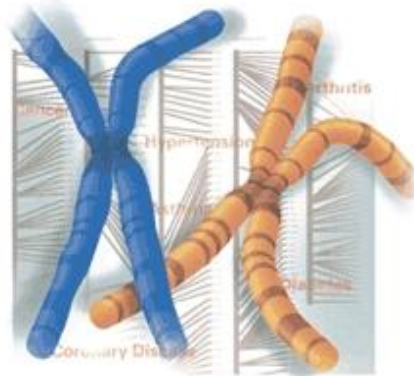


Autor: A. Ferreira Alemão, MD PhD

Cáncer colorectal (CRC)

De los factores de riesgo al diagnóstico molecular



2005

“Cosa natural en el hombre es el querer saber”

Aristóteles – siglo IV A.C.

“Para saber una cosa bien, se necesita de saber su historia y todas aquellas conexiones, semejanzas o desemejanzas que tiene con las demás”

Ribeiro Sanches (*) – siglo XVIII

(*) Médico portugués, filósofo, pensador que se fugó de Portugal de la Inquisición y llegó a ser el médico principal de la corte de Catarina II de Rusia.

Indice

INTRODUCCIÓN	8
CAPÍTULO I	12
1. ALGUNOS CONCEPTOS BÁSICOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	12
1.1 LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS DE MAMÍFEROS Y SUS NÚCLEOS	12
1.2 PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR – PROCESOS CELULARES ESENCIALES Y INTERCONECTADOS	14
1.3 PROLIFERACIÓN CELULAR	15
1.4 MUERTE CELULAR	18
1.5 ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR	21
1.6 DE CÓMO LAS PROTEINAS DEL CICLO REGULAN LAS FASES DE TRANSICIÓN GO-G1-S	24
CAPÍTULO II	27
2. DE LA NATURALEZA DE LA ESTRUCTURA DEL GENOMA	28
2.1 LA COMPLEJIDAD DEL GENOMA	28
2.2 LA COMPLEJIDAD DE LOS GENOMAS DE LAS BACTERIAS Y DE LOS VIRUS	30
2.3 LA COMPLEJIDAD DE LOS GENOMAS EUCARIOTAS	31
2.4 SECUENCIAS DE DNA ACENTUADAMENTE REPETIDAS (FRACCIÓN DE REPETICIÓN ELEVADA)	32
2.5 SECUENCIAS DE DNA REPETIDO MODERADAMENTE	35
2.6 SECUENCIAS DE DNA NO REPETIDAS	36
CAPÍTULO III	37
3. ONCOGENESIS ALGUNOS FACTORES RELACIONADOS	37
3.1 GENERALIDADES	37
3.2 FACTORES DE CRECIMIENTO	42
3.3 RECEPTORES DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO	44
3.4 TRANSDUCERS DE SEÑAL	45
3.5 FACTORES DE TRANSCRICIÓN	46
3.6 GENES SUPRESORES DE TUMOR	49
3.7 GEN RETINOBLASTOMA(RB)	55
3.8 p53	57
3.9 INHIBIDORES CDK	61
CAPÍTULO IV	64
4. ALTERACIONES GENÉTICAS EN LA CÉLULA CANCEROSA	64
4.1 CONSIDERACIONES GENERALES	64
4.2 MUTACIONES EN LAS CÉLULAS SOMÁTICAS HUMANAS	67
4.3 MUTACIONES MÚLTIPLES EN LOS TUMORES HUMANOS	68
4.4 INESTABILIDAD CROMOSÓMICA	68
4.4.1 <i>Hibridación genómica comparativa</i>	68
4.5 ANEUPLOIDIA	70
4.6 INESTABILIDAD MICROSATÉLITE	70
4.7 MUTACIONES SILENCIOSAS Y MÚLTIPLES EN GENES INDIVIDUALES	72
4.8 EVOLUCIÓN DE UN FENOTIPO MUTANTE DURANTE LA PROGRESIÓN TUMORAL	73
4.9 ORDEN SECUENCIAL DE LAS MUTACIONES EN LA CARCINOGENESIS	74
4.10 EVENTOS INICIALES DE UN FENÓTIPO MUTANTE	75

4.11 GENES DE REPARACIÓN DEL DNA	76
4.12 POLIMERASAS DEL ADN	77
4.13 HELICASAS DEL DNA	78
4.14 OTROS GENES DIANA	78
4.15 CONEXIÓN ENTRE INDUCCIÓN DE MUTACIÓN Y SELECCIÓN CLONAL	79
4.16 CONSECUENCIAS DE UN FENOTIPO MUTANTE	80
4.17 IMPLICACIONES DEL FENOTIPO MUTANTE EN UN CANCER	82
4.18 CONSIDERACIONES GLOBALES	85
CAPÍTULO V	87
5. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER COLORECTAL	87
5.1 ASPECTOS GENERALES	87
5.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS ESPECÍFICOS	92
CAPÍTULO VI	100
6. MUTAGENIOS EN LA ALIMENTACIÓN HUMANA	100
6.1 MUTAGÉNESIS Y CARCINOGENÉNESIS	102
6.2 AFLATOXINA B1	108
6.3 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (PAH)	109
6.4 N-NITROSAMINAS	111
6.5 AMINAS HETEROCÍCLICAS	112
CAPÍTULO VII	115
7. HISTORIA FAMILIAR E IDENTIFICACIÓN EN LA SUSCEPTIBILIDAD HEREDITARIA DEL CÁNCER	115
7.1 ASPECTOS GENERALES DE LA EVALUACIÓN DEL RIESGO DE CÁNCER HEREDITARIO: IDENTIFICACIÓN DE PERSONAS COM RIESGO AUMENTADO	116
7.2 CONSTRUCCIÓN DE UN ÁRBOL GENEALÓGICO	117
7.3 ACONSEJAMIENTO GENÉTICO Y TESTS	117
7.4 EL PROCESO DE ACONSEJAMIENTO GENÉTICO	118
7.5 COMPONENTES DEL CONSETIMIENTO INFORMADO	119
7.6 IMPLICACIONES DE UN RESULTADO POSITIVO O NEGATIVO Y POSIBILIDAD DEL TEST A NO SER INFORMATIVO	120
7.7 IMPLICACIONES PSICOLÓGICAS DE LOS RESULTADOS DE LOS TESTS	121
7.8 RIESGOS DE DISCRIMINACIÓN EN EL TRABAJO O EN LOS SISTEMAS DE SEGUROS DE SALUD	122
7.9 CÁNCER DEL COLON HEREDITARIO Y FAMILIAR	123
7.10 SÍNDROMES HEREDITARIOS	124
7.11 SÍNDROMES ENVOLVIENDO A MUTACIONES EN EL GEN <i>APC</i> (<i>ADENOMATOSIS POLYPOSIS COLI</i>)	124
7.12 FAP ATENUADA	126
7.13 POLIMORFISMO DEL GEN <i>APC</i> EN LOS JUDÍOS ASHKENAZI	126
7.14 HNPCC	127
7.14.1 Aspectos clínicos y test genético para HNPCC	127
7.14.2 Riesgo de cancer con HNPCC	130
7.15 EDAD JOVEN DEL COMIENZO	130
7.16 TEST DE INSTABILIDAD MICROSATÉLITE	131
CAPÍTULO VIII	134

8. HNPCC + FAP	134
8.1 INTRODUCCIÓN	134
8.2 POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR (FAP)	136
8.3 HNPCC (SÍNDROME DE LYNCH)	137
8.4 GENÉTICA MOLECULAR DEL HNPCC	138
8.5 MUTACIONES “FOUNDER” FUNDADORAS	139
8.6 LAS POSIBILIDADES DEL DIAGNÓSTICO DE HNPCC	140
8.7 INCIDENCIA DEL HNPCC	141
8.8 TUMORES EXTRACOLÓNICOS EN EL HNPCC	143
8.9 SÍNDROME MUIR-TORRE	147
8.10 FENOTIPO Y CORRESPONDIENTES MUTACIONES EN EL HNPCC	148
8.11 PATOLOGÍA Y PRONÓSTICO DEL CRC EN EL HNPCC	149
8.12 PATOGENIA EN LAS CRIPTAS ABERRANTES DEL COLON	152
8.13 PREVENCIÓN Y ACTUACIÓN CLÍNICA EN HNPCC	153
8.14 POTENCIALIDADES DE LA COLECTOMIA PROFILÁTICA EN HNPCC Y OTRAS MODALIDADES DE PROFILAXIA	155
8.15 POSIBILIDADES DE EXPERIMENTACIÓN Y MECANISMOS GENÉTICOS EN HNPCC	157
8.16 INFLUENCIA DE LA METILACIÓN EN HNPCC	158
8.17 SILENCIAMIENTO GENÉTICO	160
8.18 DEFICIENCIA DE “REPAIR MISMATCH”	161
8.19 GENES BAJA PENETRACIÓN Y MUTACIÓN I1370K DEL GEN <i>APC</i>	162
8.20 EL HNPCC EN LA INVESTIGACIÓN CLÍNICA	166
CAPÍTULO IX	168
9. QUIMIOPREVENCIÓN DEL CÁNCER COLORECTAL.	168
9.1 INTRODUCCIÓN	168
9.2 QUIMIOPREVENCIÓN DEL CÁNCER COLORECTAL POR LA ASPIRINA	170
9.3 EVIDENCIA EXPERIMENTAL DE LA QUIMIOPREVENCIÓN DEL CÁNCER COLORECTAL CON LA ASPIRINA	173
CAPÍTULO X	176
10. BASES MOLECULARES DE LOS TESTS DE DNA EN LAS HECES EN EL CRC	176
10.1 ORÍGEN DEL CÁNCER HUMANO	177
10.2 EL RIGOR DE LA REPLICACIÓN DEL DNA HUMANO	179
10.3 INESTABILIDAD GENÓMICA EN EL CRC	179
10.4 INESTABILIDAD CROMOSÓMICA Y VÍA SUPRESORA	180
10.5 INESTABILIDAD MICROSATÉLITE Y “FENOTIPO MUTANTE”	182
10.6 FENOTIPO METILADOR DE LAS ILAS CpG Y VÍA METILADORA	183
10.7 SOBREPOSICIÓN ENTRE CIMP Y MSI	184
10.8 VÍAS MÚLTIPLES PARA CRC	184
CAPÍTULO XI	186
11. RASTREO Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL CRC	186
11.1 INTRODUCCIÓN	186
11.2 TESTS DE RASTREO DE CÁNCER COLORECTAL TRADICIONALES	188
11.2.1 – <i>Test de sangre oculta en las heces</i>	189
11.2.2 – <i>Enema de bario con doble contraste</i>	190

11.2.3 – Visualización directa sigmoidoscopia y colonoscopia	190
11.2.3.1 – Sigmoidoscopia flexible	191
11.2.3.2 – Colonoscopia	192
11.3 – ANÁLISIS DEL DNA DE LAS HECES	193
CAPÍTULO XII	196
12. DIANAS GENÉTICAS MÚLTIPLES EN EL DNA DE LAS HECES	196
12.1 INTRODUCCIÓN	196
12.2 TESTES DEL DNA FECAL	197
12.3 ESTUDIOS CLÍNICOS MUESTRAM LA EVOLUCIÓN DEL TEST	198
12.4 REFINAMIENTO DE TECNOLOGÍA	199
12.5 EL RASTREO ES POCO UTILIZADO	201
12.6 LA BASE MOLECULAR DEL TEST DE HECES	202
12.7 ENSAYOS CLÍNICOS CON TESTES DE DNA EN LAS HECES	204
12.8 PACIENTES CON RESULTADO POSITIVO	206
CAPÍTULO XIII	207
13. POSIBILIDADES DE CREACIÓN Y EL POTENCIAL DE UN INSTRUMENTO DE ENCUESTA PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE CÁNCER DE COLON Y RECTO	207
CAPÍTULO XIV	215
14. CONCLUSIONES	215
15. BIBLIOGRAFIA (FORMATADA)	218
CAPÍTULO I	218
CAPÍTULO II	222
CAPÍTULO III	223
CAPÍTULO IV	223
CAPÍTULO V	230
CAPÍTULO VI	239
CAPÍTULO VII	251
CAPÍTULO VIII	257
CAPÍTULO IX	268
CAPÍTULO X	271
CAPÍTULO XI	273
CAPÍTULO XII	275

INTRODUCCIÓN

El cáncer colorectal (CRC) es una enfermedad que puede ser prevenida con antelación cuando los pólipos colorectales son removidos, o sea la enfermedad es altamente curable cuando es detectada en su estado inicial.

Es importante que existan tests de rastreo que examinen todo el colon y recto, porque este cáncer usualmente no exhibe señales y síntomas en su estado precoz. El rastreo del CRC es hecho en individuos que no tienen señal alguna o síntoma que pueda indicar la sospecha de cáncer. Para prevenir el CRC es determinante comprender su causalidad y etiopatogenia, lo que es un requisito para una acción efectiva. La causalidad puede ser establecida combinando la epidemiología (una herramienta llave para identificar los factores mayores de riesgo) con la investigación de los mecanismos de la carcinogénesis.

Cada vez es más aparente que una mejor comprensión de la nutrición y de las interacciones nutrición-genética son una importante consecuencia de la revolución que se conoce como “genomics”. A través de la biología molecular y de la genética es posible mostrar el poder de la investigación de los polimorfismos de nucleótidos singulares en los estudios epidemiológicos para clarificar los mecanismos y factores de riesgo en la difícil, (pero extremadamente importante) área de la nutrición y de la forma como es confeccionada la dieta, con lo que es posible trazar medidas preventivas de la enfermedad maligna (y de la degenerescencia) en general y en este tema particular del CRC.

Ha sido demostrado que la deficiencia de folatos, una deficiencia común en personas que comen pocos frutos y vegetales, causa estadísticamente más daño en los cromosomas a nivel de ciertos genes humanos. Los folatos son esenciales para la regeneración de la metionina, dador de metil en la metilación del DNA, y para la producción de purinas y pirimidinas requeridas para la síntesis del DNA.

De este modo, la inadecuada ingestión de folatos puede contribuir para las aberraciones en la metilación del DNA y puede llevar a anomalías en la síntesis del DNA o su reparación. Ambos mecanismos pueden influenciar la carcinogénesis del colon, lo que está en conformidad, epidemiológicamente, con la mayor tasa de incidencia del riesgo de cáncer de colon. Hay otra evidencia

que indica que la ingestión aumentada de alcohol y el humo de tabaco pueden perturbar las acciones biológicas del ácido fólico y sus derivados.

La carcinogénesis humana depende esencialmente, de tres factores: (1) humo de tabaco (2), infección e inflamación y (3) nutrición y factores dietéticos. Los factores dietéticos y la nutrición incluyen dos categorías, normalmente agentes genotóxicos y constituyentes incluyendo fenómenos asociados con la promoción tumoral.

En este trabajo se describen aspectos relacionados con agentes genotóxicos. Estos son los mutagenos/carcinogenios en los alimentos cocinados, productos de hongos, derivados de los nitritos, agentes oxidativos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH). Se debe dar énfasis a las aminas heterocíclicas (HCA) a las cuales los seres humanos están continuamente expuestos con el estilo de vida ordinaria y cotidiana de los modelos actuales “occidentalizados”.

Las HCA en los alimentos son principalmente producidas a partir de la creatin (in) a, azúcar y de los aminoácidos de la carne (bajo el calor de las cocina). Las HCA son derivados de imidazoquinolina y de imidazoquinoxalina y la fenilimidazopiridina. Las HCA son pluripotentes en la producción de cánceres en varios órganos, incluyendo mama, próstata y colonrecto. También los productos resultantes de la pirólisis, por calentamiento intenso de los alimentos resulta en la formación de PAH (el benzo[a]pyreno es formado en la corteza del pan y en la carne a la parrilla).

El receptor de las dioxinas (AHR) es el mismo para los PAHs. Entonces, necesitamos de una visión profundizada en la evaluación del riesgo de los múltiples compuestos alimenticios y de los factores que afectan a la cadena alimenticia con influencia en la salud humana en general, así como en los factores de riesgo en el CRC en especial, que es el ámbito de este trabajo de DEA.

Hay que identificar los agentes genotóxicos, que claramente sean definidos como causantes de daño del DNA, a través de mutaciones puntuales de los genes, deleciones, inserciones, recombinaciones, rearrreglos y amplificaciones, así como aberraciones cromosómicas.

Los promotores dietéticos tumorales son menos definidos en términos de sus modos de acción, genéricamente hablando, pero ellos causan proliferación celular, con o sin daño celular crónico concomitante.

La expansión controlada de las poblaciones de células es un cuadro fundamental de los organismos vivos siendo un balance riguroso entre la proliferación y la muerte celular.

Hay que hacer una introducción progresiva en el estudio de la función de los factores de crecimiento, traducción de las vías de señal, expresión génica y de los mecanismos de conservación del ciclo celular. Esto lleva al conocimiento del contexto de las consecuencias mecánicas de las alteraciones genéticas en los genes oncogénicos y supresores de tumores con la consecuente formación de los tumores, en la dependencia de la acción de los agentes genotóxicos, que son primordialmente vehiculados a través de muchos alimentos que nuestra cultura y civilización nos induce.

Los procesos carcinogénicos envuelven múltiples desencadenantes. Puede ser fácilmente apreciado que en el cuerpo de un ser humano hay muchas células que ya tienen alteraciones genéticas de genes relacionados con cáncer causadas por varias sustancias genotóxicas, incluyendo carcinógenos dietéticos. Mas aún, la inestabilidad genómica frecuentemente resulta de mutaciones en los genes, que codifican proteínas relacionadas con la reparación del DNA que son producidas por eventos mutacionales. Si una mutación ocurre en los genes, la acumulación más rápida de alteraciones génicas adicionales será ocasionada en otros genes relacionados con el cáncer. Por eso, la contribución potencial de “insignificantes” cantidades de mutágenos/carcinógenos presentes en la dieta no puede ser despreciada cuanto al significado en la carcinogénesis.

Está plenamente demostrado que los carcinógenos de la nutrición y dietas en conjunto constituyen una de las tres causas mayor de la carcinogénesis. El conocimiento de la nutrición y de los factores de carcinogénesis puede contribuir para la supresión de la carcinogénesis por su deseliminación y por la práctica de acción anticarcinogénica. La dieta depende mucho del sitio geográfico, de la historia de los pueblos, de la raza y de la religión, y al mismo tiempo de la industria alimentaria, que puede ser un buen aliado en la prevención y lucha contra el cáncer.

El desarrollo de la enfermedad maligna es el resultado de una serie de eventos celulares, progresivamente peldaño tras peldaño. Los carcinógenos de la alimentación y nutrición continúan siendo temas de gran importancia en la investigación del control del cáncer.

No es apropiado discutir el cáncer colorectal sin discutir sus aspectos biomoleculares y genéticos, teniendo también en vista los síndromes hereditario-familiares específicos, así como sus inherencias dado los aspectos fenotípicos, genéticos y toda la heterogeneidad relacionada.

Con este conocimiento emergente reciente, los médicos se sienten comprometidos a obtener no solamente una historia familiar detallada imprescindible, sino a cómo intentar comprender cuáles son los pasos esenciales para su orientación de vigilancia de los familiares del paciente, como elemento complementario de su acción clínico-terapéutica.

Hay necesidad de crear una política sanitaria epidemiológica, que tiene, en parte, que encararse con los síndromes de cáncer hereditario y con cuestiones de genética y comprensión de la maquinaria biomolecular subyacente a la etiopatogenia del desencadenamiento y desarrollo del fenotipo mutante hacia el apareamiento del cáncer con sus señales y síntomas, en el que la curación ya es una incógnita y una incertidumbre.

Hoy ya no se puede esperar por señales y síntomas, pero sí ir al encuentro del advenimiento de las causas del cáncer. La estrategia no es esperar, sino avanzar en el camino al encuentro de las causas y combatir y descubrir el cáncer precoz en la fase de la curación. Todo debe ser hecho en la fase *pré-in situ*, que es el momento en que mejor se puede hablar en curar el cáncer.

El CRC tiene una fase pre-maligna larga y una progresión lenta desde la fase de enfermedad confinada a la pared del órgano, hasta las fases de invasión local y de enfermedad metastásica distante. Por eso, hay una amplia oportunidad para identificar a los pacientes en un estadio curable con la realización de vastos rastreos. En la actualidad, existen métodos de abordaje que sin embargo no son específicos, tales como la indagación de sangre oculta en las heces, o bien aquellos que dependen de técnicas invasivas para visualización directa, tales como sigmoidoscopia flexible, colonoscopia, o enema de bario.

Los recientes avances en química clínica y biología molecular llevaron al apareamiento de nuevas técnicas de abordaje no invasivas, basadas en la propia biología subyacente del CRC. Este abordaje identifica mutaciones que son conocidas por estar asociadas con el CRC en el DNA que es desprendido en las heces por las lesiones malignas y premalignas del colon. La identificación de estas mutaciones en las muestras de heces puede ser usada para la “selección” de pacientes para una colonoscopia, para posterior evaluación y acción diagnóstico-terapéutica.

CAPÍTULO I

1. ALGUNOS CONCEPTOS BÁSICOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

El aspecto definidor de los organismos vivos es su capacidad para multiplicarse por replicación del material genético. Este proceso está sujeto a controles estrictos. En el caso de los organismos multicelulares (como nosotros) la proliferación de células individuales debe estar integrada con las necesidades globales del organismo y por eso sujeta a alguna forma de coordinación. Esto es conseguido sujetando el comportamiento de las células individuales al control de señales emanadas de otras células. El ciclo celular y la muerte celular se sitúan en el centro de la biología celular.

1.1 La estructura y función de las células de mamíferos y sus núcleos

El citoplasma y los organelos nucleares son afectados por la división celular, ya sea activamente, o pasivamente. Está bien establecido que los organelos están intrincadamente implicados en la muerte celular, ya sea ésta la parte desempeñada por lisosomas en la necrosis, o por las funciones centrales particularmente de la membrana celular, las mitocondrias y el daño del DNA nuclear y la ligación de los receptores de muerte de la membrana han sido reconocidos, desde el comienzo, como los “Triggers” de la apoptosis. La evidencia se viene acumulando para sugerir que otros organelos, incluyendo el reticulum endoplasmático, los lisosomas y el aparato de Golgi, sean también puntos mayores para el “signaling” pro-apoptótico y el sentir del daño **(1)**.

La división celular y la muerte celular son dominios en los cuales los métodos moleculares, bioquímicos y de biología celular están a cambiar la luz de cómo el núcleo funciona en relación con la estructura de la célula en general.

Una comprensión de la estructura celular y la función básica de célula y del núcleo en particular es esencial para cualquier estudio de la proliferación y muerte celular, que son la base del conocimiento de la oncogénesis (2).

Aunque el núcleo sea visto microscópicamente tiene subestructuras distintas, estas estructuras son notables por su falta de membranas individualizantes. Aún, hay razones por las cuales estas estructuras deben ser consideradas entidades microanatómicas separadas, principalmente porque ellas contienen grupos de proteínas características y pueden ser morfológicamente caracterizadas con microscopia de luz y electrónica y pueden muchas veces ser aisladas y estudiadas bioquímicamente

En la última década, el concepto de matriz nuclear ha emergido, siendo esta la estructura que resta después de la extracción de las membranas, ácidos nucleicos e histonas. La matriz nuclear comprende la lámina nuclear, la matriz nucleolar (proteínas envueltas en el procesamiento del RNA ribosómico (rRNA)) y una red fibrillogranular (proteínas de la matriz nuclear).

Mientras los compartimentos del nucleolus y del “*splicing factor*”(factor procesador de RNA) son las estructuras nucleares mejor identificadas, la función de otras entidades, tales como los cuerpos de Cajal (“cuerpos nucleares accesorios”) y los pequeños cuerpos nucleares tipo-punto (Incluyendo los cuerpos leucemia promielocitos) permanecen por esclarecer (3).

La cromatina, el RNA mensajero (mRNA) y las proteínas nucleares son moléculas altamente dinámicas dentro de la matriz nuclear y además de ser los “targets” de influencias originándose a partir del citoplasma, exhiben una capacidad auto-organizacional que juega una función substancial en la manutención y operación del ambiente nuclear.

Los cuerpos pre-nucleolares son pequeños, cuerpos fibrogranulares apareciendo en el núcleo durante la telofase para eventualmente fundirse en la región organizadora nucleolar (NOR en la literatura inglesa) para formar nucleolos de la telofases. Hay otros cuerpos (“coiled bodies”, “paraspeckles”, “splicing speckles”) que están, directa o indirectamente relacionados con la actividad del nucleolo (4).

Las proteínas que se pensaba originariamente existieren solamente en el núcleo, o en el citoplasma, navegan de hecho entre los dos compartimentos. Tales proteínas juegan importantes papeles, ya sea como transportadoras en el tránsito entre el núcleo y el citoplasma, o para la transmisión entre los

dos compartimentos celulares mayores. Ellas incluyen receptores y adaptadores de transporte, receptores de las hormonas esteroides, factores de transcripción, reguladores del ciclo celular y proteínas de ligación de RNA.

La naturaleza dinámica del núcleo puede ser estudiada en la cromatina, el RNA, las proteínas y a nivel compartimental (5).

1.2 Proliferación y muerte celular – procesos celulares esenciales y interconectados

En los organismos multicelulares, la proliferación y muerte celular deben estar regulados para mantener la homeostasis de los tejidos. Muchas observaciones sugieren que esta regulación puede ser conseguida, en parte, con el acoplamiento del proceso de la progresión del ciclo celular, con la muerte celular programada, y mediante el uso y control de un conjunto participado de factores (6,7). Un argumento a favor de una ligación entre el ciclo celular y la apoptosis comienza en la evidencia acumulada de que la manipulación del ciclo celular puede prevenir, o inducir, una respuesta apoptótica.

Esta relación ha sido reconocida para los genes supresores de tumores, tales como p53 y RB, el oncogén dominante c-myc y varias quinasas ciclina-dependientes (CDKs en la literatura inglesa) y sus reguladores. Estas proteínas que funcionan en vías proliferativas pueden también actuar para sensibilizar células para la apoptosis.

Mas aún, la proliferación celular desregulada puede resultar en condiciones patológicas, incluyendo neoplasias si no es contrariada por la apropiada muerte celular.

Traduciendo el conocimiento obtenido con el estudio de la conexión entre la muerte celular y la proliferación, se puede caminar en el sentido de identificar nuevas terapias para circunscribir la progresión de la enfermedad cancerosa, o para mejorar la evolución clínica (8).

Los genes envueltos en la proliferación celular (como c-myc, p53 y ciclina D1) han sido encontrados en el juego del papel en la apoptosis.

Green y Evan (9) han propuesto que la desregulación de la proliferación, conjuntamente con la reducción en la apoptosis, ofrece una base que puede ser necesaria y suficiente para el cáncer. Ciertas características secundarias de diversos neoplasmas son una consecuencia de la proliferación celular, la expansión celular y otras consecuencias de esta plataforma común.

1.3 Proliferación celular

La proliferación celular es de los procesos biológicos más fundamentales, altamente organizados y complejos. Los tejidos crecen primariamente a través del aumento del número de células, aunque este fenómeno sea acompañado por aumentos paralelos en el tamaño celular y la cantidad de substancia intercelular.

La división es un proceso fundamental que es requerido en algún momento de la vida de todos los eucariotas.

La proliferación de las células progenitoras ocurre en tejidos embriónicos, fetales, neonatales, juveniles y tejidos maduros. Algunas células, como los neuronios, no se replican cuando hayan llegado a un estado de plena diferenciación. Otras células, tales como las en el riñón e hígado, tienen la capacidad de replicación en respuesta a un daño. El tiempo tomado para un ciclo celular varía entre los diferentes tejidos y especies, tanto en las células en división rápida, como las envueltas en la reparación de una camada epitelial, es de por lo menos 24 horas para una sola división.

Aunque se sepa, por muchos años, que las células tienen la capacidad para crecer y replicarse, los mecanismos actuales envueltos sólo han sido recientemente descubiertos y así mismo, hay un difícil camino para ser descubiertos y explicados.

Hay siempre una fracción de la población celular de cualquier tejido que está activamente ciclando - esta es la fracción proliferativa o de crecimiento. Del mismo modo, hay siempre células que están en descanso o no se pueden dividir jamás. Consecuentemente, es posible definir la fracción proliferativa o de crecimiento como la razón ciclo a ciclo de las células en estado de no ciclo. La

actividad proliferativa depende de la velocidad del ciclo y de la proporción de células implicadas en actividades cíclicas (la fracción de crecimiento).

La división celular envuelve tanto el núcleo (mitosis), como el citoplasma (citoquinesis), para dar origen a dos nuevas células.

El proceso puede ser visto como una reiteración irreversible de una secuencia temporaria precisa de dos conjuntos de eventos: mitosis (fase M) e interfase. La mitosis, es aquella en la cual se observa la división celular, que comprende cuatro sub-fases, que se designan por profase, metafase, anafase y telofase. Entre dos divisiones celulares hay la interfase, cuando el material genético está duplicado. La interfase, durante la cual la síntesis del DNA ocurre, contiene 3 sub-fases- G1, S y G2. Estas fases no son partes distintivas del ciclo celular, pero justamente estadios sin puntos de comienzo, o términos, definitivos para la célula cuando está en estado de ciclo.

Numerosas señales externas pueden iniciar la división celular, incluyendo factores de crecimiento, hormonas, agentes virales y estimulantes artificiales. Una célula se encuentra en una fase quiescente (Go) cuando células viables no están estado de ciclo actual.

El primer propósito del ciclo celular es garantizar que la célula completa rigurosamente la replicación del DNA antes del comienzo de la división celular. El control del ciclo celular asegura que todos los estadios son ejecutados en la secuencia correcta. Todos los estadios deben ser completados antes de ser iniciado el ciclo siguiente. Las células dañadas no tienen condiciones para proliferar sin ser comprobadas. La evaluación de la proliferación se tornó particularmente popular en el estado del fallo del punto de control, tumores y su recurrencia, potencial metastático y crecimiento de metástasis **(10)**.

El control molecular de la proliferación celular está asinalablemente conservado a través de la evolución del ciclo celular. Hay tres grupos principales de proteínas que regulan el ciclo celular: CDKs (cyclin-dependente Kinases), ciclcinas e inhibidores de CDKs). Cascadas de genes reguladores tienen un papel en el control de la división celular. Otras moléculas han sido descritas donde la expresión es indicativa del status del ciclo celular.

“Estatin” es una proteína nuclear, específica de la célula, con efecto non-prolifertivo, cuya presencia puede ser usada para la distinción entre células creciendo y células no creciendo. La terminina, que puede ser usada para distinguir entre células con crecimiento temporariamente y permanentemente frenado, es una proteína citoplasmática que tiene tres formas: Tp-90; Tp-60 y Tp-30. La proteína Tp-90 solamente está presente en células en crecimiento y quiescentes sin crecimiento. La TP-60 es encontrada en las células senescentes mientras Tp-30 es encontrada en células orientadas para la muerte apoptótica **(11)**.

Todo el DNA celular está duplicado antes de se iniciar la mitosis. Esta duplicación es controlada por el enzima polimerase DNA. En las células “mortales”, los extremos de los cromosomas – las llamados regiones teloméricas – no duplican y estas regiones consecuentemente se tornan más cortas después de cada división celular.

Los telomeros en los vertebrados están compuestos de secuencias de seis nucleótidos (TTAGGG) y tienen una función protectora manteniendo las extremidades de los cromosomas intactos. Los telomeros mantienen la estabilidad de los cromosomas y cuando son perdidos el cromosoma reareglá, después de lo que las células paran y eventualmente mueren. En las células “inmortales”, tales como las encontradas en la malignidad, la extensión del telomero es mantenida por la acción del enzima telomerase – este fenómeno es central para nuestra comprensión de la división de las células germinales, hematopoiése, renovación epitelial, longevidad, envejecimiento y cáncer **(12)**.

La proliferación celular en condiciones fisiológicas normales es acompañada por el aumento de la biogénesis de los ribosomas. El nivel de actividad transcripcional está relacionado con la cantidad de rDNA de la maquinaria de transcripción presente en los NORs.

La correlación estricta positiva entre la proliferación celular y la actividad de transcripción de rDNA destaca en el uso de la región organizadora nucleolar argirofílica (AgNor en la literatura inglesa), método para evaluación de la actividad y pronóstico en neoplasmas malignos. Actualmente hay evidencia de que la biogénesis de los ribosomas antagoniza el progreso de ciclo celular hasta que la célula crece a un tamaño adecuado, previniendo la progresión del ciclo celular hasta que la respuesta de crecimiento sea completa **(13)**. También se está tornando evidente que los nucleolos conjuntamente con

los cuerpos “spindle” juegan un papel clave en la inactivación de las CDKs mitóticas y controlan el final del ciclo celular (14).

1.4 Muerte celular

Las células que mueren accidentalmente como consecuencia de agresión degeneran por un proceso descontrolado. Este proceso es llamado necrosis y es caracterizado por un edema y reventamiento de las células conjuntamente con la inducción de una respuesta inflamatoria en los tejidos cercanos.

La apoptosis, por otro lado, es un proceso genéticamente regulado que ha sido descrito por la primera vez hay mas de 30 años (15,16). Ejemplos de apoptosis son vistos a través de los reinos animal y vegetal.

En la necrosis, el DNA nuclear permanece genéricamente intacto, o en degeneración avanzada, tornandose lacerado en fragmentos de diferentes extensiones. Por otro lado, en un cuadro formal de la apoptosis se observa una fragmentación internucleosómica del DNA nuclear que resulta en la producción de oligonucleosomas de diferentes pero distintas extensiones. La diferenciación terminal (desnucleación, un tipo especial de apoptosis), es un proceso en el cual las células pierden sus núcleos pero permanecen funcionales.

Es un tipo único de muerte celular y un buen ejemplo son las fibras en la diferenciación terminal de la “adult. lens”. Las células se transforman con la desnucleación pero permanecen viables como células fibrosas anucleadas (17). Las células en estado de diferenciación terminal pueden ser dirigidas para sufrir apoptosis cuando estén a punto de entrar en un ciclo aberrante.

Estimulación es el primer estadio en la vía de la apoptosis, que puede ser, o no a través de la mediación de receptores. Para que la apoptosis comience la célula necesita primeramente encontrar una señal que activa la maquinaria de control genético. Los mecanismos que están envueltos en la iniciación de la cascada intracelular no están aún completamente esclarecidos, pero la composición del ambiente cercano de la célula está ciertamente envuelta en el comienzo y control de ritmo del proceso.

Varios estímulos externos incluyen choque de calor, infección, ciertas drogas y toxinas, tales como staurosporina, compotecina, ciclohexamida, dexametasona y etoposide. Los factores de muerte de la superficie celular incluyen “Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand /TRAIL”, “receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL)”, *Fas* y miembros de la superfamilia del “tumor necrosis factor (TNF)”.

La estimulación de los receptores de la superficie celular es seguida por una respuesta intracelular que incluye la señal transducción activación de los factores de transcripción y inducción de los genes “apoptosis-related”. La respuesta intracelular culmina en el desmantelamiento y en los procesos de degradación del DNA característicos de la apoptosis.

La expresión de las moléculas de reconocimiento fagocítico en la superficie de las células apoptóticas puede conducir a cualquier estadio de su traslado de los tejidos. Uno de los cambios más precoces en la apoptosis es el movimiento de las moléculas de fosfolípidos cargadas negativamente (fosfatidilserina) del lado de dentro de la membrana celular para el lado exterior. La marcación con “anexina v” en la exposición de la fosfatidilserina es un procedimiento establecido para la identificación de las células en un estadio precoz de la apoptosis **(18)**.

Es posible que los fagocitos reconozcan y eliminen tales células en un estadio precoz, y ha sido descrito el involucramiento de la exposición de la fosfatidilserina y mediación de los receptores de CD14 de limpieza de la clase B en la remoción de las células apoptóticas **(19)**. La quiebra del reconocimiento de fagocitosis lleva a la necrosis secundaria cuando la célula apoptótica se rompe liberando su contenido, asumiendo su morfología necrótica.

Los defectos en la eliminación fagocítica de las células apoptóticas pueden estar implicados en la persistencia de la enfermedad inflamatoria una vez que estas células se tornan necróticas eventualmente, con la liberación del contenido intracelular. Las caspases tienen una importancia fundamental en el proceso de apoptosis **(20)**. Ellas son proteasas de la cisteína que cinden residuos del ácido aspártico.

Por lo menos 14 miembros de la familia son conocidos, muchos de los cuales envuelven la inflamación. Las enzimas caspases actúan en modo de cascada, siendo las caspases 8, 9 y 10 (“long domain”) iniciadoras y están más cerca del comienzo de la cascada, mientras las caspases 3, 6 y 7 (“dominio corto”) son moléculas efectoras de la apoptosis.

La familia de proteínas Bcl-2 regula la integridad de la membrana exterior mitocondrial. La familia es compuesta de dos grupos opuestos, normalmente pro-apoptótico y anti-apoptótico. Los miembros del grupo pro-apoptótico inducen la liberación del citocromo C de las mitocondrias y incluyen Bax, Bak y BIM/BOD. Los miembros del grupo anti-apoptótico previenen la liberación del citocromo C de las mitocondrias e incluyen Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1, A1-BFL-1 y BOO/DIVA. El balance entre Bcl-2 y Bax forma un reóstato apoptótico, que parece determinar la sensibilidad para la apoptosis **(21)**.

Las mitocondrias han estado asociadas con la agresión celular, pero su papel central en la iniciación de la muerte solo recientemente ha sido esclarecido. Así como las mitocondrias están implicadas en la síntesis de la adenosina trifosfato (ATP), modulación del status redox de la célula, regulación osmótica, homeostasia del calcio citosólico y señalización celular, también tienen un involucramiento central en la apoptosis **(22)**.

La disfunción fisiológica y la alteración estructural de las mitocondrias pueden llevar a la muerte celular. La disipación del potencial de la membrana mitocondrial y la liberación del citocromo C de las mitocondrias parecen ser los eventos clave durante la apoptosis. “SECOND MITOCHONDRIAL-DERIVED ACTIVATOR OF CASPASE (SMAC)”, ó DIABLO [Direct IAP (Inhibitor of Apoptosis proteins) Binding protein with Low PI] el homólogo funcional mamífero de la *Drosophila*, regula la apoptosis, por neutralización del inhibidor de las proteínas de la apoptosis y su liberación parece ser regulada por los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 **(23)**.

La muerte celular programada es un proceso altamente regulado, pero sensible como el hilo de una espada, con sus dos bordos – es crucial para los procesos de desarrollo en los organismos multicelulares, pero su pérdida del control de regulación está implicada en un creciente número de

enfermedades, incluyendo la inflamación, la enfermedad maligna y la enfermedad de auto inmunidad y la neurodegenerescencia.

Los genes relacionados con la apoptosis han sido identificados en muchos tejidos y su caracterización rigurosa presenta potenciales “targets” para la intervención farmacológica específica en un ancho arco de enfermedades. Muchas de las condiciones médicas de hoy pueden ser atribuidas directa, o indirectamente, a defectos en la regulación de la de la apoptosis que resultan en una acumulación celular, en que la muerte celular, o el recambio, está impedida, o por pérdida celular, en que el programa de suicidio celular está impropriamente disparado.

La identificación de los genes y los productos génicos que son los responsables de la apoptosis, conjuntamente con la información emergente sobre los mecanismos de acción y las estructuras de la regulación apoptótica y proteínas efectoras, crearon un nivel propicio para el descubrimiento y creación de medicamentos, algunos de los cuales se encuentran ya en evaluación en los estudios clínicos humanos (24).

Es cada vez más aceptada que parte de la eficacia de los agentes quimioterapéuticos convencionales es debida a su capacidad de inducir apoptosis con el objetivo de crear señales de muerte y anular señales de supervivencia.

Hay una amplia variedad de abordajes para la inducción de apoptosis, bajando la regulación de los señales de supervivencia con muchas estrategias alternativas dirigidas contra anomalías moleculares de las células neoplásicas como medio de inducción la apoptosis (25).

1.5 Análisis del ciclo celular

Las células duplican su contenido de DNA durante la fase S y esto ha conducido al desarrollo de varios métodos para determinar en qué punto una célula está en el ciclo celular. El DNA puede ser

colorado cuantitativamente con uno de varios colorantes, por ejemplo PI (propidium iodide), TOTO3, DAP (4, 6 – diamidino – 2- phenylindole), ó Hoechst 33342.

El contenido del DNA puede entonces ser determinado por citometria de flujo, microscopia por fluorescencia, o microscopia de scanner por láser (26). El último método posibilita que el contenido de DNA de las células individuales pueda ser analizado combinando la morfología con la inmunocoloración.

La citometría de flujo, en la cual la coloración del DNA con PI es combinada con el contenido total de proteínas celulares (coloradas con FITC – fluoresceína isotiocianato) posibilita la determinación del porcentaje de células en las fases precoz y tardía del G1 (G1A y G1B), así como en las fases S y G2/M del ciclo celular. Otros métodos mas complejos están siendo usados para distinguir otros aspectos del ciclo celular (27). Algunos citómetros de flujo pueden aislar células con ciertas características (“cell sorting”). Por eso, las células en diferentes fases del ciclo celular pueden ser clasificadas y las proteínas en esas células caracterizadas pueden ser analizadas por “Western blotting”.

Con estos métodos es posible analizar las familias pRB y E2F en células proliferativas (28,29). Métodos similares han sido usados para caracterizar células viables coloradas con el colorante Hoechst 33342 (DNA) y con pyronin Y (colora el RNA) (30).

Tales células pueden entonces ser cultivadas o las proteínas del ciclo celular ser analizadas directamente. El análisis de las proteínas celulares del contenido de RNA fornece una medida indirecta del tamaño celular, que puede también ser determinado por mediciones de FSC (Forward Scatter). Esto es importante cuando una célula tiene que alcanzar un tamaño crítico antes de dividirse.

Recientemente, el aumento del tamaño de la célula que acompaña la transición a través de G1 ha mostrado ser regulado por la cdk4-ciclina D en la Drosophila (31,32) y los ratones con falta de los genes cdk4, ciclina D1, o ciclina D2, son pequeños y revelan tener hipoplasia de ciertos tejidos (33, 34).

Lea y col. sugieren que el mecanismo dependiente similar al de la cdk4/6 regula el tamaño de los linfocitos-T humanos (35). Diferencias en el tamaño de la célula durante el ciclo celular han sido explotadas en otro método que permite el aislamiento de células viables por elutriación centrífuga (36).

Go, G1 y Punto de Restricción – para establecer que una célula está en la fase Go es difícil una vez que no hay marcadores específicos que estén únicamente asociados con la quiescencia.

Por otro lado, hay una serie de características que indican la naturaleza quiescente de la célula. Las células quiescentes, son células que no se dividen, que son capaces de dividirse bajo condiciones específicas. Esto excluye las células en diferenciación terminal, o las células senescentes que han sido perdido, la capacidad para dividirse.

Las células hematopoiéticas quiescentes, como los linfocitos T y B no-activados y las células progenitoras pluripotenciales son pequeñas con más bajo contenido de RNA y proteico que sus contrapartes en estado de proliferación. Este tipo de información es hecho por análisis de citometría de flujo.

Durante la transición de Go para G1 hay un aumento obligatorio en la masa celular y en el número de ribosomas (37), que cuentan extensamente para el aumento del contenido de RNA celular. El ritmo de la síntesis proteica también aumenta debido, en parte a un aumento del factor de iniciación elf-4E (38). Además del perfil del ciclo celular es posible analizar un cierto número de proteínas reguladoras del ciclo celular para confirmar el status Go.

Las células quiescentes contienen p130-E2F-4-DP-1 (39) y/o complejos E2F-6-DP-1-c-myc (40) y fue analizado recientemente que contienen pRB defosforilada (41). La proteína pRB es fosforilada por la proteína cdk6/4-ciclina D durante la transición en la fase precoz G1 (35,41). Eventos de fosforilación pueden ser analizados por algunos, tales como “32P-labelling”, isoelectric focusing o usando anticuerpos específicos del sitio de la fosforilación. A las células quiescentes les faltan las proteínas 2-7(MCM2-7) de manutención de la cromatina asociada al mini cromosoma.

En efecto, las células de muchos tejidos no-proliferativos no tienen todas las proteínas MCM, pero ciertas células especializadas tales como las células acinares epiteliales lumbales de la mama de la mujer pre-menopáusica (42) son excepciones que expresan proteínas MCM constitutivamente.

No obstante estas proteínas no forman complejos (“licensing”) de “replicación original” [origin replication licensing complexes] ligados a la cromatina. Esto puede ser analizado preparando fracciones

de proteínas asociadas a la cromatina de lisados de células, seguido por el análisis wester blot usando anticuerpos específicos de MCM2-7 (35, 47,50, 51,52 y 53). La ausencia de proteínas MCM en las células quiescentes ha sido usada para distinguir entre células neoplásicas y células normales de cervix, próstata y vejiga (43-46). Cuando las células entran en el ciclo celular se tornan más voluminosas (analizado por citometría de flujo) y la pRB se torna fosforilada a través de un número de residuos por medio de complejos cdk4/6 ciclina D. La fosforilación de pRB en las serinas 807/811 es un evento precoz de G1 que puede ser estudiado por “Western blotting” con anticuerpo específico de sitio.

La fase tardía de G1 es caracterizada por el cargamento de proteínas MCM 2-7 y de Cdc sobre el DNA (47), que pueden ser encontrados en la fracción asociada a la cromatina de los lisados de células.

Además las proteínas expresadas por los genes regulados por E2F, tales como p107, cdc2 y E2F1, son inducidas y pueden ser analizadas por *western blotting*.

El punto de restricción es definido como el punto en G1. Después del cual las células pueden entrar en la fase S sin la influencia de factores de crecimiento (48). Este punto divide G1 en dos fases distintas: G1-pm(post-mitosis) y G1-ps (fase pre-S). El pasaje a través del punto de restricción está asociado con una inducción de la ciclina E, que ocurre en la fase G1-ps y justamente antes de la expresión de la ciclina A (49). En este estudio, con la ayuda de una técnica especial de microscopia se obtuvieron datos que permiten mostrar que la ciclina-E es inducida después del punto de restricción. Estos datos indican que la actividad de la ciclina E-cdk2 y por eso la hiperfosforilación de substratos tales como pRB, no son parte de los mecanismos del punto de restricción como previamente se creía.

Las ciclinas E y A pueden ser evaluadas sea por Western blotting o por citometria de flujo con anticuerpos apropiados.

1.6 De cómo las proteínas del ciclo regulan las fases de transición GO-G1-S

Las proteínas que controlan la entrada y progresión a través del ciclo celular son reguladas por un número de modificaciones post-translacionales. Éstas incluyen fosforilación, glicosilacion y acetilación. Cada una de estas modificaciones puede causar cambios en las proteínas tales como: carga, forma

hidrofilicidad y masa, las cuales pueden ser exploradas al distinguir las proteínas modificadas de las no modificadas.

Los mecanismos moleculares envueltos en el control de la entrada en el ciclo celular utilizan proteínas de dos familias: retinoblastoma (RB) y E2F (54). Estas son proteínas importantes que son requeridas para responder a los estímulos mitogénicos y la fosforilación y acetilación de las proteínas son cruciales para regulación de sus actividades. Una célula quiescente (Go) no es capaz de duplicar su DNA.

Ésta tiene falta de proteínas llave, tales como la polimerasa "alfa" DNA, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) y quinasa timidina, que son necesarias también, y no tiene ciertas proteínas, tales como cdc2 y p107, que son necesarias para el control de la transición a través de la mitosis (M). Estas proteínas son sintetizadas cuando las células quiescentes atraviesan la fase G1 por primera vez.

Los niveles de muchas de estas proteínas son mantenidos en un valor constante con respecto al contenido total de proteínas en los ciclos subsecuentes. Por eso, una célula al entrar en G1, proveniente de Go, difiere de una célula en proliferación que entra en G1 proveniente de una mitosis en que la célula entra en la fase G1 proveniente de la fase M que ya tiene cdc2, PCNA y muchas otras proteínas necesarias para el próximo ciclo celular.

La entrada de Go en G1, en respuesta a la activación de las vías de señalización mitogénica lleva a la síntesis de las ciclinas tipo D. Estas por su vez activan las proteínas CDKs, que entonces fosforilan proteínas, tales como los miembros de la familia de proteínas RB.

La proteína retinoblastoma (pRB) es una fosfoproteína nuclear que es progresivamente fosforilada en 16 sitios cuando las células quiescentes progresan a través de G1, alcanzando una forma hiperfosforilada en el límite de la fase G1/S. La proteína pRB es fosforilada en diferentes sitios (55) por una sucesión de proteínas CDKs que son activadas en diferentes tiempos durante la fase G1: por ejemplo, la ciclina D cdk6 y la ciclina D cdk4 en el periodo precoz de la fase G1, seguida por ciclina E cdk2 en la fase media/tardía G1. La proteína pRB partija regiones de homología con dos otras proteínas, p107 y p130, y como la proteína pRB son fosfoproteínas que tienen sitios de consenso para la

fosforilación por las CDKs. Ha sido revelado recientemente que la proteína p130 es fosforilada hasta 21 diferentes sitios **(56)**.

La proteína pRB hipofosforilada liga los miembros de la familia del factor de transcripción E2F **(57)** e este inhibe la activación del gen dependiente del factor de transcripción E2F por dos métodos: el primero es por la inhibición del gen que es controlado por el sitio E2F; el segundo es por la supresión de una región del DNA reclutando una diacetilase histona (HDACi-histone deacetilase) **(58)**.

Esto causa deacetilación de la histona que a su vez altera la condensación de la cromatina y reprime la transcripción. La proteína pRB es también regulada por la acetilación que ocurre durante la transición de G1 para la fase S. La acetilación de pRB retarda su fosforilación y altera su capacidad para ligar otras proteínas tales como MDM2 **(59)**. Cada miembro de la familia del factor de transcripción E2F es compuesto de un “heterodimero” de una proteína E2F (son conocidas de el E2F-1 a E2F-6) conjuntamente con un miembro de la familia DP (DP-1 ó DP-2) **(60-62)**.

Los otros dos miembros de la familia pRB, p130 y p107, también se ligan y reprimen la actividad de E2F. Los diferentes miembros de la familia pRB tienen alguna especificidad para ligar diferentes E2Fs: complejos conteniendo E2F-1, -2, -3 ligan a pRB en vez de p107, mientras E2F-4 o -5 ligan a p130 y p107 preferencialmente que a pRB. Las consecuencias funcionales son que la “super-expresión” de E2F-1, preferencialmente, dominan el paro del ciclo celular por la proteína pRB, y la E2F-4-DP-1 domina el paro causado por la proteína p130. Los factores E2F regulan un cierto número de genes que son necesarios para que las células proliferen (ejemplo: polimerase alfa +DNA, quinase timidina, PCNA o están envueltos en el control de progresión a través del ciclo celular (ejemplo: cdc2, p107).

Entonces, el balance, en particular, entre E2Fs y pRB ó p130 es claramente importante en determinar si una célula prolifera o permanece quiescente. Además, el ablandamiento en el tiempo propio de la represión transcripcional dependiente de E2F dirige la transcripción a través de G1 en la fase S sin inducir apoptosis.

El momento es crítico como, por ejemplo, cuando el aumento de E2F-1 no solamente induce la entrada en el ciclo celular, también causa apoptosis por un mecanismo dependiente de p73 **(63)**.

Los miembros de los factores de transcripción de la familia E2F son también regulados por fosforilación. Por ejemplo, E2F es una fosfoproteína que puede ser fosforilada in vitro solamente por ciertos CDK's y es probable que la fosforilación E2F-1, durante la fase S apaga su activación transcripcional y por eso bajando la regulación de ciertos genes dependientes de E2F que habían sido activados durante la fase tardía de G1 (G1B) cuando una E2F es fosforilada había sido liberada de la represión por pRB. Hay un "checkpoint" durante la fase S que requiere fosforilación de E2F-1 por la ciclina A-cdk (64). En contraste a E2F-1, E2F-4 es múltiplemente fosforilada y la forma hiperfosforilada es predominante en Go (65).

Múltiples formas hipofosforiladas de E2F-4 substituyen esta forma hiperfosforilada cuando las células progresan através de G1 y esta defosforilación puede ser requerida para su activación.

El parejo de DP-1 ligado por estos E2Fs es también una fosfoproteína, que es defosforilada cuando las células entran en el ciclo celular y esto se correlaciona con un aumento en la activación de E2F. Un nivel adicional de silenciamiento transcripcional envolviendo pRB ha sido revelado recientemente. La histona H3, próxima del promotor de genes tales como ciclina A y E que son regulados durante la entrada en el ciclo celular, es metilada en la lisina que por la metilase SUV39H1. Se piensa que esta modificación localizada de la histona ocurre cuando la SUV39H1 es ligada por pRB y que esto causa metilación localizada y no global de la histona H3.

Una tal metilación localizada de histona lleva al silenciamiento del gen (66). Por eso, la modificación post traduccional es altamente importante en la regulación la actividad de las proteínas que están envueltas en la regulación de la entrada en el ciclo celular.

Sin embargo, aunque las interacciones de pRB con E2F son las mejor caracterizadas, pRB se liga a muchas otras proteínas (67). Estas incluyen PU.1, c-Abl, p53, PML y todas las tres clases de polymerases RNA.

CAPÍTULO II

2. DE LA NATURALEZA DE LA ESTRUCTURA DEL GENOMA

El DNA es una macromolécula, una reunión de un gran número de átomos ligados entre ellos, en un arreglo cuya estructura en tres dimensiones puede ser descrita por técnicas tales como la cristalografía por rayos X. El DNA es un repositorio de información, que es una propiedad más difícil para describir en sencillos términos moleculares.

Si un gen corresponde a un segmento particular de DNA, entonces la suma de la información genética que un organismo individual hereda de sus padres es equivalente a la suma de todos los segmentos de DNA presentes en el huevo en el comienzo de la vida. Todos los individuos que constituyen una población de una especie comparten el mismo conjunto de genes, aunque los mismos individuos invariablemente poseen ligeras diferencias (versiones) de muchos de estos genes (alelos). Entonces cada especie de organismos tiene un contenido único de información genética, que es conocido como su genoma. Para los humanos, el genoma es esencialmente equivalente a toda la información genética que está presente en un único conjunto (haploide) de cromosomas humanos, que incluye 22 cromosomas autosómicos y los cromosomas sexuales **X** y **Y**.

2.1 La complejidad del genoma

Para comprender cómo es determinada la complejidad del genoma, es primeramente necesario considerar una de las más importantes propiedades de la dupla helix DNA: la capacidad de separar en sus dos tiras componentes, una propiedad denominada de desnaturación.

2.1.1 Desnaturación del DNA

Como han sugerido Watson y Crick, las dos tiras de una molécula de DNA son juntas por ligaciones flacas, no covalentes. Cuando el DNA es disuelto en una solución salina y esta solución es lentamente calentada, habrá un punto de la temperatura en el cual comienza la separación de las tiras. Con el incremento de más en la temperatura, el proceso queda generalmente completo y la solución contiene moléculas de tira única que están completamente separadas de sus “partners”. El progreso de la desnaturalización térmica (o DNA melting) es usualmente monitorizado siguiendo el aumento de la “absorbencia” del DNA disuelto.

Las bases nitrogenadas de la molécula de un ácido nucleico absorben la radiación ultravioleta con una “absorbancia” máxima próxima de los 260 nm. Una vez que las dos tiras de DNA se han separado, las interacciones hidrofóbicas que resultan de las bases montadas se encuentran enormemente disminuidas, las cuales cambian la naturaleza electrónica de las bases y aumentan su absorbencia de la radiación ultravioleta.

La temperatura en la cual el desvío en la “absorbancia” está en la mitad de su valor se llama temperatura de fusión. Cuanto más elevado el contenido de GC (%G+%C) de DNA, más elevado es el valor de T_m. Esta estabilidad aumentada del DNA conteniendo GC refleja la presencia de ligaciones de hidrógeno extra entre las bases cuando es comparada con los pares AT.

2.1.2 Renaturación del DNA

La separación de las dos hebras del dúplex DNA por calentamiento no es un hallazgo inesperado, pero la “reasociación” de hebras únicas en moléculas de doble-hebra estable con pares de bases correctas parece espantosa.

En 1960, Julius Marmur y colaboradores en la Universidad Harvard verificaron que si ellos enfriasen lentamente una solución de DNA bacteriano que había sido desnaturalado térmicamente, el DNA volvía a ganar propiedades de helix doble; ésta absorbía menos luz ultravioleta y otra vez se

comportaba como material genético capaz de transformar las células bacterianas. Similares resultados fueron obtenidos calentando el DNA hasta 100°C para desnaturar rápidamente bajando la temperatura de la solución hacia aproximadamente 25°C debajo de la temperatura de fusión, y permitiendo al DNA incubarse a esta temperatura por algún tiempo. De estos estudios, se tornó aparente que la complementación de las moléculas de DNA-hebra singular eran capaces de reasociación, un evento designado por renaturalización.

Este fenómeno ha probado ser una de las observaciones más valiosas jamás hechas en la biología molecular.

Por un lado, la renaturalización ha servido como base para la investigación en la complejidad del genoma; por otro lado, llevó al desarrollo de una metodología llamada hibridación de los ácidos nucleicos, en la cual las tiras de DNA complementario de diferentes orígenes pueden ser mezclados para formar moléculas de doble-tira (híbrida).

La hibridación del ácido nucleico juega un papel clave en la más importante moderna biotecnología, incluyendo secuenciación del DNA, clonaje del DNA y amplificación del DNA.

2.2 La complejidad de los genomas de las bacterias y de los virus

Existen varios factores que determinan la fase de renaturalización de una dada preparación de DNA. Ellos son (1) la fuerza iónica de la solución, (2) la temperatura de incubación, (3) la concentración de DNA, (4) el periodo de incubación, y (5) el tamaño de las moléculas. Con estos factores en mente, consideremos lo que puede acontecer de una comparación de la tasa de renaturalización de los tres diferentes DNAs, cada uno constituyendo el genoma entero de (1) un pequeño virus tal como MS-2

(4×10^3 pares de nucleótidos): (2) un virus mayor, tal como T4 ($1,8 \times 10^5$ pares de nucleótidos); y (3) una célula bacteriana, tal como E. Coli ($4,5 \times 10^6$ pares de nucleótidos).

La diferencia primaria entre estos DNAs es su extensión. Para comparar su renaturalización, es importante que las moléculas reagentes sean de extensión equivalente, típicamente con cerca de 1000 pares de bases.

Las moléculas de DNA pueden ser fragmentadas en piezas de esta extensión en varias vías, una de las cuales es forzarlas a través de orificios muy pequeños a una presión elevada. Cuando estos tres

tipos de DNA – todos presentes en las mismas extensiones y concentración de DNA (e.g., mg/ml) – son permitidos renaturarse, ellos lo hacen en tasas diferentes distintas.

El genoma más pequeño se renatura más rápidamente. La razón se torna aparente cuando se considera la concentración de las secuencias complementarias en tres preparaciones.

Porque las tres preparaciones tienen la misma cantidad de DNA en un dado volumen de solución, acontece que cuanto más pequeño es el tamaño del genoma, mayor es el número de genomas presentes en un dado peso de DNA y mayor la oportunidad de colisión entre fragmentos complementares.

2.3 La complejidad de los genomas eucariotas

La renaturación de los DNAs de virus y bacterianos ocurre siguiendo curvas únicas y simétricas. La renaturación ocurre siguiendo tales curvas porque todas las secuencias están presentes (con excepción de muy pocas secuencias en el DNA bacteriano) en la misma concentración. Consecuentemente, cada secuencia de nucleótido en la población está en condiciones de encontrar un “partner” en un dado tiempo como cualquier otra secuencia. Este es el resultado que sería esperado de los varios estudios de mapas de genes, que sugirieron que el DNA de un cromosoma contiene un gen después de otro en un arreglo lineal. Estos resultados en los genomas virales y bacterianos contrastan marcadamente con los obtenidos en el DNA de los mamíferos, como los obtenidos por Roy Britten y David Kohne del California Institute of Technology.

Al contrario de los genomas más sencillos, los fragmentos de DNA de un genoma mamífero renaturan en tasas marcadamente diferentes. Estas diferencias reflejan el hecho de varias secuencias de nucleótidos en una preparación de fragmentos del DNA que los eucariotas estarán presentes en concentraciones marcadamente diferentes. Esta ha sido la primera visión de que el DNA de los encariotas no es justamente una progresión simple de un gen después del otro, como en una bacteria, o un virus, tiene una organización mucho más compleja.

Cuando a fragmentos de DNA de plantas y animales se les permite la renaturación, la curva muestra típicamente una especie de tres peldaños de una escalera, que corresponden a la renaturación de tres extensas clases de secuencias de DNA. Las tres clases renaturan en diferentes tasas porque difieren tanto cuanto el número de sus secuencias de nucleótidos que son repetidos dentro de la población de fragmentos.

Las tres clases de fragmentos (o fracciones) son llamados fracción de repetición elevada, fracción de repetición moderada y fracción de no repetición.

2.4 Secuencias de DNA acentuadamente repetidas (fracción de repetición elevada)

La fracción de DNA de elevada repetición que consiste en secuencias presentes en por la menos ⁵ 10 copias del genoma, constituye cerca de 1 a 10 por ciento del total de DNA. Las secuencias de elevada repetición son típicamente cortas (algunos centenares de nucleótidos en su expresión más larga) y se presentan en agrupaciones en los cuales determinada secuencia se repite más y más sin interrupción. Una secuencia dispuesta de esta manera de punta-con-punta (end-to end) se denomina “in tandem”. Las secuencias de elevada repetición se distribuyen por varias categorías sobrepuestas, incluyendo a) DNAs satélites b) DNAs minisatélites y c) DNA microsátélites.

DNA satélites – consiste en secuencias cortas (cerca de cinco a algunas centenas de pares de bases en extensión) que forman agrupaciones muy grandes, cada uno conteniendo varios millones de pares de bases de DNA.

En muchas especies, la composición de bases de estos segmentos de DNA es suficientemente diferente del conjunto global de DNA cuyos fragmentos que contienen la secuencia pueden estar separados en distintas bandas “satélites” durante la centrifugación gradiente de densidades (esta es la

justificación de DNA satélite). Una especie puede tener más de una secuencia de DNA satélite. Por ejemplo, la *Drosophila Virilis* tiene tres secuencias satélites diferentes, cada una con siete nucleótidos de extensión y todas muy similares en la secuencia, indicando un origen genético común.

La función precisa de los satélites del DNA permanece como un “misterio”. En DNA minisatélites sus secuencias varían desde cerca de 12 a 100 pares de bases de extensión y son encontrados en agrupaciones conteniendo cerca de 3000 repeticiones. Entonces, las secuencias de minisatélites ocupan extensiones considerablemente más cortas de genoma que las secuencias satélites. Los minisatélites tienen tendencia a ser inestables y el número de copias de una secuencia muchas veces aumenta o disminuye de una generación a la siguiente. Como consecuencia, la extensión de un locus minisatélite particular es altamente variable en la población, igualmente entre miembros de la misma familia.

Debido a que presentan una alta variabilidad (polimórfica) en extensión, las secuencias minisatélites son usadas para identificar individuos en casos del foro criminal o de paternidad a través de técnicas de DNA fingerprint.

2.4.1 DNA microsátélites

Son las secuencias más cortas (1 a 5 pares de bases de extensión) están típicamente presentes en pequeños “clusters” de cerca de 10 a 40 pares de bases por casi todo el DNA- más de 100.000 diferentes clases de microsátélites están presentes en el genoma humano. Las enzimas de la replicación tienen regiones de copia perturbadas que contienen estas pequeñas secuencias repetitivas, que causan extensión del DNA para cambiar en extensión a través de generaciones.

Por causa de sus extensiones variables en la población los microsátélites del DNA están siendo usados para analizar las relaciones entre diferentes grupos étnicos de la población humana.

__Muchos antropólogos argumentan que las modernas especies humanas se originaron en África. Si esto es verdad, entonces los miembros de diferentes poblaciones Africanos deberían exhibir mayor variación de la secuencia del DNA que las poblaciones humanas viviendo en otros continentes, porque los genomas de poblaciones Africanas tuvieron más tiempo para divergir. El argumento para la génesis Africana ha recibido soporte de los estudios en las secuencias del DNA humano.

En un estudio que han analizado 60 clases de microsatélites diferentes, ha sido verificado que miembros de las poblaciones Africanas tenían una divergencia genética significativamente mayor que poblaciones Asiáticas y Europeas. Cambios en los números de copias de ciertas secuencias de microsatélites son responsables de varias enfermedades hereditarias debilitantes. Cuando se tornó aparente que los genomas de las células eucariotas contienen un gran número de copias de secuencias de DNA cortas, los investigadores intentarán saber donde estaban localizadas estas secuencias en los cromosomas; sea en un o varios puntos diseminados del cromosoma, o en una parte específica del cromosoma. Es aquí donde se verifica que el descubrimiento de la renaturación llevó a descubrir y desarrollar muchas metodologías de hidridización de ácido nucleico. La capacidad para localizar las secuencias del DNA satélite ilustra el poder analítico de la hidridización del DNA.

En los experimentos de renaturalización, las hebras de DNA complementario permanecían en solución. Mary Lou Pardne y Joseph Gall de la YALE UNIVERSITY desarrollaron inicialmente un protocolo experimental alternativo para determinar la localización del DNA satélite, al cual se designa "*in situ hybridization*". El término "*in situ*" significa "en el sitio" y se refiere al hecho de que el DNA de los cromosomas permanece en su sitio, lo que permite que se una con la preparación particular de DNA marcado. En los primeros estudios de hibridación *in situ*, el DNA para ser detectado (*"probe DNA"*) era marcado radioactivamente y era localizado por autoradiografía.

La resolución de la técnica ha sido incrementada usando las sondas de DNA (ó RNA) que son marcados con colorantes fluorescentes y entonces localizados con un microscopio de fluorescencia. Esta técnica es designada "*fluorescence in situ hybridization (FISH)*", que se tornó tan refinada que puede ser usada para mapear localizaciones relativas de diferentes secuencias a través de las tiras de DNA singulares. Para conseguirse la hibridización del ácido nucleico, ambos interactuantes deben ser hebras sencillas.

En el experimento representado en los cromosomas de una célula mitótica están dispersos sobre un cristal y el DNA es desnaturizado, tratando los cromosomas con una solución salina caliente que causa la separación de las tiras de DNA que permanecen separadas. Durante la etapa siguiente de hibridización los cromosomas desnaturados son incubados con una solución de biotina marcada por el DNA satélite de tira singular, que se liga selectivamente a las tiras complementarias del DNA satélite inmovilizado localizado en los cromosomas. Siguiendo el periodo de incubación, el DNA satélite no-

hibridado soluble es lavado/digerido/retirado y los sitios de las cercanías de los fragmentos de DNA marcados se evidencian. DNA satélite está localizado en las regiones centroméricas del cromosoma.

2.5 Secuencias de DNA repetido moderadamente

La fracción de repetición moderada de los genomas de las plantas y animales puede variar de cerca de 20 a más de 80 por ciento del DNA total, dependiendo del organismo. Esta fracción incluye secuencias que son repetidas, dentro del genoma, en cualquier parte, algunas veces a decenas de millar de veces.

Incluidos en la fracción de DNA, repetida moderadamente, están secuencias que codifican productos génicos conocidos, como RNAs, o proteínas a los que falta una función de codificación.

2.5.1 Secuencias de DNA repetido con funciones de codificación

Esta fracción de DNA incluye los genes que codifican los RNAs ribosómicos así como los que codifican un importante grupo de proteínas cromosómicas, las histonas. Las secuencias repetidas que codifican cada uno de estos productos son típicamente idénticas unas a las otras y localizadas en “tandem”.

Es esencial que los genes codificando los RNAs ribosómicos estén presentes en números múltiples porque estos RNAs son requeridos en grandes cantidades y su síntesis no beneficia el peldaño de amplificación extra que ocurre para los genes, codificando proteínas en que cada mRNA actúa como un molde para la síntesis repetida de un polipéptido. Así mismo, la producción de histonas envuelve un RNA mensajero intermediario, muchas copias de estas proteínas son requeridas durante el desarrollo precoz en que varios centenares de moldes de DNA deben estar presentes.

2.5.2 Secuencia de DNA a las cuales faltan funciones de codificación

La globalidad de la fracción repetida moderadamente no codifica cualquier tipo de producto. Al contrario, ocurre un cluster de secuencias en “tandem”, los miembros de estas familias están dispersos

(i.e. interespaciadas) a través del genoma como elementos individuales. Muchas de estas secuencias repetidas pueden ser agrupadas en dos clases que son referidas como **SINEs** (Short Interspersed Elements), o **LINEs** (Long Interspersed Elements).

2.6 Secuencias de DNA no repetidas

Como el previsto inicialmente por Mendel, los estudios clásicos en los cuadros de herencia de los caracteres visibles, llevaron a los geneticistas a concluir que cada gen estaba presente en una copia por cada (haploide) conjunto de cromosomas. Cuando al DNA eucariótico desnaturado es permitido renaturar, una fracción significativa de fragmentos es mucho más baja para encontrar “partners”, muy lenta, de hecho se presume que están presentes en una copia singular por genoma.

Esta fracción comprende las secuencias de DNA no-repetidas (o de copia sencilla), que incluye los genes que exhiben cuadros mendelianos de herencia. Porque las secuencias están presentes en una única copia en el genoma, las secuencias no repetidas localizan siempre un sitio particular en un cromosoma particular.

Considerando una variedad de secuencias diferentes presentes, la fracción no repetida contiene la gran mayoría de la información genética. Incluida dentro de la fracción no repetida están las secuencias de DNA que codifican virtualmente todas las proteínas, excepto las histonas.

Así mismo, estas secuencias no están presentes en copias múltiples, los genes que codifican polipéptidos son usualmente miembros de una familia de genes relacionados. Esto es verdad para las globinas, actinas, miosinas, colagenios, tubulinas, integrinas y muchas otras proteínas en la célula encariota. Cada miembro de una familia multi-génica es codificado por una secuencia diferente, pero relacionada. Ahora que el genoma humano ha sido secuenciado y analizado, finalmente, tenemos una medida relativamente rigurosa de las secuencias de DNA que son responsables de la codificación de las secuencias de los aminoácidos de las proteínas del ser humano.

CAPÍTULO III

3. ONCOGENESIS Y ALGUNOS FACTORES RELACIONADOS

3.1 Generalidades

Los oncogenes son, esencialmente, genes que son experimentalmente definidos por su capacidad de provocar el fenotipo transformado de las células en cultivo. Las células transformadas son capaces de multiplicarse en condiciones de reducida, o incluso, ausencia de factores de crecimiento exógenos. Estas definiciones son muy simplistas, pero son, en la práctica, útiles para los propósitos de análisis de la actividad de los oncogenes, que representan piezas de la estructura bioquímica de la multiplicación celular.

Para que un gen tenga propiedades funcionales para sustituir señales recibidas de la superficie celular, éste debe tener alguna interacción reguladora específica desempeñando un papel concreto en los procesos normales de proliferación celular. Siendo así, al identificar un oncogén, nosotros encontramos una parte potencialmente importante del mecanismo bioquímico de la multiplicación celular.

El desafío reside en definir exactamente qué papel desempeña el gen en las funciones de una célula normal. En muchos casos, para que un gen sea realmente un oncogén, tiene que poseer algún aspecto específico o verse alterado en alguna actividad.

Lo requerido varía de gen a gen, pero la naturaleza de estas alteraciones también revela potencialmente información significativa acerca de la función habitual del gen en cuestión. Los productos de muchos oncogenes son, realmente, moléculas que son estudiadas en varios capítulos de la biología molecular de una célula en estado de proliferación. Los oncogenes tienen un enorme valor práctico.

Las células transformadas son tumorigénicas y, por eso, por definición, los oncogenes han sido identificados con el estudio de los cambios genéticos en tumores que aparecen en el hombre de manera natural o que han sido inducidos en animales.

Esto significa que la comprensión de la identidad y función de los oncogenes representa una contribución importante para la realización de un diagnóstico y, consecuentemente, la terapia de los tumores.

Existen dos orígenes de oncogenes. Ciertas infecciones por virosis del ADN tienen la propiedad de ser capaces de transformar las células en cultivo ya que están íntimamente asociadas a ellas o porque son la causa de tumores que surgen de manera natural. Estas virosis codifican genes que contienen funciones oncogénicas. Tales oncogenes codificados con ADN de virus no poseen contrapartes en las células hospederas y son requeridos por virus debido a algún aspecto de su ciclo de vida infecciosa.

Las propiedades oncogénicas se originan como una consecuencia de la interacción entre el producto del gen viral y la maquinaria del ciclo celular del hospedero. Como ejemplos de tales genes podemos citar el gen Large T del virus SV40, el gen E1A del tumor asociado a la adenovirus o el gen E6 de las virosis del papiloma humano.

El origen más prolífico de los oncogenes es un conjunto de versiones acerca de las modificaciones que sufren los genes celulares normales. Cualquier gen celular normal que sea susceptible de ser alterado, sea en la secuencia, sea en la expresión para provocar la reproducción celular, en ausencia de factores de crecimiento, es potencialmente un oncogén. Por otro lado, el aislamiento de un gen celular modificado confiere al fenotipo transformado una contraparte normal correspondiente que, en principio, asume el control de la multiplicación celular. De esto se deduce el concepto de proto-oncogén, que se interpreta como la contraparte celular normal de un oncogén.

Los primeros ejemplos de genes oncogénicos han sido descubiertos en asociación con otra clase de virosis: las retrovirosis. Estas virosis tienen un estilo de vida no usual. En su estado infeccioso comprenden un genoma de ARN recubierto de una película de proteína. Cuando el virus infecta una célula, el genoma ARN se copia en la doble tira de ADN por transcripción inversa codificada por el

virus y la copia de ADN del genoma viral se integra en el genoma hospedero. En circunstancias normales, de la transcripción del genoma viral integrado resultan nuevos virus infecciosos.

Conocemos dos tipos diferentes de tumores que están asociados con la infección retroviral. El primero, el tipo más severo, puede ser producido por infección de un animal hospedero con el virus. El clásico ejemplo de este tipo es el virus del sarcoma Rous que induce a sarcomas (tumores de tejidos moles) después de infectar los pollos.

