1cm (n=3)	1 (33,30%)	2 (66,70%)	1 (33,30%)	2 (66,70%)	2 (66,70%)	1 (33,30%)
	1-2cm (n=16)	2 (12,50%)	14 (87,50%)	2 (12,50%)	14 (87,50%)	5 (31,20%)	11 (68,80%)
	>2cm (n=14)	4 (28,60%)	10 (71,40%)	4 (28,60%)	10 (71,40%)	4 (28,60%)	10 (71,40%)
Implan- tación	Sesil (n=7)	2 (28,50%)	5 (71,50%)	2 (28,50%)	5 (71,50%)	3 (42,80%)	4 (57,20%)
	Pedic. (n=26)	5 (19,30%)	21 (80,70%)	5 (19,30%)	21 (80,70%)	8 (30,80%)	18 (69,20%)

Tabla 30. Distribución de apoptosis en pólipos con cáncer focal (p tumoral) según variables anatomopatológicas

Mediante la prueba de Xi cuadrado se ha analizado la relación entre la distribución de la apoptosis agrupada y por zonas y las respectivas variables clínico-demográficas y anatomopatológicas sin hallar diferencias significativas.

### 2.2.3. COMPARACIÓN DEL ÍNDICE DE APOPTOSIS CON EL RESTO DE VARIABLES EN LOS PÓLIPOS CON CÁNCER FOCAL

A continuación se presentan los resultados obtenidos del I.A. del grupo de pólipos con cáncer focal según las variables clínico-demográficas y anatomopatológicas.

Variables	Categorías	I.A. (v. medio)	I.A. (v. máximo)	I.A. (v.mínimo)	Desv.típica
Sexo	Hombres (n=20)	0,24	2,74	0	0,46
	Mujeres (n=13)	0,17	1,84	0	0,38
Edad	<65 (n=9)	0,32	2,74	0	0,56
	≥65 (n=24)	0,17	1,84	0	0,36

Tabla 31 . Índice de apoptosis (I.A.) en pólipos con cáncer focal según variables clínicas

VARIABLES	Categorías	I.A. (v.medio)	I.A. (v.máximo)	I.A. (v.mínimo)	Desv. típica
Localización	C.T. (n=2)	0,08	0,54	0	0,19
	C.D. (n=8)	0,28	2,74	0	0,56
	R-S (n=23)	0,20	2,17	0	0,39
Histología	Aden.(n=3)	0,12	1,00	0	0,29
	T-V (n=19)	0,28	2,74	0	0,50
	Vell. (n=11)	0,12	1,30	0	0,29
Displasia	Leve (n=1)	0	0	0	0
	Mod. (n=1)	0,33	1,00	0	0,58
	Sev. (n=31)	0,19	2,17	0	0,40
Tamaño	<1cm (n=3)	0,40	2,74	0	0,70
	1-2cm(n=16)	0,18	2,17	0	0,39
	>2cm (n=14)	0,20	1,84	0	0,40
Implantación	Sesil (n=7)	0,32	2,74	0	0,57
	Pedi. (n=26)	0,18	2,17	0	0,37

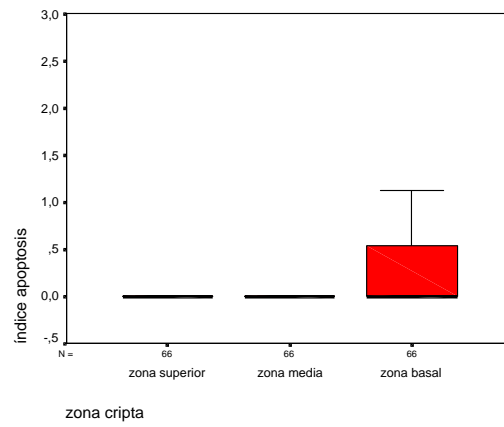
Tabla 32 . Índice de apoptosis (I.A.) en pólipos con cáncer focal según variables anatomopatológicas

La media del I.A. del grupo de pólipos con cáncer focal en relación con la edad presenta diferencias significativas (<65 años:  $x=0,3224$  con D.S. 0,5609;  $\geq 65$  años:  $x=0,1713$  con D.S. 0,3614 – $p=0,020$ ). Mediante la prueba de independencia de Kruskal-Wallis se observan diferencias entre las medias del I.A. y la histología ( $p=0,030$ ). Analizando este resultado, al comparar los tipos histológicos entre sí dos a dos se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre la histología túbulo-vellosa ( $x$  I.A: 0,2830 con D.S. 0,4991) y vellosa ( $x$  I.A: 0,1166 con D.S. 0,2876).

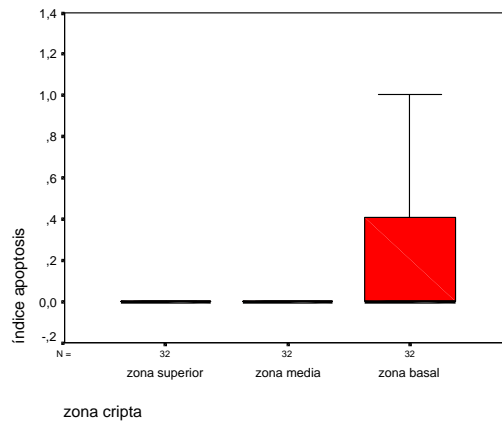
No se ha hallado relación entre el I.A. y el resto de variables.

#### 2.2.4. COMPARACIÓN DEL ÍNDICE DE APOPTOSIS POR ZONAS GLANDULARES EN LOS PÓLIPOS CON CÁNCER FOCAL

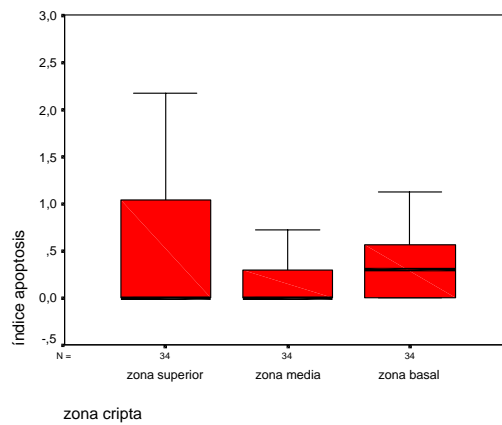
Mediante la prueba de Kruskal-Wallis la comparación de las medias del I.A. por zonas glandulares en este grupo resultó estadísticamente significativa ( $p=0,014$ ). Al analizar este resultado entre las diferentes zonas tomadas dos a dos mediante la prueba de Mann-Whitney se observa que la diferencia se establece entre la zona media ( $x=0,1220$  con D.S. 0,3276) y la basal ( $x=0,2540$  con D.S. 0,3442 ;  $p=0,004$ ).



Grafica 27: media del IA de los pólipos con cáncer focal en los distintos tercios glandulares



Grafica 28: media del IA de los pólipos con carcinoma intramucoso en los distintos tercios glandulares



Grafica 29: media del IA de los pólipos con carcinoma invasor en los distintos tercios glandulares

### 2.2.5. COMPARACIÓN DEL ANÁLISIS POR CMF ENTRE LAS PORCIONES ADENOMATOSA Y TUMORAL DE LOS PÓLIPOS CON CÁNCER FOCAL

#### 2.2.5.1. Contenido de ADN

Mediante la prueba de Xi cuadrado se comparó la ploidia entre la porción adenomatosa (10 aneuploides) y la porción tumoral (13 aneuploides) del conjunto de pólipos con carcinoma focal, no observando una diferencia significativa al comparar la aneuploidia entre las dos porciones (p=0,434).

#### 2.2.5.2. Porcentaje de células en fase S (% fase S)

- ◆ Comparación % fase S entre la porción adenomatosa y tumoral del conjunto de pólipos con carcinoma focal: p=0,367
- ◆ Comparación % fase S entre las porciones adenomatosa y tumoral de los pólipos con carcinoma intramucoso: p=0,388
- ◆ Comparación % fase S entre las porciones adenomatosa y tumoral de los pólipos con carcinoma invasor: p=**0,039**

Existe mayor porcentaje de células en fase S en la porción tumoral de los pólipos con carcinoma invasor (x%faseS=10,2769 con D.S. 7,4926 versus x%faseS=15,2267 con D.S. 10,9150).

### 2.2.6. COMPARACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA APOPTOSIS ENTRE LA PORCIÓN ADENOMATOSA Y LA PORCIÓN TUMORAL DE LOS PÓLIPOS CON CÁNCER FOCAL

- ◆ Comparación de la distribución de apoptosis en cada tercio de la cripta entre la porción adenomatosa y tumoral del total de pólipos con carcinoma.
  - Tercio superior: p=**0,042**
  - Tercio medio: p=0,523
  - Tercio basal: p=0,136
- ◆ Comparación de la distribución de apoptosis en cada tercio de la cripta entre la porción adenomatosa y tumoral de los pólipos con carcinoma intramucoso.
  - Tercio superior: no valorable, por existencia de un valor nulo
  - Tercio medio: no valorable
  - Tercio basal: p=0,182
- ◆ Comparación de la distribución de apoptosis en cada tercio de la cripta entre la porción adenomatosa y tumoral de los pólipos con carcinoma invasor.
  - Tercio superior: p=0,115
  - Tercio medio: p=0,938
  - Tercio basal: p=0,201

Así pues, únicamente se obtienen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la distribución de apoptosis entre la porción adenomatosa y tumoral en el tercio superior glandular y siempre y cuando se considere el total de los pólipos con carcinoma. Dicha significación se pierde al considerar por separado las muestras con carcinoma intramucoso e invasor.



### 2.2.7. COMPARACIÓN DEL ÍNDICE DE APOPTOSIS ENTRE LA PORCIÓN ADENOMATOSA Y LA PORCIÓN TUMORAL DE LOS PÓLIPOS CON CÁNCER FOCAL

Mediante la prueba de Mann-Whitney no se observaron diferencias entre los índices de apoptosis, por zonas y total, de las partes adenomatosa y tumoral de los pólipos con cáncer focal.

### 2.2.8. COMPARACIÓN DEL ÍNDICE DE APOPTOSIS CON EL RESTO DE VARIABLES EN LOS PÓLIPOS CON CARCINOMA INTRAMUCOSO

VARIABLES	Categorías	I.A. (v. medio)	I.A. (v. máximo)	I.A. (v. mínimo)	Desv. típica
Sexo	Hombres (n=9)	0,08	1,13	0	0,24
	Mujeres (n=7)	0,09	1,24	0	0,24
Edad	<65 (n=5)	0,12	1,13	0	0,27
	≥65 (n=11)	0,07	1,24	0	0,23

Tabla 33. Índice de apoptosis en pólipos con carcinoma intramucoso según variables clínicas

VARIABLES	Categorías	I.A. (v.medio)	I.A. (v.máximo)	I.A. (v.mínimo)	Desv. típica
Localización	C.T. (n=2)	0,08	0,54	0	0,19
	C.D. (n=2)	0	0	0	0
	R-S (n=12)	0,10	1,24	0	0,27
Histología	Aden.(n=1)	0,27	1,00	0	0,44
	T-V (n=9)	0,11	1,24	0	0,28
	Velloso (n=6)	0,01	0,39	0	0,07
Displasia	Leve (n=1)	0,06	1,13	0	0,21
	Mod. (n=1)	0,33	1,00	0	0,58
	Sev. (n=14)	0,10	1,24	0	0,25
Tamaño	<1cm (n=2)	0,13	0,59	0	0,24
	1-2cm (n=8)	0,12	1,24	0	0,31
	>2cm (n=6)	0,02	0,50	0	0,10
Implantación	Sesil (n=4)	0,07	0,59	0	0,18
	Pedic.(n=12)	0,09	1,24	0	0,26

Tabla 34. Índice de apoptosis en pólipos con c. intramucoso según variables anatomopatológicas

En las tablas previas (tablas 33 y 34) se han reproducido los resultados referentes al índice de apoptosis (I.A.) de los pólipos con carcinoma intramucoso según variables clínico-demográficas y anatomopatológicas, sobre los que se realizó el estudio comparativo.

Mediante pruebas no paramétricas se ha analizado la relación entre el I.A. de los pólipos con carcinoma intramucoso y las variables clínico-demográficas y anatomopatológicas. Existe diferencia significativa ( $p=0,031$ ) entre el I.A. y los tres tipos histológicos (x I.A. adenomatoso=0,2748 con D.S. 0,4405; x I.A. túbulo-veloso=0,1112 con D.S. 0,2766 y x I.A. veloso=0,010 con D.S. 0,065). Al comparar este resultado entre los diferentes tipos histológicos entre sí tomados de dos en dos se observa que el I.A. se asocia significativamente al comparar la histología túbulo-velosa con la velosa ( $p=0,035$ ).

El I.A. no mostró relación con el resto de variables clínico-demográficas y anatomopatológicas.

#### 2.2.9. COMPARACIÓN DEL ÍNDICE DE APOPTOSIS CON EL RESTO DE VARIABLES EN LOS PÓLIPOS CON CARCINOMA INVASOR

Las tablas 35 y 36 reflejan el índice de apoptosis de los pólipos con carcinoma invasor según variables clínico-demográficas y anatomopatológicas. Sobre dichos resultados se realizó el estudio comparativo.

VARIABLES	Categorías	I.A. (v. medio)	I.A. (v. máximo)	I.A. (v.mínimo)	Desv.típica
Sexo	Hombres (n=11)	0,37	2,74	0	0,55
	Mujeres (n=6)	0,26	1,84	0	0,47
Edad	<65 (n=4)	0,57	2,74	0	0,72
	≥65 (n=13)	0,26	1,84	0	0,43

Tabla 35 . Índice de apoptosis en pólipos con carcinoma invasor según variables clínicas

VARIABLES	Categorías	I.A. (v.medio)	I.A. (v.máximo)	I.A. (v.mínimo)	Desv. típica
Localización	C.D. (n=6)	0,38	2,74	0	0,62
	R-S (n=11)	0,31	2,17	0	0,46
Histología	Aden.(n=2)	0,04	0,47	0	0,13
	T-V (n=10)	0,44	2,74	0	0,60
	Vell. (n=5)	0,24	1,30	0	0,39
Displasia	Sev. (n=17)	0,26	2,17	0	0,48
Tamaño	<1cm (n=1)	1,04	2,74	0	1,05
	1-2cm (n=8)	0,25	2,17	0	0,45
	>2cm (n=8)	0,34	1,84	0	0,48
Implantación	Sesil (n=3)	0,59	2,74	0	0,71
	Pedi. (n=14)	0,26	2,17	0	0,43

Tabla 36 . Índice de apoptosis en pólipos con carcinoma invasor según variables clínicas

La media del I.A en los pólipos con carcinoma invasor en relación con la variable edad presenta significancia ( $p=0,015$ ) según sea  $<65$  años (x I.A: 0,5723 con D.S 0,7175) ó  $\geq 65$  años (x I.A: 0,2602 con .D.S. 0,4250).

El estudio con pruebas no paramétricas mostró una relación significativa entre I.A y los tipos histológicos ( $p=0,022$ ). Analizando este resultado entre los diferentes tipos histológicos entre sí tomados dos a dos se observa que el I.A se asocia de forma significativa ( $p=0,010$ ) al comparar la histología adenomatosa (x I.A: 0,038 con D.S. 0,1343) y la túbulo-vellosa (x I.A: 0,4376 con D.S. 0,3868).

Existe también una relación estadísticamente significativa entre el I.A. y el tamaño de los pólipos ( $p=0,050$ ). Esta relación de significancia se estableció entre el tamaño  $<1$ cm (x I.A:1,0359 con D.S 1,0480) y el tamaño 1-2cm (x I.A: 0,2496 con D.S. 0,4523) con una  $p=0,029$ . No se observó ninguna relación entre el I.A. y el resto de variables clínico-demográficas y anatomopatológicas.

### **3. COMPARACIÓN ENTRE LOS GRUPOS**

#### **3.1. COMPARACIÓN ENTRE EL GRUPO DE MUESTRAS DE COLON NORMAL, PÓLIPOS Y PÓLIPOS CON CÁNCER FOCAL**

##### *3.1.1. SEGÚN RESULTADOS DE CMF*

###### **3.1.1.1. Contenido de ADN**

No puede establecerse un estudio comparativo del contenido de ADN ente los tres grupos, pues todas las muestras de mucosa normal son diploides .

###### **3.1.1.2. Porcentaje de células en fase S (% fase S)**

Existe diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) entre el % fase S del grupo normal ( $x=5,5500$  con D.S. 2,00), grupo de pólipos ( $x=8,7299$  con D.S. 3,719) y el grupo de pólipos con carcinoma focal tanto en su porción adenomatosa ( $x=12,0885$  con D.S. 8,5703) como en la porción tumoral ( $x=14,4862$  con D.S 11,9245). Se sigue observando esta diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) al comparar los subgrupos de pólipos con cáncer focal intramucoso e invasor.

##### *3.1.2. SEGÚN EL RESULTADO DE LA APOPTOSIS*

###### **3.1.2.1. Distribución topográfica de apoptosis**

Mediante la prueba de Xi cuadrado, al comparar la distribución topográfica por zonas glandulares entre los tres grupos, se obtiene una p estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Existe mayor número de muestras teñidas positivamente en cualquiera de las tres zonas glandulares del grupo de pólipos sin cáncer focal.

###### **3.1.2.2. Índice de apoptosis (I.A.)**

Se ha empleado la prueba de Kruskal-Wallis para comparar el promedio del I.A. total y por zonas glandulares entre los tres grupos. Existen diferencias significativas en los resultados de I.A. tanto total (grupo normal: I.A= 0,1708 con D.S 0,3636, grupo de pólipos sin cáncer focal: I.A= 0,6607 con D.S. 0,8138, grupo de pólipos con cáncer focal: I.A= 0,2125 con D.S. 0,4290;  $p < 0,001$ ) como por zonas ( $p < 0,001$ ).

Mediante la prueba de Spearman no se ha podido establecer correlación entre el porcentaje de células en fase S y el I.A. para cada uno de los tres grupos (gráficas 30, 31 y 32).

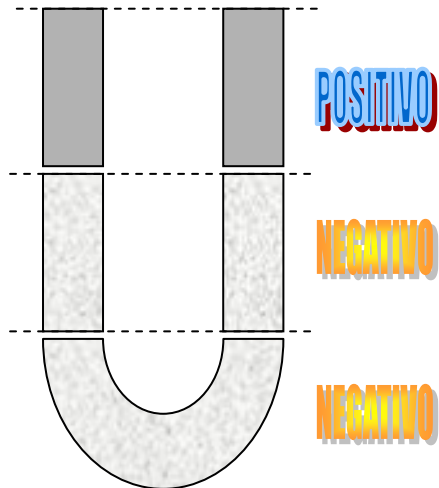


Figura 6. Distribución del patrón de positividad/negatividad de apoptosis en muestras de mucosa normal por tercios glandulares

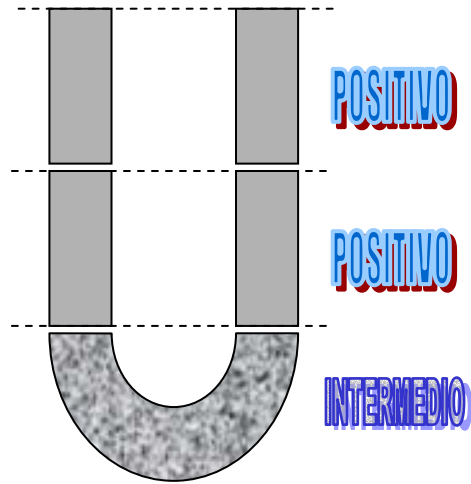


Figura 7. Distribución del patrón de positividad/negatividad de apoptosis en pólipos sin cáncer focal por tercios glandulares

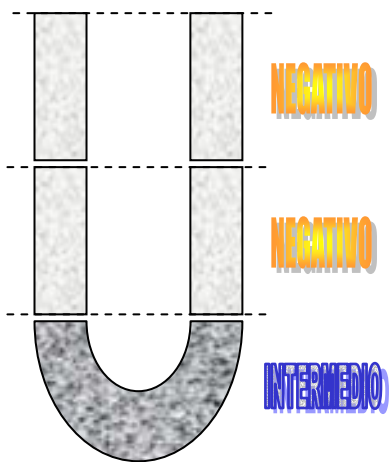


Figura 8. Distribución del patrón de positividad/negatividad de apoptosis en muestras de pólipos con cáncer focal (porción adenomatosa) por tercios glandulares

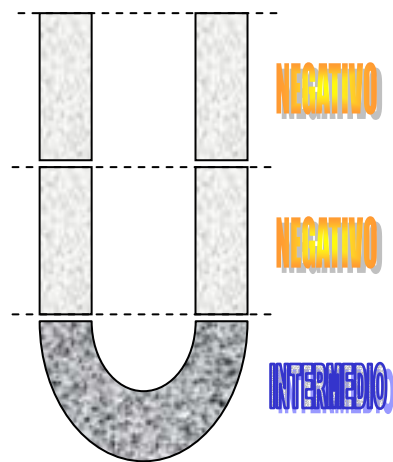
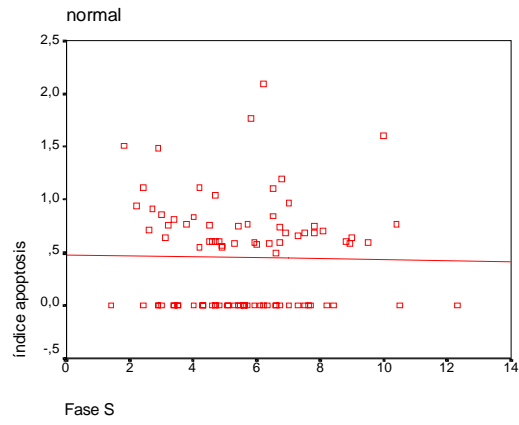
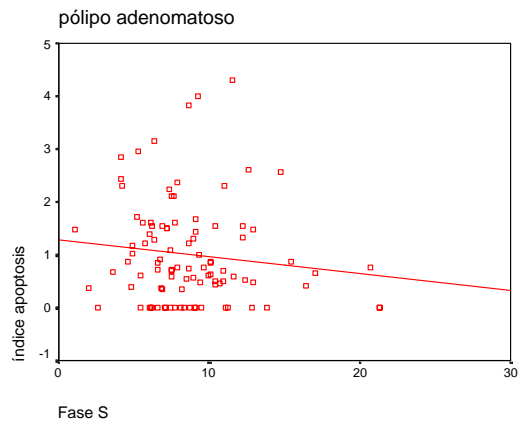


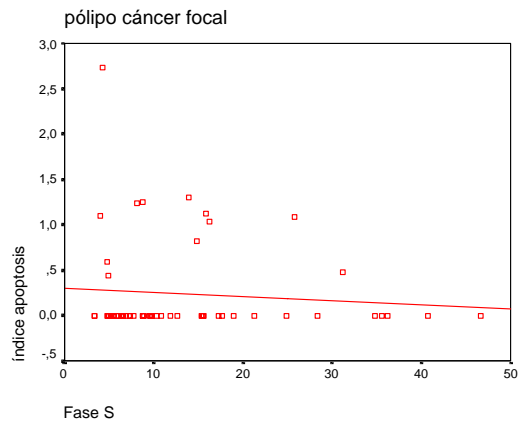
Figura 9. Distribución del patrón de positividad/negatividad de apoptosis en muestras de pólipos con cáncer focal (porción tumoral) por tercios glandulares



**Gráfica 30: correlación entre IA y % faseS en muestras de mucosa normal**



**Gráfica 31: correlación entre IA y % faseS en pólipos sin cáncer focal**



**Gráfica 32: correlación entre IA y % faseS en pólipos con cáncer focal**

### 3.2. COMPARACIÓN ENTRE EL GRUPO DE MUESTRAS DE COLON NORMAL Y PÓLIPOS SIN CÁNCER FOCAL

#### 3.2.1. SEGÚN RESULTADOS DE CMF

##### 3.2.1.1. Contenido de ADN

No puede establecerse un estudio comparativo entre el contenido de ADN de ambos tipos de muestras, pues todas las muestras de mucosa normal son diploides .

##### 3.2.1.2. Porcentaje de células en fase S (% fase S)

Comparación de %fase S entre mucosa normal (x%faseS= 5,5500 con D.S. 2,00) y pólipos sin carcinoma (x%faseS=8,7299 con D.S. 3,719) en conjunto:  $p < 0,001$

No pueden establecerse estudios comparativos diferenciando por variables clínicas (edad) o anatomopatológicas al no ser ambos grupos de muestras homogéneos para dichas variables.

#### 3.2.2. SEGÚN EL RESULTADO DE APOPTOSIS

##### 3.2.2.1. Distribución topográfica de la apoptosis

Comparando la distribución de la apoptosis en el conjunto de muestras de mucosa normal y los pólipos sin carcinoma según los tercios glandulares el resultado es el siguiente:

Tercio superior:  $p = 0,001$

Tercio medio:  $p < 0,001$

Tercio basal:  $p < 0,001$

Así pues, existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la distribución de apoptosis entre ambos tipos de muestra en cualquiera de los tercios glandulares, a expensas de una mayor tinción en los pólipos sin cáncer focal.

##### 3.2.2.2. Índice de apoptosis (I.A.)

Mediante la prueba de Mann-Whitney se ha comparado el I.A. total y por zonas glandulares entre el grupo de mucosa normal y el grupo de pólipos sin cáncer focal.

Se observa diferencia significativa entre el I.A. total del grupo normal (I.A.= 0,1708 con D.S. 0,3636) y el grupo de pólipos sin cáncer focal (I.A.= 0,6607 con D.S. 0,8138) con  $p < 0,001$ .

También se observan diferencias al analizar el I.A. por zonas entre ambos grupos:

-tercio superior: x I.A.= 0,4511 (grupo normal) v.s. x I.A.= 0,9993 (grupo pólipo sin cáncer focal);  $p < 0,001$

-tercio medio: x I.A.= 0,052 (grupo normal) v.s. x I.A.= 0,5810 (grupo pólipos sin cáncer focal);  $p < 0,001$

-tercio inferior: x I.A.= 0,0086 (grupo normal) v.s. x I.A.= 0,4019 (grupo pólipos sin cáncer focal);  $p < 0,001$

#### 3.2.3. ESTUDIO DE REGRESIÓN LOGÍSTICA

Una vez realizado el estudio comparativo, se realizó una regresión logística binaria con el fin de determinar cuáles de las variables que habían resultado estadísticamente significativas en el estudio univariante presentaban un valor predictivo independiente.

Se aplicó el programa informático SPSS, con la obtención de los siguientes resultados:

3.2.3.1. Al comparar la totalidad de variables en el estudio multivariante **entre muestras de mucosa normal y el conjunto de pólipos** (considerando únicamente la porción adenomatosa de los pólipos con carcinoma), sólo mantuvieron significación estadística las siguientes variables:

◆ *% fase S* ( $p < 0,001$ ) : a mayor % de fase S mayor probabilidad de que la muestra corresponda a un pólipo y menor de que corresponda a mucosa normal. Es decir, los pólipos presentan una mayor actividad proliferativa que la mucosa normal.

◆ *Distribución de apoptosis e índice de apoptosis*: dicha variable sólo mantenía su significación estadística cuando se limitaba a los tercios glandulares medio ( $p < 0,001$ ) y basal ( $p = 0,005$ ), pero no en el tercio superior ( $p = 0,117$ ). En los dos tercios inferiores, a mayor cantidad de apoptosis, mayor probabilidad de que la muestra correspondiese a un pólipo y menor de corresponder a mucosa normal. Es decir los pólipos presentan mayor cantidad de apoptosis en los dos tercios inferiores glandulares que las muestras normales. En el tercio superior no existen diferencias significativas entre ambos tipos de muestras, y por consiguiente esta variable en el tercio superior carece de valor predictivo independiente.

3.2.3.2. Considerando únicamente las muestras **de mucosa normal y los pólipos sin carcinoma**, los resultados al aplicar la regresión logística se mantienen, es decir, resultan con significación estadística independiente:

◆ *% fase S* ( $p < 0,001$ ) cuanto mayor es el % de fase S, mayor es la posibilidad de que la muestra corresponda a un pólipo sin carcinoma, y menor de que corresponda a una muestra de mucosa normal. Es decir, los pólipos sin carcinoma presentan una mayor actividad proliferativa celular que la mucosa normal.

◆ *Distribución de apoptosis e índice de apoptosis (I.A.)*: dicha variable sólo mantenía su significación estadística cuando se limitaba a los tercios glandulares medio ( $p < 0,001$ ) y basal ( $p = 0,001$ ), pero no en el tercio superior ( $p = 0,909$ ). En los dos tercios inferiores, a mayor cantidad de apoptosis, mayor probabilidad de que la muestra correspondiese a un pólipo sin carcinoma y menor de corresponder a mucosa normal. Es decir, los pólipos sin carcinoma presentan mayor cantidad de apoptosis en los dos tercios inferiores glandulares que las muestras normales. En el tercio superior no existen diferencias significativas entre ambos tipos de muestras.

No se obtuvo diferencia significativa entre la mucosa normal y los pólipos sin cáncer focal en cuanto al sexo ( $p = 0,528$ ).



### 3.3. COMPARACIÓN ENTRE EL GRUPO DE MUESTRAS DE COLON NORMAL Y PÓLIPOS CON CÁNCER FOCAL

#### 3.3.1. SEGÚN EL RESULTADO POR CMF

##### 3.3.1.1. Contenido de ADN

No procede el estudio comparativo, pues todas las muestras de mucosa normal son diploides para el contenido de ADN.

##### 3.3.1.2. Porcentaje de células en fase S

◆ Comparación del % fase S entre mucosa normal (x%faseS:5,5500 con D.S. 2,000) y porción adenomatosa de pólipos con carcinoma focal (x%faseS:12,0885 con D.S. 8,5703):

-En el conjunto de pólipos con carcinoma:  $p < 0,001$

◆ Comparación del % fase S entre mucosa normal y porción tumoral de pólipos con carcinoma focal (x%faseS:14,4862 con D.S. 11,9245):

-En el conjunto de pólipos con carcinoma:  $p < 0,001$

Es decir, existen diferencias significativas entre el porcentaje de células en fase S al comparar las muestras de mucosa normal con los pólipos con carcinoma, tanto en su porción adenomatosa como en su porción tumoral.

#### 3.3.2. SEGÚN EL RESULTADO DE APOPTOSIS

##### 3.3.2.1. Distribución topográfica de la apoptosis

Comparando la distribución de la apoptosis en el conjunto de muestras de mucosa normal y los pólipos con cáncer focal según los tercios glandulares el resultado fue el siguiente:

- Tercio superior:  $p = 0,004$
- Tercio medio:  $p = 0,709$
- Tercio inferior:  $p < 0,001$

Así pues, existen diferencias significativas en cuanto a la distribución de apoptosis entre ambos tipos de grupos en los tercios glandulares superior (mayor positividad en grupo normal) e inferior (mayor positividad de tinción en el grupo de pólipos con cáncer focal).

##### 3.3.2.2. Índice de apoptosis (I.A.)

Mediante la prueba de Mann-Whitney se ha comparado el I.A. total y por zonas glandulares entre el grupo de mucosa normal y el grupo de pólipos con cáncer focal.

No se observa diferencia significativa entre el I.A. total del grupo de mucosa normal (x I.A.: 0,1708 con D.S. 0,3636) y el I.A. total del grupo de pólipos con cáncer focal (x I.A.: 0,2125 con D.S. 0,4290) con una  $p = 0,237$ .

Al analizar el I.A. por zonas entre ambos grupos sólo se observaron diferencias al comparar las zona superior y basal:

- Tercio superior: x I.A.: 0,4511 del grupo normal v.s. x I.A.: 0,2615 del grupo de pólipos con carcinoma focal ( $p = 0,001$ ).
- Tercio medio: x I.A.: 0,052 del grupo normal v.s. x I.A.: 0,1220 del grupo de pólipos con carcinoma focal ( $p = 0,093$ ).
- Tercio inferior: x I.A.: 0,0086 del grupo normal v.s. x I.A.: 0,2540 del grupo de pólipos con carcinoma focal ( $p < 0,001$ ).

También se ha comparado el IA total y por zonas entre el grupo normal y los subgrupos de pólipos con carcinoma intramucoso e invasor. Así, al comparar el grupo normal con el grupo de pólipos con carcinoma intramucoso, observamos que existe diferencia entre el I.A. total en el grupo de mucosa normal (x I.A: 0,1708 con D.S. 0,3636) y el I.A. total del grupo de pólipos con carcinoma intramucoso (x I.A: 0,0837 con D.S. 0,2433) con una  $p=0,042$ .

Al comparar las tres zonas glandulares se obtuvo:

- Tercio superior: x I.A: 0,4511 del grupo normal vs. x I.A: 0,0558 del grupo de pólipos con carcinoma intramucoso ( $p<0,001$ )
- Tercio medio: x I.A: 0,052 del grupo normal vs. x I.A: 0,0201 del grupo de pólipos con carcinoma intramucoso ( $p=0,411$  NS)
- Tercio inferior: x I.A: 0,0086 del grupo normal vs. x I.A: 0,1753 del grupo de pólipos con carcinoma intramucoso ( $p<0,001$ )

Los resultados obtenidos al comparar los grupos de mucosa normal y los pólipos con carcinoma invasor fueron los siguientes: se observa diferencia significativa entre los I.A. total en el grupo de mucosa normal (x I.A: 0,1708 con D.S. 0,3636) y el I.A. total del grupo de pólipos con carcinoma invasor (x I.A: 0,3336 con D.S. 0,522) con una  $p<0,001$ .

Los resultados por zonas glandulares fueron:

- Tercio superior: x I.A: 0,4511 del grupo normal vs. x I.A: 0,4550 del grupo de pólipos con carcinoma invasor ( $p=0,442$  NS)
- Tercio medio: x I.A: 0,052 del grupo normal vs. x I.A: 0,2178 del grupo de pólipos con carcinoma invasor ( $p=0,003$ )
- Tercio inferior: x I.A: 0,0086 del grupo normal vs. x I.A: 0,3281 del grupo de pólipos con carcinoma invasor ( $p<0,001$ )

### 3.3.3. ESTUDIO DE REGRESIÓN LOGÍSTICA

Una vez realizado el estudio comparativo, se realizó una regresión logística binaria con el fin de determinar cuáles de las variables que habían resultado estadísticamente significativas en el estudio univariante presentaban un valor predictivo independiente.