Los tumores inducidos por estas virosis son frecuentemente muy agresivos y matan el hospedero en el plazo de semanas o meses. Estos tumores son también multiclonales en origen; esto significa que el tumor está compuesto por multitud de células que han sido infectadas consecutivamente por el virus.

El motivo por el cual este tipo de virus induce a un tumor es porque, en cualquier momento de la historia de su ciclo vital, se recombinó con el genoma del hospedero y se incorporó a un gen normal del hospedero en su propio genoma. De este excepcional suceso se derivan varias consecuencias; una de ellas es que los genes celulares normales se quedan bajo el control de los elementos reguladores virales. Es posible que, en el proceso de recombinación, el gen hospedero pueda sufrir mutaciones; entonces, como resultado del acto de recombinación con el genoma hospedero, el proto-oncogén hospedero se manifieste de forma anormal y también pueda resultar alterado en su función. El análisis de esta forma de descubrimiento de los proto-oncogenes lleva a concebirlos como los homólogos normales de los genes que se habían recombinado con el virus.

El segundo tipo de tumor asociado con retrovirosis infecciosas es algo diferente. En este caso, el tumor se origina generalmente de un modo lento y puede no aparecer en todos los animales infectados. En algunos casos el efecto de la integración retroviral es heredado de generación en generación y se manifiesta como una predisposición heredada de ciertas especies de ratones para desarrollar tumores mamarios.

Esto es el resultado de la herencia de una copia integrada del Virus Tumoral Mamario en el Ratón (MMTV). Los tumores formados en estas situaciones son todos monoclonales en origen. Esto significa que el tumor se origina en una célula singular fundadora infectada. En estas condiciones, debe haber un proceso adicional antes de que el potencial oncogénico del virus sea liberado. Para que este tipo de virus

llegue a producir un tumor es fundamental que se haya integrado en las cercanías de un proto-oncogen y, como consecuencia, haya adoptado la expresión del proto-oncogen bajo el control de sus propios elementos promotores. La activación transcripcional del gen hospedero por el virus es la que lleva a la formación del tumor. Esto explica, en parte, la larga latencia y monoclonalidad de este tipo de tumor. Además de esto, también se requiere que el virus se integre en un lugar específico que tiene que estar localizado en las cercanías de un proto-oncogén cuyo potencial oncogénico pueda ser activado por alteración en su manifestación.

El método de aislamiento de oncogenes implica su clonación directamente del ADN genómico en virtud de su función oncogénica. El razonamiento que está fundamentando esta hipótesis es el siguiente: si los tumores son el resultado de mutaciones genéticas que llevan a la conversión del proto-oncogén en un oncogén, debe entonces ser posible clonar directamente las secuencias del ADN oncogénico de tumores en virtud de su capacidad para transfectar células normales.

La estrategia experimental básica la encontramos reflejada en un cierto esquema. El ADN es extraído de un tipo específico de tumor y transfectado a una célula target que sea transformación en célula sensible, tal como 3T3.

Este procedimiento origina colonias transformadas raras como resultado de la adquisición de un segmento de ADN con función oncogénica. Entonces, muy probablemente, estas células captarán grandes cantidades de ADN celular normal, esto es, “diluido”, captando ADN de las colonias transformadas y usándolo para la retransformación en un segundo ciclo. Este proceso se repite hasta un segmento mínimo de ADN en transformación por contener el oncogén que puede ser clonado con este procedimiento. Debemos especificar que este abordaje del problema no prueba que el gen aislado haya sido la causa del tumor original.

Existe un cierto número de casos en los que el gen que resulta eventualmente clonado se modifica para adquirir actividad transformadora como una delección/artefacto, o mutaciones adquiridas durante el proceso de transfección. Por ejemplo, un gen normal puede integrarse en las cercanías del ADN como un poderoso promotor o perder alguno de los elementos reguladores negativos en su promoción durante el proceso de integración. Es por esto que decimos que esta técnica identifica genes que pueden transformar células, sea como resultado de una mutación en el ADN del tumor original, sea como resultado de la activación de la expresión en el proceso de transferencia. Un problema más sutil es qué

tipo de genes aislados tienden a reflejar el tipo de célula que se usa como objetivo para la transformación. Usando una diana singular, tal como 3T3, tiende a llevar a la repetición del aislamiento de los mismos genes de entre una amplia variedad de ADNs tumorales. Esto refleja la sensibilidad de la célula objetivo para la actividad del oncogén.

Un aspecto común a muchos tipos de tumores es que presentan cromosomas anormales. En particular, las translocaciones cromosómicas son comúnmente asociadas a tipos particulares de tumores. Esta es una situación en donde un segmento de un cromosoma determinado se divide y se junta con otro.

Lo que es interesante de estos casos son las frecuentes asociaciones entre pares específicos de cromosomas en translocación asociada con un tipo particular de tumor.

Posiblemente, el ejemplo más clarificador sea el del cromosoma Philadelphia encontrado en el 95% de pacientes con leucemia mielogénica crónica y que implica una translocación de un a región del cromosoma 11 de los humanos en el cromosoma 22.

La base subyacente de estos eventos es que, como resultado de una translocación, un proto-oncogén se ha desplazado, sea para la cercanía de un promotor heterólogo, sea porque se haya fundido con una secuencia de codificación de proteína para producir una proteína híbrida. La caracterización de los pares de genes relacionados con relocalaciones cromosómicas, lleva a la identificación de proto-oncogenes que pueden ser activados, tanto por expresión ectópica, como por fusión génica. Es interesante resaltar que muchos ejemplos de fusiones génicas generadas por esta vía produjeron una oligomerización y rotura del proto-oncogén.

Un ejemplo final de identificación de los oncogenes es también el que se origina debido a otro tipo de anomalía cromosómica en tumores humanos. Nos referimos al fenómeno de amplificación de un gen. En esta situación el tumor reveló que había sufrido una amplificación de los segmentos específicos del ADN en los cuales reside el proto-oncogen objetivo. Este proceso debe suceder en presencia de un gran número de copias del gen en la célula transformada.

El fenómeno de amplificación de genes revela una clase muy específica de genes: aquellos cuyas funciones oncogénicas son activadas porque están presentes en niveles más elevados que sus correspondientes contrapartes normales.

La identificación de genes (y sus contrapartes proto-oncogenes), esencialmente revela un componente de la maquinaria del ciclo celular: una proteína que, cuando está sujeta a la activación oncogénica, tiene la capacidad de inducir progresión a través del ciclo celular. El principal interés desde la perspectiva del control del ciclo celular es la comprensión de la función bioquímica de la proteína en cuestión y cómo su conversión oncogénica lleva a la transformación celular.

Una observación más pormenorizada en una muestra de oncogenes identificados por diferentes técnicas revela que no hay un aspecto evidente de que estos genes compartan su capacidad para transformar células. Los oncogenes (y los proto-oncogenes) representan una diversidad de funciones secuenciadas y localizaciones celulares.

Dicho con otras palabras, no hay ninguna explicación para la transformación, o tumorigenicidad. Esto era de esperar por lo ya conocido de los mecanismos de control del ciclo celular. Siguiendo esta línea de pensamiento se clarifica que la mayoría de los oncogenes se distribuyen en cuatro clases funcionales familiares: factores de crecimiento, receptores implicados en señalización celular y factores de transcripción. Llegados a este punto un aspecto relevante a considerar es el mecanismo por el cual un proto-oncogén es accionado y se convierte en oncogén. Esto no solo establece las condiciones bajo las cuales los procesos de conversión oncogénica tendrán lugar, sino que también revelan algo sobre la función ordinaria que desempeña el proto-oncogén y su posición en el mapa de control del ciclo celular.

3.2 Factores de crecimiento

Un cierto número de oncogenes son factores de crecimiento. El oncogén SIS está incorporado en el genoma del virus del sarcoma de los simios y codifica el PDGF – B (“platelet – derived growth factor”). La capacidad del virus del sarcoma de los simios para formar tumores es, por eso, el resultado de la expresión del PDGF-B, bajo el control de los elementos reguladores virales, al contrario de su promotor.

Un cierto número de miembros de la familia FGF-(fibroblast growth factor) – FGFs 3, 4 y 8 – han sido identificados como dianas para la activación transcripcional por inserción proviral de MMTV (virus murino de tumor mamario). En este caso, la integración del genoma viral en la vecindad del gen “target”

FGF resulta en la expresión de FGF bajo el control del promotor viral en la glándula mamaria. Un mecanismo similar está implicado en la activación de la familia Wnt de los factores de crecimiento por inserción proviral MMTV.

Un ejemplo final es el FGF4, que ha sido aislado directamente del ADN genómico, por dos vías: (1) transfección del ADN de los tumores sarcoma Kaposi en las células 3T3; (2) como una consecuencia de su inclusión en una región del ADN que está sujeta a la amplificación del ADN en los tumores del estómago.

De hecho, es muy probable que en ambos casos el aislamiento del FGF4 como un oncogén sea un artefacto que se origine del protocolo experimental al contrario de una reflexión sobre una implicación de FGF4 en el tumor original. El gen FGF4 contiene un cierto número de elementos regulatorios represores fuertes en su promotor que fueron separados de la secuencia que codifica el FGF4 en el proceso de aislamiento del gen. Como resultado, el gen FGF4 “transfected” se encuentra activado transcripcionalmente, lo que es la base de su capacidad para transformar células. Esto viene a ilustrar el principio común de la activación oncogénica de los genes de los factores de crecimiento: - la activación oncogénica casi invariablemente envuelve activación transcripcional del gen, llevando a la producción del factor de crecimiento en un sitio no apropiado.

En efecto, este mecanismo puede ser reproducido experimentalmente, forzando la expresión de los factores de crecimiento en los tejidos adultos, por varios medios. En muchos casos el resultado es la producción de un tumor en las células en que el factor de crecimiento heterólogo está presente. La capacidad de los factores de crecimiento para transformar células, por eso, resulta de un mecanismo autocrino. La célula no depende de señales externas para inducir la proliferación, una vez que es capaz de producir sus propias señales. Hay dos consecuencias intrigantes de este mecanismo de activación. La primera, implica que, en muchos tejidos adultos por lo menos, la justificación por que las células son quiescentes es debido a que están privadas de estimulación de factores de crecimiento apropiado. Segundo, la expresión ectópica de un factor de crecimiento por una célula transformada, o tumorigénica puede estimular la vecindad compuesta por células no transformadas por un mecanismo paracrínico.

Esto puede llevar a muchas de las consecuencias secundarias de la formación del tumor, tales como la fibrosis (producción de una malla de tejido, análogo a la cicatriz alrededor del tumor), o angiogénesis

(inducción de la formación de nuevos vasos sanguíneos cerca del tumor por estimulación de células endoteliales). Estas consecuencias secundarias de la expresión del factor de crecimiento ectópico son frecuentemente significativas en la “historia natural” del tumor en el hospedero.

3.3 Receptores de los factores de crecimiento

Un número significativo de oncogenes contienen la clave definidora de los receptores de los factores de crecimiento. Se trata de proteínas transmembrana con dominios con actividad tirosina quinasa intrínseca en la región intracelular (“intrinsic tyrosine kinase”).

El gen *neu* ha sido aislado (como el nombre indica) de un neuroblastoma inducido químicamente en el ratón por vía de la transfección del ADN. El gen *neu* no es más que el HER-2, un miembro de la familia de receptores EGF. Sin embargo el oncogén *neu* es sutilmente diferente, tiene mutaciones puntuales específicas en el dominio transmembrana. El resultado de estas mutaciones es para inducir el dominio transmembrana domain del receptor HER-2 para sufrir “dimerisation” espontánea.

Un cierto número de receptores del factor de crecimiento han sido identificados en tumores como resultado del proceso de translocación cromosómica que llevan a la producción de fusiones con otras proteínas celulares. Entonces, tanto los genes FGFR-1 (fibroblast growth factor receptor –1”), como el PDGFRB (factor de crecimiento derivado de plaquetas) han sido recuperados de leucemias como fusiones génicas con otro gen, TEL. TEL es un factor de transcripción, que puede parecer extraño a primera vista ya que la fusión de un factor de transcripción con un receptor de factor de crecimiento lleve a una activación oncogénica.

Una inspección de los productos proteicos de estas fusiones da la información. TEL es una proteína dimérica y las fusiones oncogénicas invariavelmente implican fusión de la “dimerisation domain” de TEL con “tyrosine kinase domain” del receptor “target”. Esto lleva a la fusión del dominio de dimerización con el dominio con actividad tirosina quinasa.

El mecanismo esencial de la activación oncogénica de los receptores del factor de crecimiento es la “dimerisation”, forzada como el resultado de una mutación específica o de una fusión del gen. Como

resultado, las vías de “transducción” de señal son activadas sin necesidad de estimulación del factor de crecimiento. En esta situación, la célula transformada actúa como si estuviese recibiendo una señal del factor de crecimiento extrínseco y comienza a reproducirse .

3.4 Transducers de señal

Una de las clases de oncogenes más frecuentemente recuperados son miembros de la familia de genes Ras, de pequeñas proteínas G asociadas a la membrana. Entonces, los miembros de la familia de genes Ras han sido incorporados en los genomas de un cierto número de diferentes retrovirus formadoras de tumores, tales como las virosis de sarcoma de ratones Harvey y Kirsten (éste es el origen del nombre Ras). Los genes Ras también son frecuentemente recuperados del ADN tumorigénico usando la vía de “transfección” del ADN. En todos los casos estos genes Ras oncogénicos se encuentran con mutaciones “point” que directa o indirectamente, eliminan la actividad GTPase intrínseca de la proteína Ras. Mas aún, las mutaciones puntuales de este tipo en los Ras genes aparecen frecuentemente en tumores humanos de muchos tipos ocurriendo naturalmente. El resultado de estas mutaciones es que el Ras está permanentemente activado, independientemente de la presencia de estímulos activadores, por eso está en estado de necesidad de activación por los estímulos activadores. Los genes Ras oncogénicos, por eso, exponen la célula a una señal mitogénica intracelular continua.

Muchas quinasis proteicas intracelulares tienen el diseño clásico de las quinases de los “domains” catalítico y regulatorio en el cual el componente regulador actúa para suprimir la actividad quinasis, excepto si está ligada o modificada, por co-factores.

La desrepresión fisiológica de la actividad quinasis puede ser por eso mimetizada por mutaciones que suprimen las funciones inhibitoras del dominio regulador. Este es un mecanismo común de activación oncológica de los “transducers” de quinasis intracelular. Por ejemplo, el gen Raf ha sido originariamente identificado como un oncogenio transformador del virus del fibrosarcoma del ratón. La incorporación del gen Raf en el genoma viral provocó la rotura de la proteína, promoviendo la activación constitutiva de la actividad de la quinasa y la activación concomitante de la vía MAPK (mitogen-activated protein kinase) “downstream”.

Otra familia de quinasas, cuya posición en la cascada de señalización es menos clara, son las quinasas de tirosina citoplasmáticas asociadas a membrana de la familia Src.

El Src es el miembro prototipo de esta familia de genes y ha sido el gen transformado incorporado en el prototipo de retrovirus transformador, el virus sarcoma Rous. Más aún, el gen Src tiene un status especial en la historia de los oncogenes como el primer proto-oncogén que ha sido identificado en la base de su incorporación en un virus transformador. Todas las versiones oncogénicas del Src se encuentran truncadas o han sufrido mutaciones puntuales, que bloquean un dominio inhibidor N-terminal, lo que lleva a la estimulación de la actividad quinasas. En general podríamos decir que los “transducers” de señal oncogénicos activan las vías de señal intracelular como un resultado de mutaciones que bloquean, o suprimen, regiones de la proteína relacionada con la supresión o atenuación de actividad.

3.5 Factores de transcripción

Se ha encontrado un número considerable de factores que tienen función oncogénica.

El gen fos ha sido identificado como un oncogén transformador del virus del osteosarcoma FBJ y el NFkB ha sido identificado como el gen transformador del retrovirus de la reticuloenteliosis del pavo. En todos los casos, el mecanismo de la activación oncogénica es la introducción de mutaciones que activan constitutivamente las acciones de la proteína, llevando otra vez a una actividad que no necesita de activadores.

En el caso del gen fos el mecanismo de activación parece resultar de “truncations” de las secuencias codificadoras y no-codificadoras del gen cuando ha sido incorporado en el virus. En el extremo 3 del gen se ha introducido una delección que tiene, por la menos, dos consecuencias. Una es para cambiar las secuencias de desestabilización en la región no-codificadora 3 del gen. Esto causa estabilidad en el mensaje fos oncogénico. La segunda es para sustituir un fragmento de la región C-terminal de la proteína normal que parece estar relacionada con la supresión transcripcional de la expresión del gen fos. El resultado combinado de estos cambios es para producir una forma de proteína que se manifiesta así de manera estable y no transitoria durante el ciclo celular normal. En el caso del NFkB la forma

oncogénica de la proteína ha sido truncada en el N-terminal y esto bloquea la asociación con el inhibidor TKB.

De esta manera se consigue la localización permanente del factor de transcripción en el núcleo y la subsecuente activación de los genes diana “downstream” sin necesidad de que sea activado por liberación de señal por mediación del complejo citoplasmático inactivo. Un ejemplo muy intrigante de un factor de transcripción oncogénico es el c-myc. Este gen ha sido frecuentemente recuperado como un oncogén por varias vías: sea directamente incorporándolo en un genoma retroviral transformador, localizado cerca de una inserción proviral en un tumor, o sujeta a reajustes cromosómicos. El último paso es la base subyacente del cromosoma “Philadelphia”, que resulta de la recolocación del gen myc en el “cluster” de genes de inmunoglobulina. El resultado de esta recolocación es para traer al gen myc bajo control transcripcional de los elementos reguladores del gen de la poderosa inmunoglobulina específica de las células B.

En todas estas manifestaciones de acciones oncogénicas del gen myc, los efectos se originan por la elevada presencia del gen normal en vez de la mutación y pérdida de función. Esto es significativo porque, en circunstancias normales de progresión del ciclo celular, parece como si el gen myc se manifestara transitoriamente o estuviera presente en niveles en muy bajos, indicando así que no es normalmente activo, o que sus acciones son ejecutadas en cantidades limitadas de proteínas.

Por eso está claro que el gen myc desempeña algún papel en la progresión tumoral, pero la pregunta es: “¿cuál es ese papel?”. La proteína myc celular normal es un factor de transcripción del tipo “HLH box”, está localizada en el núcleo y (como ha sido demostrado por mutación del dominio de unión DNA transforma las células como resultado de su interacción con el ADN.

Presumiblemente por eso, sus acciones implican la activación (o supresión) de la presencia del gen “target” “downstream”. Un cuadro definidor de los factores de transcripción de la familia “HLH box” es que ellos forman “dimers” con el partner de las proteínas “HLH box” como parte de su mecanismo de acción. El myc, además, es capaz de “to dimer” con otras proteínas partner. May es un partner dimerización del producto génico myc normal y esta parceria es necesaria para el myc para ejecutar sus funciones de transformación. La delección de la dimerización dominio del myc bloquea la capacidad para transformar células. Sin embargo, la situación es complicada por el hecho de que max sea también capaz de compartir con otras dos proteínas de la clase “HLH box”, Mad y Mxil. La formación de estas

parcerias lleva a la ocultación de max y a la inhibición de la parceria transcripcionalmente competente myc/max. Mad y Mxil se encuentran en niveles elevados en células no proliferativas y por eso inihiben la actividad myc.

Cuando las células son inducidas a la proliferación, el nivel de Mad y Mxil declina y la parceria Myc/Max profutiva puede formarse. Bajo este punto de vista, la acción de myc parece ser una manifestación de progreso a través del ciclo celular en vez de una causa.

Sin embargo, este esquema representa una explicación para las acciones oncogénicas de la proteína myc. Los niveles elevados de myc favorecen la inhibición de max por secuerstro de los inhibidores a los que se une, escapando, por eso, del control normal. El myc representa un ejemplo excelente de relación entre la disección bioquímica convencional de los mecanismos de control ciclo celular y el abordage de los oncogenes.

El facto del de que el myc es un oncogén implica que debe estar relacionado con el control del ciclo celular de alguna manera, pero los “downstream” “targets” para la activación myc/max y las señales “upstream” que regulan las funciones myc están aún sin esclarecer. La evidencia reciente indica que un aspecto posible de la actividad myc es la inducción de genes que están implicados en el control del tamaño de la célula – o más estrictamente, del contenido proteico. La expresión forzada de myc en los linfocitos B (como acontecería en células que poseen un gen myc oncogénico) lleva a un aumento del tamaño celular.

Además, el examen de los “targets” genéticos de la activación myc revela que muchos de estos genes que codifican proteínas, están directa o indirectamente implicados en el metabolismo de la célula y en la síntesis proteica, tales como factores de iniciación de la traducción y proteínas ribosómicas.

Las ciclinas (u otros genes) se quedan al el “final” de la cascada de señales pueden, en teoría, ser objetivos claros para la activación oncogénica. La ciclina D es la única de tal diana que está habitualmente asociada con un fenotipo tumorigénico cuando se encuentra amplificada en ciertos tipos de tumor y por eso se presenta en niveles mas elevados que el normal. En efecto, una reflexión posterior sugerirá que las ciclinas y otros componentes de la maquina del ciclo celular son, de hecho, dianas muy pobres para conducir las células a través del ciclo celular una vez que sus funciones esenciales dependen

de su apariencia ordenada y destrucción. Los cambios genéticos que alteran su aspecto pueden ser previstos para tener consecuencias catastróficas para la viabilidad de la célula.

Alterando la función de un gen involucrado en cascadas de señales resulta en una capacidad para liberar la proliferación celular de las señales “upstream”, la producción de señales proliferativas y una célula que, en esencia, prolifera cuando sus contrapartes normales no. Esto se manifiesta en la capacidad para transformar células (especialmente líneas de células establecidas), que es, en una primera aproximación, equivalente a la tumorigénesis. Más aún, muchos oncogenes han sido identificados debido a su íntima implicación en la formación de tumores en animales experimentales o en los humanos. Los oncogenes tienen, casi invariablemente, una de las cuatro funciones genéricas que enumeramos: pueden ser factores de crecimiento, receptores, elementos implicados en la transducción de señales citoplasmáticas o factores de transcripción. Entonces, el proceso normal de control del ciclo celular puede estar sometido a varios niveles diferentes. Es importante resaltar, sin embargo, que todos los mecanismos de control del ciclo celular, susceptibles de transformación oncogénica, se sitúan arriba (upstream) del punto de restricción.

El mecanismo exacto de transformación oncogénica depende enteramente de la función bioquímica de la proteína en cuestión. Pero, hablando en términos generales, esto puede cambiar, sea para liberar (desacoplar) la actividad de las proteínas de las señales upstream, o para prevenir la inhibición de otras proteínas celulares. En otras palabras, los oncogenes son esencialmente activos cuando no deberían serlo.

Finalmente, es curioso contemplar el hecho de que todos los mecanismos de activación oncogénica son, fundamentalmente, de origen genético: implican cambios de codificación del propio gen, o alteraciones en los elementos reguladores transcripcionales que influyen la expresión del gen. Esto puede parecer obvio, pero tiene profundas consecuencias para nuestra comprensión del control del ciclo celular en las células malignas.

3.6 Genes supresores de tumor

Hoy día sabemos que los mecanismos de control del ciclo celular son, esencialmente “activos” en la naturaleza. Esto quiere decir que el progreso a través del ciclo celular implica la activación de una serie de procesos bioquímicos secuenciales. Cada paso depende de la activación previa, de un paso anterior, llevando a la interacción de un factor de crecimiento con un receptor de la superficie celular. Esta idea ha sido reforzada por la acción de oncogenes que, en algún tipo de mutación o alteración de la regulación del gen, activa en diferentes niveles el mecanismo normal de control del ciclo celular. Esta visión es una simplificación muy elemental. Es necesario conocer la identidad y la actividad de los genes cuyas acciones están encaminadas a prevenir el progreso a través del ciclo celular, excepto cuando existen ciertas condiciones. Estos genes, en virtud de sus actividades más específicas, son los denominados genes supresores de tumores.

La idea de la activación oncogénica de un proto-oncogén, por mutación o activación génica, prevería que los tumores que se forman de manera natural se originarían en la cinética de un estímulo singular. Un solo evento, una mutación o una inserción viral, es suficiente para inducir la formación de un tumor. Esto puede verse reforzado por la capacidad de que un único oncogén sea suficiente para transformar líneas de células estables, tales como la 3T3. Esto lleva a prever si un individuo tiene probabilidad de desarrollar un tumor en un período de tiempo equivalente a su previsión de vida. Sin embargo, se sabe perfectamente que, bajo determinadas circunstancias, el proceso de tumorigénesis es más complejo y presenta una cinética derivada de multi-estímulos. Por ejemplo, está claramente determinado que, para muchos tipos comunes de cáncer tales como los de mama, pulmón y colon, la probabilidad de desarrollar un tumor aumenta con la edad. En casos en que la inducción del tumor pueda ser atribuida a la acción de un carcinogeno genotóxico (daño del ADN), tal como radiación o el humo de cigarrillo, hay una relación entre la extensión de la exposición a un carcinogeno y la probabilidad de que aparezca un tumor.

Evidentemente, no todos los individuos expuestos a un carcinogeno van a desarrollar tumores y, además, suele haber un largo período de espera entre el tiempo de exposición al carcinoma y la formación de un tumor. En general, este tipo de datos epidemiológicos sugieren que para la formación de tumores es necesario que ocurran una serie de procesos no sólo un suceso singular. Este concepto se ve reforzado por las conclusiones de estudios experimentales con oncogenes activados en vivo. Por ejemplo, si un oncogén activado está presente en todas las células de un tejido particular, la expectativa anticipa que el tumor resultante puede ser multiclonal en origen, i.e. derivados de todas las células del

tejido de donde el oncogén se ha manifestado. En la realidad, este tipo de experimentos da con frecuencia un resultado diferente.

Los tumores que se originan en presencia de un oncogén activado suelen ser multiclonales en la naturaleza (**i.e.** derivados de una célula fundadora singular) y se originan después de un período de espera relativamente largo. Esto es reminiscencia de la cinética de la inducción tumoral por inserción retroviral e indica claramente que otros eventos extraños adicionales, quizá genéticos en la naturaleza, tienen que acontecer antes de que un gen activado pueda inducir la formación de un tumor.

Observando detenidamente esta situación podríamos decir que la activación de un proto-oncogén no es suficiente para inducir la formación de un tumor en un animal real y concreto y, por tanto, en esta secuencia de sucesos deben existir otros mecanismos en las células normales que inhiben la formación de tumores por oncogenes activados.

La existencia de tales mecanismos puede ser inferida de estudios en cultivos de células. Entonces, si una célula normal (digamos un linfocito o un macrófago) se funde con una célula maligna (supongamos una célula transformada **3T3**), la célula híbrida resultante, que contiene los genomas de ambas parejas, se transforma en un comportamiento no maligno. El genoma de la célula normal, por eso, parece contener información genética que suprime, por algunos medios, la actividad transformadora del genoma de la célula maligna.

Sin embargo, si tales células híbridas se mantienen durante un período de tiempo en cultivo, con frecuencia se puede observar pérdidas de cromosomas y que la composición genética de las híbridas cambia con el tiempo.

Cuando esto acontece, el fenotipo maligno durmiente en las células híbridas puede estar correlacionado con la pérdida de cromosomas específicos o regiones de cromosomas, derivados de parientes no-malignos. Esto indica que la supresión del fenotipo maligno en la célula híbrida se debe a la presencia de información genética en las células híbridas que se deriva de la célula parental normal. En este tipo de experiencias el fenotipo transformado presenta características genéticas recesivas. Este resultado, visto desde la perspectiva de la acción del oncogén, es algo contra-intuitivo. Si analizamos los resultados de un gran número de experimentos realizados con una amplia gama de pares malignos y no

malignos en una gran variedad de especies y los consideramos en conjunto, parecería que existirían múltiples pero no muchas regiones del genoma que tienen la capacidad para suprimir la malignidad en las células híbridas.

Esto indica que la capacidad para suprimir el fenotipo maligno en las células híbridas es propiedad de un número de genes relativamente pequeño y que suele conservarse en función de las especies. Posteriores análisis indican que el fenómeno de transformación celular resulta de la colisión de productos génicos múltiples y también es posible observar la capacidad de los oncogenes para transformar en cultivo células pre-senescentes no estables. Es considerablemente difícil transformar células primarias con la presencia de un único oncogén activado comparado con la relativa facilidad de transformación observada en las líneas celulares estables. Sin embargo, es posible transformar células primarias con razonable eficiencia si se emplean pares de oncogenes. Al testar pares de oncogenes se observa que caen en dos clases o grupos complementarios.

Para transformar una célula primaria se requiere un miembro de cada clase. En el primer grupo se encuentran los “*oncogenes inmortalizantes*” que son los productos de los oncogenes virales del ADN tales como **SV4OLT**, el adenovirus **E1A** y el oncogén *myc*. En un segundo grupo están los derivados de los oncogenes de “*señalización*” clásica por mutación de proto-oncogenes tales como **Ras** o **Src**. Este hallazgo tiene dos implicaciones importantes. Primero, sugiere que la clase de oncogén inmortalizante actúa en vías bioquímicas separadas de aquellas que activan procesos de señalización mitogénica. Segundo, esto implica que el proceso de establecimiento e inmortalización, que invariablemente implica cambios cromosómicos e inestabilidad genética, puede estar mimetizado por la acción de oncogenes inmortalizadores.

Tomadas conjuntamente, estas consideraciones son el resultado de la pérdida o supresión de alguna actividad celular. Esta actividad puede ser suprimida por la acción de oncogenes inmortalizadores derivados de virosis de ADN tumorigénicas, y, presumiblemente, es también inactivada por algunas carencias en tumores que aparecen de forma natural. Todo este proceso descrito hasta ahora evidencia claramente la existencia de algunos mecanismos bioquímicos que evitan que una célula se reproduzca indefinidamente en presencia de una señal mitogénica continua.

Los datos nos hacen intuir que este mecanismo putativo está, en cierta medida, relacionado con la integridad del genoma y que puede ser inactivado o suprimido por desestabilización del genoma o mutación. Lo que es necesario, sin embargo, es tener una pista para identificar qué moléculas están implicadas en este proceso, más que el conocimiento de lo que ellas puedan interactuar o ser reguladas por la acción de genes virales de ADN tumorigénico.

Un posterior avance en la identificación de estos productos genéticos viene del análisis de la base molecular de determinadas mutaciones genéticas. Se trata de ciertas mutaciones que resultan de una predisposición heredada para formar tumores. Estas mutaciones exhiben una penetrancia muy elevada, i.e. virtualmente cada individuo que hereda el gen mutado desarrollará un tumor.

En muchos casos los tumores aparecen en la infancia, lo cual contrasta con la dependencia de la edad de la mayoría de los tumores de la población humana. Finalmente, los individuos que desafortunadamente heredan estas mutaciones, con frecuencia desarrollan tumores múltiples; esto también se contrapone con la mayoría de los tumores que se forman de manera natural.

Dos ejemplos de tales tumores ilustran este punto. El retinoblastoma es un tumor relativamente raro de la niñez, del retinoblasto del ojo y presenta un cuadro claro de herencia mendeliana. Los individuos que heredan el gen de susceptibilidad al retinoblastoma tienen tendencia a desarrollar retinoblastomas múltiples y también muestran una muy elevada propensión a desarrollar otros tipos de tumor durante el resto de su vida.

El síndrome de **Li-Fraumeni** es un síndrome de susceptibilidad de cáncer heredado muy raro en el cual los individuos que heredan la mutación desarrollan múltiples tipos de tumores agresivos en la infancia. En todos los casos el síndrome de susceptibilidad de cáncer heredada está asociado con deleciones cromosómicas específicas, indicando que la base de la predisposición heredada es la pérdida de regiones particulares de información genética. Si suponemos que un gen localizado en la zona de falta de ADN está relacionado con la inhibición del proceso de formación tumoral, esta consideración nos lleva a la hipótesis de doble estímulo la cual sugiere que, para que un tumor se forme, las dos copias de un gen *target* deben ser inactivadas por mutación.

Por lo tanto, en individuos normales, deben darse dos mutaciones inactivadoras, una en cada copia del gen. Sin embargo, un individuo que hereda un gen que ya haya sufrido la mutación de pérdida de

función requiere solamente una mutación adicional singular en la otra copia del gen para que el tumor se origine. Esto dará origen a una situación en la que la formación tumoral dependía de una lesión genética singular, de ahí la explicación inicial y la caracterización del fenotipo como altamente penetrante.

Esta hipótesis supone predecir que si el gen target puede ser identificado, una copia sería mutada en el tejido normal y ambas copias serían mutadas en el tumor, lo que ya ha sido confirmado. Los síndromes de retinoblastoma y Li-Fraumeni son excepcionales, pero son casos bien definidos de genes mutados heredados que conducen a la formación de tumores. Esto sirve para cuestionarse en qué medida esta idea es aplicable a la mayoría de los tumores en que no es posible discernir un cuadro obvio de herencia mendeliana estricta.

Un examen detallado de *clusters* de tipos específicos de tumor dentro de familias ha llevado a la identificación de genes adicionales que confieren susceptibilidad a la formación de tipos específicos de tumor; Dos ejemplos son **BRCA1** y **BRCA2** (para el cáncer de mama asociado); estos son genes que se encuentran mutados en cerca del 5% de mujeres con cáncer de mama precoz. Parece probable que las mutaciones de estos genes no sean completamente determinantes (*i.e.* ni todos los individuos que heredan la mutación desarrollarán un tumor) y que, ciertamente, estos dos genes solos no pueden contar para la mayoría de los tumores de mama que ocurren en la población, implicando que otros genes permanezcan por identificar.

No obstante, sirve para ilustrar el supuesto de que las mutaciones inactivantes en un conjunto crucial de genes diana pueden ser las responsables de la mayoría, sino de todos, los tumores que surgen de manera natural. Considerando toda la evidencia precedente en conjunto, nos conduce a la idea de que hay actividades dentro de la célula que deben ser inactivadas por algunos medios para que una célula se reproduzca indefinidamente. Éstas deben estar codificadas por genes supresores de tumores.

Existen dos vías prácticas para la identificación de los genes supresores de tumores que se deducen de la evidencia acumulada. La primera sería para identificar los componentes celulares que interactúan con productos génicos virales del ADN tumorigénico, y el segundo sería clonar genes que son delectados, o mutados, en síndromes de susceptibilidad de cánceres heredados. Es muy gratificante verificar que ambas vías convergen en los mismos productos génicos.

Esto confirma la sospecha de que hay un número relativamente bajo de productos génicos con funciones supresoras de tumores.

3.7 Gen retinoblastoma (RB)

El gen diana (llamado **Rb**), que está apaciguado en individuos con susceptibilidad heredada de retinoblastoma, ha sido aislado por métodos de clonación “*positional*” (?), que en muchos casos de retinoblastoma implica deleciones cromosómicas de pequeñas regiones. Se ha confirmado rápidamente que este gen era, asimismo, responsable de todos los casos examinados de retinoblastoma heredado y gracias a esta información crucial, las previsiones básicas de la hipótesis del doble estímulo pudieron ser confirmadas. Los individuos de riesgo heredaron una copia mutada singular del gen, y tumores derivados de estos individuos tenían mutaciones inactivadoras o deleciones en ambas copias del gen. Más aún, la introducción de un gen **Rb** salvaje en células tumorales derivadas de pacientes con retinoblastoma ha sido capaz de restaurar el crecimiento normal. Finalmente, se ha verificado que el gen **Rb** estaba mutado en una variedad de tumores adultos espontáneos, indicando que podría estar relacionado con otra gama de tumores a parte del retinoblastoma.

El gen **Rb** codifica una fosfoproteína localizada en el núcleo de masa molecular *110kda*. El producto génico **Rb** forma un complejo con las proteínas oncogénicas virales de ADN **SV40LT**, **E1A**, **HPV E6** en células infectadas viralmente. El sitio de interacción con las oncoproteínas virales ADN es el dominio que ha resultado ser el punto mutado en algunos mutantes de inactivación del gen **Rb**. Esto implica que esta región de la proteína **Rb** puede ser significativa para sus funciones supresoras de tumor y el propósito de la asociación entre los productos génicos virales y el “*pocket domain*” puede ser para inactivar, o inhibir, la asociación del **Rb** con las proteínas celulares normales. Esto llama la atención de la identidad de los componentes celulares que interactúan con **Rb**.

Un cierto número de proteínas interactuando con **Rb** han sido identificadas por diferentes vías. Un partner importante es el factor de transcripción, **E2F**, una familia multigénica de proteínas, que, en asociación con un factor **DB** partner de heterodimerización puede activar la expresión de un cierto número de genes implicados en el mecanismo de la síntesis del ADN, tales como la dehidrofolato reductasa, el antígeno nuclear celular proliferante (**PCNA** – antígeno nuclear de proliferación celular subunidad de la polimerasa de ADN y, significativamente, el gen ciclina **E**. Esto indica que el **E2F**

participa en la coordinación del comienzo de la fase **S** por activación transcripcional de la maquinaria de síntesis del ADN y de la activación de la actividad de la **CDK** la fase-**S**. Más consistente aún con esta idea es la presencia forzada prematura. ¿Cuál es la función del complejo **E2F/Rb** El **E2F** se liga al **Rb** vía “pocket domain” y es, por eso, presumiblemente liberado en presencia de oncoproteínas virales ADN. Esto sugiere que el complejo **E2F/Rb** actúa para suprimir la transcripción de los promotores dependientes de **E2F** y que, para que la fase **S** ocurra, esta supresión debe atenuarse. La interacción de **Rb** con **E2F** bloquea la llamada activación del “*domain de E2F*”, que es necesaria para la activación de dependiente de **E2F** de los promotores “*downstream*”. El **E2F**, en efecto, atrapa la proteína **Rb** a los promotores dependientes de **E2F** en forma de un complejo transcripcionalmente silencioso. La supresión de la transcripción es posteriormente facilitada por el reclutamiento de la histona deacetilase en el complejo vía asociación con **Rb**. Esto sucede en el “*assembly*” del nucleosoma en las cercanías de los promotores dependientes de **E2F** y la supresión de la posición específica de la transcripción.

El complejo entre **Rb** y **E2F** debe por eso ser disociado o inactivado de alguna manera para que la actividad de **E2F** se manifieste y la fase **S** pueda proseguir. Esto, a su vez, indica que la función **Rb** debe ser controlada por alguna forma de mecanismo regulador dependiente del ciclo celular. Un examen más pormenorizado de la proteína en poblaciones celulares sincronas revela que, inmediatamente antes del comienzo de la fase **S**, ésta es fosforilada en un cierto número de sitios, incluyendo el “pocket domain”. Esta fosforilación es mediada por el **complejo ciclina D/CDK** y resulta en la activación de la actividad de **E2F** presumiblemente por disociación del complejo represor **E2F/Rb**. En esencia, el **Rb** actúa para bloquear el programa de expresión génica necesario para el comienzo de la fase **S**, por represión transcripcional de los promotores dependientes de **E2F**. Esta actividad inhibitoria puede ser atenuada por mutación y pérdida de la función de **Rb**, en asociación con oncogenes virales ADN, o en el curso del progreso del ciclo celular normal, por fosforilación o por activación de los complejos **CDK** activos. En este contexto, la **Rb** parece una “*puerta*” y el final de la fase **G1** e impide el progreso a través del ciclo celular excepto si se abre por la actividad de las **CDK/ciclinas**. El bloqueo de la actividad de **Rb**, por eso, desplaza una barrera para progresar a través del ciclo celular.

Aunque este razonamiento nos dé una explicación persuasiva para saber cómo puede resultar la delección del gen **Rb** en la propensión para formar tumores, está claro que hay aspectos de la función **E2F/Rb** que quedan sin ser comprendidos. La ablación genética de **E2F** puede ser prevista y tener consecuencias fatales en función de su papel en la entrada en la fase **S**. De hecho, los ratones con esta

ablación son viables y fértiles, pero presentan una probabilidad aumentada de desarrollar tumores en la fase tardía de la vida. Basándonos en estas observaciones, el **E2F** parecería paradójico que nos mostrara las propiedades esperadas de un gen supresor de un tumor. Esto puede reflejar la acción de otros miembros de la familia **E2F** en los ciclos celulares “normales”, o que el papel de **E2F** se manifieste solamente bajo condiciones celulares específicas. Además, los ratones que son genéticamente deficientes en **Rb** de hecho mueren durante la gestación como resultado de la dramática muerte celular en los sistemas nervioso y hematopoiético. Esto indica que, como con **E2F**, la función **Rb** no es aparentemente necesaria en cada ciclo celular y, **Rb** puede tener otras funciones en el desarrollo y diferenciación vía asociación con **proteínas no-E2F**.

3.8 p53

El segundo ejemplo que debemos examinar es un gen supresor de tumor, que debemos examinar es el **p53**, denominado así en base a su descubrimiento como una proteína celular normal de masa molecular 53 KDa, fuertemente asociada con el producto oncogénico viral de ADN **SV40LT**.

Consecuentemente también se ha encontrado que interactúa con los oncogenes virales ADN codificados por las virosis del papiloma humano. En base a estos conocimientos, el **p53** podría ser considerado un candidato a gen supresor de tumor. Esto ha sido firmemente establecido cuando fue descubierto que el síndrome **Li-Fraumeni** pues resultaba de la herencia de una mutación del gen **p53**. Además, la mutación del gen **p53** (sea por deleciones, o mutaciones puntuales) es un cuadro extremadamente frecuente de muchos (pero no todos) los tumores que se forman naturalmente. Más aún, hasta en un 85% de los cánceres de mama, pulmón y colon se han reconocido mutaciones del gen **p53**. Finalmente, los ratones que son genéticamente deficientes en el **p53** presentan una mayor propensión para desarrollar tumores, especialmente en respuesta a agresiones genotóxicas, tales como carcinogénos químicos, radiación ionizante. Vista en conjunto, esta información evidencia claramente que la función **p53** normal actúa como “protectora” contra la formación tumoral, pero su actividad no es probablemente necesaria para todos los ciclos celulares. Interesa, entonces, saber cual es la función de **p53**.

La presencia forzada de la proteína salvaje **p53** en las células lleva al ciclo celular a detenerse antes de fase **S** y eventualmente a la muerte celular. Es, por eso, una proteína cuyas funciones normales son de parar la proliferación celular y de la muerte celular. Es, por eso, importante saber como el **p53** ejecuta esta función. La **p53** salvaje es una proteína localizada en el núcleo encontrada en forma de tetrámero. Puede considerarse que comprende tres dominios funcionales. La región C-

terminal es necesaria para la oligomerización de la proteína y se liga preferentemente a la hebra única de ADN o a las terminales del ADN. El dominio central participa en la secuencia específica de reconocimiento del ADN y su afinidad para el ADN es modulada por la fosforilación de, o unión del ADN con, el C-terminal dominio (carboxilo terminal). Finalmente, la región N-terminal de **p53** interactúa con otras proteínas celulares requeridas para la activación transcripcional y es otro objetivo de los eventos de fosforilación reguladores.

Sobre esta base consideramos que el **p53** es un factor de transcripción de unión a una secuencia específica del ADN cuya actividad es facilitada por la asociación con fragmentos de hebra única de ADN y acompañantes celulares. Más aún, muchas mutaciones de **p53** que ocurren de forma natural, inhiben la ligazón de ADN por medios directos o indirectos y la oncoproteína **SV40LT** bloquea el “*DNA-binding domain* del **p53**”. Las funciones de supresión del ciclo celular del **p53** deben, por eso, resultar de su capacidad para regular la transcripción genética. Interesa, pues, saber como actúa el **p53** en el papel de gen supresor de tumor.

Quizá, no sorprendentemente, desde el punto de vista de sus funciones biológicas, la presencia de **p53** es muy baja en tejidos normales debido, entre otras cosas, a un recambio muy elevado de la proteína en condiciones normales. De hecho, en muchos casos, la proteína **p53** es solamente detectada en células que proliferan muy rápidamente (*i.e.* tienen una elevada proporción de población en la fase **S**), o en células normales en donde un pico transitorio de aparición es detectado en el comienzo de la fase **S**. Sin embargo, los niveles de **p53** en la célula son dramáticamente elevados en respuesta a los tratamientos que producen lesión del ADN, tales como exposición a radiaciones ionizantes, carcinógenos genotóxicos, y, quizá desgraciadamente, agentes quimioterapéuticos dañinos para el ADN del cáncer como la adriamicina.

Este hallazgo prevé una clave vital pues sugiere que **p53** actúe como “el guardián del genoma” – en otras palabras, **p53** es un gen que es inducido en respuesta al daño del ADN y actúa para bloquear la progresión del ciclo celular. Bajo estas circunstancias, las células con daño genómico no pueden dividirse y la acción de **p53** suprime la acumulación de reajustes cromosómicos y futuras mutaciones. Si se repara el daño del ADN los niveles de **p53** caen y progresan de modo que el ciclo celular prosigue. Si el daño de ADN no es reparado, el **p53** eventualmente actúa para matar la célula. En

otras palabras, el **p53** es un mecanismo central que controla la integridad del genoma en cada célula y actúa para evitar que la célula contenga reajustes en posteriores reproducciones.

De esto se deriva que una pérdida de la función de **p53** debe llevar a la inestabilidad del genoma y a la acumulación de mutaciones. Debemos prestar atención a que éste es uno de los puntos clave de las líneas de células estables, como base de muchos tipos de activación de proto-oncogenes.

El **p53** es, por eso, un factor de transcripción que tiene capacidad para detener el progreso del ciclo celular cuando está presente en niveles apropiados en células con el ADN dañado. Esta inhibición del progreso del ciclo celular (y muerte celular) puede estar mediatizada por genes “*target*” para transactivación de **p53**. Se ha invertido un esfuerzo considerable en la identificación de genes cuya transcripción es regulada por el **p53**. Un “*target*” para la inducción del **p53** es una proteína llamada **GADD45**. **GADD45** que se liga al **PCNA** (*proliferating cell nuclear antigen*), que es inducida por **E2F**, una subunidad reguladora del complejo de polimerasis de ADN.

La asociación de **GADD45** con **PCNA** tiene la propiedad interesante de bloquear la actividad de la polimerasis de ADN en la replicación del ADN, pero no en la reparación. En teoría, el efecto de la presencia de **GADD45** debe, por eso, servir para parar la replicación del ADN pero no para su reparación. Dentro de los productos génicos **p53** –inducibles más significativos está el **p21** (también conocida como *Waf1*), que parece ser el agente responsable de muchos efectos de la manifestación del **p53** sobre el progreso del ciclo celular. La expresión forzada del **p21** en una célula proliferativa induce una parada del progreso del ciclo celular que es muy similar a la inducida por **p53**. La proteína **p21** es un inhibidor **CDK** que bloquea la actividad de las **ciclinas/CDK**, ligándose al complejo **ciclina/CDK** de una manera que bloquea el dominio de activación del **CDK**. El resultado inmediato de la acción de **p21** es bloquear la fosforilación del complejo **E2F/Rb**, cuyo efecto cierra la puerta de entrada en la fase **S**, y bloquea el complejo **ciclina E/CDK**, por eso también bloquea la organización de las funciones de la fase **S**.

Los efectos biológicos de **p53** son mediados por asociación con otras proteínas celulares que se asocian con el dominio de activación del N-terminal. Como ya se ha mencionado anteriormente, el **p53** se asocia con el antígeno **SV40LT** en las células infectadas por el virus, pero también se ha encontrado que **p53** se liga a otras dos oncoproteínas virales de ADN. El adenovirus **E1A** se liga al “domain” N-terminal de transactivación de **p53**, desactivando, por eso, las funciones de activación

transcripcional de **p53**, y el gen **E6** del papilomavirus humano puede también ligarse con **p53**, promoviendo su degradación. Por analogía con la asociación de oncoproteínas virales con **Rb**, antes descritas, se puede presumir que la función de las proteínas virales es generalmente para desactivar la actividad de **p53**.

En este caso, presumiblemente para promover el proceso de replicación del ADN viral durante el ciclo infeccioso. Del mismo modo puede suceder también que las proteínas virales compitan en la ligazón con las proteínas celulares normales. Estudios *in vitro* han revelado que un cierto número de proteínas se ligan a **p53**. Estas incluyen helicasis de ARN y elementos del aparato transcripcional basal. Sin embargo, un potencial partner significativo del p53 es la proteína **MDM2** (*mouse double minute*). Esta ha sido originariamente identificada en sarcomas murinos como un oncogén putativo activado por amplificación génica. La proteína **MDM2** se liga al “*domain*” de transactivación del N-terminal de **p53** y bloquea sus funciones biológicas. La activación de la proteína **MDM2** por amplificación génica sugiere que ésta ejerce sus acciones por secuestro la proteína **p53** biológicamente activa, simulando por eso la **p53**, desactivando mutaciones. Además, la **MDM2** es también un “*target*” para la inducción del gen **p53**, sugiriendo la existencia de alguna forma de *loop feedback* inhibitor, por inducción de **p53**, debido a la presencia de **MDM2** que revierte el control inhibitor ejercido por **p53**.

La **MDM2** puede también estar implicada en la modulación de funciones de **p53** bajo condiciones fisiológicas normales, una vez que los ratones deficientes en **MDM2** mueren rápidamente después de criarse el modo dependiente del **p53**.

Esto sugiere que una función de **MDM2** es para neutralizar un efecto tóxico potencial de **p53** en el desarrollo embrionario.

El modelo global para la acción de **p53** por eso, sugiere que la función de transactivación sea activada con la exposición sobre la hebra única de ADN, o las terminales del ADN. Esta situación puede darse tanto durante la estimulación de la replicación en el esquema de síntesis del ADN programada como por un resultado de lesión no programada del ADN. La activación de **p53** ocurre vía dos mecanismos: el primero es la estabilización de la proteína debido a que se atenúa el efecto de la destrucción de **p53** mediada por **MDM**; el segundo, es también evidente que la función de **p53**

requiere fosforilación y que las pruebas recientes así lo indican ya que esto ocurre vía activación de proteínas quinasis que son reclutadas para regiones de ADN dañado.

Pudiera ser que estas quinasis también tuviesen una función genética supresora de tumor, una vez que la incapacidad para fosforilar **p53** provocaría una pérdida de la función de **p53**. Por consiguiente, podemos añadir que un cierto número de genes supresores de tumores, tales como **BRCA1**, **CHK1** y **ATM**, participan en la vía llevando a la fosforilación de **p53**. Finalmente, los dos mecanismos concurren en que la fosforilación de la región N-terminal de **p53** bloquea la asociación con **MDM**. Como consecuencia de la activación **p53**, un cierto número de genes “*target*” *downstream*; incluyendo **p21** y **GADD45**, son activados transcripcionalmente. La actividad colectiva de estos genes participa en la detención del progreso a través del ciclo celular. Cuando la reparación del ADN está completada, la degradación de **p53** aumenta, los niveles de la proteína **p53** caen y progresan a través del ciclo celular que recomienza. La proteína **p53** puede, por eso, considerarse como un ejemplo de una proteína implicada en puntos de control del ciclo celular, cuya función primordial es suprimir el control del ciclo celular en fases críticas y prevenir la propagación de las células con lesión del ADN.

Se puede interpretar, por tanto, que **p53** en cuanto que no es necesaria para el progreso de la célula, debe estar íntimamente relacionada con el engranaje del ciclo celular. Una consecuencia a largo plazo de la inhibición de la función de **p53** es la acumulación de alteraciones genómicas, incluyendo mutaciones y reajustes que llevan a la activación del oncogén. Los medios por los cuales **p53** consigne la detención del ciclo celular están por explorar, vía **p21**, la maquinaria del ciclo celular central **ciclina/CDK** e, indirectamente, las acciones de otro gen supresor de tumor, **Rb**.

3.9 Inhibidores CDK

El inhibidor **CDK** inducido por la **p53** es un miembro de una familia más grande de proteínas con funciones de inhibición de **CDK**. Todos los inhibidores **CDK** causan la detención de **G1** cuando su presencia es muy elevada en células transfectados. Esto es, en efecto, una versión forzada de senescencia prematura. Podemos decir que la pérdida de la función inhibidora **CDK** también previene de que las células entren en senescencia y se vuelvan susceptibles de transformación ante un estímulo único, por oncogenes activados.

La pérdida de la función inhibidora **CDK** por mutación, o inhibición, por oncogenes virales del ADN es por tanto un evento bioquímico de gran relevancia para el fenómeno de estabilización de la célula. La inducción de la función inhibidora del **CDK** también provee la base para la detención del crecimiento reversible inducida por la familia **TGF β** (factor transformante beta). Debería, pues, estar previsto que esta clase de proteínas presentarían una función supresora de tumor. Además, el bloqueo, directo o indirecto, de las vías inhibitoras de **CDK** prueba ser un tema central en la actividad de los genes supresores de tumor. La proteína **p21** es el miembro prototipo de la familia **Kip** de los inhibidores **CDK** cuyos otros miembros son **p27** y **p57**. La diferencia entre estos inhibidores reside en la especificidad de los miembros de la familia **CDK** que son inhibidos por **p57** y **p27**, ya que presentan inhibición **CDK** de amplio espectro, mientras que la inhibición de **p21** está restringida al complejo **CDK4/ciclina D** de la fase **G1**.

Podemos mencionar que existen pruebas evidentes de que la actividad de **p27** juega un papel normal en el control del ciclo celular. Los niveles de la proteína **p27** se mantienen elevados en las células quiescentes pero bajan cuando las células son estimuladas para progresar a través del ciclo celular. Los ratones que son genéticamente deficientes en **p27** son más grandes que sus contrapartes normales como resultado de un número aumentado de células en cada órgano, indicando que la actividad de **p27** está relacionada con la regulación de la masa de tejido en el desarrollo normal. La **p27** posee todos los indicadores de un gen supresor de tumor clásico, una vez que los ratones deficientes en **p27** son también susceptibles a la producción de tumores en la pituitaria.

La segunda familia de inhibidores **CDK** son la familia **inK4, p16, p18 y p19**; estos son inhibidores específicos de las quinasis **CDK4** y **CDK6** dependientes de las ciclinas en la fase **G1**, que realizan funciones esenciales en la regulación de la función de **Rb**. El **p16 inK4A** es un gen frecuentemente mutado en muchos tipos de tumores humanos y debe mantenerse en una posición junto con la **p53** como un “*target*” primordial para mutaciones en el cáncer humano. Es poco frecuente que el gen **p16** pueda ser traducido en dos estructuras de lectura alternativa para producir dos productos génicos diferentes: la proteína **p16** inhibidora de **CDK** y una segunda proteína **p19 ARF**, una estructura proteica de lectura alternativa que también bloquea la proliferación celular. La **p19ARF** actúa directamente en la función de **p53** vía inhibición de la acción de **MDM2** con la consiguiente activación de las funciones de detención del crecimiento de **p53**.

El análisis genético de la malignidad ha revelado la existencia de vías adicionales que regulan la progresión del ciclo celular que se manifiestan de dos formas. Una es el bloqueo de la entrada en la fase **S**, como el ejemplificado por la actividad de la proteína **Rb**. Este bloqueo debe ser atenuado para facilitar el progreso en la fase **S** y su transcurso por el resto del ciclo celular. La segunda es la existencia de puntos de control que, aunque no son esenciales para la progresión a través del ciclo celular, tienen la capacidad de bloquear el proceso de lesión del ADN.

Ambos caminos centran su acción sobre la supresión de las vías **CDK** del engranaje del ciclo celular.

La mayoría de las malignidades implican, directa o indirectamente la desactivación de las vías bioquímicas que inhiben la actividad de las **CDKs**. La función de los oncogenes activados de promover la proliferación celular indefinida solamente puede ser revelada cuando estas vías han sido desactivadas. Esto crea una base mecanicista para la comprensión de la necesidad de mutaciones múltiples para que se produzca el proceso de la malignidad.

El análisis de la función del gen supresor de tumor también ha revelado una conexión íntima con los procesos que conducen a la activación de proto-oncogenes por mutación o reajuste del genoma. Esto es debido al hecho de que todo el proceso está regulado por mecanismos de control de checkpoints, como el ejemplificado por la proteína **p53**. Estos mecanismos bloquean el progreso del ciclo celular cuando la lesión del ADN se produce en la vía del inhibidor de **CDK** y en la intervención directa en el mecanismo de replicación del ADN. La sustitución de los controles de los *checkpoints* permite la desestabilización de la integridad genética y promueve la propagación de mutaciones y de reajustes del genoma; esto lleva inevitablemente a la activación del proto-oncogén y promoción del crecimiento celular progresivo en forma de tumor.

Esto nos proporciona una visión unificadora de los objetivos genéticos que debe ser modificada en el proceso de formación tumoral. El primero, son los componentes de la maquinaria de señalización del punto de pre-restricción. El segundo, son componentes relacionados con la sensibilización y reparación del ADN dañado; y el tercero, control de las actividades de **CDKs** que organizan la secuenciación de los pasos principales del engranaje del ciclo celular.

CAPÍTULO IV

4. ALTERACIONES GENÉTICAS EN LA CÉLULA CANCEROSA

4.1 Consideraciones generales

Se considera que el cáncer colorectal se desarrolla en el seguimiento de la adquisición de múltiples cambios genéticos. La manutención de las especies (y de un individuo), necesita que la replicación del DNA sea muy rigurosa. La información del DNA debe ser rigurosamente copiada y transmitida a cada una de las células hijas. El DNA de las células cancerosas es lógicamente diferente del DNA de las células normales. De esta forma, la carcinogénesis implica la existencia considerable de errores en la duplicación de DNA, déficits en la reparación del DNA y alteraciones en los productos de segregación de los cromosomas.

En las células normales, la replicación del DNA y la partición de los cromosomas son procesos extraordinariamente rigurosos. En el ciclo de cada división, cada célula hija recibe un conjunto completo y exacto de información genética. Cada célula parental duplica su genoma, conteniendo aproximadamente 6×10^9 nucleótidos y entonces divide el DNA igualmente entre las dos nuevas células hijas generadas. La fidelidad de esta transferencia es precisa tanto en las células germinales, como en las células somáticas normales. Los errores en estos procesos provocan mutaciones.

En las células germinales, son necesarias algunas mutaciones para permitir que las especies se adapten a los cambios ambientales. Las células somáticas pueden ser capaces de tolerar la producción de gran número de mutaciones, porque estas mutaciones no pasan para generaciones posteriores y, entonces, no se acumularían como genes recesivos de la especie.

Sin embargo, cuando estas mutaciones somáticas aparecen, causan enfermedades que acorta la vida de los individuos. En los humanos, el cáncer es la más destacable de estas enfermedades. Entre las

mutaciones anómalas que se dan en las células normales y el gran número de mutaciones que se dan en una gran variedad de cánceres hay una diferencia que se traduce como la variación entre un fenotipo normal de una célula en un cierto tejido y el fenotipo mutante de esa célula **(1)**. Este concepto ha evolucionado con el transcurso del tiempo gracias a la posibilidad de conocer y comprender los mecanismos del proceso carcinogénico a nivel molecular. **(1,2,3 y 4)**.

Hay múltiples transacciones sintéticas del DNA que podrían ser alteradas en las células normales y generar un fenotipo mutante; éstas incluyen tanto errores en la síntesis del DNA como reparación inadecuada del DNA lesionado. En este punto, podemos definir una mutación como cualquier cambio en la secuencia de nucleótidos del DNA celular.

Los errores en la síntesis del DNA son generados por mala incorporación de los nucleótidos porque las mutaciones son producidas cuando el número de estos nucleótidos mal incorporados excede la capacidad de las células para escindir y reparar las lesiones ocasionadas. El daño producido en el DNA es generado por moléculas reactivas en las células por procesos metabólicos normales, así como por agentes ambientales exógenos. Las células desarrollan mecanismos múltiples para la escisión y reparación del DNA dañado.

Hay ocasiones en que la cantidad lesionada en el DNA puede exceder la capacidad restauradora de la célula y las lesiones residuales no reparadas pueden ser una fuente dominante de mutaciones durante la replicación del DNA.

Las mutaciones somáticas pueden también resultar de errores en la partición de los cromosomas durante la división celular. Las desigualdades en la partición cromosómica resultan en aneuploidía, un cambio en el número de cromosomas, que es uno de los distintivos más comunes de las células cancerosas.

Considerando la excepcionalidad de las mutaciones en las células normales y el gran número de mutaciones observadas en los cánceres humanos se piensa que la tasa de mutaciones espontáneas en las células normales no es suficiente para el número total de mutaciones encontrados en los cánceres humanos **(1)**. Las células cancerosas podemos decir que muestran un fenotipo mutante. Este fenotipo es el resultado de las mutaciones en los genes que funcionan en el mantenimiento de la estabilidad

genómica **(1)**. La progresión tumoral se asocia a un aumento en las tasas de mutación y en la evolución genética de las células cancerosas **(1)**.

La multiplicidad de aberraciones cromosómicas encontradas en muchos tumores humanos ha sido descubierta por los patólogos desde hace más de cien años y ha servido para identificar las células malignas y para estratificar la agresividad de ciertos cánceres **(5)**.

Las aberraciones cromosómicas incluyen translocaciones, amplificaciones de los genes, deleciones e inserciones; éstas pueden ser clasificadas como mutaciones que implican el reposicionamiento, adición, u omisión de millones de nucleótidos. Un gran número de estas alteraciones, en ciertos cánceres, conjuntamente con la heterogeneidad morfológica y fisiológica de las células cancerosas y tumores individuales, fueron importantes observaciones que sustentan el concepto del fenotipo mutante en el cáncer.

Inicialmente se había propuesto que las mutaciones múltiples encontradas en las células tumorales resultarían de mutaciones en genes que garantizarían la fidelidad de la síntesis del DNA, o la adecuada reparación del mismo. **(1)**.

Los individuos con enfermedades heredadas anómalas, como por ejemplo, la xeroderma pigmentosum **(7)**, o la ataxia telangiectásica **(8)** presentan una elevada incidencia de ciertos tumores y las células de estos individuos muestran una supervivencia disminuida con la exposición de los mismos agentes que causan cánceres en estos individuos. A pesar de la presencia de múltiples “zonas calientes” el daño del DNA es primariamente un proceso ocasional; si la lesión no es reparada, ésta puede servir como un potente origen de mutaciones. En determinados casos, estas mutaciones pueden darse en genes requeridos para la manutención de la estabilidad genética. Las mutaciones en los genes responsables de la estabilidad genética pueden producir mutaciones adicionales en cualquier parte del genoma, implicando la aparición de una serie de mutaciones consecutivas cuando el cáncer se desarrolla.

En 1976, Nowell propuso que un fenotipo mutante en el cáncer es el resultado de ciclos repetitivos de selección clonal en el que las mutaciones de una única célula llevan a una ventaja de crecimiento selectivo, permitiendo que su progenia prolifere y multiplique su población celular **(9)**.

La progresión tumoral resulta de la proliferación secuencial de las líneas celulares más agresivas.

Los sucesivos ciclos de expansión clonal conducen la progresión tumoral y son el resultado de múltiples mutaciones. Parece probable que ambos mecanismos (acumulación de mutaciones y selección clonal) contribuyan a las mutaciones múltiples encontradas en el cáncer, pero sorprendentemente, los dos mecanismos pueden actuar sinérgicamente (9), o sea, pueden estar íntimamente ligados.

4.2 Mutaciones en las células somáticas humanas

Las células humanas normales replican el DNA rigurosamente cada vez que se dividen. La tasa global de mutación en las células humanas somáticas ha sido valorada en $1,4 \times 10^{-8}$ nucleótidos/célula/división, o $2,0 \times 10^{-6}$ mutaciones/gen/célula/división (10). Considerando que cada célula contiene ~ 70.000 genes, se calcula que cada célula acumula un gen mutante a lo largo de la duración de la vida de un individuo (3). Sin embargo, todavía hay falta de información en las tasas de mutación de las células somáticas en diferentes tejidos y en diferentes especies mamíferas. Es probable que las tasas de mutación somática en las células humanas sean más bajas que en los roedores y esto puede contribuir a la resistencia de las células humanas para la transformación *in vitro* (11,12). Si esta disparidad entre humanos y roedores se manifiesta en las células precursoras de cáncer, eso sugiere que el de test carcinogeno de en los roedores no es el modelo más adecuado para la susceptibilidad humana, aunque sea el ejemplar más disponible.

Un gran cuerpo de evidencia indica que muchos tumores se originan en una, o algunas células “stem”. Estas células tienen una plasticidad destacable, permitiéndoles diferenciarse en una gran variedad de tipos celulares, incluyendo las que son malignas. Asumiendo como base que el rigor de la replicación del DNA en las células “stem” es similar al de las células somáticas humanas, se sabe que cada célula “stem” acumula uno o dos genes mutantes, asumiendo 100 divisiones celulares durante un periodo de vida humana; (13). Según estudios de distribución de probabilidades, existirían algunas “stem cells” que contendrían 12 mutaciones. La curva de crecimiento exponencial del cáncer como una función de la edad sugiere que hay entre seis y doce eventos causantes del cáncer (14,15), cada uno de los cuales tiene su tasa límite para la progresión tumoral. Si se asume que estos eventos de tasas de limitación son mutaciones, entonces se puede suponer que las tasas normales de mutación pueden ser tomadas en consideración para el aumento de la edad en el cáncer.

Cada una de estas mutaciones tendría de ofrecer una ventaja de crecimiento selectivo, mismo si ello ocurriese en un alelo singular. Por consiguiente, si orientamos nuestro análisis para genes que han mostrado estar asociados con cánceres humanos (unos 100 genes conocidos, oncogenes y genes supresores de tumores), entonces las tasas normales de mutación producirían solamente dos o tres mutaciones en los genes asociados al cáncer. (16)

En cualquier caso, la tasa de mutación en las células normales no puede estar relacionada con los millares de mutaciones que se encuentran en las células cancerosas humanas.

4.3 Mutaciones múltiples en los tumores humanos

Históricamente, las observaciones citológicas de variaciones en el número de cromosomas y su integridad en los cánceres siempre implicaron que éstos contienen mutaciones múltiples. En raras ocasiones se encuentran aberraciones cromosómicas específicas diagnosticadas.

Los métodos citogenéticos más recientes, que son los más informativos, y se encuentran actualmente en desarrollo, pueden evidenciar ejemplos adicionales de anomalías cromosómicas específicas de tumores. Sin embargo, la mayoría de las anomalías cromosómicas no son específicas de tumor, pero, por otro lado, pueden indicar la existencia de manifestaciones de inestabilidad subyacente en las células cancerosas.

4.4 Inestabilidad cromosómica

Las aberraciones cromosómicas en las células cancerosas han sido reconocidas como un indicio de cáncer y para valorar los tumores con vistas a la predicción del pronóstico.

Con el aumento de nuestra capacidad para caracterizar los cromosomas a nivel molecular, hay cada vez más artículos de investigación sobre alteraciones cromosómicas múltiples en diferentes tumores. Existen dos técnicas que son particularmente ilustrativas:

4.4.1 Hibridación genómica comparativa

Mide las diferencias en la hibridación entre los fragmentos marcados con fluorescentes de DNA tumoral y normal utilizando cromosomas en metafasis como un patíbulo. Una gran variedad de tumores han presentado cambios en el número de copias de DNA (17). Por ejemplo, algunos cánceres de mama

muestran hasta quince cambios en el número de copias de DNA **(18)**, y un número aún mayor ha sido observado en cánceres ováricos de alto grado **(19)**. Igualmente, en tumores benignos como los leiomiomas **(20)** aparecen cambios en el número de copias de DNA.

La hibridación genómica comparativa puede detectar deleciones o amplificaciones solamente si éstas son de 1-10 megabases **(21)**; presumiblemente, con el desarrollo de técnicas más sensibles, se podrá detectar un mayor número de cambios en los cánceres. Estos estudios son efectuados usando el DNA conjunto y por eso los únicos cambios observados son los que ocurren en la mayoría de la población. Sin embargo, una estrategia basada en el PCR para la amplificación global del DNA en una célula única evidenció la multiplicidad de cambios en el número de copias del DNA en cánceres y puede ser usada para trazar el mapa de la evolución clonal **(22)**.

4.4.2 Mediciones de la pérdida de heterocigocidad

En los tumores se hicieron y analizaron utilizando marcadores microsátelites que examinan solamente una pequeña fracción del genoma. No obstante, algunos cánceres primarios de mama presentan más de veinte regiones con una pérdida de heterocigocidad **(23)**.

Las sondas utilizadas en este estudio abarcan únicamente el 0,01% del genoma y por eso se calcula que algunos de estos tumores pueden contener cerca de doscientas mil regiones con pérdida de heterocigocidad **(24)**. Este cálculo es tendencioso porque el número de mutaciones detectadas en pequeñas regiones puede no ser representativo de lo que ocurre en todo el genoma, y también hay que tener en cuenta que las secuencias que fueron examinadas fueron aquellas que previamente habían demostrado que podían ser alteradas con frecuencia en los tumores humanos. Si estos cambios son de algún modo representativos de otros cambios del genoma, entonces se puede concluir que en muchos cánceres hay decenas de millares de mutaciones. Se ha argumentado que hay dos tipos de inestabilidad genética, la inestabilidad microsátelite y la inestabilidad cromosómica **(25, 26)**.

Los cánceres que presentan inestabilidad microsátelite extensiva son aquellos que tienen mutaciones o inactivación de los genes de la restauración. Los que muestran predominantemente inestabilidad cromosómica son aquellos que tienen mutaciones que afectan a la partición de los cromosomas durante la mitosis. Por ello, tanto la inestabilidad microsátelite, como la inestabilidad cromosómica pueden ser

manifestaciones de un fenotipo mutante. Ambos fenómenos pueden ser fáciles de detectar; las secuencias de los microsatélites son sometidas a deslizamientos durante el proceso de copia y están presentes en millares de copias y las alteraciones citológicas, porque pueden aglutinar millones de unidades de nucleótidos en el DNA. (27). Los cambios producidos en uno o algunos de los nucleótidos adyacentes del DNA pueden ocurrir más frecuentemente, y serán mucho más difíciles de detectar.

4.5 Aneuploidia

La aneuploidia es un cambio en el número de cromosomas resultante de una partición desigual de los cromosomas durante la división celular, que ocurre frecuentemente en tumores sólidos. La generación de la aneuploidia ha sido propuesta como el desencadenante de la carcinogénesis (28,29). La aneuploidia proporciona un proceso en un paso que genera millares de alteraciones genéticas que pueden desestabilizar el genoma.

Sin embargo, hay enfermedades como el síndrome de Down que presenta un enigma singular; las células contienen una copia extra del cromosoma 21 con unos 200 genes (30) y mismo así estas células se diferencian para producir un individuo.

Aunque los individuos con síndrome de Down presentan una elevada incidencia de leucemia, se demostró que tienen una disminución en la incidencia de muchos tumores sólidos (31). Aun más, se tiene que afrontar el proverbial dilema de saber si la aneuploidia genera inestabilidad genómica, o si la inestabilidad genómica genera aneuploidia, o ambas son manifestaciones de un fenotipo mutante subyacente. En el esófago de Barret, las alteraciones de los genes p53, p16 y la tetraploidia aumentada (4n) preceden a la aneuploidia (32,33) y la inestabilidad genética en la colitis ulcerativa precede a la detección tumoral (34).

4.6 Inestabilidad microsatélite

El grado de extensión de la inestabilidad genética asociada al cáncer ha sido primeramente precedida por hallazgos de mutaciones de secuencias repetitivas. Peinado y col. (35) utilizaron oligonucleótidos aleatorios como “*primers*” arbitrarios en las reacciones de PCR y observaron los productos adicionales de diferentes tamaños utilizando DNA obtenido de tumores de colon humano y los compararon con los obtenidos usando DNA de tejidos normales adyacentes.

Los productos PCR específicos de tumor con extensiones alteradas abarcaron segmentos con secuencias de nucleótidos repetitivos. Estos investigadores emplearon muestras únicamente de una pequeña fracción de genoma, y aún dentro de su limitada visión observaron gran cantidad de alteraciones en la secuencia de DNA. Con la extrapolación de estos resultados para todo el genoma, ellos concluyeron que algunos tumores contenían cerca de cien mil mutaciones.

Las células tumorales con mayor número de cambios en las extensiones de las secuencias repetitivas mostraron poseer mutaciones en los genes de reparación de errores (36). Las secuencias repetitivas alteradas fueron detectadas principalmente en cuestión de segundos entre genes (microsatélites) y ocurrirán predominantemente en el HNPCC (36).

Consecuentemente, se demostraron mutaciones dentro de los exons, en secuencias repetitivas (37,38). Estos resultados fueron confirmados y se extendieron a los cánceres esporádicos del colon usando inter (repetición secuencial simples)-PCR (39). Estos autores piensan que muchos cánceres esporádicos del colon contienen decenas de millares de mutaciones y que muchas de estas mutaciones están ya presentes en pólipos premalignos. En el caso de HNPCC, la inestabilidad es medida por mutaciones en los genes de reparación de errores que funcionan en la corrección de los errores de replicación.

Muchos cánceres esporádicos del colon (40) y esporádicos gástricos (41) que parecen no contener mutaciones en los genes de reparación de errores presentan hipermetilación de la región promotora de MLH1, impidiendo, entonces, la reparación de errores por un mecanismo epigenético.

Un gran número de cánceres no hereditarios han mostrado la presentación de alteraciones en las repeticiones de microsatélites en menor extensión, pero no parecen implicar mutaciones de genes reparadores de errores. Queda por explicar si el origen de esta inestabilidad de microsatélites en los tumores no-HNPCC es el resultado de la disminución de la expresión de los genes de reparación de errores o es atribuible a mutaciones en otros genes relacionados con la manutención de la estabilidad genética.

La causa, o causas, de la inestabilidad de los microsatélites permanece indeterminada. En general, las mutaciones son generadas cuando la tasa de producción de mutaciones excede la capacidad de la célula para las correcciones. Los estudios *in vitro* revelan adiciones y deleciones en secuencias repetitivas que

son generadas por deslizamiento de las polimerasis de DNA durante el proceso de copia en el sistema de reparación de errores. Por consiguiente, el deslizamiento facilitado, o los déficits en la reparación de los errores, pueden alterar este equilibrio dinámico y producir inestabilidad microsatélite. El deslizamiento facilitado por polimerasis puede ser el resultado del daño del DNA en las secuencias repetitivas.

In vitro (42), y en la *Escherichia coli* (43), la lesión del DNA conteniendo secuencias repetitivas por especies oxígeno-reactivas produce mutaciones dentro de las repeticiones.

El análisis de la secuencia del DNA con mutaciones indica que las mutaciones son exclusivamente deleciones y adiciones dentro de las repeticiones. Lesionar los mismos plasmidios conteniendo secuencias repetitivas por agentes que no generan especies reactivas al oxígeno produce pocas, o algunas, mutaciones dentro de las repeticiones (42).

Otra evidencia menos directa sugiere una función para las especies oxígeno-reactivas en la generación de inestabilidad microsatélite. En el fermento, las mutaciones en los genes reparadores de errores, MSH2 o MSH6, pueden resultar 60.000 veces el aumento en las tasas de reversión de los genes mutantes y este aumento necesita desarrollarse en presencia de oxígeno (44). La exposición de las líneas de células del pulmón humano, conteniendo un plasmidio con un $(CA)_n$, a los radicales libres de oxígeno, generando sistemas, ha resultado en un aumento de 27 veces en las mutaciones de estructura, muy especialmente localizadas dentro de la secuencia repetitiva (45). Si la lesión del DNA, dentro de la secuencia repetitiva por especies oxígeno-reactivas, induce a mutaciones, entonces habrá una reducción de especies oxígeno-reactivas en las células precancerosas, o cancerosas, por los radicales libres de oxígeno, que pueden reducir las mutaciones durante la progresión tumoral.

4.7 Mutaciones silenciosas y múltiples en genes individuales

La presencia de mutaciones silenciosas y/o múltiples en el mismo gen puede permitir evaluar los resultados de un fenotipo mutante en ausencia de selección clonal. Las mutaciones silenciosas resultan de la redundancia del código genético y son presumiblemente no selectivas excepto si fueron alterados los puntos de separación (corte/splice) o interagen con tRNAs específicos que son limitantes del ritmo de la síntesis proteica. Si los tumores acumulan millares de mutaciones, entonces deben también acumular mutaciones silenciosas, o múltiples. Mas aún, Strauss utilizando una gran cantidad de datos en mutaciones del gen *p53* en tumores humanos (46,47) ha verificado que las mutaciones silenciosas

adicionales estaban presentes en genes *p53* con mutaciones, en tumores humanos, en una frecuencia que es, por lo menos, 20 veces mayor de lo esperado. Además, algunos tumores contienen cerca de cuatro sustituciones separadas dentro del gen *p53*, quizá el resultado de malas incorporaciones motivadas por una tendencia de error de las polimerasis del DNA expresada en las células cancerosas. Sin embargo, como Strauss destacó (46), hay otras interpretaciones interesantes sobre estos datos.

El gen *p53* puede ser inherentemente hipermutable, sea por la secuencia del DNA, sea por su posición en el cromosoma. Sin embargo, sí se ha encontrado que otros genes son igualmente mutables, la presencia de mutaciones silenciosas en tumores provee evidencia de la expresión de un fenotipo mutante durante la progresión tumoral.

4.8 Evolución de un fenotipo mutante durante la progresión tumoral

La evidencia experimental de la evolución de un fenotipo mutante en los cánceres ha sido evidenciada en los cánceres HNPCC y no-HNPCC. Muchos, pero no todos, los estudios en el cáncer de colon sugieren las mutaciones en los genes de reparación de errores y la resultante inestabilidad microsatélite de estos tumores. Hay estudios que refieren que en cánceres esporádicos del colon las mutaciones en los genes de reparación de errores suceden antes que las mutaciones del gen *APC*, un marcador del cáncer de colon. (48).

Con frecuencia se ha encontrado inestabilidad microsatélite en los adenomas que presumiblemente serán indicios de adenocarcinomas. Usando microdissección láser, para marcar la evolución tumoral, desde el adenoma hasta el adenocarcinoma, Shibata y sus colaboradores (49) observaron alteraciones a lo largo de la secuencia de microsatélites en el estadio precoz de adenomas, así como que aparecieron alteraciones de microsatélites adicionales cuando los tumores progresaron hacia adenocarcinomas.

Las diferencias en el espectro de las mutaciones en el gen *APC* en los tumores que presentan inestabilidad microsatélite y en los tumores que no evidencian fuertemente alteraciones de los genes de reparación de errores, son patentes antes de las mutaciones *APC* (48). Estos estudios combinados sustentan la inferencia lógica que apunta para el fenotipo mutante como un evento precoz en la generación de los tumores del colon en el HNPCC, por lo menos con respecto a mutaciones en los genes de reparación de errores.

Homfray y sus colaboradores refieren la inexistencia de diferencias en la frecuencia, o en los tipos, de mutaciones en el gen *APC*, entre los tumores esporádicos del colon y los tumores de colon que contienen mutaciones en los genes de reparación de errores (**HNPCC**) (50). Estos autores concluyeron lo contrario, que las mutaciones del gen *APC* inician la carcinogénesis y que las mutaciones de los genes reparadores de errores ocurren en un estadio más tardío (51). A pesar de estos hallazgos, el peso de la evidencia indica que las mutaciones en los genes de reparación de errores ocurren precozmente durante el curso de la carcinogénesis del colon en tumores que presentan inestabilidad microsatélite.

4.9 Orden secuencial de las mutaciones en la carcinogenesis

Los modelos sobre el desarrollo del cáncer de colon han sido diseñados como una secuencia ordenada de mutaciones en oncogenes diferentes y en genes supresores de tumores, cada uno asociado con una determinada implicación en la tumorogénesis (52). En otros cánceres humanos, los datos han sido presentados por una secuencia ordenada de cambios en regiones que muestran pérdida de heterocigocidad. Utilizando la técnica de disección de captura de rayos láser (“laser capture dissection”) de regiones de carcinomas de mama, que enriquece el número de células tumorales, Shen y sus colaboradores presentan la evidencia de una ordenación en las regiones de pérdida de heterocigocidad que incluyen los genes relacionados con la reparación de las fracturas de las espirales duplas, la pérdida del *gen p53* seguida de la pérdida del *gen BRCA1*. (53).

El hallazgo de la “*transfección*” secuencial de cuatro genes, asociados a cáncer, en células humanas, mostró que desarrollaba tumores y ha sido considerado también como un argumento que sustenta un modelo ordenado para la mutagénesis (54). A pesar de estos estudios, no ha sido establecida una ordenación secuencial para las mutaciones, mismo en los cánceres del colon, en los cuales los niveles morfológicos e histológicos definidos están claramente delimitados.

Hay otros estudios que indican que diferentes cánceres de mama poseen diferentes deleciones (23). Si los cánceres son producidos como resultado de la acumulación de gran número de mutaciones aleatorias, entonces hay probablemente muchas mutaciones diferentes que pueden ofrecer una ventaja selectiva durante cada estadio de la tumorogénesis. De esta forma, un fenotipo mutante no estaría en concordancia con un conjunto de órdenes de mutación durante la evolución tumoral.

Parece probable que la expresión de un fenotipo mutante podría ser la pérdida en los últimos estadios de la progresión tumoral. Hay argumentos teóricos que indican que la acumulación de gran número de mutantes puede exceder el límite de error de la replicación y de la viabilidad de la célula **(55)**.

Los estudios en la replicación del VIH han evidenciado un esclarecimiento en este dominio; las células infectadas con el VIH en presencia de un análogo nucleósido mutagénico implican un aumento de la mutagénesis viral y eventualmente la ablación de la infectividad viral **(56)**. Por analogía, la acumulación de gran número de mutaciones en células tumorales podría eventualmente disminuir su potencial replicativo. Como resultado, se puede predecir que las células tumorales perderían su flexibilidad para su adaptación a un ambiente en cambio. En este estadio, la resistencia a los agentes quimioterapéuticos estaría basada en el gran número de mutaciones ya presentes en la población celular tumoral.

4.10 Eventos iniciales de un fenotipo mutante

La hipótesis del fenotipo mutante no se dirige a los orígenes de las mutaciones que inician la carcinogénesis. Los estudios epidemiológicos han identificado agentes ambientales mutagénicos que están casualmente asociados con los tumores humanos. Excepto para el tabaco, la radiación Ultra Violeta y la aflatoxina B₁, solamente algunos agentes ambientales han demostrado estar casualmente asociados con los principales cánceres humanos. Muchos carcinogénicos conocidos lesionan el DNA y si este daño no es reparado causa mutaciones en toda la extensión del genoma incluyendo los genes que son requeridos para mantener la estabilidad genética. Se debe destacar que la causa de casi la mitad de todos los cánceres humanos no ha sido documentada; estos cánceres no están geográficamente agrupados, ni asociados con la exposición a agentes ambientales específicos.

Estos cánceres pueden originarse con la exposición a múltiples agentes ambientales, cada uno causando un pequeño incremento en las mutaciones. Alternativamente, estos cánceres pueden ser “espontáneos” y emanar del DNA reactivos endógenos **(57)**, incluyendo grupos alquil, lípidos activados, cationes metálicos y especies oxígeno-reativas **(58)**.

El daño causado por las sustancias químicas ambientales puede también producir mutaciones aleatorias en cualquier punto de la extensión del genoma. La extensión del daño del DNA por metabolitos reactivos normales parece ser excepcionalmente alta. Se ha estimado que las especies

oxígeno-reactivas generan cerca de 10.000 casos de lesión en el DNA/célula/día. (59). Un número similar de lesiones es generado por “depuración” espontánea, resultando una pérdida de bases purínicas del DNA y la mala codificación por los *sitios* apurínicos residuales (60). Globalmente, está calculado que cada célula de nuestro cuerpo genera y cambia centenares de millares de bases alteradas de DNA/célula/día. (61). Estos procesos acumulados, o daños espontáneos del DNA pueden no únicamente generar lesiones iniciales que confieren a la célula un estado de fenotipo mutante sino que también pueden contribuir a la acumulación de mutaciones durante la progresión tumoral, específicamente en células que implican mutaciones en los genes de restauración del DNA. Un cierto número de estudios sugiere que el DNA tumoral contiene bases alteradas y que estas alteraciones resultan de exposiciones a carcinógenos.

La presencia de alteraciones químicas del DNA debe reflejar un estado constante de equilibrio en el que la tasa de generación de mutaciones sea igual a la tasa de restauración. Por lo tanto, la presencia de “DNA adduct”, en las células indica la restauración incompleta del DNA y estas lesiones residuales tienen el potencial suficiente para causar mutaciones somáticas.

Las condiciones que han heredado las mutaciones en genes específicos están asociadas con la malignidad y sugieren que estos mismos genes puedan sufrir mutaciones en las células somáticas y causar malignidades. Además, los polimorfismos específicos en estos genes pueden estar asociados con un aumento de la incidencia de tumores. El hecho de que un individuo con ciertos polimorfismos pueda presentar una mayor incidencia de ciertos cánceres no puede funcionar contra las mutaciones aleatorias.

La tecnología para la detección de mutaciones en lugares específicos en los genes, en los tumores y para la detección de polimorfismos en poblaciones humanas está mejorando rápidamente. Hay que tener información momentánea de la presencia de mutaciones en muchos genes de las células cancerosas, por lo menos cuando ocurren en sitios específicos en la mayoría de las células dentro de un tumor. No hay, sin embargo, métodos para secuenciar el DNA suficientemente sólidos como para detectar mutaciones aleatorias.

4.11 Genes de reparación del DNA

Hay cuatro vías genéricas principales para la restauración de lesiones de DNA en las células humanas: la reparación por escisión de nucleótidos, la reparación por escisión de bases, la reparación de errores y reversión directa de lesiones **(62)**. Los estudios más recientes evidenciaron la superposición y redundancia de estas vías **(63)**.

Las alteraciones químicas específicas en el DNA pueden ser reparadas por más de un mecanismo. Históricamente, una enfermedad humana heredada, la xeroderma pigmentosa, presenta una fuerte evidencia de ligazón de mutaciones en los genes de restauración del DNA con el cáncer **(7)**.

Los pacientes con xeroderma pigmentosa son excepcionalmente propensos al cáncer de piel después de la exposición al sol y los cultivos de células de estos pacientes son defectuosos en la reparación de la lesión en el DNA producido por rayos **UV**.

Estos pacientes heredan mutaciones en uno de los genes relacionados con la reparación por escisión de nucleótidos.

Las mutaciones en por lo menos uno de los cuatro genes de reparación de errores (hMsh2, hMSH6, hMLH1 y hPMS2) está asociada con una mayor incidencia de tumores HNPCC y otros tumores asociados. Esta asociación entre mutaciones en los genes de reparación de errores y las malignidades también ha sido demostrada en el ratón **(64)** Falta evidencia de que las mutaciones en los genes de reparación por escisión de bases están asociadas con cualquier predisposición heredada para el cáncer.

4.12 Polimerasas del ADN

Hasta hace poco tiempo, nuestro conocimiento sobre las polimerasas de DNA de las células eucariotas estaba limitada a cinco enzimas bien caracterizadas: Pol- α , Pol- δ , Pol- ϵ , cada una de ellas participa en la replicación del DNA; La Pol- β está asociada con la síntesis de reparación de la escisión de bases y la Pol- γ es la responsable de la síntesis del DNA mitocondrial. La actividad de la Pol- β es elevada en muchos cánceres y hay casos dispersos sobre mutaciones en cánceres de colon **(65)**, próstata **(66)** y vejiga **(67)**.

La Pol- δ es probablemente la principal polimerasa de DNA replicativa en las células eucariotas; tiene una actividad exonucleasa 3-5 que enmienda la mala incorporación de nucleótidos no-complementarios, durante la síntesis de DNA. En las bacterias, el 90% de las mutaciones son

dependientes de la respuesta SOS que media la inducción de múltiples genes y está asociada con lesiones de DNA causadas por by-pass. Recientemente, uno de estos genes, UmuD`2C (E. coli Pol V), ha evidenciado codificar una polimerasis de DNA con propensión a error (68). En una variante de xeroderma pigmentosa (XP-V), que presenta una tasa elevada de mutación, se ha demostrado el encubrimiento de una mutación en polimerasis relacionada de DNA, Pol-n10, permitiendo aún otras polimerasis relacionadas, probablemente Pol-E10, “by-pass” “dimers” UV, por incorporación de nucleótidos incorrectos (69,70). Más aún, se ha reconocido que de seis a ocho nuevas polimerasis de DNA recientemente descubiertas, pueden estar implicadas en el by-pass propenso a error de lesiones de DNA (71). Hay estudios en curso para determinar la expresión de estas enzimas potencialmente mutagénicas en tumores humanos.

4.13 Helicasas del DNA

Las células eucariotas contienen un número de enzimas sorprendentemente grande que desarrollan la doble-hebra de DNA para ser copiada por las polimerasis de DNA. Estas helicasis son indicios potenciales de un fenotipo mutante. Las mutaciones heredadas en varias de estas helicasis de DNA están asociadas con enfermedades que presentan una alta incidencia de cáncer. Recientemente, los genes mutados en el síndrome de Bloom (72) y en el síndrome de Werner (73) han sido reconocidos codificando helicasis de DNA pertenecientes a la familia E. coli Rec Q. Las células con mutaciones en estos genes muestran inestabilidades genéticas características (74), cambios entre cromosomas hermanos en el síndrome de Bloom (75) y grandes deleciones en el síndrome de Werner (76), evidenciando así consecuentemente la asociación de inestabilidad genética con el cáncer. Estas son enfermedades raras, recesivas, autosómicas y es importante determinar si los heterocigotos más frecuentes en la población presentan una mayor incidencia de tumores y si los tumores esporádicos contienen mutaciones somáticas en estas helicasis.

4.14 Otros genes diana

Hay muchos genes implicados en la seguridad de la estabilidad del genoma. Considerando los múltiples estadios relacionados con la replicación del DNA, el metabolismo desoxinucleótido, los checkpoints en el ciclo mitótico, la segregación cromosómica y la mitosis, es evidente que hay muchos genes diana que se han mutado y pueden inducir a un fenotipo mutante.

Los complejos de síntesis de DNA han sido aislados de células de cáncer de mama humanas, que incorporan mal los nucleótidos, más frecuentemente que complejos similares aislados en paralelo de células normales (77).

Es necesario establecer las proteínas con propensión a error en estos complejos. Las mutaciones en un determinado número de genes están fuertemente asociadas con cánceres humanos y muchos de estos genes están directamente implicados (o indirectamente) en las transacciones que contienen mutaciones en el gen *p53* (78). Aunque no exista una clara muestra de que las mutaciones del *p53* aumenten las “point mutaciones”, a lo largo del genoma, hay una considerable evidencia de que el gen *p53* está implicado en la restauración del ADN, apoptosis y recombinación (79,80) y entonces el gen *p53* podría ser un gen “target” (diana) para un fenotipo mutante.

4.15 Conexión entre inducción de mutación y selección clonal

Aunque sea ampliamente reconocido que tanto la mutagénesis facilitada como la selección clonal contribuyan al fenotipo mutante, no está generalmente aceptado que estos mecanismos actúen sinérgicamente.

Los ciclos secuenciales de selección de crecimiento de la *E.coli* en diferentes condiciones de restricción dieron un aumento de 5000 veces la tasa de mutagénesis espontánea. (81). Si las bacterias fuesen primeramente expuestas a un mutagenio, el mismo protocolo favorecería una población que diera el 100% de mutantes. Estos hallazgos pueden ser particularmente relevantes para la progresión tumoral. (82).

Cuando los cánceres se expanden, hay series de restricciones mediadas por el hospedro que deben ser superadas; éstas incluyen oxígeno reducido, el requisito para la producción de factores de crecimiento y angiogénico y confinamiento por los tejidos adyacentes. (24,83). Cada una de estas restricciones puede ser superada por la selección de mutaciones en genes específicos. Cada ciclo de selección conlleva (“*piggy-backing*”) (*¿*) una serie de mutaciones en los genes de estabilidad genética y como resultado hay un aumento en la frecuencia de mutación en el genoma.

Entonces, cuando se seleccionan mutaciones simultáneamente se seleccionan mutantes que causan la aparición de estas mutaciones. Con los ciclos múltiples de selección hay un enriquecimiento progresivo de mutaciones en los genes de estabilidad genética.

4.16 Consecuencias de un fenotipo mutante

La hipótesis de los cánceres expresaren un fenotipo mutante y de este fenotipo orientar la proliferación de los cánceres y generar variantes de selección clonal tiene consecuencias teóricas y prácticas. Dentro de las implicaciones teóricas tenemos:

a) **La progresión tumoral es genéticamente irreversible**

El concepto de un fenotipo mutante implica que un gran número de mutaciones son producidas aleatoriamente en el genoma de las células cancerosas; solamente algunas de las cuales resultan en la proliferación clonal. Esta heterogeneidad de genes mutantes imposibilita cualquier posibilidad de reconvertir las células cancerosas en células normales. La supresión de estas mutaciones puede ocurrir por otras mutaciones o silenciamiento epigenético y por eso reduce la expresión del fenotipo canceroso, pero esto no restablecería el genoma normal. De esto se deriva que las experiencias clásicas en que las células tumorales se convierten en células normales pueden ser al nivel de sus fenotipos pero no de sus genotipos (84).

No se puede eliminar la posibilidad de que los mecanismos epigenéticos orienten la progresión tumoral. El silenciamiento de reparación del DNA puede facilitar la producción de mutaciones múltiples encontradas en los tumores. El silenciamiento de la expresión genética puede ser un requisito para que las células cancerosas toleren la introducción de la aneuploidia.

Aunque se puedan mencionar firmes argumentos para la función de los mecanismos epigenéticos en la carcinogénesis, todavía falta conocimiento suficiente de estos mecanismos para construir experiencias críticas que validen estos conceptos.

b) **Los tipos de lesión del DNA y las mutaciones encontradas en un tumor son incapaces de esclarecer las claves sobre el inicio de la carcinogénesis**

Para tumores sólidos, demora 20 años o más desde el tiempo de exposición a un químico carcinogénico hasta la detección clínica de un tumor. Por ello parece improbable que las lesiones del DNA iniciando el proceso carcinogénico aún estuviesen presentes en las células tumorales varias generaciones más tarde, excepto si continuase el daño del DNA por el mismo agente específico para la formación del tumor. Además, las mutaciones encontradas

en un tumor pueden no resultar de las lesiones químicas más frecuentes en el DNA. Muchos agentes dañando el DNA causan una variedad de alteraciones químicas en el mismo; las lesiones más frecuentes pueden no ser las más mutagénicas.

A pesar del argumento arriba indicado, hay casos de exposición por agentes esperáficos que producen una mutación específica.

Esto podría indicar que la exposición repetitiva a un agente específico podría ser la fuerza orientadora en la selección clonal como puede ocurrir en los cánceres de piel inducidos por rayos UV (85), cánceres de hígado inducidos por aflatoxina (86) y quizá cánceres de pulmón asociados a humo de cigarrillos (87). La exposición a los rayos UV induce a cánceres de piel y las mutaciones detectadas en el gen *p53* resultando ser contrarias “a dímeros de pirimilina y las sustituciones “tandem” T ----C ó CC ----TT implicadas son características del daño causado por los rayos UV (88).

Las áreas contaminadas con aflatoxina tienen una mayor incidencia de hepatomas primarios y las mutaciones del gen *p53* ocurren predominantemente en el codón 249, implicando sustituciones G-T.

Un caso menos sugestivo es el proporcionado por “transversions”(?) G---A encontradas en el gen *p53* en los cánceres de pulmón (87). Aunque se encuentre una sustitución similar en la exposición de las células epiteliales humanas al benzo[a]pyrene en el cultivo de tejidos, las G--A”transitions” son también el resultado de errores por las polimerasas del DNA. La cuestión principal es si estas mutaciones son diagnósticas de “specíficos adducts” producidas por carcinógenos, o reflejan la selección de mutaciones en una población aleatoria que promueve la proliferación clonal.

c) Los cánceres benignos contienen mutaciones múltiples

Los argumentos sugeridos de que la adquisición de un fenotipo mutante es un evento precoz en la carcinogénesis implica que los tumores precoces como los adenomas del colon, la hiperplasia uterina y los leiomiomas deben contener microsatélites y aberraciones cromosómicas, como lo sustenta la evidencia (20,89). Con las nuevas técnicas será posible, en breve, recrear la arqueología de los genes mutados que promueven la expansión clonal cuando el tumor se desarrolla.

d) Tardíamente en la tumorigénesis, la selección puede ser contraria a un fenotipo mutante.

Un fenotipo mutante puede ser un evento precoz que orienta la progresión tumoral. Mas aún, el fenotipo mutante puede ya no estar presente en el tiempo en el que el tumor sea clínicamente aparente.

Aunque muchas mutaciones en las células cancerosas sean neutrales o ventajosas, algunas serán perjudiciales. Por tanto, hay probablemente un momento crítico de comienzo, después del cual la selección será contraria al fenotipo mutante. Como consecuencia, los tumores pueden ni siempre presentar un fenotipo mutante, pero en lo básico revelarán su historia, a través de mutaciones aleatorias a lo largo de sus genomas.

e) Los tumores contienen células con mutaciones pre-existentes a la resistencia para los medicamentos citostáticos.

Si se considera la probabilidad de que un fenotipo mutante sea un evento precoz en la carcinogénesis y los 20 años que tarda un cáncer en mostrarse clínicamente aparente, parece probable que cada tumor, compuesto por millones de células, contiene una o más células que ya acumularon mutaciones volviéndolas resistentes a los medicamentos (90). Las líneas de células tumorales, pero no las líneas de células normales, rápidamente amplifican los genes, haciéndolas resistentes a los agentes terapéuticos. Es improbable que haya antígenos que existan en todos los tumores de un determinado tipo y los vuelvan susceptibles a la inmunoterapia. El suceso más corriente de la inmunoterapia está basado principalmente en la super expresión de antígenos normales por tumores específicos. El concepto de fenotipo mutante sugiere que la inmunidad pueda ser hecha por medida para tumores individuales.

4.17 Implicaciones del fenotipo mutante en un cancer

Las mutaciones son un marcador de los cánceres. Aunque no haya mutaciones específicas ni sea absolutamente diagnóstica de una malignidad específica, la presencia de un número elevado de mutaciones puede indicar que las células estén ya en la vía del desarrollo de un cáncer. Tanto la inestabilidad microsatélite, como las alteraciones cromosómicas están siendo investigadas como

marcadores de tumorales en las células de la sangre, del estómago, de lavados bronquicos y pancreáticos. En el suero se encuentra DNA desnudo y las mutaciones en este DNA pueden servir como indicadores de tumores en lugares distantes **(91,92)**. Con el desarrollo de técnicas más cuantitativas y sensibles, la detección de alteraciones genéticas en las células, o en el DNA, puede ser posible para identificar individuos propensos a desarrollar cánceres específicos.

Las técnicas emergentes permitirán la cuantificación de mutaciones aleatorias. Suponiendo que la tasa de mutaciones de las células cancerosas fuera 100 veces mayor en la fase precoz de la carcinogénesis, sólo así se anticiparía la alteración de un nucleótido por millón de nucleótidos secuenciados. Esto resalta el nivel corriente de la tecnología; se puede establecer cambios de la secuencia de nucleótidos en un número muy limitado de tumores.

La mayoría de las metodologías, en 10-100 veces acopladas con copias singulares de clones de un gen, hacen posible cuantificar las mutaciones aleatorias en tumores múltiples y evaluar si la acumulación de mutaciones es de pronóstica para la susceptibilidad de cáncer.

Los cánceres se originan en un campo de células normales implicando mutaciones múltiples. Los estudios más recientes sugieren que los cánceres de colon se originan en el medio de una comunidad de células premalignas que expresan un fenotipo mutante. Los estudios de Rabinovitch y col. **(34)** sobre los cambios de cromosomas en pacientes con colitis ulcerativa crónica proporcionan una demostración persuasiva de este concepto. Ellos detectaron un aumento de pérdida de brazos de cromosoma en células de biopsias rectales de pacientes con colitis ulcerativa y con cánceres asociados en el colon, pero no en células de pacientes con colitis ulcerativa sin displasia o cáncer. **(34)**.

Las células mucosas con mutaciones están en sitios distantes del cáncer. Esto implica que los cánceres son originados dentro de un campo extensivo de células mostrando un fenotipo mutante. Este estudio es de importancia práctica porque puede proporcionar un procedimiento simple para el rastreo en los pacientes con colitis ulcerativa que son propensos a desarrollar un cáncer de colon.

Se ha informado de la presencia de mutaciones puntuales en tejidos precancerosos tanto en la hemocromatosis como en la enfermedad de Wilson **(93)**. Ambas enfermedades se caracterizan por un aumento de la incidencia de hepatoma primario.

Mutaciones aleatorias (no clonales) en el gen *p53* similares a las producidas por especies oxígeno-reactivas fueron detectadas en pacientes con hígados no tumorales con enfermedad de Wilson. En el último estudio, el ensayo usado presentó una sensibilidad elevada excepcional, detectando una mutación en 10 nucleótidos y entonces puede ofrecer una ventaja al examinar otros genes en eventos aleatorios.

Utilizando el mismo proceso, Hsain y sus col. (94) detectaron alelos *p53* mutados en tejido de colon no-tumoral de pacientes con colitis ulcerosa; posteriormente, mantuvieron que los cánceres pueden originarse en un campo de células con mutaciones. Aunque estos estudios sean limitados para las enfermedades precancerosas asociadas con inflamación, presentan la evidencia adicional de que las mutaciones en tejidos normales preceden al comienzo de malignidades observables.

Otra evidencia presenta el concepto de que la expansión clonal regional de células fenotípicamente normales pero genéticamente alteradas pueden preceder el desarrollo de cánceres. La inactivación de un factor de crecimiento de tipo-insulina por delección de una región polidesoxiguanosina ocurre en tejido hepático adyacente a carcinomas hepatocelulares (95). Regiones con pérdida de heterocigocidad referidas en lóbulos morfológicamente normales adyacentes a carcinomas de mama y áreas clonales ocultando mutaciones en el gen *p53* presentes en la piel normal. Es posible que tumores se originen en campos de células que presentan una tasa más elevada de mutaciones atribuibles a modificaciones epigenéticas. Silber y col. (96) describen en un trabajo que los gliomas están envueltos por células normales que son defectuosas en la reparación del daño de DNA dañado por agentes alquilantes (Mer-), implicando que la falta de producción de *O* alquilguanina-DNA transferase es un factor que predispone al desarrollo de tumores cerebrales.

Las quimioterapias dirigidas contra diana específicas u oncogenes son improbables de matar todas las células cancerosas. El hecho de que ningún oncogén o gen supresor sea universalmente mutado o con baja regulación en todos los casos de cáncer humano sólido refuerza el concepto de que los tumores son heterogéneos. La heterogeneidad acentuada en poblaciones celulares dentro de un tumor presenta una gran cantidad de células mutadas aleatoriamente, algunas de las cuales posiblemente contengan mutaciones resistentes a agentes quimioterapéuticos. En presencia de quimioterapia, las células tumorales mutantes tienen una ventaja de crecimiento selectivo y vuelven a poblar el tumor. Parece que los tumores contendrían también células que son resistentes a los anticuerpos dirigidos contra oncogenes específicos.

Por lo tanto, las quimioterapias son probablemente incapaces de erradicar el 100% de las células tumorales de un tumor y hay que confiar en los mecanismos inmunológicos del hospedero, que en muchos casos están disminuidos por la quimioterapia del cáncer.

El gran número de mutaciones en un tumor sugiere la posibilidad de que la fidelidad de la replicación del DNA opera cerca del límite de error para la viabilidad de la célula estando los efectos de la mutagenesis aumentados. Los errores posteriores en la replicación del DNA pueden ser letales. Para mantener este concepto está el elevado nivel de apoptosis en los tumores. Mas aún, muchos fármacos usados en el tratamiento del cáncer son potentes mutagenios y la mutagénesis facilitada puede ser un factor significativo en la eficacia terapéutica. Por lo tanto, se debe considerar el test de los análogos nucleósidos mutagénicos en el tratamiento de las malignidades humanas, pesando fuertemente el problema de la inducción de tumores secundarios.

De particular utilidad serán los análogos que no están sometidos a la escisión por enzimas de reparación humana.

Si un fenotipo mutante determina la evolución del proceso carcinogénico, puede ser posible prevenir el cáncer por retardación. Una reducción de dos veces la tasa de mutación puede prolongar el tiempo entre el inicio y las manifestaciones clínicas del cáncer de 20 años o más, o hasta 40 años o incluso más. La prevención por retardación puede ser particularmente aplicable a cánceres asociados con inflamación crónica prolongada, por bacterias (cáncer gástrico) (97), por virus (hepatitis primaria – (98,99), por insuficiencia inmunológica (colitis ulcerativa – (100), o etiología desconocida (pancreatitis crónica- (101). En cada enfermedad, la respuesta inflamatoria crónica está asociada con la generación aumentada de especies oxígeno-reactivas por las células inflamatorias. Estos oxidantes reactivos son generados por fagocitos para matar bacterias pero puede también dañar el DNA celular. La eliminación del agente causante o la reducción de la respuesta inflamatoria predecirá la retardación de la aparición clínica de tumores asociados.

4.18 Consideraciones globales

El fenotipo mutante indica que el cáncer en el estado denominado “adulto” resulta de la acumulación de gran número de mutaciones somáticas.

Las mutaciones ocurren aleatoriamente a lo largo de la extensión del genoma; dentro de éstas se encuentran las mutaciones de genes que funcionan en células normales para mantener la estabilidad del genoma y para garantizar su copia con gran fidelidad y su transmisión a la progenia durante cada división celular. Las mutaciones en los genes de la estabilidad genética inducen a posteriores mutaciones a través del genoma, incluyendo otros genes relacionados con la manutención de la estabilidad genética.

Es necesario enfatizar sobre las polimerasis del DNA y las enzimas que participan en la reparación del DNA, pero hay muchos otros objetivos potenciales para la generación de un fenotipo mutante.

Los procesos que conducen a posteriores acumulaciones de mutaciones incluyen la selección de células que ocultan las mutaciones sufridas y el permanente bombardeo del DNA por sustancias químicas reactivas producidas en los procesos metabólicos normales.

Los avances actuales en la secuenciación del DNA y en las tecnologías relacionadas con él hacen posible que hoy día se pueda medir la acumulación de mutaciones aleatorias en el cáncer humano y por tanto fundamentar la hipótesis de un fenotipo mutante en el cáncer humano. Ahora será importante determinar la distribución de genes mutantes en las células individuales dentro de un tumor, tanto para marcar la evolución de las líneas clonales como para identificar los genes que sufren mutaciones en muchas células.

Dentro de estas mutaciones profundas están las que hacen que una célula en su estado de fenotipo mutante defina la posibilidad de desarrollar resistencia a los medicamentos, o de orientar la terapia por fármacos.

Los métodos más sensibles para la detección de mutaciones aleatorias deben permitir monitorizar materiales humanos y sangre, o células precancerosas, que pueden posibilitar la intervención terapéutica precoz. La verificación más importante de la hipótesis del fenotipo mutante puede ser la demostración de que una reducción en la multiplicidad de mutaciones aleatorias en las células cancerosas prevenga el desarrollo de la malignidad.

CAPÍTULO V

5. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER COLORECTAL

5.1 Aspectos generales

En el Reino Unido mueren anualmente 19.000 personas por causa del cancer colorectal. Estas estadísticas no pueden ser muy rigurosas porque no son echas las diferencias anatomicas distintas entre recto y colon, que son, por veces, un tanto arbitrarias. Las tasas incidencia por cáncer del colon y del recto en Estados Unidos son 31,9 y 12,4 casos por 100.00 personas, respectivamente y la tasa anual combinada de mortalidad para estos dos canceres es de 17,5 muertes por 100.000 de población. (1)

En los Estados Unidos, en 1999, las estadísticas señalaban 129.400 nuevos casos y 56.600 casos de muerte por cáncer colorectal. (2)

En el Reino Unido son resecaados anualmente alrededor de 6000 cánceres de colon y recto. (3) En los Estados Unidos hay evidencia que el porcentaje de cáncer del colon está aumentando, con seguridad, cuando es comparado con el cáncer del recto.

Hay diferentes estudios sobre la tasa de incidencia relativamente a sexo, pero los hombres parecen tener mayor riesgo para el cancer rectal, mientras las mujeres para el cáncer del colon.

La incidencia de los dos cánceres aumenta con la edad, siendo la mayor incidencia relativamente a la edad cerca de los 60/65 años. El cáncer de colon y recto, dentro del universo del mundo de los países desarrollados y/o industrializados, tiene una incidencia de las más altas. (4)

En los Estados Unidos el cáncer colorectal conta para cerca de 15% de todos los cánceres diagnosticados anualmente. (5,6)

En el año de 2001, murieron cerca de 48.100 personas a consecuencia del cáncer colorectal y fueron diagnosticados 98.2000 nuevos casos. (7)

La incidencia de cáncer del colon y la mortalidad varían acentuadamente según la raza/etnicidad, especialmente cuando se hace comparación entre Africanos y otros grupos populacionales. Entre 1990 y 1996, las tasas de incidencia de cáncer colon/recto y de mortalidad fueron 50,7 y 23,1 por 100.000, respectivamente dentro de los Africanos Americanos. La incidencia y mortalidad para blancos fueron 43,9 y 17,4 por 100.000, respectivamente. Las diferencias en las tasas de incidencia para el cáncer colorectal son extensamente inexplicadas. Aunque algunas de estas disparidades puedan ser atribuidas al acceso a los sistemas de salud y diferencias socioeconómicas, estos factores no explican completamente las tendencias divergentes. (8)

El aumento en la incidencia del cáncer de colon en los Africanos Americanos no parece ser explicable por tasas mayores de detección precoz y rastreo. (9)

Diferencias en las características de la susceptibilidad heredada, como variaciones polimórficas e interacciones relacionadas con genes/medio, tendrán a ser explicadas con futuros estudios.

Estudios epidemiológicos han demostrado, con seguridad, acentuadas mudanzas en la incidencia del cáncer de colon con los aspectos geográficos y migración, sugiriendo un importante componente ambiental para el estudio del riesgo del cáncer colorectal. (10)

Factores dietéticos han sido profusamente estudiados y están dentro de los factores de riesgo aceptados como los más vastos en el cáncer colorectal. (11,12)

A pesar de muchos estudios a lo largo de los últimos 10 años el impacto de muchos factores dietéticos en la carcinogénesis colorectal no está aún resuelto. Las tendencias del cáncer colorectal en los Estados Unidos son significativamente diferentes de las de Europa. En el Reino Unido, la incidencia ha aumentado ligeramente desde 1971, mientras que en finales de 1990, la mortalidad ha disminuido cerca de 50% desde 1950. Estas tendencias son concordantes con las tasas de supervivencia a los cinco años, mejorando desde los 20% en comienzos de 1970 hasta casi 45% a mediados de 1990.

En Europa, ha habido generalmente más declinio en la mortalidad de la mujer que en el hombre, lo que puede ser debido a un aumento del uso de contraceptivos y de la terapéutica de sustitución hormonal. (13)

La mortalidad ha bajado recientemente en muchos estados de la Unión Europea, pero esta aumentando en Grecia, Portugal y España.

A pesar de la evidencia acumulada, incluyendo varios estudios controlados randomizados sobre la eficacia de la indagación de sangre oculto en las heces, que permite afirmar la existencia de una reducción de la mortalidad por cáncer colorectal en un programa aplicado a una cierta población, muchas personas en países desarrollados no se han sometido a cualquier rastreo. (14)

Una Quinta parte de las series del “Annual Reports to the nation the Status of Cancer” (15) Destaca los datos de los cuatro cánceres mas comunes – pulmón, mama de la mujer, próstata y colorectal – que en total representan mas de la mitad de los casos de cáncer y de muertes por cáncer en Estados Unidos. Estos cuatro cánceres tienen la misma importancia en la mayor parte de Europa. (16)

Hay más de 20 años, Doll y Peto. (17) utilizando datos de estudios hechos en 1970 y antes, concluyeron que los datos de la mortalidad eran generalmente más creíbles que los datos de la incidencia.

Aun así, los datos de los registros de cáncer de la mundialmente afamada oficina de datos epidemiológicos SEER (Surveillance, Epidemiology and En Result) del “National Program of Cancer Registries (NPCR), que sigue los criterios de alta calidad divulgados por la “North American Association of Central Cancer Registries” (NAACCR), y de un gran número de registros en todo el mundo, siguen los mas elevados estándares de calidad divulgados por el IARC (International Association of Cancer Registries), siendo por eso muy creíbles. Los datos de la mortalidad nunca fueran exentos de tendencia ó criticismo. (18)

La muerte ni siempre es correctamente certificada, ni siempre corresponde a la causa correctamente codificada, mismo en los casos de cáncer. Muchos estudios tienen mostrado una vasta variabilidad en el rigor de la certificación de la muerte y su codificación, particularmente entre los países. Para canceres con supervivencia moderada ó buena, las tendencias de la mortalidad muestran solamente una indicación

retrasada de los nuevos casos, porque los pacientes que mueren en cualquier año pueden haber sido diagnosticados y tratados muchos años antes. Los datos de la mortalidad son también un indicador imperfecto e indistinto de las tendencias de la eficacia del tratamiento, reflejando tendencias anteriores tanto de la incidencia como de la supervivencia y no pueden ser interpretados sensiblemente sin estos últimos.

Las tendencias de la incidencia y de la supervivencia de los registros de cáncer aportan una observación adicional en los complejos problemas de control del cáncer. (19)

En los últimos 30 años la supervivencia de casi todos los cánceres ha mejorado genuinamente, por veces dramáticamente. Las implicaciones son que las tendencias en la incidencia y la mortalidad tienen divergido. Si esto puede parecer verdadero, entonces esta concordancia general en los resultados de lo que son dos sistemas ampliamente independientes ----- registro de cáncer y muerte ----- induce mayor confianza en cada uno de ellos. Pero ninguna incidencia, supervivencia, o mortalidad es perfecta y ninguna es adecuada en sí misma.

En Europa, los sistemas de registro de cáncer de la población, desde hace muchos años, con cobertura nacional en cada país (muchas veces regionalmente organizados), y con follow-up de los casos, completa virtualmente existen en los países nórdicos (Dinamarca, Finlandia, Islandia, Noruega y Suecia), en el Reino Unido y en muchos países del Báltico y Europa Central de la anterior Unión Soviética.

La cobertura en otras partes de Europa, como en Francia, Alemania, Italia, Portugal y España, es, sin embargo, relativamente pobre. (20)

En este contexto, el establecimiento de un registro de cáncer riguroso es una vía importante en el sentido del control del cáncer.

5.2 Aspectos epidemiológicos generales

Los cánceres de colon y recto partirán muchos factores de riesgo ambiental y ambos son encontrados en personas síndromes genéticos específicos. Aún, hay algunas diferencias en la etiología.

En todo el mundo se calcula, que en 1996 existieron 875.000 casos de cáncer colorectal, lo que representó cerca de 8,5% de todos los casos nuevos de cáncer. (World Health Organization (WHO). (21)

Las tasas de incidencia varían, aproximadamente, veinte veces al redor del mundo, encontrando-se las tasas más elevadas en el mundo desarrollado y las tasas más bajas en India. (22,23)

El cáncer de colon es el único cáncer que tiene aproximadamente la misma frecuencia en hombres y mujeres. (24)

En las áreas de incidencia elevada, como Estados Unidos y Australia, así como en Japón e Italia, donde las tasas están por subir rápidamente, las tasas de los hombres ahora exceden las de las mujeres tanto como 20%. El cáncer rectal en las mujeres está aumentado el doble comparativamente a los hombres.

La supervivencia a los cinco años, después del diagnóstico de cáncer de colon es de cerca de 55% en los Estados Unidos. (25)

El cáncer rectal puede tener una supervivencia mejor cuando es diagnosticado en programas de rastreo. Las diferencias internacionales, datos de migrantes y las recientes mudanzas rápidas en las tasas de incidencia en Italia, Japón, China urbana y polinesios urbanos en el Hawaii muestran que el cáncer de colon, en particular, es muy sensitivo a cambios en el ambiente.

Entre los inmigrantes y sus descendientes, las tasas de incidencia suben rápidamente hasta los valores de las tasas del país hospedero, por veces en la misma generación de los migrantes. (26,27)

Las diferencias internacionales de veinte veces en los inmigrantes de regiones de más bajo riesgo para regiones de más elevados riesgos pueden ser explicadas, en gran parte, por las diferencias significativas en la dieta y otros factores ambientales diferentes.

Además, aunque las tasas de la incidencia en Japón hayan sido bajas hasta hoy poco tiempo, las tasas más elevadas en el mundo son ahora observadas entre los inmigrantes japoneses en Hawái. Sin embargo, el cáncer colorectal es conocido como el que ocurre más frecuentemente en ciertas familias, (28) y hay varios síndromes genéticos raros que transportan un riesgo marcadamente elevado (29,30,31) Entonces, así, el cáncer colorectal está, en términos de causa/efecto, relacionado tanto con los genes, como con el ambiente.

5.2 Aspectos epidemiológicos específicos

Muchos de los obstáculos sobre la interpretación de los datos alimentarios son conocidos y dependen, entre otros motivos, del marketing y intereses económicos de la industria y comercio de los alimentos, así como a cuestiones culturales y estilos de vida. Además de estas realidades, hay otras que pueden ser profundizadas, en tratamiento extensivo de estas cuestiones sobre dietas, nutrientes y comidas, con la consulta de obras sobre el tema (32-35). En estas publicaciones hay referencias abundantes a estudios conjuntos y estudios controlados de asociaciones entre factores dietéticos y cáncer colorectal, así como hay relevantes citas y más detalle sobre el tema. Abordaremos los hallazgos más importantes, con algunas de las más recientes publicaciones. Para una comprensión básica sobre la interpretación de los datos relativos a los criterios de selección de las tendencias y causas, e inferencias obtenidas de los estudios epidemiológicos, será útil consultar un trabajo de Hill (36).

Para una discusión de la causalidad específica, en relación a los constituyentes de la dieta, con el cáncer colorectal, es fundamental al estudio del capítulo 3 de la referencia

Hay muchos estudios conjuntos abordando la relación entre cáncer colorectal y el consumo de vegetales y fruta. Algunos de estos estudios llegan a conclusiones poco sólidas (y por veces no enteramente consistentes) en cuanto al bajo riesgo de cáncer colorectal en las personas que consumen abundante fruta y verduras (37).

Hay un estudio que aborda los hábitos alimentarios de los Adventistas del Séptimo Día cuanto a la relación de elevado consumo de ensalada y verduras y la reducción, aunque no muy significativa, del riesgo la incidencia del cáncer colorectal. Hay un otro estudio sobre poliposis adenomatosa en hombres, reportándose a una disminución, en la mitad, del riesgo de transformación maligna con la mayor ingestión de vegetales y frutos con fibra. (38).

Hay mas de veinte estudios controlados de cancer colorectal y consumo de verduras y frutos, casi todos refiriéndose a un grado modesto más elevado de por lo menos una categoría de verduras, o de frutas. Hay consistencia en cuanto a la disminución de los riesgos de cáncer colorectal en los regímenes alimentarios ricos en verduras crudas, Verduras verdes y [“cruciferous” vegetables].

Los estudios sobre el consumo de fruta y el riesgo de cancer colorectal son menos abundantes y sus conclusiones son menos evidentes que las de los vegetales (39).

Alimentos ricos en fibra incluyen verduras, así como cereales. El efecto de la dieta rica en fibra en la carcinogenesis del colon ha si propuesto por Burkitt.(40). No obstante existen estudios contradictorios sobre la hipótesis del beneficio de la dieta rica en fibra como medida preventiva. Los más recientes estudios conjuntos de dieta con fibra total no encontraron asociacion alguna con carcinoma, o con adenoma en las mujeres (41).

En un análisis combinado de 13 estudios controlados fue encontrada una reducción en el riesgo de cáncer colorectal con el aumento da ingestión de fibra dietética, al igual que otros datos similares hayan sido referidos en un meta-análisis de 16 estudios controlados (42).

En un estudio prospectivo, con alimentacion rica en fibra (de vegetales y cereales), se verificó una disminución, mayor que la mitad, del riesgo de adenomas colorectales en el hombre.. Estudios controlados han evidenciado asociaciones inversas en regímenes alimentarios ricos en fibra total, fibra de cereales y fibra de vegetales y frutos.

No hay datos claramente suportativos de los ensayos de intervención en pacientes con poliposis adenomatosa familiar (43) exepcto en una análisis post-hoc de personas adherentes. La fibra no tuvo cualquier efecto significativo estadístico en la ocurrencia de adenomas esporádicos metacronos (44).

Globalmente, la relación entre ingestión de fibra y riesgo de cáncer colorectal, aunque muchas veces inversa, es algo inconsistente, no sólo por causa de la naturaleza heterogénea de la fibra y las diferencias

en el modo como es medida (45). Sin embargo, los datos limitados en los humanos no sugieren un efecto fuerte de cualquier origen o tipo de fibra.

La información del World Cancer Research Fund concluyó "... la evidencia de que las dietas ricas en vegetales protegen contra los cánceres de colon y recto es convincente." ELWCRF también concluyó "las dietas ricas en fibra posiblemente disminuyen el riesgo de cáncer colorectal", pero "los datos sobre fruta son más limitados e inconsistentes; ningún juicio es posible."

Otros nutrientes han sido invocados para explicar los reducidos riesgos de cáncer colorectal en asociación con el consumo de vegetales (46). Muchos de estos nutrientes no son fácilmente mensurables en estudios epidemiológicos, pero varios micronutrientes han sido referidos (incluyendo carotenoides, ascorbatos y folatos). Para más información y pormenores hay que consultar el informe de WCRF.

Freudenheim y colaboradores (47) que fueron los primeros a proponer la hipótesis folatos/cáncer colorectal, encontraron bajos riesgos de cáncer de colon y recto en asociación con ingestión elevada de folatos en sus estudios controlados. Sin embargo hay estudios conjuntos que hablan de la no existencia de asociación entre la ingestión total de folatos en la dieta y el riesgo de cáncer de colon en los hombres (48).

Sin embargo, se observa en los hombres un aumento del riesgo del cáncer de colon cuando hay una baja ingestión de folatos y de metionina asociada a elevados consumos de alcohol. Lo mismo se observó en el mismo estudio conjunto cuanto a los polipos adenomatosos (49). En un gran estudio controlado multicéntrico no fue encontrada una relación entre micronutrientes y el riesgo de cáncer de colon, envolviendo el metabolismo del grupo metil (50).

Globalmente, los datos sugieren que la relación entre el riesgo de cáncer colorectal y la ingestión de vegetales es más consistente que con cualquier micronutrientes específicos.

Hasta mediados de 1997 habían sido examinados siete estudios conjuntos sobre ingestión de carne y sus riesgos de cáncer colorectal, con gran detalle y citas originales. Un estudio de los Adventistas del séptimo día – predominantemente una población vegetariana – se refiere a que la ingestión de carne no estaba asociada con riesgo de cáncer colorectal.

Un estudio hecho con enfermeras en Estados Unidos referió que el conjunto de mujeres que consumían carne roja más frecuentemente, cuando fue comparado con otro conjunto de mujeres que comían raramente carne roja, mostró que aquellas tenían un aumento significativo, dos veces y media más que estas, en el riesgo de desarrollar cáncer de colon. En otro estudio con hombres que consumían cinco o más veces, por semana, carne de vaca, carne de cerdo, o carne de cabrito, tuvieron un riesgo moderadamente aumentado de cáncer de colon, cuando fue comparados con otros hombres que consumían estas carnes muy pocas veces por mes.

En contraste con estos estudios la sociedad de cáncer Americana en su totalidad demostró que no existían diferencias en el riesgo entre los cuantiles más altos y más bajos de consumo de carne en ambos sexos. Estudios de salud de las mujeres de Iowa y estudios conjuntos de Netherlands y Finish también no mostrarn aumento de riesgo con el consumo de carne.

En dos cuatro estudios conjuntos que examinaron la ingestión de carne procesada se verificó la existencia de un aumento estadísticamente significativo de cáncer colorectal con el aumento del consumo de carne y otro mostraba un aumento modesto de la elevación del riesgo. El peso de la evidencia apunta para un aumento del riesgo, mismo aún con hallazgos poco esclarecedores.

Un estudio conjunto entre mujeres de New York (51) no encontró asociación con consumo de carne. Más recientemente dos otros estudios conjuntos analizaron el consumo de carne en poblaciones de bajo consumo (52). Un estudio no encontró asociación con la mortalidad del cáncer colorectal aunque los investigadores fuesen capaces de detectar una asociacion entre el consumo de carne y la enfermedad cardiaca coronaria. El otro estudio detectó un riesgo elevado en los Adventista del Setimo Dia en asociación con elevado consumo, tanto de carne “Roja”, como de carne blanca.

Gerhardsson de Verdier y colaboradores, en un estudio en Stockhom, confirmaron el aumento significativo del riesgo de cancer del colon en los consumidores más frecuentes de carne frita, con la superficie muy tostada (53).

Schiffman y Felton también se refieren a un aumento de frecuencia de 3,5 veces del riesgo de cáncer del colon en aquellas personas que prefieren la carne bien cocinada (54). En otro estudio controlado ha sido encontrada un aumento de pólipos adenomatosos (55).

Las aminas heterociclicas son producidas cuando cuando la carne es cocinada.

Hoy, sin embargo, no está claro si el riesgo que envuelve la ingestión de carne y grasa animal dependen de su procesamieto, o de sus métodos de ser cocinada. Tal como con el estudio de los nutrientes constituyentes en los vegetales, estudios epidemiológicos están siendo hechos para investigar la asociación entre el riesgo del cáncer colorectal y algunos de los nutrientes importantes mensurables encontrados en la carne (incluyendo grasa, grasa saturada/animal, proteínas y hierro).

La gran mayoría de los estudios controlados sobre grasas evidenciaron riesgos aumentados con regímenes de elevada ingestión.

Hay muchos artículos intentando establecer diferencias entre grasa y roral de ingestión energética. En otro estudio ha sido hecho un análisis combinado de trece estudios controlados de cáncer colorectal de varias poblaciones con diferentes, riesgos de cáncer y dietas (56). En este análisis se concluyó que no existía cualquier riesgo aumeutado de cáncer colorectal con cualquier tipo de grasa desde el punto en que la ingestión del total de energía alimentaria no sea excedida relativamente al padrón normal. Más, aún, no hubo asociaciones estadísticamente significativas para cualquier de grasa en la análisis de los subgrupos por sexo, edad o localizacion del cáncer.

Así, en conclusión, estos recientes estudios conjuntos y el análisis combinado de los 13 estudios controlados no consiguieron encontrar una clara evidencia para la asociación de cáncer colorectal con la dieta rica en grasa, como las conclusiones observadas en los primeros estudios. Giovannucci y Goldin concluyeron que la asociación con el consumo elevado de carne “roja” no parece ser mediada por su contenido lipidico (57).

Gobalmente, los datos sugieren una mas fuerte asociación del cáncer colorectal con carne que con cualquier nutrientes asociados, y que mientras tanto, la carne procesada, como la grasa animal saturada

están posiblemente asociados con un aumento del riesgo de cáncer colorectal y no parecen tener una gran influencia los alimentos ricos en grasa total, o ricos en proteínas totales.

Hay estudios buscando una asociación entre la ingestión elevada de calcio y el cáncer colorectal, pero los resultados no son consistentes. Aunque haya artículos hablando de la asociación entre el calcio y la reducción de la proliferación en la parte superior de las criptas de la mucosa del colon (58).

Datos acumulados muestran que las elevaciones de la tasa de calcio disminuyen la probabilidad de aparición de adenomas metacrónicos (59).

Hay un trabajo reciente, doblemente ciego, con intervención controlada que muestra una reducción estadísticamente significativa de 15%-20% en la incidencia de adenomas colorectales metacrónicos (60).

Hay algunas otras variables alimentarias, en grados variados, asociadas con riesgo aumentado de cáncer colorectal (e.g. consumo aumentado de huevos, azúcar y mayor frecuencia del número de comidas al día), y otros alimentos están asociados con, posiblemente (e.g. Carbohidratos complejos, vitaminas D y E).

La relación entre actividad física y una reducción del riesgo del cáncer de colon está entre los hallazgos más consistentes en la literatura sobre epidemiología, muy citada en estudios de actividad ocupacional, actividad de ocio y de actividad total.

Personas con niveles elevados de actividad en sus vidas estuvieron menos propensas a los riesgos del cáncer de colon y de forma menos expresa al cáncer de recto. Cuando se trata de la masa corporal hay estudios que apuntan para un aumento del riesgo del cáncer de colon dos veces más cuando su estructura corporal/peso está en valores considerados de obesidad.

En contraste, hay estudios que no muestran ninguna asociación entre el índice de masa corporal (BODY MASS INDEX – BMI), o sea, peso en Kg/altura en m², y el riesgo de cáncer de colon en los hombres.

“Waist-to-hip” ratio mostró estar asociada con el aumento de riesgo de cáncer colorectal en los hombres pero no en las mujeres (61,62).

Globalmente, la evidencia sugiere que la obesidad puede aumentar el riesgo de cáncer de colon (particularmente en los hombres), pero como con la actividad física, la obesidad no parece influir en el riesgo de cáncer rectal.

En 1969, Faumeni y colaboradores verificaron que las “nuns” exhibían un aumento de la incidencia no solo de cánceres asociados a hormonas, pero también de cáncer de colon (63).

En los años 70 algunos estudios controlados llegaron a la conclusión (sin la explicar) que había un mayor riesgo de cáncer de colon dentro de las mujeres nulíparas.

En 1980 McMichael y Pottex presentaron una hipótesis (basada en aquellos estudios, en las diferencias de incidencia del colon de cáncer en los dos sexos, en las diferencias internacionales en la fertilidad y en datos quimales) en que el aumento de parejas, la edad, el uso de contraceptivos orales, cada uno por sí, estarían asociados con un reducido riesgo de cáncer de colon como resultado evidente de los cambios en los lípidos y ácidos biliares que ocurren con los cambios en el medio hormonal. Actualmente, hay otra hipótesis, que podría explicar la influencia de las hormonas en el cáncer de colon, mediante la metilación de los receptores de estrógenos y con el menor riesgo de polipos adenomatosos, que se observan en las mujeres que están bajo terapia hormonal de sustitución, (64) y con el menor riesgo de polipos adenomatosos, que se observan en las mujeres que están bajo terapia hormonal de sustitución (65-69).

Dentro de los factores epidemiológicos en que el riesgo de cáncer colorectal está aumentada, la historia familiar tiene un gran destaque (síndromes de alto riesgo), comparativamente con la población en general. Personas con historia familiar de cáncer colorectal tienen una probabilidad doble de riesgo de cáncer colorectal comparativamente con la población en general (70-74)

Los medicamentos del grupo anti-inflamatorios no esteroides, incluyendo la aspirina, han sido consistentemente asociados con un riesgo reducido de cáncer colorectal (75-81). Cuatro estudios conjuntos señalaron un menor riesgo de cáncer colorectal o mortalidad menor (82-85).

Hay estudios que concluyeron con la asociación inversa entre los polipos adenomatosos y el uso regular de aspirina (86,87). Un estudio con sulindac reveló que los pacientes con polyposis adenomatosa familiar tenían regresión significativa con su tratamiento (88). Sin embargo, hay algunos estudios que no son tan conclusivos sobre la influencia de los anti-inflamatorios no esteroides, incluyendo a aspirina (89-91).

En los roedores, la aspirina, la indometacina, el sulindac, el piroxican y el celecoxib (un inhibidor de la ciclooxigenase-2 [COX-2]especifica) inibem la carcinogenesis (92-97).

Los cigarrillos no han demostrado significativamente aumentar el riesgo de cancer colorectal, pero los cigarros y la pipa si (98,99). Sin embargo hay estudios que verificaram existir un riesgo mas elevado de cancer colorectal entre los fumadores de cigarrillos, especialmente aquellos con una longa historia de ahumar (100-103). Todos los estudios que encontraron asociación entre ahumar cigarrillos y polipos adenomatosos, también mostraron elevado riesgo de cancer colorectal (104-116). En 1957, en la primera vez fue referido en un estudio que encontró un elevado riesgo de cancer colorectal entre los grandes bebedores diarios de cerveza, cuando es comparado con los abstemios (117).

Subsecuentemente, esta asociación con cánceres del colon fue explorada en muchos otros estudios. Sin embrago hay estudios divergentes cuanto al riesgo de cancer colorectal y sumortalidad. No hay una fuerte evidencia que sugira que una origen de alcohol (por ejemplo, cerveza) tenga mas asociación con el aumento de riesgo de cáncer colorectal, que con cualquier otra bebida alcoholica. La informacion del WCRF (Fundación de Investigacion de Cáncer Mundial) concluyó que “... el alto consumo de alcohol problemente aumento el riesgo de canceres del colon y recto”, y la asociación esta probablemente”relacionada con la ingestión total de etanol, de acuerdo con el tipo de bebida”.

CAPÍTULO VI

6. MUTAGENIOS EN LA ALIMENTACIÓN HUMANA

Varias líneas de evidencia indican que la dieta y los comportamientos dietéticos pueden contribuir al aumento del riesgo de cáncer. Una vía para que esto ocurra es a través de la ingestión de mutagenios alimentarios.

Los cánceres esporádicos resultan de interacciones gen-ambiente en que el ambiente incluye exposiciones endógenas y exógenas. Cuando se habla de mutagenios alimentarios se define el ambiente como exposición alimentaria en el contexto de las interacciones gen-ambiente.

Los mutagenios causan diferentes tipos de daño del DNA: alteraciones de nucleótidos y aberraciones cromosómicas severas. Muchos mutagenios empiezan su acción a nivel del DNA formando complejos, carcinogenio-DNA que resultan de ligaciones covalentes de una carcinogénesis que puede ser modificada por trazos heredables, normalmente, genes de baja penetración que afectan la exposición del DNA al mutagéneo a través de la activación metabólica y detoxificación o respuestas celulares al daño del DNA a través de mecanismos de reparación del DNA, o de muerte celular.

Existen algunos mutagenios alimentarios identificados (por ejemplo: aflatoxina), o sospechosos (por ejemplo: N-nitrosaminas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, o aminas heterocíclicas). Los órganos objetivo para estos agentes son numerosos, pero hay especificidad órgano – objetivo para cada una. La mutagénesis sin embargo, no es la única vía que liga los comportamientos dietéticos y los cánceres.

Hay una creciente evidencia de que factores epigenéticos incluyen cambios el cuadro de la metilación del DNA, causan cancer y pueden ser modificados por componentes alimentares. Además, presentan cambios en el cuadro de metilación del DNA, causan cáncer y pueden ser modificados por componentes alimentarios. También el daño del DNA puede ser indirecto desencadenando daño oxidativo del DNA.

Cuando se considera la dieta humana, se debe reconocer que los alimentos contienen tanto mutagenios, como componentes que disminuyen el riesgo de cáncer como los antioxidantes. Entonces cánceres relacionados con la nutrición en última consideración desarrollan un balance entre carcinogénesis y anticarcinogénesis.

El mejor camino para evaluar los riesgos nutricionales es a través de los biomarcadores, pero no hay un único biomarcador que haya sido validado. Aunque los paneles de biomarcadores fuesen de lo más apropiado, su uso como reflexión del riesgo de órgano – “*Target*” permanece por determinar. Así mismo cuando nuevos biomarcadores se desarrollan, su aplicación en órganos *objetivo* es problemática porque los tejidos no están fácilmente disponibles. Por ahora, muchos biomarcadores son usados en tejidos sustitutos (por ejemplo: sangre, orina y células de la cavidad oral) que presumiblemente reflejen los efectos biológicos en órganos objetivo.

Los mutagenios alimentarios contribuyen para el apareamiento del cáncer en la extensión de la vía de exposición (cavidad oral, esófago y tracto gastrointestinal) y en órganos que no están en contacto directo con la vía de exposición (por ejemplo: hígado). Aunque haya alguna evidencia de algunos mutagenios identificados y otros sospechosos no hay un conocimiento exacto de cuáles son los mutagenios que causan cánceres que están asociados con los diferentes tipos de dieta (por ejemplo: dieta rica en grasa). Por otro lado, son los constituyentes dietéticos los que reducen los riesgos de cáncer y en algunos casos disminuyendo los efectos de los mutagenios alimentarios y compuestos dietéticos que pueden indirectamente afectar el control celular de la regulación del DNA, vía metilación.

Los cánceres esporádicos resultan de interacciones gene-ambiente en que el ambiente incluye exposiciones endógenas y exógenas **(1,2)**. Para efectos de exposición ambiental, la alimentación del ser humano ejerce su efecto a nivel celular e macromolecular. Los mutagenios alimentarios causan diferentes tipos de daño del DNA, normalmente alteraciones de nucleótidos y aberraciones cromosómicas severas. Muchos mutagenios comienzan su acción a nivel de DNA formando carcinogénio – DNA “adducts” **(3-5)**, que resultan de ligaciones covalentes de un carcinogénio, o parte de un carcinogénio, a un nucleótido. Sin embargo, los efectos de los mutagenios alimentares en la carcinogénesis pueden ser modificados por trazos hereditarios, normalmente, genes de baja penetrancia que afectan la exposición mutagenia del DNA a través de la activación y “*detoxification*”, o respuestas celulares al daño del DNA a través de los mecanismos de reparación del DNA, o de muerte celular.

Hay datos que indican que los mutagenios alimentarios y los carcinogenios alimentarios afectan órganos específicos en vez de afectar cada órgano en el cuerpo. Separadamente los alimentos contienen sustancias que probablemente reducen el riesgo de cáncer, tales como los antioxidantes o algunos tipos de fibras. Debe ser reconocido que los cánceres relacionados con la nutrición ocurren mediante una alteración del equilibrio entre la carcinogénesis y la anticarcinogénesis.

La mutagénesis no es la única vía que liga la exposición dietética y los cánceres. Hay evidencia creciente que factores epigenéticos, incluyendo cambios en los cuadros de metilación del DNA causan cáncer (6) y que pueden ser modificados por componentes dietéticos (7). También el daño del DNA puede ser indirecto por desencadenamiento de daño oxidativo del DNA (8,9).

6.1 Mutagénesis y carcinogénesis

Después de entrar en el cuerpo, los mutagenios alimentarios sufren activación metabólica y “*detoxification*” por enzimas endógenas (10), cuyo papel es liberar el cuerpo de compuestos extraños.

A veces los mutagenios químicamente modificados que son más reactivos (electrofílicos) se ligan al DNA en vez de las moléculas portadoras excretorias. Esta ligación puede entonces causar errores de codificación en el momento de la replicación del DNA. Sin embargo, los mecanismos de reparación de DNA redundantes que existen, pueden reparar los “adducts” del DNA (reparación por excisión), que a su vez pueden ser ayudados por procesos que desencadenan en paraje del ciclo celular y por eso permiten más tiempo para la reparación del DNA.

Estos procesos del ciclo celular son desencadenados por daños del DNA. Si los DNA adducts, sin embargo, no son reparados, pueden causar “point mutations”, deleciones, inserciones o anomalías cromosómicas severas. Ni todos los “adducts” son promutagenios, y algunas secuencias son más propensas para permitir la formación de “adducts” o mutaciones. Si ocurren anomalías cromosómicas severas, entonces hay enzimas de reparación de DNA (reparación por recombinación), que son ayudadas por otras proteínas que retrasan el ciclo celular. Si persiste el daño del DNA, las células sufren muerte celular (oncosis o apoptosis), excepto si hay una orientación clonal selectiva.

Algunas exposiciones dietéticas pueden plausiblemente modificar los efectos de los mutagenios alimentarios. Por ejemplo, las bebidas alcohólicas inducen una isoforma de **citocromo P450 (Cyp)2E1**, que metabólicamente activa las N-nitrosaminas, mientras que la ingestión de vitamina C previene la formación de N-nitrosaminas. La exposición a ciertos mutagenios alimentarios tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (**PAH**) puede inducir **CyP1A1**, que entonces aumenta la activación metabólica de estos compuestos.

Los genes relacionados con el cáncer pueden ser clasificados como protooncogenes y genes supresores de tumor. Los primeros son genes normalmente funcionales que regulan la replicación y la diferenciación del crecimiento celular normal, pero contribuyen para la carcinogénesis cuando sufren mutación, de tal modo que se orientan para una expresión genética descontrolada y proliferación celular.

Los genes supresores de tumores también regulan el crecimiento, la replicación y la diferenciación pero contribuyen para la carcinogénesis cuando una mutación lleva a la pérdida de la función más reciente. Los genes relacionados con el cáncer han sido clasificados como caretaker (“*reparadores*”), “*guardianes*” y “*landscaper*” (11,12).

Los genes “*caretaker*” son responsables de la mantenimiento de la integridad genómica (por ejemplo: reparación del DNA, activación metabólica y detoxificación), y cuando son mutados aumentan la probabilidad de mutaciones en otros genes.

Los genes “*gatekeeper*”(guardianes) son responsables del control del ciclo celular señal conocido como “*transducción*” y replicación. Una vez mutados, estos genes permiten la expansión clonal selectiva. Los genes “*landscaper*” son responsables del abastecimiento de señales para las células adyacentes. Aunque la clasificación de estos genes haya sido originalmente propuesta en el contexto de genes de elevada penetración y síndromes de cáncer familiar, el concepto es también aplicable para los genes de baja penetración y interacciones gen-ambiente (2). Las funciones genéticas específicas y el modo como los genes son mutados deben llevar a diferentes paradigmas en el riesgo de cáncer, así como en los modelos estadísticos para el abordaje de las interacciones gen-gen.

Los efectos de los mutagenios alimentarios en los genes “*caretaker*” y “*gatekeeper*” pueden teóricamente ser modulados por variación interindividual en función de cualquier enzima envuelta en el

daño del DNA y su respuesta (activación metabólica, “*detoxification*”, reparación del DNA, control del ciclo celular, apoptosis, etc.). Para los mutagenios alimentarios que llevan al cáncer, la variación interindividual es comandada por polimorfismos genéticos, donde la frecuencia de la variante genética es $> 1\%$ en la población en consideración.

El riesgo del cáncer esporádico es usualmente modificado por polimorfismos genéticos en los genes de baja penetración (el riesgo de trazo genético es >1 , pero menos de 2), y los riesgos de estos genes son mucho más veces identificados en el contexto de la exposición y no como un efecto principal. Es importante imaginar que aunque el aumento en el riesgo de cáncer asociado con polimorfismos en genes de baja penetrancia es pequeño, el riesgo atribuible en la población es grande debido a la elevada frecuencia de las variantes **(2)**. Mucha de la investigación para las susceptibilidades genéticas se ha enfocado en el metabolismo de la carcinogénesis y la “*detoxificación*” **(13-15)**, y más recientemente se ha enfocado en la reparación del DNA **(16)**. Son necesarios esfuerzos en el sentido de estudiar los genes “*gatekeeper*” y otros “*caretaker*”. Existe la necesidad de identificar los mutagenios alimentarios, o sea, que pueden causar cáncer, a través de estudios experimentales y de la utilización de biomarcadores para evaluar los efectos humanos. Al establecer el papel de los mutagenios humanos en la carcinogénesis se torna necesario disponer de los datos y de interpretar su evidencia experimental y les atribuye una relación de causalidad. **(17)**.

El estudio de los mutagenios alimentarios incluye tareas complementarias, tales como sistemas de modelos químicos que identifican la estructura de los carcinogénesis y su modo de acción, **(18,19)**, modelos de culturas de células humanas y animales que verifican la aplicabilidad de la química a un sistema en vivo **(20)**, modelos en vivo de la carcinogénesis **(21,22)** y estudios e epidemiológicos adicionales que incorporan biomarcadores identificados usando otros modelos **(1,15)**.

Los diferentes tipos de métodos para estudiar los mutagenios alimentarios deben ser interpretados en el contexto de mas que un cenario **(23)**, las dosis usadas **(24)** y de los órganos “*target*” **(25)**.

Por ejemplo, la previsibilidad para la carcinogénesis humana de cualquier método singular (por ejemplo: cultura de células in vitro o estudio animal experimental) es baja, y la concordancia entre diferentes sistemas experimentales es variable.

Hay diferencias significantes en la susceptibilidad entre las especies; algunas son más sensitivas que otras, de lo que la extrapolación de la experiencia animal para la humana puede ser difícil (25-28). Aunque un estudio pueda indicar el potencial mutagénico de un mutagenio alimentario, actualmente la causa de mutaciones y cáncer en humanos puede ser solamente demostrada en humanos. Células genéticamente alteradas y animales pueden aumentar el rigor de los tests laboratoriales predictivos. (29).

Metodologías de “*screening*” (*búsquedas* de alto rendimiento) se están desarrollando para su uso en sistemas experimentales y estudios epidemiológicos (30-32). Un elevado rendimiento puede referirse a la capacidad para identificar un gran número de efectos celulares en un único experimento o la aplicación de un test en gran número de sujetos. Los nuevos métodos incluyen rastreos [Large –scale genomic sreens] genómicos en gran escala basados en “*microarrays*” (33,34) y “*Screens*” proteómicos basados electroforesis 2-D con detección espectrométrica de masa (*FM-Ref.35 ,36*) o “*surface-enhanced laser desorption/ionización*” (37).

Los métodos genómicos y proteómicos son plausiblemente útiles “to screen” para rastrear los efectos toxicológicos y eventos carcinogénicos precoces in vitro y estudios experimentales in vivo (38,39). Algunos métodos pueden ser aplicados a un gran número de asuntos epidemiológicos (40). Sin embargo, la interpretación de los datos, cuando hay un gran número de datos puntuales, tanto para genes conocidos, como para genes desconocidos, las proteínas desafían los modelos estadísticos existentes y requieren nuevos cometidos para interpretación de los datos. Por ejemplo, los mejores métodos para determinar cuadros únicos de expresión que son representativos de un efecto tóxico determinado o agrupamiento de respuestas que prevén una combinación de efectos, están actualmente a ser probados.

Estos métodos usan una agrupación de datos basada en relaciones estadísticas ó vías biológicas.

Otros avances nuevos proporcionan a los investigadores fuertes herramientas para el análisis de las vías carcinogénicas relacionadas con la dieta. La síntesis combinatoria de los compuestos químicos ha aumentado tremendamente la producción de químicos novel y drogas incluyendo suplementos dietéticos

(41-43). Estos representan nuevas oportunidades para la expansión de la investigación del cáncer, así como la comprensión de la carcinogénesis.

Ensayos con biomarcadores son frecuentemente usados para evaluar la exposición a mutagenos alimentarios y de cómo el cuerpo responde a esas exposiciones. Cualquier ensayo que sea ejecutado en un fluido biológico o tejido puede ser considerado un ensayo de biomarcador. Cualquier exposición en este contexto puede referirse a la exposición a niveles celular y macromolecular al contrario de lo que puede ser en los géneros alimenticios o reflejados en los comportamientos dietéticos. Un planteamiento conceptual importante es considerar la dosis biológicamente efectiva de un mutagenio **(44)**, que es una medida del efecto del mutagenio en el DNA (i.e. carcinogenio-DNA “adducts”, alteraciones de nucleótidos, aberraciones cromosómicas) o su sustituto.

La dosis biológicamente efectiva es un fenotipo de la respuesta de la persona a la exposición; normalmente el resultado efectivo de la activación metabólica y “detoxificación”, una falta de la reparación del DNA y una falta del desencadenamiento de la muerte celular. Porque los estudios epidemiológicos necesariamente asientan en la recordación del comportamiento dietético y presentan algunas dificultades para identificar la ingestión de mutagenos alimentarios, el uso dosímetros internos y de biomarcadores puede reducir esta limitación, mejorando la clasificación de la exposición a nivel macromolecular y finalmente la mejoría de la evaluación de los riesgos **(45,46)**. Las encuestas corrientes y los ensayos de biomarcadores son usualmente complementarios y son muy poderosos cuando son usados en conjunto.

El uso de biomarcadores en la epidemiología mejora las evaluaciones de las exposiciones (e.g. caracterizando exposiciones de bajas dosis o poblaciones de bajo riesgo), favorece una contribución relativa de carcinogenos químicos individuales de misturas complejas (e.g., N-nitrosaminas), y evalúa la responsabilidad total de una exposición particular cuando hay numerosos orígenes [e.g. benzo(a) ptereno (bap de la dieta, o tabaco y ocupacional)] **(47)**. Generalmente los biomarcadores son intuitivamente más informativos y deben ser mejores marcadores del riesgo de enfermedad. Sin embargo, muchas veces estos ensayos son técnicamente limitados y “target” el tejido es difícil de obtener.