Se aplicó el programa informático SPSS, con la obtención de los siguientes resultados:

3.3.3.1. Considerando la **porción adenomatosa de los pólipos con carcinoma (sin diferenciar entre carcinoma intramucoso e invasor) y las muestras de mucosa normal**, y aplicando el estudio de regresión, mantienen significación estadística independiente las siguientes variables:

◆ **% fase S ( $p=0,003$ )** A mayor % de fase S, mayor probabilidad de que la muestra corresponda a la porción adenomatosa de un pólipo con carcinoma, y menor de que corresponda a mucosa normal. Es decir, la porción adenomatosa de los pólipos con carcinoma también presenta una mayor actividad proliferativa que la mucosa normal.

◆ *Distribución de apoptosis e índice de apoptosis*: la distribución de apoptosis entre los dos tipos de muestras, muestra diferencias estadísticamente significativas únicamente en los tercios superficial ( $p=0,005$ ) y basal ( $p=0,002$ ), pero no en el tercio medio ( $p=0,718$ ). Además el comportamiento en los dos tercios extremos sigue tendencias opuestas. Así, en el tercio superior, a mayor cantidad de apoptosis, mayor probabilidad de que la muestra corresponda a mucosa normal. En el tercio basal, por el contrario, a mayor apoptosis, mayor probabilidad de que la muestra corresponda a la porción adenomatosa de un pólipo con carcinoma. Es decir, la porción adenomatosa de los pólipos con carcinoma presenta una apoptosis proporcionalmente aumentada en el tercio basal y proporcionalmente reducida en superficie cuando se compara con mucosa normal.

◆ No se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a edad, sexo y localización.

3.3.3.2. Considerando la **porción tumoral de los pólipos con carcinoma y las muestras de mucosa normal**, se mantienen los resultados obtenidos para la porción adenomatosa de los mismos pólipos, es decir, conservan significación estadística independiente las siguientes variables:

◆ *% fase S* ( $p=0,009$ ) A mayor % de fase S, mayor probabilidad de que la muestra corresponda a la porción tumoral de un pólipo con carcinoma focal, y menor de que corresponda a mucosa normal. Es decir, la porción tumoral de los pólipos con carcinoma focal también presenta una mayor actividad proliferativa que la mucosa normal.

◆ *Distribución de apoptosis e índice de apoptosis*: la distribución de apoptosis entre los dos tipos de muestras al igual que lo descrito en el punto 3.2 muestra diferencias estadísticamente significativas únicamente en los tercios superficial ( $p=0,007$ ) y basal ( $p=0,007$ ), pero no en el tercio medio ( $p=0,933$ ). Además el comportamiento en los dos tercios extremos sigue tendencias opuestas. Así, en el tercio superior, a mayor cantidad de apoptosis, mayor probabilidad de que la muestra corresponda a mucosa normal. En el tercio basal, por el contrario, a mayor apoptosis, mayor probabilidad de que la muestra corresponda a la porción tumoral de un pólipo con carcinoma focal. Es decir, la porción tumoral de los pólipos con carcinoma presenta también una apoptosis proporcionalmente aumentada en el tercio basal y proporcionalmente reducida en superficie cuando se compara con mucosa normal.

### 3.4. COMPARACIÓN ENTRE EL GRUPO DE PÓLIPOS SIN CARCINOMA Y EL GRUPO DE PÓLIPOS CON CÁNCER FOCAL

#### 3.4.1. SEGÚN EL RESULTADO POR CMF

##### 3.4.1.1. Contenido de ADN

Mediante la prueba de Xi cuadrado se comparó la ploidía entre el grupo de pólipos sin cáncer focal (8 aneuploides) y el grupo de pólipos con cáncer focal (13 aneuploides), observando una diferencia significativa al comparar la presencia de aneuploidia entre los dos grupos ( $p < 0,001$ ).

##### 3.4.1.2. Porcentaje de células en fase S

♦ Comparación % fase S entre pólipos sin cáncer focal y porción adenomatosa de pólipos con carcinoma focal:

- En el conjunto de pólipos con carcinoma:  $p=0,348$
- En los pólipos con carcinoma intramucoso:  $p=0,113$
- En los pólipos con carcinoma invasor:  $p=0,857$

♦ Comparación % fase S entre pólipos sin cáncer focal y porción malignizada de pólipos con carcinoma focal:

- En el conjunto de pólipos con carcinoma:  $p=0,348$
- En los pólipos con carcinoma intramucoso:  $p=0,549$
- En los pólipos con carcinoma invasor:  $p=0,064$

#### 3.4.2. SEGÚN EL RESULTADO DE APOPTOSIS

##### 3.4.2.1. Distribución topográfica de la apoptosis

Comparando la distribución de la apoptosis entre los grupos de pólipos sin y con cáncer focal según los tercios glandulares, el resultado es el siguiente:

- Tercio superior:  $p < 0,001$
- Tercio medio:  $p < 0,001$
- Tercio inferior:  $p=0,423$

Por consiguiente, sólo existen diferencias significativas en cuanto a la distribución de apoptosis entre ambos tipos de muestras para los tercios superior y medio (mayor tinción en dichas zonas para los pólipos sin cáncer focal).

##### 3.4.2.2. Índice de apoptosis (I.A.)

Mediante la prueba de Mann-Whitney se han comparado el I.A. total y por zonas glandulares entre ambos grupos.

La comparación entre el I.A. total del grupo de pólipos sin cáncer focal ( $x$  I.A.:0,6607 con D.S. 0,8138) y del grupo de pólipos con cáncer focal ( $x$  I.A.:0,2125 con D.S. 0,4290) fue estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

Asimismo los resultados de la comparación por zonas glandulares entre ambos grupos fueron:

- Tercio superior:  $x$  I.A.:0,9993 (grupo de pólipos sin cáncer focal) vs.  $x$  I.A.:0,2615 (grupo de pólipos con cáncer focal).  $p < 0,001$ .
- Tercio medio:  $x$  I.A.:0,5810 (grupo de pólipos sin cáncer focal) vs.  $x$  I.A.:0,1220 (grupo de pólipos con cáncer focal).  $p < 0,001$ .
- Tercio inferior:  $x$  I.A.:0,0086 (grupo de pólipos sin cáncer focal) vs.  $x$  I.A.:0,2540 (grupo de pólipos con cáncer focal).  $p=0,298$  NS.

#### 3.4.3. ESTUDIO DE REGRESIÓN LOGÍSTICA

Una vez realizado el estudio comparativo, se realizó una regresión logística binaria con el fin de determinar cuáles de las variables que habían resultado estadísticamente significativas en el estudio univariante presentaban un valor predictivo independiente.

Se aplicó el programa informático SPSS, con la obtención de los siguientes resultados:

3.4.3.1. Al aplicar el estudio de regresión logística a los **pólipos sin carcinoma y las porciones adenomatosas de los pólipos con cáncer focal** son más las variables a analizar y también más las que mantienen una significación estadística de predicción independiente:

◆ *Distribución de apoptosis e índice de apoptosis*: la distribución de apoptosis muestra diferencias estadísticamente significativas únicamente en los tercios superficial ( $p=0,002$ ) y medio ( $p=0,01$ ), pero no en tercio basal ( $p=0,064$ ). En los dos tercios superficiales, cuanto mayor es la apoptosis, mayor la probabilidad de que la muestra corresponda a un pólipo sin carcinoma. Es decir, la porción adenomatosa de los pólipos con cáncer focal presenta menor apoptosis en superficie que los pólipos sin carcinoma.

◆ *Tamaño* ( $p=0,027$ ) A mayor tamaño ( $>2\text{cm}$ ), mayor probabilidad de que la muestra corresponda a la porción adenomatosa de un pólipo con carcinoma focal, y menor de que corresponda a un pólipo sin carcinoma. Es decir, a mayor tamaño del pólipo ( $>2\text{cm}$ ), mayor probabilidad de degeneración maligna.

◆ *Displasia* ( $p=0,036$ ) A mayor grado de displasia, mayor probabilidad de que la muestra corresponda a la porción adenomatosa de un pólipo con carcinoma. Es decir, cuanto más severa es la displasia mayor probabilidad de malignización.

◆ *Ploidia* ( $p=0,043$ ) A mayor aneuploidia, mayor probabilidad de que la muestra corresponda a la porción adenomatosa de un pólipo con carcinoma. Es decir, a mayor aneuploidia mayor probabilidad de malignización.

◆ A diferencia de apartados anteriores, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas en cuanto a % fase S, es decir, ambos grupos parecen presentar una actividad proliferativa similar ( $p=0,364$ ).

◆ Tampoco se observaron diferencias al contemplar las variables sexo, edad, localización, histología e implantación, careciendo por consiguiente de valor predictivo independiente.

3.4.3.2. Al aplicar el estudio de regresión logística entre **los pólipos sin carcinoma y la porción tumoral de los pólipos con cáncer focal**, los resultados obtenidos han sido superponibles a los del apartado anterior, con una excepción. Dado que en todas las muestras de porción tumoral de pólipos con carcinoma focal la displasia es severa, *no se ha introducido la variable displasia en el estudio de regresión logística*. En cuanto a las demás variables, mantienen su significación estadística independiente las siguientes:

◆ *Distribución de apoptosis e índice de apoptosis*: la distribución de apoptosis muestra diferencias estadísticamente significativas únicamente en los tercios superficial ( $p=0,004$ ) y medio ( $p=0,030$ ), pero no en tercio basal ( $p=0,142$ ). En los dos tercios superficiales, cuanto mayor es la apoptosis, mayor la probabilidad de que la muestra corresponda a un pólipo sin carcinoma. Es decir, la porción malignizada de los pólipos con carcinoma presenta menor apoptosis en superficie que los pólipos sin carcinoma.

◆ *Tamaño* ( $p=0,017$ ) A mayor tamaño ( $>2\text{cm}$ ), mayor probabilidad de que la muestra corresponda a la porción tumoral de un pólipo con carcinoma focal, y menor de que corresponda a un pólipo sin carcinoma. Es decir, a mayor tamaño del pólipo, mayor probabilidad de degeneración maligna.

◆ *Ploidia* ( $p=0,005$ ) A mayor aneuploidia, mayor probabilidad de que la muestra corresponda a la porción tumoral de un pólipo con carcinoma focal. Es decir, a mayor aneuploidia mayor probabilidad de malignización.

◆ Tampoco existen diferencias significativas en el porcentaje de células en fase S ( $p=0,256$ ) entre los dos grupos.

## DISCUSIÓN

La alta incidencia del CCR y la elevada tasa de mortalidad asociada al mismo en los países occidentales, y más concretamente en España, hacen imprescindible el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas y terapéuticas que permitan frenar el alto coste humano y económico de esta patología. En esta línea, parece lógico el diseño de nuevas estrategias de diagnóstico precoz, seleccionando la población más susceptible a padecer CCR, y, en concreto, aquella en la que las terapias disponibles podrían mostrar su máxima eficacia.

Cada vez parece más claro el papel que los procesos de proliferación, diferenciación y destrucción celular juegan en el desarrollo de las neoplasias. Por tanto, un mayor conocimiento de dichos procesos y de sus mecanismos de regulación parece básico para desarrollar futuras estrategias diagnósticas y terapéuticas.

Con dicha finalidad nos hemos planteado la realización de la presente tesis, por un lado para conocer el valor del estudio citométrico del contenido en ADN y fase S en los pólipos colónicos con cáncer focal, y por otro para saber el posible papel de la apoptosis en la secuencia adenoma-cáncer de colon.

A continuación, procederemos al desarrollo de la discusión analizando y comentando los resultados más significativos del estudio, así como las ventajas y limitaciones del mismo y finalmente mencionaremos las posibles perspectivas de futuro.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS DEL ESTUDIO

### A. EN CUANTO AL CONTENIDO DE ADN

- Todas las muestras de mucosa normal fueron diploides

- *Pólipos sin carcinoma*: de los 101 pólipos analizados, 93 (92,1%) fueron diploides en cuanto a su contenido de ADN frente a un total de 8 pólipos (7,9%), con un contenido aneuploide de ADN. Si analizamos el resultado en función del grado de displasia de los pólipos, de los 20 con displasia leve 19 (95%) fueron diploides y 1 (5%) aneuploide. En el grupo de los 39 pólipos con displasia moderada, 37 (94,9%) fueron diploides y sólo 2 (5,1%) aneuploides; finalmente, de los 42 pólipos con displasia severa, 37 (88,1%) eran diploides y 5 (11,9%) aneuploides. No existen diferencias significativas entre el grado de aneuploidia conforme aumenta el grado de displasia ( $p=0,457$ ). Tampoco se obtuvieron diferencias significativas al analizar la aneuploidía en función de otras variables como el tamaño ( $p=0,891$ ), la histología ( $p=0,695$ ) o la implantación ( $p=0,372$ ).

Estos resultados difieren de algunos reflejados en la literatura. Goh y Jass (35), en su estudio diseñado para el estudio de la secuencia adenoma-carcinoma colorectal mediante la utilización de la citometría de flujo obtienen diferencias significativas en cuanto al grado de aneuploidia al comparar muestras de adenomas con displasia leve (4% aneuploidias), moderada (18%) y severa (36%). Sin embargo, no aprecian diferencias significativas al comparar el grado de aneuploidia entre muestras de adenocarcinoma bien (62% aneuploidias), moderadamente (64%) y pobremente (63%) diferenciado. Goh utiliza para su estudio muestras parafinadas, y el tratamiento de las mismas es básicamente el utilizado por nosotros. Sí difiere el citómetro utilizado, pero en cualquier caso llama la atención el elevado porcentaje de aneuploidía obtenido por Goh en su estudio para cada una de las categorías, siendo superior prácticamente en todas ellas al obtenido por nosotros aún en los casos de mayor aneuploidia (un 43,8% de muestras aneuploides al analizar la porción adenomatosa de los pólipos con carcinoma intramucoso). Por otra parte, el trabajo de Goh no analiza otras variables como el tamaño, la histología o implantación.

También Giaretti, en un trabajo de 1988 (49) diseñado con el triple objetivo de 1) determinar la incidencia de aneuploidia en adenomas colorrectales, 2) la correlación de la ploidia con parámetros clínicos e histopatológicos de los adenomas y 3) comparar los índices de ADN de los adenomas y adenocarcinomas colorrectales, en este caso utilizando muestras frescas congeladas, obtuvo resultados discordantes con los de nuestro estudio. Así, al igual que Goh y Jass, apreció diferencias significativas entre los porcentajes de aneuploidia al analizar las muestras según el grado de displasia, obteniendo también porcentajes de aneuploidia superiores a los de nuestra serie. También encuentra correlación directa entre el grado de aneuploidia y el tamaño del pólipo, pero no con los distintos tipos histológicos. El propio Giaretti destaca el mayor porcentaje de aneuploidia que se detecta en los estudios con muestras frescas respecto a



los realizados con muestras parafinadas. Del estudio de Giaretti destacaremos también su referencia al subgrupo de pólipos con carcinoma focal, en el que detecta porcentajes de aneuploidia similares a los del grupo de adenocarcinomas.

Kimura, en un trabajo de 1993 (183) realizado sobre 47 muestras parafinadas de pólipos colorrectales remarca el hecho de que la incidencia de aneuploidia obtenida sobre muestras parafinadas es generalmente menor que la obtenida sobre muestras frescas. Ello podría deberse a que algunos casos de aneuploidia muy cercanos a la diploidia no se definirían correctamente en las muestras parafinadas debido a su bajo coeficiente de variación (CV). A pesar de ello, considera que la utilización de muestras parafinadas es posible con resultados fiables gracias a las mejoras introducidas por Hedley (126). El propio Kimura ya apunta la gran variabilidad en cuanto al grado de aneuploidía recogida en las diversas series publicadas, que oscilan en el caso de los adenomas entre un 2 y un 35%. Recordemos que en nuestra serie el promedio fue del 7,9% de muestras aneuploides en el conjunto de los pólipos sin carcinoma.

- *Pólipos con carcinoma-porción adenomatosa*: al considerar en conjunto la porción adenomatosa de todos los pólipos con carcinoma en los que pudo determinarse el contenido de ADN (31 casos), 21 (67,7%) de las muestras eran diploides, frente a 10 casos (32,3%) con un contenido aneuploide de ADN. De esos 10 casos, 3 (9,7% del total) presentaban un contenido de ADN multiploide.

De los 31 casos, 29 de ellos correspondían a muestras con grado de displasia severa, de los que 21 (72,4%) eran diploides y 8 (27,6%) aneuploides. De las dos muestras restantes, una presentaba displasia leve y la otra displasia moderada. Curiosamente, ambas muestras poseían un contenido aneuploide de ADN, pero ello no permite extraer ningún tipo de conclusión.

Si consideramos únicamente la porción adenomatosa de los pólipos con *carcinoma intramucoso* (16 casos), los resultados son los siguientes: 9 muestras (56,3%) contenían una cantidad diploide de ADN, frente a 7 (43,8%) que eran aneuploides, 3 de ellas (18,8% del total) multiploides. Catorce de las 16 muestras presentaban displasia severa.

En cuanto a las 15 muestras correspondientes a la porción adenomatosa de los pólipos con *carcinoma invasor*, 12 (80%) eran diploides y 3 (20%) aneuploides en cuanto a su contenido de ADN. Todas las muestras presentaban displasia severa.

Son muy escasos en la literatura los trabajos que estudian los contenidos de ADN en pólipos con carcinoma intramucoso o invasor analizando por separado las porciones con y sin invasión tumoral, y de ellos ninguno con técnicas similares a las de nuestro estudio. Por ello, y por la dificultad de lograr series extensas de pólipos con estas características consideramos que no pueden compararse nuestros resultados con los de estudios previos. Sería necesaria la realización de un estudio dirigido centrándose únicamente en este aspecto y con un número suficientemente amplio de muestras para poder extraer conclusiones definitivas.

Podemos citar el estudio de Nakamura (185), que procesó por separado porciones adenomatosas y tumorales de las muestras obtenidas, analizando posteriormente el contenido de ADN de las mismas. Sin embargo, a diferencia de nosotros, utilizó 114 muestras procedentes de resecciones intestinales por neoplasia,

procesadas en fresco y aplicando una técnica desarrollada por él para separar células con y sin degeneración tumoral. En las células tumorales aisladas detectó un grado de aneuploidía del 70%, y hasta en un 34% de los casos se detectaban múltiples grados de ploidia en la muestra procedente de un único paciente tras analizar por separado sus fracciones. Dadas las claras diferencias en cuanto a objetivos, muestras y métodos entre nuestros estudios, no puede establecerse una comparación con garantías.

- *Pólipos con carcinoma/porción tumoral*: sólo en 30 casos pudo valorarse el histograma obtenido. De ellos, 17 (56,7%) eran diploides y 13 (43,3%) aneuploides. En un caso (3,3% del total) se detectó multiploidia.

Considerando la porción tumoral de los 16 pólipos con *carcinoma intramucoso* analizados, 10 de los casos (62,5%) presentaban un contenido de ADN diploide y 6 (37,5%) aneuploide. De ellos, uno (6,3% del total) era multiploide. Todas las muestras menos 2 presentaban displasia severa.

De los 14 casos correspondientes a porción tumoral de pólipos con *carcinoma invasor*, la distribución ploidia / multiploidia fue similar, con 7 casos (50%) en cada grupo.

**El porcentaje de aneuploidia aumenta progresivamente desde las muestras de mucosa normal (0%) pasando por los pólipos sin carcinoma (7,90%) hasta llegar a los pólipos con cáncer focal, tanto en su porción adenomatosa (32,30%) como en la porción tumoral (43,30%).**

De los pólipos con displasia severa, aquellos que desarrollan cáncer focal tienen menor porcentaje de diploidía (67,7%) que aquellos que no malignizan (88,1%). Este dato podría ser útil para distinguir cuáles de los pólipos extirpados por endoscopia tienen mayor potencial de malignización. Citaremos el estudio retrospectivo realizado por Frei (184) sobre 83 muestras parafinadas de biopsias de pólipos colorrectales. Aplicando la técnica de Hedley, comprobó los porcentajes de ploidia de las muestras y los correlacionó con el grado de malignidad de las lesiones, así como con la actitud terapéutica correcta en cada caso. Para evaluar el valor predictivo del contenido de ADN de los pólipos extraídos mediante polipectomía sobre su futura malignización correlacionaba las muestras obtenidas mediante polipectomía con lesiones tumorales intervenidas que se desarrollaban posteriormente en la zona de la exéresis. Llegó a la conclusión de que la determinación del contenido de DNA asociado a los parámetros histopatológicos tradicionales y criterios clínicos y radiológicos puede mejorar el manejo terapéutico de los pacientes, al indicar con mayor exactitud cuáles de los pólipos evolucionarán en el futuro hacia lesiones claramente malignas.

Al comparar la porción adenomatosa y la tumoral de las muestras y correlacionar el grado de displasia y el contenido de ADN llama la atención que entre los 28 casos analizados con displasia severa (los otros dos casos corresponden a uno con displasia leve y otro con moderada) se detectó un mayor grado de aneuploidia en la porción adenomatosa (16 muestras diploides -57,1%- y 12 -42,9%-aneuploides, frente a las 21-72,4%- y 8-27,6%- respectivamente). Por otro lado, la porción tumoral de la muestra con displasia leve presentó un contenido diploide de ADN, a diferencia de su porción adenomatosa correspondiente. Una posible interpretación es que en estos casos, la detección de un contenido aneuploide de ADN en cualquiera de las porciones del pólipo, es sugestiva de malignidad presente o potencial. Frei (184), en su estudio, ya sugiere que el valor predictivo del contenido de ADN de la biopsia es superior a los

estudios histológicos convencionales, pues contenidos aneuploides de ADN se correlacionan claramente en su serie con desarrollo posterior de lesiones malignas.

En los pólipos con displasia severa los resultados de ploidia no presentan diferencias significativas entre pólipos sin carcinoma (diploidia 88,1%) versus la porción adenomatosa de los pólipos con carcinoma (diploidia 72,4%), pero sí con la porción tumoral de los pólipos con cáncer focal (diploidia 57,1%) con una  $p=0,005$ . No se compararon los pólipos con cáncer focal con displasia leve o moderada por el bajo número de casos.

Como mencionamos previamente, los resultados de ploidia para la porción adenomatosa y tumoral de los pólipos con cáncer focal (tanto intramucoso como invasor) con displasia severa son equiparables, pues aunque se aprecian pequeñas diferencias éstas no son estadísticamente significativas.

## B. EN CUANTO AL ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN-PORCENTAJE DE CÉLULAS EN FASE S

- *Mucosa normal*: al analizar las muestras de mucosa normal, el porcentaje medio de células en fase S fue de 5,5. Sólo se encuentran diferencias significativas al comparar el porcentaje de células en fase S según la localización de la muestra. Así, existe un menor índice de proliferación (menor porcentaje de células en fase S) en recto-sigma (4,15  $p < 0,001$ ).

- *Pólipos sin cáncer focal*: el total de pólipos sin cáncer focal en los que se determinó el tanto por ciento de células en fase S fue de 97, obteniéndose un promedio de 8,73. No se detectaron diferencias significativas en cuanto al índice de proliferación dentro de estas muestras al analizarlo en función de las distintas variables clínicas y anatomopatológicas.

- *Pólipos con cáncer focal*: al considerar la *porción adenomatosa* del conjunto de pólipos con cáncer focal, sólo pudo determinarse el porcentaje de células en fase S en 26 muestras (13 con carcinoma intramucoso, y 13 con carcinoma invasor) por dificultades en la interpretación del histograma, obteniendo un valor de 12,09. En los casos con carcinoma intramucoso, se obtuvo un valor de 13,90, siendo de 10,27 en los pólipos con carcinoma invasor.

En cuanto a la *porción tumoral*, fueron 29 las muestras valorables, obteniéndose un porcentaje de células en fase S de 14,48. De las 29 muestras, 14 correspondían a pólipos con carcinoma intramucoso, con un valor global de 13,69. Las 15 restantes correspondían a pólipos con carcinoma invasor, obteniéndose en este subgrupo un porcentaje de 15,23.

Al comparar entre sí la porción adenomatosa y la porción tumoral en los pólipos con cáncer focal, se obtienen diferencias significativas en el caso de los pólipos con carcinoma invasor ( $p=0,039$ ), pero no en los pólipos con carcinoma intramucoso, o al considerar los pólipos con cáncer focal en conjunto. Es decir, existe un mayor porcentaje de células en fase S en la porción tumoral de los pólipos con carcinoma invasor.

Al comparar los distintos grupos entre sí, se extraen las siguientes conclusiones:

- existe un **mayor porcentaje de células en fase S en los pólipos sin carcinoma (8,72) que en las muestras de mucosa normal (5,5  $p < 0,001$ )**.

- también es **mayor el índice de proliferación (porcentaje de células en fase S) en los pólipos con carcinoma que en la mucosa normal**, tanto en su porción adenomatosa (12,09  $p < 0,01$ ) como tumoral (14,49  $p < 0,01$ ) y tanto en el caso de los pólipos con carcinoma intramucoso (13,69  $p < 0,01$ ) como sobre todo invasor (15,23  $p < 0,01$ ).

- es decir, **el índice de proliferación (porcentaje de células en fase S) aumenta progresivamente y de forma estadísticamente significativa a lo largo de la secuencia mucosa normal- adenoma- cáncer**.

**-el porcentaje de células en fase S es significativamente mayor en los pólipos con carcinoma invasor que en aquellos con carcinoma intramucoso ( $p < 0,001$ ).**

En líneas generales, y a pesar de las diferencias entre nuestros resultados y los de algunos estudios previos en cuanto a los porcentajes de diploidia, menores de lo esperado en nuestra serie, nuestro estudio sí confirma lo ya apuntado en los estudios de Goh(35), Giaretti(49), Frei(184) o Kimura(183), es decir la determinación del contenido de ADN y el porcentaje de células en fase S puede constituir un arma importante a la hora de determinar el riesgo potencial de malignización de un pólipo colo-rectal extirpado.

### C. DISTRIBUCIÓN DE APOPTOSIS

- *Mucosa normal*: en este grupo, la detección de apoptosis es mayor en el tercio glandular superior. Ello se cumple independientemente del sexo, edad o localización, aunque debe remarcarse que en el caso de las muestras correspondientes a recto-sigma el número de células apoptóticas en tercio superior es significativamente mayor ( $p=0,009$ ) que en el resto.

Nuestros resultados coinciden con los de trabajos clásicos como el de Sträter (63). Él divide las glándulas en cinco compartimentos, pero a la hora de analizar los resultados los agrupa en región basal (con detección de apoptosis casi nula), media (también con apoptosis casi inexistente) y luminal, en la que la detección de apoptosis es mucho mayor. Apunta a que la detección de apoptosis en la región luminal, aun siendo siempre muy superior a la de otras regiones glandulares, presenta una gran variabilidad entre las muestras. En su estudio Sträter no especifica el segmento intestinal del que proceden las biopsias, pero esa variabilidad podría deberse a la región de procedencia de las muestras.

También Moss (61) en su trabajo de 1996 orientado al estudio de la secuencia mucosa normal-adenoma-carcinoma obtiene resultados similares, aunque tampoco diferencia entre los distintos segmentos colónicos. En su estudio, Moss detecta apoptosis en un 3% de las células en las muestras de mucosa normal, situándose el 87% de las células apoptóticas detectadas en el tercio superior glandular y la superficie luminal.

- *Pólipos sin cáncer focal*: en conjunto, el número de células apoptóticas detectadas es superior al de las muestras de mucosa normal. En el tercio superior, aunque predomina la positividad de apoptosis sobre la negatividad, la proporción es menor que en las muestras de mucosa normal. Lo contrario ocurre en el tercio medio, donde, al contrario que en la mucosa normal, las células positivas para apoptosis son claramente superiores a las negativas. En el tercio basal la distribución positividad/negatividad para apoptosis es menos llamativa que en los dos tercios superiores, pero cercana al 50% y en cualquier caso muy superior a la detectada en muestras normales. Esta tendencia parece cumplirse independientemente de las variables analizadas, incluida la localización recto-sigma.

En el estudio de Moss (61) se analizan por separado los patrones de apoptosis que presentan los pólipos no malignizados según sean hiperplásicos (6 muestras) o adenomatosos (16 muestras, 7 de ellas con displasia severa). En el caso de los pólipos hiperplásicos el patrón de apoptosis descrito no difiere del de las muestras de mucosa normal, tanto en porcentaje de células apoptóticas como en su distribución. Por el contrario, en el caso de los pólipos adenomatosos describe un aumento de la apoptosis y una inversión de la misma, que es mayor en la base del adenoma y menor en superficie. La menor apoptosis en el tercio superior glandular podría explicar la mayor elongación que se describe histológicamente en las glándulas de la mucosa de los pólipos adenomatosos. Moss intenta explicar este fenómeno mediante dos posibles teorías: como primera opción, el aumento de la apoptosis podría deberse a un intento de frenar la proliferación anómala. Otra posible explicación radicaría en una inversión del sentido de crecimiento celular, es decir, existiría una proliferación celular anormalmente aumentada en la superficie del pólipo y una migración posterior de las células hacia la base de la cripta. Esta segunda explicación se corresponde con la demostrada en su

estudio por Lightdale y Lipkin (81), que también apuntan a que esta migración anómala se produciría en fases precoces del desarrollo de la neoplasia colo-rectal.

- *Pólipos con cáncer focal*: al considerar la *porción adenomatosa* del conjunto de pólipos con cáncer focal (33 muestras), la distribución de apoptosis cambia significativamente. De las 33 muestras, 20 (60,6%) mostraron tinción positiva para apoptosis. Además, en los dos tercios superiores el número de células que muestran apoptosis es muy bajo (24,2% en tercio superior y 9,1% en tercio medio). En el tercio inferior, sin embargo, se mantiene un equilibrio entre células apoptóticas (42,4%) y no apoptóticas (57,6%). Aunque esto se mantiene en líneas generales, el bajo número de muestras de cada subgrupo dificulta la interpretación según sea el tumor intramucoso o invasor y las distintas variables clínicas y anatomopatológicas.

En cuanto a la *porción tumoral*, de las 33 muestras sólo 14 (42,4%) resultaron con tinción positiva para apoptosis, con una distribución por tercios glandulares similar a la descrita para la porción adenomatosa de los mismos pólipos. También en este caso el bajo número de muestras dificulta la interpretación de resultados.

Aunque el trabajo realizado por Sträter (63) se centra en el estudio de pólipos malignizados en el contexto de una poliposis familiar, la distribución de apoptosis que describe en estos casos es similar a la de nuestro estudio, es decir, en los pólipos con carcinoma describe una mayor actividad tanto proliferativa como apoptótica, y con una distribución de apoptosis claramente diferente a la descrita en las muestras de mucosa normal, siendo netamente superior en el tercio basal glandular.

En su estudio, Moss (61) analizó también la distribución de apoptosis en 33 muestras de carcinoma colorrectal. Aunque estas muestras no son superponibles a las analizadas en nuestro estudio (en nuestro caso nos centramos en pólipos con sólo una porción neoplásica), los resultados descritos por Moss en las muestras de carcinoma son superponibles a los de nuestro estudio tanto para la porción adenomatosa como la tumoral de los pólipos con cáncer focal; es decir, describe una disminución global de la apoptosis y una distribución randomizada a lo largo de la lesión. Describe además zonas con apoptosis anormalmente elevada o disminuida en los tejidos adyacentes a la porción tumoral.

## D. INDICE DE APOPTOSIS

- *Mucosa normal*: la media del IA en este grupo fue de 0,17, con unos resultados al estudiar los tercios glandulares de 0,45 en tercio superior, 0,05 en tercio medio y 0,008 en tercio inferior. La mayor área de apoptosis se observa en el tercio superior de la localización recto-sigma (IA:0,79), la única en la que el mayor IA del tercio superior es estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ).

- *Pólipos sin cáncer focal*: la media del IA en este grupo fue de 0,66, con unos valores de 0,99 ; 0,58 y 0,40 para los tercios glandulares superior , medio e inferior respectivamente. Aunque aparentemente el IA tiende a igualarse entre los tres tercios glandulares, al aplicar la prueba de Kruskal-Wallis en el análisis de los resultados existen diferencias significativas no sólo en conjunto ( $p < 0,001$ ) sino al comparar los tercios glandulares dos a dos. Así, el IA aumenta de forma significativa desde el tercio basal al medio y al superior. Existen diferencias significativas al comparar los pólipos con aneuploidia, que presentaban un menor IA (0,42) con los pólipos diploides, con un IA superior (1,05  $p = 0,05$ ). No se observaron diferencias significativas al analizar los resultados en función de las variables clínicas y anatomopatológicas.

- *Pólipos con cáncer focal*: considerando conjuntamente las porciones adenomatosa y tumoral el IA medio en este grupo fue de 0,21, con valores para los tercios superior , medio e inferior de 0,26 ; 0,12 y 0,25 respectivamente. El valor medio del IA varía de forma estadísticamente significativa en función de la edad y el tipo histológico, siendo mayor (0,32) en los pacientes menores de 65 años que en los pacientes más ancianos (0,17  $p = 0,02$ ); de forma similar , el IA es significativamente mayor en las muestras con histología túbulo-vellosa (0,28) que en los pólipos con histología vellosa (0,12  $p = 0,01$ ).

En cuanto a la distribución del IA en los distintos tercios glandulares, es significativamente menor en el tercio medio (0,12) que en el tercio basal (0,25  $p = 0,04$ ). La diferencia no resulta significativa con el tercio superior, quizá por el número bajo de muestras.

En el subgrupo de los pólipos con *carcinoma intramucoso* (en cuanto al tipo histológico) y en el de *carcinoma invasor* (en cuanto a histología-pero en este caso es significativamente mayor el IA en los pólipos túbulovellosos que en los adenomatosos- edad del paciente y tamaño del pólipo) también se aprecian diferencias.

Los resultados se modifican al analizar únicamente la *porción adenomatosa*. La media de IA fue de 0,20 con valores de 0,25 (tercio superior), 0,09 (tercio medio) y 0,25 (tercio inferior) en los distintos segmentos glandulares. Aunque parece existir una tendencia a menor IA en el tercio medio, la diferencia no resulta estadísticamente significativa, ni siquiera al analizar los resultados en función de las variables clínicas y anatomopatológicas.