Aunque los marcadores sustitutos y el uso de tejidos sustitutos sean populares porque reducen las dificultades técnicas, solamente un pequeño esfuerzo ha sido efectuado para tener la seguridad que la sustitución refleje los efectos en estudio. Son necesarios estudios correlacionados y por eso ensayos que midan directamente los efectos de interés de los órganos “*target*”, también son necesarios que éstos puedan ser técnicamente limitados, de trabajo intensivo, o usados en un pequeño número de sujetos. Como un ejemplo, la relación de marcadores sustitutos, tales como “*adducts*” carcinogenio-DNA en la sangre con el órgano “*target*” ha sido parcialmente establecida (48,49). Recientemente el énfasis en la metodología y control de calidad en laboratorios de investigación que tienen su actividad con biomarcadores relacionados con la mutagénesis ha progresado.

Una variedad de ensayos están disponibles para identificar “*adducts*” carcinogenio-macromoléculas en tejidos humanos (50-56). Estos incluyen el “*32P-postlabeling assay/nucleotide cromatografía*”, inmunoensayos tales como inmunohistoquímica, espectroscopia de fluorescencia, cromatografía de gas/espectroscopia de masa y detección química eléctrica. Los métodos más recientes tienen una gran ventaja con las nuevas tecnologías, incluyendo las radiomarcaciones detectables en muy bajas dosis (56) y detectores de fluorescencia. Cada uno de estos ensayos “*adduct*” tiene sus utilidades y limitaciones y todos son confrontados por la sensibilidad y/o especificidad.

Otros ensayos con biomarcadores han sido usados para evaluar las consecuencias biológicas a la exposición a los mutagenios. Un ensayo no específico es la medición de la mutagenicidad de la orina, donde extractos de orina humana son usados en el ensayo de la mutación de la Salmonella. También, cambios de la cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas pueden ser medidas en culturas de linfocitos, pero estos son probablemente muy poco específicos y útiles en la evaluación de los efectos dietéticos.

El estudio de las mutaciones en el gen supresor de tumor p53 está únicamente situado para el estudio de la etiología del cáncer, exposición y susceptibilidad (57), son celulares, incluyendo la manutención de la estabilidad genómica, muerte celular programada (apoptosis), reparación del DNA y control del ciclo celular (58,59).

La frecuencia de la mutación del p53 en el cáncer varía con el sitio del órgano y subtipo histológico (60), la que indica que los cánceres ocurren a través de diferentes vías y exposiciones a nivel celular.

Hay varios ejemplos de exposiciones carcinogénicas específicas que están ligadas a cánceres vía un mecanismo mutacional del p53, particularmente para la exposición de la aflatoxina B1 de la dieta y un hallazgo consistente de mutaciones en el tercer par nucleótido del colon 249 en los cánceres del hígado en regiones con exposición endémica a la aflatoxin B1 **(61,62)**. Combinaciones de estas exposiciones también pueden llevar a diferentes salidas en el mismo sitio de un órgano. Un efecto interactivo de la exposición de la hepatitis B y aflatoxinas aumenta el riesgo de mutaciones **(63)**.

Los ensayos por biomarcadores pueden ser útiles en la confirmación de una hipótesis con vista a las relaciones etiológicas. Por ejemplo, aunque las bebidas alcohólicas estén asociadas con cánceres de la cavidad oral y poco con los cánceres de mama **(64-66)**, el agente carcinogénico permanece desconocido. El etanol es oxidado para acetaldeido, que es flacamente mutagénico. Esta oxidación es gobernada por las dehidrogenases alcohol (ADH) y el gene ADH13 es polimórfico. En estudios diferentes, el alelo correspondiente a la capacidad oxidativa aumentada estaba asociado con cánceres de la cavidad oral **(67)** y de la mama **(68)**.

Separadamente un papel hacia el daño oxidativo en el cáncer de la mama es soportado por estudios del gen dismutase superoxido manganeso; las variantes polimórficas aumentan el riesgo de cáncer de mama, que eran las mayores en personas con baja ingestión de antioxidante alimentario **(69)**.

6.2 Aflatoxina B1

Estudios de la exposición de la aflatoxina B1 han revelado un paradigma claro para un mutagenio alimentario relacionado con el riesgo del cáncer. Aunque las infecciones de las hepatitis B y C causen un riesgo más elevado que con la exposición a la aflatoxin B1, existen tanto los datos laboratoriales, como epidemiológicos que establecen la causalidad del papel de la aflatoxina en la carcinogénesis del hígado **(46)**. La exposición a la aflatoxina B1 ocurre a través de la contaminación del trigo y alimentación para animales con moho **(70)**, que puede ser transmitido transplacentariamente **(71)** y a al recién-nacido vía alimentación mamaria **(72)**. Las exposiciones son bajas en los Estados Unidos, pero pueden ser elevadas en la China y partes de África. Modelos animales laboratoriales indican que las aflatoxinas son mutagénicas y carcinogénicas **(46)**.

Estudios epidemiológicos en África y en Asia, en donde ocurren niveles elevados de exposición, la ligación de la exposición de aflatoxina B1, y los carcinomas hepatocelulares **(63,74-76)** y el riesgo,

revelan un efecto sinérgico con las infecciones por virus de la hepatitis (63). El mecanismo de acción para la mutagenicidad de la aflatoxina B1 comienza con la activación metabólica por **CYP3A4**, **CYP3A5** y/o **CYP1A2** (77-81) que forma un exo-8,9-epóxido y la subsecuente adduct formación y daño del DNA (82,83). Este daño ha evidenciado in vitro causar substituciones del nucleótido guamina (84), específicamente en el codon 249 del gen p53 (85).

Los cánceres del hígado en áreas con elevados niveles de contaminación con aflatoxina casi siempre tienen mutaciones del codon 249, del gene p53, mientras la frecuencia de esta mutación es baja en áreas de baja contaminación y en áreas de contaminación intermedia (60,86,87).

Curiosamente parece haber un efecto interactivo para el aumento de mutaciones en el p53 en personas con hepatitis B y coexposición de aflatoxina (74). Varios ensayos con biomarcadores para la exposición con aflatoxina han sido desarrollados (46,88). Aunque sea preferible medir la dosis biológicamente efectiva en el hígado, porque este es el órgano “target”, eso no es práctico. Entonces los métodos han enfocado los marcadores en la sangre y orina.

Los niveles aflatoxina “adductus” varían entre las áreas de baja y elevada contaminación (89). Las mediciones del “adduct” o su metabolito en la orina indican un efecto dosis-respuesta para la exposición a la aflatoxina B1 y su relación con el cáncer de hígado (46,63). El efecto es multiplicativo en personas infectadas con hepatitis B ó C (90, 91).

La “detoxification” de los exo-8,9-epóxidos de la aflatoxina por conjugación con el glutatión llevó a estudios de “oltipraz” como un agente quimoprotector, porque es un inductor del enzima M1 glutatión transferasa (92,93).

6.3 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH)

Los compuestos PAH son formados durante la combustión incompleta de materia orgánica. Once compuestos **PAH** han sido clasificados como carcinogénicos para los animales de laboratorio (94), y los compuestos **PAH** son carcinogénicos humanos (95). Está calculado que en nuestra dieta son vehiculados cerca de 3mg de **PAH**/día (96,07), lo que se compara a una exposición de 2-5m **PAH**/día, por paquete de cigarrillos en el fumador regular. Entonces la exposición de la dieta puede ser significativa en no fumadores y así mismo exceder el nivel de los fumadores regulares. Datos corroborativos indican que la

exposición de **PAH** en la dieta es importante, son los datos que corresponden a la ingestión de carne emparrillada que está más correlacionada con los “*adducts*” del DNA relacionados con el **PAH** en la sangre que con el fumar (98,99).

La exposición de los alimentos a los **PAH** y el riesgo de cáncer han recibido poca atención. Los efectos de la exposición de **PAH**, los cuales son medidos en otros escenarios (e.g., fumar tabaco y locales de trabajo), indican que los órganos “*target*” para los compuestos **PAH** son los pulmones, la orofaringe, la mama, el aparato genitourinario y el tracto gastrointestinal. Entonces los biomarcadores para la evaluación de **PAH** enfocarán el estudio de estos órganos “*target*”, o en los tejidos sustitutos de estos órganos.

En los estudios animales de laboratorio con **PAH**, las dietas contaminadas con **PAH** consistentemente inducen tumores del tubo digestivo superior y también pueden inducir tumores del pulmón (100-105). En los humanos hay alguna evidencia para la asociación de la exposición de la dieta por **PAH** con el cáncer de colon (106,107).

Estudios humanos y animales (108,109,110) sugieren que el **PAH** de la dieta es distribuido en otros órganos asimismo en los tejidos expuestos localmente, es necesario considerar que el **PAH** dietético pueda contribuir para el riesgo de cáncer de pulmón y mama. Aunque la contribución del **PAH** en la dieta responsable por la contaminación del cuerpo sea cuantificable (111,112), la presencia ubicuitaria de **PAH** en el ambiente (113) y la presencia de otros cancerígenos en los mismos alimentos (114,115) hace difícil la interpretación de los estudios epidemiológicos del riesgo de cáncer por el **PAH** en la dieta. Puede ser posible distinguir las exposiciones de **PAH** en la dieta de fumadores por la medición de los biomarcadores específicos de cada [e.g., medición simultanea de **1-hidroxi pireno** para evaluar la ingestión total de **PAH** (116) y **4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol (NNAL)** para evaluar la contribución debido al fumar (51)]. Además, el **PAH** de la dieta es invariablemente una mistura compleja de compuestos que se torna difícil predecir las consecuencias metabólicas y carcinogénicas.

El **benzo(a)pireno** es el compuesto **PAH** mejor caracterizado disponible en la dieta. La región (“*bay-region*”) **exoxidodiol** se liga al **DNA** principalmente como N2-dexoxiguanosine “*adduct*”

(117). La activación metabólica por el **CYP1A** (118) y por el **CYP1B** (119,120) enzimas es requerida para la formación de “*adducts*”.

Los “*adducts*” **BaP** pueden ser cuantificados por varios métodos sensitivos (56, 121,122). Existen otros métodos para detectar metabolitos de **PAH** [e.g., **BaP-tetrol** urinario (123) y **3-hidroxibenzeno (a) pireno** urinario (124)].

Los **BaP** “*adducts*” dan la información de la dosis biológicamente activa y sugieren una ligación al riesgo del cáncer del pulmón (125,126); ellos están también asociados con mutaciones de regiones calientes específicos de sitio en el gen supresor de tumor p53 (60,127) y a mutaciones observadas en el cáncer del pulmón de los fumadores (128). Similar es la evidencia para los cánceres asociados con el **PAH** en la dieta deben ser investigados, por ejemplo, en los cánceres gastrointestinales.

6.4 N-Nitrosaminas

Los humanos están expuestos a los **compuestos N-nitroso** en la dieta de una variedad de carnes curadas y pescados y sus derivados (129,130).

Las N-nitrosaminas pueden ser formadas in vivo durante la ingestión simultánea de “*nitrite or nitrogen oxides*” y un substracto “*nitrosable*” tales como una amina secundaria (131).

Las **N-nitrosaminas** de la dieta han sido implicadas en los cánceres de esófago y de otras partes del aparato digestivo (gastrointestinal) (130,132); por ejemplo, las N-nitrosaminas son consideradas un carcinogenio importante en algunas regiones de China e Japón. Los estudios con biomarcadores muestran que los N-nitrosaminas “*adductus*” son más elevados en estas partes del mundo, cuando son comparados con áreas de baja concentración de N-nitrosaminas (133,134).

Aunque el humo del tabaco y las nitrosaminas específicas del tabaco causen cáncer del pulmón (51,135), las N-nitrosaminas de la dieta pueden también contribuir para el cáncer del pulmón (136-138).

Modelos animales experimentales soportan fuertemente las propiedades carcinogénicas de las N-nitrosaminas de la dieta (130). En realidad, hay una fuerte concordancia entre las especies animales aunque con diferente especificidad de órgano, tipo de compuesto y dosis (139). Cáncer de pulmón,

hígado, riñón, glándula mamaria, estómago, páncreas, vejiga o esófago son órganos en los cuales hay una asociación segura con las N-nitrosaminas (140). Estos sitios son considerados como órganos “*Target*” en los humanos, y por eso los ensayos con biomarcadores son adecuados para ellos.

Las N-nitrosaminas son un grupo grande de compuestos con un mecanismo carcinogénico común. La **N-nitrosodimetilmina** es formada frecuentemente como el resultado de exposiciones de la dieta. La **N-nitrosodimetilamina** sufre hidroxilación enzimática e hidrólisis subsecuente a un aldeído y una monoalquilnitrosamina que finalmente se estabiliza liberando un “*Carbocation*” que es reactivo con las bases del **DNA** (141, 142). La hidroxilación es catalizada principalmente por **CYP2E1** (143,144), pero otras isoformas del **citocromo p450**, incluyendo **CYP2A6** han sido implicadas (14,145).

La **O6-metilguanina**” es principalmente responsable por la mutagenicidad y carcinogenicidad de los agentes alquilantes (146,147).

La “**O6-metilguanina**” lleva a transiciones **GC-AT** en culturas de células (148) y modelos animales (149) si no hay reparación por la “**O6-metilguanina transferase**” (150,151).

Ha sido observada una mutación específica en el codon 12/13 del oncogene *ras* en animales expuestos a agentes alquilantes (152) [evidencia posterior sugirió que esto puede haber sido debido a selección clonal al en ves de una mutación (153)] y en tumores gastrointestinales humanos de etiología desconocida (154). Aunque la “**O6-metilguanina**” sea una lesión promutagénica, es técnicamente más fácil medir la **7-metilguanina**, que no es promutagénica, como un marcador de sustitución para el estudio de la susceptibilidad genética y de la exposición, porque la **7-metilguanina** ocurre en niveles 10 veces más elevada. Estudios humanos de N-nitrosamina “*addcuts*” en diferentes tejidos y el uso de marcadores de susceptibilidad deben ayudar a elucidar los riesgos de las exposiciones de las N-nitrosaminas.

6.5 Aminas heterocíclicas

Las aminas heterocíclicas son formadas al cocinar a elevadas temperaturas por pirolisis de las proteínas, aminoácidos, o creatinina (155) y pueden estar presentes en la dieta humana en

concentraciones substanciales dependiendo de los hábitos y modos de cocinar (156,157). Las aminas heterocíclicas son claramente biodisponibles de la dieta humana normal (158).

La vía de bioactivación propuesta consiste en la **N-hidroxilación** por la **CYP1A2** (159) y subsecuente esterificación (160,161). El ion “*nitrenium*” es probablemente la ligación carcinogénica última a las bases del DNA (162). La activación metabólica por la **CYP1A2** ha sido documentada en personas después de la caracterización extensiva in vitro y en modelos animales (163,164). La activación por la **CYP1A2** puede ser inducida en humanos alimentados con una alimentación rica en aminas heterocíclicas (114) y es afectada por polimorfismos de fase II activando enzimas (161,165-168).

El área de investigación más activa en lo que respecta las aminas heterocíclicas se dedica más al cáncer de colon y de mama.

Los compuestos heterocíclicos relacionados, sus metabolitos y dosis biológicamente efectivas determinados por DNA-“*adducts*” y complejos proteicos han sido medidos en estudios humanos, usando un acelerador de espectrometría de masa (55,169-171) y una variedad de otros métodos analíticos muy sensitivos (55,172,173). Hay también buena evidencia epidemiológica correlacionando el consumo de los alimentos que conteniendo una elevada cantidad de aminas heterocíclicas con el cáncer de colon (174-176), aunque esta correlación no sea consistente (177). Parece que las mutaciones en el gen APC y en el gen supresor de tumor p53 sugiere una conexión a la exposición de aminas heterocíclicas (178), pero hay necesidad de más investigación para tener seguridad en esta asociación.

Aunque la eliminación de las aminas heterocíclicas de la dieta parezca poco práctica, las exposiciones pueden ser reducidas cocinando los alimentos a bajas temperaturas (156,179). Posibles intervenciones quimiopreventivas basadas en la comprensión corriente de los mecanismos carcinogénicos han sido propuestas (180,181). Existen muchos otros mutagenos alimentarios, así como hay muchos agentes vinculados a los alimentos que reducen el riesgo de cáncer.

La consideración integrada de todos estos aspectos permanece problemática por causa de la naturaleza compleja de la forma como se procesa la exposición, así como la documentación de los hábitos alimentarios y, los medios de investigación, tienen sus particularidades y limitaciones.

Los nuevos métodos de evaluación de los biomarcadores no van a sustituir los métodos epidemiológicos establecidos, tales como las encuestas y las mediciones de los mutágenos en los géneros alimentarios, pero todos juntos serán complementarios.

Los biomarcadores, que dan la evaluación de los efectos de los mutágenos alimentarios, varían desde marcadores de susceptibilidad a marcadores fenotípicos de efecto/resultado (mutaciones de p53, sobreexpresión de enzimas, etc). Empleando biomarcadores múltiples dentro del ámbito de estudios epidemiológicos bien concebidos, se pueden identificar nuevos mutágenos alimentarios, o caracterizar mejor mutágenos previamente establecidos.

CAPÍTULO VII

7. HISTORIA FAMILIAR E IDENTIFICACIÓN EN LA SUSCEPTIBILIDAD HEREDITARIA DEL CÁNCER

Los síndromes de cáncer hereditario cuentan con cerca del 5% de los cánceres de mama, ovario y colon.(1,2). El descubrimiento rápido de genes relacionados con el cáncer en los últimos 15 años ha impulsado hacia adelante el campo de la evaluación del riesgo genético del cáncer. Hoy los pacientes y la sociedad ya comienzan a tener consciencia de las opciones de tests genéticos para descubrir los potenciales portadores de enfermedades cancerosas con susceptibilidad hereditaria, por lo que los profesionales de la salud no deben dejar de tener el conocimiento en identificar el riesgo aumentado de un síndrome canceroso hereditario. Aunque no sean muy frecuentes, esos síndromes son importantes en ser reconocidos porque ellos confieren un riesgo elevado de cánceres múltiples primarios que ocurren en edades más jóvenes, afectando múltiples miembros de una familia, que heredan mutaciones genéticas predisuestas hacia el cáncer.

Pacientes y entidades de salud reconocen las ventajas terapéuticas potenciales de identificar el riesgo de cáncer hereditario. El proceso de evaluación sistemática del riesgo de los síndromes de cáncer hereditario se está tornando cada vez más importante, lo que merece el reconocimiento de los pacientes y los médicos (3-8). Los tests genéticos de cáncer son unos de los más fuertes exámenes de previsión que los profesionales de la salud pueden prescribir (9,10).

Los médicos de clínica general, los especialistas, los enfermeros y de una forma general los profesionales de la salud, no geneticistas comenzaron a tener la consciencia de la importancia en tener el conocimiento de su papel en orientar a los enfermos, en el futuro, para servicios de la genética del cáncer, mediante el pedido más frecuente de tests genéticos del cáncer (11-13). Los médicos, en todos

los campos de la asistencia clínica pueden reconocer una responsabilidad legal para evaluar y comunicar el riesgo de cáncer de susceptibilidad en los tribunales **(14-16)**.

En este trabajo nos limitaremos a abordar la hereditariadad del cáncer del colon (HNPCC). Este síndrome es particularmente importante porque incluye cánceres comunes que son responsables por condiciones y estados de riesgo que antes no eran conocidos (síndromes de Lynch I y Lynch II).

7.1 Aspectos generales de la evaluación del riesgo de cáncer hereditario: identificación de personas con riesgo aumentado

La mayoría de pacientes que desarrollan cáncer de colon y recto es por cánceres denominados esporádicos, esto es, que desarrollan riesgo no familiar, o hereditario. Un pequeño porcentaje de pacientes con síndrome de cáncer hereditario puede ser una presunción con base en la historia médica familiar y personal. Los pacientes que presenten determinados aspectos clínicos, como cualquiera de los siguientes, deberán ser sometidos a evaluaciones e investigación biomédica adicionales:

- a) Dos o más familiares en una familia en los que haya sido diagnosticado un cáncer;
- b) El cáncer ha sido diagnosticado en un miembro de la familia con menos de cincuenta años de edad;
- c) El mismo tipo de cáncer ha ocurrido en varios miembros de una familia;
- d) Más de un tipo de cáncer ocurrido en una persona;

- e) Un cáncer raro ha ocurrido en uno, o más miembros de una familia.

Hay criterios específicos para los cánceres de colon hereditarios (HCC - "*hereditary colorectal cancer*").

Usualmente, los datos de la cosecha de la historia familiar son frecuentemente incompletos **(17,18)**. Cuando una historia familiar es obtenida, frecuentemente, faltan elementos importantes, tales como detalles críticos necesarios para la evaluación del riesgo: 1) sitio del cáncer; 2) edad del diagnóstico. Esto ocurre tanto en los cuidados primarios como en las especialidades. **(19, 20)**.

Un estudio mostró que la edad de diagnóstico estaba documentada en solamente 7% de los familiares identificados con cáncer (17). Las herramientas para ayudar a construir la historia familiar, como las encuestas y los cuestionarios médicos, que están en uso desde hace muchos años, no han evidenciado mucha eficacia de sus datos y registros. Historias clínicas familiares con la ayuda de ordenadores están siendo desarrollados y probadas. (21-25).

En los Estados Unidos hay en la página www.nsgc.org, de la *National Society of Genetic Counselors* información valiosa para ayudar a los pacientes a aprender cómo desarrollar una historia familiar y el árbol genealógico (26).

7.2 Construcción de un árbol genealógico

Si existe la sospecha de un síndrome de cáncer hereditario, se debe obtener una historia familiar pormenorizada y confirmada, se posible, a través de la revisión de los registros médicos. Esto debe ser hecho como un árbol genealógico de tres o más generaciones (27). El árbol genealógico debe incluir tanto los familiares afectados, como los no afectados y la etnia debe ser identificada. Por ejemplo, en los Judíos Ashkenazi es importante que sea identificada, una vez que existe alguna probabilidad de mutaciones, e por eso se debe incluir a esta etnia como un factor de riesgo.

Para los familiares afectados, la edad del diagnóstico, la muerte y el sitio específico del cáncer deben ser documentados. Las lesiones de alto riesgo tales como hiperplasia ductal atípica, carcinoma lobular *in situ* y pólipos del colon deben ser registrados. Para los síndromes con transmisión dominante autosómica, como el HCC, el árbol genealógico es frecuentemente sugestivo. Sin embargo, la historia familiar puede no ser importante, por ejemplo, con una pequeña historia familiar incierta, mutación *de novo*, o penetración incompleta, con algunos portadores de mutación que jamás han desarrollado cáncer. Siempre que sea posible, el diagnóstico de cáncer en el familiar afectado debe ser verificado por registros patológicos, o en los registros médicos.

7.3 Aconsejamiento genético y tests

En una publicación reciente en los Estados Unidos se señala que cerca del 30% de médicos de

cuidados primarios y 33% de médicos especialistas refieren que enviaron pacientes para evaluación del riesgo de cáncer hereditario, o requirieron tests para descubrir condiciones de cáncer hereditario (10).

Más del 80% de los médicos de los cuidados primarios de salud acreditan que el número de pacientes que necesitan de tests genéticos aumentará en los próximos cinco años (12). Dentro de los especialistas, los oncólogos son los que más veces piden tests de susceptibilidad genética, seguidos de los cirujanos y de los gastroenterólogos. Mientras cualquier médico puede requerir los tests de susceptibilidad genética para el cáncer, la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO-"*American Society of Clinical Oncology*") recomienda que los tests de predisposición para el cáncer deben ser hechos solamente si es hecha una historia detallada pretest, para así obtener las mejores interpretaciones y consecuentemente buenos resultados (27,28).

7.4 El Proceso de asesoramiento genético

Primeramente, tiene que haber una historia familiar detallada, antes de la entrevista personal, pudiendo ser inclusive por teléfono. Deben ser consultados, siempre que sea posible, los registros médicos de los familiares, para verificar el diagnóstico de cáncer. Si la persona que quiere someterse a un test genético de cáncer no ha tenido un cáncer, debe ser animada a identificar algún familiar que tenga (o ha tenido) un tipo de cáncer y estar interesada en someterse a un test genético.

Si la decisión es tomada para intentar saber el potencial existencial de predisposición de cáncer, el pretest y el consentimiento informado deben ser seguidos de un segundo descansillo para los familiares de primer grado (padres, hijos, hermanos). Idealmente, lo más aconsejable, es que los pacientes tendrán un periodo de tiempo para reflexionar en su decisión antes de firmar el documento de consentimiento y entonces dar inicio a los tests.

Finalmente, el último descansillo del proceso involucra el asesoramiento de un post-test cuando el individuo recibe los resultados.

7.5 Componentes del consentimiento informado

En Estados Unidos ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) enumera 12 elementos que deben ser abordados antes del consentimiento informado que pueden influenciar la predisposición del paciente, o persona, para se someter a los tests de susceptibilidad hacia el cáncer (28):

- 01 - Información sobre el test específico a que el paciente se va a someter;
- 02 - Implicaciones sobre un resultado positivo o negativo;
- 03 - Posibilidad del test a no ser informativo;
- 04 - Opciones del riesgo sin el test genético;
- 05 - Riesgo de transmitir una mutación a un hijo;
- 06 - Rigor técnico del test;
- 07 - Precio del test y las consultas;
- 08 - Implicaciones psicológicas de los resultados de los tests (beneficios y riesgos);
- 09 - Riesgos de inseguridad de discriminación del empleador;
- 10 - Confidencialidad de todo el proceso;
- 11 - Opciones y limitaciones de la vigilancia médica y estrategias para la prevención después del test;
- 12 - Importancia de compartir los tests genéticos con familiares de alto riesgo para que ellos se puedan beneficiar de esta información (29,30).

Además, los laboratorios de tests genéticos deben requerir información clínica específica, invitando al paciente a firmar su propio documento de consentimiento (31).

El propósito es determinar si una mutación puede ser detectada en un gen de la susceptibilidad de un cáncer específico. Se debe especificar si una muestra de sangre o de otras células es para evaluar mutaciones de la línea germinal presentes en cada célula del cuerpo, o si la muestra es de un tejido canceroso para ser evaluado en las eventuales y potenciales mutaciones.

La sensibilidad de los tests para detectar las mutaciones que predisponen hacia el cáncer es dependiente del método molecular usado. Existen numerosos métodos moleculares. Por ejemplo, el test genético usado en la FAP ("Familial Adenomatous Polyposis") incluye la secuencia génica completa, test de "truncation" de proteínas y una combinación de los dos. La sensibilidad se sitúa entre los 80% y

los 95% (32,33). de las tasas detenidas de cada laboratorio de tests.

Sin embargo, el valor de previsión positiva de un test diagnóstico depende no solamente en cuanto a su sensibilidad, de mutación pretest, sino está basada en la historia personal y familiar, así como en antecedentes étnicos.

7.6 Implicaciones de un resultado positivo o negativo y posibilidad del test a no ser informativo

Siempre que sea posible, debe ser probada una muestra de sangre o tejido canceroso en un miembro en la primera vez de este test para busca de mutaciones conocidas que pueden estar asociadas con un tipo de cáncer hereditario, por ejemplo, mediante la secuenciación completa de los genes. Si es encontrada una mutación asociada con cáncer, los otros miembros de la familia deben tener a su disposición un análisis específico de mutación (también llamada análisis de sitio singular).

Un resultado positivo indica que el individuo está en riesgo aumentado de cáncer. Un resultado negativo (ausencia de una mutación asociada con cáncer encontrado en un familiar afectado) implica que el riesgo del individuo no afectado del cáncer no es mayor que la población general (34). Las personas deben pensar que si tienen un test negativo están incluidas en las reglas generales de rastreo de la población general.

Muchas personas no tienen algún familiar con historia de cáncer o no se encuentran motivados, sin embargo, hay por veces circunstancias en que es aconsejable hacer un test de susceptibilidad de cáncer. Un resultado positivo implica que hay un riesgo aumentado de desarrollar cáncer.

Un test negativo no excluye la posibilidad de una anomalía en un gen que no puede ser detectado por secuenciación de DNA, o anomalías en otros genes responsables que todavía no están identificados para la susceptibilidad heredada hacia el cáncer. Por eso, un resultado negativo, cuando no ha sido encontrada cualquier mutación asociada con cáncer en la familia, es un test “no informativo”. Algunos laboratorios disponen de testes de mutaciones multiples asociadas para individuos de poblaciones con mutaciones “**founder**” conocidas. Las mutaciones asociadas son aquellas únicas y específicas para una cierta población.

Las mujeres descendientes de judíos Ashkenazi tienen un riesgo de 23% de ser portadoras de la mutación genética *BRCA1*, o *BRCA2*, la mayoría de las cuales son mutaciones “founder” (35). Por ejemplo, cuando se realizan pruebas para mutaciones BRCA en judíos Ashkenazi (los que tienen ancestros en Europa del Este, como son el 95% de los judíos en los Estados Unidos) es razonable comenzar por probar tres mutaciones “founder” asociadas con cáncer que prevalecen en esta población: *187delAG*, *5385insC*, y *6174delIT*. Si ninguna de estas está presente, se pueden elegir tests que deben seguirse, *e.g.* secuencia completa de los genes *BRCA1* y *BRCA2*.

La secuencia del DNA puede revelar una variante genética de significado incierto. Las variantes genéticas de significado incierto muchas veces resultan de mutaciones sin sentido, o de un cambio de un par de bases singulares en un gen con efectos desconocidos en el producto proteico. Las implicaciones clínicas son desconocidas, y el test es considerado no ser informativo en cuanto al riesgo de cáncer. Los resultados variantes son relativamente comunes en los tests de *BRCA1* y *BRCA2* y ocurren en aproximadamente en 10% de ejemplos (36).

Al probar las mutaciones “germlines”, los pacientes deben estar conscientes que las personas que sean portadoras de una mutación tienen 50% de posibilidades de transmitirla a cada uno de sus hijos. La realización de tests en niños para buscar mutaciones de cáncer hereditario es recomendada solamente en las estrategias de prevención necesarias en las edades jóvenes (como por ejemplo, **FAP**).

7.7 Implicaciones psicológicas de los resultados de los tests

Los factores psicológicos afectan los comportamientos tanto antes de los tests, o bien, después. Hay estudios que revelan ansiedad pre-test que se relacionan con el recelo de la amenaza de riesgo de cáncer, así como reacciones de adaptación después de los consejos ante la percepción del riesgo de cáncer (37,38).

La exploración de como los resultados de los tests afectarán a un individuo, particularmente los que puedan presentar un límite de la línea basal de ansiedad depresión ó desolación, ante la eventualidad de un cancer es muy importante. Puede ser útil preguntar a un individuo para imaginar su reacción a un

resultado positivo, negativo, o incierto e identificar cuáles son sus soportes sociofamiliares.

7.8 Riesgos de discriminación en el trabajo o en los sistemas de seguros de salud

La discriminación en el trabajo, o ante los sistemas de seguros de salud son aspectos importantes que se relacionan con las personas que tengan que someterse a un test de rastreo de susceptibilidad de enfermedad cancerosa.

De hecho, es conocido, en general, que hay un cierto recelo de discriminación de las entidades de seguros de salud, lo que es una de las más importantes razones porque las personas muchas veces no quieren someterse a un test **(39,40)**. En el año 2000, fue publicado un estudio que revelaba que 68% de los profesionales de la salud de genética no querían pagar a su compañía de seguros si supiesen que la aseguradora no les pagaría los cargos de una enfermedad de causa genética **(41)**.

En los Estados Unidos la ley prohíbe la discriminación en los seguros de salud, con algunas excepciones, lo que está reglamentado con el *“Disability Act 1990”*, que protege las personas con discapacidades físicas y mentales **(42)**. En España, seguramente habrá una legislación en el mismo sentido, incluyendo la protección en el trabajo y empleo; igualmente, en cualquier país, hay reglas de restricción de acceso a los registros médicos **(42)**. El *American College of Medical Genetics* aconseja que los resultados de los tests genéticos no deben ser revelados a los miembros de la familia sin que el paciente autorice previamente, excepto si existe algún peligro inminente para el familiar **(43)**.

La susceptibilidad de cáncer hereditario puede tener algunas dificultades en ser definida en los casos en que exista una penetración incompleta, o un tiempo de evaluación incierto. Sin embargo, muchas personas (>95%) acreditan que tendrían el deber de revelar los resultados a su familiar si el conocimiento posibilitaría a la familia a tomar medidas de prevención del cáncer hereditario **(44)**.

ASCO y otras asociaciones defienden que lo más apropiado para notificar de un familiar es a través de una discusión sobre el tema con el individuo que se ha sometido al test, que entonces tendría la responsabilidad de notificar a los miembros de su familia **(28)**. Hay una lista extensa de Laboratorios Clínicos, certificados en la red americana de laboratorios de genética desarrollada por la Universidad de

Washington-Seattle, disponible en <http://www.acmg.net/> (30,31,45).

El resultado de un test demora de 3 a 6 semanas en los Estados Unidos, aunque algunos laboratorios puedan dar resultados más rápidos con un encargo adicional. Los resultados están disponibles, por escrito, por el laboratorio y solamente para el médico del paciente, que ha pedido el test y el “report”, usualmente incluye los datos sin diagnóstico, interpretación clínica de los resultados del test, sensibilidad y especificidad de la información y bibliografía. Los geneticistas dan consejos informando al individuo evaluado personalmente, en conjugación con las sugerencias del post-test.

Esto incluye interpretación de los resultados, discutiendo sus implicaciones para los cuidados preventivos y para orientación de los miembros de la familia y recomendaciones para grupos de soporte y otros recursos de información cuando es apropiado, facilitando soporte emocional a la persona que recibe los resultados. Hay sitios en la **Internet** que dan, también, información, soporte y consejos adicionales para enfermedades específicas: www.genetests.org (45) y www.geneticalliance.org (46), entre otros.

7.9 Cáncer del colon hereditario y familiar

La historia familiar del cáncer de colon es común en la población general. Es importante identificar esta historia familiar porque en muchos casos es recomendada para familiares comenzar el rastreo del cáncer colorectal (**CRC**) en una edad antes de los 50 años.

Por ejemplo, la presencia de **CRC** o pólipos adenomatosos en un familiar de primer grado antes de los 60 años, o en dos o más familiares de primer grado en cualquier edad justifica un rastreo precoz (comenzando a los 40 años, o 10 años antes de la edad más joven en el momento del diagnóstico de un miembro familiar inmediato) y con un protocolo más intensivo (colonoscopia cada 5 a 10 años, según la *American Cancer Society*) (47). Una quinta parte de los casos de **CRC** ocurre en individuos con una historia familiar de enfermedad (48), pero muchos no son debidos a uno de los conocidos síndromes hereditarios de alto riesgo, que se van a describir. Sin embargo, las familias con estos síndromes genéticos menos comunes son importantes reconocer, porque la probabilidad de desarrollar cáncer es

muy alta en los individuos afectados.

7.10 Síndromes hereditarios

Cerca de 2% a 5% de todas las personas con **CRC** nacen con uno de los conocidos síndromes de susceptibilidad al **CRC** hereditarios (49). En muchos casos, la susceptibilidad hereditaria del **CRC** es evidente a través de un cuadro multigeneracional (autosómico dominante) de **CRC** y de tipos relacionados de cáncer en más de un familiar próximo. Otros cuadros clínicos apuntando hacia posible **CRC** hereditario son los cánceres de apareamiento precoz (antes de los 50 años de edad), múltiples (10 ó mas) pólipos intestinales, o un individuo con más de un **CRC** primario, o un cáncer asociado a un **HNPCC**.

Los síndromes de **CRC** hereditarios han sido clasificados como **FAP** (*“Familial Adenomatous Polyposis”*) o **HNPCC** (*“Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer”*), sin pólipos de colon numerosos (49).

Sin embargo, como resultado del genotipo, ahora es apreciado que hay una sobreposición entre las manifestaciones clínicas de la poliposis familiar y las del **HNPCC** (50,51). Más aún, la susceptibilidad al **CRC** es un cuadro de varios síndromes hereditarios, incluyendo pólipos juveniles, Síndrome de Peutz Jeghers, síndromes asociados con *BRCA1*, y un recientemente descubrimiento, que es un tipo de poliposis recesiva autosómica, debido a mutaciones en el gen *MYH*. (52-54).

7.11 Síndromes envolviendo a mutaciones en el gen *APC* (*Adenomatosis Polyposis Coli*)

La **FAP** cuenta con menos del 1% de **CRC**, pero es importante diagnosticar por causa de sus implicaciones, dentro de los cuáles cuenta con elevada susceptibilidad para el cáncer en los pacientes miembros de familiares. Clínicamente, el aspecto más visible de la **FAP** es el desarrollo de numerosos pólipos adenomatosos colorectales, muchas veces millares cubriendo la mucosa, en la segunda o tercera década de la vida (32). Con tantos pólipos, la probabilidad, durante el tiempo de vida, de desarrollar un carcinoma del colon es casi 100%. La media de la edad para el diagnóstico en los casos de **FAP** no

tratados es aproximadamente de 39 años (55).

Además de los **CRC**, las personas con **FAP** tienen un riesgo aumentado de hepatoblastoma en la niñez, así como cánceres de intestino delgado, arvore biliar, estómago y tiroides. Las llaves del diagnóstico de **FAP** pueden ser el descubrimiento de tumores desmoides, o en la observación retinoscópica el aparecimiento de hipertrofia congénita del epitelium pigmentar de la retina. (56,57). La **FAP** es debida a mutaciones “*germline*” en los genes **APC**. **FAP** es heredada como un cuadro dominante autosómico. Cerca de 10% a 30% de estas mutaciones se originan de nuevo, con nadie afectado en las generaciones anteriores (58).

Una historia familiar de **FAP** es una excepción a la regla general de que los tests de predisposición para el cáncer no deben ser hechos en niños, porque en la poliposis, con el potencial para transformación maligna, puede comenzar en la adolescencia. Cincuenta por ciento de las personas con **FAP** desarrolla adenomas cerca de los 15 años de edad (32). Si una mutación **APC** es identificada en un miembro de una familia afectada, entonces el consenso especializado recomienda asesoramiento genético y ser considerada la realización de un test de la mutación **APC** a los diez años de edad. Si el test del niño es negativo para la mutación asociada con el cáncer en la familia, entonces está indicada la realización de un examen de rastreo rectosigmoidoscópico en los “*teens*” finales y otro en los comienzos de los **20s** de la edad adulta;

Si no es observado cualquier pólipo en los dos exámenes, entonces este individuo no tendrá un **FAP** hereditario y deberá entrar en las recomendaciones de rastreo como en la población general. Si el niño tiene un test positivo para la mutación **APC** asociada al cáncer, entonces la vigilancia sigmoidoscópica anual está recomendada y debe comenzar en la edad de los 10 a 12 años (94,59-61). Pólipos únicos deben ser removidos, pero cuando numerosos adenomas comienzan a desarrollarse, la vigilancia debe comenzar a ser hecha por colonoscopia, y deben se hechas consideraciones serias para la realización de una colectomía profilática (94). Asesoramiento especializado y soporte son necesarios para la familia cuando un adolescente o un joven adulto se someten a este proceso que altera sus vidas en el plano de los cuidados médicos.

En la **FAP** clásica, la prevención del cáncer de colon, si hay numerosos pólipos, obligará a una colectomía profilática. La colectomía subtotal con anastomosis ileorectal puede preservar la continencia,

pero la vigilancia del tejido mucoso rectal restante debe ser hecha cada 6 a 12 meses por muchos años (62).

Para detectar pequeños cánceres asociados biliares y del intestino delgado es recomendado hacer una vigilancia (por endoscopia del ducto biliar) cada uno o tres años a partir de los 25 años. Además, Rx del intestino delgado (inclusivamente, tomografía axial computarizada abdominal y pélvica, con contraste oral) está indicado si hay sospecha de la existencia de adenomas duodenales, o antes de una colectomía, por esta enfermedad (98-100).

Hay múltiples vías de investigación para identificar formas efectivas de quimiopprofilaxia. Aunque haya estudios con medicaciones non-esteroides anti-inflamatorias (sulindac y cox-2 inhibidores) los resultados no siempre son concordantes, (63-66). Igualmente hay otras modalidades de tratamiento preventivo (67,72), tales como ejercicio diario, uso de aspirina diariamente, ácido fólico, en la dosis diaria de 400mg, así como calcio en dosis 1200mg/día, en lo que no son completamente unánimes en la relación causa-efecto.

7.12 FAP atenuada

La capacidad de la “*genotipage*” para identificar mutaciones del gen *APC* permitió el reconocimiento de una forma menos severa de **FAP** cuando las mutaciones ocurren en las puntas del gen *APC* (71) con menos pólipos (5 a < de 300), ocurriendo en edades menos avanzadas. La edad media de desarrollo de la poliposis es a los 30 años (72); la edad media de diagnóstico con cáncer de colon es cerca de los 55 años (71). El riesgo de cáncer de colon es cerca de 100% a los 70 años de edad. Este síndrome pasó a denominarse de **FAP atenuada**. Sus aspectos clínicos varían en la misma familia y en parte se sobreponen con los de la clásica **FAP**; por eso, las recomendaciones específicas para esta forma clínica de **FAP atenuada** no están aún bien definidas, excepto que la vigilancia debe ser hecha por colonoscopia y no sigmoidoscopia (73,74).

7.13 Polimorfismo del gen APC en los judíos Ashkenazi

Una variante común en la secuencia del gen *APC* (*I1307K*) está presente en cerca del 20% de judíos

con ancestros en la Europa de Este, debido a un efecto “founder” (75). Esta substitución de nucleótido singular es rara en otras poblaciones. La presencia de esta variante del gen *APC* aproximadamente duplica el riesgo de desarrollar adenomas del colon y **CRC** y desvía el inicio hacia una edad algo más joven, similar a la situación con **CRC** familiar de causa desconocida (76,77).

El rastreo precoz del colon, comenzando a los 40 años de edad. Es entonces recomendado para personas en quienes la mutación *I1307K* ha sido encontrada y para sus familiares en primer grado, pero el rastreo de judíos asintomáticos para este genotipo no es recomendado. Por causa de su baja penetración, la presencia de la variante del gen tiene un bajo poder predictivo; su ausencia no cambia la necesidad del rastreo del colon basado en la historia familiar y recomendaciones generales.

7.14 HNPCC

7.14.1 Aspectos clínicos y test genético para HNPCC

HNPCC ha sido descrito como una entidad clínica, caracterizada por una fuerte historia familiar, de inicio precoz de cánceres de colon y asociados, sin pólipos numerosos mucho tiempo antes de cualquier alteración genética causativa a ser identificada. Ha sido descubierto que en muchos casos el síndrome está relacionado con mutaciones “germline”, o silenciamiento epigenético de genes implicados en la reparación de errores de apareamiento (**MMR**) del **DNA**, por veces *MSH6*, *PMS1* ó *PMS2*, pero principalmente *MLH1* y *MSH2* (49). Estas mutaciones y la resultante elevada susceptibilidad para el cáncer son heredadas en un cuadro autosómico dominante. Hay tests para mutaciones en *MLH1* y *MSH2* para la disponibilidad clínica.

Muchas mutaciones son “private” (diferentes para cada familia afectada), aunque una mutación “founder” particular en *MSH1* aparezca diseminada en los Estados Unidos (78). No son encontradas alteraciones del gen *MMR* en cada familia que muestre criterios clínicos de **HNPCC** y entonces esta susceptibilidad hereditaria elevada para el cáncer mantiene un diagnóstico clínico (78-81). Los médicos que identifican los cuadros clínicos deben recomendar una prevención de cáncer intensificada y vigilancia para el paciente y sus familiares, mismo que un test para las mutaciones del gen **MMR** sea negativo, o bien si el test no ha sido hecho (3, 49, 67).

En el cuadro siguiente se presenta una secuencia de los criterios clínicos definidores del **HNPCC** para determinar la elegibilidad para investigar los aspectos genéticos del cáncer. El cuadro comienza con los criterios más específicos, pero menos sensitivos.

Clínicamente, la perturbación es definida por los **criterios de AMSTERDAM**. Como estos criterios son estrictos y excluyen pequeñas familias, aparecieron alternativas, tales como el Amsterdam modificado (**AMSTERDAM II**) y los criterios de Bethesda, que han sido desarrollados. El Amsterdam II es más específico que el Amsterdam I, basándose en una fuerte historia familiar, que es más inclusivo, pero menos específico, incluyendo el diagnóstico en una edad más joven que los 50 años de edad, tumores múltiples primarios, cuadros histológicos particulares, cánceres extracolónicos asociados y **CRC (49,55,80,82)**.

CRITERIOS DEL CÁNCER COLORECTAL NONPOLIPOSIS HEREDITARIA (HNPCC)

CRITERIOS DE AMSTERDAM

1. Tres familiares con cáncer colorectal, un familiar de primer grado de otros dos.
2. Casos que se extienden por lo menos por dos generaciones.
3. Por lo menos un caso de cáncer colorectal diagnosticado antes de los 50 años.

CRITERIOS DE AMSTERDAM II

1. Tres o más familiares con cáncer asociado con HNPCC verificado histológicamente (cáncer colorectal, cáncer del endometrio, del intestino delgado, uretra o pelvis renal), uno de los cuales es familiar de primer grado de los otros dos, y que la poliposis adenomatosa familiar haya sido excluida.
2. Cáncer colorectal envolviendo por lo menos dos generaciones.
3. Uno o más cánceres colorectales diagnosticados antes de los 50 años.

CRITERIOS DE BETHESDA (simplificados en esta publicación)*

1. Individuos con cáncer en familias que reúnen los criterios de Amsterdam.

2. Individuos con dos cánceres relacionados con **HNPCC**, colorectales y/o extracolónicos (ver lista de **Amsterdam II**).
3. Individuos con cáncer colorectal y un familiar de primer grado con cáncer colorectal y/o cáncer extracolónico relacionado con **HNPCC** y/o un adenoma colorectal; uno de los cánceres diagnosticado antes de los 45 años de edad.
4. Individuos con cáncer colorectal o cáncer del endometrio diagnosticado antes de la edad de los 45 años.
5. Individuos con adenomas colorectales diagnosticados antes de los 40 años de edad.
6. Cuadros histológicos de cáncer colorectal: tumores mucinosos, pobremente diferenciados, infiltración linfocítica marcada, aspecto de crecimiento medular.
7. Tests inmunohistoquímicos: pérdida de la expresión proteica de MLH1, MLH2, o MSH6.
8. Mutación “*germline*” en los genes “mismatch repair”

CRITERIOS DE BETHESDA MODIFICADOS ()**

Una conferencia de consenso de la **AMERICAN GASTROENTEROLOGY ASOCIATION** ha recomendado elevar la edad en la cual comienza la búsqueda de alteraciones en la sospecha de **HNPCC**. Sustituye los cánceres colorectal o endometrial diagnosticados antes de la edad de los 50 años en vez de los 45 años, indicados en los criterios del Bethesda anterior.

(*) – todos los criterios se encuentran en las referencias **81,82**

(**) – **(55)**

Los criterios del Bethesda modificado identificarán personas sin una historia fuerte de familia de CRC que son consideradas por estar en alto riesgo y ofrecen cuidados preventivos intensificados y/o tests de descubrimiento de mutaciones, pero la prevalencia de mutaciones asociadas a HNPCC en grupos seleccionados por estos criterios es menor que en grupos que reúnen los criterios estrictos de

Amsterdam. Los resultados de los tests definitivos (i.e., genes asociados a cáncer y a mutaciones “germline” de MMR) también llevan al diagnóstico de HNPCC. Al interpretar estos resultados los médicos en la práctica clínica deben reconocer que la presencia de una mutación en un gen asociado a HNPCC aumenta la probabilidad de cáncer pero no es un predictor absoluto del futuro de los eventos de cáncer.

7.14.2 Riesgo de cancer con HNPCC

El **HNPCC** envuelve un elevado riesgo de **CRC** durante la vida, desarrollándose en una edad más precoz que en el caso de **CRC** esporádico. En los casos de **HNPCC** con una fuerte historia familiar de cáncer, la hipótesis de que en el periodo de vida una mutación positiva individual desarrolla un **CRC** puede ser tan alta como en un 80%, con una edad media en la ocasión del diagnóstico de cerca de 45 años **(83,84)**.

El riesgo de individuos con mutación positiva sin una historia típica familiar de cáncer no es aún conocido. Sin embargo, las mutaciones en el gen *MSH6*, en particular, han sido descubiertas más frecuentemente que lo esperado en personas mayores con **CRC** sin una historia familiar fuerte de cáncer **(85-88)**.

Además del cáncer de colon, **HNPCC** confiere un riesgo aumentado para otros cánceres, especialmente cáncer de endometrio y ovario pero también incluyendo de estómago, intestino delgado, pelvis renal, uretra y tracto biliar. El riesgo de desarrollar cáncer del endometrio en la edad de los 70 años en una mujer con **HNPCC** es de 40% a 60%, con comienzo en la mitad de la vida. Por eso, ella es casi siempre diagnosticada primeramente con el cáncer de endometrio, como con **CRC**; más aún, la consciencia del **HNPCC** como una causa de susceptibilidad para el cáncer del endometrio no está divulgada. El riesgo de cáncer de ovario es de 10% a 12% **(48)**.

7.15 Edad joven del comienzo

Ciertos aspectos del cáncer de colon, mismo en la ausencia de historia familiar, sugieren la

posibilidad de **HNPCC**. Se debe sospechar de **HNPCC** cuando el **CRC** es diagnosticado en una edad excepcionalmente joven (especialmente <45 años). Ciertos tipos de histología pueden también sugerir el diagnóstico; estos son sólidos/cribiformes (carcinoma pobremente diferenciado compuesto de ojos irregulares de grandes células eosinofílicas y conteniendo pequeños espacios de tipo-glándula) y cánceres colorectales tipo campanilla-anillo (compuestos por más de 50% de células campanilla-anillo) **(120)**.

7.16 Test de inestabilidad microsatélite

Los errores de replicación del DNA caracterizan los tumores con mutaciones de pérdida de la función en los genes **MMR**. Estos pueden ser detectados como INESTABILIDAD DE LOS MICROSATÉLITES (**MSI**), que es el hallazgo que, en el mismo individuo, el número de repeticiones en una dada secuencia repetida de DNA varía de célula en célula en vez de ser constante.

Varias de tales secuencias de repetición (usualmente cinco o seis) – llamados marcadores de microsatélites – pueden ser examinadas en cuanto a su variabilidad (llamada “*inestabilidad*”), indicando errores en la replicación del DNA. El MSI es llamada “baja” (“*low*”) si cero o uno de los marcadores muestran inestabilidad, y “*elevada*” (“*high*”) si una elevada proporción de marcadores es inestable. **(49)**. Más de un 90% de **CRCs** en las personas con mutaciones del gen de “*mismatch*” “*repair*” del DNA tienen **MSI** elevada, mientras menos de 15% de **CRCs** esporádicos son **MSI** elevados.

Un análisis económico reciente comparó el coste por año de ganancia de vida en tres estrategias para identificar los casos de **HNPCC**: **(a)** Estudio del genotipo (*genotipado*) de todas las personas con cáncer de colon para las mutaciones del gen **MMR** (lo más caro); **(b)** evaluar cada cáncer hacia la **MSI** y hacer el genotipo (*genotipado*) los que son **MSI** elevados; o **(c)** aplicar los criterios de Bethesda (historia familiar, edad, y histología) a todos los casos de **CRC**, evaluando para **MSI** aquellos que reúnen los criterios, y haciendo el genotipo (“*genotyping*”) el subgrupo con **MSI** elevado. **(89)**. Dado el coste elevado del test de genotipo (“*genotyping*”), la estrategia ha sido la de mejor coste-beneficio. Este análisis también demuestra que el ratio del coste-beneficio para los tests de mutación del gen **MMR** disminuye dramáticamente las mutaciones del gene **MMR** y lleva a la oferta del test y a la institución de medidas preventivas en los hermanos, hijos, hijas, en vez de de hacerlo solamente al individuo evaluado. **(89)**.

En contraste con **FAP**, en donde la cirugía profiláctica es el principal método para la prevención del

cáncer del colon, la reducción del riesgo del **CRC** en el **HNPCC** es principalmente a través de la colonoscopia para identificar y remover pólipos. La vigilancia de los varios tipos de cáncer en individuos con **HNPCC** está basada en recomendaciones de especialistas y en series de casos que han demostrado una reducción en la incidencia de CRC con vigilancia colonoscópica periódica. **(3, 49,90)**. Estas recomendaciones son las siguientes:

RECOMENDACIONES DE RASTREO PARA PACIENTES CON HNPCC			
CONFIRMADO O ALTAMENTE SOSPECHADO (*)			
RIESGO DE CÁNCER	PROCEDIMIENTO	EDAD PARA COMENZAR (AÑOS)	FRECUENCIA (AÑOS)
Cáncer de colon (60% a 80% de riesgo en la vida)	Colonoscopia	20 a 25	2 (**)
Cáncer del endometrio (30% a 60% de riesgo en la vida) y cáncer de ovario (10% a 13% de riesgo en la vida)	Examen ginecológico (+- muestra de endometrio), ecografía transvaginal, CA125	30 a 35	1 a 2
Cáncer del tracto urinario (***)	Ultrasonografía, citología urinaria	30 a 35	1 a 2

Cáncer de estómago (***)	Gastroscopia	30 a 35	1 a 2
-----------------------------	--------------	---------	-------

(*) – Recomendaciones para el **HNPCC** del Grupo de Colaboración Internacional (**82**).

(**) – *The Cancer Genetics Study Consortium* (**3**) y la *National Comprehensive Cancer Network Guideline* (**67**) colonoscopia recomendada cada 1 a 3 años, comenzando a los 25 años (**67**)

(***) Rastreo recomendado por lo menos a un miembro de la familia que tiene este tipo de cáncer (**48**).

Los ensayos de quimioprevención clínica son más difíciles en el **HNPCC** que en la FAP porque el número de pólipos no puede ser usado como un sustituto final en cortos intervalos. Por eso, la eficacia de la quimioprevención en el **HNPCC** es desconocida. Con el advenimiento de las nuevas tecnologías disponibles para identificar mutaciones genéticas asociadas con el aumento del riesgo de cáncer, y con las modalidades más nuevas disponibles para prevenir el cáncer, se está tornando cada vez más importante que todos los médicos se familiaricen con los elementos de evaluación del riesgo de cáncer.

CAPÍTULO VIII

8. HNPCC + FAP

8.1 Introducción

El cáncer colorectal familiar (**CRC**) es un problema mayor de salud pública por su relativamente elevada frecuencia. Cerca de 15-20% de todos los CRC son de naturaleza familiar. Entre estos, la poliposis adenomatosa familiar (FAP – *familial adenomatous polyposis*, causada por “*germline mutations*” en el gen **APC**, cuenta con menos del 1%.

El cáncer colorectal non-poliposis hereditario (**HNPCC** – “*hereditary non-polyposis colorectal cancer*”), también llamado *síndrome de Lynch*, cuenta con aproximadamente 58% de todos los pacientes con **CRC**. Entre estos, cerca del 3% son positivos para mutaciones, esto es, causado por “*germline mutations*” en los genes de reparación de “*mismatch*” del DNA que han sido implicados (**MLH1**, **MLH2**, **MSH6**, **PMS1** y **PMS2**). Muchos de los pacientes pertenecientes a familias **HNPCC** o del tipo – **HNPCC** son aún molecularmente inexplicados.

Entre los restantes CRC familiares, una gran proporción es probablemente causada por mutaciones genéticas y polimorfismos de baja penetración, de los cuales el polimorfismo **I1307K** en el gen **APC** es un ejemplo de los más representativos. Los hallazgos genéticos moleculares han posibilitado dividir en dos grupos el **CRC** hereditario: (**A**) tumores que muestran inestabilidad microsatélite (**MSI** – “*microsatellite instability*”, que ocurren más frecuentemente en el colon derecho, tienen un DNA diploid y contienen mutaciones características, tales como el receptor del factor B tipoII de crecimiento transformador (**TGFBR** – “*transforming growth factor beta receptor*”) y **BAX**, y se comportan indolentemente de los cuales el **HNPCC** es un ejemplo; y (**B**) tumores con inestabilidad cromosómica (**CIN** – “*chromosomal instability*”), que tienden a situarse en el lado izquierdo del colon, muestran aneuploidia del DNA, contienen mutaciones características, tales como **K-ras**, **APC** y **p53**, y se comportan agresivamente, de los cuales **FAP** es un ejemplo.

Hay necesidad de estudiar con cierta profundidad los aspectos clínicos, patología, genética molecular, vigilancia y proyectos terapéuticos, incluyendo cirugía profiláctica en el caso del **HNPCC**.

Es difícil diagnosticar el HNPCC, y por eso es necesario un trabajo de diagnóstico diferencial detallado de algunas variantes de **CRC** hereditario. Debido a la heterogeneidad genética y fenotípica en el **CRC** se llega a la conclusión que no es apropiado discutir la genética del **CRC** sin definir y desarrollar el concepto relacionado con un síndrome de **CRC** hereditario específico. Por eso, es importante averiguar el cáncer en todos los sitios anatómicos, así como todos los estigmas fenotípicos no cancerosos (tales como las pigmentaciones mucosas y periorales en el síndrome de Peutz-Jeghers), cuando se coge una historia de cáncer familiar).

El cáncer colorectal (**CRC**) es muy común en muchas naciones con estilo de vida occidental. En los Estados Unidos se manifestaron más de 95.000 nuevos casos de cáncer de colon y más de 35.000 nuevos casos de cáncer de recto en el año de 1999 (1). Durante el mismo periodo de tiempo, la mortalidad del cáncer de colon fue de cerca de 50.000 y la del cáncer de recto de casi 9.000 (1). Se calcula que por lo menos el 10% de estos casos de CRC se acercan de la posibilidad de ser el resultado de un factor genético primario (13.000 para los nuevos casos y casi 6.000 para las muertes).

El cáncer colorectal hereditario es un problema mayor de salud pública. Es necesaria más investigación para ayudar la comprensión y la descodificación de este conocimiento con efecto sobre la práctica clínica. La identificación del responsable por la predisposición de las mutaciones “gremlines” determinará quién es, o no es, un candidato para la participación en los programas de rastreo y de administración de la incidencia y diagnóstico del CRC como objetivo.

Si es posible comprender el papel de la genética y sus mecanismos biomoleculares en la etiología del **CRC**, entonces es posible incrementar y profundizar la investigación en el dominio del **CRC**, lo que ha aumentado rápidamente durante la última década, como se verifica en la explosión de las publicaciones de la literatura científica relacionada con el tema. Esta explosión de conocimiento ha sido, principalmente, el resultado de los avances prodigiosos sobre genética molecular.

Más aún, esta información ha evolucionado tan rápidamente que ultrapasó la capacidad de los médicos para estar al lado de los acontecimientos. ¿Cómo podremos ayudar a reducir la mortalidad entre

los pacientes con riesgo elevado? La solución, en cierta medida, puede ser relativamente simple: mediante la identificación de tales pacientes en virtud de su posición en el árbol genealógico familiar. El proceso de identificación comienza por registrar sistemáticamente la historia familiar, con énfasis hacia el cáncer de todos los tipos y relacionarla siempre que sea posible con documentación médica (sea de informaciones del normal, sea del patológico).

Centralmente a todo esto, es un médico de gran conocimiento global el que puede interpretar el árbol genealógico, que haga el diagnóstico de un síndrome de cáncer hereditario, si el estuviere presente, y entonces avanzar con un trabajo de rastreo altamente dirigido y administrar los datos en el plano del tratamiento. Aunque esto sea la situación ideal, no obstante, debemos confrontarnos con el hecho de que la historia familiar de cáncer es notoriamente dirigida en el conjunto de la práctica clínica, a pesar de que la historia familiar es uno de los componentes de mayor impacto de beneficio económico en la comunidad, a partir de su comparación con la historia médica del paciente (2,3). En condiciones ideales, un diagnóstico de síndrome de cáncer hereditario presuntivo puede ser confirmado por tests genéticos moleculares de un sujeto afectado en esa perturbación en donde hayan sido identificadas “germline mutaciones”.

Teniendo en cuenta estos presupuestos temáticos, se abordará la herencia del CRC, buscando la base de genética molecular para destacar sus aspectos clínicos y la patofisiología.

El **CRC** hereditario puede ser dividido en dos grupos basados en cuadros biomoleculares. Específicamente, tumores que exhiban inestabilidad microsatélite (**MIN**-*microsatelite instability*) que tienden a ocurrir en el colon derecho, tienen DNA diploid, transportan mutaciones características (receptor del factor β tipo II de crecimiento “*transforming*”, BAX), y se comportan de forma indolente.

El **HNPCC** es el paradigma de esta vía de crecimiento tumoral.

Inversamente, los tumores con inestabilidad cromosómica (**CIN**- “*chromosomal instability*”) tienden a ser del lado izquierdo, tienen DNA aneuploide, transportan mutaciones características (**K-ras**, **APC**, **p53**) y se comportan agresivamente. La poliposis adenomatosa familiar (**FAP** – “*familial adenomatous poliposis*” representa este tipo de tumor. (4).

8.2 Poliposis adenomatosa familiar (FAP)

El **FAP** es el ejemplo clásico de **CRC** hereditario. La enfermedad es conocida en las publicaciones médicas desde hace más de cien años (5). En el aspecto clínico típico, los pacientes tienen más de cien (por veces más de mil) adenomas colónicos que frecuentemente empiezan en la zona la colectomía profiláctica, una vez que la mayoría de pacientes con el estigma de FAP manifestaran cáncer de colon cerca de los 50-60 años de edad. Los pacientes también tienen un riesgo aumentado para el carcinoma periampular, carcinoma papilar de la tiroideia, carcinoma gástrico, sarcomas y tumores cerebrales. Los tumores desmoides son también secuelas, particularmente después de la cirugía intra-abdominal. Estos tumores pueden ocurrir en exceso en ciertas familias con **FAP**.

Cuando se estudian familias con **FAP**, se debe estar atento al síndrome heterogenio bajo y a los aspectos del genotipo y del fenotipo. Un ejemplo de esta heterogeneidad es el reciente descubrimiento de la poliposis adenomatosa familiar atenuada (**AFAP** – “*atenuated familial adenomatous polyposis*”), variante que es caracterizada por un menor número de adenomas colónicos, con predilección por el colon proximal y una edad mas tardía de aparecimiento de **CRC** cuando es comparada la clásica **FAP** (6,7). Spirio y colaboradores identificaron una mutación en la extremidad 5 del gen **APC** que es etiológica para **AFAP**. Ni todas las condiciones con adenomas múltiples son el resultado de mutaciones **APC**, como ha acontecido para pacientes con múltiples adenomas que no tienen el gen **APC**. (9).

8.3 HNPCC (Síndrome de Lynch)

El **HNPCC**, también llamado síndrome de Lynch, ha sido llamado originariamente síndrome familiar de cáncer (10). Históricamente, es tal vez, la primera descripción de una familia que ha sido hecha por Aldred Warthin, un patólogo que comenzó a estudiar una familia en 1895, publicada en 1913 (11). Esta familia, ahora conocida como familia G, ha sido reestudiada por Lynch y Krush en 1971 (12) y se verificó tener aspectos de **HNPCC**.

La **HNPCC** ha sido primeramente delineada como un síndrome de cáncer hereditario a mediados de 1960 (10), cuando fue descrito un **CRC** con un modo autosómico dominante de herencia. Los aspectos cardinales del síndrome de Lynch son los siguientes:

- 01 – Cuadro de herencia autosómica dominante;
- 02 – Penetración del gen para CRC en cerca de 85-90%;

- 03 – Los portadores del gen desarrollan **CRC** en una edad precoz (cerca de los 45 años);
- 04 – Muchos (cerca de 70%) de los **CRCs** son proximales al ángulo esplénico;
- 05 – **CRCs** múltiples, tanto sincronos como metacronos, son comunes;
- 06 – El pronóstico es mejor para los **CRC** esporádicos;
- 07 – Los cuadros patológicos de **CRC** son muchas veces distinguibles (pero no patognomónicos) e incluyen diferenciación pobre, células (campanilla) “signet”, aspectos medulares, infiltración linfocítica peritumoral, reacción tipo Crohn, y linfocitos infiltrando el tumor, misturados con células tumorales;

08 – Hay un riesgo aumentado de malignidad en varios sitios extracolónicos, particularmente el endometrium, ovario, estómago, intestino delgado, tracto hepatobiliar, páncreas, uretra y pelvis renal (13).

Puede existir un aumento de la incidencia de cáncer de mama en algunas familias con **HNPCC** (14). En la familia G de Warthin, el cáncer gástrico era marcadamente común antes de 1900.

Sin embargo, el cáncer gástrico disminuye en las generaciones siguientes, acompañando su declive en la población en general (12). Antes del descubrimiento de las mutaciones “*germline*” (**MSH2**, **MLH1**, **PMS1**, **PMS2**), conocidas como genes de reparación de errores (“*mismatch*”) o genes mutantes (“*mutator*”), el diagnóstico de **HNPCC** tenía que ser hecho exclusivamente en la presencia de hallazgos clínicos en concreto con un “*pedigree*” (árbol genealógico) documentado y muchas veces alargado. El mejor cálculo del portador del gen y por eso con riesgo de cáncer era de 50%, basado en el hecho de que el paciente está en línea descendente con uno o más familiares en primer grado afectados con el síndrome del cáncer.

8.4 Genética molecular del HNPCC

Hay muchas revisiones sobre clonaje y caracterización de los genes **MMR** (“*mismatch repair*”) (15-22). Desde un punto de vista práctico, el diagnóstico molecular de **HNPCC** está usualmente basado en la búsqueda de genes **MMR** para las mutaciones “*germline*”. Una visión global buena del espectrum mutacional es provista por Peltomaki (23) y la actualización de la Base de Datos Mutacional del **HNPCC** es también accesible a través de **OMIM**. Como se muestra en la página electrónica www.nfdht.nl, la base de datos ahora enumera un total de 228 presumibles polimorfismos en seis genes. La lista está creciendo rápidamente y sin duda comprenderá brevemente muchos centenares de entradas

(“*entries*”). Una cuestión mayor es la interpretación de mutaciones “*missense*” [“*sin sentido*”]. Éstas son particularmente comunes en **MLH1** y son una causa frecuente de incertidumbre. Hay pocos tests, que son poco eficientes, de reparación de errores (“*mismatch repair*”), normalmente no hay ningún método que concluyentemente muestre ser una “*missense mutation*” causa deficiente “*mismatch repair*”. Han sido propuestos tests in vitro de “*yeast*”, más sencillos (24) para llenar esta falta, pero aparentemente es necesaria más evaluación.

8.5 Mutaciones “Founder” fundadoras

Hay ejemplos bien conocidos de mutaciones “*founder*” alrededor del mundo, tales como el **Glu6Val** en el gen de la globina β que cuentan con la mayoría de todas las enfermedades de las células (“*sickle*” /falciforme), y la mutación **F508** del gen **CFTR** que cuenta con 50-80% de todos los casos de fibrosis quística a través del mundo. Cada una de estas mutaciones se origina en un cromosoma único o, como en el caso de la mutación de “*sickle cell*”, algunas veces, muchos millares, o decenas de millares de años antes, se acredita haber alcanzado una distribución a través del mundo y una frecuencia relativamente elevada de alelos porque ellos confieren, o han conferido, ventaja en los heterocigotos.

Las mutaciones fundadoras (“*founder*”) que ocurren en sólo una persona o pocas personas están siendo descritas con una frecuencia aumentada y en algunas poblaciones ha ocurrido un incremento considerable de algunas mutaciones. Típicamente, poblaciones que exhiben efectos “*founder*” han aumentado rápidamente de un pequeño número de “*founders*” y sin un significativo influjo de personas de diferentes regiones. Ejemplos primordiales son los finlandeses (“*funded*” en cerca de 2000 años) (25), islandeses (en cerca de 1100 años) (26), judíos ashkenazi (600-800 años) (27) canadienses, franceses, y Amish (250-400 años) (28). Existe abundante documentación de frecuencias de alelos extremadamente elevadas para genes de enfermedades raras en estas poblaciones.

El mecanismo de enriquecimiento génico en estas poblaciones más recientemente “*fonlado*” no es probable el resultado de cualquier “*ventaje selectiva*”, pero sí de una orientación genética, esto es, el efecto repetido de la casualidad en poblaciones juntas y mezcladas. Sólo muy recientemente se verificó que las mutaciones que contribuyen para la predisposición del cáncer pueden ser enriquecidas en poblaciones humanas. Un ejemplo primordial es la delección genómica del **exon16** de **MLH1** que ha sido llamado de mutación “**Finlandia 1**”.

Esto ocurre en 40 familias ostensiblemente no relacionadas en Finlandia y Suecia. Estudios genealógicos muestran que en un cluster geográfico en el centro-sur de Finlandia, muchos, o la mayoría de sujetos afectados, son portadores de la mutación “**Finlandia1**” y pertenecen a diferentes familias descendientes de un antecesor que ha sido uno de los pocos “founder” de esta subpoblación finlandesa (29).

Esta “*fondación*” ha ocurrido en cerca de 500 años. Sin embargo, otras familias con la misma mutación viven varios centenares de kilómetros alejados del sudeste y no parecen tener conexión genealógica. Recientemente, utilizando una batería de marcadores polimórficos intragenicos y/o flanqueados, para determinar la “*edad*” de estas mutaciones (30), sur-central de Finlandia la “*edad*” era quizá cerca de 16 generaciones, mientras en el sudeste era de mayor edad, quizá mayor de 40 generaciones (31). Estos hallazgos son absolutamente consistentes con la historia de la población de Finlandia y sugiere que la mutación “*Finlandia1*” se ha originado, o ha sido traída para la Finlandia del sur/este y se diseminó para otras partes del país a través de efectos “founder” intra-finlandeses repetidos. En el **HNPCC**, un número de mutaciones recurrentes han sido documentadas.

Cuando una mutación es vista repetidamente de modo ostensivo en familias no relacionadas, no es cierto que es una mutación “*founder*”; por el contrario, ésta puede representar una mutación *de novo* que sucede recurrentemente. Las dos pueden ser relativamente fáciles de distinguir por “*haplotype analysis*”. Las mutaciones “*founder*” ocurren en el mismo haplotipo, mientras las mutaciones “*de novo*” no.

8.6 Las posibilidades del diagnóstico de HNPCC

En el pasado, para establecer la frecuencia de **HNPCC**, muchos investigadores determinaban la proporción de todos los pacientes con **CRC** que llenaban los criterios de Amsterdam. (32). Por este método, los valores calculados obtenidos eran de 0,5% y 5% (16, 33-36).

Otros métodos han revelado resultados altamente discordantes de estos. Por ejemplo, Cannon-Albright y col. sugirieron que una proporción elevada de todos los tumores colorectales resultaba de mutaciones heredables (37). Con el análisis de gran segregación, Houlston y col. concluyeron que el 13% de los casos de **CRC** llenan los aspectos del modelo de herencia dominante, mientras Aaltonen y colaboradores, estudiando un conjunto consecutivo de pacientes jóvenes con **CRC**, extrapolaron una frecuencia de **HNPCC** de 0,5% - 0,9% (39).

Obviamente, cuando se usan los criterios de Amsterdam, o similares, como un todo de definición, más pequeña es la información obtenida y menos la probabilidad de definir los casos de **HNPCC**. Esto puede deformar los resultados y dificultar comparaciones entre los miembros de familias con miembros llave afectados por otros cánceres **HNPCC**, particularmente del endometrio.

Por eso, han sido propuestos criterios más “*relaxing*” del árbol genealógico del **HNPCC**. (40). El problema es como el **HNPCC** debe ser definido hoy. Los tumores de la gran mayoría de las familias positivas para los criterios de Amsterdam son **MSI** positivos, (41, 42), sugiriendo que en la deficiencia de la reparación de errores subyacen muchos **HNPCC**.

Sin embargo, cuando las familias de Amsterdam positivas son probadas para las mutaciones en genes **MMR** (usualmente en *MLH1* y *MLH2*), solamente muestran mutación entre 45% y 86% (43-46). Igualmente cuando los genes *PMS1* y *PMS2* fueron adicionalmente probados, la proporción de familias positivas para la mutación era del 70% (47, 48). En familias con **CRC** que no llenan los criterios de Amsterdam (familias del tipo “*HNPCC*”) la proporción con mutaciones en *MLH1* ó *MSH2* es más baja (8-30%) (43,44 y 49). Considerando toda la evidencia en conjunto, es tentador proponer que la presencia, o ausencia de una mutación “*germline*” en un gen **MMR** debe ser incorporada en la definición de **HNPCC**. Con este criterio del diagnóstico de **HNPCC** que faltará en algunos pacientes, porque ni todos los genes **MMR** son estudiados, y porque no hay ningún método de detección de mutación perfecto. Por ejemplo, el papel de *MSH6* no está completamente explorado. (50).

En por lo menos dos familias **HNPCC**, o del tipo **HNPCC**, las mutaciones estaban implicadas (51,52) y una elevada proporción de pacientes con **CRC** con inestabilidad microsatélite “media” ha sido descrita brevemente teniendo mutaciones germline de *MSH6* (53). Si *MSH3*, para allá de los genes **MMR**, u otros genes, tales como *BAX* y *TGFBRII*, resulta para la contribución de la predisposición heredada de **CRC** no esta aun esclarecido (54,55). Puede llevar tiempo hasta que el espectro mutacional de **HNPCC** sea definido. Nuevos loci serán descubiertos que muestren eventualmente genes cuyas mutaciones contribuyen para síndromes como el **HNPCC** o tipo-**HNPCC** (56).

8.7 Incidencia del **HNPCC**

Para determinar la incidencia de **HNPCC**, series consecutivas de pacientes con cáncer colorectal y otros no seleccionados deben ser estudiados en las mutaciones de los genes **MMR**. En una subpoblación de 1,25 millones en Finlandia, fueron seleccionados prospectivamente tumores **CRC** consecutivos, con determinación de eventual **MSI**, y estudiados *MLH1* y *MSH2* para mutaciones por secuenciación genómica en la “germline” de todos los pacientes cuyos tumores eran **MSI** positivos.