En cuanto a la *porción tumoral* (independientemente del tipo de tumor) el valor medio de IA fue de 0,23, con valores de 0,27 ; 0,16 y 0,26 para los tercios superior, medio e inferior respectivamente. Tampoco en este subgrupo se aprecian diferencias significativas.



Finalmente, **no se obtienen diferencias estadísticamente significativas al comparar entre sí el IA de las porciones adenomatosa y tumoral de los pólipos con cáncer focal**. Ello podría justificar el hecho de que las diferencias detectadas en este tipo de muestras para los distintos tercios glandulares y las variables clínicas y anatomopatológicas analizadas no tomen fuerza estadística al analizar cada sección histológica por separado, pero sí al considerar el pólipo como un todo, con un mayor número de eventos estudiados.

Al comparar nuestros resultados con otros reflejados en la literatura, citaremos en primer lugar el estudio de Arai (186), que junto a Kino estudia mediante microscopía electrónica los patrones de mitosis y apoptosis en un total de 35 muestras, 27 de ellas adenomas tubulares y los 8 restantes adenomas vellosos. Las muestras y métodos utilizados no se corresponden a los de nuestro estudio, pero las conclusiones que apuntan los autores son las siguientes: en primer lugar, demuestran una relación directa entre el índice de apoptosis y el número de mitosis viables. En segundo lugar, concluyen que conforme disminuye el índice de apoptosis aumenta en riesgo de malignidad. En el caso de los adenomas tubulares demuestran un incremento progresivo del índice de apoptosis conforme aumenta el grado de atipia, desde un I.A. de 3,5% en las muestras con atipia leve hasta un I.A. de 8,8% en las muestras con atipia severa y pasando por un I.A. del 5,7% en las muestras con atipia moderada. Esta tendencia es paralela a los índices de mitosis descritos (0,41% en atipia leve, 0,58% en moderada y 0,83% en severa). Sin embargo esta tendencia se rompe en el caso de los adenomas vellosos, con mayor riesgo de malignidad. En este caso, el I.A. desciende de forma marcada, hasta un 1,8% (con un índice de mitosis del 0,38%). Tomaremos estos datos como orientativos, pues el estudio de Arai no coincide con el nuestro ni en método aplicado ni en variables analizadas. Reflejamos sin embargo sus resultados, pues son pocos los estudios publicados que analicen con detenimiento el índice de apoptosis en relación con las variables de nuestro estudio.

## VENTAJAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

En cuanto a la población de estudio elegida, se excluyeron todos aquellos pacientes con antecedentes de neoplasia, así como los pacientes con EII. En ambos casos resultaría difícil interpretar los resultados obtenidos, en el caso de la EII por tratarse de un proceso que “per se” puede conllevar patrones de ploidia y apoptosis que difieren de la normalidad (86,87,88,89). Los pacientes con neoplasias previas se excluyeron asimismo del trabajo, pues interesaba el estudio de la secuencia adenoma-cáncer partiendo de la benignidad histológica e incrementando progresivamente el grado de malignidad. Se consideró que existirían dificultades al interpretar un determinado patrón de ploidía o apoptosis en un paciente afecto en la actualidad de un adenoma histológicamente “benigno”, pero con claros antecedentes de proceso neoplásico. Caso de detectarse patrones alejados de la normalidad, sería difícil decidir atribuirlos a la potencial malignidad futura de la lesión o a los antecedentes del paciente. Para evitar errores en este sentido se decidió eliminar del estudio a los pacientes con cualquier tipo de neoplasia previa, afectase o no al tubo digestivo.

Para planificar nuestro estudio, partimos de trabajos clásicos como los de Frei (184), Moss (61), Sträter (63), Goh (35) o Giaretti (49). Todos ellos habían apuntado datos esclarecedores sobre la secuencia mucosa normal-adenoma-cáncer colorectal. Sin embargo, cada uno de los estudios se centraba en analizar puntos concretos, unos el papel jugado por la proliferación celular, otros el papel determinante de la apoptosis. El tipo de muestras a analizar y los métodos aplicados difieren también entre estos estudios clásicos. Decidimos reproducir los aspectos que consideramos más interesantes de cada uno de ellos, en un intento de analizar conjuntamente el papel que la proliferación celular y la destrucción celular mediante apoptosis juegan en el proceso de desarrollo de la neoplasia colónica.

A la hora de seleccionar los métodos diagnósticos para realizar nuestro trabajo, se consideraron tanto sus posibles aplicaciones como la reproducibilidad en nuestro medio.

Las técnicas de laboratorio modernas han demostrado su utilidad en el ámbito oncológico en varias facetas, entre las que destacaremos dos. Por una parte, en la detección de sujetos con mayor predisposición a padecer CCR; por otra, en la contribución al desarrollo de nuevas terapias, tanto en el *ensayo de nuevos fármacos*-al disponer de medios que permiten testar su eficacia en períodos cortos de tiempo, acelerando el ritmo de los estudios habituales- como en el *diseño de fármacos* dirigidos específicamente contra la génesis tumoral, mediante las técnicas de terapia génica.

De las técnicas disponibles, nosotros seleccionamos dos para nuestro estudio, la CMF (para valorar el contenido de ADN y la actividad proliferativa celular) y la detección de apoptosis mediante técnica TUNEL, por su *reproducibilidad* sin necesidad de medios técnicos sofisticados, su *fiabilidad*, y la *posibilidad de aplicación sobre muestras parafinadas*.

Se seleccionó la técnica de determinación de apoptosis tras tinción TUNEL por los siguientes motivos:

- puede aplicarse sobre muestras parafinadas, como se demostró con éxito en el estudio clásico de Sträter (63). En la práctica clínica es poco frecuente poder trabajar con muestras en fresco, en tiempo real.
- para la mayoría de autores, entre ellos el citado Sträter (63), era la técnica de detección de apoptosis que había demostrado una mayor sensibilidad en el momento de comienzo de nuestro estudio.
- puede llevarse a cabo con medios técnicos poco sofisticados siguiendo la técnica descrita por Gavrieli (76), y gracias a los kits comerciales disponibles.
- desde 1992, también gracias a las modificaciones de Gavrieli (76), es posible la realización de la técnica “in situ”, lo que permite el estudio sin destruir la morfología glandular.

Asimismo, se eligió la lectura mediante CMF por su utilidad para detectar aneuploidias aun cuando éstas se dan en un número muy bajo de células. Además, con los métodos descritos por Hedley (181) y Schutte (182) puede aplicarse sobre muestras parafinadas.

Para realizar la lectura de apoptosis, como ya comentamos, se dividieron las glándulas en tres tercios o segmentos. En el estudio de Sträter (63) se dividían las glándulas en cinco segmentos diferentes, o compartimentos. A efectos prácticos nosotros consideramos esta división artificial. El pequeño tamaño de algunas de las glándulas hubiese dificultado enormemente esta división, que por otra parte no aporta un mayor interés desde el punto de vista fisiopatológico. Así, nosotros dividimos las glándulas en tres segmentos, que se corresponden fisiológicamente con los tres procesos celulares predominantes: proliferación, diferenciación y destrucción celular.

En el terreno práctico, surgieron una serie de dificultades durante la realización del estudio, que detallaremos a continuación. Consideramos que finalmente no modificaron los resultados obtenidos.

Tras una selección inicial de casos, el principal problema a la hora de procesar las muestras fue el pequeño tamaño de algunas de las mismas. Este problema podría solucionarse mediante la utilización de pinzas de biopsia de mayor tamaño.

Otro problema que se planteó, que obligó a desechar diversas muestras para la lectura de la tinción de TUNEL para detectar apoptosis, fue una incorrecta orientación de las glándulas, que impedía la división artificial de las mismas en tercios glandulares, imposibilitando así el conteo celular. Este problema podría evitarse mimando la colocación de las muestras en el momento de la inclusión en parafina, pero resulta dificultoso para biopsias de muy pequeño tamaño.

Algo similar ocurría al procesar las muestras correspondientes a pólipos con carcinoma. La necesidad de separar las porciones adenomatosa y tumoral de los pólipos con carcinoma focal para el estudio citométrico obliga a contar con personal entrenado.

Según los resultados obtenidos en nuestro estudio, este problema se obvia al demostrar que las características citométricas de ambas porciones no presentan entre sí diferencias significativas en cuanto al contenido de ADN ( $p=0,434$ ), es decir, en la práctica clínica bastaría con realizar un estudio de contenido de ADN en la totalidad del pólipo extraído mediante polipectomía endoscópica. No obstante, sí existen diferencias significativas en cuanto al porcentaje de células en fase S al comparar las porciones adenomatosa y tumoral de los pólipos con carcinoma invasor ( $p=0,039$ ). En este caso para obtener resultados fiables deberían analizarse por separado ambas fracciones, lo que no ocurre al analizar el porcentaje de células en fase S de los pólipos con cáncer focal en su totalidad ( $p=0,367$ ) o de los pólipos con carcinoma intramucoso.

Una vez procesadas las muestras y obtenidos los resultados, que procederemos a discutir a continuación, se apreciaron algunas cifras levemente discordantes con las obtenidas en la literatura, y que comentaremos aquí por la relevancia que algunos detalles técnicos pueden jugar para justificarlas.

Como posibles causas que justifican la detección de **índices de apoptosis** diferentes a los esperados partiendo de los resultados de otros estudios, podemos apuntar los siguientes:

- las muestras utilizadas como controles, obtenidas mediante pinza de biopsia endoscópica, contaban con un número de células notablemente inferior a las muestras correspondientes a pólipos, especialmente en el caso de los pólipos de mayor tamaño. Aunque se aseguró la presencia de un número mínimo de células (10.000) para poder realizar con fiabilidad el estudio citométrico, se disponía de menos campos a la hora de seleccionar el más idóneo o representativo para la determinación de apoptosis. Ello podría justificar en parte el bajo número de células apoptóticas detectadas en las muestras de mucosa normal.

- En el caso de las muestras correspondientes a pólipos con displasia severa o las porciones con carcinoma, se añadió un problema de lectura. La desestructuración de las glándulas y su gran tamaño en algunos casos dificultaron la división por tercios glandulares y en consecuencia la técnica de lectura óptica. Cabe señalar además la existencia de una notable diferencia en cuanto a la riqueza celular al comparar glándulas de las muestras de mucosa no patológica, con una celularidad normal, y las muestras mencionadas, con un número de eventos celulares muy superior. Así, debieron analizarse un mayor número de glándulas en el caso de las muestras de mucosa normal o determinados pólipos para analizar un número de eventos celulares similar.

En cuanto a la variabilidad de los resultados obtenidos en distintos estudios, Martínez y colaboradores (38) apuntan dos hechos interesantes. En su trabajo, el tamaño de las muestras se determinaba por dos procedimientos, la medida directa durante la endoscopia y una segunda medida realizada por el patólogo tras la extracción. Obtuvieron diferencias significativas ( $p<0,001$ ) al comparar ambas, siendo mayor la determinada por el endoscopista. En nuestro estudio, algunos de los pólipos se midieron directamente durante la endoscopia, en otras ocasiones, tras su extracción. Quizá este hecho haya sido decisivo en algunos casos para incluir las muestras en uno u otro grupo en cuanto al tamaño.

En el estudio de Martínez, los pólipos extirpados fueron analizados por dos patólogos independientemente. Curiosamente, sólo en un 65% de los casos coincidieron a la hora de clasificarlos como tubulovelloso o vellosos. Quizá este hecho se debió a la dificultad de examinar regiones similares del pólipo, pero también pudo deberse al hecho de que uno de los patólogos examinaba la muestra “en fresco”, mientras el otro trabajaba sobre muestras parafinadas. Aunque el objetivo del trabajo de Martínez difiere claramente del de nuestro estudio, estos datos podrían justificar algunos de nuestros resultados poco concordantes con los de otras publicaciones.

## PERSPECTIVAS DE FUTURO

Para finalizar esta discusión y de cara a futuros estudios y aplicaciones vamos a mencionar que:

1. A pesar de las diferencias porcentuales, nuestros resultados confirman los de los grandes estudios previos sobre el tema, demostrando los distintos patrones que el contenido de ADN, el porcentaje de células en fase S o los estudios de apoptosis presentan en función de que la muestra examinada corresponda a mucosa colónica normal, y pólipo con o sin cáncer focal.
2. Sería conveniente la creación de escalas que permitieran integrar dichos patrones y su valor predictivo en la práctica clínica, como apunta el estudio retrospectivo de Frei (184) . Con tal fin, es necesario realizar estudios prospectivos con un número suficiente de pacientes y con seguimiento a largo plazo, integrando alguno o la totalidad de los patrones ya descritos (en cuanto a contenido de ADN, porcentaje de células en fase S o distribución e índice de apoptosis), con otros factores clásicos como el tipo histológico, el grado de displasia o el tamaño del pólipo.
- 3 .Las técnicas descritas en nuestro estudio son reproducibles en centros hospitalarios de nivel medio, pudiendo constituir una herramienta adicional para el clínico en casos dudosos o de difícil valoración.

## CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio permiten obtener las siguientes conclusiones:

1. En la mucosa normal el menor índice de proliferación celular (menor porcentaje de células en fase S) corresponde a la localización anatómica de recto-sigma.
2. El mayor porcentaje de aneuploidia lo presenta el grupo de pólipos con cáncer focal. Los pólipos con o sin cáncer focal presentan mayor porcentaje de células en fase S que las muestras normales, siendo este porcentaje máximo en los pólipos con cáncer focal tanto intramucoso como invasor.
3. En el grupo de pólipos con cáncer focal, intramucoso o invasor, el mayor porcentaje de células en fase S corresponde a la porción tumoral de los pólipos con cáncer focal invasor.
4. El mayor porcentaje de células en fase S junto con la aneuploidia constituyen un indicador precoz, con valor predictivo independiente, de transformación maligna de los pólipos colorrectales.
5. En la mucosa colónica normal la mayor distribución de la apoptosis al igual que el mayor índice de apoptosis se correlaciona con el tercio superior glandular de la localización anatómica recto-sigma.
6. Los pólipos sin cáncer focal con diploidia son los que presentan mayor distribución cualitativa e índice de apoptosis. Éste es mayor en la zona superior glandular y disminuye de forma progresiva hasta un mínimo en la zona inferior.
7. Los pólipos con cáncer focal, intramucoso o invasor, presentan un índice de apoptosis mayor en la zona inferior glandular, convirtiéndose en una variable con valor predictivo independiente de transformación maligna.
8. En el grupo de pólipos con cáncer focal el mayor índice de apoptosis en la zona inferior se correlaciona con la variable histológica túbulo-velloso para el intramucoso e invasor y las variables edad < 65 años y tamaño < 1cm. para el invasor.
9. Las variables tamaño > 2 cm., displasia severa, aneuploidia y mayor índice de apoptosis en la zona inferior glandular, todas ellas con valor predictivo independiente, permiten diferenciar entre los pólipos con y sin cáncer focal.
10. La inhibición de la apoptosis favorece el crecimiento de los pólipos colorrectales así como su transformación maligna.

## RESUMEN

### INTRODUCCIÓN

Los tumores malignos son la primera causa de muerte en los países desarrollados. El cáncer colorrectal (CCR) es la neoplasia más frecuente del tubo digestivo. Se diagnostican 20.000 nuevos casos de CCR en España cada año, y afecta a uno de cada 10.000 españoles. Muestra una incidencia creciente, y supone el 15% de los nuevos diagnósticos de cáncer. Los esfuerzos investigadores se centran en la prevención y la búsqueda de nuevas posibilidades terapéuticas.

Parece evidente el papel que los procesos de proliferación, diferenciación y destrucción celular juegan en el desarrollo de las neoplasias y en el diseño de futuras estrategias diagnósticas y terapéuticas.

Pocos artículos en la literatura han demostrado su interés por el estudio de la proliferación celular y la muerte celular programada de las lesiones preneoplásicas del colon.

Durante la última década algunos trabajos investigan el papel que diversos oncogenes, genes supresores de tumor, marcadores de proliferación celular e inhibidores de la misma juegan en el desarrollo de lesiones cancerosas a partir de un pólipo adenomatoso colo-rectal preexistente. De todos ellos destacan por sus posibles aplicaciones diagnósticas y terapéuticas los dedicados al estudio citométrico del contenido de ADN celular en la secuencia adenoma-cáncer colorrectal, aunque su importancia no se ha demostrado de forma concluyente. El establecimiento definitivo del papel que juega la inhibición de la apoptosis en dicha secuencia podría también condicionar el manejo clínico futuro de los pacientes afectados de pólipos adenomatosos colo-rectales.

El presente trabajo pretende valorar de forma simultánea la influencia del contenido de ADN celular y la inhibición de la muerte celular programada en la secuencia adenoma-cáncer colorrectal, correlacionando ambos con variables clínico-demográficas y anatomopatológicas.

### HIPÓTESIS

1. El estudio del contenido de ADN y proliferación celular por citometría de flujo puede ser un indicador importante para el diagnóstico precoz de transformación maligna de los pólipos colorrectales.
2. El fracaso o inhibición de la apoptosis puede conducir a la formación de pólipos colorrectales así como a su transformación maligna.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo. Muestras: 134 válidas obtenidas a partir de bloques parafinados procedentes de pólipos colorrectales extraídos por polipectomía endoscópica desde 1996 hasta 2001 (22 adenomatosos, 94 túbulo-vellosos, 18 vellosos). En 33 pólipos se detectó adenocarcinoma intramucoso (16) o invasor (17). Controles: 128 biopsias endoscópicas de mucosa normal correspondientes a los cuatro segmentos de intestino grueso (36 a colon ascendente, 32 a colon transversal, 31 a colon descendente, 29 a recto-sigma).