En un total de 1050 tumores, 126 eran **MSI** positivos (12%) y, dentro de estos, 28 tenían mutaciones de “germlines” en *MLH1*, o *MSH2*. Entonces, la proporción de pacientes exhibiendo mutación positiva para **HNPCC** era de 2,8% en estas series. Solamente parte de este estudio ha sido publicado (57). Obviamente, 2,8% es un valor despreciable. Las principales razones son los resultados **MSI** falsos negativos y el análisis de mutaciones falsas-negativas. Por ejemplo, la proporción más baja de células tumorales en un espécimen usado para el análisis **MSI** condiciona un mayor riesgo de un resultado **MSI** falso-negativo. Sin embargo, cuando los procedimientos patológicos son bien controlados, cerca del 85-95% de todos los tumores **HNPCC** son **MSI** positivos (41,58). Más aún, el análisis de mutaciones por secuenciación puede simplemente omitir una sustitución de un único nucleótido. Quizá, de modo más importante, grandes deleciones, inversiones, y duplicaciones esperan a la detección y puede ser más común de lo que se pensó previamente (59).

Debe notarse que muchos otros métodos de detección de mutaciones comúnmente usados, tales como **SSCP** y **DGGE**, también omiten estos tipos de mutaciones. Entonces, cuando una mutación “germline” del gen **MMR** ha sido identificada en 2,8% de pacientes con **CRC** en el estudio de Aaltonen y col. (57), y cuando algunas mutaciones pueden haber sido omitidas por las razones apuntadas, la frecuencia de **HNPCC** positivos hacia mutaciones puede bien ser arriba en esta población.

Más aún, esto a su vez representa una subestimación de la frecuencia global **HNPCC** porque solamente fueron rastreados los pacientes **CRC**. La incidencia de mutaciones de los genes **MMR** en la subpoblación de Finlandia en estudio puede ser calculada por extrapolación como se sigue: si cerca del 3% de todos los pacientes **CRC** tienen **HNPCC** con mutaciones positivas, y dado que el riesgo de **CRC** durante la vida es de 5%, en Finlandia, entonces la incidencia de portadores del gen es de 3% de 5%, esto es, 1 en 660 sujetos.

La frecuencia de **HNPCC** necesita ser estudiada en diferentes poblaciones y por diferentes métodos. Es posible que la incidencia varíe. Un origen de variación puede ser la presencia o ausencia de mutaciones “**founder**” que pueden mostrar un considerable enriquecimiento en algunas poblaciones. Se puede asumir que la proporción de mutaciones “*de novo*” en **HNPCC** es baja, porque no han sido documentados ejemplos. Por eso, en poblaciones extensas ampliamente mezcladas, en donde las mutaciones “**founder**” enriquecidas son raras, la expectativa es que las incidencias de las mutaciones génicas **MMR** son similares. Esta suposición debe ser probada. Si los factores ambientales (principalmente los dietéticos) tienen un impacto sobre la penetración y expresividad del cáncer **HNPCC**, entonces las diferencias en la incidencia de la enfermedad y la presentación entre cáncer de colon esporádico y **HNPCC** pueden ser altamente informativos. Por ejemplo, la incidencia relativamente a la edad en el **CRC** es cinco veces más elevada en los Estados Unidos que en México (60). Si la penetración de **HNPCC** es tan elevada en México como en los Estados Unidos, la proporción de **HNPCC** entre todos los **CRC** puede ser mucho más elevada en México. Inversamente, si la penetración en **HNPCC** es pesadamente dependiente de los factores ambientales, entonces los portadores mexicanos de mutaciones génicas **MMR** mostrarán una penetración mucho más baja. Tales poblaciones pueden probar ser muy valiosas en el estudio de quimioprevención.

En resumen, la incidencia global de **HNPCC** es la suma de las formas de mutación positiva y mutación negativa. Si el valor de los casos de mutación positiva es de 3% y si el valor en los casos de criterio laxo en los casos de mutación negativa, entonces el valor entre 5% y 10% puede ser esperado.

8.8 Tumores extracolónicos en el **HNPCC**

Watson y Lynch han descrito el espectro tumoral en el **HNPCC** (13). La presencia o ausencia de tumores extracolónicos condujo a la racional subdivisión del **HNPCC** en síndrome de Lynch I (sólo **CRC**) y síndrome de Lynch II (**CRC** y tumores extracolónicos).

Sin embargo, las diferencias en el involucramiento extracolónico son muchas veces relativas y no absolutas. Por ejemplo, algunas familias pueden tener muchos ejemplos de tumores extracolónicos, mientras otras tienen pocos, o ninguno, haciendo la distinción entre Lynch I y Lynch II un poco problemática.

El primer estudio sistemático de cáncer extracolónico en **HNPCC (13)** ha comparado la frecuencia observada de cáncer en sitios específicos en más de 1300 miembros de elevado riesgo en familiares de 23 familias **HNPCC**, con las expectativas basadas en la incidencia de la población general. La evaluación ha sido hecha de la hipótesis de que había heterogeneidad en la frecuencia de cáncer entre familias. Los hallazgos han mostrado un significativo aumento de las apariciones de cáncer de estómago, intestino delgado, carcinoma de las células transicionales del tracto urológico superior (pelvis renal y uretra) y ovario.

El carcinoma de colon y endometrium ya se ha establecido como un síndrome integral, y no fueron incluidos en esta evaluación. No ha sido detectado algún aumento de cánceres de páncreas, sistema linfático/hematopoético, laringe, mama, cerebro o pulmón/bronquios. No había evidencia de los exámenes de rastreo para otros cánceres de colon o endometrium que pudiesen concluir en una historia familiar. Por ejemplo, una revisión de casos del estómago, intestino delgado, sistema hepatobiliar, riñón, uretra y ovario no revelaron casos que hubiesen sido descubiertos a través de exámenes de rastreo.

Ha sido observada una significativa heterogeneidad en las frecuencias de los cánceres del tracto urológico superior y endometrio. Una significativa, pero menos asinalable heterogeneidad ha sido observada en cánceres de ovario. Cánceres de estómago, sistema hepatobiliar e intestino delgado, estaban homogéneamente distribuidos entre familias. En categorías que combinan órganos por sistemas, ha sido observada una heterogeneidad significativa en todos los cánceres, todos los cánceres urológicos y todos los cánceres genitales femeninos.

La categoría de todos los cánceres del sistema gastrointestinal (excepto colorectal) difería significativamente de la homogeneidad cuando solamente los cánceres encontrados estaban incluidos, pero no cuando los cánceres no incluidos del tracto gastrointestinal estaban comprendidos. **(13)**.

Con respecto al cáncer urológico, los familiares de elevado riesgo tenían tres veces más cánceres de riñón y 22 veces más cánceres uretrales de lo esperado. Sin embargo, no había evidencia de un riesgo aumentado de cáncer de la vejiga urinaria o cáncer de células renales. El cáncer endometrial ha sido probablemente el más importante de los cánceres extracolónicos a influenciar en la investigación familiar. Recientemente, un estudio sobre riesgo de cáncer en un conjunto de 1763 miembros de 50 familias diagnosticadas genéticamente, reveló 360 portadores de mutaciones en los cuales las tasas de incidencia estándar eran calculadas para diferentes cánceres **HNPCC (61)**. Estos estaban

significativamente aumentados para los cánceres colorectal, endometrial, ovario, tracto gastro biliar, tracto uroepitelial, riñón y sistema nervioso central.

Las incidencias acumulativas de cáncer en la edad de los 70 años fueron: cáncer colorectal 82%, cáncer del endometrium 60%, cáncer gástrico 13%, cáncer del ovario 12%. Para los otros tumores asociados con riesgo aumentado, el riesgo de las incidencias acumulativas estaba debajo de los 4%. Curiosamente, como había sido sugerido (**13, 62**) en las mujeres con mutaciones positivas, la incidencia del cáncer de endometrium (60%) excedía la del cáncer colorectal (54%). Con el correr del tiempo, habrá trabajos adicionales que posibiliten la conclusión más rigurosa y segura en que se sabrá cuáles son los cánceres que pertenecen al spectrum del HNPCC. Claramente, muchas conclusiones previas se basarán en casos en donde el estado de mutaciones no estaba determinado (**13, 63**), lo que ahora está siendo confirmado.

Por ejemplo, los riesgos de cáncer de mama, próstata y pulmón no parecen estar aumentados.

El carcinoma broncogénico, común en la población general, ocurrió muy raramente entre los miembros de la familia de alto riesgo. En el grupo de elevado riesgo, ninguna de las cinco personas referidas en un estudio (**13**), que tenían cáncer del pulmón, eran portadoras de gen putativo (esto es, afectadas con cáncer de endometrio o colon, ni tenían descendientes con estos cánceres). Otro estudio (**35**), en familiares de pacientes con cáncer de colon, reveló que el cáncer de pulmón ocurrió en solamente 60% de los familiares, cuando era comparado con sujetos normales. Mecklin y col. (**64**) han referido cáncer de 40 familias con **HNPCC**. Heinimann y col. (**65**) estudiaron 27 familias Suizas **HNPCC**, algunas con los criterios de Amsterdam y otras no, y algunas con mutaciones **MMR** “*germline*”, y otras no. Los hallazgos revelaron un exceso de carcinomas del endometrium, estómago y cerebro.

Once tumores de cerebro han sido identificados en este conjunto, tres de los cuales eran glioblastoma multiforme, mientras los restantes eran de tipo desconocido. Aunque no haya sido encontrado un exceso de tumores cerebrales en el estudio de Watson y Lynch (**13**), Vasen y col. (**66**) han descrito un riesgo aumentado de tumores cerebrales en **HNPCC**. Previamente, Hamilton y col. (**67**) descubrieron que el síndrome de **TURCOT** (tumores cerebrales, pólipos del colon y cáncer de colon) se divide, de hecho, en dos síndromes: uno que envuelve al gen **APC** (**CRC**, pólipos colónicos y meduloblastomas) y otro que

envuelve a los genes **HNPCC**, específicamente *MLH1* y *PMS2* (**CRC**, pólipos colónicos, y malignidades gliales).

El carcinoma gástrico ha sido originalmente encontrado en exceso en la familia G de Warthin descrita en los comienzos de los años de 1900s (11), pero este tumor declinó en la frecuencia con el correr del tiempo en la proporción en familia G con su declive en muchas poblaciones de estilo de vida Occidental (12).

Aarnio y col. (68) han elucidado nuestra comprensión del cáncer gástrico originado en el **HNPCC**. Específicamente, encontraron 62 cánceres gástricos ocurriendo en 51 familias **HNPCC**, abarcando 570 personas.

Ellos fueron capaces de estudiar 24 cánceres gástricos en detalle, en que ambas familias *MSH2* y *MLH1* estaban representadas. Sin embargo, es de gran interés y, más aún, contrariamente a algunas expectativas acerca de la prevalencia relativa del comienzo del cáncer extracolónico, que solamente uno de 22 pacientes con mutaciones *MSH2* tenía cáncer gástrico, mientras que 52 de 489 portadores de mutaciones *MLH1* manifestaron cáncer gástrico. Su edad media en el momento del diagnóstico era de 56 años. Diecinueve eran cánceres intestinales, mientras tres eran definidos como difusos y dos eran aparentemente no clasificados.

Once de 24 tumores mostraron inestabilidad microsatélite. La supervivencia global a los cinco años ha sido de 15%, pero ésta mejoró hasta un 48% con la cirugía curativa en los cánceres con estadio más bajo.

El carcinoma del intestino delgado es raro y cuenta con solamente 2% de todas las malignidades gastrointestinales (69). Sin embargo, en el **HNPCC** el riesgo en la vida del carcinoma del intestino delgado ha sido calculado ser de 1-4%, lo que es más que 100 veces el riesgo de la población general (70,71).

Rodríguez-Bigas y col. (72) examinaron 42 pacientes de 40 familias **HNPCC** que desarrollaron 42 cánceres primarios y 7 cánceres metacronos del intestino delgado. Cuarenta y seis eran adenocarcinomas, mientras tres eran tumores carcinoides. La edad mediana en el momento del diagnóstico era de 49 años. Las mutaciones génicas **MMR** han sido identificadas en 15 de 42 pacientes

(36%), nueve de los cuales eran *MLH1* y seis eran mutaciones *MSH2*. El cáncer del intestino delgado ha tenido el primer sitio en 24 pacientes (57%). La supervivencia global a los 5 y 10 años ha sido 44% y 33% respectivamente. Se ha concluido que los tumores del intestino delgado pueden ser presentados como neoplasmas en el **HNPCC** en sujetos de riesgo.

Estas lesiones ocurren en una edad más precoz y parecen tener un pronóstico mejor en **HNPCC** cuando son comparadas con lo esperado en la población general. Se coloca una cuestión: ¿por qué razón se encontraron cánceres extracolónicos en exceso en el **HNPCC**?

Hasta el presente, no hay una explicación comprensible, no obstante, Fearon (73) en una revisión de síndromes de cánceres humanos que ofrece una explicación para este fenómeno. Específicamente, él sugiere que los sitios en riesgo deben estar expuestos a una agresión ambiental que causa la mutación o inactivación del “*Wild Type Allele*” más probablemente en aquel sitio. Esto parecería ser el caso de la historia del cáncer gástrico en el **HNPCC**, dado el hecho de que las generaciones de familiares con **HNPCC** referidas lo más precozmente mostraron un exceso de **HNPCC** referidas al cáncer gástrico, que más común es en ciertas familias. También sobre esta hipótesis interactiva genética/ambiental Aarnio y col. (68) refirieron que muchos cánceres gástricos en el **HNPCC** son intestinales, el cáncer gástrico-tipo que se ha verificado ser el más fuertemente asociado con causas ambientales.

8.9 Síndrome MUIR-TORRE

El Síndrome de Muir-Torre (MTS) requiere por lo menos un neoplasma de las glándulas sebáceas (adenoma, epitelioma, o carcinoma) o queratocantoma (s), o ambos, en concordancia con un mínimo de un neoplasma maligno interno. La asociación con tumores de las glándulas sebáceas es importante en estas lesiones cutáneas y son muy raras. El primer reconocimiento de esta asociación ha sido publicada en 1966 por Muir y col. (74) y en 1968 por Torre (75), lo que llevó al epónimo de esta enfermedad. Estos investigadores notaron que sus pacientes manifestaban adenocarcinomas viscerales múltiples en edades precoces y un curso clínico que aparecía relativamente benigno en la ocasión. Los hallazgos constantes han sido los neoplasmas sebáceos malignos y benignos de la piel y, menos frecuentemente, queratocantomas. Los criterios diagnósticos de **MTS** han sido extensivamente revistos por Cohen y col. (76).

Lynch y col. (77-79) han sido los primeros en descubrir los hallazgos cutáneos de **MTS** como parte del síndrome Lynch II. Publicaciones más recientes han identificado las mutaciones germline en **MSH2** y **MLH1** como los genes sospechosos en el **MTS** (21, 80-82).

8.10 Fenotipo y correspondientes mutaciones en el **HNPCC**

Vasen y col. (71) compararon el riesgo de cáncer en 124 sujetos que eran portadores de mutaciones **MLH1** “*germline*” con 86 pacientes con mutaciones conocidas de **MSH2**. El riesgo en la vida del **CRC** ha sido el mismo para ambos grupos (80%), como era el riesgo de carcinoma del intestino delgado (cien veces más que la población general en ambos grupos). Curiosamente, el carcinoma endometrial parecía ser más común en el sub-grupo con mutaciones **MSH2** (61%v. 42%), pero la diferencia no era estadísticamente significativa.

Los portadores de mutaciones **MSH2** mostraron un riesgo aumentado para el carcinoma de células de transición de la pelvis renal de uretra y adenocarcinoma del estómago y ovario cuando era comparado con los portadores de mutaciones **MLH1**. Lin y col. (83) describieron hallazgos similares, en que los cánceres extracolónicos eran de 33% de pacientes con mutaciones de **MSH2** pero sólo de 12% para familias con mutaciones de **MLH1**. Dunlop y col. en su estudio de 64 pacientes con **HNPCC** que tenían mutaciones de genes **MMR** y que fueron evaluados hacia el riesgo de cáncer hasta la edad de 70 años, manifestaron que el sexo era una determinante importante en la aparición de tumores en el **HNPCC** (62). Curiosamente, el riesgo era de 91% para los hombres y de 69% para las mujeres.

El riesgo de **CRC** era marcadamente diferente entre los sexos: 74% para los hombres y 30% para las mujeres. El carcinoma del endometrio era más común que el **CRC** para las mujeres en los pacientes de este estudio con **HNPCC**.

Jäger y col. (84) postularon que la naturaleza específica de las mutaciones dentro de los genes puede contribuir de manera importante para el fenotipo. Ellos describieron un “*intron 14 splice donor mutation*” **MLH1** en cinco familias danesas con **HNPCC**. Esta mutación resultó en un alelo “silenciado” en que no ha sido generada cualquier proteína anormal. Estas familias con esta mutación mostraron una historia natural similar a 16 otras familias **HNPCC** con respecto al **CRC**, pero sólo fueron identificados dos cánceres extracolónicos, uno del endometrium y otro de la ampolla de Vater,

comparados con 44 en otras familias. El cáncer extracolónico para la tasa de **CRC** ha sido de 2 para 23 en familias con “*intron 14 splice donor mutation*”, comparado con 44 para 91 en otras familias. Estos investigadores levantaron la hipótesis de que el alelo silenciado resultó en una enfermedad menos severa por causa de la ausencia de un efecto negativo dominante.

Miyaki y col. (52) identificaron la mutación “*germline*” **MSH6** en una familia que no reunía los criterios de **Ámsterdam**, pero que mostraba una predominancia de carcinoma del endometrium y ovario. Akiyama y col. (51) también describieron una mutación de **MSH6** en un pariente **HNPCC** atípica. Todos los tres tumores del colon “proband” mostraron inestabilidad microsatélite y mutaciones de ambos alelos **MSH6**, indicando que esta mutación ha sido predispuesta para el síndrome en esta familia.

Finalmente, Beck y col. (85) sugirieron que las familias cancerosas que no reúnen los criterios de **Amsterdam** pero que tienen mutaciones “*germline*” muchas veces tienen mutaciones “*missense*”. Estos investigadores especularon que las mutaciones “*missense*” resultan en enfermedad menos severa, o de más baja penetración porque hay menor alteración estructural de la proteína codificada.

Hasta el presente, nadie demostró o ha dado una explicación comprensiva para los varios aspectos de combinaciones tumorales en cualquiera de estas perturbaciones, incluyendo, obviamente, el **HNPCC**.

8.11 Patología y pronóstico del CRC en el HNPCC

Watson y col. (86) hicieron un estudio conjunto retrospectivo comprando las características de supervivencia entre los casos de **HNPCC** (274 casos de 98 familias **HNPCC**) con una serie hospitalaria no seleccionada de 820 casos consecutivos de **CRC**. Los pacientes fueron clasificados (estudiados) de acuerdo con el sistema TMN del Comité Conjunto Americano de Cáncer y de la Unión Internacional Contra el Cáncer. Cuando fueron comparados con series no seleccionadas, los casos **HNPCC** tenían un estadio de enfermedad más baja y algunos tenían metástasis distantes en el diagnóstico. En el estadio estratificado del análisis de supervivencia, los casos de **HNPCC** tenían una supervivencia global significativamente mejor, no obstante el ajustamiento de su edad más joven.

Sankila (87) ha referido una supervivencia similar cuando estudió 175 pacientes con **HNPCC** y los comparó con 14.086 pacientes con aparentes **CRC** esporádicos, confirmando que los pacientes con **HNPCC** que desarrollaran **CRC** tenían un mejor pronóstico que los pacientes con **CRC** esporádicos. El estadio más bajo en el tiempo del diagnóstico de pacientes con **HNPCC** comparados con los casos **CRC**

no seleccionados fue principalmente atribuido a metástasis distantes más raras en el momento del diagnóstico. Su supervivencia era mas larga que en los pacientes **CRC** no seleccionados con los tumores en el mismo estadio. Destaca el hecho de que la tasa de muerte estimada para los casos de HNPCC, cuando era ajustada para las diferencias de estadio y edad, era en lo máximo, dos tercios de la tasa de las series hospitalarias.

Fujiwara (58) estudió 39 **HNPCC CRCs (HNPCCa)** y 57 **CRCs** del lado derecho esporádicos (**SRSCCa**). Los hallazgos revelaron que de **HNPCCa** 95% (37 de 39) eran **MSI** positivos cuando comparados con 31% (18 en 57) de **SRSCCa**, pero la inestabilidad tendía a ser más dispersa en **SRSCCa**. La ausencia nuclear del producto génico de reparación de error, por inmunocitoquímica, estaba asociada con la mutación **MSH2** “*germline*”.

La persistencia de mutaciones en el proto-oncogen **K-ras** era similar en el **HNPCC** y **SRSCCa** (30%:11 en 37) y (30%:16 en 54), pero ninguno **HNPCCa** de los pacientes en el codon 13, y dos otros HNPCC tenían mutaciones **K-ras** múltiples atribuidas a subclones. Deleciones alélicas 189 y superexpresión de producto génico **p53** eran inversamente relacionadas con **MSI**. La mutación de alteración de estructura (“*frameshift*”) del gen del receptor del factor de crecimiento transformador B tipo II (“*transforming growth factor β type II receptor gene*”) ha sido frecuente en todos los cánceres **MSI** positivos (85%: 46 de 54), pero la mutación del gen del factor de transcripción **E2F-4** era más común en **HNPCCa** de pacientes con mutación “*germline*” **MSH2** que en aquellos con mutación “*germline*” **MLH1** (100%:8 de 8) versus (40%:2 de 5) y la mutación del gen proapoptótico **Bax** era más frecuente en **HNPCCa** que en **SRSCCa MSI** positiva (55%:17 en 31) versus 13% (2 de 15). La combinación más común de mutaciones ocurrió en solamente 23% (8 de 35) de los cánceres potencialmente evaluados **MSI** positivos.

Los autores concluyeron que sus hallazgos correspondían a la heterogeneidad marcada resultante de la acumulación de alteraciones genéticas específicas en **CRCs MSI** positivos. Más aún, es esta heterogeneidad genética marcada la que puede ser responsable de los cuadros clínicos y patológicamente heterogenios de los cánceres **MSI** positivos. Los cálculos han mostrado que la frecuencia de los adenomas colónicos en los **HNPCC** es la misma que el problema que permanece por resolver.

Por ejemplo, Beck y col. (9) han sugerido que los pacientes **HNPCC** pueden desarrollar adenomas más precozmente y más frecuentemente que en la población general. En el St. Mark's Hospital, un estudio ha mostrado una mayor frecuencia de adenomas múltiples en **HNPCC** cuando es comparado con la población general. (88).

Jass y Stewart (89) también identificaron significativamente más adenomas en pacientes **HNPCC** más jóvenes de 50 años, que la edad encontrada en los controles de necropsia. Ellos encontraron adenomas en **HNPCC** que eran más grandes, muchas veces vellosos, y tenían mayor grado (elevado) de displasia. Estos hallazgos son consistentes con la hipótesis de que los adenomas en **HNPCC** tienen una mayor tendencia para la degeneración maligna que los adenomas esporádicos.

Jass (90) preconizó la teoría del “adenoma agresivo”, en que los adenomas se forman en los pacientes **HNPCC**, tal como en la población general; no obstante, una vez formados, éstos progresan hacia un carcinoma más rápidamente, o más frecuentemente, o ambos, que sus contrapartes esporádicas. Una evidencia posterior como soporte de esta teoría ha sido encontrada en un estudio finlandés que mostró una marcada disminución en la incidencia del cáncer de colon entre pacientes con **HNPCC** que fueron sometidos a vigilancia colonoscópica regular con remoción de adenomas (91).

Smyrk y col. (92) y Jass (93) hicieron importantes contribuciones para el estudio de la patología de **CRC** en el **HNPCC**. Los **CRC** en **HNPCC** muestran una tendencia para un cuadro de crecimiento sólido que cuenta con la elevada frecuencia de carcinomas poco diferenciados en esta perturbación (93,94). Estos tumores se parecen al “Carcinoma indiferenciado descrito por Gibbs (95) y al carcinoma medular descrito por Jessurun y Manivel (96). Estos tumores parecen tener un mejor pronóstico que los **CRC** que son más típicos. Cuadros histológicos similares caracterizan un 15% de **CRCs** esporádicos que expresan inestabilidad microsatélite (97). Este tipo especial de histología ha sido referido como “sólido-cribiforme” en que el cuadro tiene un valor predictivo positivo de 53% para el estatus **MSI+** (98).

Smyrk y col. (92) también describieron la respuesta linfoide del hospedero, normalmente la reacción del tipo Crohn, siendo más común en **HNPCC** que en **CRCs** esporádicos. Aunque este hallazgo no es consistentemente verdadero en todas las series (93), hay una tendencia similar para formar agregados linfoides en las cercanías del tumor que parece ser un cuadro de tumores del colon **RER+** esporádico

(97). En la población general, una reacción “tipo Crohn” está asociada con un pronóstico mejorado (99). Será importante determinar si este fenómeno cuenta con un pronóstico más favorable de CRC en HNPCC (86).

8.12 Patogenia en las criptas aberrantes del colon

Los focos de criptas aberrantes (ACF) son caracterizadas por lesiones en la mucosa del colon de ratones (100), cuando criptas grandes y espesas en especímenes colorados de azul de “methyline” han sido tratadas con un carcinogenio (azoxymetano). Estas criptas, comparadas a las de los modelos de roedores, han sido subsecuentemente referidas en la mucosa colónica en el hombre (101).

Roncucci y col. (102) estudiaron ACF en la mucosa colónica en un conjunto de pacientes con CRC en dos provincias de Italia. Los hallazgos de estos investigadores mostraron que la densidad de ACF era más elevada y la multiplicidad de criptas baja desde el intestino grueso proximal al distal. Fueron observados microadenomas solamente en el colon, mientras ACF hiperplásticos eran más frecuentes en el rectum. Ellos concluyeron que la densidad de ACF se correlacionaba con las tasas de CRC en las dos provincias italianas en donde ha sido estudiado, lo que constituye un gradiente positivo del intestino grueso proximal para el distal. La histología de ACF sugiere que esas lesiones pueden ser precursoras tanto de los pólipos adenomatosos, como de los pólipos hiperplásticos. Estos datos muestran evidencia posterior del papel de ACF en la carcinogénesis colorectal humana.

En su revisión Roncucci (102) notó que Augenlicht y col. (103) describieron la existencia de inestabilidad genómica en los microsátélites que eran indicativos de deficiencia MMR del DNA en las ACF humanas. Los autores también notaron que Heinen y col. (104) encontraron inestabilidad microsátélite restringida a ACF de la mucosa colónica del lado derecho entre pacientes con cáncer del intestino grueso.

Roncucci y col. (102) concluyeron que la inestabilidad es también más frecuente en el carcinoma del lado derecho del colon, reforzando un concepto de vías diferentes para el cáncer del colon proximal y distal, y dando soporte a la hipótesis del involucramiento de ACF en el desarrollo del cáncer.

Takayama y col. (105) han hecho una revisión del tema de los focus **ACF** y, usando endoscopia “magnifying” estudiaron la permanencia, número, tamaño y aspectos displásicos de **ACF** en concreto con su distribución de acuerdo con la edad en 171 pacientes, 131 de los cuales tenían un adenoma(s) del colon y 48 tenían **CRC**. Los autores, también, de forma prospectiva evaluaron la permanencia de **ACF** en 11 sujetos, de los cuales cuatro eran normales, seis tenían adenoma y uno tenía cáncer, antes y después de la administración de 100 mg. de Sulindac tres veces al día por 8 a 12 meses.

Ellos compararon sus resultados con nueve sujetos no tratados, de los cuales cuatro eran normales y cinco tenían adenoma. Todos los pacientes tenían hallazgos de base compatibles con **ACF**. Los hallazgos revelaron que de 3155 **ACF**, 161 eran displásicos.

La permanencia y número mostró aumentar con la edad. Más, había correlaciones entre el número de foci de criptas aberrantes, la presencia de foci displásicos, el tamaño de foci, y el número de adenomas. Después de la terapia con Sulindac, el número de foci disminuyó, desapareciendo en siete de once sujetos. En el grupo de control no tratado el número de foci no cambió en ocho sujetos y aumentó ligeramente en uno. Estos autores concluyeron que tales **ACF**, en particular los mayores, que contenían cuadros displásicos, pueden constituir ejemplos precursores de adenomas y cáncer. Deben ser realizados estudios de investigación sobre los casos de **ACF** en el **HNPCC**, dado que pueden constituir un “marcador” patológico para estudios de evaluación de efectividad de la quimioprevención, al demostrar que hay una reducción en la frecuencia de **ACF**, después de la exposición a un agente de quimioprevención específico.

8.13 Prevención y actuación clínica en **HNPCC**

Para evaluar la efectividad de la vigilancia, Vasen y col. (106) desarrollaron un modelo para calcular la expectativa de vida y los costes de los cuidados de salud con la vigilancia de los portadores de un gen **MMR** mutado **HNPCC**. Ha sido ejecutada una colonoscopia cada dos o tres años y ha sido comparada con los pacientes que no han recibido esta vigilancia de **CRC**. Los valores han sido, entonces, determinados para un riesgo de la duración de vida con la posibilidad de desarrollar **CRC** en dirección con el estadio de distribución de este cáncer entre sujetos sintomáticos que resultaba el registro de **HNPCC** de Alemania.

Los resultados indicaron que los portadores bajo vigilancia tenían una expectativa de vida de siete años, y también que el coste de la vigilancia era menor que el coste de no vigilancia. Estas

investigaciones del gen **HNPCC** eran efectivas y recomendaron que las agencias gubernamentales, así como las organizaciones de seguros de salud, deberían apoyar y financiar esta vigilancia.

Syngal y colab. (107) examinaron la expectativa de vida y la calidad adaptada a los beneficios en la expectativa de vida resultante de la vigilancia y colectomía profiláctica entre los potenciales poseedores de mutaciones “germline”, responsables por **HNPCC**. Cada uno de los programas de reducción del riesgo que mostró grandes ganancias en la expectativa de vida para los portadores de mutación, con beneficios que iban de los 13,5 años para el grupo de vigilancia a 15,6 años para el grupo de procolectomía a los 25 años de edad, comparados con los que no tuvieron cualquier intervención. Los beneficios de la colectomía profiláctica comparados con la vigilancia disminuyeron con el aumento de edad fueron mínimos si la colectomía fue ejecutada en el tiempo del diagnóstico de cáncer colorectal. Estos autores concluyeron que la vigilancia colonoscópica era efectiva entre los portadores de mutaciones **HNPCC**. Sin embargo, la preferencia entre cirugía profiláctica y vigilancia coloca una decisión compleja al paciente.

Cuando existe un inicio precoz del CRC en **HNPCC**, así como la combinación de la predilección proximal de CRC, resulta altamente recomendable que la colonoscopia sea iniciada en la edad de los 20 a 25 años en pacientes con 50% de riesgo de **HNPCC** basado en su posición en el árbol genealógico, o aquellos que son portadores de mutación “germline” **HNPCC**. Como consecuencia de este problema de carcinogénesis, es recomendable que la colonoscopia sea ejecutada cada otro años en los pacientes de alto riesgo que no tuvieron un test de DNA y anualmente en aquellos con mutaciones “germline” **HNPCC**. Es importante señalar que la colonoscopia falta a tasas tan elevadas como de 29% para pólipos menores que 5 milímetros de diámetro. (108). Jarvinen y al (91) identificaron seis CRC entre portadores de mutaciones “germline” **HNPCC** que se sometieron a tres colonoscopias en cada año, mientras Vasen y col. (109) descubrieron cinco cánceres de “intervalo” en pacientes **HNPCC** dentro de los tres años y medio en la secuencia de una colonoscopia dicha normal. En un estudio de revisión, Church (110) sugirió que en este intervalo los **CRCs** se desarrollan en el epitelio con apariencia normal, dentro de los tres años, o de adenomas que han sido fallos”. En orden a minimizar esta tasa de fallos es necesario que la preparación sea excelente y un examen meticuloso de la mucosa colorectal interna sea ejecutado. Los pacientes deben ser avisados que la colonoscopia no es un examen de visión perfecta y por eso hay una opción de la colectomía profiláctica (111,112).

8.14 Potencialidades de la colectomía profiláctica en HNPCC y otras modalidades de profilaxia

La colectomía subtotal como una medida profiláctica entre los pacientes **HNPCC** permanece en controversia. A los pacientes que tengan potencialmente mutaciones “**germline**” les es ofrecida esta opción como una alternativa a la vigilancia, para toda la vida de colonoscopias. El consejo médico genético debe ofrecer esto para que los pacientes puedan estar en mejor posición para evaluar las ventajas, así como las potenciales secuelas de estas estrategias de actuación. En el caso de colectomía profiláctica, el riesgo de mortalidad es bajo pero hay una posibilidad de morbilidad de largo curso y más frecuentes de yecciones.

Los pacientes también necesitan saber que ellos deberán hacer vigilancia endoscópica continuada de la porción restante de la mucosa rectal, una vez que el riesgo de cáncer es de cerca del 1% al año **(113)**.

Fraggatt y col. **(114)** llaman la atención hacia que el riesgo de **CRC** en **HNPCC** puede ser significativamente más alto en hombres cuando es comparado con las mujeres en los 50 y 60 años de edad respectivamente. Por otro lado, las mujeres tienen un cierto riesgo de cáncer endometrial (0,5% a los 60 años), así como de carcinoma del ovario en la premenopausia (0,2% a los 50 años). Estos autores concluyeron apropiadamente que tales diferencias intersexuales en los riesgos de cáncer colorectal en **HNPCC** tienen implicaciones para el rastreo y los programas, y para las tentativas en identificar los condicionantes y modificadores de la susceptibilidad de cáncer colorectal. **(114)**.

La razón de la importancia de la opción de la colectomía subtotal profiláctica para estos pacientes **HNPCC** de alto riesgo de **CRC** se basa en un cierto número de relatos de **CRCs** de “*intervalo*” que ocurren en el periodo de un año a cinco años después de la colonoscopia de vigilancia anterior. Por ejemplo, Lanspa y col. **(115)** estudiaron 225 sujetos con 313 cánceres de colon de familias en el archivo de la Universidad Creighton, del Nebraska, en Estados Unidos, sobre los registros del Síndrome de Lynch, y verificaron que seis de estos pacientes, de diferentes familias, manifestaron **CRCs**, originándose dentro de un período de 4,5 años postcolonoscopia. Otros 17 pacientes tenían cánceres de colon metacronos dentro del período de cinco años post-resección (menos que la colectomía subtotal) de su cáncer de colon inicial. Entonces, de 225 pacientes **CRC** de familias con el síndrome de Lynch, 10,2% tenían **CRC** dentro del periodo de cinco años post-colonoscopia, o de resección de colon

La cirugía profiláctica en los pacientes con síndrome de Lynch levanta la cuestión de saber si el nivel de riesgo en la perturbación merece una colectomía preventiva. DeCosse responde que “...en la presencia de genes **HNPCC** defectuosos adicionales, la respuesta parece ser afirmativa” (116). En el caso del síndrome de Lynch II, él constata que cuando la cirugía es planeada por la presencia de **CRC**, debe ser ofrecida la opción de ooforectomía bilateral profiláctica y histerectomía, particularmente si la mujer está en la postmenopausia (15,117-119).

Church (112) refiere que pacientes con colitis ulcerativa y FAP, que pueden estar razonablemente en buen estado de salud, pero cuyos colones pueden mostrar severa displasia y múltiples adenomas, claramente no tienen colones normales. Sin embargo, en **HNPCC**, el colon puede parecer normal pero, en verdad, no está normal dado el hecho de que las mutaciones del gen de “mismatch repair” están presentes en el núcleo de cada colonocito y es sólo una cuestión de tiempo antes que se manifieste un tumor. Church muy razonablemente coloca la siguiente cuestión: “... ¿Por qué debe ser hecha como rutina una colectomía profiláctica en un síndrome y no en el otro? Church apoya la colectomía profiláctica en pacientes con mutaciones en genes asociados a “mismatch repair” con **HNPCC** que son miembros de una familia en que hay un cuadro clínico fuerte de cáncer colorectal heredado.

“Cuando los cánceres aparecen en los familiares jóvenes, la cirugía profiláctica necesita de ser hecha precozmente. Los pacientes no deben estar en un riesgo aumentado por complicaciones y deben comprender completamente la racionalidad de esta supuesta recomendación.”

Rüschhoff y col. (120) verificaron que la inestabilidad microsatélite (**MSI**) en células **CRC** que son deficientes para un subgrupo de genes “mismatch repair”, normalmente **MLH1**, **MSH2** y **MSH6** es marcadamente reducida siguiendo la exposición a la Aspirina o Sulindac. Estos hallazgos eran reversibles y eran independientes de la tasa de proliferación y de la función ciclo-oxigenase. Curiosamente, una línea de células de cáncer endometrial no mostró cualquier cambio con el tratamiento con Aspirina / Sulindac.

La reducción de la inestabilidad microsatélite en estas células deficientes en la reparación estaba confinada a las células no-apoptóticas. Estos autores concluyeron que sus resultados sugieren que la Aspirina / Sulindac induce a una selección genética para la inestabilidad microsatélite en el subgrupo de células deficientes **MMR** y pueden conferir una terapéutica profiláctica efectiva para los familiares de los

cánceres **HNPCC**, en donde la alteración de los genes *MSH2* y *MLH1* están asociados con una susceptibilidad mejorable de casos de cáncer.

8.15 Posibilidades de experimentación y mecanismos genéticos en HNPCC

Con los modelos animales se puede acelerar la comprensión de la etiología y la patogénesis, así como el control de **HNPCC**. De Wind y col. (121) han desarrollado modelos de ratones sufriendo una deficiencia en el gen **MMR** *MSH2*. Curiosamente, la mayoría de estos ratones deficientes *MSH2* sucumbieron a linfomas en edades precoces. Estas malignidades fueron inducidas de forma sinérgica a través de la exposición a etilnitrosurea.

Los ratones inmuno-comprometidos *Tap1* y *MSH2* generalmente sucumbían a tumores tipo-**HNPCC**. Conjuntamente, estos datos sugieren que el espectrum de tumores **HNPCC** es determinado por la exposición de las células deficientes **MMR** a mutagenios exógenos, en vez de la pérdida específica del tejido del alelo **MMR** de tipo natural, o por vigilancia inmune. Los ratones hemicigóticos *MSH2* tenían una incidencia tumoral aumentada que, sorprendentemente, era raramente correlacionada con la pérdida del alelo *MSH2*. Estos autores desarrollaron un modelo para la tumorigénesis intestinal en **HNPCC**, introduciendo el alelo MIN del gen supresor de tumor *Apc*. Sus hallazgos revelaron que había pérdida del alelo *MSH2* tipo natural en una fracción significativa de tumores del intestino en los ratones *Apc+ / Min; MSH2 +/-*. En algunos de estos tumores (*Msh2 +/-*), existe un área del tumor que revela una pérdida del alelo *Msh2+*, pero no del alelo *Apc+*, mientras otro mostró el genotipo inverso. Esta biclonalidad aparente podía indicar la necesidad de la colaboración entre clones tumorales independientes durante la tumorigénesis.

Los avances prodigiosos en el conocimiento sobre el riesgo genético, la historia natural de la enfermedad, la vigilancia disponible recomendable y la gestión de la condición, los tests de DNA, así como la necesidad para tratamiento genético, son significativamente importantes en los cuidados del tratamiento de **HNPCC** y **FAP**; así mismo para los pacientes con una variedad de otras perturbaciones que pueden estar relacionadas hereditariamente con el cáncer.

El papel fundamental de los genes en el proceso que lleva al apareamiento del cáncer, ahora, están bien establecidos. Aún, recientemente, la investigación cuantitativa y cualitativa de la expresión de los

genes incidía su atención en los cambios de la secuencia de los genes, usualmente referidos como mutaciones.

Sin embargo, las alteraciones en la expresión génica pueden venir por otros mecanismos diferentes de los cambios de la secuencia de los genes; esos cambios son referidos como cambios epigenéticos. Relativamente a la condición **HNPCC**, vale la importancia de dos tipos de fenómenos epigenéticos, con relevancia en el fenómeno etiopatogénico del CRC: silenciamiento genético por metilación y pérdida de impresión (*“imprinting”*). Existen varias revisiones disponibles para una lectura posterior (**122, 123**).

8.16 Influencia de la metilación en HNPCC

Los residuos de la citosina pueden adquirir un grupo metilo en la posición C-5. Esto ocurre en hebras opuestas de la secuencia palindrómica **CpG**. Muchos genes tienen regiones ricas en parejas **CpG**, usualmente referidas como “islas **CpG**”, o fragmento minúsculo Hpa, o islas **HTF**. En los genes expresados extensamente, las islas **CpG** están típicamente, pero no exclusivamente, localizadas en la región promotora. Como regla, las islas **CpG** están no-metiladas (*“desmetiladas”*).

Cuando la metilación ocurre, la unión de los factores de transcripción es inhibida e impedida la transcripción inicial, llevando al silenciamiento del gen. Los cambios *“denovo”* en la metilación son uno de los mecanismos por los cuales los genes son activados (*“switch on”*) y inactivados durante el desarrollo normal. Actualmente, está cada vez más claro que, similarmente, los cambios en el cuadro de la metilación son un fenómeno común en el cáncer.

Recientemente, han sido descubiertos hallazgos de interés en el **CRC** hereditario. Primero, ha sido encontrada hipermetilación de la región promotora del **APC** (**124**), pero su relevancia no está completamente evaluada, por ejemplo, analizando la expresión de APC o la proteína correspondiente. Curiosamente, la hipermetilación ha sido casi totalmente confinada a tumores del lado derecho, cuando es comparada con los del colon izquierdo.

Segundo, en el modelo del ratón de **FAP**, el ratón **APC^{Min}**, ha sido posible reducir dramáticamente la formación de pólipos por supresión de la metilación genómica (**125**). Esto es conseguido tornando el

ratón heterocigoto para el gen de la metiltransferasa DNA o inyectándoles “*DNA metiltransferasa inhibidor 5-aza-2-deoxycytidine (5-aza-c)*”.

Mientras este resultado no prueba que la demetilación del gen **Apc** cuenta específicamente para la reducción del número de pólipos, eso levantó la posibilidad provocativa de que la demetilación “*targeted*” podría ser obtenida y esto podría suprimir la tumorigénesis.

Recientemente, ha sido mostrado que en los **CRCs** esporádicos **MSI** positivos, la hipermetilación de la región promotora **MLH1** es común (126-129) y asociada con la ausencia de la proteína **MLH1** inmunoreactiva (127). La hipermetilación ha podido ser revertida con el tratamiento con 5-aza-3c y esto restablece la proteína **MLH1** (127).

Algo sorprendente: hallazgos no correspondientes pudieron ser mostrados relativamente al gen **MSH2**, pero cerca de 85% de todos los tumores **MSI** positivos (no-**HNPCC**) han podido contar para el silenciamiento de **MLH1** en esta vía. Se sabe, que el 12-15% de todos los **CRCs** son **MSI** positivos, pero solamente una cuarta parte de ellos representa **HNPCC**. Entonces, parece que casi todos **CRCs** **MSI** positivos pueden tener una explicación. Una minoría, quizá una quinta parte, ocurre en pacientes **HNPCC**; muchos de estos tienen una mutación heredada en **MLH1** o **MLH2** y un cambio somático que elimina el segundo alelo.

En la mayoría, quizá cerca de cuatro quintos, la deficiencia de “mismatch repair” es causada por eliminación bialélica de **MLH1** por hipermetilación somática de su promotor. Los detalles de este esquema aún permanecen por esclarecer. Por ejemplo, ha sido mostrado previamente que el segundo estímulo (“*secondhit*”) en **MLH1** puede ser, sea una mutación (47) o una delección (pérdida de heterocigocidad; **LOH**) (130). Puede parecer, ahora, que la hipermetilación puede también producir el segundo estímulo “*second hit*”, pero no es claro cuál es la frecuencia con que esto ocurre.

Mas aún, mientras en algunos casos esporádicos han sido documentados casos de hipermetilación bialélica de **MLH1**, es posible que en otros, un alelo pueda ser eliminado por metilación, el otro por **LOH**, o mutación.

Esto levanta la cuestión si la metilación “*de novo*” -sea específica del gen somático, sea específica de alelo- ocurre, o si la metilación es usualmente un fenómeno bialélico generalizado.

Una vez que los CRCs esporádicos MSI positivos resultan de hipermetilación de *MLH1*, esto lleva a la especulación intrigante sobre el papel de los factores epigenéticos en general. Queda por saber cuál es la razón de estos tumores en mostrar mejor pronóstico (42,86,87,131) y son predominantes del lado derecho (132), así como no se sabe porqué están asociados con una edad típica en el diagnóstico en vez de una edad joven (132,133).

No está completamente explicado cuáles son los factores ambientales que contribuyen para la hipermetilación. ¿Será la hipermetilación específica del gen, específica del órgano, o de la edad? (134). También, no está esclarecido si la inhibición, o reversión de la hipermetilación, es preventivamente benéfica, o es una estrategia terapéutica. Estas son cuestiones importantes que pueden tener un impacto fuerte en nuestra comprensión del proceso molecular en un subgrupo substancial de CRC y, cómo ha sido mostrado en el cáncer gástrico (135,136) y el cáncer endometrial (137).

8.17 Silenciamiento genético

“*Imprinting*” es un hecho cuando los dos alelos en una célula somática son diferencialmente expresados. Estudios en cigotos y embriones en el estadio precoz sugieren que el cuadro de la expresión modificado (“*up ó down*” regulación) es precigótico, o sea, en otras palabras, es inducido por el gameta (el huevo, o esperma). Por ejemplo, el gen *factor2 de crecimiento tipo-insulina (IGF2 – “insulin-like growth factor 2”)* es usualmente expresado en el cromosoma paternal, pero no el maternal. Si acredita que el “*imprinting*” diferencial de los genes juega un papel importante en el desarrollo (138,139). No muy sorprendentemente, modificaciones de “*imprinting*” han sido recientemente implicadas en el cáncer. La pérdida de “*imprinting*” (LOI- “*loss of imprinting*”) puede ser definida, sea como activación de un alelo silencioso normal, o bien como el silenciamiento de un gene que se expresa normalmente (140,141). Recientemente, LOI para IGF2 ha sido estudiado en los cánceres colorectales (142). Diez de once CRCs que eran MSI positivos mostraron LOI, mientras solamente dos de 16 que eran MSI negativos tenían LOI.

Lo más intrigante, es que en aquellos pacientes cuyos tumores mostraron **LOI**, mucosa colónica normal y, en algunas ocasiones, leucocitos de la sangre circulante, también mostraba **LOI**. En sujetos sin cáncer de colon, **LOI** era raro, pero ocurrió en la mucosa colónica en dos de 16 casos y en la sangre en dos casos de 15 (**142**). Estos hallazgos necesitan de confirmación de trabajos adicionales independientes. Más aún, numerosas cuestiones necesitan ser contestadas. ¿Cuál es la importancia del gen **IGF2** en el **CRC**? ¿Estará el fenómeno **LOI** relacionado con alguna región que pueda contener otros genes de importancia para el **CRC**? ¿Cuál es la base de la asociación entre inestabilidad microsatélite e **LOI**? Una vez que en las personas cuyos tumores muestran **LOI**, la mucosa normal y leucocitos de la sangre también muestran **LOI**, será el **LOI** un fenómeno vasto en el cuerpo.

8.18 Deficiencia de “repair mismatch”

Recientemente dos relatos describieron ejemplos de personas que eran “*homocigotos*” para una mutación del gen “*mismatch repair*”. En cada caso, los niños de parientes consanguíneos (África del Norte y Turquía respectivamente) eran homocigóticos para las mutaciones **MLH1** “*germline*”; en la secuencia de este hecho, todos los cuadros familiares eran heterocigotos para una mutación **HNPCC**. Cuatro de cinco niños homocigotos para estas mutaciones tuvieron neurofibromatosis tipo I que no era conocida haber ocurrido en otros miembros de estas familias. Además, en una de las familias, un niño homocigoto falleció a los 2 años de edad con un hinfoma no-Hodgkin y otro tubo leucemia mieloide aguda con la edad de 6 años, seguida por meduloblastoma con la edad de 7 años (**143**). En la otra familia, un niño cuyo estatus mutacional no pudo ser confirmado falleció con 2 años de edad, debido a leucemia aguda; un niño desarrolló linfoma non-hodgkin, con tres años de edad, y un tercer niño desarrolló una leucemia mieloide crónica atípica con un año de edad (**144**). Estos relatos, aunque breves, han dado alguna información clínica y datos moleculares. Sin embargo, los fenotipos de los cuatro niños afectados en los cuales la homocigocidad para la mutación ha sido probada, eran totalmente concordantes tanto para la neurofibromatosis como para el apareamiento precoz de malignidad hematológica.

Sus tejidos eran, aún, deficientes en “*mismatch repair*”, como ha sido señalado por demostración de **MSI** en las células de una mucosa bucal de uno de los sujetos. Un ejemplo previo de un sujeto con deficiencia de “*mismatch repair*” constitucional por causa de heterocigocidad compuesta de dos mutaciones diferentes **MLH1** “*missense*” ha sido descrito (**145**). Esta paciente desarrolló cáncer de

mama en la edad de los 35 años y no ha sido referido tener neurofibromatosis, o malignidad hematológica.

Los pacientes pediátricos con homocigotos para las mutaciones *MLH1* no han sido posible ser estudiados con gran detalle; por ejemplo, el análisis de la mutación del gen *NFI* no ha sido hecha, ni fueron hechos estudios moleculares de las células hematológicas afectadas referidas (143,144).

Sin embargo, estos datos muestran que el desarrollo humano normal es posible en la presencia de “mismatch repair” deficiente en cada célula del cigoto. Esto es consistente con los hallazgos en ratones transgénicos con homocigotos para la deficiencia de *MSH2*, o *MLH1*. (121). Sin embargo, mientras tales ratones desarrollan linfoma, tanto en la edad precoz, como en la edad tardía, las malignidades hematológicas no han sido referidas en elevada proporción en los animales jóvenes sacrificados, ni se encontró neurofibromatosis. Claramente, los cuadros fenotípicos evidenciados por estos niños sugieren que la deficiencia de “mismatch repair” lleva a mutaciones en *NFI*, así como genes no identificados predisponibles para el linfoma y leucemia. El paciente descrito por Hackman y col. (145) que era homocigoto para diferentes mutaciones missense de *MLH1* tenía un fenotipo mucho más suave; esta explicación es hecha asumiendo que por lo menos una de las mutaciones ha permitido la actividad residual de MMR.

8.19 Genes baja penetración y mutación I1370K del gen APC

Un artículo de Laken y col. (146) es un ejemplo de una mutación de baja penetrancia dentro del gen *APC*. Estos autores estudiaron inicialmente un hombre judío Ashkenazi, paciente con 39 años de edad que manifestaba ocho pólipos adenomatosos de colon y tenía una historia familiar de CRC. A través de un análisis para la estabilidad de los microsatélites en sus tumores, ha sido excluido el diagnóstico de HNPCC.

Ha sido identificado un polipéptido APC “truncated” a través de un ensayo in vitro (IVSP – “in vitro synthesised protein”) seguido de la transcripción y translación de productos de PCR (“polymerase chain reaction”), abarcando los codons 1099-1693. Sorprendentemente, la “secuenciación” (“sequencing”) de la región relevante de *APC* mostró una ausencia de mutaciones truncadas típicas de FAP. En vez de eso,

se identificó una transversión del nucleótido 3920 **T** para **A** con la mutación mostrando una sustitución de lisina por isoleucina en el codon 1370 (**I1307K**).

La proteína “*truncation*” ha sido verificada como un fenómeno in vitro causado por transversión **A** para **T**, resultando en un tracto hipermutable. Esta mutación no ha sido identificada en cualquiera de los 243 non-Ashkenazim que han sido examinados. En contraste, 6,1% de los 766 pacientes **CRC** judíos Ashkenazi evidenciaron tener una mutación; la diferencia entre estas proporciones era significativamente elevada (**146**).

Para determinar si la mutación **I1307K** estaba asociada con **CRC** en los judíos Ashkenazi, Laken y col. (**146**) examinaron 211 pacientes Ashkenazim afectados con **CRC** y verificaron que 10,4% de ellos tenían la mutación **I1307K**. Esto fue una proporción significativamente mayor de lo que se ha visto en los Ashkenazim sin **CRC**. Además, la prevalencia de las mutaciones **I1307K** era más elevada en pacientes debajo de los 66 años que aquéllos por arriba de los 66 años de edad (**146**). Laken y col. (**146**) también observaron la mutación más frecuentemente (28%) en los Ashkenazim con **CRC** y un familiar de 1°, o 2° grado con **CRC**, o pólipos adenomatosos, o ambos, cuando eran comparados con los Ashkenazim con **CRC** y una historia familiar negativa o desconocida. Ellos superficialmente estimaron que transportando esta mutación resultaba en una duplicación del riesgo de **CRC**, arriba del tiempo de vida del paciente, y calcularon también que la incidencia de **CRC** en la población general Ashkenazi es de cerca de 9-15% (**147-149**), por lo que ellos han sugerido que el riesgo de vida de **CRC** en las personas con **I1307K** es probable que esté en la amplitud de los 18-30%.

Los autores sugieren que el riesgo puede ser más elevado para aquellos con la mutación y una historia familiar de **CRC**.

La descripción del cambio de **I1307K** del **APC** y su efecto atribuido de causar una predisposición suave para el cáncer, originó un interés generalizado. Esto es porque si existía una predisposición, ésta continuaría uno de los primeros ejemplos de cambio genético definitivo de baja penetración en la predisposición del cáncer humano. Hay cuestiones que están aún por esclarecer: **1)** ¿El cambio de **I1307K** está apenas confinado a los judíos Ashkenazi; **2)** ¿Puede el estudio de su papel en la predisposición para **CRC** ser confirmado y predisponer para otros cánceres?; **3)** ¿Cuáles son los mecanismos que ocurren para el apareamiento de la predisposición?; **4)** ¿Las determinaciones de **I1307K** tienen alguna relevancia en la práctica clínica?; **5)** ¿Puede la existencia de genes con baja o

elevada predisposición contribuir para las diferencias en la incidencia de cáncer entre las poblaciones?; y
6) Existen otros polimorfismos similares? Hay por lo menos dos revisiones que abordan algunas de estas cuestiones. (150,151).

Parece que *I1307K* ha sido visto casi exclusivamente en los judíos Ashkenazi. Ha sido investigado en 392 noruegos no-judíos (152), 148 finlandeses, 105 americanos-africanos, 54 hawaianos-japoneses y 38 italianos (153), en los cuales no ha sido encontrada. En Israel, ocurrió en 20 de 261 (7,7%) de judíos con antecedentes de Ashkenazi (154), confirmando la aproximación de su frecuencia en esta población. En los judíos-israelí non-Ashkenazi, la variante (como se esperaba) era de baja frecuencia, 3 en 339 (1,3%). Entonces, el polimorfismo *I1307K* constituye el requisito de un polimorfismo que es raro en el mundo pero común en una población “founder”. Si su “enrichment” en judíos Ashkenazi es por causa del efecto “founder” seguido de acaso (“*drift*”) genético (como esta asumido para muchos genes enfermos en poblaciones “founder”) (155), o se puede transportar una ventaja selectiva, esto permanece por ser indeterminado. Conclusiones firmes son, usualmente, mui difíciles de conseguir.

, El cambio de *I1370K* ha sido juzgado en un estudio por no estar asociado con **CRC** en familiares de Ashkenazi, que fueron estudiados porque ellos muestran agregación familiar de cáncer de mama y ovario (156). Los autores tuvieron la tentación de concluir que no ocurría una predisposición directa y sugerir un papel de deficiencia de “mismatch repair”. En un estudio en familias de cánceres de ovario, se obtuvo una conclusión similar. (157)

Sin embargo, ni el poder estadístico, ni la selección de las poblaciones de estudio pueden haber sido adecuados para detectar un efecto de predisposición de *I1307K*. En contraste, un efecto ha sido notado por Gryfe y col. (158) y Rozen y col. (154) cuyos datos permiten la confirmación de interpretaciones del artículo inicial (146).

De acuerdo con eso, los portadores de *I1307K* parecen tener un riesgo de aproximadamente de 1,5 a 2 veces más de **CRC** relativamente a los no-portadores (154, 159). Curiosamente, en el estudio de Gryfe y col. (160) se ha verificado que el *I1307K* contribuye para numerosos y aumentados pólipos adenomatosos de colon-recto y de cánceres por paciente. Resultados similares han sido obtenidos por Frayling y col. (161). Si sí o no el *I1307K* predispone para otros cánceres, por ejemplo, cáncer de mama, no está ainda claro (162), pero ha sido sugerido tener una asociación directa con varios cánceres.

Laken y col. (146) mostraron un efecto molecular directo de *I1307K* en el que dentro de 23 tumores de pacientes con *I1307K* y **CRC**, 11 tenían una mutación “*truncating*” en **APC**. Las mutaciones ocurrieron en la cercanía de la secuencia inmediata (29 bases) del codon 1307 y en cada caso era en el mismo cromosoma como el cambio de *I1307K*. Esto dio una evidencia provocativa a favor de un efecto directo en, “*cis*” y fue razonable especular que la creación de un trato $(A)_8$ en vez de $(A)_3 T (A)_4$ podía predisponer para mutaciones inserción-delección a través de “*slippage*” en la replicación de DNA. Prior y col. (153) mostraron un soporte indirecto para esta interpretación, al secuenciar en la región del codon 1307 en el DNA de tumor **CRC** esporádico de sujetos sin *I1307K* y verificaron que el tipo y localización diferían de las referidas en los portadores *I1307K*.

Más aún, no ha sido posible mostrar ninguna asociación con deficiencia “mismatch repair” en que solamente un único, dentro de 22 tumores, en portadores de *I1307K*, mostró deficiencia de **MMR**. (153). Entonces, la presente evidencia favorece la hipótesis de que el *I1307* predispone para **CRC**, haciendo la región cercana del codon 1307 vulnerable a inserciones y deleciones de una base singular, que a su vez lleva a la “*truncation*” de **APC**, el propuesto “*gatekeeper*” de la carcinogénesis colorectal. Una visión más profunda en la estructura cromatínica es fundamental para la comprensión de la cancerigénesis.

Probablemente, sería muy prematuro evaluar si la presencia o ausencia de *I1307K* puede ser usada para propósitos de asesoramiento. Si el riesgo de vida de los judíos Ashkenazi para adquirir **CRC** es del 12%, y si se convence que la presencia de *I1307K* aumenta el riesgo hasta 24% ¿Tiene esto relevancia clínica?

Si muchos, portadores de *I1307K* tienen familiares de primer o segundo grado con **CRC** el riesgo *a priori* de tales sujetos ya es elevado (arriba de 12%). Como influencia, la presencia o ausencia de *I1307K* del riesgo de una persona permanece por determinar. Más aún, ¿cómo es posible que los cambios en el riesgo estadístico, relativamente menores, tienen un impacto sobre tales cosas cuando el comportamiento de vigilancia no es claro? Una cuestión intrigante es si sí o no las diferencias entre poblaciones en la incidencia de la predisposición de polimorfismos (genes de penetrancia baja) pueden explicar diferencias en la incidencia de la enfermedad. Por ejemplo, ¿Puede el *I1307K* contribuir para la elevada incidencia de **CRC** (9-15%) de riesgo de vida en los judíos Ashkenazi? (146). También es relevante preguntar si mutaciones “founder” con penetración altamente enriquecida, tal como la gran delección genómica del exon 16 **MLH1** en los finlandeses, o la mutación 943+3A - T en **MSH2**, en la

Tierra Nueva (114) llevaron a una elevada incidencia de CRC en estas poblaciones. Asumiendo que el **HNPCC** cuenta con cerca del 3% de todos los CRC, un modesto “*enrichment*” (por ejemplo, 30%) de una mutación **HNPCC** en una dada población debe tener un efecto dirigible en la incidencia global de CRC (30% de 3%=0,9% de aumento).

En contraste, si mutaciones génicas de baja penetración, tales como **I1307K** son comunes en una población (por ejemplo 7%) y aumentan el riesgo de CRC dos veces, el aumento global causado por este cambio sólo podía ser calculado en 7%. Usando los datos actuales de un estudio retrospectivo de pacientes judíos con carcinomas colorectales, o adenomas, Grufe y col. (160) concluyeron que **I1307K** contribuye directamente para el 3-4% de todos los CRC en esta población.

En un estudio retrospectivo de DNA “germline” de 164 pacientes con adenomas/carcinomas colorectales múltiples, Frayling y col. (161) detectaron un cambio de G para A que afecta el codon 1317 previendo la substitución de glutamina en vez de ácido glutámico en esta posición (E1317Q). Este cambio ha sido visto previamente en una familia británica (164) con cáncer del colon, pero no “cosegregate” completamente con **CRC** en aquella familia. El cambio de E1317Q ha sido procurado y no ha sido encontrado en 213 sujetos controles británicos.

8.20 El HNPCC en la investigación clínica

No es apropiado discutir el cáncer colorectal sin discutir sus aspectos genéticos y biomoleculares y sin discutir los síndromes hereditarios específicos, así como sus inherencias dado los aspectos fenotípicos, genéticos y toda la heterogeneidad relacionada. Con este conocimiento emergente reciente, los médicos se sienten comprometidos a obtener no solamente una historia familiar detallada imprescindible, sino a cómo intentar comprender cuáles son los pasos esenciales para su orientación de vigilancia de los familiares del paciente, como elemento complementario de su acción clínico-terapéutica.

Esta orientación está en conformidad con el bienestar de la población, pero también tendrá que encontrarse con una nueva vertiente de la mala práctica médica y su correspondiente responsabilidad por actos de omisión diagnóstica, relativamente a los familiares de los pacientes que puedan tener un árbol genealógico de incidencia heredofamiliar.

Hay que reconocer, cada vez más, la necesidad de criar una política sanitaria epidemiológica que tiene en parte que encararse con los síndromes de cáncer hereditario, tal como en ciertos países, como Estados

Unidos, que lo tienen ya planteado como una prioridad relativa a orientaciones globales de la investigación con dos biomarcadores, y los estudios de epidemiología de estas cuestiones de genética y comprensión de la maquinaria biomolecular correspondiente.

Finalmente, pensamos que con ésta actitud seremos capaces fervientemente de disminuir de forma drástica la morbilidad y la mortalidad del **CRC**, transmitiendo a las comunidades científicas/médicas y a la población en general, las potencialidades del conocimiento sobre las cuestiones genéticas del **CRC** y sus correspondientes interpretaciones biomoleculares, y así, continuar una actuación concertada para trabajar antes que el fenotipo de **CRC** se manifieste.

CAPÍTULO IX

9. QUIMIOPREVENCIÓN DEL CÁNCER COLORECTAL.

9.1 Introducción

La quimiopreención del cáncer es el estudio/científico de la intervención con agentes de naturaleza farmacéutica, vitaminas, minerales y otros químicos, para reducir la incidencia de cáncer (6).

El ácido acetilsalicílico (Aspirina) ostenta una gloria sin precedentes en la historia de los anales de la medicina.

Las propiedades medicinales de los salicitatos, tal como el ácido salicílico, han sido reconocidas por las culturas de los Asirios y los Egipcios. A través de los siglos siguientes, el desarrollo de la aspirina ha sido influenciado por eminentes figuras históricas, tales como el padre de la medicina Hipócrates, Napoleón, científicos líderes y prominentes clérigos (1). Aún, en 1793 el Reverendo Edmund Stone de Chipping Norton in Oxfordshire, en el Reino Unido, escribió al President de la Royal Society para describir el tratamiento de pacientes con cición (fiebre intermitente) usando polvo de la cáscara del árbol del sauce que contiene ácido salicílico. En el último siglo se han observado los más significativos desarrollos de la aspirina. En 1897 el químico Félix Hoffman ha formulado una forma pura y estable de acido acetílico. Hoffman estaba trabajando en un laboratorio que era propiedad de Friedrich Bayer, en Elberfield, Alemania. Hoffman y Bayer llamaron a la nueva preparación aspirina y patentaron el producto, que apareció en el mercado en 1899.

Hoy, la aspirina es una marca protegida de la empresa Bayer en más de 70 países. El desarrollo y marketing de la aspirina por la Bayer en 1899 ha sido un marco significativo en la historia de la medicina. Otros productos con propiedades medicinales similares a la aspirina fueron subsecuentemente desarrollados y colectivamente estos son conocidos con drogas anti-inflamatorias non-esteroides (NSAID en la literatura de lengua inglesa). Los NSAIDs, tales como aspirina, indometacina, piroxicam y sulindac son drogas valiosas para alivio del dolor, inflamación y fiebre.

Los NSAIDs son extensivamente usados en el tratamiento de las enfermedades musculoesqueléticas inflamatorias, tales como la artritis. De todos los NSAIDs, la aspirina es lo más extensamente usado, porque es lo más barato, fácilmente disponible y está indicada en muchas condiciones comunes, tales como cefaleas y resfriado común. La aspirina tiene también una indicación muy importante dentro de la familia de los NSAIDs en que puede reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular en pacientes con enfermedad cardiovascular pre-existente. Dosis bajas (100-300mg/día) pueden reducir el riesgo de infarto del miocardio y de trombosis cerebral en pacientes que ya tienen una historia de estas perturbaciones. En estos pacientes, la aspirina reduce el riesgo de subsecuentes eventos cardiovasculares en cerca del 30%. Dosis más bajas, entre 75 y 150mg. por día también muestran promisorios resultados en la reducción del riesgo de enfermedad cardiovascular (2) en pacientes con enfermedad cardiovascular pre-existente. A pesar de esto, la potencial función de la aspirina en la prevención primaria de la enfermedad cardiovascular permanece por esclarecer de modo inequívoco (3).

No obstante los beneficios ya mencionados, aún la aspirina y otros NSAIDs también tienen efectos colaterales tóxicos. La aspirina puede causar irritación, ulceración y hemorragia del estómago y otros órganos del tracto gastrointestinal. La aspirina puede reducir la función renal, inducir bronco constricción en los asmáticos y en raros casos, puede precipitar hemorragia cerebral. Hay también una ligación de controversia entre la aspirina y el síndrome de reye en los niños.

Las propiedades terapéuticas y tóxicas de la aspirina y otros NSAIDs pueden ser explicadas farmacológicamente. En 1971 (4) se descubrió que los NSAIDs inhiben el enzima ciclo-oxigenase y entonces previene la formación de prostaglandinas y tromboxanos a partir del precursor ácido araquidónico. El ácido araquidónico es un ácido graso esencial poli-insaturado que es derivado de la dieta. Piénsese que los efectos analgésicos, anti-inflamatorios y antipiréticos de la aspirina están relacionados con la inhibición de las prostaglandinas.

La prevención de la enfermedad cardiovascular se piensa que está relacionada con la inhibición del tromboxano en las plaquetas, lo que implica un riesgo reducido de la formación de coágulos sanguíneos peligrosos en el corazón y los vasos sanguíneos.

La enzima ciclo-oxigenase existe en dos formas (5): la **ciclo-oxigenase-1**, que produce prostaglandinas y tromboxano, que son importantes en muchos procesos fisiológicos, pero notablemente

en el estómago y riñón; y la **ciclo-oxigenase-2**, que no se expresa en los tejidos normales, pero su expresión está grandemente aumentada (más que 20 veces) en locales de inflamación **(5)**.

Se piensa que los efectos terapéuticos de los NSAIDs contra el dolor, inflamación y fiebre están abundantemente relacionados con la inhibición de la ciclo-oxigenase-2, mientras los efectos tóxicos de los NSAIDs en el estómago y riñón están muy relacionados con la inhibición de la ciclo-oxigenase-1

9.2 Quimiopreención del cáncer colorectal por la aspirina

Hay una buena evidencia que indica que el consumo regular de aspirina puede reducir el riesgo fatal de cáncer colorectal en un 50%. Mucho del trabajo inicial en este campo ha sido con NSAIDs, más que con la aspirina.

Los orígenes de esta hipótesis se pueden remontar al año de 1975, cuando Bennett y Del Tacca **(7)** verificaron qué cánceres humanos, incluyendo cánceres colorectales, producían más prostaglandinas E2 que en la mucosa cercana. Ellos admitirán la hipótesis que los tumores que producían prostaglandinas E2 en exceso podrían promover su propio crecimiento y/o diseminación. Esta hipótesis ganó soporte en una serie de experiencias en roedores. A partir de 1980 surgieron trabajos científicos experimentales, que, consistentemente y reproduciblemente, revelaron la capacidad de los NSAIDs, tales como la indometacina y el priroxican, inhibían pólipos adenomatosos precancerosos, químicamente inducidos, y carcinomas precoces del colon **(8,9)**. Después de 1983, se iniciaron estudios clínicos con sulindac en pacientes con poliposis adenomatosa familiar (FAP en la literatura inglesa) **(10)**. Esta condición está asociada con mutaciones en el gen/supresor de tumor “Adenomatous Polyposis Coli” (APC) y es caracterizada por el desarrollo de centenares de pólipos en la mucosa colorectal.

Kune y col. **(14)** han publicado, en 1988, uno de los estudios, usando el registro de tumores en Melbourne, Australia, refiriendo la existencia de 40% de riesgo más bajo en la tasa de incidencia de cáncer del colon dentro del número de individuos que habían usado aspirina, comparada con individuos que referían no haber usado aspirina.

En 1989 han sido referidos los resultados de estudios conjuntos de 13.987 pacientes viejos (arriba de los 73 años), viviendo en una casa de jubilados en California **(15-27)**. Las personas que habían utilizado aspirina diariamente durante más de un año tuvieron una incidencia del 50% más baja de cáncer de colon, comparada con personas que habían tomado aspirina menos que un mes.

Rosenberg y col. en 1991 **(18)**, han sido los primeros en conducir un experimento de caso hospitalario controlado, y se han referido a un riesgo de cerca del 50% más bajo de incidencia de cáncer colorectal entre individuos que tomaron regularmente aspirina, comparado con los que no tomaron. El uso de aspirina durante 10 años estaba asociado con una reducción del 70% en el riesgo de cáncer colorectal.

Thun y col. **(19-21)** publicaron los resultados del mayor estudio de la relación entre el uso de aspirina y cáncer colorectal, relativamente a 662.424 personas durante un periodo de estudio de 6 años. El uso de aspirina 16 o más veces por mes ha reducido el riesgo de cáncer del colon fatal en valores de 42% y para el cáncer rectal para valores de 34%. Comparados con los non-utilizadores de aspirina, las personas que han utilizado por 10 o más años tuvieron una reducción de 64% en el riesgo de tener cáncer del colon.

Los resultados de un estudio clínico randomizado entre varones médicos publicado en 1993 no ha demostrado un efecto protector de la aspirina en la reducción del riesgo de cáncer colorectal en la dosis de 325mg. en días alternados **(25)**. La intención de este estudio era evaluar los efectos de la aspirina en la prevención de la enfermedad cardiovascular y el beta-caroteno en la prevención del cáncer en 22.071 médicos de los Estados Unidos. Debido a una significativa elevada reducción (44%) en el riesgo de infarto del miocardio entre los médicos a tomar, la componente randomizado del estudio ha sido terminada después de un “follow-up de cinco años.

En 1995 ha sido publicado un estudio para evaluar la relación dosis/duración en mayor pormenor **(32)**, en el cual se ha 80.644 mujeres enfermeras Americanas, desde 1984 hasta 1992. Los datos sobre el uso regular de aspirina (definido como la toma de dos o más comprimidos por semana) han sido obtenidos por encuestas hechas en 1992. Después de veinte años de uso regular de aspirina se verificó que había una reducción significativa del riesgo (44%) de cáncer colorectal. Reeves y colaboradores, en 1996 publicaron un estudio controlado en el cual verificaron que con el uso de NSAIDs, exceptuando aspirina, había mayor protección contra el cáncer colorectal, comparados con la aspirina, y en donde

globalmente los medicamentos fueron tomados por lo menos dos veces por semana y durante por lo menos un año (35).

En 1997, el *International Agency for Research of Cancer* (IARC), con base en Lyon, France (41) publicó el resultado de una evaluación científica detallada sobre la eficacia quimiopreventiva del cáncer con aspirina, que ha considerado que la evidencia la fuerza científica conferida por la aspirina en el caso del cáncer colorectal en humanos aún era limitada. El IARC define “limitado” (41) como el siguiente: - *“Los datos sugieren un reducido riesgo de cáncer con el uso del agente, pero por ser limitados, para hacer una evaluación definitiva, sea por acaso, tendencia o confusión, no podían ser excluidos con razonable confianza, o porque los datos son restrictos a biomarcadores intermediarios de validez incierta en la vía putativa para el cáncer.”*

El grupo de trabajo del IARC evaluó 23 estudios (13-40). Kauppi y colaboradores (37) estudió la incidencia de cáncer colorectal en un estudio conjunto de 9.469 de pacientes con artritis reumatoide, en Finlandia. Comparó la incidencia esperada del cáncer colorectal en la población general con la incidencia en la población con la enfermedad artritis reumatoide y verificaron que los pacientes con artritis reumatoide tenían una incidencia 38% más baja de cáncer colorectal. Este hallazgo está soportado por estudios anteriores en pacientes con artritis reumatoide en Finlandia (13) y Suecia (23). Kauppi y colaboradores han concluido que el uso crónico de NSAIDs o aspirina, en dosis anti-inflamatorias es probablemente la explicación principal para la baja incidencia de cáncer colorectal en pacientes con artritis reumatoide. (37).

La relación entre el uso de aspirina y el riesgo de cáncer colorectal ha sido soportada por un estudio controlado italiano (38), utilizando 1357 casos y 1891 controles, en el cual la aspirina ha sido tomada 4 veces por semana durante por lo menos 6 meses, que mostró una reducción de riesgo del 30%. Aún, la fuerza global del estudio fue limitada, debido al número bajo de utilizadores regulares de aspirina. En otro estudio controlado publicado en 1998 (39), los resultados sobre la relación entre el uso de aspirina y la incidencia de pólipos adenomatosos esporádicos colorectales mostró 210 pacientes con pólipos adenomatosos y 169 sin pólipos adenomatosos.

Se hizo un ajustamiento relativamente a posibles casos de confusión y se verificó que los utilizadores regulares de aspirina (más que 15 veces por/mes, durante los cinco años previos) tenían un riesgo de 44% más bajo de pólipos adenomatosos, cuando eran comparados con non-utilizadores de aspirina. Así

se ha demostrado que la aspirina bloquea la secuencia adenoma/cáncer en un estadio precoz. Los autores de este trabajo llaman la atención de la necesidad de posteriores estudios, particularmente para establecer la dosis óptima y la duración o requerimiento para que la aspirina tenga efecto protector contra el cáncer colorectal.