Procesado y análisis mediante citometría de flujo del contenido de ADN y fases del ciclo celular, con técnica de Hedley modificada. Contaje mediante un citómetro de flujo EPICS PROFILE I.



Estudio de apoptosis: protocolo de tinción sobre cortes de 4  $\mu\text{m}$  con método TUNEL modificado; conteo celular siguiendo criterios predeterminados, y cálculo del índice de apoptosis (IA).

Los resultados obtenidos se correlacionaron con variables clínico-demográficas y anatomopatológicas.

En las muestras en las que una porción adenomatosa y otra neoplásica coincidían en el mismo pólipo se diferenciaron ambas secciones.

## RESULTADOS

*-Mucosa normal:* en recto-sigma encontramos el menor índice de proliferación celular ( $p < 0,001$ ) y en esa misma localización en el tercio superior glandular es donde existe mayor índice de apoptosis ( $p = 0,009$ ).

*-Pólipos sin cáncer focal:* los pólipos con diploidia son los que presentan mayor índice de apoptosis ( $p = 0,05$ ). Globalmente el IA es mayor en la zona superior glandular y disminuye de forma progresiva hasta ser mínimo en la zona inferior ( $p < 0,001$ ). La mayor distribución de la apoptosis corresponde a la zona superior de los pólipos con displasia moderada y a la zona inferior de los pólipos de entre 1 y 2 cm. ( $p = 0,02$ ).

*-Pólipos con cáncer focal:* en menores de 65 años presentan mayor índice de apoptosis ( $p = 0,02$ ). Globalmente el IA es mayor en la zona inferior ( $p = 0,014$ ).

No hay relación entre la distribución de la apoptosis y las variables clínico-demográficas y anatomopatológicas tanto en la porción adenomatosa como en la porción tumoral de los pólipos con cáncer focal.

Al comparar entre sí la porción adenomatosa y la tumoral, el mayor índice de proliferación (mayor % fase S) corresponde a la porción tumoral de los pólipos con cáncer focal invasor ( $p = 0,039$ ); no hay diferencias significativas en la distribución y el índice de apoptosis.

Los pólipos con cáncer focal intramucoso con histología túbulo-vellosa son los que tienen mayor IA ( $p = 0,035$ ). En los pólipos con cáncer focal invasor los mayores índices de apoptosis se observan en aquellos con histología túbulo-vellosa ( $p = 0,03$ ), tamaño menor de 1cm ( $p = 0,002$ ) y menores de 65 años ( $p = 0,02$ ).

*-Comparación mucosa normal versus pólipos sin y con cáncer focal:* el mayor índice de proliferación se obtiene en el grupo de pólipos con cáncer focal y los subgrupos intramucoso e invasor tanto en sus porciones adenomatosas como tumorales ( $p < 0,001$ ). El índice de apoptosis total, por zonas, y la distribución de la apoptosis por zonas son mayores en el grupo de pólipos sin cáncer focal ( $p < 0,001$ ).

*-Comparación mucosa normal versus pólipos sin cáncer focal:* los pólipos sin cáncer focal tienen mayor índice de proliferación, siendo ésta una variable predictiva independiente ( $p < 0,001$ ). La distribución de la apoptosis por zonas y el índice de apoptosis total y por zonas también es mayor en los pólipos sin cáncer focal pero en este caso sólo tienen valor predictivo independiente en los tercios medio ( $p < 0,001$ ) e inferior ( $p = 0,001$ ).

*-Comparación mucosa normal versus pólipos con cáncer focal:* los pólipos con cáncer focal tienen mayor índice de proliferación, tanto en porción adenomatosa como tumoral, que el grupo de muestras normales, con valor predictivo independiente ( $p = 0,003$ ).

La distribución y el índice de apoptosis, ambos por zonas, son mayores en la zona superior del grupo de muestras normales ( $p = 0,007$ ) y en la zona inferior del grupo

de pólipos con cáncer focal ( $p=0,007$ ). Dichas variables tienen valor predictivo independiente.

*-Comparación entre pólipos adenomatosos versus pólipos con cáncer focal:* los segundos presentan mayor porcentaje de aneuploidia ( $p<0,001$ ), sin diferencias en cuanto al índice de proliferación.

El IA total es superior en el grupo de pólipos sin cáncer focal ( $p<0,001$ ), al igual que la distribución e IA en los tercios superior y medio ( $p<0,001$ ), con valor predictivo independiente tanto si se considera la parte adenomatosa como la parte tumoral de los pólipos con cáncer focal. La menor apoptosis en el tercio superior de los pólipos con cáncer focal presupone transformación maligna.

Al comparar los pólipos sin cáncer focal con la parte adenomatosa de los pólipos con cáncer focal, las variables tamaño mayor de 2 cm ( $p=0,027$ ), displasia severa ( $p=0,036$ ) y presencia de aneuploidia ( $p=0,043$ ) tienen valor predictivo independiente, sugiriendo la presencia de transformación maligna.

Al comparar los pólipos sin cáncer focal con la parte tumoral de los pólipos con cáncer focal sólo las variables tamaño mayor de 2 cm ( $p=0,017$ ) y presencia de aneuploidia ( $p=0,005$ ) tienen valor predictivo independiente para indicar transformación maligna.

## CONCLUSIONES

El mayor porcentaje de células en fase S junto con la aneuploidia constituyen un indicador precoz, con valor predictivo independiente, de transformación maligna de los pólipos colorrectales.

Los pólipos con cáncer focal, intramucoso o invasor, presentan un índice de apoptosis mayor en la zona inferior glandular, convirtiéndose en una variable con valor predictivo independiente de transformación maligna.

Las variables tamaño > 2 cm., displasia severa, aneuploidia y mayor índice de apoptosis en la zona inferior glandular, todas ellas con valor predictivo independiente, permiten diferenciar entre los pólipos con y sin cáncer focal.

La inhibición de la apoptosis favorece el crecimiento de los pólipos colorrectales así como su transformación maligna.

## RESUM

### INTRODUCCIÓ

Els tumors malignes són la primera causa de mort als països desenvolupats. El càncer colorectal (CCR) és la neoplàsia del tub digestiu més freqüent. Es diagnostiquen 20.000 nous casos de CCR a Espanya a l'any, i afecta a un de cada 10.000 espanyols. Mostra una incidència creixent i suposa el 15% dels nous diagnòstics de càncer. Els esforços investigadors es centren en la prevenció i cerca de noves possibilitats terapèutiques.

Sembla evident el paper què els processos de proliferació, diferenciació i destrucció cel·lular juguen en el desenvolupament de les neoplàsies i en el disseny de futures estratègies diagnòstiques i terapèutiques.

Pocs articles en la literatura han demostrat interès per l'estudi de la proliferació cel·lular i la mort cel·lular programada de les lesions preneoplàsiques del còlon.

En la última dècada alguns treballs han investigat el paper que diversos oncogenes, gens supressors de tumor, marcadors de proliferació cel·lular i inhibidors de la mateixa juguen en el desenvolupament de lesions canceroses a partir d'un pòlip adenomatosos colorectal preexistent. De tots ells destaca per les seves possibles aplicacions diagnòstiques i terapèutiques els dedicats a l'estudi citomètric del contingut d'ADN en la seqüència adenoma-càncer colorectal, encara que la seva importància no ha estat demostrada de forma concloent. L'establiment definitiu del paper que juga la inhibició de l'apoptosi en l'esmentada seqüència podria condicionar el maneig clínic futur dels pacients amb pòlips adenomatosos colorectals.

Aquest treball pretén valorar de forma simultània la influència del contingut d'ADN i la inhibició de la mort cel·lular programada en la seqüència adenoma càncer colorectal, i fer una correlació d'ambdues amb variables clinicodemogràfiques i anatomopatològiques.

### HIPÒTESIS

1. L'estudi del contingut d'ADN i proliferació cel·lular per citometria de flux pot ser un indicador important per al diagnòstic precoç de transformació maligna dels pòlips colorectals.
2. El fracàs o inhibició de l'apoptosi pot conduir a la formació de pòlips colorectals i a la seva transformació maligna.

### MATERIAL I MÈTODES

Estudio retrospectiu. Mostres: 134 vàlides obtingudes a partir de blocs parafinats procedents de pòlips colorectals extrets per polipectomia endoscòpica des de 1996 fins 2001 (22 adenomatosos, 94 tubulovelloso, 18 vellosos). En 33 pòlips es va detectar adenocarcinoma intramucós (16) o invasor (17). Controls: 128 biòpsies endoscòpiques de mucosa normal que es corresponen als quatre segments d'intestí gros (36 a còlon ascendent, 32 a còlon transvers, 31 a còlon descendent, 29 a recte-sigma).

Processament i anàlisi per citometria de flux del contingut d'ADN i fases del cicle cel·lular, amb tècnica de Hedley modificada. Contatge mitjançant un citòmetre de flux EPICS PROFILE I.

Estudi d'apoptosi: protocol de tinció sobre talls de 4 µm amb el mètode TUNEL modificat; contatge cel·lular segons criteris predeterminats, i càlcul de l'índex d'apoptosi (IA).

Els resultats obtinguts es van correlacionar amb variables clinicodemogràfiques i anatomopatològiques.

En les mostres en les quals coincidien una porció adenomatosa i una altra neoplàsica en el mateix pòlip es van diferenciar ambdues seccions.

## RESULTATS

*-Mucosa normal:* al recte-sigma vam trobar el menor índex de proliferació cel·lular ( $p < 0,001$ ) i en aquesta mateixa localització en el terç superior glandular és on existeix major índex d'apoptosi ( $p = 0,009$ ).

*-Pòlips sense càncer focal:* els pòlips amb diploidia són els que presenten major índex d'apoptosi ( $p = 0,05$ ). De forma global l'IA és major en la zona superior glandular i disminueix de forma progressiva fins a ser mínim en la zona inferior ( $p < 0,001$ ). La major distribució de l'apoptosi correspon a la zona superior dels pòlips amb displàsia moderada i a la zona inferior dels pòlips d'entre 1 i 2 cm. ( $p = 0,02$ ).

*-Pòlips amb càncer focal:* en menors de 65 anys presenten major índex d'apoptosi ( $p = 0,02$ ). De forma global el IA és major en la zona inferior ( $p = 0,014$ ).

No hi ha relació entre la distribució de l'apoptosi i les variables clinicodemogràfiques i anatomopatològiques tan en la porció adenomatosa com en la porció tumoral dels pòlips amb càncer focal.

Al comparar la porció adenomatosa i la tumoral, el major índex de proliferació (major % fase S) correspon a la porció tumoral dels pòlips amb càncer focal invasor ( $p = 0,039$ ); no hi ha diferències significatives en la distribució i l'índex d'apoptosi.

Els pòlips amb càncer focal intramucós amb histologia túbulo-vellosa són els que tenen major IA ( $p = 0,035$ ). En els pòlips amb càncer focal invasor els majors índexs d'apoptosi s'observen en els d'histologia túbulo-vellosa ( $p = 0,03$ ), grandària menor d'1cm ( $p = 0,002$ ) i menors de 65 anys ( $p = 0,02$ ).

*-Comparació mucosa normal versus pòlips sense i amb càncer focal:* el major índex de proliferació s'obté en el grup de pòlips amb càncer focal i els subgrups intramucós i invasor tan en les seves porcions adenomatoses com tumorals ( $p < 0,001$ ). L'índex d'apoptosi total, per zones, i la distribució de l'apoptosi per zones són majors en el grup de pòlips sense càncer focal ( $p < 0,001$ ).

*-Comparació mucosa normal versus pòlips sense càncer focal:* els pòlips sense càncer focal tenen major índex de proliferació, essent una variable predictiva independent ( $p < 0,001$ ). La distribució de l'apoptosi per zones i l'índex d'apoptosi total i per zones també és major en els pòlips sense càncer focal però en aquest cas només té valor predictiu independent en els terços mig ( $p < 0,001$ ) i inferior ( $p = 0,001$ ).

*-Comparació mucosa normal versus pòlips amb càncer focal:* els pòlips amb càncer focal tenen major índex de proliferació, tan en la porció adenomatosa com tumoral, que el grup de mostres normals, amb valor predictiu independent ( $p = 0,003$ ).

La distribució i l'índex d'apoptosi, ambdós per zones, són majors en la zona superior del grup de mostres normals ( $p = 0,007$ ) i en la zona inferior del grup de pòlips amb càncer focal ( $p = 0,007$ ). Les esmentades variables tenen valor predictiu independent.

*-Comparació pòlips adenomatosos versus pòlips amb càncer focal:* els segons presenten major percentatge d'aneuploidia ( $p < 0,001$ ), sense diferències a l'índex de proliferació.

El IA total és superior en el grup de pòlips sense càncer focal ( $p < 0,001$ ), de la mateixa manera que la distribució i IA en els terços superior i mig ( $p < 0,001$ ), amb valor predictiu independent tan si es considera la part adenomatosa com la part tumoral dels

pòlips amb càncer focal. La menor apoptosi en el terç superior dels pòlips amb càncer focal pressuposa transformació maligna.

Al comparar els pòlips sense càncer focal amb la part adenomatosa dels pòlips amb càncer focal, les variables grandària major de 2 cm ( $p=0,027$ ), displàsia severa ( $p=0,036$ ) i presència d'aneuploidia ( $p=0,043$ ) tenen valor predictiu independent, i suggereixen la presència de transformació maligna.

Al comparar els pòlips sense càncer focal amb la part tumoral dels pòlips amb càncer focal només les variables grandària major de 2 cm ( $p=0,017$ ) i presència d'aneuploidia ( $p=0,005$ ) tenen valor predictiu independent per indicar transformació maligna.

## CONCLUSIONS

El major percentatge de cèl.lules en fase S junt amb l'aneuploidia constitueixen un indicador precoç, amb valor predictiu independent, de transformació maligna dels pòlips colorectals.

Els pòlips amb càncer focal, intramucós o invasor, presenten un índex d'apoptosi major en la zona inferior glandular, essent una variable amb valor predictiu independent de transformació maligna.

Les variables grandària  $> 2$  cm., displàsia severa, aneuploidia i major índex d'apoptosi en la zona inferior glandular, totes elles amb valor predictiu independent, permeten diferenciar entre els pòlips amb i sense càncer focal.

La inhibició de l'apoptosi afavoreix el creixement dels pòlips colorectals així com la seva transformació maligna.

# ABSTRACT

## INTRODUCTION

Malignant tumors are the first cause of death in developed countries. Colon cancer is the most frequent tumor of digestive tract. 20.000 colorectal cancer new cases are diagnosed in Spain every year and the problem involves one over 10.000 people. Colonic cancer shows and increasing incidence and causes about 15% of new diagnostics of tumor. Investigation efforts are focused on prevention and discovery of new treatment lines.

Cell proliferation, differentiation and destruction mechanisms are fundamental for tumor growth and for development of new diagnostic and therapeutic methods.

A few works have shown interest in the study of cellular proliferation and programmed cellular death mechanisms in preneoplastic colonic injures.

During last decade some works tried to find out the paper that oncogenes, tumor growth supressor genes, cell growth proliferation markers and inhibitors issues have in the outcome of malignant injures on a previous adenomatous colorectal polyp. Of all of them, those measuring cellular DNA content by flow cytometry in the colorectal adenoma- colorectal cancer secuencia are important because of their diagnostic and therapeutic applications, but they're not conclusive. To stablish definitely the paper of apoptosis inhibition in that process could conditioning the clinical practise on the patient with adenomatous colo-rectal polyps in the future.

The present study pretends measuring both the influence of cellular-DNA content and the programmed cellular death on the adenoma-colorectal cancer secuencia, and their correlation with clinical, demographical and anatomopathological items.

## HYPOTHESIS

1. The study of DNA content and cell proliferation rate measured by flow citometry can be a good indicator of malignant tranformation in colonic polyps.
2. Apoptosis inhibition can induce colonic polyps' growth and their malignant tranformation.

## MATERIAL AND METHODS

Retrospective study. Specimens: 134 colorectal polyps obtained by endoscopic polypectomy between 1996 and 2001 (22 adenomatous, 94 tubulovillous and 18 villous polyps). Controls: 128 specimens obtained by endoscopical resection of normal mucosa in colonic tract (36 in ascending colon, 32 in transverse colon, 31 in descending colon and 29 in sigmoid colon and rectum).

Specimens were prepared using a modification of the method described by Hedley et al. and DNA content was messured by flow analysis. Flow citometry was carried out on EPICS PROFILE I cell sorter.

Identification of apoptosis: 4 µm slides of tissue samples were treated with a modification of TUNEL method. We described the labeling pattern and apoptosis index. Obtained results were related to clinical-demographical and histopathological items.

When adenomatous and malignant sections were found together in the same polyp sample, both of them were treated as independent sections.

## RESULTS

-*Normal mucosa*: the lowest cell proliferation index is found in rectal and sigmoid location. There, in the upper crypt section we found the higher apoptosis index ( $p=0,009$ ).