Más recientemente, en otro estudio “post-trial follow-up” con datos del *Physician’s Health Study* (40), en el cual la aspirina, en un estudio randomizado, fue interrumpida en 1988, después de que los participantes escogieron recibir aspirina o placebo para el resto del estudio. De los participantes, 70% escogieron continuar tomando aspirina con beta-caroteno o placebo. No ha sido encontrada diferencia en el riesgo de cáncer colorectal entre los participantes que tomaran aspirina después de 1988 (pero que habían tomado anteriormente) y los participantes que comenzaron a tomar aspirina (regularmente) después de 1988 y no la tomaban antes de 1988.

Los autores atribuyen los resultados a un periodo corto con el régimen de la toma de dosis baja de aspirina. A pesar de esta explicación para una segura interpretación científica es necesaria una posterior evidencia científica para inequívocamente reconocer que la aspirina reduce el riesgo de cáncer colorectal.

9.3 Evidencia experimental de la quimioprevención del cáncer colorectal con la aspirina

En la primera mitad de los años 90 han sido realizados estudios de corta y larga duración (42-44 y 45-47) con aspirina en modelos experimentales de cáncer colorectal con roedores, que convincentemente evidenciaran una disminución de la incidencia de cánceres de colon y la multiplicidad de cánceres (el número de cánceres que se desarrollan en cada animal individual).

La hipótesis anterior de Bennett y del Tacca (7) de que los prostaglandinas pueden estar involucrados en el desarrollo del cáncer colorectal ha sido soportada por otros estudios, siendo confirmado que cánceres colorectales humanos (48) y cánceres colorectales experimentales (49) producen cantidades aumentadas de prostaglandinas E2.

La función precisa de la prostaglandina E2 en la carcinogenesis colorectal no es clara pero parece estar involucrada en los estados precoces del proceso. La concentración de prostaglandinas E2 está aumentada en tejidos de roedores pareciendo normales macroscópicamente, después de expuestos a agentes carcinogénicos (49), o en riesgo genético de cáncer colorectal (50) y en pólipos adenomatosos esporádicos, colorectales humanos (51). Hay una fuerte evidencia de que la ciclo-oxigenase-2 es el origen enzimática del exceso de producción de prostaglandina E2 colorectal, ya sea en los animales (52), o en los humanos (53,54). Ruffin y colaboradores (55) sugirieron que los niveles de prostaglandina E2 en la mucosa colorectal humana pueden ser importantes tanto como marcadores de carcinogenesis, como medidas farmacológicas de la actividad quimiopreventiva del cáncer con aspirina. En 65 personas saludables (hombres y mujeres), con 18 años de edad, o más, la cantidad de 81mg de aspirina (una cuarta parte del comprimido estándar en Estados Unidos) mostró ser la dosis más baja que podía reducir los niveles de prostaglandina E2 colorectal. En este sentido una dosis diaria de aspirina de 81mg ha sido la recomendada en estudios de quimiopreención con la aspirina, aunque esta cuestión de la dosis mínima efectiva de la aspirina contra el cáncer colorectal no esté completamente resuelta con seguridad.

Además de la prostaglandina E2 y la ciclo-oxigenase-2, mucha de la investigación en los mecanismos específicos de la acción quimiopreventiva de la aspirina ha sido centrada en cuatro áreas que se piensa están relacionadas con el desarrollo del cáncer colorectal (41). Estos mecanismos no deben ser considerados como ya probados, pero sí como cuatro hipótesis de trabajo para posteriores investigaciones:

A) INHIBICIÓN DE LA ACTIVACIÓN CARCINOGENICA Y PRODUCCIÓN

Las ciclo-oxigenase-1 y ciclo-oxigenase-2 pueden estar implicadas en la iniciación de la carcinogenesis en dos vías generales. Primero, es posible que las enzimas ciclo-oxigenase estén implicadas en la activación metabólica de la carcinogenios en el colon (56,57). Segundo, algunos productos de la degradación de las prostaglandinas, tales como malondialdeido? (MALONDIALDEHYDE), ejercen efectos mutagénicos y carcinogénicos en sis-experimentales (58). La aspirina podría entonces ejercer un efecto de inhibición de la activación carcinogénica y producción.

B) INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Dos estudios han indicado que tanto la aspirina **(59)**, como los salicilatos **(60)** pueden reducir la proliferación celular en líneas de células de cáncer colorectal. En los humanos, un estudio en personas con alto riesgo mostró que 80mg de aspirina eran suficientes para inhibir la proliferación de las células de la mucosa rectal. **(61)**. Son necesarios más estudios para validar estos hallazgos y evaluar la relevancia para el proceso carcinogénico.

C) MUERTE CELULAR PROGRAMADA

Científicamente, hay una evidencia conflictiva de que la aspirina induce a la muerte celular programada (apoptosis) en líneas de células de cáncer colorectal. Shiff y colaboradores **(59)** no han conseguido demostrar el efecto de la aspirina. En contraste, Elder y sus colaboradores **(60)** han demostrado, de modo convincente, usando salicilatos, una respuesta de apoptosis en función de la dosis.

Quizá la inducción de la apoptosis por los salicilatos. Los salicilatos – tal como bastamente son distribuidos en las plantas y los árboles – se acumulan en los sitios de infección y en ciertas condiciones, pueden inducir a una apoptosis en el orden de focalizar la enfermedad **(62)**.

D) IMUNOVIGILANCIA

En dos estudios con líneas de células de cáncer de colon se verificó la eficiencia del sistema inmune en reducir, reconocer y atacar las células de cáncer colorectal. Por el contrario, se esperaba que la aspirina aumentara una respuesta inmune al cáncer colorectal. A pesar de esta evidencia laboratorial y de una protección inmune teórica contra el cáncer colorectal en humanos **(65)** son necesarios estudios posteriores.

CAPÍTULO X

10. BASES MOLECULARES DE LOS TESTS DE DNA EN LAS HECES EN EL CRC

El **CRC** se desarrolla como el resultado de alteraciones en genes que regulan el crecimiento, la supervivencia y otros comportamientos celulares. Los cánceres colorectales se desarrollan a través de una de tres vías diferentes, denominadas (1) inestabilidad cromosómica, (2) inestabilidad microsatélite y (3) “*CpG island methylator phenotype*”.

Aunque haya un cierto grado de sobreposición, estas vías tienden a inactivar diferentes conjuntos de genes supresores del tumor y tienden a tener comportamientos biológicos algo diferentes. Las células tumorales y normales, con su DNA, son liberadas en el flujo fecal, y solamente los genes mutados pueden ser identificados, los cuales indican la presencia probable de un neoplasma en el tracto gastrointestinal. Comprendiendo las vías que llevan al desarrollo de un tumor, los “*target genes*” envueltos, y los mecanismos que están por de bajo de la inestabilidad genómica, será posible implementar estrategias para detectar y tratar los diferentes tipos de cáncer colorectal.

El **CRC** comanda la atención de los gastroenterólogos porque es una de las enfermedades más letales con que tienen de enfrentarse; ocurre frecuentemente (y silenciosamente). Por cerca de 30 años, desde al principio en que se intentó comprender la base científica de la enfermedad, el **CRC** era comprendido a nivel morfológico. En ese tiempo el CR era distinguido en sus formas en la base de los niveles aparentes de diferenciación, formación glandular, producción de mucina, etc, pero estas observaciones no daban gran perspicacia para la realidad clínica y por eso estos aspectos morfológicos poco contribuían para la comprensión de la base biológica del tumor.

Actualmente está reconocido que el cáncer colorectal es el resultado final de un grupo heterogenio de procesos que alteran las características biológicas del epitelio colorectal. Por ser conocidos estos procesos, pueden ser imaginados programas racionales de detección precoz, prevención y terapéutica.

Debe ser destacado que uno de los aspectos más importantes del **CRC** es que este no representa sólo un proceso singular de enfermedad, porque cuando se aborda el **CRC** en la perspectiva del diagnóstico precoz, en la base de la identificación de los genes alterados en las células liberadas en el flujo fecal, necesitamos tener en mente que al detectar un tipo u otro de **CRC**, las estrategias que ofrezcan flexibilidad en los ensayos aumentaran la sensibilidad y la optimización. Unidos hacia la comprensión de la carcinogénesis, podemos modificar nuestras estrategias para encontrarnos con nuestras necesidades de acción clínica.

10.1 Origen del cáncer humano

Todos los cánceres son causados por alteraciones genéticas. Aunque el cáncer sea una enfermedad genética, solo raramente (u ocasionalmente) es hereditaria. Las mutaciones adquiridas que ocurren fuera de la línea germinal, son llamadas “*mutaciones somáticas*”. Hay muchos tipos de mutaciones diferentes. Algunas son “*point mutation*” que convierten un nucleótido en otro en la secuencia del DNA. Esto puede ocurrir a través de la creación accidental de un “mismatch” (apareamiento) durante la replicación del DNA, a través de la degeneración espontánea de una purina, o puede ser inducida por un carcinógeno químico que forma un “*adduct*” con un nucleótido que induce un error durante la replicación, justamente para un ejemplo de algunos mecanismos. A veces hay mecanismos de “*insertion/deletion*”, (“*inserción/delección*”), en donde un nucleótido es borrado, o un nucleótido extra es introducido en una secuencia. Esto crea un cambio en la estructura de lectura “*tres-bases-por codón*” (“*three-base-pair-per-codon*”), y altera la codificación de cada aminoácido que ocurre “**downstream**” **de una mutación**. Los cambios de los marcos usualmente llevan al apareamiento de un codon stop prematuro, que “*truncate*” la extensión completa de la proteína codificada por un gen.

Las mutaciones “*insertion/deletion*!” son posibles de ocurrir en secuencias repetitivas, tales como “*tracts de poliadenina*” (A_n), o secuencias de dinucleótidos repetidas tales como (CA)_n, ambas las cuales son comunes en nuestro genoma.

Las mutaciones encontradas en cánceres ocurren a nivel cromosómico pueden incluir rearrreglos (“*rearrangements*”) (i.e. *translocaciones*), deletions (que acostumbran ser llamados eventos de pérdida de heterocigocidad, o LOH), duplicaciones y amplificaciones.

Las mutaciones generalmente ocurren aleatoriamente, con ciertos tipos más comunes en tipos específicos de secuencias genéticas. Como se ha mencionado, las secuencias repetitivas son propensas para mutaciones de “*insertion/deletion*” y los rearrreglos cromosómicos frecuentemente ocurren en sitios complementarios que permiten el cambio (o *deletion*) de grandes partes de material genético. Cada alteración crea una alteración de la secuencia genética inicial, que puede, o no, ser de cualquier significado biológico. Ocasionalmente una mutación ocurre cuando puede trazar el destino de la progenia de una célula.

En condiciones experimentales, ha sido referido que tres alteraciones genéticas pueden transformar una célula normal en célula neoplasia (1). Sin embargo, esto ha sido ejecutado en un modelo *in vitro*, y una de las mutaciones (inserción de un gen antigénico T [*T antigen gene*]), puede haber proporcionado los medios para deshabilitación genómica y la aparición de mutaciones adicionales. No obstante, el número de mutaciones esencial para el comportamiento neoplásico puede ser relativamente pequeño, quizá cinco o diez en tumores humanos. Sin embargo, una variedad de técnicas del cáncer de colon contienen un gran número de mutaciones. En 1989, Vogelstein y col. han demostrado que aproximadamente 20% de todos los pares de brazos de cromosomas documentados en el DNA del colon normal mostraban una pérdida de uno de los brazos (LOH) en el DNA tumoral (2). Ionov y col. (3) calcularon que quizá había cerca de 100.000 mutaciones microsatélites en tumores individuales con inestabilidad microsatélite.

Muchos tumores son caracterizados por un gran número de una clase de alteraciones que pueden ser consideradas “*signature mutations*”, que es uno de los principales métodos de la clasificación ocurrente de cánceres del colon. Las mutaciones son “*targeted*” para tipos específicos de secuencias de DNA, en lugar de ciertos genes. Como resultado, el DNA de los cánceres colorectales contienen un enorme número de mutaciones, solamente algunas de las cuales están envueltas en la carcinogen multiescalón (“*multistep*”).

Aunque esta cuestión no pueda ser respondida, sin duda en este momento, es razonable adivinar que solamente pocas de una multitud de mutaciones encontradas en un tumor contribuyen para la tumorigénesis (4). Las mutaciones ocurren aleatoriamente, pero aquellas que proporcionan una ventaja en crecimiento llevarán a una expansión clonal de aquella “*lineage*”. Otras mutaciones ocurrirán que son perjudiciales para la célula, tales como la pérdida de genes que codifican enzimas críticas, o proteínas estructurales. Estas células morirán (mediante colapso clonal), y esas mutaciones no serán

encontradas cuando el DNA tumoral es analizado. Sin embargo, una gran proporción de mutaciones y otras alteraciones ni acrecientan, ni quitan supervivencia a la célula y se expandirán como “*pasajeras*” (“*pasengers*”), y serán encontradas como parte de la familia de mutaciones que constituyen la firma en la célula tumoral.

10.2 El rigor de la replicación del DNA humano

Una vez que un organismo se ha adaptado a su propio medio ambiente, y suponiendo que éste no cambiará jamás, será ventajoso para el organismo proteger sus planos arquitecturales (i.e., el genoma) de cualquier cambio. El DNA humano está bien protegido de la degradación y cambio por una variedad de sistemas enzimáticos de reparación del DNA, incluyendo “*proofreading*” (**actividad correctora de errores**) “*subunit*” (preparación por escisión de bases o por escisión de nucleótidos) de la polimerase del DNA, reparación de errores de no apareamiento de DNA (*MMR o reparación de errores de no apareamiento*), “*base excision repair*”, y “*nucleotide excision repair*”.

Pueden existir mecanismos programados en nuestro genoma que periódicamente permiten la generación de errores de replicación, pero esto ocurre de un modo auto-limitado (5).

Un grupo crítico de proteínas impide que las células se dividan cuando el DNA está dañado, y estas las proteínas del ciclo celular que regulan los “*puntos de control*” G_1/S y G_2/M .

De la misma forma una doble hebra de DNA *rota* puede impedir el movimiento de G_1 en la fase S ; o el daño de ser reparado, o de la célula entrar en la apoptosis (muerte celular programada). Se puede aumentar grandemente el número de mutaciones, sea aumentando la exposición a mutagenios (eg, ingestión o inhalación de carcinógenos químicos, exposición a la luz ultravioleta, etc.), o por remoción de los sistemas envueltos en la defensa de la integridad genómica. Se puede usar la piel como un ejemplo del aumento del número de tumores, ya sea por el aumento de la exposición de a luz ultravioleta, o bien por la pérdida de la reparación por excisión de nucleótido, en la fase, por exposición de la luz del sol ordinario, como acontece en la xerodermo pigmentosa.

10.3 Inestabilidad genómica en el CRC

La inestabilidad genómica se refiere a una perturbación en la replicación del genoma, en que un número excesivo de alteraciones genómicas son creados y tolerados. La inestabilidad genómica parece ser un cuadro de todos los cánceres colorectales y puede ser esencial para cualquier cáncer a desarrollarse. El concepto de hipermutabilidad ha sido propuesto en cerca de 30 años (6), pero ha sido demostrado más dramáticamente en el cáncer colorectal. El aspecto más importante es que hay distintas formas de inestabilidad genómica, y para cada una la clase de “*target genes*” difiere, así como las estrategias para detectar y tratar estos tumores.

Recientemente, han sido encontradas tres formas de inestabilidad genómica en el CRC. Hay un cierto grado de sobreposición entre estas formas de inestabilidad genómica y puede existir más que una vía de tumorigénesis en el mismo tumor. Presumiblemente, la presencia de hipermutabilidad debida a un mecanismo puede permitir la emergencia de una segunda vía (a través de mutación) mientras el tumor progresa.

No obstante, predomina un tipo de inestabilidad genómica, y en muchos casos, esto determinará muchos de los aspectos fenotípicos del tumor. (7,8).

10.4 Inestabilidad cromosómica y vía supresora

En 1988, Vogelstein y col. (9) ejecutaron una serie de análisis genéticos en 56 cánceres colorectales y encontraron (“*point mutations*”) en algunos genes pérdidas completas de otros genes, o más rigurosamente, alelos. Las (“*point mutations*”) en el oncogen *K-ras* podían ser explicadas por carcinogenesis “química” típica, pero la pérdida de más del 20% de alelos probados indicaba que había un proceso evidente que permitía a las células replicarse en de una forma caótica sin estar de acuerdo con el número de 46 cromosomas. Analizando el “alelotipo” del cáncer de colon (i.e. la pérdida alélica media en cada locus? en la población de tumores), los autores presuponieron que ciertas localizaciones cromosómicas contenían genes supresores de tumores que eran críticos para el desarrollo del cáncer colorectal. Esos autores verificaron que existían excesivas pérdidas en los brazos de los cromosomas 17p, 18q y 5q. También, analizando un conjunto de lesiones del colon, de pequeños adenomas a carcinomas, ellos fueron capaces de proponer la secuencia de eventos que era el primer modelo coherente “*multistep*” de desarrollo del tumor de colon. (10). La primera conclusión en este modelo era que había una acumulación de pérdidas alélicas (eventos LOH), que acompañaban, y presumiblemente

causaban, la evolución del tumor. Los adenomas más pequeños tenían **LOH** en el cromosoma **5q** pero no en los 17p y 18q. Estos cambios ocurrían más tarde (**9, 11**).

El cromosoma **5q** fue subsecuentemente encontrado ser el sitio del gen **APC**, y el **17p** la sede del gen **p53**. Tanto el **APC**, como el **p53** son genes supresores de tumores y requieren dos eventos mutacionales para completar su inactivación. En muchas circunstancias, un alelo fue inactivado por una (“*point mutation*”), que podía ser atribuible a una variedad de los mecanismos arriba descritos.

Los mecanismos que cuentan para las “*allelic deletions*” no han sido bien explicados, aunque haya evidencia en la literatura que apunta hacia un virus transformador comúnmente presente en el colon humano como estando presente en muchos cánceres de colon (**12**) que puede ser encontrado en el tracto gastrointestinal de muchos adultos (y todos los pacientes que tienen adenomas, o cánceres). (**13**).

Los cánceres colorectales en esta vía son propensos a tener inestabilidad cromosómica (**CIN**) (**14**), y son típicamente aneuploides, siendo que el grado de **CIN** esta con un destino final más letal. (**15**). Los “*targets*” de esta vía son los genes supresores de tumor **APC** (el “*gatekeeper*” de las neoplasias colorectales) y **p53** (el gene del adenoma-carcinoma). Ciertamente que hay más “*targets*” genéticos para **CIN**., como hay loci adicionales con grados prominentes de **LOH** pérdida de heterocigocidad. La poliposis adenomatosa familiar ocurre cuando hay una mutación “*germline*” en el gen **APC** (dando a cada célula en el colon, una de las dos requería pérdidas en este locus), y la enfermedad progresa a través de la vía de la **CIN**. La vía **CIN** transporta una asunción subyacente que es derivada de la necesidad para inactivar tanto los alelos de los genes supresores de tumores **APC**, como el **p53**.

Una observación común (pero no unánime) es que el DNA tumoral tiene solamente una copia de estos genes, y que esa copia tiene una mutación inactivadora en ella. Las mutaciones en **APC** son casi exclusivamente las que crían “*stop codons*” (i.e. los que terminan la “*translation*” y dan origen a una proteína “*truncated*”, no funcional. Estas mutaciones tienden a ocurrir en una región de “*cluster*” de mutación, que se sitúa en la zona media del gen.

El gen **APC** es muy grande, y el “*clustering*” de muchas mutaciones de cierto modo facilita el diagnóstico y su abordaje, porque es estrecha la zona en que es necesario buscar mutaciones. El gen **p53** es mucho más pequeño que el **APC** y las mutaciones en **p53** tienden a ocurrir en los exons 5-9 del gen.

Estas mutaciones son casi siempre mutaciones (“*missence*”) (i.e., éstas alteran la secuencia del código del gen e interfieren con la función de la proteína). Además, la proteína es frecuentemente más estable como consecuencia de la mutación. Por fin, los neoplasmas en el colon en la vía de la **CIN** tienden a ser expansiones clonales de células que transportan una copia mutante única de *APC* y *p53* y ulteriormente las mutaciones tienden a ocurrir porciones previsibles de las secuencias del código. Estas observaciones llevaron al desarrollo de estrategias para detectar cánceres a partir del DNA liberado en las heces.

10.5 Inestabilidad microsatélite y “fenotipo mutante”

En 1993, una forma de inestabilidad genómica que produce millares de mutaciones en secuencias repetitivas de DNA ha sido encontrada en cerca de 12%-15% de cánceres colorectales (DNA/MB-A-**(3,16,17)** ligados al cáncer colorectal non-poliposis hereditario (**HNPCC** – “hereditary nonpoliposis colorectal cancer”), **(17)** y últimamente a la pérdida del sistema **MMR** del **DNA (18,19)**. Estos tumores finalmente se desarrollan a través de la pérdida de genes supresores de tumores; sin embargo, en estas circunstancias, los genes son inactivados por mutación, particularmente en las secuencias conteniendo 6-10 nucleótidos repetidos en una región de codificación. Evidentemente, para ser un (“*target gene*”) en esta vía, el gen necesitaría codificar una proteína crítica que controla algún aspecto del comportamiento celular y también ser susceptible de mutación en la ausencia de actividad **MMR** del DNA. Genes tales como este incluyen el *TGFBI-receptor II* (que tienen un A₁₀ crítico en una región de codificación que es típicamente mutada para A₉ en el tejido canceroso), *IGF2 receptor*. (con una secuencia G₈ colocada críticamente, el gen *Bax* (envuelto en la apoptosis), dos de los genes **MMR** del **DNA** minor (*hMSH6* y *hHMSH3*), *TCF4*, ciertas capases **WISP-3**, **MBD4**, y otros genes.

También, algunos genes son mutados en secuencias obviamente menos sensitivas a la pérdida del sistema **MMR** del DNA, pero críticamente envueltos en la regulación del crecimiento y de la supervivencia celular, y estos genes son frecuentemente mutados en los tumores con inestabilidad microsatélite (**MSI**).

Un ejemplo particularmente importante, es el gen *APC*, que es inactivado por mutación de un alelo y pérdida de otro en la vía **CIN**, subrayando los diversos métodos de inactivación de este gen esencial. El gen *APC* es expresado en una célula para limitar la expresión de la B-catenina, una proteína que activa o transactiva los genes que son necesarios para la proliferación celular el colon. Curiosamente, las mutaciones en el gen B-catenina son a veces encontradas en los tumores colónicos con copias normales

(i.e., “Wild-type” *APC* genes). En estas circunstancias, las mutaciones en B-catenina previenen su degradación por interacción con *APC* dando estas diferentes mutaciones en la misma vía de señal un resultado idéntico, que es la proliferación desregulada.

La secuencia exacta de eventos en la vía **MSI** no es conocida aunque ésta parezca que la pérdida del gen *TGFBI-receptorII* ocurre relativamente tarde, quizá en la interfase adenoma-carcinoma, la vía de pérdida del alelo *p53* salvaje ocurre en tumores **CIN**. Mientras esto ocurre, muchas de las secuencias poli-A (algunas de las cuales son llamadas “**BAT**” por “**big adenine tract**”) y secuencias de “*repetición dinucleotido*” (tales como las “*CA-repeats*”) están presentes en elevados números a través del genoma, y en algunos tumores, más de la mitad de estas están mutadas. Entonces, al encontrar aleatoriamente mutaciones las secuencias seleccionadas **BAT** o “*CA-repeat*” sirven como un sustituto útil para el **MSI**, y no es necesario encontrar los genes diana mutados para concluir que este proceso que está en curso (20). Esto ha proporcionado un medio de diagnosticar la presencia de **MSI** en un tumor, y el descubrimiento de estas secuencias puede ser encontrado en las heces de pacientes con estos tipos de tumores.

10.6 Fenotipo metilador de las ilas CpG y vía metiladora

Algunos tumores colorectales no tienen ni **CIN** ni **MSI**, llevando a creer que puede existir aún otra forma de inestabilidad genómica.

Con el tiempo, decorriendo sobre la apreciación de nuevos detalles sobre el **MSI** de los tumores colorectales, fue reconocido que los genes (incluyendo los genes supresores de tumores, obviamente) podían ser silenciados o inactivados por hipermetilación de islas de **CpG** en los promotores de los genes. Las islas **CpG** son “*clusters*” de residuos de **CYTOSINA-guanosina** en la secuencia del DNA, y son destacadamente representadas en los promotores de cerca de mitad de los genes en nuestro genoma (y también destacadamente ausente en otros puntos). Las mujeres tienen dos cromosomas **X** pero solamente usan los genes en uno de ellos; todos los genes en el otro **X** están silenciados por metilación. En algunos cánceres, los genes supresores de tumores son hipermetilados, lo que es tan efectivo en la inactivación de ellos, como mutación o delección a través de **LOH**. Curiosamente, los genes pueden ser re-expresados por inhibición de la enzima responsable por la manutención de la metilación de la isla **CpG** (islas de metilación CpG) (i.e. desmetilación del promotor).

En 1999, Toyota y col. (21) han propuesto que algunos cánceres del colon pueden desarrollarse por medio de un “*fenotipo metilador de la isla CPG*” (CIMP) [*CpG island methylator Phenotype*], y subsecuentemente han sido identificados varios genes que son significativamente metilados en los cánceres de colon, incluyendo APC (aún una vía más para silenciar la actividad de este gen), *HIC-1*, *TIMP-3*, *PTEN*, *P16*, *P14*, *retinoic acid receptor B*, *MGMT*, y otros. Esto representa una tercera vía, independiente, de desarrollo de CRC. pero se pronosticará alguna sobreposición entre si una vía lleva a la inactivación de un gen crítico que abrirá otra vía.

10.7 Sobreposición entre CIMP y MSI

Los tumores MSI fueron inicialmente encontrados conjuntamente con HNPCC (7, 17), en que hay una mutación heredada en un alelo de un gen MMR del DNA, e inactivación de otro alelo en una célula colónica, que resulta en pérdida de la actividad MMR del DNA y la cascada MSI de mutaciones. Sin embargo, el HNPCC cuanta solamente con 2%-3% de todos los cánceres colorectales; cerca de 12%-15% de los canceres colorectales tienen MSI. (3,16,17).

Ha sido encontrado que la mayoría de los CRC-MSI se desarrollan porque hay hipermetilación del gen *hMLH1*, proporcionando una vía adquirida para MSI. Entonces, la vía CIMP puede llevar al desarrollo tumoral directamente a través de metilación y silenciamiento de una variedad de genes supresores de tumores, o indirectamente a través del silenciamiento de *hMLH1*, inactivación de MMR del DNA, y de la vía MSI.

10.8 Vías múltiples para CRC

Hay vías múltiples para llegar al CRC. Cada vía envuelve sus propios mecanismos de inestabilidad genómica. Cada una de estas vías puede producir alteraciones en algunas combinaciones de genes críticos, que está, en parte, relacionada con el mecanismo de inestabilidad. Simples “*point mutations*” son comúnmente encontrados en muchos tumores, y estos (que ocurre continuamente), mucho de los cuales son reparados por una variedad de genes constitutivos de mantenimiento.

Se puede incrementar el número de estas mutaciones aumentando la tasa de degeneración del **DNA** (a través de inflamación crónica, exposición a carcinógenos, etc), o por reducción de la eficacia de los sistemas de reparación. Un aumento fuerte en la tasa de mutación – que ocurre con inestabilidad genómica – puede ser encontrado en muchos **CRCs**, y esto también proporciona una firma de mutaciones

Esto añade a la complejidad del análisis del tumor, pero ciertos genes, tales como **APC** y **p53** son esenciales en la regulación del crecimiento celular colorectal en que ellos pueden ser “*targets*” de cualquiera de las formas de la inestabilidad genómica.

Hay alguna sobreposición, también, cuando una forma de inestabilidad genómica lleva a la sobreposición de un segundo tipo. Esto hace cualquier estrategia para detectar tumores en la base del **DNA** asociado a un tumor en el colon (en las heces) un trabajo complejo. Este trabajo abrumador puede ser superado con la utilización de un panel flexible de marcadores genéticos que detectaran anomalías en cualquiera de estas vías. En la medida que nuevos marcadores son descubiertos, pueden ser incorporados en el teste para aumentar la sensibilidad. También, si el paciente tiene un riesgo de un tipo particular de anomalía, tal como la pérdida de **MMR** del **DNA** en el contexto del **HNPCC**, se puede usar un abordaje “*target*” y mirar los marcadores de **MSI**. Con nuestra comprensión del crecimiento tumoral en los aspectos genéticos, puede ser posible crear otras concepciones de nuevos abordajes para mejorar el diagnóstico precoz y el rastreo.

CAPÍTULO XI

11. RASTREO Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL CRC

11.1 Introducción

El cáncer colorectal (CRC) es una de las principales causas de muerte por cáncer en el mundo con estilo de vida occidental, pero está dentro de los cánceres mejor curables cuando es identificado en un estadio precoz. Tiene una fase pre-maligna larga y una progresión lenta desde la fase de enfermedad confinada a la pared del órgano hasta las fases de invasión local y de enfermedad metastática distante. Por eso hay una amplia oportunidad para identificar a los pacientes en un estadio curable con la realización de rastreos vastos (1). Hasta el momento, los métodos existentes de tratamiento, no han sido específicos, tales como la indagación de sangre oculta en las heces; y dependen de técnicas invasivas para visualización directa, tales como sigmoidoscopia flexible, colonoscopia o enema de bario. Recientes avances en química clínica y biología molecular llevaron al apareamiento de nuevas técnicas de tratamiento no invasivas, basadas en la propia biología subyacente del CRC. Este tratamiento identifica mutaciones que son conocidas por estar asociadas con el CRC en el DNA que es desprendido en las heces por las lesiones malignas y premalignas del colon. La identificación de estas mutaciones en las muestras de heces puede ser usada para una posterior evaluación.

En los Estados Unidos el **CRC** es la principal causa de muerte por cáncer en hombres y mujeres no fumadores, con un número estimado de 57.100 muertes por cáncer ocurridas en 2003, y es la segunda causa de muerte global (2). Mientras la incidencia global del **CRC** ha bajado algo en los últimos 20 años, cerca de 147.500 nuevos casos serán diagnosticados en 2003, en los Estados Unidos igualmente divididos entre hombres y mujeres.

La mortalidad y la incidencia relacionados con el **CRC** varían en función de la raza y de los grupos étnicos y es muy común entre negros, seguida por caucasianos y americanos asiáticos, y seguidos por hispanos e Indios Americanos. Los hombres negros tienen la incidencia más alta de muerte relacionada con **CRC**.

El factor de riesgo más significativo para el desarrollo de **CRC** en la vasta mayoría de las personas es simplemente la edad avanzada. Aproximadamente 90% de **CRC** ocurre después de la edad de los 50 años, y con más de un 70% después de la edad de los 60 años (3). Una historia previa de **CRC**, la presencia o historia personal de pólipos (adenomatosos) neoplásicos, una historia familiar de **CRC**, y una enfermedad inflamatoria del intestino de larga duración aumentan esta línea de base del riesgo relacionado con la edad. Varios factores ambientales y dietéticos también han sido implicados, y muy notoriamente la inactividad física, la obesidad, dietas ricas en carne roja, así como el uso de tabaco y alcohol. Hay factores que mitigadamente están bajo investigación, tales como vitamina D, calcium, ácido fólico y agentes anti-inflamatorios no-esteroides entre otros.

El **CRC** parece desarrollarse a través de cambios estructurales en los genes que se originan a través de mutaciones y modificaciones químicas de regiones de control genético. La vía más común, **inestabilidad cromosómica (CIN)**, incluye “*point*” mutaciones que ocurren en los genes supresores de tumores relacionados con el **CRC**, tales como **APC** y **p53** o el gen promotor común de tumor **K-ras** (4).

La segunda vía, la vía mutadora, envuelve mutaciones en genes que controlan el reparación de errores de no apareamiento del DNA, primariamente **MLH1** y **MSH2**, que permite que las mutaciones inicien y persisten en los genes críticos del ciclo celular (4). Hay áreas de **DNA** con secuencias repetitivas de nucleótidos, conocidas como microsatélites, que son especialmente sensitivas a las mutaciones (inestabilidad de microsatélite) cuando la reparación de errores de no apareamiento del DNA es anormal.

Finalmente, los genes pueden ser “*turned off*” (inactivados) por hipermetilación de las islas CpG de las regiones promotoras en la tercera (o “*mutación*”) vía.

La vía del **CIN** lleva a cerca de 85% de todos los **CRCs** que son primariamente esporádicos, originados como una consecuencia de una mutación adquirida; sin embargo, una mutación heredada (“*germline*”) rara, envolviendo el gen **APC**, está asociada con la adenomatosis poliposis coli y confiere un riesgo de casi 100% de **CRC** en una edad precoz, una condición conocida como polyposis adenomatosa familiar (**FAP**). La vía mutadora lleva a 12%-15% de **CRCs**. Mientras la mayoría de las vías mutadoras (**MIN**) de **CRCs** son esporádicas, una minoría significativa (20%) de **CRCs** **MIN** están asociadas con una mutación heredada (“*germline*”) que predispone para el **CRC** conocido como

HNPCC (Síndrome de Lynch). Los cánceres **MIN Síndrome de Lynch**, por eso, constituyen solamente 2% a 3% de todos los **CRCs**. Los pacientes del **Síndrome de Lynch**, que tienen cerca de 80% de riesgo, en la vida, de desarrollar **CRC**, pueden también desarrollar otros cánceres, incluyendo endometrio, ovario, tracto urinario, aparato digestivo superior y tracto biliar. Todos los pacientes deben tener una historia familiar hecha de modo cuidadoso y pormenorizado en la investigación de rastreo, cuando la familia está siendo evaluada en cuanto al riesgo de **CRC** familiar. Finalmente, el gen **MLH1**, que puede predisponer para **CRC** a través de mutaciones heredadas (“*germline*”), puede también tornarse inactivo a través de una modificación química adquirida. La región promotora del **MLH1** es sensible a la hipermetilación, una modificación química adquirida que inactiva el gen **MLH1**. La hipermetilación, por eso, lleva a una deficiencia adquirida en la reparación de errores de no apareamiento “*repair*” del DNA. Esta vía es conocida la **hipermetilación** de la carcinogénesis colorectal. Estos descubrimientos en la genómica básica y medicina laboratorial han llevado a nuevas estrategias de tests para la identificación precoz de lesiones malignas y premalignas, como se abordarán más adelante.

11.2 Tests de rastreo de cáncer colorectal tradicionales

El rastreo del **CRC** ha probado ser efectivo, tanto en la disminución de la mortalidad por **CRC** (5), como, más recientemente, en la disminución de la incidencia (6). Existe un desafío mayor, sin embargo, para los clínicos, así como para los pacientes, para conseguir un beneficio claro en los programas de rastreo de **CRC**.

Existen ciertas condiciones que disminuyen las potencialidades de los resultados de los rastreos, que están asociadas con algunos factores, incluyendo el número de estrategias del rastreo, sus esquemas variados de recomendación, manipulación e inadecuación impropia para los tests de sangre fecal, consumo excesivo de tiempo y preparación incómoda para el paciente en las etapas de limpieza intestinal, y la naturaleza invasiva de muchas modalidades de rastreo riguroso. Más aun, a pesar de su clara eficiencia, ni todos los médicos utilizan completamente las potencialidades del **CRC** y no rastrean “*agresivamente*” sus pacientes y ó no les encarajan.

Todos estos factores contribuyen a bajar las ventajas y disminuyen el valor global del esfuerzo de indagación. El rastreo de **CRC** no ha penetrado adecuadamente en la muestra de población susceptible

de ser estudiada y con indicaciones para tal, como por ejemplo, los mayores de 50 años de edad. En los Estados Unidos hay cerca de 20,6% de pacientes que refieren haber hecho un test de sangre oculta en las heces dentro del año anterior a esa cuestión, y solamente 33,6% se refieren a haber hecho una sigmoidoscopia flexible dentro de los cinco años, previos (7). La creación de sistemas de recordación clínica de rastreos de CRC para garantizar que los pacientes mantengan fidelidad a programas de rastreo apretados es igualmente necesaria, y condicionada por arreglos complicados de organización de organigramas de organización de rastreos.

11.2.1 – Test de sangre oculta en las heces

El test de rastreo más habitualmente hecho, el test de la sangre oculta fecal, se basa en identificar la actividad de la peroxidase del hierro de la molécula de la hemoglobina, o por una indagación nueva inmunológica que identifica la proteína de la porción de globina de la molécula de la hemoglobina.

Esta última indagación tiene la ventaja de aumentar la especificidad, lo que da menos resultados falsos positivos causados por agentes de peroxidación no específicos que pueden estar en las heces, tales como ciertos alimentos o drogas. Los ensayos, publicados basados en el método de la sangre oculta (con busca de la molécula de hierro) en las heces hechos bianualmente han demostrado una baja de 15%-18% en la mortalidad (7, 8), mientras que el método inmunológico da una baja de 30%, siendo más específico y más seguro (9).

A pesar de que estos tests son repulsivos, porque exigen la manipulación de las heces por los pacientes, no son invasivos y no requieren ninguna preparación del intestino, pueden ser efectuados en cualquier oficina médica con el espécimen que el paciente ha traído de casa, o hecho por el paciente en su domicilio con la utilización de los kits de test aprobados. Hay estudios múltiples que apuntan hacia una baja sensibilidad de estos tests, que tendrán que ser realizados de modo repetitivo, durante años, para conseguir disminuciones modestas de la mortalidad referida. Muchos médicos apuntan a falsos positivos y circunstancias en que no hay “follow ups” adecuados, resultando en pérdida de cánceres (5, 10).

Los resultados negativos del test de sangre oculto en las heces no deben ser considerados satisfactorios en definitivo para un rastreo, pero en caso de ser positivo apunta a la obligación médica de ser hecha una evaluación colonoscópica (12). Por ejemplo, un toque rectal positivo nos da información si el test de sangre oculto es positivo, pero la negatividad no garantiza nada, lo que implica, entonces

seguir las reglas publicadas en los estudios controlados **(12)**. Mientras continua el trabajo de mejorar la sensibilidad y especificidad para los tests de sangre oculto en las heces **(11)**, la falta de relación entre la pérdida de sangre y la etiología de CRC constituye un límite natural para su utilización clínica como instrumento único final de diagnóstico.

11.2.2 – Enema de bario con doble contraste

Relativamente a todos los otros exámenes y modalidades, el enema de bario con doble contraste no puede ser usado como exámenes de rastreo de CRC. Aunque evalúe el colo-rectum entero y su costo beneficio en las series de estudios publicados, tiene muy bajo riesgo de perforación de intestino (cerca de 1/25.000), requiere una excelente preparación intestinal y es perjudicado por una tasa pobre de identificación de pólipos **(13)** comparado con los métodos de visualización directa.

Como el interés en esta modalidad ha bajado, pasó a haber menor disponibilidad de radiólogos expertos en interpretar exámenes radiológicos de ENEMA DE BARIO CON DUPLO CONTRASTE, lo que da más impacto en la cualidad de estos exámenes y acceso a ellos.

11.2.3 – Visualización directa sigmoidoscopia y colonoscopia

Mientras las estrategias de la visualización directa a través de endoscopios de fibra óptica son efectivas en los pólipos más pequeños y la biopsia de lesiones de mayores dimensiones, son consideradas invasivas y requieren preparación intestinal para remover materia fecal antes del examen.

El examen del colon entero a través de un colonoscopio es generalmente ejecutado con sedación, o anestesia superficial, mientras el examen sigmoidoscópico, más limitado, que sirve para examinar el colon hasta la flexura esplénica, es ejecutado sin anestesia.

11.2.3.1 – Sigmoidoscopia flexible

La sigmoidoscopia flexible, aunque sea eficaz y el coste-beneficio de su ejecución es obvio, pudiendo ser hecha por médicos no endoscopistas, requiere preparación intestinal, y sólo consigue examinar la mitad izquierda del colon (máximo de inserción 60 cm; inserción media de 52-55 cm), pudiendo ser realizada sin sedación, pero con resultados muy molestos **(14, 15, 22)**. Si durante una sigmoidoscopia surgen lesiones más complejas que un simple pólipo (de diámetro inferior a 1 cm) habrá necesidad de ser efectuada, obligatoriamente una colonoscopia **(16,17)**, como en neoplasmas colónicos avanzados, pólipos colónicos avanzados que exhiben una o más de las siguientes características: diámetro de por lo menos 1cm, elevado grado de displasia, o una apariencia vellosa, en todo, o en parte **(18)**. Solamente 50% a 60% de CRCs se sitúan potencialmente dentro del límite de acción del sigmoidoscopio, por lo que el fallo de inserción para alcanzar la flexura sigmoidea puede dejar de observar lesiones significativas. El descubrimiento de adenomas avanzados, o pólipos adenomatosos múltiples pequeños en el colon izquierdo (distal), como ha sido afirmado arriba implica, obligatoriamente, la realización de una colonoscopia.

La presencia de estas “lesiones centinela”, sin embargo, puede extender la sensibilidad de los programas en los rastreos de CRC, por ocasionalmente llevar al descubrimiento de cánceres del colon derecho (proximal), que no serían descubiertos con el sigmoidoscopio.

La eficacia global de los programas de rastreo con sigmoidoscopio en el riesgo mediano de la población puede ser estimada dentro del intervalo de 55% a 75%. Lieberman y col. **(19)** e Imperial y col. **(20)** en estudios que usaron el primer examen colonoscópico no pasando proximalmente la flexura esplénica. Como equivalente a la sigmoidoscopia, refieren que los programas de rastreo a la sigmoidoscopia pueden no descubrir aproximadamente la mitad de todos los pacientes con neoplasia proximal avanzada.

Como lo indicado por estos autores, sin embargo, este proceso beneficia el hecho de que todos los pacientes habían recibido una preparación intestinal adecuada y todos fueron sometidos a anestesia.

Mas aún, en el caso del estudio de Liberman, 96% de los individuos eran hombres (los hombres tienen una incidencia más elevada de lesiones en el lado izquierdo del colon). Levin y col. Refirió una serie de 161 pacientes que desarrollaron CRC dentro del periodo de tiempo de cinco años después de

una sigmoidoscopia, demostrando que 30% de los fallos de las sigmoidoscopias ocurrieron en la parte izquierda del colon en la zona al alcance del sigmoidoscopio **(21)**.

11.2.3.2 – Colonoscopia

La colonoscopia examina todo el colon hasta el ciego y es ejecutada por médicos especializados que son primordialmente gastroenterologistas. Porque la colonoscopia tiene la sensibilidad más elevada entre todas las estrategias de visualización del colon, es considerada una referencia estándar. El rastreo, la remoción de uno o mas pólipos y biopsia deben ser realizados en una única sesión, y el uso de anestesia hace el procedimiento relativamente fácil para el paciente. El coste-beneficio ha sido referido en varios estudios **(22)**.

Los aspectos que hacen de la colonoscopia una excelente herramienta de diagnóstico disminuyen su uso como examen de rastreo. La preparación intestinal y la anestesia pueden ser difíciles y por causa de las complicaciones de los pacientes ancianos y las relacionadas con complicaciones de los pacientes ancianos y condiciones co-mórbidas. La colonoscopia está asociada con mayores tasas de perforaciones del intestino (25-20/10.000) y muerte, o complicaciones significativas (estimadas en aproximadamente 1-3/10.000) **(16, 22, 23)**.

Con el aumento del uso de la colonoscopia, se torna como una herramienta de rastreo y su baja morbilidad y mortalidad se vuelven aparentemente más significativas cuando se compara con la prevalencia del cáncer colorectal (6-8/1000) en el riesgo medio de la población.**(16,22,23)**. En los Estados Unidos hay más de 80 millones de personas mayores de 50 años y aproximadamente 4 millones más a pasar de los 50 años, que cada año reúnen las condiciones de edad para entrar en programas de rastreo con colonoscopia y sus desafíos. **(22)**.

Esto obliga a un aumento del número de colonoscopistas entrenados a través de programas adicionales, llevando a un aumento de la oferta de la capacidad de servicios especializados de colonoscopia, generando un aumento y mejoría de la accesibilidad, con un incremento significativo de los presupuestos gubernamentales en las áreas de la salud y sus políticas. Con el aumento del rastreo de

CRC, existe la implicación de buscar métodos innovadores para probar a las personas con una disminución de las dificultades corrientes que subsisten en las barreras naturales de todos los preparativos y dificultades propias de la realización de una colonoscopia, manteniendo o mejorando el rigor, las facilidades de acceso y aumentando la satisfacción de los pacientes con el proceso de rastreo. Al acrecentar estas preocupaciones existen o prevalecen los costes para cualquier sistema nacional de salud de cualquier país, o el reembolso en los casos de seguros de salud.

11.3 – Análisis del DNA de las heces

El desarrollo de tests no invasivos derivados del conocimiento de la biología tumoral básica muestra la promesa de mejoría de las barreras apuntadas para la colonoscopia, como el examen de rastreo y diagnóstico de CRC. Estos tests identifican las mutaciones del DNA humano en las heces que se sabe están asociadas con el CRC y los pólipos colorectales premalignos. El conocimiento científico de esta metodología de base de detección precoz del CRC usando un tratamiento no invasivo y riguroso, a través del estudio de las mutaciones del DNA de las células de la mucosa colorectal, está basado en décadas de trabajo por Bert Vogelstein, Kenneth Kinzler y col. en la Universidad de Johns Hopkins, que elaboraron estudios de los cambios genéticos que se desarrollan a través de una transición del epitelium colónico normal hasta el carcinoma colorectal invasivo (4,24).

Tales estudios pueden ser aplicados en el futuro en gran escala en programas de rastreo de poblaciones con las características que apuntan hacia el estudio precoz del cáncer colorectal, sin necesidad de personas especializadas, o de instalaciones médico-hospitalarias como en el caso de la realización de una colonoscopia.

Mientras que la ciencia subyacente es sofisticada en el estudio de las mutaciones del DNA de las células descamadas de la mucosa colorectal, el proceso de cosecha de heces es simple. No hay cuidados especiales de restricción alimenticia, o necesidad de cambios de medicación. El paciente produce una deposición singular de heces en su casa, directamente para un recipiente adecuado, que es cerrado con seguridad y enviado al laboratorio que aísla el DNA humano a partir de la muestra de heces y procede a la identificación de una variedad de mutaciones que usualmente están asociadas con CRC y pólipos (25). Si una mutación es detectada, se inicia un estudio estructurado con un follow-up y un estudio de la naturaleza estructural, que comienza por una colonoscopia, cuyos resultados deben ser conjugados con

una historia familiar con vista a saber si las alteraciones tienen una base hereditaria familiar o si es un caso esporádico.

La encuesta del paciente sobre sus antecedentes y hábitos de vida, conjugados con los elementos anteriores y la naturaleza histopatológica, determinarán la estrategia diagnóstico-terapéutica y el follow-up.

Cuando los neoplasmas se desarrollan, las células y fragmentos son descamados y liberados en las heces en la luz intestinal, llevando, así, el DNA en las heces que constituyen la muestra para el test. Este DNA es aislado de la cantidad masiva de DNA bacteriano contenido en las heces, mediante una serie de etapas de purificación, en que estas “agujas en un pajar” son separadas del bacteriano, siguiéndose el proceso de la tecnología de **PCR** (*polymerase chain reaction*).

Después se continúa con un proceso de microsecuenciación para detección de mutaciones de base-singular en los loci que son conocidas como “hotspots” (“puntos calientes”) de mutación (25,26). Mientras hay millares de posibles mutaciones, la evaluación de cánceres colorectales resecaados y de tejidos de pólipos colónicos avanzados muestra que un número relativamente pequeño de mutaciones está asociado con la vasta mayoría de estas lesiones. Las 22 mutaciones más comunes están incluidas en un panel de análisis de DNA de las heces para el rastreo de **CRC**.

Éstas comprenden 10 “targets” en el **APC**, tres en **K-ras**, ocho en **p53** y deleciones en el microsatélite **BAT-26**. (27-29). Adicionalmente, la cantidad y la calidad, o extensión, de los fragmentos de **DNA** han mostrado ser diferentes en pacientes con **CRC** y pólipos (25,30). Este mecanismo por lo cual esto ocurre está bajo investigación, pareciendo en las observaciones que el fenómeno está relacionado con un defecto en la muerte celular programada (apoptosis). El **DNA** normal es degradado por las endonucleasas en fragmentos de cerca de 200 pares de bases durante el proceso de apoptosis, mientras el **DNA** en fragmentos de extensiones mayores. El **DNA Integrity Assay (DIA)** evalúa el **DNA** humano aislado de las heces mediante su amplificación y análisis posterior de fragmentos que tienen una extensión de 1.300, 1800 ó 2400 de bases.

El trabajo de Brand y col. (31) demuestra que un espécimen singular completo de heces es suficiente para cada sesión de rastreo periódico y que las muestras múltiples de cada paciente no necesitan de ser

probadas en cada sesión de rastreo (31). El propio intervalo de repetición, similar al intervalo para la sigmoidoscopia y la colonoscopia debe ser basado en la interpretación clínica. Sin embargo, considerando el tiempo relativamente lento del desarrollo del cáncer colorectal, un intervalo de tres a cinco años entre dos eventos de tests puede ser considerado apropiado de acuerdo con las indicaciones del *NATIONAL CANCER INSTITUTE*.

La identificación de **DNA** mutado, o alterado, en las heces de estos tres genes (APC, K-ras, p53) y el Bat-26 microsatélite, conjugados con el test de integridad del **DNA** (**DIA**) han podido juntar una estrategia poderosa no invasiva al mení de rastreo del CRC, especialmente en pacientes que no revelan concordancia con las más efectivas técnicas de rastreo invasivas, tales como la colonoscopia y/o sigmoidoscopia. Acrecentando el test del **DNA** de las heces en intervalos de 2 a 5 años, permitirá facilitar la indicación para el modelo de rastreo de la colonoscopia, permitiendo con este simple test de **DNA** de heces extender la amplitud diagnóstica de la smoidoscopia y llegar a diagnósticos de **CRC** en la mitad derecha del colon. Pacientes que son demasiado frágiles para métodos de rastreo efectivos, o que las señales y síntomas están en conformidad con un potencial diagnóstico de adenocarcinoma del colon derecho pueden ser buenos candidatos para tests no invasivos, como la identificación de mutaciones el **DNA** de las heces. Por todo esto, se puede reconocer que el rastreo de **CRC** es una estrategia que permite al médico tener una intervención clínica que salvará muchas vidas, permitiendo, igualmente, caminar con afición a la clínica de los **CRC**.

Si conciliáramos este test con una historia clínica familiar, para identificar la predisposición familiar de **CRC** hereditario e integrando en un programa planeado de rastreo en la comunidad, se consigue aplicar una acción médica de longo-termo, lo que constituye un registro médico poderoso, soportado por sistemas de diagnóstico adecuados.

CAPÍTULO XII

12. DIANAS GENÉTICAS MÚLTIPLES EN EL DNA DE LAS HECES

12.1 Introducción

El cáncer colorectal es una de las formas más comunes de cáncer en el mundo occidental y es curable si el diagnóstico es hecho en un estadio precoz (1-4). En los últimos 15 años se ha verificado que una serie de cambios genéticos orientan la transformación neoplásica de la mucosa normal del colon, primeramente hacia adenomas benignos y subsecuentemente hacia adenocarcinomas (5). Estos cambios genéticos incluyen mutaciones de activación del oncogen *K-ras* y mutaciones de inactivación de los genes supresores de tumor TP53 y del cáncer poliposis adenomatoso (APC). (6). Recientemente, ha sido demostrado que los errores de replicación (RERs – “replication errors”) causados por mutaciones “*germline* o somáticas de los genes “*mismatch repair*” están envueltas en el desarrollo de algunos cánceres colorectales (7, 8). El fenotipo **RER** puede ser detectado tan frecuente como las alteraciones en ciertas secuencias de microsatélites, tales como el locus **B26** (9).

El descubrimiento de estas alteraciones genéticas levantó la posibilidad de detectar el cáncer colorectal a través del examen del DNA de las heces, porque las células cancerosas colorectales son derramadas/descoladas de la mucosa en las heces. Tales alteraciones dan una ventaja teórica sobre los indicadores/marcadores convencionales, tales como testes de sangre oculta fecal para detección del cáncer, porque éstas reflejan una diferencia cualitativa en vez de cuantitativa entre estados normales y neoplásicos. Más aún, varios estudios han mostrado que es posible detectar mutaciones de *K-ras* y otros genes en las muestras de pacientes con cáncer colorectal (10-15). Sin embargo, hay numerosos problemas técnicos que están por resolverse después de haber testes en la práctica clínica.

Estos problemas incluyen:

Aislamiento reproducible de DNA de alta calidad separado de los inhibidores de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de las muestras de heces heterogéneas;

La capacidad de obtener DNA humano suficiente de las heces para permitir la detección de mutaciones que están presentes en solamente una pequeña fracción de las muestras de DNA fecal;

3) El desarrollo de testes altamente específicos, y) la validación de un pequeño número de genes “target” específicos que son frecuentemente mutados en cánceres colorectales

12.2 Testes del DNA fecal

Hoy el teste de DNA extraído de las heces es considerado una nueva herramienta de diagnóstico precoz de CRC, con una vocación de diagnóstico, y de rastreo, porque entre muchos atributos no es invasivo. Este teste detecta mutaciones genéticas, características del CRC en células que se liberan de la mucosa colorectal con alteraciones malignas para el flujo fecal. Aunque sea más riguroso que el teste de sangre oculto en las heces, no es tan sensitivo como la colonoscopia, según varios artículos de la literatura médica. El rastreo del CRC en las personas arriba de los 50 años es un conocido medio de salvar vidas. En Estados Unidos, en donde hay testes de DNA en venta, en el comercio especializado, con un fuerte marketing sobre los médicos y la población en general, los rastreos de CRC no han conseguido aumentar muy significativamente la consciencia del beneficio del diagnóstico precoz no invasivo del CRC. **(16)**. A pesar de todo, el teste del DNA fecal puede ser una alternativa para los pacientes que de otro modo, no serían rastreados. En el 2004, el periódico de temas médicos THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE (en su número 351:2704-2714, 2755-2758) presentó un trabajo que enfocaba el problema del rastreo del CRC en Estados Unidos, constatando que a pesar de las “guidelines” de las recomendaciones de rastreo, poco más de 50% de los adultos Americanos mayores que 50 años de edad habían tenido un examen reciente para despiste del CRC, en los intervalos recomendados por el “CENTERS FOR DISEASE CONTROL”.

Dentro de las muchas razones porque las personas no se someten al rastreo del CRC se encuentran **(a)** algunos individuos que no quieren someterse a una colonoscopia porque sienten una fuerte incomodidad, a pesar de la sedación del estado de consciencia, **(b)** o sea riesgo de complicaciones; **(c)** otros no tienen la voluntad en manipular sus heces para hacer una sementera en un cartón del teste de sangre oculto en las heces (**FOBT**-“*fecal occult blood test*”), una vez en cada año.

El test de DNA de las heces sólo requiere una muestra singular expedida del cuerpo directamente en un recipiente de las personas que no quieren someterse a cualquiera de los medios habituales de diagnóstico/rastreo (sigmoidoscopia/colonoscopia y FOBT), una comodidad a través de este medio de detección no invasivo de pesquisa de mutaciones en el DNA de las heces. El primer teste de rastreo de CRC basado en el estudio de mutaciones del DNA de las heces comenzó a ser utilizado en los Estados Unidos en Agosto de 2003, comercializado por EXACT SCIENCES, en Marlborough, Massachusetts. El teste no envuelve ni endoscopia, ni preparación alimenticia especial, ni preparación intestinal. Además, el teste no depende de la presencia de sangre en las heces para identificar el riesgo en el paciente.

En la privacidad de su casa el paciente defeca en un recipiente que coloca encajado en la apertura del sanitario y envía el recipiente al laboratorio para el análisis del DNA. Esta metodología es el culminar de más de una década de años de trabajo en que se intentó separar el DNA anormal de los colonocitos, en fase de transformación de la mucosa del colon que sufrieron descamación del DNA bacteriano de las heces y el DNA de los colonocitos de la mucosa normal, y después amplificar este DNA y someterlo al teste para detección de las anomalías genéticas que acostumbran caracterizar al CRC. El cáncer colorectal se desarrolla como un resultado de genes inactivados por mutación, u otras modificaciones químicas. **(16)**. La inestabilidad cromosómica es la vía más común de desarrollo de CRC y envuelve “point mutations” que ocurren en los genes supresores de tumor relacionados con el CRC, tales como APC, p53, y el gen común promotor de tumor, K-ras. En cuadro 1 se presenta el conocido modelo genético de cáncer colorectal **(16)**.

12.3 Estudios clínicos muestran la evolución del test

Los primeros estudios para testar el DNA fecal evaluaban un conjunto limitado de anomalías del DNA, muy menor al que actualmente es hecho. En 1992 ha sido descubierto en las heces, por primera vez, el mutante K-ras **(17)**. Más recientemente, un estudio investigó heces para detección de anomalías de DNA en el gen supresor de tumor p53, en el oncogen K-ras y en el marcador de inestabilidad microsatélite BAT-26 en 51 pacientes con CRC conocidos **(18)**.

En este estudio, la sensibilidad global de los tres marcadores genéticos ha sido de 71%, pero las anomalías fueron detectadas en 36 de 39 pacientes (92%) en los cuales el tumor tenía anomalías del DNA en uno de estos tres marcadores. Ahlquist evaluó muestras de heces guardadas de 21 pacientes con

CRC (11 con adenomas >1cm y 28 controles con colonoscopia normal). (19). La bacteria de “targets” genéticos incluía 15 “point mutations” en K-ras, p53, APC, así como BAT-26, y los llamados “long DNA” o “high amplifiable DNA”. Este último es característico de células que no sufren la apoptosis normal. La sensibilidad hacia el cáncer fue del 91% CI, (71%-99%) y para los adenomas >1cm fue del 82% (48%-98%) con 93% de especificidad (76%-99%). Singal y col. (MTG-C-Ref.5) ejecutaron la evaluación inicial de un teste de DNA de heces en pacientes con CRC conocidos. Este teste (en venta en el mercado) examina el DNA fecal, de 21 “point mutations” específicas en los genes K-ras, APC y p53. Ese teste, además, puede detectar tanto el marcador de inestabilidad microsatélite BAT-26, como el “long DNA”, llamado “DNA integrity assay” (DIA). El DIA identifica el DNA largo o redundante. En los estudios clínicos el teste tenía una sensibilidad de 68% (95% CI, 56%-80%) para la detección de CRC, y para los adenomas con elevado y bajo grado de displasia, con una sensibilidad de 40% y 20%, respectivamente (20).

12.4 Refinamiento de tecnología

Posteriores refinamientos de metodología para identificar mutaciones en APC y BAT-26 describen crecimientos de nuevas variables en los testes de DNA y en las heces que están descritas en algunas publicaciones, aunque estas metodologías no están en venta en el mercado. Un test de proteínas truncadas para las mutaciones del APC, muestra una gran sección del gen APC para las mutaciones sin sentido que resulta en discontinuación del mensaje de transcripción y una proteína truncada, o acortada (6). Esta nueva tecnología ha sido evaluada en 28 pacientes con CRC conocido, 18 de los cuales con grandes adenomas, y 28 sujetos a un control para el cáncer con este ensayo y 50% para adenomas grandes; la especificidad fue de 100%. El mismo grupo de investigación también refirió un nuevo ensayo para detección de BAT-26 en las heces, a lo que ellos llamaron ensayo de “digital polymerase chain reacción” (dig-PCR). (21).

Los resultados han sido anormales en 18 de 46 pacientes con CRC, pero las mutaciones BAT-26 fueron identificadas en las heces de 17 de 18 pacientes con CRCs que contenían mutaciones BAT-26. La especificidad de este ensayo fue también de 100%. Entonces, estos estudios demuestran que los refinamientos en la tecnología de los ensayos de DNA fecal conducirán a una mejoría de la sensibilidad y la especificidad.(22)

Arriba de todas, esta investigación sugiere que la versión comercial ocurrence del teste del DNA de las heces tiene una sensibilidad de cerca del 65% para CRC, 30%-40% para adenomas avanzados, y una especificidad de cerca del 95%. En comparación, la sensibilidad del FOBT es mucho más baja. **(23)**. Entonces, el ensayo de DNA fecal representa un avance significativo en la efectividad de un teste completamente no invasivo. Sin embargo, el teste no tan efectivo como una colonoscopia por eso no lo puede sustituir. En otros estudios hay indicaciones de sensibilidades del 70% en el CRC y de 50% para grandes adenomas, el teste del DNA fecal cada 4 años ha sido menos efectivo y más caro cuando es comparado con la colonoscopia en cada diez años **(24)**.

El costo-beneficio de un gran número de estrategias de rastreo de CRC ha sido evaluado, incluyendo una colonoscopia única, FOBT anual, DNA fecal, sigmoidoscopia cada 5 años, FOBT anual más sigmoidoscopia cada cinco años, una vez que la colonoscopia es seguida de este teste de DNA fecal cada cinco años, alternando con el teste de DNA fecal cada cinco años y ningún rastreo (10). Este modelo detallado ha identificado dos estrategias dominantes desde un punto de vista coste-beneficio: la colonoscopia alternando con el DNA fecal con intervalos de 5 años, y FOBT anual. La estrategia alternando la colonoscopia con el teste de DNA fecal testado con intervalos de 5 años ha sido la estrategia más efectiva, disminuyendo la incidencia y la mortalidad para 59% y 60% respectivamente con más elevadas reducciones esperadas en pacientes que se adhieren al esquema del teste. De esta forma, el modelo de la inclusión del teste del DNA en las heces, cada cinco años, alternando la colonoscopia cada diez años es el preferido de Ness y colaboradores **(25)**.

En Estados Unidos, según las estadísticas, morirán de CRC casi 60.000 personas (26,27).

De hecho, el potencial de curación para el cáncer de colon y recto, después de su resección quirúrgica no ha evolucionado en los últimos 50 años, a pesar de la mejora significativa de los métodos de técnica quirúrgica y en los cuidados peri-operatorios. Como en otros tipos de cáncer, las mejores hipótesis de curación del cáncer de colón y recto sólo se pueden verificar si su resección quirúrgica se realiza antes que se haya dado la diseminación de las células malignas hacia otras partes del cuerpo. Hasta el momento, los medios formales y clásicos de prevención y tratamiento (colonoscopia y polictemia), así como los testes para detectar lesiones pre-cancerosas (colonoscopia, sigmoidoscopia, clister opaco de doble contraste y pruebas de sangre oculto en las heces) no han conseguido, por sí solos, hacer bajar su incidencia como causa de muerte.

A pesar de esta realidad, la gran mayoría de las personas con posible riesgo de poder sufrir de cáncer colorectal y de ser elegible para rastreo no se somete a los actuales testes de prevención. El pronóstico de la enfermedad está relacionado con su estadio en el momento del diagnóstico.

Los avances en nuestra comprensión sobre los mecanismos genéticos y moleculares que están en la base de la patogénesis del cáncer colorectal tienen largas implicaciones, no sólo en su prevención y en el diagnóstico precoz, sino también en su tratamiento.

El diagnóstico y tratamiento del cáncer colorectal es complejo y frecuentemente se utiliza en todos los niveles de cualquier sistema nacional de salud en todos los países. Sólo una exploración realizada en condiciones científicas muy exigentes podrá permitir obtener resultados evidentes en la investigación diagnóstica multidisciplinar del cáncer colorectal, ¿Será la medicina clínica capaz de disponer de testes que permitan evaluar las alteraciones biomoleculares y genéticas de la célula cancerosa y a todos los mecanismos evolutivos patológicos desde la célula normal hasta la célula cancerosa? Muchas muertes por cáncer colorectal pueden ser prevenidas por detección precoz mediante rastreo, que es genéricamente seguido por algunos grupos de estrategia con efectiva mejora del coste-beneficio **(28-31)**.

12.5 El rastreo es poco utilizado

De acuerdo con las recomendaciones corrientes, las personas con riesgo medio que tienen 50 años de edad, o mayores, deben optar por un método de rastreo.

Las opciones convencionales (que varían considerablemente en cuanto a la invasibilidad, efectividad y coste) son: **(a)** teste del sangre oculto en las heces todos los años, **(b)** sigmoidoscopia flexible todos los años, **(c)** teste del sangre oculto en las heces todos los años más sigmoidoscopiflexible todos los cinco años, **(d)** colonoscopia cada diez años y **(e)** enema de bario, con doble adherencia, son bajas. En un estudio reciente de personas con más de 50 años, solamente 44,6% ha referido haberse sometido al teste de sangre oculto en las heces, y sólo 47,3% refirieron haberse sometido a una endoscopia baja (ya sea sigmoidoscopia o colonoscopia). **(32)**. Solamente 53,1% se habían sometido a una endoscopia baja

dentro de los últimos diez años, o a un teste de sangre oculto en las heces dentro de los últimos 12 meses. (32).

Es interesante observar que aunque el rastreo del cáncer colorectal tenga comprobado y mostrado haber tenido una baja en la incidencia, este es menos usado frecuentemente que el rastreo de cáncer de próstata, que no ha probado reducir la mortalidad (33). Por este motivo, es crítico para los médicos de cuidados primarios de salud intentar comprender las preferencias de sus pacientes y sus actitudes ante los programas de rastreo, y ayudarlos a tener decisiones informadas (33,34). Leard y col. (35) explicaron las ventajas y desventajas de los varios métodos de testes a 100 pacientes y después les preguntaron cuál de los métodos preferían como método de rastreo. Los resultados fueron: (a) colonoscopia 38% (más elevado para personas que ya anteriormente se habían sometido a una colonoscopia, que para las personas que anteriormente se habían sometido al teste de la sangre oculta en las heces, o no se habían sometido a cualquier teste previo), (b) teste de sangre oculto de las heces – 31% (recusando todas las formas de teste invasivo), (c) Enema de bariun – 14%, (d) sigmoidoscopia flexible – 13%. Estos hallazgos sugieren que muchos pacientes (casi un tercio) declinaran cualquier forma de teste invasivo, pero se someterían a un teste no invasivo.

12.6 La base molecular del test de heces

Los cánceres se desarrollan y crecen como resultado de un disturbio de la función de los oncogenes o de los genes supresores de tumor, o ambos. Si un gen que normalmente estimula el crecimiento sufre una mutación que aumenta su función, puede activar un oncogen, y el resultado puede ser un crecimiento anormal y acelerado.

Inversamente, los genes supresores de tumor regulan y frenan el crecimiento celular. Potencialmente las mutaciones peligrosas en este tipo de genes son las que reducen su función. Los adenomas colorectales y los cánceres se originan a través de por lo menos tres vías genéticas diferentes (que pueden no ser completamente independientes una de las otras): (a) inestabilidad cromosómica, (b) inestabilidad microsatélite, y (c) metilación de la “CpG island”.

La inestabilidad cromosómica, la pérdida de cromosomas completos durante la división celular o la pérdida de partes de cromosomas a través de rearrreglos estructurales, cuenta con cerca del 85% de los

cánceres colorectales esporádicos y esencialmente todos los tumores que se originan en el síndrome de la poliposis adenomatosa familiar hereditario.

Vogelstein y col. (36,37) describieron la asociación entre la acumulación de genes supresores de tumores mutados y oncogenes con el desarrollo de adenomas del colon y su eventual transformación en cáncer colorectal. El proceso en el cual la inestabilidad cromosómica causa cáncer es generalmente lento: los tumores tienden a acumular mutaciones durante un periodo de tiempo arriba de 1 a 2 décadas (38). Aunque muchos genes puedan mutar, los que están frecuentemente implicados en el cáncer colorectal incluyen: APC (adenomatous polyposis coli), un gen supresor de tumor en el cromosoma 5q. Las mutaciones en este gene tienden a aparecer primero, o por lo menos precozmente, en el desarrollo de un adenoma. K-ras (un oncogene). Las mutaciones de este gen frecuentemente ocurren en segundo, en el desarrollo del cáncer colorectal, después del gen APC haber sido mutado p53 (un gen supresor de tumor en el cromosoma 17p). Las mutaciones de este gene frecuentemente ocurren más tarde en el proceso y están asociados con adenomas más grandes conteniendo grados de displasia más severos.

La inestabilidad microsatélite es responsable de menos casos de cáncer colorectal que la inestabilidad cromosómica (39-41) y está implicada en cerca de 20% de cánceres colorectales del lado derecho, pero solamente en 1% a 2% de los cánceres del lado izquierdo. (42-47). La inestabilidad microsatélite, sin embargo, es encontrada en más de 90% de cánceres colorectales (HNPCC), que heredan una copia defectuosa del gen “mismatch repair”. Los genes “mismatch repair” son los verificadores del delectrear del genoma: ellos producen proteínas que detectan y reparan errores en el DNA. La pérdida de función de cualquiera de estos genes (hay por lo menos cinco de ellos) pueden fallar en la reparación de mutaciones, que, en ocasiones, pueden acumularse (42, 48).

Los microsatélites cortos, secuencias repetidas de DNA, son particularmente vulnerables. Eventualmente, si se acumulan muchas mutaciones, el gen funcionará mal o fallará. Si el gen mutado controla el crecimiento celular, o regula la supresión tumoral, la pérdida de la función puede llevar al cáncer. Los genes habitualmente afectados son aquellos que contienen microsatélites en sus regiones de codificación; estos incluyen: (a) TGF (transforming growth factor) beta-1 receptorII, (b) receptor para el crecimiento análogo a la insulina II (c) BAX, (4) hMSH3, (d) hMSH6, (e) TCF4, (f) caspasis, (g) beta-catenina, (i) wisp-3, y (j) MBD4. Los tumores con mutaciones en dos o más loci? son encarados teniendo inestabilidad microsatélite de alta frecuencia, y una fuerte indicación de un fallo de un gen de “mismatch repair”. Un microsatélite, BAT26, un locus? singular de 26 nucleótidos consecutivos de

adelite?, está fuertemente asociado con el fallo de un gen “mismatch”. Entonces, el teste para mutaciones en BAT-26 es casi tan efectivo como medio de rastreo de todos los cinco loci microsatélites **(43-46)**.

Los genes supresores de tumores pueden también ser inactivados por una tercera vía para el desarrollo del cáncer colorectal: hipermetilación de “CpG islands” en sus regiones promotoras. “CpG islands” son “clusters” de residuos citosina-guanosina que, son abundantes en la región promotora de varios genes; la región promotora instruye el gen para activar su transcripción. **(49)**.

12.7 Ensayos clínicos con testes de DNA en las heces

Unidos en la comprensión del conocimiento sobre cómo se originan los neoplasmas colorectales a nivel molecular, los investigadores están desarrollando testes que pueden detectar el cáncer colorectal asintomático, a través de la detección del DNA alterado en células liberadas de los adenomas y cánceres de la mucosa colorectal en las heces. En 1992, Sidransky y col. **(50)**, por primera vez refirieron la detección del cáncer colorectal a través del teste del K-ras mutante en las heces. Los primeros estudios, con testes para mutaciones singulares (principalmente en el K-ras) eran de cerca de 40% de sensibilidad para detectar el cáncer colorectal **(51)**.

Los testes más recientes utilizan la identificación de más de una mutación y son significativamente más sensibles. Dong y col. **(44)** desarrollaron un teste de DNA de las heces con tres marcadores genéticos: p53, BAT-26 y K-ras. Estos marcadores en conjunto detectaron 36 (71%; 95% CI 56%-83%) de 51 pacientes con cáncer colorectal; estos 36 constituyeron 93% (95% CI 79%-98%) de 39 pacientes cuyos tumores tuvieron una o más de estas alteraciones genéticas. Ahlquist y colaboradores **(45)** analizaron heces en 22 pacientes con cáncer colorectal, en un estudio “doble ciego” (blinded fashion), 11 con adenomas de por lo menos 1 cm de diámetro, y 28 pacientes con colon endoscópicamente normales. El teste se “dirigia” (“targeted”) a “mutaciones puntuales” en cualquiera de 15 sitios de K-ras, p53, APC, y el marcador de la inestabilidad microsatélite BAT-26. El ensayo de Ahlquist también testó el “DNA altamente amplificable” utilizando el DIA (DNA integrity assay), que identifica el DNA redundante, frecuentemente presente en células que no están por sufrir una apoptosis normal (muerte celular programada). La sensibilidad fue de 91% (95% CI 71%-99%) para cáncer y 82% (95% CI 48%-98%) para adenomas con 1 cm de diámetro o más grande; la especificidad ha sido 93% (95% CI 76%-99%).

Syngal y col. **(52)** utilizaron un ensayo para detectar 23 marcadores del DNA en las heces, incluyendo 21 “point mutations” en el gen K-ras, en el APC y en el p53; el marcador de la inestabilidad microsatélite BAT-26; y el DNA altamente amplificable” (??). En los pacientes con lesiones conocidas, la sensibilidad fue 68% (95% CI 56%-80%) para detectar carcinomas colorectales invasivos, 40% para adenomas con elevado grado de displasia, y 20% para adenomas con displasia de bajo grado. Los resultados con testes capaces de detectar más mutaciones en el gen APC han sido mejores que con los testes que podían detectar menos mutaciones en este gene. Traverso y col. **(53)** desarrollaron un teste de “protein truncation” que detectó alteraciones en el gen APC en 17 (61%) de 28 cánceres y en 9 (50%) de 18 grandes adenomas, sin alteraciones detectables en 28 sujetos control. Traverso y col. **(43)** también desarrollaron un teste “digital polymerase chain reaction” para el antígeno BAT-26. El teste fue positivo en 18 de 46 pacientes con cáncer colorectal y en 17 de 18 pacientes con canceres teniendo mutaciones BAT-26.

Globalmente la sensibilidad de los testes “multitarget”, relativamente al DNA de las heces, tiene una amplitud de los 68% a los 91% para el cáncer colorectal y de 40% a 82% a los 91% para el cancer colorectal y de 40% a 82% para los adenomas avanzados **(28,44,54,56)**. La especificidad del teste comercializado con el nombre pregen-Plus (EXACT Sciences Corporation, Maynard, Mass) es de cerca de 95%. **(43,45,56)**. Los estudios preliminares con el prototipo del teste “multitarget stool-based DNA” se acercan a una especificidad de 100%, excluyendo los marcadores K-ras, sin comprometer la sensibilidad del teste **(42,44,52)**. Hay testes comercialmente disponibles sólo para el gen BAT26 (Pregen-26, from EXACT SCIENCES) **(46)**, que han sido substituidos por el PreGen-Plus, que existe comercializado en el mercado de Estados Unidos desde agosto de 2003, que se destina a múltiples “DNA Targets” **(52)**, y se destina para ser utilizado en el rastreo pacientes que están en la media general del riesgo de CRC. Este teste tiene una sensibilidad mucho mayor que el teste de la sangre oculta en las heces, pero menos que la de la colonoscopia. Así, el teste “multitarget” (PreeGen-Plus) sólo debe ser utilizado en aquellos pacientes que no desean ser sometidos a la colonoscopia.

Suponiendo que el rastreo de la población tiene una prevalencia de cánceres de 0,5% y de 5% de adenomas avanzados, que su especificidad es 95%, que su sensibilidad para el CRC es 50%, y que su sensibilidad para los adenomas avanzados es 15%, el valor predictivo de Pregen-plus, deberá ser de 15% **(43,45,52,55,56)**.

12.8 Pacientes con resultado positivo

Así, los pacientes con un teste positivo deben someterse a una colonoscopia. Sin embargo, si en la colonoscopia no han encontrado algún cáncer, o adenoma avanzado el seguimiento de estos pacientes es incierto, pero deben ser evaluados con más medios para detectar si hay algún origen de DNA anormal fuera del colon, y así deberá ser hecha la tomografía computarizada abdominal pélvica, la endoscopia digestiva superior, rayos X del intestino delgado y TAC de tórax, porque en caso de cáncer de pulmón habrá DNA anormal de la expectoración deglutiva. (44).

En la práctica clínica, es razonable ejecutar un examen físico y continuar explorando eventuales hallazgos extracolónicos si es encontrada alguna anomalía del teste “multitarget” de heces y no es de excluir la ejecución de otra colonoscopia un año después, en el caso de no haber encontrado hallazgos en la colonoscopia hecha en la secuencia de un teste positivo de DNA anormal en las heces. Aunque los datos sean limitados, la evidencia sugiere que el teste del DNA de las heces tiene un coste-beneficio. Esto fue estudiado por Ness y col (59), donde demostraron que la estrategia de alternancia de colonoscopia con el teste del DNA fecal en intervalos de cinco años disminuirá la incidencia del cancer colorectal en 59% y la mortalidad en 60%. Adicionalmente, el mismo autor concluyó que comparando la estrategia de “no-rastreo” con aquella estrategia había un “ahorro/año” de \$14.528 para el hombre y \$17.095 para la mujer. Song y Ladabaum (60) adoptando un modelo previo para evaluar el coste-beneficio de la utilización del teste del DNA en las heces versus colonoscopia cada diez años, y suponiendo una sensibilidad de 52%, encontrada en un reciente estudio multicéntrico (44), claramente llegaron a la conclusión que el teste no invasivo es de mejor coste-beneficio cuando es comparado con el teste-invasivo (colonoscopia), en el modelo utilizado por aquellos autores.

CAPÍTULO XIII

13. POSIBILIDADES DE CREACIÓN Y EL POTENCIAL DE UN INSTRUMENTO DE ENCUESTA PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE CÁNCER DE COLON Y RECTO

El cáncer colorectal ha probado ser un excelente modelo de un sistema de información para el estudio del papel de factores hereditarios, de la carcinogénesis ambiental, de la activación oncogénica, de la inactivación de los genes supresores de tumores en la iniciación y de la progresión de tumores sólidos. Hay una progresión relativamente bien definida en el contexto clínico desde el adenoma benigno hasta la neoplasia maligna.

Hay un aforismo popular portugués que dice “*Somos lo que comemos*”. Claramente, la mejor forma de estudiar el perfil nutricional/dietético es intentar hacer una encuesta sobre antecedentes, hábitos alimentarios y otros factores ambientales. De hecho los epidemiólogos en el estudio del cáncer colorectal apuntan hacia múltiples factores relacionados con el CRC en general, tales como el humo de tabaco, la alimentación/nutrición/dieta, como está evaluado por el *National Cancer Institute* de Estados Unidos de América y por la *American Cancer Society*, al recomendar una dieta baja en grasa, elevada en fibra natural y rica en frutos y vegetales, como uno de los instrumentos para ayudar a prevenir y retrasar el inicio del proceso canceroso, así como evitar ciertos estilos de vida. Está demostrado epidemiológicamente que el riesgo de cáncer es mayor con regímenes calóricos elevados.

Hay un cierto número de ingredientes en los alimentos que son potencialmente preventivos del cáncer, que pueden actuar en varios niveles de la iniciación y de la promoción tumoral.

Por ejemplo, hay más de 200 estudios epidemiológicos revelando gran consistencia sobre el hecho de que la mayor incidencia de cáncer esta asociada con el bajo consumo de frutos y vegetales. La deficiencia en micronutrientes es una razón plausible para explicar la distorsión del metabolismo y las vías complicadas, muchas de las cuales pueden dañar el DNA. La ingestión óptima de un

micronutriente puede variar con la edad y la constitución genética y ser influenciada por otros aspectos de la dieta.

Las aminas heterocíclicas (HCA), que son agentes carcinogénicos pluripotentes, son formadas al cocinar a elevadas temperaturas, por pirolisis de las proteínas, aminoácidos o creatinina y pueden estar presentes en la dieta humana en concentraciones substanciales, dependiendo de los hábitos y modos de cocinar. Las HCA son claramente biodisponibles de la dieta humana normal. La vía de bioactivación propuesta consiste en la **N-hidroxilación** por la **CYP1A2** y subsecuente esterificación, que ha sido documentada en personas después de la caracterización extensiva *in vitro* y en modelos animales. El área de investigación más activa en lo que respecta las HCA se dedica más al cáncer de colon y de mama. Los humanos están expuestos a los **compuestos N-nitroso** en la dieta de una variedad de carnes curadas y pescados y sus derivados. Las N-nitrosaminas de la dieta han sido implicadas en los cánceres de esófago y de otras partes del aparato gastro-intestinal.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) son formados durante la combustión incompleta de materia orgánica. El **benzo(a)pireno** es el compuesto PAH mejor caracterizado disponible en la dieta. El calentamiento intenso de los alimentos, especialmente cocinados con carbón o leña resulta en la formación de PAH; el **benzo(a)pyreno** es formado en las galletas y en la corteza del pan y otros compuestos PAH que son producidos en la carne y pescado a la parrilla. Múltiples estudios epidemiológicos han responsabilizado la ingestión frecuente de grasa, especialmente la de origen animal, como la que está asociada a una tasa más elevada de incidencia de cáncer en la mama, la próstata y en el colon.

La apreciación global del “formato” y “tipo” de alimentación a través de una encuesta personalizada permite aumentar la sospecha clínica de los antecedentes y hábitos alimentarios en cuanto a la mayor exposición hacia agentes carcinogénicos/mutantes, incluyendo la evaluación de otros factores ambientales, así como la ingestión en exceso de alcohol y el vicio del tabaco.

La encuesta está precedida de un mensaje para justificar y motivar al candidato a su contestación, para así desarrollar las cuestiones relacionadas con los “*antecedentes, hábitos alimentarios y otros factores ambientales*”

ENCUESTA SOBRE CÁNCER COLORECTAL

La presente encuesta es parte de un proyecto innovador de una Institución Universitaria Europea y tiene como objetivo ampliar los conocimientos sobre la **Detección Precoz del Cáncer Colorrectal**.

Su respuesta **detallada, atenta y rigurosa**, es muy importante para la investigación clínica y es equivalente, en términos de apoyo desinteresado, a lo que representa si usted fuese un donante de sangre.

Así, apelamos a su colaboración para que sea posible en breve, investigar una enfermedad que en España es una de las principales causas de mortalidad por encima de los 50 años de edad.

Como estimará usted, cuantas más respuestas fuesen obtenidas, más fiables y científicas serán las conclusiones de este trabajo.

Vaya por delante nuestra gratitud y deseos de buena salud.

ENCUESTA SOBRE CÁNCER COLORECTAL

(Antecedentes, hábitos alimentarios y otros factores ambientales)

FECHA: _____

ENCUESTA N° _____

1 – DATOS PERSONALES

NO ESCRIBA SU NOMBRE PORQUE NO ES NECESARIO

Señale con **X** y llene los valores para peso y altura

01	SEXO	Masc.	<input type="checkbox"/>	Fem	<input type="checkbox"/>	EDAD	<input type="text"/>	PESO	<input type="text"/> Kgms.	ALTURA	<input type="text"/> mts.
----	------	-------	--------------------------	-----	--------------------------	------	----------------------	------	----------------------------	--------	---------------------------

Llene el campo

02.	PROFESIÓN	<input type="text"/>
-----	-----------	----------------------

Señale su opción con **X**

03. ESTADO CIVIL	(si vive en pareja de hecho responda casado)								
	Casado	<input type="checkbox"/>	Viudo	<input type="checkbox"/>	Separado	<input type="checkbox"/>	Divorciado	<input type="checkbox"/>	Soltero

Llene los campos

04. NATURALIDAD	Ayuntamiento	Provincia
Lugar de nacimiento		
Lugar donde ha vivido en su infancia/adolescencia		
Lugar donde ha vivido los últimos 3 años		

05. HÁBITOS ALIMENTARIOS

(*) Por favor, utilice **uno** de los siguientes valores (**3, 2, 1 y 0**) al llenar el cuadro de los ALIMENTOS en lo que respecta a todas las comidas del día.

Diariamente	3	Más de 3 veces p/semana	2	Ocasionalmente	1	Jamás / Raramente	0
--------------------	----------	--------------------------------	----------	-----------------------	----------	--------------------------	----------

Grado de frecuencia de la ingestión de los diversos alimentos

ALIMENTOS	COMIDAS			
	Desayuno (*)	Almuerzo(*)	Merienda (*)	Cena (*)
(designación)				
Pan				
Mantequilla				
Margarina				
Dulcería				
Queso fresco				
Queso semicurado				
Queso curado				
Requesón				
Dulce de membrillo				
Leche desnatada				
Leche semidesnatada				
Leche entera				
Yogur desnatado				
Yogur				
Café solo				
Café con leche				
Leche con chocolate				
Chocolate a la taza				
Huevos				
Bollería				
Empanadas				
Fibra / cereales				
Frutas				
Otros				
CARNES	Desayuno (*)	Almuerzo(*)	Merienda (*)	Cena (*)
Vaca / ternera				
Conejo				
Aves				
Carnero				
Jabalí				
Cerdo				

Jamón				
Fiambre				
Morcilla				
Salchichón				
Bacon				
Salchicha				
Otras				
PESCADOS	Desayuno (*)	Almuerzo(*)	Merienda (*)	Cena (*)
Pescados comunes				
Mariscos				
Bacalao				
Pescados grasos (atún, salmón, etc.)				
Otros				
BEBIDAS	Desayuno (*)	Almuerzo(*)	Merienda (*)	Cena (*)
Agua				Continúa
Vino				
Cerveza				
Zumos (enlatados / botella)				
Zumos naturales				
Coca Cola / Pepsi				
Infusión / te				
Aperitivos (Whiskey, coñac, etc.)				
Otras				
SOPAS	Desayuno (*)	Almuerzo(*)	Merienda (*)	Cena (*)
Legumbres				
Otras				

(*) Por favor, utilice **uno** de los valores (**3, 2, 1 y 0**) al llenar los cuadros de las siguientes preguntas.

Diariamente	3	Más de 3 veces p/semana	2	Ocasionalmente	1	Jamás / Raramente	0
--------------------	----------	--------------------------------	----------	-----------------------	----------	--------------------------	----------

¿Cómo consume las carnes y los pescados? (*)

06.	Cocidos		A la plancha		Estofados / guisados / rehogados		Asados		Fritos	
------------	---------	--	--------------	--	----------------------------------	--	--------	--	--------	--

07.	¿Utiliza alimentos precocinados / congelados ? (*)								
------------	----------------------------------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--

08. ¿En las comidas principales qué prefiere como acompañamiento? (*)

Arroz	
Ensaladas (tomate, cebolla, lechuga....)	
Patatas cocidas	
Patatas fritas	
Pasta	
Zanahorias / Nabos	
Leguminosas (garbanzo, guisantes, judías, habas, etc.)	
Verduras y otras legumbres	
Pan	
Otros	

09.	¿Consumes “fast food”? (*)								
------------	----------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--

10.	¿Para la comida hecha en casa utiliza grasa vegetal? (*)								
------------	----------------------------------------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--

11.	¿Para la comida hecha en casa utiliza grasa animal? (*)	
-----	---------------------------------------------------------	--

Señale su opción con una **X** en siguientes preguntas:

12.	¿Le gusta la comida con salsa?	Si		No	
-----	--------------------------------	----	--	----	--

13.	De los vegetales ¿cuáles prefiere?	Legumbres		Ensaladas	
-----	------------------------------------	-----------	--	-----------	--

14.	¿Cuántas veces toma café solo al día?	Más de 4		3		2		1		0
	¿Con azúcar?	Si		No		Edulcorante				

15.	¿Acostumbra calentar y/o descongelar la comida en microondas?	Si		No	
-----	---------------------------------------------------------------	----	--	----	--

16.	¿Acostumbra comprar platos precocinados?	Si		No	
-----	------------------------------------------	----	--	----	--

17.	¿O prepara la comida en su casa?	Si		No	
-----	----------------------------------	----	--	----	--

(En caso de que sea fumador, indique las cantidades)

18.	¿Fuma?	No		Si		¿Cuál es la media de cigarrillos por día?	_____
-----	--------	----	--	----	--	-------------------------------------------	-------

19.	¿Tiene animales en casa?	Perros		Gatos		Aves		Otros	
-----	--------------------------	--------	--	-------	--	------	--	-------	--

20.	¿Tiene aire acondicionado?	En casa	Si		No		En el trabajo	Si		No	
-----	----------------------------	---------	----	--	----	--	---------------	----	--	----	--

21.	¿Reside cerca de industrias contaminantes?	No		Si		¿Cuáles?	
-----	--------------------------------------------	----	--	----	--	----------	--

22.	¿Vive en familia?	Si		No	
-----	-------------------	----	--	----	--

23.	¿Vive solo?	Si		No	
-----	-------------	----	--	----	--

(*) Por favor, utilice uno de los valores **(3, 2, 1 y 0)** al llenar los cuadros de las siguientes preguntas (llene los campos si es el caso).

Diariamente	3	Más de 3 veces p/semana	2	Ocasionalmente	1	Jamás / Raramente	0
-------------	----------	-------------------------	----------	----------------	----------	-------------------	----------

24.	Si utiliza AUTO-MEDICACIÓN señale qué tipo de medicamentos toma:	(*)
	Cefaleas / jaquecas :	
	Estreñimiento :	
	Acedía / dispepsia / hartura :	
	Vitaminas / tónicos :	
	Analgésicos :	
	Calmantes / Ansiolíticos :	
	Para dormir :	
	Otros :	

Llene el campo

25.	¿Qué distancia recorre a pie de su casa al lugar de trabajo?	_____ mts.
-----	--------------------------------------------------------------	------------

Llene de acuerdo con los valores de la frecuencia (*)

26. ¿En qué ocupa su tiempo libre?	(*)
Televisión / lectura / ordenadores / Internet	
Practicar gimnasia / actividades de mantenimiento físico	
Practicar deporte	
Pasear a pie	
Otros	

ANTECEDENTES DE ENFERMEDADES PERSONALES

27. Indique de qué enfermedades crónicas o recurrentes sufre? (llene los campos)
1.
2.
3.
4.
5.

Señale su opción con una **X** en siguientes preguntas:
(Llene los campos si es el caso)

28. ¿Sufre de alguna enfermedad o trastorno intestinal?	Si	No
---------------------------------------------------------	----	----

29. Tiene estos síntomas en más de:	1 mes	3 meses	6 meses	Un año
Estreñimiento				
Diarrea				

30. ¿Ha tenido pérdida de sangre en las heces?	Si	No
------------------------------------------------	----	----

31. ¿Ha consultado a su médico por causa de este problema?	Si	No
------------------------------------------------------------	----	----

32. Si ha tenido pérdida de sangre ¿Ha consultado inmediatamente al médico?	Si	No
-----------------------------------------------------------------------------	----	----

33. Si ha tenido pérdida de sangre y no ha consultado inmediatamente al médico: ¿Cuánto tiempo ha dejado pasar?	Más de 2 meses	Más de 6 meses	Más de 1 año
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------	----------------	--------------

34. Si ha tenido pérdida de sangre y no ha consultado al médico en ese momento (o igual que si lo hubiese hecho más tarde):

¿Se automedicó suponiendo que eran hemorroides?	
-------------------------------------------------	--

35. En caso de que hubiese tenido pérdida de sangre, su médico ha pedido para usted:

Rayos X / clíster opaco	
Una rectosigmoidoscopia	
Una colonoscopia	

36. ¿Toma habitualmente algún tipo de medicación?	No	Si
---------------------------------------------------	----	----

37. Indique la medicación que toma regularmente	Por más de 3 meses	Por más de 6 meses	Por más de 1 año
1.			
2.			
3.			
4.			

5.						
6.						

38. ¿Sufre de hipertensión?	No		Por más de 1 año		Por más de 3 años		Por más de 5 años	
-----------------------------	----	--	------------------	--	-------------------	--	-------------------	--

39. ¿Tuvo algún ataque cardiaco o infarto del miocardio?	Si		No	
----------------------------------------------------------	----	--	----	--

40. ¿Há sufrido algún AVC/trombosis?	Si		No	
--------------------------------------	----	--	----	--

41. ¿Tiene algún familiar con cáncer en el intestino?	Si		No	
-------------------------------------------------------	----	--	----	--

42. Si su respuesta es sí señale su opción con una **X**

GRADO DE PARENTESCO	¿Quién?	¿Llegó a ser operado del intestino?	¿Falleció algún familiar como consecuencia de cáncer en el intestino?
Padre			
Madre			
Abuelos paternos			
Abuelos maternos			
Tíos paternos			
Tíos maternos			
Primos hermanos paternos			
Primos hermanos maternos			
Hermanos			
Hijos			

Continúa

43. Factores psíquicos

¿Acostumbra reaccionar depresivamente ante las contrariedades de la vida?	Si		No	
---------------------------------------------------------------------------	----	--	----	--

44. Si su respuesta es sí ¿cómo reacciona?

De modo depresivo/negativista	
Con indiferencia (alejado/desistencia)	
Con obsesión/fijación	
Con angustia / ansiedad / intranquilidad	
Con insomnio/perturbación del sueño	
Con fatiga crónica / falta de energía / motivación	
Cansancio / desánimo al despertar	
Otros	

45. ¿Encara la adversidad con serenidad ?	Si		No	
-------------------------------------------	----	--	----	--

46. ¿Intenta buscar culpables ante la adversidad?	Si		No	
---------------------------------------------------	----	--	----	--

47. Si su respuesta es sí, intente discriminar:

Condiciones de trabajo	
Condiciones económicas	
Personas de familia o amigos (as)	
Pareja frustrada	
Enfermedad (es)	
Incapacidad / inaptitud	
Azar / infelicidad / destino / suerte	
Otras causas o factores (Indique otras causas o factores externos a su voluntad)	

48. Si desea agregar información relacionada con el tema, descríbala en las diez líneas siguientes:

¡Gracias por su colaboración!

CAPÍTULO XIV

14. CONCLUSIONES

I– El cáncer es una enfermedad de base genética porque puede ser atribuido a alteraciones dentro de los genes, pero en muchos casos no es una enfermedad heredada. En una enfermedad heredada el defecto está presente en los cromosomas de un progenitor y es transmitido al cigoto.

II – Las alteraciones genéticas que llevan al apareamiento de muchos cánceres se originan en el DNA de una célula somática durante el período de la vida de un individuo afectado. Por causa de estas alteraciones genéticas, las células cancerosas proliferan sin control, produciendo tumores malignos que invaden los tejidos cercanos saludables.

III – El comportamiento de las células cancerosas es muy fácil de estudiar cuando crecen en cultura. Las células normales pueden ser convertidas en células cancerosas mediante su tratamiento con agentes genotóxicos, tales como químicos, radiaciones o viroses tumorales. La carcinogénesis es un proceso complejo, que evoluciona por etapas.

IV – En términos de biología molecular y celular el cáncer puede representar un relativo pequeño número de enfermedades causadas por defectos moleculares en funciones celulares resultantes de alteraciones similares en los genes de una célula. En última expresión se puede definir el cáncer como una enfermedad constituida por la expresión génica alterada.

V – Esta expresión génica alterada ocurre a través de un cierto número de mecanismos, incluyendo agresiones directas al DNA (tales como mutaciones, translocaciones, amplificaciones, deleciones, inserciones, etc), así como transcripciones y translaciones anormales.

VI – Si se considera el cáncer como una enfermedad que resulta de alteraciones en el DNA de las células somáticas. Entonces, acontece que cualquier actividad que aumenta la frecuencia de mutaciones genéticas es probable que aumente el riesgo de desarrollar cáncer.

VII – Los nucleótidos que se vuelven químicamente alterados o los nucleótidos que son incorporados incorrectamente durante la replicación son selectivamente removidos del DNA por mecanismo de reparación del DNA.

VIII – El CRC se desarrolla como el resultado alteraciones que regulan el crecimiento, la supervivencia y otros comportamientos celulares. Los cánceres colorectales se desarrollan a través de una de tres vías diferentes denominadas (1) inestabilidad cromosómica, (2) inestabilidad microsatélite y (3) “*CpG island methylator phenotype*”.

IX – Las células tumorales y normales, con su DNA, son liberadas en el flujo fecal, y solamente los genes mutados pueden ser identificados, los cuales indican la presencia probable de un neoplasma en el tracto gastrointestinal.

X – Recientemente fueron descritos nuevos avances en química clínica y biología molecular que llevaron al apareamiento de nuevas técnicas de abordaje no invasivas, que identifican mutaciones que son conocidas por estar asociadas con el CRC en el DNA que es desprendido en las heces por las lesiones malignas y premalignas del colon.

XI – El test del DNA extraído de las heces es considerado una herramienta de diagnóstico precoz de CRC, con una vocación de diagnóstico y de rastreo, a través de la detección de mutaciones genéticas características del CRC.

XII – Los genes habitualmente afectados son aquellos que contienen microsatélites en sus regiones de codificación; estos incluyen: (1) TGF (*transforming growth factor*) beta-1 receptor II; (2) *Insulin-like growth factor II receptor*; (3) BAX, (4) hMSH3, (5) hMSH6, (6) TCF4, (7) caspases, (8) beta-catenina, (9) wisp3, (10) MBD4.

XIII – El conocimiento de los factores de carcinogénesis en la nutrición/dieta es una contribución para la prevención, el rastreo y la historia diagnóstica del CRC.

XIV – El **HNPCC** ha sido descrito como una entidad clínica, caracterizada por una fuerte historia familiar de cánceres de colon de inicio precoz y asociados (Lynch II) sin pólipos numerosos, mucho tiempo antes de cualquier alteración genética causal a ser identificada.

XV – El HNPCC está relacionado con mutaciones “*germline*” o silenciamiento epigenético de genes “*mismatch repair*” (MMR) del DNA, por veces **MSH6**, **PMS1** ó **PMS2**, pero principalmente **MLH1** y **MSH2**, siendo muy útil utilizar los criterios clínicos de AMSTERDAM que son definidores del HNPCC para determinar la elegibilidad en la investigación de los aspectos genéticos del CRC.

15. BIBLIOGRAFIA (FORMATADA)

CAPÍTULO I

1. Ferri, K.F. and Kroemer, G. (2001) Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell Biol.* 3: E255-E263.
2. Cook, P.R. (2001) *Nuclear Structure and Function*. J. Wiley and Sons, New York.
3. Dundr, M. and Misteli, T. (2001) Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem. J.* 356:297-310.
4. Fox, A.H., Lam, Y.w., Leung, A.K., Lyon, C. E., Andersen, J., Mann, M. and Lamond, A.I. (2002) Paraspeckles: a novel nuclear domain. *Curr. Biol.* 12:13-25.
5. Phair, R.D. and Misteli, T. (2000) High mobility of protein in the mammalian nucleus. *Nature* 404:604-609.
6. Evan, G.I. and Vousden, K. H. (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411:342-348.
7. Guo, M. and Hay, B. A. (1999) Cell proliferation and apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:745-752.
8. Pucci, B., Kasten, M. And Giordano, A. (2000) Cell cycle and appoptosis. *Neoplasia* 2:291-299.
9. Grenn, D.R. and Evan, G.I.(2002) A matter of life and death. *Cancer cell* 1:19-30.
10. Van Diest, P.J., Brugal, G., and Baak, J.P.A. (1998) Proliferation markers in tumours:interpretation and clinical value. *J. Clin. Pathol.* 51:716-724.
11. Miller, M.M., Teng, C. J. Mitmaker, B. and Wang, E. (1995) Characterization of the tissue regression process in the uterus of older mice as apoptotic by the presence of Tp30, an isoform of terminin. *Eur. J. Histochem.* 39:91-100.
12. Hayflick, L. (1998) A brief history of the mortality and immortality of cultured cells. *Keio J. Med.* 47:174-182.
13. Thomas, G. (2000) Na encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation. *Nat. Cell Biol.* 2:E71-E72.
14. Cerutti, L. And Simanis V. (2000) Controlling the end of the cell cycle. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10:65-69.

15. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239-257.
16. Lockshin, R.A. and Zakeri, Z. (2001) Timeline: programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:545-550.
17. Gagna, C.E., Kuo, H-R., Florea, E., Shami, W., taormina, R., Vaswani, N., Gupta, M., Vijh, R. and Lambert, W.C. (2001) Comparison of a apoptosis and terminal differentiation:the mammalian aging process. *J. Histochem. Cytochem.* 49:929-930.
18. Van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F.C., Schutte, B. and Reutelingsperger, on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31:1-9.
19. Fadok, V.A. and Chimini, G. (2001) The phagocytosis of apoptotic cells. *Semin. Immunol.* 13:365-372.
20. Mehmet, H. (2000) Caspases find a new place to hide. *Nature* 403(6765):29-30.
21. Van Der Vliet, H.J., Wever, P.C., Van Diepen, F.N., Yong, S.L. and Ten Berge, I.J. (1997) Quantification of Bax/Bcl-2 ratios in peripheral blood lymphocytes, monocytes and granulocytes and their relation to susceptibility to anti-Fas (anti-CD95)-induced apoptosis. *Clin. Exp. Immunol.* 110:324-328.
22. Green, D.R. and Redd, J. C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312.
23. Shi, Y. (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol.Cell* 9:459-470.
24. Reed, J.C. (2002) Apoptosis-based therapies. *Nat. rev. Drug Discov.* 1:111-121.
25. Makin, G. (2002) targeting apoptosis in cancer chemotherapy. *Expert Opin. Ther. Targets* 6:73-84.
26. Darzynkiewicz, Z, Badner, E, Li, X, Gorczyca, W, and Melamed, M.R. (1999) Laserscanning cytometry. A new instrumentation with many applications. *Exp. Cell Res.* 249:1-12.
27. Gong J, Traganos, F, and Darzynkiewicz, Z (1995) Discrimination of G2 and mitotic cells by from cytometry based on different expression of cyclins A and B1. *Exp. Cell Res.* 220: 226-231.
28. Burke, L.C., Bybee, A and Thomas, N.S. (1992) The retinoblastoma protein is partially phosphorylated during early G1 in cycling cells but not in G1 cells arrested with alpha-interferon. *Oncogene* 7:783-788.
29. Thomas, N.S., Pizzey, A.R., Tiwari, S., Williams, C.D. and yang, J, (1998) p130, p107, and pRB are differentially regulated in proliferating cells and during cell cycle arrest by alpha-interferon. *J. Biol. Chem.* 273: 23659-23667.

30. Gothot, A, Van der Loo, J. C., Clapp, D.W. and Srour, E.F. (1998) Cell cycle-related changes in repopulating capacity of human mobilized peripheral blood CD34 (+) cells in non-obese diabetic/severe combined immune-deficient mice. *Blood* 92: 2641-2649.
31. Datar, S.A., Jacobs H.W., de La Cruz, A.F., Lehner, C.F., and Edgar, B.A. (2000) The drosophila cyclin D-cdk4 complex promotes cellular growth. *EMBO J.* 19: 4543-4554.
32. Meyer C.A., Jacobs, H.W., Datar, S.A., Du, W., Edgar, B.A., and Lehner, C.F. (2000) *Drosophila* cdk4 is required for normal growth and is dispensable for cell cycle progression. *EMBO J.* 19: 4533-4542.
33. Rane, S.G., Dubus, P., Mettus, R.V., Galbreath, E.J., Boden, G., Reddy, EP. and Barbacid, M. (1999) Loss of cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and cdk4 activation results in B-islet cell hyperplasia. *Nat. Genet.* 22: 44-52.
34. Tsutsui, T., Hesabi, B., Moons, D.S., Pandolfi, P.P., Hansel, K.S., Koff, ^a and Kiyokawa, H. (1999) Targeted disruption of cdk4 delays cell cycle entry with enhanced p27 (klp1) activity. *Mol. Cell Biol.* 19: 7011-7019.
35. Lea, N.C., Orr, S.J., Stoeber, K., Williams, G.H., Ibrahim, M.A.A., Mufti, G.J. and Thomas, N.S.B. (2003) Commitment point during Go-G1 that controls entry into the cell cycle. *Mol. Cell Biol.* (in press).
36. Morris, G.F. and Mathews, M.B. (1989) Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *J. Biol. Chem* 264: 13856-13864.
37. Zetterberg, A. (1997) Cell growth and cell cycle progression in mammalian cells, in: *Apoptosis and cell cycle control in cancer* (ed. N.S.B. Thomas). BIOS scientific Publishers Ltd, Oxford, pp.17-36.
38. Mao, X., Green, J.M., Safer, B., Lindsten, T., Frederickson, R.M., Miyamoto, S., Sonenberg, N. and Thompson, C.B. (1992) Regulation of transiation initiation factor gene expression during human T cell activation. *J. Biol. Chem.* 267: 20444-20450.
39. Smith, E.J., Leone, G., Degregori, J., Jakoi, L. and Nevins, J.R. (1996) The accumulation of an E2F-p130 transcriptional repressor distinguishes a Go cell state from a G1 cell state. *Mol. Cell Biol.* 16: 6965-6976.
40. Ogawa, H., Ishiguro, K, Gaubatz, S., Livingston, D.M. and Nakatani, Y, (2002) A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in Go cells. *Science* 296: 1132-1136.
41. Ezhevsky, S.A., Ho, A., Becker-Hapak, M., Davis, P.K. and Dowdy, S.F. (2001) Differential regulation of retinoblastoma tumor suppressor protein by G(1) cyclin-dependent kinase complexes in vivo. *Mol. Cell Biol.* 21: 4773-4784.

42. Stoeber, K., Tisty, T.D., Happerfield, L., Thomas, G.A., Romanov, S., Bobtow, L, Williams, E.D. and Williams. G.H. (2001) DNA replication licensing and human cell proliferation. *J. Cell Sci.* 114: 2027-2041.
43. Meng, M.V., Grossfeld, G.D., Williams, G.H., Dilworth, S., Stoeber, K., Mulley, T.W., Weinberg, V., Carrol, P.R. and Tisty, T.D. (2001) Minichromosome maintenance protein 2 expression in prostate: characterization and association with outcome after therapy for cancer. *Clin. Cancer Res.* 7: 2712-2718.
44. Stoeber, K., Halsall, I., Preeman, A., Swinn, R., Doble, A., Morris, L., Coleman, N. Bullock, N., Laskey, R.A., Hales, C.N. and Williams, G.H. (1999) Immunoassay for urothelial cancers that detects DNA replication protein Mcm5 in urine. *Lancet* 354: 1524-1525.
45. Freeman, A., Morris, L.S., Mills, A.D., Stoeber, K., Laskey, R.A., Williams, G.H. and Coleman, N. (1999) Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer res.* 5: 2121-2132.
46. Williams, G.H., Romanowski, P., Morris, L., Madine, M., Mills, A.D., Stoeber, K., Marr, J., Laskey, R.A. and Coleman, N. (1998) Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 95: 14932-14937.
47. Bloww, J.J., and Hodgson, B. (2002) Replication licensing-defining the proliferative state? *Trends Cell Biol.* 1: 72-78.
48. Zeterberg, A., Larsson, O. and Williams, K.G. (1995) What is the restriction point? *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 835-842.
49. EKHOLM, s.v., Zickert, p., Reed, s.i. AND Zetterberg. A. (2001) Accumulation of cyclin E is not a prerequisite for passage through the restriction point. *Mol. Cell Biol.* 21:3256-3265.
50. Williams, C.D., Linch, D.C., Sorensen, T.S., LaThangue, N.B., and Thomas, N.S.B. (1997) The predominant E2F complex in human primary haemopoietic cells and in AML blast contains E2F-4, DP-1 and p130 *Br. J. haematol.* 96: 688-696.
51. Roberts, R.J., Khwaja, A., Lie A. K.W., Bybee, A., Yong, K., Thomas, N.S.B. and Linch, D.C. (1994) Differentiation-linked changes in tyrosine phosphorylation, functional activlty, and gene expression downstream from the grandulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *Blood* 84: 1064-1073.
52. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* 227: 681-683.
53. Harlow, E. and Lane D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual.* C5H press, New York.
54. Tiwari, S, Jamal, R. And Thomas, N.S.B. (1996) In: *Protein Phosphorylation in Cell Growth Regulation* (ed. M.J. Clemens). Academic Press, London, pp.255-382.

55. Kitagawa, M., Higashi, H., Jung, H.-K., Suzuki-Takahashi, I., Ikeda, M., Tamai, K., Kato, J., Segawa, K., Yoshida, E., Nishimura, S. and Taya, Y. (1996) The consensus motif for phosphorylation by cyclin D1-Cdk4 is different from that for phosphorylation by cyclin A/E-Cdk2. *EMBO J.* 15:7060-7069.
56. Hansen, K., Farkas, T., Lukas, J., Holm, K., Ronnstrand, L. and Bartek, J. (2001) Phosphorylation-dependent and independent functions of p130 co-operate to evoke a sustained G1 block. *EMBO J.* 20:422-432.
57. Lam, E.W.F. and LaThangue, N.B. (1994) DP and E2F proteins: co-ordinating transcription with cell cycle progression. *Curr Opin. Cell Biol.* 6:859-866.
58. DePinho, R.A. (1998) Transcriptional repression. The cancer-chromatin connection. *Nature* 391: 533-536.
59. Chan, H.M., Krstic-Demonacos, M., Smith, L., Demonacos, C. and La Thangue, N.B. (2001) Acetylation control of the retinoblastoma tumour-suppressor protein. *Nat. Cell Biol.* 3: 667-674
60. LaThangue, N.B. (1994) DP and E2F proteins: components of a heterodimeric transcription factor implicated in cell cycle control. *Curr Biol.* 6: 443-450.
61. Peeper, D.S. and Bernards, R. (1997) Communication between the extracellular environment, cytoplasmic signalling cascades and the nuclear cell-cycle machinery? *FEBS Lett.* 410: 11-16.
62. Nevins, J., Jakoi, L. and Leone, G. (1997) Functional analysis of E2F transcription factor. *Methods Enzymol.* 283: 205-219.
63. Stiewe, T. and Putzer, B.M. (2000) Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat genet.* 26: 464-469.
64. Krek, W., Xu, G. And Livingston, D.M. (1995) Cyclin A-Kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of a S phase checkpoint. *Cell* 83: 1149-1158.
65. Williams, C.D., Watts, M., Linch, D.C. and Thomas, N.S.B. (1997) Characterization of cell cycle status and E2F complexes in mobilized CD34+ cells before and after cytokine stimulation. *Blood* 90: 194-203.
66. Ringrose, L. and Paro, R. (2001) Gene regulation. Cycling silence. *Nature* 412: 493-494.
67. Taya, Y. (1997) RB Kinases and RB-binding proteins: new points of view. *Trends Biochem. Sci.* 22: 14-17.

CAPÍTULO II

CAPÍTULO III

CAPÍTULO IV

1. Loeb L. A., Springgate C. F., Battula M. Errors in DNA replication as a basis omalignant change. *Cancer Res.*, 34:2311, 1974.
2. Loeb L. A. My personal thiughts on the recent joint U.S./Japan cancer meeting in Honolulu, Hawaii. *Jpn. J. Cancer Res.*, 80:1014-1015, 1989.
3. Loeb. L. A. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.*, 51:3075-3079, 1991.
4. Loeb. L. A. Microsatelite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.*, 54:5059-5063, 1994.
5. Cheng K. C., Loeb. L. A. Genomic instability and tumor progression: mechanistic considerations. *Adv. Cancer Res.*, 60:121-156, 1993.
7. Cleaver J. E., Kraemer K. H. Xeroderma pigmentosum Scriver C. R. et al eds. *Metabolic Basis of Inherited Disease*,:2949-2971, McGraw-Hill New York 1989.
8. Meyn M. S. Chromosome instability syndromes: lessons for carcinogenesis Kastan M. B. eds. *Genetic Instability and Tumorigenesis*, :71-148, Springer-Verlag Berlin 1997.
9. Nowell P.C The Clonal evolution of tumor cell populations. *Science (Washington DC)*, 194: 23-28, 1976.
10. DeMars R., Held K. R. The spontaneous azaguanine-resistant mutants of diploid human fibroblasts. *Humangenetik*, 16: 87-110, 1972.
11. Bohr V. A., Smith C. A., Okumoto D. S., Hanawalt P. C. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell*, 40: 359-369,1985.
12. Mellon I., Spivak G., Hanawalt P. C. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell*, 51: 241-249, 1987.
13. Jackson A. L., Loeb. L. A. The muation rate and cancer. *Genetic*, 148: 1483-1490, 1998.
14. Armitage P., Doll R. The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *Br. J. Cancer*, 8: 1/12,1954.

15. Renan M. J. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol. Carcinog.*, 7: 139-146, 1993.
16. Weinberg R. A. The molecular basis of oncogenesis and tumor suppressor genes. *Ann. NY Acad. Sci.*, 758: 331-338, 1995.
17. Knuutila S., Aalto Y., Autio K., Bjorkqvist A.-M., El-Rifai W., Hemmer S., Huhta T., Kettunen E., Kiuru-Kuhlefelt S., Larramendy M. L., Lushnikova T., Monni O., Pere H., Tapper J., Tarkkanen M., Varis A., Wasenius V.-M., Wolf M., Zhu Y. DNA copy number losses in human neoplasms. *Am. J. Pathol.*, 155: 683-694, 1999.
18. Kallioniemi A, Kallioniemi O-P., Piper J., Tanner M., Stokke T., Chen L., Smith H. S., Pinkel D., Gray J. W, Waldman F. M. Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genoma hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91 : 2156-2160, 1994.
19. Iwabuchi H., Sakamoto M., Sakunaga H., Ma Y. Y. Genetic analysis of benign, low-grade, and high-grade ovarian tumors. *Cancer Res.*, 55: 6172-6180, 1995.
20. El-Rifai W., Sarlomo-Rikala M., Knuutila A., Miettinen M. DNA copy number changes in development and progression in leiomyosarcomas of soft tissues. *Am. J. Pathol.*, 153: 985-990, 1998.
21. Bentz M., Plesch A., Stilgenbauer S., Dohner H., Lichter P. Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 21: 172-175, 1998.
22. Klein C. A., Schmidt-Kittler O., Schardt J. A., Pantel K., Speicher M. R., Riethmuller G. Comparative genoma hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 4494-4499, 1999.
23. Kerangueven F., Noguchi T., Coulier F., Allione F., Wargniez V., Simony-Lafontaine J., Longy M., Jacquemier J., Sobol H., Eisinger F., Birnbaum D. Genome-wide search for loss of heterozygosity shows extensive genetic diversity of human breast carcinomas. *Cancer Res.*, 57: 5469-5474, 1997.
24. Jackson A. L., Loeb. L. A. On the origin of multiple mutations in human cancers. *Semin. Cancer Biol.*, 8: 421-429, 1998.
25. Lengauer C., Kinzler K. W., Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature (Lond)*, 386: 623-627, 1997.
26. Orr-Weaver T. L., Weinberg R. A. A checkpoint on the road to cancer. *Nature (Lond)*, 392: 223-224, 1998.
27. Loeb. K. R., Loeb. L. A. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis (Lond)*, 21: 379-385, 2000.

28. Duesberg P., Rausch C., Rasnick D., Hehlmann R. Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95: 13692-13697, 1998.
29. Li R., Sonik A., Stindl R., Rasnick D., Duesberg P. Aneuploidy vs. gene mutation hypothesis of cancer: recent study claims mutation but is found to support aneuploidy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 3236-3241, 2000.
30. Hattori M., Fujiyama A., Taylor T. D., Watanabe H., Yada T., Park H-S., Toyoda A., Ishii K., Totoki Y., Choi D-K., Soeda E., Ohki M., Takagi T., Sakayi Y., Taudien S., Blechschmidt K., Polley A., Menzel U., Delabar J., Kumpf K., Lehmann R., Patterson D., Reichwald K., Rump A., Schillhabel M., Schuby A., Zimmermann W., Rosenthal A., Kudoh J., Shibuya K., Kawasaki K., Asakawa S., Shintani A., Sasaki T., Nagamine K., Mituyama S., Antonarakis S. E., Minoshima S., Shimizu N., Nordsiek G., Hornischer K., Brandt P., Scharfe M., Schon O., Desario A., Reichelt J., Kauer G., Blocker H., Ramser J., Beck A., Klages S., Hennig S., Riesselmann L., Dagand E., Haaf T., Wehrmeyer S., Borzym K., Gardiner K., Nizetic D., Francis F., Lehrach H., Reinhardt R., Yaspo M.-L. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature (Lond)*, 405: 311-319, 2000.
31. Hasle H., Clemmensen I. H., Mikkelsen M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet*, 355: 165-169, 2000.
32. Galipeau P. C., Cowan D. S., Sanchez C. A., Barrett M. T., Emond M.J., Levine D. S., Rabinovitch P. S., Reid B. J. 17p (p53) allelic losses, 4N (G2/tetraplo) populations, and progression to aneuploidy in Barrett's esophagus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 7081-7084, 1996.
33. Barrett M. T., Sanchez C. A., Prevo L. J., Wong D. J., Galipeau P. C., Paulson T. G., Rabinovitch P. S., Reid B. J. Evolution of neoplastic cell lineages in Barrett oesophagus. *Nat. Genet.*, 22: 106-109, 1999.
34. Rabinovitch P. S., Dziadon S., Brentnall T. A., Emond M. J., Crispin D. A., Haggitt R. C., Bronner M. P. Pancolonic chromosomal instability precedes dysplasia and cancer in ulcerative colitis. *Cancer Res.*, 59: 5148-5153, 1999.
35. Peinado M. A., Malkhosyan S., Velazquez A., Perucho M. Isolation and characterization of allelic loss and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 10065-10069, 1992.
36. Fishel R., Lescoe M. K., Rao M. R. S., Copeland N. G., Jenkins N. A., Garber J., Kane M., Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*, 75: 1027-1038, 1993.
37. Brentnall T. A., Crispin D. A., Bronner M. P., Cherian S. P., Hueffed M., Rabinovitch P. S., Rubin C. E., Haggitt R. C., Boland C. R. Microsatellite instability in nonneoplastic mucosa from patients with chronic ulcerative colitis. *Cancer Res.*, 56: 1237-1240, 1996.

38. Rampino N., Yamamoto H., Ionov Y., Li Y., Sawai H., Reed J. C., Perucho M. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* (Washington DC), 275: 967-969, 1997.
39. Stoler D. L., Chen N., Basik M., Kahlenberg M. S., Rodriguez-Bigas M. A., Petrelli N. J., Anderson G. R. The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 15121-15126, 1999.
40. Kuismanen S. A., Holmberg M. T., Salovaara R., Schweizer P., Aaltonen L. A., de la Chapelle A., Nystrom-Lahti M., Peltomaki P. Epigenetic phenotypes distinguish microsatellite-stable and unstable colorectal cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 12661-12666, 1999.
41. Fleisher A. S., Esteller M., Wang S., Tamura G., Suzuki H., Yin J., Zou T. -T., Abraham J.M., Kong D., Smolinski K. N., Shi Y.-Q., Rhyu M.-G., Powell S. M., James S. P., Wilson K. T., Herman J. G., Meltzer S. J. Hypermethylations of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res.*, 59: 1090-1095, 1999.
42. Jackson A. L., Chen R., Loeb L. A. Induction of microsatellite instability by oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 12468-12473, 1998.
43. Jackson, A. L., and Loeb, L. A. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat. Res.*, in press, 2001.
44. Early M. C., Crouse G. F. The role of mismatch repair in the prevention of base pair mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 15847-15491, 1998.
45. Zienolddiny S., Ryberg D., Haugen A. Induction of microsatellite by oxidative agents in human lung cancer cell lines. *Carcinogenesis* (Lond), 21:1521-1526, 2000.
46. Strauss B. S. Silent and multiple mutations in p53 and the question of the hypermutability of tumors. *Carcinogenesis* (Lond), 18: 1445-1452, 1997.
47. Hollstein M., Shomer B., Greenblatt M., Soussi T., Hovig E., Montesano R., Harris C. C. Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: update compilation. *Nucleic Acids Res.*, 24: 141-146, 1996.
48. Huang J., Papadopoulos N., McKinley A. J., Farrington S. M., Curtis L. J., Wyllie A. H., Zheng S., Willson J. K. V., Markowitz S. S., Morin P., Kinzler K. W., Vogelstein B., Dunlop M. G. APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 9049-9054, 1996.
49. Shibata D., Navidi W., Salovara R., Li Z.-H., Aaltonen L. A. Somatic microsatellite mutations as molecular tumor clocks. *Nat. Med.*, 2: 676-681, 1996.
50. Homfray T. F. R., Cottrell S. E., Ilyas M., Rowan A., Bodmer W. F., Tomlinson I. P. M. Defects in mismatch repair occur after APC mutations in the pathogenesis of sporadic colorectal tumours. *Hum. Mutat.*, 11: 114-120, 1998.

- 51.** Tomlinson I., Bodmer W. Selection, the mutation rate and cancer: ensuring that the tail does not wag the dog. *Nat. Med.*, 5: 11-12, 1999.
- 52.** Vogelstein B., Fearon E. R., Kern S. E., Hamilton S. R., Preisinger A. C., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smits A. M. M., Bos J. L. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.*, 319: 525-532, 1988.
- 53.** Shen C. -Y, Yu J. -C., Lo Y. -L., Kuo C. -H., Jou Y.-S., Huang C.-S., Lung J. -C., Wu C.-W. Genomewide search for loss heterozygosity using laser capture microdissected tissue of breast carcinoma: an implication for mutator phenotype and breast cancer pathogenesis. *Cancer Res.*, 60: 3884-3892, 2000.
- 55.** Eigen M. the origin of genetic information: viruses as models. *Gene (Amst)*, 135: 37-47, 1993.
- 56.** Loeb. L. A., Essigmann J. M., Kazazi F., Zhang J., Rose K. D., Mullins J. I. Lethal mutagenesis of HIV with mutagenic nucleoside analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 1492-1497, 1999.
- 58.** Lindhal T., Wood R. D. Quality control by DNA repair. *Science (Washington DC)*, 286: 1897-1905, 1999.
- 59.** Helblock H. J., Beckman K. B., Shigenaga M. K., Walter P. B., Woodall A. A., Yeo H. C., Ames B. N. DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxoguanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 288-293, 1998.
- 60.** Loeb. L. A., Preston B. D., Snow E. T., Schaaper R. M. Apurinic sites as common intermediates in mutagenesis. *Basic Life Sci.*, 38: 341-347, 1986.
- 61.** Holmquist G. P. Endogenous lesions, S-phase-independent spontaneous mutations and evolutionary strategies for base excision repair. *Mutat Res.*, 400: 59-68, 1998.
- 62.** Friedberg E. C., Walker G. C., Siede W. *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press Washington, DC 1995.
- 63.** Hanawalt P. C., Spivak G. *Transcription-coupled DNA repair* Dizdaroglu M. Karakaya E. eds. *Advances in DNA Damage and repair: Plenum Publishing Corp. New York 1999.*
- 65.** Wang L., Patel U., Ghosh L., Banerjee S. DNA polymerase B mutations in human colorectal cancer. *Cancer Res.*, 52: 4824-4827, 1992.
- 66.** Dibashi Y., Shuin T., Tsuruga H., Uemura H., Torigoe S., Kubota Y. DNA polymerase B gene mutations in human prostate cancer. *Cancer Res.*, 54: 2827-2829, 1994.
- 67.** Matsuzaki J., Dobashi Y., Miyamoto H., Ikeda I., Fujinami K., Shuin T., Kubota Y. DNA polymerase B gene mutations in human bladder cancer. *Mol. Carcinog.*, 15: 38-43, 1996.
- 68.** Tang M., Shen X., Frank E. G., O'Donnell M., Woodgate R., Goodman M. F. UmuD'2 C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia Coli Pol V*. *proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 8919-8924, 1999.

69. Masutani C., Araki M., Yamada A., Kusumoto R., Nogimori T., Maekawa T., Iwai S., Hanaoka F. Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity. *EMBO J.*, 18: 3491-3501, 1999.
70. Johnson R. E., Kondratieff C. M., Prakash S., Prakash L. hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. *Science (Washington DC)*, 285: 263-265, 1999.
71. Friedberg E. C., Gerlach V. L., Novel DNA polymerase offers clues to the molecular basis of mutagenesis. *Cell*, 98: 413-416, 1999.
72. Ellis N. A. DNA helicases in inherited human disorders. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 7: 354-363, 1997.
73. Yu C.-E., Oshima J., Fu Y.-H., Wijsman E. M., Hisama F., Alisch R., Matthews S., Nakura J., Miki T., Ouais S., Martin G. M., Mulligan J., Schellenberg G. D. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science (Washington DC)*, 272: 258-262, 1996.
74. Shen J.-C., Loeb L. A. The Werner syndrome gene. The molecular basis of RecQ helicase-deficiency diseases. *Trends Genet.*, 16: 213-220, 2000.
75. Ellis N. A., Groden J., Ye T.-Z., Strugheim J., Lennon D. J., Ciocci S., Proytcheva M., German J. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell*, 83: 655-666, 1995.
76. Fukuchi K.-i., Tanaka K., Kumahara Y., Marumo K., Pride M. B., Martin G. M., Ronnat R. J. J. Increased frequency of 6-thioguanine-resistant peripheral blood lymphocytes in Werner syndrome patients. *Hum. Genet.*, 84: 249-252, 1990.
77. Sekowski J. W., Malkas L. H., Schnaper L., Bechtel P. E., Long B. J., Hickey R. J. Human breast cancer cells contain an error-prone DNA replication apparatus. *Cancer Res.*, 58: 3259-3263, 1998.
78. Greenblatt M. S., Bennett W. P., Holsstein M., Harris C. C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.*, 54: 4855-4878, 1994.
79. Harris C. C. p53. At the crossroads of molecular carcinogenesis and cancer risk assessment. *Science (Washington DC)*, 262: 1980-1981, 1993.
80. Levine A. J., p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88: 323-331, 1997.
81. Mao E. F., Lane L., Lee J., Miller J. H. Proliferation of mutators in a cell population. *J. Bacteriol.*, 179: 417-422, 1997.
82. Miller J. H., Suthar A., Tai J., Yeung A., Truong C., and Stewart J. L. Direct selection for mutators in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, in press, 2001.

- 83.** Loeb L. A. Transient expression of a mutator phenotype in cancer cells. *Science (Washington DC)*, 277:1449-1450, 1997.
- 84.** Illmensee K., Mintz B. Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73: 549-553, 1976.
- 85.** Ziegler A., Leffell D. J., Kunala S., Sharma H. W., Gailani M., Simon J. A., Halperin A. J., Baden H. P., Shapiro *proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:4216-4220, 1993.
- 86.** Ross R. K., Yuan J.-M., Yu M. C., Wogan G. N., Quian G.-S., Tu J. -T., Groopman J. D., Gao Y.-T., Henderson B. E. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 339:943-946, 1992.
- 87.** Denissenko M. F., Pao A., Tang M.-S., Pfeifer G. P. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in p53. *Science (Washington DC)*, 274:430-432, 1996.
- 88.** Jonason A. S., Kunala S., Pride G. J., Restifo R. J., Spinelli H. M., Persing J. A., Leffell D. J., Tarone R. E., Brash D. E. Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 14025-14029, 1996.
- 89.** Kiechle M., Hinrichs M., Jacobsen A., Luttes J., Pfisterer J., Kommoss F., Arnold N. Genetic imbalances in precursor lesions of endometrial cancer detected by comparative genomic hybridization. *AM. J. pathol.*, 156: 1827-1833, 2000.
- 90.** Tlsty T. D., Margolin B. H., Lum K. Differences in the rates of gene amplification in nontumorigenic and tumorigenic cell line as measured by Luria-Delbruck fluctuation analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 9441-9445, 1989.
- 91.** Steiner G., Schoenberg M. P., Linn J. F., Mao L., Sidransky D. Detection of bladder cancer recurrence by microsatellite analysis of urine. *Nat. Med.*, 3: 621-624, 1997.
- 92.** Field J. K., Liloglou T., Xinarianos G., Prime W., Fielding P., Walshaw M. J., Turnbull L. Genetic alterations in bronchial lavage as a potential marker for individuals with a high risk of developing lung cancer. *Cancer Res.*, 59: 2690-2695, 1999.
- 93.** Hussain S. P., Harris C. C. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer res.*, 58: 4023-4037, 1998.
- 94.** Hussain S. P., Amastad P., Raja K., Ambs S., Nagashima M., Bennett W. P., Shields P. G., Ham A., -J., Swenberg J. A., Marrogi A. J., Harris C. C. Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res.*, 60: 3333-3337, 2000.
- 95.** Yamada T., De Souza A. T., Finkelstein S., Jirtle R. L. Loss of the gene encoding mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptor as an early event in liver carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 10351-10355, 1997.

96. Sillber J. R., Blank A., Bobola M. S., Mueller B. A., Kolstoe D. D., Ojemann G. A., Berger M. S. Lack of the DNA repair protein O-methylguanine-DNA methyltransferase in histologically normal brain adjacent to primary human brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:6941-6946, 1996.
 97. Baik S. C., Youn H. S., Chung M. H., Lee W. K., Cho M. J., Ko G. H., Park C. K., Kasai H., Rhee K. H. Increased oxidative DNA damage in helicobacter pylori-infected human gastric mucosa. *Cancer Res.*, 56: 1279-1282, 1996.
 98. Shimoda R., Nagashima M., Sakamoto M., Yamaguchi N., Hirohashi S., Yokota J., Kasai H. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis. *Cancer Res.*, 54: 3171-3172, 1994.
 99. DeMaria N., Colantoni A., faguioli S., Liu G.-J, Rogers B. K., farinati F., Van Thiel D. H., Floyd R. A. Associatin between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. *Free Radic. Biol. Med.*, 21: 291-295, 1996.
 100. Rabinovitch P. S., Gollahon K. A., Jackson A. L., Palanca B. J., Shen W. T. Flow cytometric assay of DNA damage by alkaline unwinding coupled with DNA repair endonucleases. *Cytometry*, 8 (Suppl.): 38 1996.
 101. Brentnall T. A., Chen R., Lee J. G., Kimmey M. B., Bronner M. P., Haggitt R. C., Kowdley K. V., Hecker L. M., Byrd D. R. Microsatellite instability and K-ras mutations associated with pancreatic adenocarcinoma and pancreatitis. *Cancer Res.*, 55: 4264-4267, 1995.
-

CAPÍTULO V

1. CANCER STATISTICS REVIEW 1973 – 1996. See <http://www-seer.ins.nci.nih.gov>.
2. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 1999; 49:8-31.
3. Correa, P and Haenszel, W, 1978. The epidemiology of large bowel cancer. *Advances in Cancer Research*, 26, 1-141.
4. Parkin DM, Pisani P., Ferlay J. Global cancer statistics. *Ca Cancer J. Clin.*, 49:33-64, 1999.
5. RIESLAG, Eisner MP, Koary C. L. Hankey B. F, Miller B.A, Clegg et al.. SEE Cancer Statisticas Reviwews, 1973 – 1997., National Cancer Institute, Bethesdam, MD 2000.
6. American Cancer Society. Cancer Facts and Figues., American Cancer Society Atlanta, GA2000.

7. American/Cancer Society. Cancer Facts and Figures. American Cancer Society Atlanta, GA 2001.
8. Carethers JM. Racial and ethnic factors in the genetic pathogenesis of colorectal cancer. *J. Assoc. Acad. Minor Phys.*, 10:59 – 67, 1999.
9. Weaver P, Harrison B, Eskander G, Jahan MS, Tanzo V, Williams W, Weaver WL, Walker CR, Turner E, Hoover EL. Colon Cancer in blacks: a disease With a worsening prognosis. *J Natl. Med. Assoc.*, 83:133 – 136, 1991.
10. Potter JD. Colorectal cancer:molecules and populations. *J. Natl. Cancer Inst. Bethesda*, 91:916 – 932, 1999.
11. Food, Nutrition and Prevention of Cancer:Aglobal Perspective. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, 1997
12. Slattery ML. Diet, lifestyle and colon cancer. *Semin. Gastrointest. Dis.*, 11 :142-146, 2000.
13. Boyle P, d’Onofrio A, Maisonneuve P, Severi G, Robertson C, Tubiana M et al. Measuring progress against cancer in Europe. Has the 15% decline targeted for 2000 come about? *Ann. Oncol.* 2003; 14:1312 – 25.
14. Boyle P, Autier P, Bartelink H, Baselga J, Boffetta P, Burn J et al. European code Against Cancer an cientific justification: third version 2003. *Ann. Oncol.* 2003;14.973 – 1005.
15. Weir HK, Thun MJ, Hankey BF, Ries LA, Howe HL, Wingo PA et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer 1975 – 2000, Featuring the Uses of Surveillance Data for Cancer Prevention and Control. *J. Natl. Cancer Inst.* 2003; 95:1276 – 1299.
16. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur. J. Cancer* 2001 ; 37 Suppl. 8 :4 – 66.
17. Doll R. And Peto R. The causes of Cancer. Oxford: Oxfor University Press, 1981.
18. Coleman MP, Aylin P. editors. Death certification and mortality statistics:an international perspective. *Studies on Medical and Population Subjects N° 64*. London: TSO, 2000.
19. Parkin DM, Wagner G, Muir C, editors. The role of the registry in cancer control. IARC Scientific Publications N° 66. Lyon France: IARC, 1985.
20. Berrino F, Capocaccia R, Estéve J, Gatta G, Hakulinen T, Micheli M. Et al., editors. Survival of cancer patientes in Europe – the EUOCARE study II. IARC Scientific Publications N° 151. Lyon France: International Agency for Research on Cancer, 1999.
21. The World Health Report. Geneva Switzerland: WHO;1997.

22. Parkin DM, Muir CS, Whelan SI, Gao JT, Ferlay J, Powell J. Cancer incidence in five continents. Lyon France: International Agency for Research on Cancer; 1992.
23. Muir C, Waterhouse J, Mack T, Powell J, Whelan S, Smans M, et al cancer incidence in five continents. Lyon France: International Agency for Reseach on Cancer; 1987.
24. McMichael AJ, Potter JD. Reproduction, endogenous and exogenous sex hormones, an colon cancer : a review and hypothesis. J. Natl. Cancer Inst. 1980; 65:1201-7.
25. Ries LA, Hankey BF, Edwards BK. Cancer statistics review 1973-87. Bethesda MD: National Institutes of Health, National Cancer Institute: 1990 report n° DHHS Publ n° NIH 90-2789.
26. McMichael Aj, Giles GG. Cancer in migrantes to Australia: extending the descriptive epidemiological data. Cancer Research 1988; 48:751-6.
27. Haenzel W. Cancer mortality among the foreign born in the United States. J. Natl. Cancer Inst. 1961;26:37-132.
28. MacklinM. Inheritance of cancer of the stomach and large intestine. J. Natl. Cancer Inst. 1960;24:551-71.
29. Veale AM;Intestinal polyposis. Cambridge U.K.:Cambridge University Press;1965.
30. Utsunomiya J, Linch HT. Hereditary colorectal cancer. New York NY: Springer-verlag;1990.
31. Gardner EJ. A genetic and clinical study of intestinal polyposis, a predisposing factor for carcinoma of the colon and rectum. Am. J. Hum. Genet. 1951;3:167-76.
32. Willet WC. Dietary epidemiology. Oxford UK: Oxford University Press; 1990.
33. World Cancer Research Fund WCRF Panel Potter JD, Chair. Diet, nutricion and the Prevention of cancer: a global perspective. Washington DC: WCRF/American Institut of Cancer Reseach; 1997.
34. Potter JD, Slattery ML, Bostick RM, GapsturSM. Colon cancer: a Review of epidemiology. Epidemiol. Rev. 1993;15:499 – 545.
35. Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit and cancer prevention: a review. J. Am. Diet Assoc.1996;96:1027-39.
36. Hill AB. The enviroument and disease: asociation or causation? Pro. R. Soc. Med. 1965;58:295-300
37. Sing PN, Fraser GE. Diectary Risk factors for colon cancer in a low-risk population. Am. J. Epidemiol. 1998;148:761-74.
38. Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz G, Rimm EB, Willett WC. Relationship of diet to risk of colorectal adenoma in men. J. Natl Cancer Inst. 1992;84:91-8.

39. Trock B, Lanza E, Grenwald P. Dietary fiber, vegetables and colon cancer: critical review and meta-analyses of epidemiologic evidence. *J. Natl. cancer Inst.* 1990;82:650-61.
40. Burkitt DP. Related disease – related cause? *Lancet* 1969;2:1229-31.
41. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Rosner B, et al. Dietary fiber and risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N. Eng. J. Med.* 1999;340:169 – 76.
42. Howe GR, Benito E, Castellato R, Cornee J, Esteve J, Galagher RP, et al. Dietary intake of fiber and decreased risk of cancers of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. *J. Natl. Cancer Inst.* 1992;84:1887-96.
43. Decosse JJ, Miller HH, Lesser ML. Effect of Wheat fiber and vitamins C and E on rectal polyps in patients with familial adenomatous polyposis. *J. Natl. Cancer Inst.* 1989;81:1290-7
44. Maclellan R, Macrae F, Bain C, Battistutta D, Chapuis P, Graten H, et al. Randomized trial of intake of fat, fiber and beta carotene to prevent colorectal adenomas. The Australian Polyp Prevention Project. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995;87:1760-6.
45. Potter JD. Fiber and colorectal cancer – where to now? *N. Engl. J. Med.* 1999.
46. Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit and cancer II. Mechanisms. *Cancer Causes Control* 1991;2:427-42.
47. Freudenheim JL, Graham S, Marshall JR, Hanghey BP, Cholewinski S, Wilkinson G. Folate intake and Carcinogenesis of the colon and rectum. In. *J. Epidemiol* 1991;20:368-74.
48. Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Alcohol, low-methionine-low-folate diets and risk of colon cancer in men. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995;87:265-73.
49. Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Alcohol, low-methionine-low-folate diets and risk of colon cancer in men. *J. Natl. cancer Inst.* 1995;87:265-73.
50. Slattery ML, Schaffer D, Edwards SL, Ma KN, Potter JD. Are dietary factors involved in DNA methylation associated with colon cancer? *Nutr. Cancer* 1997;28:52-62.
51. Kato I, Akhmedkhanov A, Koenig K, Toniolo PG, Shore RE, Riboli E. Prospective study of diet and female colorectal cancer: the New York University Women’s Health Study. *Nutr. Cancer* 1997;28:276-81.
52. Key T, Fraser G, Thorogood M, Appleby P, Beral V, Reeves G, et al. Mortality in vegetarians and non-vegetarians: a collaborative analysis of 8300 deaths among 76.000 men and women in five prospective studies. *Public Health Nutr.* 1998;1:33-41.

53. Gerhardsson de Verdier M, Hagman U, Peters RK, Steineck G, Overvik R. Meat, cooking methods and colorectal cancer: a case-referent study in Stockholm. *Int. J. Cancer* 1991;49:520-5.
54. Schiffman MH, Felton JS:Re:”Fried foods and risk of colon cancer”[letter],*Am.J. Epidemiol.* 1990;131:376-8.
55. Probst-Hensch NM, Sinha R, Longmecker MP, Witte JS, Ingles SA, Franke HD, et al. Large sigmoidoscopy-based case-control study in California (United States). *Cancer Causes Control* 1997;8:175-83.
56. Howe GR, Aronson KJ, Benito E, Vastelleto R, Cornee J, Duffy S, et al. The relationship between dietary fat intake and risk of colorectal cancer: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. *Cancer Causes Control* 1997;8:215-28.
57. Giovannucci E, Goldin B. The role of fat, fatty acids, and total energy intake in the etiology of human colon cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 1997;66(8 suppl): S1564 – S1571.
58. Bostick RM, Fosdick L, Wood JR, Grambsch P, Grandits GA, Lillemoe TJ, et al. Calcium and colorectal epithelial cell proliferation in sporadic adenoma patients: a randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995;87:1307-15.
59. Hyman J, Baron JA, Dain BJ, Sandler RS, Haide RW, Mandel JS, et al. Diet and supplemental calcium and the recurrence of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998;7:291-5.
60. Baron JA, Beach M, Mandel JS, Van Stolk RU, Haile RW, Sandler RS, et al. Calcium supplements for the prevention of colorectal adenomas. Calcium Polyp Prevention Study Group. *N. Engl. J. Med.* 1999;340:101-7.
61. Giovannucci E, Ascherio A, Rimm B, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Ann. Intern. Med.* 1995;122:327-34.
62. Bostick RM, Potter JD, Kuski LH, Sellers TA, Steinmetz KA, McKenzie DR, et al. Sugar, meat, and fat intake, and non-dietary risk factors for colon cancer incidence in Iowa Women (United States). *Cancer Causes Control* 1994;5:38-52.
63. Faruqi JF JR, Lloyd W, Smith EM, Eagoner JK. Cancer mortality among nuns: role of marital status in etiology of neoplastic disease in women. *J. Natl Cancer Inst.* 1969; 42:455-68.
64. Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat. Genet.* 1994;7:536-40.
65. Potter JD, Bostick RM, Grandits GA, Fosdick L, Elmer P, Wood J, et al. Hormone replacement therapy is associated with lower risk of adenomatous polyps of the large bowel: the Minnesota Cancer Prevention Research Unit case-control study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1996;5:779-84.

66. Newcomb PA, Storer BE. Postmenopausal hormone use and risk of large bowel cancer. *J. Natl Cancer Inst* 1995;87:1416.
67. Kampman E, Potter JD, Slattery ML, Caan BJ, Edwards S. Hormone replacement therapy, reproductive history, and colon cancer: a multicenter, case-control study in the United States. *Cancer causes control* 1997;8:146-58
68. Jacobson JS, Neugut AI, Garbowski GC, Ahsan H, Wayne JD, Treat MR, et al. Reproductive risk factors for colorectal adenomatous polyps (New York city, NY, United States). *Cancer causes control* 1995;6:513-8
69. Grodstein F, Martinez ME, Platz EA, Giovannucci E, Colditz GA, Kautzky M, et al. Postmenopausal hormone use and risk of colorectal cancer and adenoma. *Ann Intern Med.* 1998;128:705-12.
70. Woolf C. A genetic study of carcinoma of the large intestine. *Am J Hum Genet* 1958;10:42-7.
71. Lovett E. Family studies in cancer of the colon and rectum. *Br. J. Surg* 1976;63:13-8.
72. Bale SJ, Chakravarti A, Strong LC. Aggregation of colon cancer in family data. *Genet epidemiol* 1984;1:53-61.
73. Burt RW, Bishop DT, Canon LA, Double MA, Lee RG, Skolnick MH. Dominant inheritance of adenomatous colonic polyps and colorectal cancer. *N Engl J Med* 1985;312:1540-4.
74. Carsten B, Soll-Johanning H, Villadsen E, Sondergaard JO, Linge E. Familial Aggregation of colorectal cancer in the general population. *Int. J Cancer* 1996;68:428-35.
75. Kune GA, Kune S, Watson LF. Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations, and medications: case control results from the Melbourne colorectal cancer study. *Cancer Res* 1988;48:4399 – 404.
76. Rosenberg L, Palmer JR, Zamber AG, Warshauer ME, Stolley PD, Shapiro S. A hypothesis: nonsteroidal anti-inflammatory drugs reduce the incidence of large-bowel cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:355-8.
77. Suth O, Mettlin C, Petrelli NJ. Aspirin use, cancer, and polyps of the large bowel. *Cancer* 1993;72:1171-7.
78. Peleg II, Maibach HT, Brown SH, Wilcox CM. Aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drug use and the risk of subsequent colorectal cancer. *Arch Intern Med.* 1994;154:394-9.
79. Muscat JE, Stellman SD, Wynder EL. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer. *Cancer* 1994;74:1847-54.
80. La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, Conti E, Montella M, Graiosa A, et al. Aspirin and colorectal cancer. *BR. J. Cancer* 1997;76:675-7.

81. Rosenberg L, Louik C, Shapiro S. Nonsteroidal antiinflammatory drug use and reduced risk of large bowel cancer. *Cancer* 1998;82:2326-33.
82. Schreinemachers DM, Everson RB. Aspirin use and lung, colon, and breast cancer incidence in a prospective study. *Epidemiology* 1994;5:138-46.
83. Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willett WC. Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann Intern Med* 1994;121:241-6.
84. Giovannucci E, Egan Km, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, et al. Aspirin and the risk of colorectal cancer in Women. *N Engl J Med* 1995;333:609-14.
85. Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CWJr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer *N Engl J Med* 1991;325:1593-6.
86. Grenberg Er, Baron JA, Freeman DH, Mandel JS, Haile R. Reduced Risk of large-bowel adenomas among aspirin users. The polyp prevention study group. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85:912-6.
87. Logan RF, Little J, Hawtin PG, Hardcastle JD. Effect of aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs on colorectal adenomas: case control study of subjects participating in the Nottingham faecal occult blood screening programme. *BMJ* 1993;307:285-9.
88. Giardiello FM, Hamilton Sr, Krus AJ, Piantadosi S, Hyland LM, Celano O, et al. Treatment of colonic and rectal adenomas With sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993;328:1313-6.
89. Paganini-Hill A, Chao A, Ross RK, Henderson BE. Aspirin use and chronic diseases: a cohort study of the elderly. *BMJ* 1989;299:1247-50
90. Gann PH, Manson JE, Glynn RJ, Buring JE, Hennekens CH. Low-dose aspirin and incidence of colorectal tumores in a randomized trial. *J Natl cancer Inst.* 1993;85:1220-4.
91. Sturmer T, Glynn RJ, Lee IM, Manson JE, Buring JE, Hennekens CH. Aspirin use and colorectal cancer: post-trial follow-up data from the physicians Health Study. *Ann Intern Med* 1998;128:713-20.
92. Craven PA, Derubertis FR. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1992;36:2251-70.
93. Pollard M, Luckert PH. Indomethacin treatment of rats with dimethylhydrazine-induced intestinal tumors. *Cancer treat Rep* 1980;64:1323-7
94. Narisawa T, Sato M, Tani M, Kudo T, Takahashi T, Goto A. Inhibition of development of methylnitrosourea-induced rat colon tumors by indomethacin treatment. *Cancer res* 1981;41:1954-7

95. Moorghen M, Ince P, Finney KJ, Sunter JP, Appleton DR, Watson AJ. A protective effect of sulindac against chemically induced primary colonic tumors in mice. *J Pathol* 1988;156:341-7
96. Reddy BS, Maruyama H, Kelloff G. Dose-related inhibition of colon carcinogenesis by dietary piroxicam, a nonsteroidal antiinflammatory drug, during different stages of rat colon tumor development. *Cancer res* 1987;47:5340-6
97. Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS. Chemo-preventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *cancer res* 1998;58:409-12.
98. Wynder EL, Shigematsu T. Environmental factors of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1967;20:1520-61
99. Slattery ML, West DW, Robison LM, French TK, Ford MH, Schuman KL, et al. Tobacco, alcohol, coffee, and caffeine as risk factors for colon cancer in a low-risk population. *Epidemiology* 1990;1:141-5.
100. Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Kearney J, et al. A prospective study of cigarette smoking and risk of colorectal adenoma and colorectal cancer in U. S. men. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:183-91
101. Giovannucci E, Colditz GA, Stampfer MJ, Hunter D, Rosner BA, Willett WC, et al. A prospective study of cigarette smoking and risk of colorectal adenoma and colorectal cancer in US women. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:192-9
102. Slattery ML, Potter JD, Friedman GD, Ma KN, Edwards S. Tobacco use and colon cancer. *Int J Cancer* 1997;70:259-64
103. Knekt P, Hakama M, Jarvinen R, Puukka E, Heliovaara M. Smoking and risk of colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998;78:136-9.
104. Hoff G, Vatn M, Larsen S. Relationship between tobacco smoking and colorectal polyps. *Scand J Gastroenterol* 1987;22:13-6
105. Demers RY, Neale AV, Demers P, Deighton K, Scott RO, Dupuis MH, et al. Serum cholesterol and colorectal polyps. *J Clin Epidemiol* 1988;41:9-13
106. Kikendall JW, Bowen PE, Burgess MB, Magnetti C, Woodward J, Langenberg P. Cigarettes and alcohol as independent risk factors for colonic adenomas. *Gastroenterology* 1989;97:660-4
107. Kono S, Ikeda N, Yanai F, Shinchi K, Imanishi K. Alcoholic beverages and adenomatous polyps of the sigmoid colon: a study of male self-defense officials in Japan. *Int J Epidemiol* 1990;19:848-52
108. Zahm SH, Cocco P, Blair A. Tobacco smoking as a risk factor for colon polyps. *Am J Public Health* 1991;81:846-9

109. Monet E, Allemand H, Farina H, Carayon P. Cigarette smoking and the risk of colorectal adenoma in men. *Sacnd J Gastroenterol*, 1991;26:758-62
110. Cope GF, Wyatt JJ, Pinder IF, Lee in patients with colorectal adenomatous polyps. *Gut* 1991;32:70-2
111. Honjo S, Kono S, Schinchi K, Imanishi K, Hirohato T. Cigarette smoking alcohol use and adenomatous polyps of the sigmoid colon. *Jp J Cancer Res*1992;83:806-11
112. Olsen J, Kronborg O. Coffee, tobacco and adenoma of large intestine. *Int J Epidemiol* 1993 ;22 :398-402
113. Sandler RS, Lyles CM, Mcanhiffe C, Woosely JT, Kupper LL. Cigarette smoking, alcohol, and the risk of colorectal adenomas. *Gastroenterology* 1993;104.1445-51
114. Lee WC, Neugut AI, Garbowski GC, Forde KA, Treat MR, Waye JD, et al. Cigarettes, alcohol, coffee, and coffee as risk factors for colorectal adenomatous polyps. *Ann Epidemiol* 1993;3:239-44
115. Martinez ME, McPherson RS, Annegers JF, Levin B. Cigarette smoking and alcohol consumption as risk factors for colorectal adenomatous polyps *J Natl Cancer Inst* 1995;87:274-9
116. Potter JD, Bigler J, Fosdick L, Bostik RM, Kampam E, Chen C, et al. colorectal adenomatous and hyperplastic polyps: smoking and N-acetyltransferase polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8:69-75.
117. Stocks P. Cancer incidence in North Wales and Liverpool region in relation to habits and environment. *Br Emp. Cancer Campaign 35th Annual Report* 1957;1:127.