-*Non malignant polyps*: diploid polyps present the highest apoptosis index ( $p=0,005$ ). Apoptosis index is higher in upper crypt section and it decrease to be minimum in lower crypt section ( $p>0,001$ ). Apoptotic cells are mainly located in the upper zone of mild displasic polyps and lower zone of polyps being between 1 and 2 cm sized ( $p=0,02$ ).

-*Malignant polyps*: apoptosis index is higher in people being under 65 year-old ( $p=0,02$ ) and in lower crypt section ( $p=0,014$ ). It doesn't exist a relation between apoptosis distribution and clinical, demographical or anatomopathological items nor in the adenomatous or the tumoral sections of malignant polyps.

Malignant section in malignant polyps shows the highest proliferation rate ( $p=0,039$ ), if we compare adenomatous and malignant sections. It doesn't exist a significative difference on apoptosis distribution or index. Intramucosal malignant tubulovillous polyps show the higher AI ( $p=0,035$ ).

-*Comparison between normal mucosa and polyps*: the highest proliferation index is obtained in adenomatous and neoplastic sections of malignant polyps ( $p<0,001$ ). Apoptosis index and apoptotic cells rate are higher in non malignant polyps ( $p<0,001$ ).

-*Comparison between normal mucosa and non malignant polyps*: non malignant polyps have a higher proliferation rate with an independent predictive value ( $p<0,001$ ). Apoptotic cells rate and apoptosis index is higher in non malignant polyps. Both of them have independent predictive value when measured in medium ( $p<0,001$ ) and lower ( $p=0,001$ ) crypt sections.

-*Comparison between normal mucosa and malignant polyps*: malignant polyps have higher proliferation index than normal mucosa, in both adenomatous and tumoral sections with an independent predictive value ( $p=0,003$ ).

Apoptosis distribution and index are higher in the upper crypt section of normal mucosa ( $p=0,007$ ) and in the lowest crypt section of malignant polyps ( $p=0,007$ ); both of them with independent predictive value.

-*Comparison between adenomatous polyps and malignant polyps*: malignant polyps present higher aneuploidy rate ( $p<0,001$ ) with no differences in proliferation rate. AI is higher in non malignant polyps ( $p<0,001$ ) as well as apoptotic cells rate and AI in upper ad medium crypt sections ( $p<0,001$ ) with independent predictive value, both in adenomatous and neoplastic sections of malignant polyps. The lowest apoptosis rate is found in upper crypt section in malignant polyps and it correlates with potencial malignant transformation .

If we compare non malignant polyps and adenomatous section of malignant polyps, the items size higher than 2 cm ( $p=0,027$ ), severe displasia ( $p=0,036$ ) and aneuploidy ( $p=0,043$ ) have independent predictive value showing a malignant transformation.

If we compare non malignant polyps and neoplastic section of malignant polyps, only size higher than 2cm ( $p=0,017$ ) and aneuploidy ( $p=0,005$ ) have independent predictive value to shown a malignant transformation.

## CONCLUSIONS

Higher cell proliferation rate and aneuploidy are a predictive item of malignant transformation in colorectal polyps, with independent value.

Lower crypt section in malignant polyps presents a higher apoptosis index, with independent predictive value, showing malignant transformation.

Items size higher than 2 cm, severe dysplasia, aneuploidy and higher apoptosis index in lower crypt section, all of them with independent predictive value, are useful to discriminate between malignant and non-malignant polyps.

Apoptosis inhibition promotes growing in colorectal polyps, as well as their malignant transformation.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Hoel DG, Davis DL, Miller AB, Sondik, Swerdlow AJ. Trends in cancer mortality in 15 industrialized countries, 1969-1986. *J.Natl Cancer Ins* 1992;84:313-318.
2. Wingo PA, Tong T, Bolden S. Cancer statistics, 1995. *Cancer J Clin* 1995;45:8-30.
3. McCormick D, Kibbe PJ, Morgan SW. Colon cancer: prevention, diagnosis, treatment. *Gastroenterol Nurs* 2002;25:204-11.
4. Sanz Anquela JM, Ruiz Liso JM, Alfaro Torres J. Epidemiología del cáncer colorrectal. *Med Clin* 1992;18:706-714.
5. Luk GD. Epidemiology ,etiology, and diagnosis of colorectal neoplasia. *Cur Opin Gastroenterol* 1993;9:19-27.
6. Joossens JV, Kesteloot H. Epidemiology of cancer mortality. *Verh K Acad Geneeskld Belg* 200;63:123-35.
7. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of worldwide incidence of eighteen major cancers in 1995. *Ins J Cancer* 1993;54:594-597.
8. Parkin D, Muis C, Whelan S, Gao Y, Ferlay J, Powell J. Cancer incidence in the five continents VI. Lyon; IARC 1992.
9. Greenwald P. Colon cancer overview. *Cancer* 1992;70:1206-1215.
10. Wyatt CJ. Evaluation of the composition of the regional diet in Sonora, México: incidence of colon cancer. *Arch Latinoam Nutr* 1998;48:225-30.
11. Aldercreutz H. Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncol* 2002;3:364-73.
12. Mayberry RM, Coates RJ, Hill HA et al. Determinants of black/white differences in colon cancer survival. *J Natl Cancer Inst* 1995;15:1686-93.
13. Cooper GS, Yuan Z, Rimm AA. Racial disparity in the incidence and case-fatality of colorectal cancer:analysis of 329 United States counties. *Cancer Epidem Biomar Prev* 1997;6:283-5.
14. Chen VW, Wu XC, Ahmed MN, Correa CN, Andrews PA. Cancer of the colon and rectum in Louisiana. *J La State Med Soc* 1999;151:189-97.
15. Jedrychowski W, Tobiasz-Adamczyk B, Steindorf K, Popiela T, Pertz A, Matyja A, Wahrendorf J. Protective effects of physical activity in the occurrence of colon cancer. *Przegl Leck* 2002;59:21-5.
16. López-Abente G, Pollán M, Vergara A, Moreno C, Moreo P, Ardanaz E, Aragonés N. Age-period-cohort-modeling of colorectal cancer incidence and mortality in Spain. *Cancer Epidem Biomar* 1997;6:999-1005.
17. OPCS 1988. Cancer statistics registrations. London ; HMSO,1994.
18. Haenzsel W, Correa P. Cancer of colon and rectum and adenomatosos polyps, a review of epidemiologic findings. *Cancer* 1971;20:14-18.
19. Haenzsel W, Correa P. Epidemiology of large bowel. En:Correa P, Haenzsel W(eds); *Epidemiology of cancer of the digestive tract*. Martinus Nijhoff Publishers. Den Haag 1982;85.
20. Research Triangle Institute / University of North Carolina para la Agency for Healthcare Research and Quality.
21. Loren DE, Lewis J, Kochman ML. Colon cancer: detection and prevention. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31:565-86.
22. Pignone M, Rich M, Teutsch SM, Berg AO, Lohr KN. Screening for colorectal cancer in adults at average risk: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2002;137:132-41.
23. Trowbridge B, Burt RW. Colorectal cancer screening. *Surg Clin North Am* 2002 ;82:943-57.

24. Fossi S, Bazzoli F, Ricciardiello L et al. Incidence and recurrence rates of colorectal adenomas in first-degree asymptomatic relatives of patients with colon cancer. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1601-4.
25. Bond JH. Colorectal cancer screening: the potential role of virtual colonoscopy. *J Gastroenterol* 2002;37:92-6.
26. Coleman N. *Lancet* 2002;359:1917-1919.
27. Thiis-Evensen E, Hoff GS, Sauar J, Vatn MH. The effect of colonoscopic screening with polypectomy on the incidence of colorectal cancer and total mortality.
28. McGrath JS, Ponich TP, Gregor MD. Screening for colorectal cancer: the cost to find an advanced adenoma.
29. Luk GD. Epidemiology, etiology and diagnosis of colorectal neoplasia. *Curr Opin Gastroen* 1993;9:19-27.
30. Matsumoto T, Iida M, Yao T, Fujishima M. Role on nonpolypoid neoplastic lesions in the pathogenesis of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1994;37:450-455.
31. Bronner MP, Haggit RC. The polyp-cancer sequence: do all colorectal cancer arise from benign adenomas? *Gastrointest Endosc* 1993;3:611-622.
32. Selby JV, Friedman GD, Quesenbeny CP, Weiss NS. A case-control study of screening sigmoidoscopy and mortality from colorectal cancer. *N Eng J Med* 1992 ;326:653-657.
33. Morson BC, Dawson's IMP. *Gastrointestinal Pathology*. Third Edition. Blackwell Scientific Publication 1990.
34. Lieberman D. Overview of colon cancer screening. Libro resumen de comunicaciones. ASGE Course, 1993:291-301.
35. Goh HS, Jass JR. DNA content and the adenoma-carcinoma sequence in the colorectum. *J Clin Pathol* 1986;39:387-392.
36. Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenoma. *N Eng J Med* 1992;326:658-662.
37. Bond JH. Evolving strategies for colonoscopic management of patients with colorectal polyps. *Endoscopy* 1995;27:38-43.
38. Martínez M.E, Sampliner R., Marshall J.R, Bhattacharyya A.K, Reid M.E and Alberts D.S. Adenoma characteristics as risk factors for recurrence of advanced adenomas. *Gastroenterol* 2001;120:1077-1083.
39. Estrada RG, Spjut HJ. Hyperplastic polyps of the large bowel. *Am J Surg Pathol* 1980;4:127-133.
40. Franzin G, Zamboni G, Scarpa A, Dina R, Iannucci A, Novelli P. Hyperplastic (metaplastic) polyps of the colon. A histological and histochemical study. *Am J Surg Pathol* 1984;8:687-698.
41. Winawer SJ, Zauber AG, Gerdes H. et al. Reduction in colorectal cancer incidence following colonoscopic polypectomy: report from the National polyp study. *Gastroenterol* 1991;100:A410.
42. Scott NA, Rainwater LM, Wieand HD. The relative prognostic value of flow cytometric DNA analysis and conventional clinicopathologic criteria in patients with operable rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1987;30:513-520.
43. Quirke P, Fozard JBJ, Dixon MF, Dyson JED, Giles GR, Bird CC. DNA aneuploidy in colorectal adenomas. *Br J Cancer* 1986;53:477-481.
44. Van der Ingh HF, Guiffioen G, Cornelise CJ. Flow cytometry detection of aneuploidy in colorectal adenomas. *Cancer Res* 1985; 45:3392-3397.
45. Murad T, Bauer K, Scarpelli DG. Histopathologic and flow cytometry analysis of adenomatous colonic polyps. *Arch Pathol Lab Med* 1989;113:1003-1008.
46. Sciallero S, Bruno S, Di Vinci A, Geido E, Aste H, Giaretti W. Flow cytometric DNA ploidy in colorectal adenomas and family history of colorectal cancer. *Cancer* 1988;61:114-120.

47. Suzuki S, Mizuno M, Tomada J, Ohmori M, Tsuji T. Flow cytometric analysis of the DNA content in colorectal adenomas with focal cancers. *Gastroenterol* 1995;109:1098-1104.
48. Tomita T. DNA ploidy and proliferating cell nuclear antigen in colonic adenomas and adenocarcinomas. *Dig Dis Sci* 1995;40:996-1004.
49. Giaretti W, Sciallero S, Bruno S et al. DNA flow cytometry of endoscopically examined colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Cytometry* 1988;9:238-244.
50. Perrin-Cottier M, Jouffre C, Sabido O et al. Flow cytometric analysis of DNA content in colorectal polyps resected at endoscopy. *Anal Quant Cytol Histol* 1991;13:132-138.
51. Weiss H, Wilter GP, Jacobasch KH, Heinz W, Schaelicke W. Characterization of human adenomatous polyps of the colorectal bowel by means of DNA distribution patterns. *Oncology* 1985;42:33-41.
52. Dennis J, Ahnen MD. Tissue markers of colon cancer risk. *Gastrointest Endosc* 1999;49:550-559.
53. Giaretti W, Pujic N, Rapallo A et al. K-ras 2 G-C and G-T transversions correlate with DNA aneuploidy in colorectal adenomas. *Gastroenterol* 1995;108:1040-1047.
54. Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, et al. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 1992;256:102-104.
55. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Eng J Med* 1988;319:525-532.
56. Ahnen DJ. Dysplasia and chronic ulcerative colitis. In: Rustgi AK, editor. *Gastrointestinal cancers: Biology, diagnosis and therapy*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1995. P399-411.
57. Thibodeau SN, Bren G, Schard D. Microsatellic instability in cancer of proximal colon. *Science* 1993;260:816-819.
58. Jass JR, Whitehall V, Young J and Leggett B. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterol* 2002;123:862-876.
59. Hermsen M, Postma C, Baak J et al. Colorectal adenoma to carcinoma progresión follows múltiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterol* 2002;123:1109-1119.
60. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup MJ et al. P53 gene mutations occur in combinations with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1990;50:7717-7722.
61. Risio M and Rossini FP. Cell proliferation in colorectal adenomas containing invasive carcinoma. *Anticancer Res* 1993;13:43-48.
62. Moss SF, Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt PR. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut* 1996;38:498-501.
63. Sträter H, Koretz K, Günthert AR, Möller P. In situ detection of enterocytic apoptosis in normal colonic mucosa and in familial adenomatous polyposis. *Gut* 1995;37:819-825.
64. Eastwood GL. Progress in gastroenterology: gastrointestinal epithelial rewal. *Gastroenterol* 1977; 72:962-975.
65. Schwartz LM, Osborne BA. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunol Today* 1993;14:582-590.
66. Bellomo G, Orrenius S. Altered thiol and calcium homeostasis in oxidative hepatocellular injury. *Hepatology* 1985;5:876-882.
67. Spragg RG, Hinshaw DB, Hyslop PA, Schraufstatter IU, Cochrane CG. Alterations in adenosine triphosphate and energy charge in cultured endothelial and P388D cells after oxidant injury. *J Clin Invest* 1985;76:1471-1476.

68. Watson AJM. Review article: manipulation of cell-death- the development of novel strategies for the treatment of gastrointestinal disease. *Aliment Pharm Therap* 1995;9:215-226.
69. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
70. Thompson Craig B. Apoptosis in th epathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-1462.
71. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68:251-306.
72. Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. Macrophage phagocytosis of ageing neutrophils in inflammation:programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 1989;83:865-875.
73. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990;136:593-608.
74. Oberhammer F, Wilson JW, Dive C et al. Apoptotic death in epithelial cells:cleavage of DNA to 300 and/or 50 Kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J* 1993;12:3679-3684.
75. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;284:555-556.
76. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of prograded cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.
77. Sträter J, Günthert AR, Brüderlein S, Möller P. Microwave irradiation of paraffin-embedded tissue sensitizes the TUNEL-method for in situ detection of apoptotic cells. *Histochemistry* 1995;103:157-160.
78. Ruoslahti E, Reed JC. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 1994;77:477-478.
79. Bayly AC, Roberts RA, Dive C. Suppresion of liver cell apoptosis in vitro by the non-genotoxic hepatocarcinogen and peroxisome proliferator nafenopin. *J Cell Biol* 1994;125:197-203.
80. Moss SF, Scholes JV, Holt P. Abnormalities of epithelial apoptosis in multistep colorectal neoplasia demonstrated by terminal deoxyuridine nick end labeling. *Digest Dis Sci* 1996;41:2238-2247.
81. Lightdale C, Lipkin M, Deschner E. In vivo measurements in familial polyposis: kinetics and location of proliferating cells in colonic adenomas. *Cancer Res* 1982;42:4280-4283.
82. Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ. Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 1992;358:167-169.
83. Walker NI, Bennett RE, Axelsen RA. Melanosis coli. A consequence of anthraquinone-induced apoptosis of colonic epithelial cells. *Am J Path* 1988;131:465-476.
84. Lee FD. Importance of apoptosis in the histopathology of drug realted lesions in the large intestine. *J Clin Path* 1993;46:188-222.
85. Kotler DP, Weaver SC, Terzakis JA. Ultrastructural features of epithelial cell degeneration in rectal crypts of patients with AIDS. *Am J Surg Path* 1986;10:531-538.
86. Iwamoto M, Koji T, Makiyama K, Kobayashi N, Nakane PK. Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis. *J Pathol* 1996;180:152-159.
87. Pérez-Machado MA, Espinosa LM, de la Madrigal EJ, Abreu L, Lorente GM, Alvarez-Mon M. Impaired mitogenic response of peripheral blood T cells in ulcerative colitis is not due to apoptosis. *Dig Dis Sci* 1999;44:2530-2537.
88. Ina K, Itoh J, Fukushima K, Kusugami K, Yamaguchi T et al. Resístanse of Crohn's disease T cells to múltiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol* 1999;163:1081-1090.

89. Itoh J, de La Motte C, Strong SA, Levine AD, Fiocchi C. Decreased Bax expresión by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease. *Gut* 2001;49:6-8.
90. Winawer SJ, Shike M. Dietary factors in colorectal cancer and their possible effects upon the earlier stages of hyperproliferation and adenoma formation. *J Natl Cancer Invest* 1992;84:74-75.
91. Forman D. Dietary exposure to N-nitroso compounds and the risk of human cancer. *Cancer Surv* 1987;6:719-738.
92. Potten CS. The significance of spontaneous and induced apoptosis in the gastrointestinal tract of mice. *Cancer Metast Rev* 1992;11:179-195.
93. Coates PJ. Molecular methods for the identification of apoptosis in tissues. *Histotechnol* 1994 ;7:261-267.
94. Sanderson CJ. The mechanism of T-cell mediated cytotoxicity II. Morphological studies of cell death by time-lapse microcinematography. *Proc Roy Soc Lon* 1976;192:241-255.
95. Matter A. Microcinematographic and electron microscopic analysis of target cell lysis induced by cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* 1979;36:179-190.
96. Ucker DS. Death by suicide: one way to go in mammalian cellular development? *New Biol* 1991;3:103-109.
97. Compton MM. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metast Rev* 1992;11:105-119.
98. Facchinetti A, Tessarollo L, Mazzocchi M et al. An improved method for the detection of DNA fragmentation. *J Immunol Methods* 1991;136:125-131.
99. Afanaser UN, Korol B, Mantsygin YA et al. Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death. *FEBS Lett* 1986;194:347-350.
100. Compton MM, Haskill JS, Cidlowski JA. Analysis of glucocorticoid actions on rat thymocyte DNA by fluorescence-activated flow cytometry. *Endocrinology* 1988 ;122 :2158-2164.
101. Swart W, Ignatowicz L, Kisielow P. Detection of apoptosis of immature CD4+8+ thymocytes by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991;137:79-87.
102. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC et al. A rapid and simple method for measuring Thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991;139:271-279.
103. Walker PR, Smith C, Yondale T et al. Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res* 1991;51:1078-1085.
104. Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R et al. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: In situ end-labelling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 1993;41:7-12.
105. Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA. In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol* 1993;170:1-8.
106. Kressel M, Groscurth P. Detection of apoptotic cell death by in situ labelling of DNA double strand breaks. *Ann Anat* 1993 (suppl.) 175:165.
107. Kressel M, Groscurth P. Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell Tissue Res* 1994;278:549-556.
108. Alfaro Moreno E, García Cuellar C, Dueñas González A. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Rev Inst Nal Cancerol (Mex)* 2000;46(4).275-280.
109. Köhler C, Orrenius S, Zhivotovsky B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immunol Meth* 265 (2002) 97-110.

110. Ijiri K, Potten CS. Further studies on the reponse of intestinal crypt cells of different hierarchical status to eighteen different cytotoxic drugs. *Br J Cancer* 1983;47:175-185.
111. Bybee A, Thomas NSB. Cell cycle regulation. *Blood Reviews* 1991;5:177-192.
112. Tur GE, Sato Y, Fukuova T, Andoh H, Kotanagi H, Koyama K. Effect of the combination of hyperthermia and irradiation on human colon cancer cells. *J. Surg Oncol* 1994;56:128-131.
113. Shapiro HM. *Practical flow cytometry*. Alan R Liss Inc, New York 1988.
114. Köhler G and Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495-497.
115. Gómez J. Citometría de flujo: principios y aplicaciones. Ilerda "Ciències". 1994;51:13-33.
116. Kiang J, spanier SS, Benson NNA, Braylan RC. Flow cytometric analysis of DNA content and srff-tissue using nuclear suspensions. *Cancer* 1987;59:1951-1958.
117. Marcote E, Campos A, Carrato A, Arlandis F, Vierna J. Significación pronóstica de la ploidía del ADN y de la fase S en el cáncer de mama. *Cir Esp* 1993;53:88-96.
118. Van Dilla MA, Trujillo TT, Mullaney PF, Coulter JR. Cell microfluorometry a method for rapid fluorescence measurement. *Science* 1967;163:1213-1214.
119. Melamed MR, Mullaney PF, Shapiro HM. An historical review of the development of flow cytometers and sorters. En: *Flow Cytometry and sorting*. Editores Melamed MR, Lidmo T, Mendelsohn ML, Wiley-Liss. New York 1991.
120. Givon AL. *Flow cytometry. First principles* Wiley-Liss Inc New York 1992.
121. Ersley FJ, Maciorowski Z, Hassan M, Pietraszkiewicz H, Sakr W, Heilbrun LK. Variations in DNA aneuploid cell content during tumor dissociation in human colon and head and neck cancers analyzed by flow cytometry. *Cytometry* 1993;14:550-558.
122. Daver A, Bocquillon PG, Page M, Dalifard I, Chassevent A, Litas P, Cellier P. Flow cytometric studies of colorectal tumors using the needle aspiration. *Anticancer Res* 1987;7:531-534.
123. Skoog SJ, Evans CP, Hayward IJ, Griffin JL, Hitchcock CL. Flow cytometry of fine needle aspirations of the Sprague-Dawley rat testis defining normal maturation and the effects of multiple biopsies. *Cancer* 1991;146:620-623.
124. Remvikos Y, Magdelenat H, Zajdela A. DNA flow cytometry applied to fine needle sampling of human breast cancer. *Cancer* 1988;61:1629-1634.
125. Hubens G, Totte E, Verhulst A, Van Marck E, Hubens A. The influence of the interaction of sutures with the mucose on tumor formation at colonic anastomose in rats. *Eur Surg Res* 1993;25:213-221.
126. Hedley DW, Frielander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin embedded pathological material using flow cytometry. *J. Histochem Cytochem* 1983;31:1333-1335.
127. Schultz DS, Zarbo RJ. Comparison of eight modifications of hedley's method for flow cytometric DNA ploidy analysis of paraffin-embedded tissue. *Am. J Clin Pathol* 1992;98:291-295.
128. Overton WR, McCoy JP. Reversing the effect of formalin on the Birding of propidium iodide to DNA. *Cytometry* 1994;16:351-356.
129. Zalopski MM, Maciorowski Z, Ryan JR, Easley JF, Hussein ME, Sundareson AS, Baker LH. DNA content parameters of paraffin-embedded soft tissue sarcomas; optimization of retrieval technique and comparison to fresh tissue. *Cytometry* 1993;14:327-333.
130. Leers MPG, Theunissen PHMH, Schulte B, Ramaekers FCS. Bivariate cytokeratin DNA flow cytometric analysis of paraffin-embedded samples from colorectal carcinomas. *Cytometry* 1995;21:101-107.

131. Berrocal A, González Barón M, Barón JM, Ordóñez A. Aplicaciones de la citometría de flujo en oncología. *Oncología* 1991;14:279-288.
132. Carretero F. La citometría de flujo en el control de calidad de la criopreservación. *Biol Clin Hematol* 1985;7:121-134.
133. Gómez A, García J, Orfao de Matos A. El análisis del DNA mediante citometría de flujo en la patología colorectal maligna. *Cir Esp* 1991;50:132-136.
134. Tagawa Y, Nakazaki T, Yasutake T, Matsuo S, Tomita M. Comparison of pepsin and trypsin digestion on paraffin-embedded tissue preparation for DNA flow cytometry. *Cytometry* 1993;14:541-549.
135. Muguerza JM, Díez M, Torres AJ, López-Asenjo JA et al. Prognostic value of flow cytometric DNA analysis in non-small-cell lung cancer; rationale of sequential processing of frozen and paraffin-embedded tissue. *World J Surg* 1997;21:323-329.
136. Fisher C, Knaust KO, Schauer A, Ringert RH. Flow cytometric analysis of the DNA content in paraffin-embedded tissue and in fresh tumor samples obtained from renal cell carcinoma; comparison of DNA ploidy using ethidium bromide and mithramycin. *Anticancer Res* 1996;16:2575-2580.
137. Vavruch L, Enestrom S, Carstensen J, Nordenskjold B, Wingren S. DNA index and S-phase in primary brain tumors. A comparison between fresh and deparaffinized specimens studied by flow cytometry. *J Neurosurg* 1994;80:85-89.
138. Niezabitowski A, Lackowska B, Rys J, Dyba T, Gruhala A, Szkiarski W, Steimach A, Kruczak A, Swiatkiewicz I. Comparative flow cytometric DNA analysis on fresh and paraffin-embedded tumor tissue in different neoplasms. *Pol J Pathol* 1994;45:203-208.
139. Kumar D, Kumar S, Lyon D. Comparison on flow cytometric DNA content analysis of fresh and formalin-fixed paraffin-embedded solid neoplasms. *Mod Pathol* 1994;7:354-360.
140. Ferrer-Roca O, Ballester-Guardia E, Martín Rodríguez JA. Consideraciones técnicas en la evaluación pronóstica de la citometría de flujo sobre material extraído de bloques de parafina. *Patología* 1989;22:263-265.
141. Kreichergs A, Tribukait B, Willems J, Bauer HC. DNA flow analysis of soft tissue tumors. *Cancer* 1987;59:128-133.
142. Emidin SO, Stenling R, Roos G. Prognostic value of DNA content in colorectal carcinoma. A flow cytometric study with some methodologic aspects. *Cancer* 1987;60:1282-1287.
143. Barlogie B, Raber MN, Schumann J et al. Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* 1983;43:3982-3997.
144. Koss LG, Grenebaum E. Measuring DNA in human cancer. *JAMA* 198 ;225:3158-3159.
145. Scott CA, Desinan L, Avelini C et al. DNA index shift with disease progression in colorectal adenocarcinoma: a morphological and flow cytometric study. *Hum Pathol* 1998;29:482-490.
146. Lanza G, Gafa R, Santini A, Maestri I, Cilli G, Cavazzini L. Prognostic significance of DNA ploidy in patients with stage II and stage III colon carcinoma: a prospective flow cytometric study. *Cancer* 1998;82:49-59.
147. Raber MN, Barlogie B. DNA flow cytometry of human solid tumors. En: *Flow cytometry and sorting* 2ª ed. Wiley-Liss Inc 1990:745-754.
148. Salud A, Porcel JM, Raikundalia B, Camplejohn RS, Taub NA. Prognostic significance of DNA ploidy, S-phase fraction and P-glycoprotein expression in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 1999;72:167-174.
149. Chen HS, Sheen-Chen SM, Lu CC. DNA index and S-phase fraction in curative resection of colorectal adenocarcinomas: analysis of prognosis and current trends. *World J Surg* 2002;26:626-630.

150. Cascinu S, Ligi M, Graziano F, Del Ferro E, Valentini M, Grianti C, Bartolucci M, Catalano G. S-phase fraction can predict event free survival in patients with pT2-T3N0M0 colorectal carcinoma: implications for adjuvant chemotherapy. *Cancer* 1998;83:1081-1085.
151. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: Where are we now?. *Ann Oncol* 2005;0:3521.
152. Smilek P, Dusek L, Vesely K, Roltenberg J, Kostrica R. Prognostic significance of mitotic and apoptotic index and the DNA cytometry in head and neck cancer. *Neoplasma* 2005;52(3):199-207.
153. Wersto RP, Liblit RL, Deitch D, Koss LG. Variability in DNA measurements in multiple tumor samples of human colonic carcinoma. *Cancer* 1991;67:106-115.
154. Wheelless LL, Coon JS, Cpox C et al. Measurement variability in DNA flow cytometry of replicate samples. *Cytometry* 1989;10:731-738.
155. Diaz FJ, García-Alonso I, Iturburu I et al. Valor pronóstico del DNA nuclear de 106 tumores colorectales medido por microespectroscopía. *Rev Esp Enf Digest* 1993;83:4211-4228.
156. Welley RC, Schreiber K, Koss LG, Karas M, Sherman A. DNA distribution in human colon carcinoma and its relationship to clinical behavior. *J Natl Cancer* 1982;69:15-22.
157. Emblad P, Glimelius B, Bengtsson A. The prognostic significance of DNA content in carcinoma of the rectum and rectosigmoid. *Acta Chir Scand* 1987;153:453-458.
158. Albe X, Vassilakos P, Helfer Guarnori. Independent prognostic value of ploidy in colorectal cancer. A prospective study using image cytometry. *Cancer* 1990;66:1168-1175.
159. Deans GT, Williamson K, Heatley M et al. The role of flow cytometry in carcinoma of the colon and rectum. *Surg Gynecol Obstet* 1993;177:377-382.
160. Tomouchi H, Matsumoto K, Kinoshita T, Itoh H, Suzuki H. Prognostic value Of DNA ploidy patterns of colorectal adenocarcinoma: univariate and multivariate analysis. *Dig Surg* 1998;15:687-692.
161. Giaretti W, Danova M, Geldo E et al. Flow cytometric DNA index in the prognosis of colorectal cancer. *Cancer* 1991;67:1921-1927.
162. Pandrea IR, Zugun F, Tarcoveanu E et al. Flow cytometry DNA index of colorectal carcinomas. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 1995;99:112-115.
163. Ando Y, Tsuchiya A, Sekikawa K et al. Flow cytometric DNA analysis in colorectal cancer. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1989;90:1571-1575.
164. Hood DL, Petras RE, Edinger M, Fazio V, Tubbs RR. Deoxyribonucleic acid ploidy and cellcycle analysis of colorectal carcinoma by flow cytometry. A prospective study of 137 cases using fresh whole cell suspensions. *Am J Clin Pathol* 1990;93:615-620.
165. Ando H, Sawada T, Saito Y et al. Feasibility of DNA analysis for prognostic evaluations of colorectal cancer using touch preparations and image cytometry. *Gan To Kagaku Ryocho* 1994:89-94.
166. Yamamoto T, Matsumoto K, Iriyama K. Prognostic significance of the DNA index in a colorectal cancer. *Surg Today* 1998;28:792-796.
167. Bauer KD, Lincoln ST, Vera-Roman JM. Prognostic implications of proliferative activity and DNA aneuploidy in colonic adenocarcinoma. *Lab Invest* 1987;57:329-335.
168. Stipa S, Danesi DT, Modini C et al. The importance of heterogeneity and of multiple site sampling in the prospective determination of deoxyribonucleic acid flow cytometry. *Surg Ginecol Obstet* 1993;176:427-434.
169. D'Agnano I, Cosimelli M, La Pera A et al. Flow cytometric analysis of DNA content and cell kinetics in colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 1993;13:699-703.



170. Costa A, Faranda A, Scaimati A et al. Autoradiographie and flow cytometric assessment of cell proliferation in primary colorectal cancer: relationship to DNA ploidy and clinico-pathological features. In *J Cancer* 1992;50:719-723.
171. Bosari S, Lee AK, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML. Flow cytometry and image analysis of colorectal adenocarcinomas. A comparative study with clinical correlations. *Am J Clin Pathol* 1993;99:187-194.
172. Kouri M. DNA ploidy of colorectal carcinoma by tumor site gender and history of noncolorectal malignancies. *Oncology* 1993;50:41-45.
173. Frankfurt OS, Arbuck SG, Chin JL et al. Prognostic applications of DNA flow cytometry for human solid tumors. *Ann N Y Acad Sci* 1986;468:276-290.
174. Palmqvist R, Oberg A, Bergstrom C. Systematic heterogeneity and prognostic significance of cell proliferation in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998;77:917-925.
175. Linden MD, el-Naggar AK, Nathanson SD, Jacobson G, Zarbo RJ. Lack of correlation between flow cytometric and immunohistologic proliferation measurements of tumors. *Mod Pathol* 1996;9:682-689.
176. Kearney TJ, Price EA, Lee S, Silberman AW. Tumor aneuploidy in young patients with colorectal cancer. *Cancer* 1993;72:42-45.
177. Meling GI, Rognum TO, Clausen OPF, Chen Y, Lunde OC, Schlichting E. Association between DNA aneuploidy pattern and atypia in colorectal carcinomas, a new clinical application of DNA flow cytometric study. *Cancer* 1991;67:1642-1649.
178. Fischbacch W, Mossner J, Seyschab H, Holm H. Tissue carcinoembryonic antigen and DNA aneuploidy in precancerous and cancerous colorectal lesions. *Cancer* 1990;65:1820-1824.
179. Hartmann DP, Montgomery EA, Carr NJ, Gupta PK, Azumi N. Flow cytometric DNA analysis of ulcerative colitis using paraffin-embedded biopsy specimens; comparison with morphology and DNA analysis of fresh samples. *Am J Gastroenterol* 1995;90:590-596.
180. Barletta A, Marzullo F, Pellicchia A et al. DNA flow cytometry, p53 levels and proliferative cell nuclear antigen in human colon dysplastic, precancerous and cancerous tissues. *Anticancer Res* 1998;18:1677-1682.
181. Hedley DW, Rugg CA, Gelber RD. Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of node positive early breast cancer. *Cancer Res* 1987;47:4729-4735.
182. Schutte B, Reynders MMJ, Bosman FT et al. Flow cytometric determination of DNA ploidy level in nuclei isolated from paraffin-embedded tissue. *Cytometry* 1985;6:26-30.
183. Kimura H, Kanno M, Takamura H et al. Histopathologic and flow cytometric analysis of colorectal polyps resected at endoscopy. *Eur Surg Res* 1993;25:187-192.
184. Frei JV, Troster MM, Cramer HM, Martínez VJ, Cook M. DNA Flow Cytometry of large-bowel biopsies showing that adenoma tissue predicts the ultimate nature of the lesions. *CJS* 1991;34 (4):343-348.
185. Nakamura S, Goto J, Kitayama M, Kino I. Application of the crypt-isolation technique to flow-cytometric analysis of DNA content in colorectal neoplasms. *Gastroenterol* 1994;106:100-107.
186. Arai T, Kino I. Role of apoptosis in modulation of the growth of human colorectal tubular and villous adenomas. *J Pathol* 1995;176:37-44.
187. Morson BC. The polyp-cancer sequence in the large bowel. *Proc Roy Soc Med* 1974;67:451-457.
188. Fearon ER., Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759-767.