CAPÍTULO VI

1. Perera, F.P. (1997) Environment and cancer:who are susceptible?Science 278:1068-1073-
2. Shields, P.G. & Harris, C.C. (2000) Cancer risk and low penetrance susceptibility genes in gene-environment interactions. J. Clin. Incol. 18:2309-2315.
3. Dipple, A. (1995) DNA adducts of chemical carcinogens. Carcinogens 16:437-441.
5. Strickland, P.T. & groopman, J.D. (1995) Biomarkers for assessing environmental exposure to carcinogens in the diet. Am.J.Clin.Nutr. 61 (suppl.3):710S-720S
6. Lipkin, M., Reddy, B., Newmark, H. &Lamprecht, S.A. (1999) Dietary factors in human colorectal cancer. Annu. Rev. Nutr. 19 :545-586.
7. Dumont, N. (1999) Genetic and epigenetic contributions to colorectal cancer. APMIS 107:711-722.
8. Haliwell, B. (1999) Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species:measurement, mechanism and the effects of nutrition. Mutat. Res. 443:37-52.
9. Ames, B. N. Gold, L.S. (1998) The causes and prevention of cancer:the role of environment. Biotherapy 11:205-220.
10. Harris, C.C. (1989) Interindividual variation among humans in carcinogen metabolism, DNA adduct formation and DNA repair. Carcinogenesis 10:1563-1566.
11. Adamson, R. H., Thorgeirsson U.P., Snyderwine, E.G., Thorgeirsson, S.S., Reeves, J., Dalgard D. W., takayama, S. & Sugimura, T. (1990) Carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in nonhuman primates: inducition of tumors in three macaques. Jpn. J. Cancer Res. 81:10-14.
12. Kinzler, K. W. & Vogelstein, B.(1998) Landscaping the cancer terrain. Science 280:1036-1037.
13. Perera, F.P. (1996) Molecular epidemiology:insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention. J. Natl. Cancer Inst. 88:496-509.
15. Yuspa, S. H. & Gelboin, P. G. (1997) Etiology of cancer:chemical. In: Cancer: Principles an Practice of point mutation of c-Ki-Ras and N-ras oncogenes in human hepatocellular carcinoma. Jpn. J. Cancer Res. 80: 196-199.

16. Tsuda, H., Hirohashi, S., Shimosato, Y., Ino, Y., Yoshida, T. & Terada, M. (1989) Low incidence of point mutation of c-Ki-ras and N-ras oncogenes in human hepatocellular carcinoma. *Jpn. J. Cancer res.* 80:196-199.
17. Hill, A. B. (1965) The environment and disease: association or causation. *Proc. R. Soc. Med.* 58 :295-300.
18. Szeliga, J & Dipple, A. (1998) DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol epoxides. *Chem. Res. Toxicol.* 11 :1-11.
19. Marnett, L. J. (1999) Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* 424:83-95.
20. Balmain, A. & Harris, C.C. (2000) Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. *Carcinogenesis* 21: 371-377.
21. Thorgeirsson, S. S., Factor, V. M. & Snyderwine, E. G. (2000) Transgenic mouse models in carcinogenesis research and testing. *Toxicol. Lett.* 112/113: 553-555.
22. Epstein, C.J., Martin, G.M., Schultz, A. L. & Motulsky, A. G. (1996) Werner's syndrome. A review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process. *Medicine (Baltimore)* 45:177-221
23. Waters, M.D., Stack, H.F. & Jackson, M.A. (1999) Short-term tests for defining mutagenic carcinogens. *IARC Sci. Publ.* 146 :499-536.
24. Vrump, K. S., Krewski, D. & Van Landingham, C. (1999) Estimates of the proportion of chemical that were carcinogenic or anticarcinogenic in bioassays conducted by the National Toxicology program. *Environ. Health Perspect.* 107:83-88.
25. Haseman, J. K & Lockhart, A.M. (1993) Correlations between chemically related site-specific carcinogenic effects in long-term studies in rats and mice. *Environ. Health Perspect.* 101:50-54.
28. Grisham, J. W (1997) Interspecies comparison of liver carcinogenesis: implications for cancer risk assessment. *Carcinogenesis* 18:59-81.
29. Tennant, R. W., French, J. E & Spalding, J. W. (1995) Identifying chemical carcinogens and assessing potential risk in short-term bioassays using transgenic mouse models. *Environ. Health Perspect.* 103:942-950.
30. Sundberg, S. A. (2000) High-throughput and ultra-high-throughput screening: solution- and cell-based approaches. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:47-53.
32. Nestler, H. P. & Liu, R. (1998) Combinatorial libraries: studies in molecular recognition. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 1:113-126.

33. Pollack, J. R., Perou, C. M., Alizadeh, A. ^a, Eisen, M. B., Pergamenschikov, A., Williams, C. F., Jeffrey, S. S., Botstein, D. & Brown, P. O. (1999) genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat. genet.* 23: 41-46.
34. DeRisi, J., Penland, L., Brown, P.O., Bittner, M. L., Meltzer, P. S., Ray, M., Chen, Y., Su, Y. A. & Trent, J. M. (1996) Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat. Genet.* 14: 457-460.
37. Merchant, M. & Weinberger, S. R. (2000) Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* 21: 1164-1177.
38. Scherf, U., Ross, D. T., Waltham, M., Smith, L. H., Lee, J. K., Tanabe, L., Kohn, K. W., Reinhold, W. C., Myers, T. G., Andrews, D. T., Scudiero, D. A., Eisen, M. B., Sausville, E. A., Pommier Y., Botstein, D., Brown, P. O. & Weinstein, J. N. (2000) A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat. Genet.* 24: 236-244.
39. Alizadeh, A., Eisen, M., Davis, R. E., Ma, C., Sabet, H., Tran, T., Powell, J. I., Yang, L., Marti, G. E., Morre, D. T., Hudson, J. R., Chan, W. C., Greiner, T., Weisenburger, D., Armitage, J. O., Lossos, I., Levy, R., Botstein, D., Brown, P. O. & Staudt, L. M. (1999) The lymphochip: a specialized cDNA microarray for the genomic-scale analysis of gene expression in normal and malignant lymphocytes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol* 64 : 71-78.
40. Ahrent, S. A., Halachmi, S., Chow, J. T., Wu, L., Halachmi, N., Yang, S. C., Wehage, S., Jen, J. & Sidransky, D. (1999) Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 7382-7387.
41. Dolle, R. E. & Nelson, K. H., Jr. (1999) Comprehensive survey of combinatorial library synthesis: 1998. *J. Comb. Chem.* 1: 235-282.
43. Martin, A. B. & Schuktz, P. G. (1999) Opportunities at the interface of chemistry and biology. *Trends cell Biol.* 9: M24-M28.
44. Perera, F. P. (1987) Molecular cancer epidemiology: a New tool in cancer prevention. *J. Natl. cancer inst.* 78: 887-898.
45. Schantz, S. P., Zhang, Z. F., Spitz, M. S., Sun, M. & Hsu, T. C. (1997) Genetic susceptibility to head and neck cancer: interaction between nutrition and mutagen sensitivity. *Laryngoscope* 107: 765-781.
46. Groopman, J. D. & Kensler, T. W. (1999) The light at the end of the tunnel for chemical –specific biomarkers: daylight or headlight? *Carcinogenesis* 20: 1-11.
47. Vineis, P. & Porta M. (1996) causal thinking biomarkers, and mechanisms of carcinogenesis. *J. Clin. Epidemiol.* 49 : 951-956.
48. Bardeesy, N., Falkoff, D., Petruzzi, M. J., Nowak, N., Zabel, B., Adam, M., Aguiar, M. X., Grundy, P., Shows, T. & Pelletier, J. (1994) Anaplastic Wilm’s tumour, a subtype displaying poor prognosis, harbours p53 gene mutations. *Nat. Genet.* 7 : 91-97.

- 49.** Wada, M., Bartram, C. R., nakamura, H., Hachiya, M., Chen, D. L., Borenstein, J., Miller, C. W., Ludwig, L., Hansen-hagge, T. E., Ludwig, W. D., Reiter, A., Misoguchii, H. & Koeffler, H. P. (1993) Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood. *Blood* 82: 3163-3169.
- 50.** Farmer, P. B., & Shuker, D. E. (1999) What is the significance in background levels of carcinogen-derived protein and DNA adducts? Some considerations for incremental risk assessment. *Mutat. Res.* 424: 275-286.
- 56.** Goldman, R. (2000) Quantitation of benzo [alpha] pyrene-DNA adducts by postlabeling with C-acetic anhydride and accelerator mass spectrometry. *Chem. Biol. Interact.* 126: 171-183.
- 57.** Harris C. C. & Hollstein, M. (1993) Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N. Engl. J. Med* 329: 1318-1327.
- 58.** Levine, A. J. (1997) p53, The cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331.
- 59.** Harris C. C. (1996) Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J. Natl. Cancer Inst.* 88: 1442-1455.
- 60.** Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M. & Harris, C. C. (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 54: 4855-4878.
- 61.** Hsu, I. C., Metcalf, R. A., Sun T., Welsh, J. A., Wang N. J. & Harris, C. C. (1991) Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 350: 427-428.
- 62.** Bressac, B. Kew, M., Wands, J. & ozturk, M. (1991) Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from soutren Africa. *Nature* 350: 429-431.
- 63.** Qian, G. S., Ross, R. K., Yu, M. C., Yuan, J. M., Gao, Y. T., Henderson, B. E., Wogan, G. N. & Groopman, J. D. (1994) A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 3: 3-10
- 64.** Schatzkin, A. & Longnecker, M. P. (1994) Alcohol and breast cancer. Where are we now and where do we go from here? *Cancer* 74: 1101-1110.
- 66.** Longnecker, M. P. (1994) Alcoholic beverage consumption in relation to risk of brest cancer: meta-analysis and review. *Cancer causes Control* 5: 73-82.
- 67.** Harty, L. C., Caporaso, N. E., Hayes, R. B., Winn, D. M., Bravo-Otero, E., Blot, W. J., Kleinman, D. V., Brown, L. M., Armenian, H. K., Fraumeni, J. F., Jr. & Shields, P. G. (1997) Alcohol dehydrogenase 3 genotype and risk of oral cavity and pharyngeal cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 89: 1698-1705.

- 68.** Freudenheim, J. L., Ambrosone, C. B., Moysich, K. B., Vena, J. E., Marshall, J. R., Graham, S., Laughlin, R., Nemoto, T. & Shields, P. G. (1997) Alcohol intake and breast cancer risk: effect of alcohol metabolism by alcohol dehydrogenase 3. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 38: 619 (abs).
- 69.** Ambrosone, C. B., Freudenheim, J. L., Thompson, P. ^a, Bowman, E., Vena, J. E., Marshall, J. R., Graham, S., Laughlin, R., Nemoto, T. & Shields, P. G. (1999) Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. *Cancer Res.* 59: 602-606.
- 70.** Wogan, G. N. (1992) Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Res.* 52(suppl. 7): 2114S-2118S.
- 71.** Denning, D. W., Allen, R., Wilkinson, A. P. & Morgan, M. R. (1990) Transplacental transfer of aflatoxin in humans. *Carcinogenesis* 11: 1033-1035.
- 72.** Wild, C. P., Lu, S. H. & Montesano, R. (1987) Radioimmunoassay used to detect DNA alkylation adducts in tissues from populations at high risk for oesophageal and stomach cancer. *IARC Sci. Publ.* pp. 534-537.
- 74.** Lunn, R. M., Zhang, Y. J., Wang, L. Y., Chen, C. J., Lee, P. H., Lee, C. S., Tsai, W. Y. & Santella, R. M. (1997) p53 Mutations, chronic hepatitis B virus infection, and aflatoxin exposure in hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Cancer res.* 57: 3471-3477.
- 76.** Bulatao-Jayme, J., Almero, E. M., castro, M. C., Jardeleza, M. T. & salamat, L. A. (1982) A case-control dietary study of primary liver cancer risk from aflatoxin exposure. *Int. J. Epidemiol.* 11 : 112-119.
- 77.** Garner, R. C., Miller, E. C. & Miller, J. A. (1972) Liver microsomal metabolism of aflatoxin B1 to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimutium* TA 1530. *Cancer Res.* 32: 2058-2066.
- 81.** Reynolds, S. H., Stowers, S. J., Patterson, R. M., maronpot, R. R., Aaronson, S. A. & Anderson, M. W. (1987) Activated oncogenes in B6C3F1 mouse liver tumors: implications for risk assessment. *Science* 237: 1309-1316.
- 82.** Essigmann, J. M., Croy, R. G., Nadzan, A. M., Busby, W. F., Jr., Reinhold, V. N., Buchi, G. & Wogan, G. N. (1977) Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B1 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 1870-1874.
- 83.** Iyer, R. S., Coles, B. F., Raney, K. D., Thier, R., Guengerich, F. P. & Harris, T. M. (1994) DNA adduction by the potent carcinogen aflatoxin B-1-mechanistic studies. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 1603-1609.
- 84.** Lilleberg, S. L., Cabonce, M. A., Raju, N. R., Wagner, L. M. & Kier, L. D. (1992) Alterations in the p53 tumor suppressor gene in rat liver tumors induced by aflatoxin B1. *Prog. Clin. Biol. Res.* 376: 203-222.

- 85.** Aguilar, F., Hussain, S. P. & Cerutti, P. (1993) Aflatoxin B1 induces the transversion of G T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 8586-8590.
- 86.** Mace, K., Aguilar, F., Wang, J. S., Vautravers, P., Gomez-Lechon, M., Gonzalez, F. J., Groopman, J., Harris, C. C. & Pfeifer, A. M. A. (1997) Aflatoxin B1 induced DNA adduct formation and p53 mutations in CYP450-expressing human liver cell lines. *Carcinogenesis* 18: 1291-1297.
- 87.** Shimizu, Y., Zhu, J. J., Han, F., Ishikawa, T. & Oda, H. (1999) Different frequencies of p53 codon-249 hot-spot mutations in hepatocellular carcinomas in Jiang-su province of China. *Int. J. Cancer* 82: 187-190.
- 88.** Wogan, G. N. (1992) Molecular epidemiology in cancer risk assessment and prevention: recent progress and avenues for future research. *Environ. Health Perspect.* 98: 167-178.
- 89.** Wild, C. P., Jiang, Y. Z., Allen, S. J., Hall, A. J., Jansen, L. A. M. & Montesano, R. (1990) Aflatoxin-albumin adducts in human sera from different regions of the world. *Carcinogenesis* 11: 2271-2274.
- 92.** Bolton, M. G., Munoz, ^a, Jacobson, L. P., Groopman, J. D., Maxuitenko, Y. Y., Roebuck, B. D. & Kensler, T. W. (1993) Transient intervention with oltipraz protects against aflatoxin-induced hepatic tumorigenesis. *Cancer Res.* 53: 3499-3504.
- 93.** Wang, J. S., Shen, X., he, X., Zhu, Y. R., Zhang, B. C., Wang, J. B., Qian, G. S., Kuang, S. Y., Zarba, A., Egner, P. A., Jacobson, L. P., Munoz, A., Helzlsouer, K. J., Groopman, J. D. & Kensler, T. W. (1999) Protective alterations in phase 1 and 2 metabolism of aflatoxin B1 by oltipraz in residents of Qidong People's Republic of China. *J. Natl. Cancer Inst.* 91: 347-354.
- 94.** International Agency for Research on Cancer. (1983) Benzo[a]pyrene. In: *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, vol. 32, pp. 211-224. IARC, Lyon, France
- 95.** International Agency for Research on Cancer. (1985) *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, pp. 7-271. IARC, Lyon France.
- 96.** Liou, P. J. & Greenberg, A. (1990) factors associated with human exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Ind. Health* 6: 209-223.
- 98.** Rothman, N., Poirier, M. C., Baser, M. E., Hansen, J. A., Gentile, C., Bowman, E. D. & Strickland, P. T. (1990) Formation of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in peripheral white blood cells during consumption of charcoal-broiled beef. *Carcinogenesis* 11: 1241-1243.
- 99.** Rothman, N., Correa-Villasenor, A., Ford, D. P., Poirier, M. C., Haas, R., Hansen, J. A., O'Toole, T. & Strickland, P. T. (1993) Contribution of occupation and diet to white blood cell polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in wildland firefighters. *Cancer Epidemiol. Biomarkers prev.* 2: 341-347.

100. Benjamin, H., Storkson, J., Nagahara, A. & Pariza, M. W. (1991) Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by dietary soy suce. *Cancer Res.* 51: 2940-2942.
105. Stoner, G. D., Greisiger, E. A., Schut, H. A., Pereira, M. A., Loeb, T. R., Klauning, J. E. & Branstetter, D. G. (1984) A comparison of the lung adenoma response in strain A/J mice after intraperitoneal and oral administration of carcinogens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 72: 313-323.
106. probst-Hensch, N. M., Sinha, R., Longnecker, M. P., Witte, J. S., Ingles, S. A., Frankl, H. D., Lee, E. R. & Haile, R. W. (1997) Meat preparation and colorectal adenomas in a large sigmoidocopy-based case-control study in California (United States). *Cancer causes Control* 8: 175-183.
107. Giovannucci, E., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Ascherio, A. & Willett, W. C. (1994) Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res.* 54: 2390-2397.
108. Huggins, C. & Yang, N. C. (1962) Induction and extinction of mammary cancer. *Science* 137: 257-262.
109. Kotin, P., Falk, H. L., & Busser, R. (1959) Distribution, retention and elimination of c 14-3,4-benzprene after admonsitration to mice and rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 23: 541-555.
110. Goldman, R., Bowman, E. D., pellizzari, E. D., Beach, J. & Shields, P. G. (2000) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in human lung, liver and breast tissue. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 41: 559-560.
111. Phillips, D. H. (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat. Res.* 443: 139-147.
112. Buckley, T. J. & Lioy, P. J. (1992) An examination of the time course from human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons to urinary elimination of 1-hydroxypyrene. *Br. J. Ind. Med.* 49: 113-124.
113. Howard, J. W. & Fazio, T. (1980) Analytical methodology and reported findings of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63: 1077-1104.
114. Sinha, R., Rothman, N., Brown, E. D., Mark, S. D., Hoover, R. N., Caporaso, N. E., Levander, O. A., Knize, M. G., Lang, N. P. & Kadlubar, F. F. (1994) Pan-fried meat containing high levels of heterocyclic aromatic amines but low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons induces cytochrome p4501A2 activity in humans. *Cancer Res.* 54: 6154-6159.
115. Baghurts, K. (1999) red meat consumption in Australia: intakes, contributions to nutrient intake and associated dietary patterns. *Eur. J. cancer Prev.* 8: 185-191.
116. Van Rooij, J. G., Veeger, M. M., Bodelier-Bade, M. M., Scheepers, P. T. & Jongeneelen, F. J. (1994) Smoking and dietary intake of polycyclic aromatic hydrocarbons as sources of

interindividual variability in the baseline excretion of 1-hydroxypyrene in urine. *Int. Arch. Occup Environ. Health* 66: 55-65.

117. Cheng, S. C., Hilton, B. D., Roman, J. M. & Dipple, A. (1989) DNA adducts from carcinogenic and noncarcinogenic enantiomers of benzo[a]pyrene dihydrodiol epoxide. *Chem. Res. Toxicol.* 2: 334-340.
118. Gelboin, H. V. (1980) Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis : role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol. Rev.* 60: 1107-1166.
119. Pottenger, L. H., Christou, M. & Jefcoate, C. R. (1991) Purification and immunological characterization of a novel cytochrome P450 from C3H/10T1/2 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 286: 488-497.
120. Shimada, T., Hayes, C. L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S. S., Guengerich, F. P. & Sutter, T. R. (1996) Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res.* 56: 2979-2984.
121. Gupta, R. C. Reddy, M. V. & Randerath, K. (1982) 32P-postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts. *Carcinogenesis* 3: 1081-1092.
122. Alexandrov, K., Rojas, M., Geneste, J., Castegnaro, M., Camus, M., Petruzzelli, S., Giuntini, C. & Bartsch, H. (1992) Na improved fluorometric assay for dosimetry of benzo(a)pyrene diol-epoxide-DNA adducts in smokers lung: comparisons with total bulky adducts and aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Cancer Res.* 52: 6248-6253.
123. Bentsen-Farmen, R. K., Botnen, I. V., Noto, H., Jacob, J. & Ovrebo, S. (1999) detection of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites by high-pressure liquid chromatography after purification on immunoaffinity columns in urine from occupationally exposed workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 72: 161-168.
124. Godschalk, R. W., Ostertag, J.U., Moonen, E. J., Neumann, H. A., Kleinjans, J. C. & Van Schooten, F. J. (1998) Aromatic DNA adducts in human white blood cells and skin after dermal application of coal tar. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7: 767-773.
125. Ryberg, D., Skaug, V., Hoyer, A., Phillips, D. H., Harries, L. W., Wolf, C. R., Ogreid, D., Ulvik, A., Vu, P. & Haugen, A. (1997) Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis* 18: 1285-1289.
126. Wu, X., Shi, H., Jiang, H., Kemp, B., Hong, W. K., Delclos, G. L. & Spitz, M. R. (1997) Associations between cytochrome P450E1 genotype mutagen sensitivity, cigarette smoking and susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis* 18: 967-973.
127. Conney, A. H. (1982) Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes memorial Lecture. *Cancer Res.* 42: 4875-4917.

- 128.** Denissenko, M. F., Pao, A., Tang, M. & Pfeifer, G. P. (1996) Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in p53. *Science* 274:430-432.
- 129.** Fiddler, W. (1975) The occurrence and determination of N-nitroso compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31: 352-360.
- 130.** Bartsch, H., O'Neill, I. & Schulte-Hermann, R. (eds) (1987) The relevance of N-nitroso Compounds to human Cancer. Exposures and Mechanisms. IARC Scientific Publications No. 84. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- 131.** Wogan, G. N. & Tannenbaum, S. R. (1975) Environmental N-nitroso compounds : implications for public health. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31: 375-383.
- 132.** Mirvish, S.S. (1995) Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of Known exposures to NOC. *Cancer Lett.* 93: 17-48.
- 133.** Thor, H., Smith, M. T., Hartzell, P., Bellomo, G., Jewell, S.A. & Orrenius, S. (1982) The metabolism of menadione (2-methyl-1, 4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study of the implications of oxidative stress in intact cells. *J. Biol. Chem.* 257: 12419-12425.
- 134.** Umbenhauer, D., Wild, C. P., Montesano, R., Saffhill, R., Boyle, J. M., Huh, N., Kirstein, U., Thomale, J., Rajewsky, M. F. & Lu, S. H. (1985) O-methyldeoxyguanosine in oesophageal DNA among individuals at high risk of oesophageal cancer. *Int. J. Cancer* 36: 661-665.
- 135.** Bartsch, H. & Montesano, R. (1984) Relevance of nitrosamines to human cancer *Carcinogenesis* 5: 1381-1393.
- 136.** Idle, J. R., (1999) CYP2A6 polymorphism, nicotine, and environmental nitrosamines. *Lancet* 353:2073.
- 138.** De Stefani, E., Deneo-Pellegrini, H., Carzoglio, J. C., Ronco, A. & mendilaharsu, M. (1996) Dietary nitrosodimethylamine and the risk of lung cancer : a case-control study from Uruguay. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5: 679-682.
- 139.** Bogovski, P. & Bogovski, S. (1981) Animal species in which N-nitroso compounds induce cancer. *Int. J. Cancer* 27: 471-474.
- 140.** Lijinsky, W. (1990) In vivo testing for carcinogenicity. In: *Chemical carcinogenesis and Mutagenesis I* (Cooper, C. S. & Grover, P. L., eds), pp. 179-209. Springer-Verlag, Berlin, Germany
- 141.** Sahnk, R. C. (1975) Toxicology of N-nitroso compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31: 361-368.
- 142.** Loepky, R. N. (1999) The mechanism of bioactivation of N-nitrosodiethanolamine. *Drug Metab. Rev.* 31: 175-193.

- 143.** Lai, D. Y. & Arcos, J. C. (1980) Minireview: dialkyl nitrosamine bioactivation and carcinogenesis. *Life Sci.* 27: 2149-2165.
- 144.** Lin, H. L., Parsels, L. A., Maybaum, J. & Hollenberg, P. F. (1999) N-nitrosodimethylaminemediated cytotoxicity in a cell line expressing P450 2E1: evidence for apoptotic cell death. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 157: 117-124.
- 145.** Kamataki, T., Nunoya, K., Sakai, Y., Kushida, H. & Fujita, K. (1999) Genetic polymorphism of CYP2A6 in relation to cancer. *Mutat. Res.* 428: 125-130.
- 146.** Loveless, A. (1969) Possible relevance of O-6 alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides. *Nature* 223: 206-207.
- 147.** Goth, R. & Rajewsky, M. F. (1974) Persistence of O-6-ethylguanine in rat-brain DNA: correlation with nervous system-specific carcinogenesis by ethylnitrosourea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 639-643.
- 148.** Singer, B. & Essigmann, J. M. (1991) Site-specific mutagenesis: retrospective and prospective. *Carcinogenesis* 12: 949-955.
- 149.** Romach, E., Moore, J., Rummel, S. & Richie, E. (1994) Influence of sex and carcinogen treatment protocol on tumor latency and frequency of K-ras mutations in N-methyl-N-nitrosourea induced lymphomas. *Carcinogenesis* 15: 2275-2280.
- 150.** Lindahl, T. (1982) DNA repair enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 51: 61-87.
- 151.** Rydberg, B., Spurr, N. & Karran, P. (1990) cDNA cloning and chromosomal assignment of the human O-methylguanine-DNA methyltransferase. cDNA expression in *Escherichia coli* and gene expression in human cells. *J. Biol. Chem.* 265: 9563-9569.
- 152.** You, M., Wang, Y., Lineen, A. M., Gunning, W. T., Stoner, G. D. & Anderson, M. W. (1992) Mutagenesis of the K-ras protooncogene in mouse lung tumors induced by N-ethyl-N-nitrosourea or N-nitrosodiethylamine. *Carcinogenesis* 13: 1583-1586.
- 153.** Cha, R. S., Thilly, W. G. & Zarbl, H. (1994) N-nitroso-N-methylurea-induced rat mammary tumors arise from cells with pre-existing oncogenic ha-ras-1 gene mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 3749-3753.
- 154.** Nagata, Y., Abe, M., Kobayashi, K., Yoshida, K., Ishibashi, T., Naoe, T., Nakayama, E. & Shiku, H. (1990) Glycine to aspartic acid mutations at codon 13 of the c-k-ras gene in human gastrointestinal cancers. *Cancer Res.* 50: 480-482.
- 155.** Skog, K. I., Johansson, M. A. & Jagerstad, M. I. (1998) carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food Chem. Toxicol.* 36: 879-896.
- 156.** Keating, G. A., Layton, D. W. & Felton, J. S. (1999) factors determining dietary intakes of heterocyclic amines in cooked foods. *Mutat. Res.* 443: 149-156.

- 157.** Knize, M. G., Salmon, C. P., Paris, P. & Felton, J. S. (1999) Food heating and the formation of heterocyclic aromatic amine and polycyclic aromatic hydrocarbon mutagens/carcinogens. *Adv. Exp. Med. Biol.* 459: 179-193.
- 158.** Lynch, A. M., Knize, M.G., Boobis, A. R., Gooderham, N. J., Davies, D. S. & Murray, S. (1992) Intra-and interindividual variability in systemic exposure in humans to 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, carcinogenesis present in cooked beef. *Cancer Res.* 52:6216-6223.
- 159.** Butler, M. A., Guengerich, F. P. & Kadlubar, F. F. (1989) Metabolic oxidation of the carcinogens 4-aminobiphenyl and 4, 4-methylene-bis (2-chloroaniline) by human hepatic microsomes and by purified rat hepatic cytochrome P-450 monooxygenases. *Cancer Res.* 49: 25-31.
- 160.** Lynch, A. M., Murray, S., Gooderham, N. J. & Boobis, A. R. (1995) Exposure to and activation of dietary heterocyclic amines in humans. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 21: 19-31.
- 161.** Chen, J., Stampfer, M. J., Hough, H. L., Garcia-closas, M., Willett, W. C., Hennekens, C. H., Kelsey, K. T. & Hunter, D. J. (1998) A prospective study of N-acetyltransferase genotype, red meat intake, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res.* 58: 3307-3311.
- 162.** Colvin, M. E., Hatch, F. T. & felton, J. S. (1998) Chemical and biological factors affecting mutagen potency. *Mutat. Res.* 400:479-492.
- 163.** Boobis, A. R., Lynch, A. M., Murray, S., de la Torre R., Solans, A., Farre, M., Segura, J., Gooderham, N. J. & Davies, D. S. (1994) CYP1A2-Catalyzed conversion of dietary heterocyclic amines to their proximate carcinogens is their major route of metabolism in humans. *Cancer Res.* 54: 89-94.
- 164.** Schut, H. A. & Snyderwine, E. G. (1999) DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 20: 353-368.
- 165.** Yanagawa, Y., Sawada, M., Deguchi, T., Gonzalez, F. J. & Kamataki, T. (1994) Stable expression of human CYP1A2 and N-acetyltransferases in Chinese hamster CHL cells: mutagenic activation of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline. *Cancer Res.* 54: 3422-3427.
- 168.** Ozawa, S., Tang, Y. M., Yamazoe, Y., Kato, R., Lang, N. P. & Kadlubar, F. F. (1998) Genetic polymorphisms in human liver phenol sulfotransferases involved in the bioactivation of N-hydroxy derivatives of carcinogenic arylamines and heterocyclic amines. *Chem. Biol. Interact.* 109: 237-248.
- 169.** Ji, H., Yu, M. C., Stillwell, W. G., Skipper, P. L., Ross, R. K., henderson, B. E. & Tannenbaum, S. R. (1994) urinary excretion of 2-amino-3, 8-dimethylimidazo-[4,5-f]quinoxaline in white, black, and Asian men in Los Angeles County. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 3: 407-411.

- 171.** Kidd, L. C., Stillwell, W. G., Yu, M. C., Wishnok, J. S., Skipper, P. L., Ross, R. K., henderson, B. E. & Tannenbaum, S. R. (1999) urinary excretion of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in White, African, and Asian-American men in Los Angeles County. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 8: 439-445.
- 172.** Friesen, M. D., Kaderlik, K., Lin, D., Garren, L., Bartsh, H., Lang, N. P. & Kadlubar, F. F. (1994) Analysis of DNA adducts of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol[4,5-b]pyridine in rat and human tissues by alkaline hydrolysis and gas chromatography/electron capture mass spectrometry: validation by comparison with ³²P-postlabeling. *Chem. Res. Toxicol.* 7: 733-739.
- 173.** Totsuka, Y., Fukutome, K., Takahashi, M., Takahashi, S., tada, A., Sugimura, T. & Wakabayashi, K. (1996) presence of N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (dG-C8-melQx) in human tissues. *Carcinogenesis* 17: 1029-1034.
- 174.** Zheng, W., Gustafson, D. R., Sinha R., Cerhan, J. R., Moore, D., Hong, C. P., Anderson, K. E. Kushi, L. H., Sellers, T. A. & Folsom, A. R. (1998) Well-done meat intake and the risk of breast cancer. *J. Natl. cancer Inst.* 90: 1724-1729.
- 176.** Ward, M. H., Sinha, R., Heineman, E. F., Rothman, N., Markin, R., Weisenburger, D. D., Correa, P. & Zahm, S. H. (1997) Risk of adenocarcinoma of the stomach and esophagus with meat cooking method and doneness preference. *Int. J. cancer* 71: 14-19.
- 177.** Augustsson, K., Skog, K., Jagertad, M., Dickman, P. W. & Steineck, G. (1999) Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder, and kidney: a population-based study. *Lancet* 353: 703-707.[Medline]
- 178.** Nagao, M. (1999) A new approach to risk estimation of food-borne carcinogens heterocyclic amines-based on Molecular Information. *Mutat. Res.* 431: 3-12.
- 179.** Schwab, C. E., Huber, W. W., Parzefall, W., Hietsch, G., Kassie, F., Schulte-hermann, R. & Knasmuller, S. (2000) Search for compounds that inhibit the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. *Crit. Rev. Toxicol.* 30: 1-69.
- 180.** hammons, G. J., Fletcher, J. V., Stepps, K. R., Smith, E. A., Balentine, D. A., harbowy, M. E & Kadlubar, F. F. (1999) Effects of chemoprotective agents on the metabolic activation of the carcinogenic arylamines PhIP and 4-aminobiphenyl in human and rat liver microsomes. *Nutr. Cancer* 33: 46-52.
- 181.** Dashwood, R. H., Xu, M., hermaez, J. F., hasaniya, N., Youn, K. & Razzuk, A. (1999) Cancer chemopreventive mechanisms of tea against heterocyclic amine mutagens from cooked meat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 220 : 239-243.

CAPÍTULO VII

1. Claus ER, Risch N, Thompson WD. Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *Am J Hum Genet* 1991;48:232-242.
2. Kinsler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159-170.
3. Burke W, Petersen G, Lynch P, et al. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. I Hereditary nonpolyposis colon cancer. Cancer Genetics Studies Consortium. *JAMA* 1997;277:915-919.
4. Burke W, Daly M, Garber J, et al. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer: II. BRCA1 and BRCA2. Cancer genetics Studies Consortium. *JAMA* 1997;277:997-1003.
5. Yu HJ, Lin KM, Ota DM, Lynch HT. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: preventive management. *Cancer Treat Rev* 2003;29:461-470.
6. Schrag D, Kuntz KM, Garber JE, Weeks JC. Life expectancy gains from cancer prevention strategies for women with breast cancer and BRCA1 or BRCA2 mutations. *JAMA* 2000; 283:617-624.
7. Hull S, Prasad K. Recording between the lines: direct-to-consumer adverting of genetic testing *Hastings Cent rep* 2001;31:33-35.
8. Myers MF, Jorgensen C, Litch J, et al. Public health response to a direct-to consumer marketing campaign for genetic testing for breast ovarian cancer susceptibility. Abstract #28 presented at: American College of Medical Genetics Annual Meeting; March 6, 2004; Kissimmee, FL.
9. Sifri R, Myers R, Hyslop T, et al. Use of cancer susceptibility testing among primary care physicians. *Clin Genet* 2003;64:335-360.
10. Wideroff L, Freedman A, Olson L, et al. Physician use of genetic testing for cancer susceptibility: results of a national survey. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:295-303.
11. Gramling R, Nash J, Siren K, et al. Family physician self-efficacy with screening for inherited cancer risk. *Ann Fam med* 2004;2:130-132.
12. Freedman AN, Wideroff L, Olson L, et al. US physicians attitudes toward genetic testing for cancer susceptibility. *Am J Med Genet* 2003; 120A:63-71.
13. Carrol JC, Brown JB, Baline S. et al. genetic susceptibility to cancer. Family physicians experience. *Can Fam Physicians* 2003;49-52.
14. *Safer v Pack*, 677 A. 2d 1188/NJ App), appeal denied, 683 A. 2d 1163 (NJ 1996).
15. *Pate v Threlkel*, 661 So. 2d 278 (Fla. 1995).

16. Clayton EW. Ethical, Legal, and Social Implications of genomic Medicine, in Guttmacher AE, Collins FS, Drasen JM (eds). Genomic medicine: Articles from the New England Journal of Medicine. Baltimore: The Johns Hopkins University Press; 2004:154-155.
17. Sifri R, Wender RC, Paynter NP. Cancer Risk assessment from family history: gaps in primary care practice. *J Fam Pract* 2002;51:856.
18. Acheson LS, Wiesner GL, Zyzanski SJ, et al. Family history-taking in community family practice: implications for genetic screening. *Genet Med* 2000;2:180-185.
19. Sweet K, Bradley T, Westman J. Identification and referral of families at high risk for cancer susceptibility. *J Clin Oncol* 2002;20:528-537.
20. Church J, McGannon E. Family history of colorectal cancer: how often and how accurately is it recorded? *Dis Colon Rectum* 2000;43:1540-1544.
21. Acheson LS, Stange KC, Wiesner GL. Validation of the GREAT system for automated collection of the cancer pedigree. Platform presentation at: American Society of Human Genetics Annual Meeting; October 17, 2002; Baltimore, MD.
22. Emery J, Walton R, Murphy M, et al. Computer support for interpreting family histories of breast and ovarian cancer in primary care: comparative study with simulated cases. *BMJ* 2000;321:28-32.
23. Euhus D. Cancer Gene. Available at: www.swmed.edu/home_pages/cancergene/. Accessed March 11, 2004.
24. Hampel H, Sweet K, Westman JA, et al. Referral for cancer genetics consultation: a review and compilation of risk assessment criteria. *J Med Genet* 2004;41:81-91.
25. Yoon PW, Scheuner MT, Khoury MJ. Research agenda for family history tools: analytic validity, clinical utility, and ethical, legal and social implications. Abstract #300 presented at: American College of Medical Genetics Annual Meeting; March 7, 2004; Kissimmee, FL.
26. National Society of Genetic Counselors, Inc. Home Page. Available at: www.nsgc.org/. Accessed March 11, 2004.
27. Bennett RL. The family medical history. *Prim Care* 2004; 31: 479-495.
28. American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol* 2003;21:2397-2406.
29. Bennett RL, Allain D, Baker D, et al. Genetic counselor training programs in the United States, capacities and needs: a report of the National Society of Genetic Counselors (NSGC). Abstract #31 presented at: American College of Medical Genetics Annual Meeting; Kissimmee, FL; March 6, 2004.

30. Cancer genetics services directory. Available at: www.nci.nih.gov/search/geneticsservices/. Accessed March 11, 2004.
31. Myriad Genetics, Inc. home page. Available at: <http://www.myriad.com/>. Accessed march 11,2001.
32. GeneReviews at gene tests: medical genetics informatics resource. Familial adenomatous polyposis [database online].Seattle, WA: University of Washington; 1997-2004. Available at: <http://www.genetests.org/>. Accessed march 11, 2004.
33. GeneReviews at Gene Tests: medical genetics informations resource. BRCA1 and BRCA2 hereditary breast/ovarian cancer [database online]. Seattle, WA: University of Washington; 1997-2004. Available at: <http://www.genetests.org/>. Accessed March 11, 2004.
34. Marteau TM, Lerman C. Genetic risk and behavioural change. *Br Med J* 2001;322:1056-1059.
35. King MC, Marks JH, Mandell JB, et al. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 2003; 302:643-646.
36. Thull D, Vogel V. Recognition and management of hereditary breast cancer syndromes *oncologist* 2004;9:13-24.
37. Croyle R, Lerman C. Risk communication in genetic testing for cancer susceptibility. *J natl Cancer Inst Monog* 1999; 25: 59-66.
38. Kash KM, Ortega-Verdejo K, Dabney MK, et al. Psychosocial aspects of cancer genetics: women at high risk for breast and ovarian cancer. *Semin Surg Oncol* 2000; 18: 333-338.
39. Olopade O. The Emerging Role of genetics in Clinical cancer care, in Perry MC, Whippen D, Harrington R (eds). 1998 ASCO Educational book: 34th Annual meeting, Los Angeles, May 16-19, 1998. Alexandria, VA: American Society of Clinical Oncology; 1998:210-216.
40. Wilkie T. genetics and insurance in Britain: why more than just the Atlantic divides the English-speaking nations. *Nat Genet* 1998; 20: 119-121.
41. Matloff E, Shappell H, Brierley K, et al. What would you do? Specialists' perspectives on cancer genetic testing, prophylatic surgery, and insurance discrimination. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2484-2492.
42. Genetics laws and legislative activity. National Conference of State legislatures Web site. Available at: www.ncsl.org/programs/health/genetics/charts.htm. Accessed March 11, 2004.
43. American College of medical home page. Available at: <http://www.acmg.net/>. Accessed March 11, 2004.
44. Lehmann LS, Weeks JC, Klar N, et al. Disclosure of familial genetic information: perceptions of the duty to inform. *Am J Med* 2000; 738-739.

45. Genetests home page. Developed by the University of Washington-Seattle. Available at: <http://www.genetests.org/>. Accessed March 11, 2004.
46. Genetic Alliance home page. Available at: www.geneticalliance.org/. Accessed march 11, 2004.
47. de Jong MM, Ntote IM, te Meerman GJ, et al. Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J Med genet* 2002; 39:225-242.
48. Wooster R, Weber B. Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003;348: 2339-2347.
49. Smith RA, Cokkinides V, Eyre HJ. American cancer Society guidelines for the early detection of cancer, 2003. *CA Cancer J Clin* 2003; 53: 27-43.
50. Culler D, Grimes S, Acheson LS, Wiesner GL. Cancer genetics in primary care. *Prim care* 2004;31:649-683.
51. HNPCC CME advisory Committee. Identifying and managing risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer and endometrial cancer (HNPCC) [monograph]. Chicago: American medical Association, 2001. Available at: www.ama-assn.org/ama/pub/category/10183.html. Accessed September 2, 2004.
52. Cao X, Eu KW, Seow-Choen F, et al. APC mutation and phenotypic spectrum of singapore familial adenomatous polyposis patients. *Eur J Hum Genet* 2000;8:42-48.
53. Cao Y, Pieretti M, Marshall J, et al. Challenge in the differentiation between attenuated familial adenomatous polyposis and hereditary nonpolyposis colorectal cancer: case report with review of the literature. *Am J Gastroenterol* 2002;97: 1822-1827.
54. Sampson JR, Dolwani S, Jones S, et al. Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet* 2003;362:39-41.
55. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, et al. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med* 2003; 348: 791-799.
56. Enholm S, Hienonen T, Suomalainen A, et al. Proportion and phenotype of MYH-associated colorectal neoplasia in a population-based series of Finnish colorectal cancer patients. *Am J Pathol* 2003; 163: 827-832.
57. Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM. AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology* 2001; 121: 198-213.
58. Offit K. *Clinical genetics: Risk Counseling and management*. New York: Wiley-Liss; 1998.
59. Turet A, Taniel-Sartral M, Turet E, Laroche L. Diagnostic value of fibrous examination in familial adenomatous polyposis. *BR J Ophthalmol* 1997; 81: 755-758.
60. Aretz S, Uhlhaas S, Caspari R, et al. Frequency and parental origin of de novo APC mutations in familial adenomatous polyposis. *Eur J Hum genet* 2004; 12: 52-58.

61. Heiskanen I, Kellokumpu I, Jarvinen H. management of duodenal adenomas in 98 patients with familial adenomatous polyposis. *Endoscopy* 199; 31: 412-416.
62. Norton ID, Geller A, Petersen BT, et al. Endoscopic surveillance and ablative therapy for periampullary adenomas. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:101-106.
63. Thorson AG, Faria J. Familial adenomatous polyposis, hereditary nonpolyposis colon cancer and familial risk: what are the implications for the surgeon? *Surg Clin N Am* 2000;9: 683-697; discussion 699-701.
64. King JE, Dozois RR, Lindsay NM, Ahlquist DA. Care of patients and their families with familial adenomatous polyposis. *Mayo Clin Proc* 2000; 75: 57-67.
65. Giardello FM, Yang VW, Hyland LM, et al. primary chemoprevention of familial adenomatous polyposis with sulindac. *N Engl J Med* 2002; 346: 1054-1059.
66. Steinbach G, Lynch PM, Philips RKS, et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 2000;342: 1946-1952.
67. Higuchi T, Iwama T, Yoshinaga K, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of the effects of rofecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on rectal polyps in Familial Adenomatous Polyposis patients. *Clin Cancer Res* 2003;9:4756-4760.
68. Philips RK, Wallace MH, Lynch PM, et al. A randomized, double blind, placebo controlled study of celecoxib, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, on duodenal polyposis in familial adenomatous polyposis. FAP Study Group. *Gut* 2002; 50:857-860.
69. NCCN practice guidelines in oncology v1 2001. national Comprehensive Cancer Network Web site. Colorectal screening guideline. Available at: www.nccn.org/physician_gls/PDF/colorectal_screening.pdf. Accessed August 6, 2004.
70. Baron JA, Beach M, Mandel JS, et al. Calcium supplements for the prevention of colorectal adenomas. Calcium Polyp Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1999; 340: 101-107.
71. Baron JA, Cole BF, Sandler RS, et al. A randomized trial of aspirin to prevent colon adenomas. *N Engl J Med* 2003; 348: 891-899.[Abstract/Free Full Text].
72. Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses`Health Study. *Ann Intern Med* 1998; 129:517-524.
73. Soravia C, Berk T, Madlensky L, et al. Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. *Am J Hum Genet* 1998 ; 62 : 1290-1301.
74. Giardello FM, Brensinger JD, Petersen GM, et al. The use and interpretation of commercial APC gene testing for familial adenomatous polyposis. *N Engl J med* 1997; 336:823-827.

75. Lynch HT, Smyrk T, McGinn T, et al. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A phenotypically and genotypically distinctive variant of FAP. *Cancer* 1995; 76: 2427-2433.
76. Hernegger GS, Moore HG, Guillem JG. Attenuated familial adenomatous polyposis: an evolving and poorly understood entity. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 127-134; discussion 134-126.
77. Drucker L, Shpilberg O, Neuman A, et al. Adenomatous polyposis coli I1307K mutation in Jewish patients with different ethnicity: prevalence and phenotype. *Cancer* 2000; 88: 755-760.
78. Woodage T, King SM, Wacholder S, et al. The APC I1307K allele and cancer risk in a community-based study of Ashkenazi Jews. *Nat Genet* 1998; 20: 62-65.
79. Figer A, Shtoyerman-Chen R, Tamir A, et al. Phenotypic characteristics of colo-rectal cancer in I1307K APC germline mutation carriers compared with sporadic cases. *Br J Cancer* 2001; 85: 1368-1371.
80. Wagner A, Barrows A, Wijnen JT, et al. Molecular analysis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the United States: high mutation detection rate among clinically selected families and characterization of an American founder genomic deletion of the MSH2 gene. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 1088-1100.
81. Wijnen JT, Vasen HF, Khan PM, et al. Clinical findings with implications for genetic testing in families with clustering of colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998; 339: 511-518.
82. Renkonen E, Zhang Y, Lohi H et al. Altered expression of MLH1, MLH2, and MSH6 in predisposition to hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3629-3637.
83. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116: 1453-1456.
84. Vasen HF. Clinical diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes. *J Clin Oncol* 2000; 18: 81S-92S.
85. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, et al. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 1999; 81: 214-218.
86. Vasen HF, Wijnen JT, Menko FH, et al. Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* 1996; 110: 1020-1027.
87. Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, et al. Germ-line MSH mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res* 1999; 59: 5068-5074.
88. Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH, et al. Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 26-37.
89. Charaimes GS, Millar AL, Pal T, et al. Do MSH6 mutations contribute to double primary cancers of the colorectum and endometrium? *Hum Genet* 2000; 107: 623-629.

90. Wagner A, Hendriks Y, Meijers-Heijboer EJ, et al. Atypical HNPCC owing to MSH6 germline mutations: analysis of a large Dutch pedigree. *J Med Genet* 2001; 38: 318-322.
 91. Ramsey S, Clarke L, Etzioni R, et al. Cost-effectiveness of microsatellite instability screening as a method for detecting hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann Intern Med* 2001;135: 577-588.
 92. Jarvinen HJ, Mecklin JP, Sistonen P. Screening reduces colorectal cancer rate in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 1995; 108: 1405-1411.
-

CAPÍTULO VIII

1. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA cancer J Clin* 1999;49:8-31
2. Lynch HT, Follett KL, Lynch PM, Albano WA, Mailliard JL, Pierson RL. Family history in an oncology clinic; implications for cancer genetics. *JAMA*. 1979;242:1268-1272.
3. David KL, Steiner-Grossman P. The potential use of tumor registry data in the recognition and prevention of hereditary and familial cancer. *NY State J Med* 1991;91:150-152.
4. Smyrk TC, Lynch HT. Microsatellite instability: impact on cancer progression in proximal and distal colorectal cancers. *Eur J Cancer* 1999;35:171-172.
5. Lynch HT, Boman BM, Lanspa SJ, Smyrk T, Lynch JF. Heritage of colonic polyps. In: Herrera L, ed. *Familial adenomatous polyposis*. New York: Alan R Liss, 1990;9-15.
6. Lynch HT, Smyrk T, Lanspa S, Marcus J, Kriegler M, Appelman HD. Flat adenomas in a colon cancer-prone kindred. *J Natl Inst* 1988;80:278-281.
7. Lynch HT, Smyrk T, McGinn T, et al. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP) : a phenotypically and genotypically distinctive variant of FAP. *Cancer* 1995;76:2427-2433.
8. Spirio L, Olschwang S, Groden J, et al. Alleles of the APC gene:an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 1993;75:951-957.
9. Beck NE, Tomlinson IP, Homfray TF, Frayling IM, Hodgson SV, Bodmer WF. Frequency of germline hereditary non-polyposis colorectal cancer gene mutations in patients with multiple or early onset colorectal adenomas. *Gut* 1997;41:235-238.
10. Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, Larsen AL, Krush AJ. Hereditary factors in cancer: study of two large midwestern Kindreds. *Arch Intern Med* 1966;117:206-212.

11. Warthin AS. Hereditary with reference to carcinoma. Arch Intern Med 1913;12:546-555.
12. Lynch HT, Krush AJ. Cancer Family "G" revisited: 1895-1970. Cancer 1971;27:1505-1511.
13. Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Cancer 1993;71:677-685.
14. Risinger JI, Barrett JC, Watson P, Lynch HT, Boyd J. Molecular genetic evidence of the occurrence of breast cancer as an integral tumor in patients with the hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Cancer 1996;77:1836-1843.
15. Lynch HT, Smyrk T. hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome): an update review. Cancer 1996;78:1149-1167.
16. de la Chapelle A, Peltomaki P. genetics of hereditary colon cancer. Annu Rev. Genet 1995;29:329-348.
17. Peltomaki P, de la Chapelle A. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer. In: Vande Woude GF, Klein G, eds. Advances in cancer research. San diego, California: Academic Press, 1997;93-119.
18. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colon cancer. Cell 1996;87:159-170.
19. Kinzler KW, Vogelstein B. Landscaping the cancer terrain. Science 1998;280:1036-1037.
20. Kinzler KW, Vogelstein B. cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. Nature 1997;386:761-763.
21. Kolodner RD, Hall NR, Lipford J, et al. Structure of the human MSH2 locus and analysis of two Muir-Torre kindreds for msh2 mutations. Genomics 1994;24:516-526.
22. Modrich P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. Annu Rev genet 1991;25:229-253.
23. Peltomaki P. DNA mismatch repair gene mutations in human cancer. Environ Health Perspect 1997;105(suppl4):775-780.
24. Shimodaria H, Filosi N, Shibata H, et al. Functional analysis of human MLH1 mutations in Saccaromyces cerevisiae. Nat Genet 1997;19:384-389.
25. de la Chapelle A, Wright FA. Linkage disequilibrium mapping in isolated populations : the example of Finland revisited. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:12416-12423.
26. Thorlacius S, Struewing JP, Hartge P, et al. Population-based study of risk of breast cancer in carriers of BRCA2 mutation. Lancet 1999;352:1325-1326.
27. Goodman RM, Motulsky AG, eds. Genetic diseases among Ashkenazi jews. New York:Raven press, 1979.

28. McKusick VA, Hostetler JA, Egeland JA. Genetic studies of the Amish: background and potentialities. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1964;115:203-222.
29. Nystrom.Lahti M, peltomaki P, Aaltonen LA, de la Chapelle A. Genetic and genealogic study of 33 Finnish HNPCC kindreds. *Am J Hum Genet* 1994;55(suppl):A356.
30. Risch N, de leon D, Ozelus L, et al. Genetic analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi jews and their recent descent from a small founder population. *Nat Genet* 1995;9:152-159.
31. Moisio AL, Sistonen P, Weissenbach J, de la Chapelle A, peltomaki P. Age and origin of two common MLH1 mutations predisposing to hereditary colon cancer. *Am J Hum genet* 1996;59:1243-1251.
32. Vasen HFA, Mecklin JP, Meera Khan P, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon rectum* 1991;34:424-425.
33. Moore J, Cowled P. Hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Aust Nz J Med* 1999;69:6-13.
34. Mecklin JP, Jarvinen HJ, Hakkiluoto A, et al. Frequency of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: a prospective multicenter study in finland. *Dis Colon Rectum* 1995;38:588-593.
35. Ponz de Leon M, Sassatelli R, Sacchetti C, Zanghieri A, Roncucci L. Familial aggregation of tumors in the 3-year experience of a population-based colorectal cancer registry. *Cancer Res* 1989;49:4344-4348.
36. Ponz de leon M, Sassatelli R, Benatti P, Ronucci L. identification of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the general population : the 6-year experience of a population-based registry. *Cancer* 1993;71:3493-3501.
37. Cannon-Albright LA, Skolnick MH, Bishop DT, Lee RG, Burt RW. Common inheritance of susceptibility to colonic adenomatous polyps and associated colorectal cancers. *N Engl J Med* 1988;319:533-537.
38. Houlston RS, Collins A, Slack J, Morton NE. Domiant genes for colorectal cancer are not rare. *Ann Hum Genet* 1992; 56:99-103.
39. Aaltonen LA, Sankila R, Mecklin JP, et al. A novel approach to estimate the proportion of hereditary nonpolyposis colorectal cancer of total colorectal cancer burden. *Cancer detect Prev* 1994;18:57-63.
40. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, hamilton SR, et al. A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda Guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1758-1762.
41. Aaltonen LA, peltomaki P, Mecklin JP, et al. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer patients. Cancer res* 1994;54:1645-1648.

42. Lynch HT, Smyrk TC. Identifying hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998;338:1537-1538.
43. Moslein G, tester DJ, Lindor NM, et al. Microsatellite instability and mutation analysis of hMSH2 and hMLH1 in patients with sporadic, familial and hereditary colorectal cancer. *Hum Mol genet* 1996;5:1245-1252.
44. Wijnen J, Khan PM, Vasen H, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer families not complying with the Amsterdam criteria show extremely low frequency of mismatch-repair-gene mutations. *Am J Hum genet* 1997; 61:329-335.
45. Nystrom-Lahti M, Kristo P, Nicolaides NC, et al. Founding mutations and Alu-mediated recombination in hereditary colon cancer. *Nat med* 1995;1:1203-1206.
46. Nystrom-Lahti M, Wu Y, Moisio AL, et al. DNA mismatch repair gene mutations in 55 kinders with verified or putative hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Hum Mol genet* 1996;5:763-769.
47. Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, et al. Mismatch repair gene defects in sproadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet* 1995;9:48-55.
48. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, et al. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996;2:169-174.
49. Wu Y, Nystrom-Lahti M, osinga J, et al. MSH2 an MLH1 mutations in sproadic replication error-positive colorectal carcinoma as assessed by two-dimensional DNA electrophoresis. *Genes Chrom Cancer* 1997;18:269-278.
50. Papadoulos N, Nicolaides NC, Liu B, et al. Mutations of GTBP in genetically unstable cells. *Science* 1995;268:1915-1917.
51. Akiyama Y, Sato H, Yamada T, et al. Germ-line mutations of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Res* 1997;57:3920-3923.
52. Miyaki M, Konishi M, tanaka K, et al. Gremline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 1997;17:271-272.
53. Hofstra RMW, Wu Y, berends MJW, et al. Frequent involvement of MSH6 germline mutations in HNPCC-suspected families with low microsatellite instability tumors. *Am J Hum Genet* 1998;63(suppl):A21.
54. Lu SL, Kawabata M, Imamura T, et al. HNPCC associated with germline mutation in the TGF-B type II receptor gene. *Nat genet* 1998;19:17-18.
55. Percesepe A, Kristo P, Aaltonen LA, Ponz de leon M, de la Chapelle A, peltomaki P. Mismatch repair genes and mononucleotide tracts as mutation targets in colorectal tumors with different degrees of microsatellite instability. *Oncogene* 1998;17: 157-163.

56. Tomlinson I, Rahman N, Frayling I, et al. Inherited susceptibility to colorectal adenomas and carcinomas:evidence for a new predisposition gene on 15q 14-q22. *Gastroenterology* 1999; 116:789-795.
57. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J med* 1998;338:1481-1487.
58. Fujiwara T, Stolker JM, Watanabe T, et al. Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences. *AM J Pathol* 1998;153:1063-1078.
59. Wijnen J, van der Klift H, et al. MSH2 genomic deletions are a frequent cause of HNPCC. *Nat Genet* 1998;20:326-328.
60. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin* 1998;48:6-29.
61. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, et al. Cancer Risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int j Cancer* 1999;81:214-218.
62. Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, et al. cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol genet* 1997;6:105-110.
63. Mecklin JO, Jarvinen HJ. Tumor spectrum in cancer family syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *Cancer* 1991;68:1109-1112.
64. Mecklin JP, Jarvinen HJ, Peltokallio P. cancer family syndrome: genetic analysis of 22 Finnish Kindreds. *Gastroenterology* 1986;30:328-333.
65. Heinimann K, Muller H, Weber W, Scott RJ. Disease expression in Swiss hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) kinders. *Int J Cancer (Pred Oncol)*1997;74:281-285.
66. Vasen HFA, Sanders EACM, taal BG, et al. The risk of brain tumours in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC. *Int J Cancer* 1997;74:551-555.
67. Hamilton Sr, Liu B, Parsons RE, et al. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* 1995;332:839-847.
68. Aarnio M, Salovaara R, Aaltonen LA, Mecklin J-P, Jarvinen HJ. Features of gastric cancer in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Int J Cancer (Pred oncol)* 1997;74:551-555.
69. Ashley SW, Wells SA. Tumors of the small intestine. *Semin Oncol* 1988;15:116-128.

70. Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Jarvinen HJ. Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *Int J cancer* 1995;64:430-433.
71. Vasen HFA, Wijnen JT, Menko FH, et al. Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* 1996;110:1020-1027.
72. Rodriguez-Bigas MA, Vasen HFA, Lynch HT et al. Characteristics of small bowel carcinoma in hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *Cancer* 1998;83:240-244.
73. Fearon ER. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science* 1997;278:1043-1050.
74. Muir EG, Bell AJ, Barlow KA. Multiple primary carcinomata of the colon, duodenum, and larynx associated with keratoacanthomata of the face. *Br J Surg* 1966;54:191-195.
75. Torre D. Multiple sebaceous tumors. *Arch Dermatol* 1968;98:549-551.
76. Cohen PR, Kohn SR, Kurzrock R. Association of sebaceous gland tumors and internal malignancy: the Muir-Torre syndrome. *Am J Med* 1991;90:606-613.
77. Lynch HT, Lynch PM, Pester J, Fusaro RM. The cancer family syndrome: rare cutaneous phenotypic linkage of Torre's syndrome. *Arch Intern Med* 1981;141:607-611.
78. Lynch HT, Fusaro RM, Roberts L, Voorhees GJ, Lynch JF. Muir-Torre syndrome in several members of a family with a variant of the cancer family syndrome. *Br J Dermatol* 1985;113:295-301.
79. Lynch HT, Fusaro RM. Muir-Torre syndrome: heterogeneity, natural history, diagnosis, and management. *Prob Gen surg* 1993;10:1-14.
80. Bapat B, Xia L, Madlensky L, et al. The genetic basis of Muir-Torre syndrome includes the hMLH1 locus. *Am J Hum Genet* 1996;59:736-739.
81. Kruse R, Lamberti C, Wang Y, et al. Is the mismatch repair deficient type of Muir-Torre syndrome confined to mutations in the hMSH2 gene? *Hum Genet* 1996;98:747-750.
82. Kruse R, Rutten A, Lamberti C, et al. Muir-Torre phenotype has a frequency of DNA mismatch-repair-gene mutations similar to that in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families defined by the Amsterdam criteria. *Am J Hum Genet* 1998;63:63-70.
83. Lin KM, Shashidharan M, Ternent CA, et al. Colorectal and extracolonic cancer variations in MLH1/MSH2 hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds and the general population. *Dis Colon Rectum* 1998;41:428-433.
84. Jager AC, Bisgaard ML, Myrholm T, Bernstein I, Rehfeld JF, Nielsen FC. Reduced frequency of extracolonic cancers in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families with monoallelic hMLH1 expression. *Am J Hum Genet* 1997;61:129-138.

85. Beck NE, Tomlinson IPM, Homfray T, Hodgson SV, Harocopos CJ, Bodmer WF. Genetic testing is important in families with a history suggestive of hereditary non-polyposis colorectal cancer even if the Amsterdam criteria are not fulfilled. *Br J Surg* 1997;84:233-273.
86. Watson P, Lin K, Rodriguez-Bigas MA, et al. Colorectal carcinoma survival among hereditary nonpolyposis colorectal cancer family members. *Cancer* 1998;83:259-266.
87. Sankila R, Aaltonen LA, Jarvinen HJ, Mecklin JP. Better survival rates in patients with MLH1-associated hereditary colorectal cancer. *Gastroenterology* 1996;110:682-687.
88. Hodgson SV, Harocopos C, Gaglia P. Screening results in a family cancer clinic: five years experience. *Anticancer Res* 1993;13:2581-2586.
89. Jass JR, Stewart SM. Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 1992;33:783-786.
90. Jass JR. Colorectal adenoma progression and genetic change: is there a link? *Ann Med* 1995;27:301-306.
91. Jarvinen HJ, Mecklin JO, Sistonen P. Screening reduces colorectal cancer rate in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 1995;108:1405-1411.
92. Smyrk TC, Lynch HT, Watson PA, Appelman HD. Histologic features of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. In: utsunomiya J, Lynch HT, eds. *Hereditary colorectal cancer*. Tokyo: Springer-Verlag, 1990;357-362.
93. Jass JR, Smyrk TC, Stewart SM, Lane MR, Lanspa SJ, Lynch HT. Pathology of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Anticancer Res* 1994;14:1631-1634.
94. Mecklin JP, Jarvinen HJ. Clinical features of colorectal carcinoma in cancer family syndrome. *Dis colon rectum* 1986;29:160-164.
95. Gibbs NM. Undifferentiated carcinoma of the large intestine. *Histopathology* 1977;1:77-84.
96. Jessurun MR, Manivel JC. Cecal, poorly differentiated adenocarcinomas, medullary-type. *Mod Pathol* 1992;5:43A.
97. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite. *Am J Pathol* 1994;145:148-156.
98. Thibodeau SN, French AJ, Roche PC, et al. Altered expression of hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. *Cancer Res* 1996;56:4836-4840.
99. Graham DM, Appelman HD. Crohn's-like lymphoid reaction and colorectal carcinoma: a potential histologic prognosticator. *Mod pathol* 1990;3:332-335.

100. Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett* 1987;37:147-151.
101. Roncucci L, Stamp D, Medline A, Cullen JB, Bruce WR. Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Hum Pathol* 1991;22:287-294.
102. Roncucci L, Modica S, Pedroni M, et al. Aberrant crypt foci in patients with colorectal cancer. *Br J cancer* 1998;77:2343-2348.
103. Augenlicht LH, Richards C, Corner G, Pretlow TG. Evidence for genomic instability in human colonic aberrant crypt foci. *Oncogene* 1996; 12:1762-1767.
104. Heinen CD, Shivapurkar N, Tang Z, groden J, Alabaster O. Microsatellite instability in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res* 1996;56:5339-5341.
105. Takayama T, Katsuki S, Takahashi Y, et al. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med* 1998;339:1277-1284.
106. Vasen HFA, Van Ballegooijen M, Buskens E, et al. A cost-effectiveness analysis of colorectal screening of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma gene carriers. *Cancer* 1998;82:1632-1637.
107. Syngal S, Weeks JC, Schrag D, garber JE, Kuntz KM. Benefits of colonoscopic surveillance and prophylactic colectomy in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer mutations. *Ann Intern Med* 1998;129:787-796.
108. Rex DK, Cutler CS, Lemmel GT, et al. Colonoscopic miss rates of adenomas determined by back-to-back colonoscopies. *Gastroenterology* 1997;112:24-28.
109. vasen HFA, Nagengast FM, Khan PM. Interval cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Lancet* 1995;345:1183-1184.
110. Church J. hereditary colon cancers can be tiny: a cautionary case report of the results of colonoscopic surveillance. *Am J Gastroenterol* 1998;93:2289-2290.
111. Lynch HT. Is there a role for prophylactic subtotal colectomy among hereditary nonpolyposis colorectal cancer gemline mutation carriers? *Dis Colon Rectum* 1996;39:109-110.
112. Churxh JM. Prophylactic colectomy in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann Med* 1996;28:479-482.
113. Rodriguez-Bigas MA, Vasen HFA, Pekka-Mecklin J, et al rectal cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer after abdominal colectomy. *Ann Surg* 1997;225:202-207.
114. Frogatt NJ, Green J, Brassett C, et al. A common MSH2 mutation in English and North American HNPCC families : origin, phenotypic expression, an sex specific differences in colorectal cancer. *J Med Genet* 1999;36:97 – 102.

115. Lanspa SJ, Jenkins JX, cavalieri RJ, Smyrk TC, Watson P, Lynch J. Surveillance in Lynch syndrome: How aggressive? *Am J Gastroenterol* 1994;89:1978-1980.
116. DeCosse JJ. Surgical prophylaxis of familial colon cancer: prevention of death from familial colorectal cancer. *J natl cancer Inst (Monogr)* 1995;17:31-32.
117. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, et al. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an update review. *Gastroenterology* 1993;104:1535-1549.
118. Lynch HT, Smyrk T, Lynch J. An update of HNPCC (Lynch syndrome). *Cancer Genet Cytogenet* 1997;93:84-99.
119. Lynch HT, Smyrk T. An update of Lynch syndrome. *Curr Opin Oncol* 1998;10:349-356.
120. Ruschoff J, Wallinger S, Dietmaier W, et al. Aspirin suppresses the mutator phenotype asociated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer by genetic selection. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1998;95:11301-11306.
121. de Wind N, Dekker M, van Rossum A, van der Valk M, te Riele H. Mouse models for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:248-255.
122. Bylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998;72:141-196.
123. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat genet* 1999;21:163-167.
124. Hiltunen MO, Alhonen L, Koistinaho J, et al. Hypermethylation of the APC (adenomatous polyposis coli) gene promotr region in human colorectal carcinoma . *Inst J Cancer* 1997;70:644-648.
125. Laird PW, Jackson-Grusby L, Fazeli A, et al. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell* 1995;81:197-205.
126. Kane MF, Loda M, Gaida GM, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer res* 1997;57:808-811.
127. Herman JG, Umar A, Polyak K, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1998;95:6870-6875.
128. Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer res* 1998;58:3455-3460.

129. Veigl ML, Kasturi L, Olechnowics J, et al. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8698-8702.
130. Hemminki A, Peltomaki P, Mecklin JP, et al. Loss of the wild type MLH1 gene is a feature of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat. Genet* 1994;8:405-410.
131. Bubb VJ, Curtis LJ, Cunningham C, et al. Microsatellite and the role of hMSH2 in sporadic colorectal cancer. *Oncogene* 1996;12:2641-2649.
132. Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI, et al. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 1993;53:5849-5852.
133. Senba S, Konishi F, Okamoto T, et al. Clinicopathologic and genetic features of nonfamilial colorectal carcinomas with DNA replication errors. *Cancer* 1998;82:279-285.
134. Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JJP. Aging and DNA methylation in colorectal in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res* 1998;58:5489-5494.
135. Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan ASY, Ho JCI. HMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res* 1999;59:159-164.
136. Fleisher AS, Esteller M, Wang S, et al. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1999;59:1090-1095.
137. Esteller M, Levine R, Baylin SB, Ellenson LH, Herman JG. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene* 1998;16:2413-2417.
138. Cattanach BM, Beechey CV. Autosomal and X-chromosome imprinting. *Development* 1990;suppl:63-72.
139. Sapienza C, Paquete J, Tran TH, Peterson A. Epigenetic and genetic factors affect transgene methylation imprinting. *Development* 1989;107:165-168.
140. Rainier S, Johnson LA, Dobry CJ, Ping AJ, Grundy PE, Feinberg AP. Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature* 1993;362:747-749.
141. Feinberg AP. Genomic imprinting and cancer. In: Vogelstein B, Kinzler KW, eds. *The genetic basis of human cancer*. New York: McGraw Hill, 1998;95-107.
142. Cui H, Horon IL, Ohlsson R, Hamilton SR, Feinberg AP. Loss of imprinting in normal tissue of colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Nat Med* 1998;4:1276-1280.
143. Wang Q, Lasset C, Desseigne F, et al. Neurofibromatosis and early onset of cancers in hMLH1-deficient children. *Cancer Res* 1999;59:294-297.

144. Ricciardone MD, Ozçelik T, Cevher B, et al. Human MLH1 deficiency predisposes to hematological malignancy and neurofibromatosis type I. *Cancer Res* 1999;59:290-293.
145. Hackman P, Tannergard P, Osei-mensa S, et al. A human compound heterozygote for two MLH1 missense mutations. *Nat Genet* 1997;17:135-136.
146. Laken SJ, Peterson GM, Gruber SB, et al. Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nat Genet* 1997;17:79-83.
147. Greenwald P, Korn RF, Nasca PC, Wolfgang PE. Cancer in United States Jews. *Cancer Res* 1975;35:3507-3512.
148. Bat L, Pines A, Ron E, Rosenblum Y, Niv Y, Shemesh E. Colorectal adenomatous polyps and carcinoma in Ashkenazi and non-Ashkenazi Jews in Israel. *Cancer* 1986;58:1167-1171.
149. Kune S, Kune GA, Watson L. The Melbourne Colorectal Cancer Study: incidence findings by age, sex, site, migrants and religion. *Int. J Epidemiol* 1986;15:483-493.
150. White RL. Excess risk of colon cancer associated with a polymorphism of the APC gene? *Cancer Res* 1998;58:4038-4039.
151. Gruber SB, Petersen GM, Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer, crash sites, and the new genetics of neoplasia. *Gastroenterology* 1999;116:210-212.
152. Lothe RA, Hektoen M, Johnsen H, et al. The APC gene I1307K variant is rare in Norwegian patients with familial and sporadic colorectal or breast cancer. *Cancer Res* 1998;58:2923-2924.
153. Prior TW, Chadwick RB, Papp AC, et al. The I1307K polymorphism of the APC gene in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1999;116:58-63.
154. Rozen P, Shomrat R, Strul H, Naiman T, Karminsky N. Prevalence of the I1307K APC gene variant in Israeli Jews of differing ethnic origin and risk for colorectal cancer. *Gastroenterology* 1999;116:54-57.
155. de la Chapelle A. Disease gene mapping in isolated human populations: the example of Finland. *J Med Genet* 1993;30:857-865.
156. Petrukhin L, Dangel J, Vanderveer L, et al. The I1307K APC mutation does not predispose to colorectal cancer in Jewish Ashkenazi breast and breast-ovarian cancer kindreds. *Cancer Res* 1997;57:5480-5484.
157. Abrahamson J, Moslehi R, Vesprini D, et al. No association of the I1307K APC allele with ovarian cancer risk in Ashkenazi Jews. *Cancer Res* 1998;58:2919-2922.
158. Gryfe R, Di Nicola N, Lal G, Gallinger S, Redston M. Inherited colorectal polyposis and cancer risk of the APC I1307K polymorphism. *Am J Hum Genet* 1999;64:378-384.

159. Woodage T, King SM, Wacholder S, et al. The APC I1307K allele and cancer risk in a community-based study of Ashkenazi Jews. *Nat Genet* 1998;20:62-65.
 160. Gryfe R, Di Nicola N, gallinger S, Redston M. Somatic instability of the APC I1307K allele in colorectal neoplasia. *Cancer Res* 1998;58:4040-4043.
 161. Frayling IM, beck NE, Ilyas M, et al. The APC Variants I1307K and E1317Q are associated with colorectal tumors, but not always with a family history. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:10722-10727.
 162. Redston M, Nathanson KL, Yuan ZQ, et al. The APC I1307K allele and breast cancer risk. *Nat Genet* 1998;20:13-14.
 163. Storey A, Thomas M, kalita A, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998;21:229-234.
 164. White S, Bubb VJ, Wyllie AH. Gremline APC mutaion in (Gln1317) in a cancer-prone family that does not result in familial adenomatous polyposis. *Genes Chrom Cancer* 1996;15:122-128.
-

CAPÍTULO IX

1. Jack B. One hundred years of aspirin. *Lancet* 1997; 350:437-439.
2. Elwood P., Hughes C. Aspirin and cardiovascular disease. University of Wales College of Medicine 1997; ISBN 1899717 153.
3. Ridker P. M., Cushman M., Stampfer M. J., Tracy P., Henekens C. H. Inflammation, aspirin and the risk of cardiovascular disease in apparently health men. *New. Engl. J. Med.* 1997;336:973-979.
4. Vane J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature* 1972;231:232-235.
5. Frolich J. C. A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *TIPS* 1997;18:30-34.
6. Swan D., Ford B. Chemoprevention of cancer: reviw of the literatura *Oncol. Nurs Forum.* 1997;24(4):719-727.
7. Bennett A., Del Tacca M. Prostaglandins in human colonic carcinoma. *Gut* 1975;16:409.

8. Pollard M., Luckert P. H. Indomethacin treatment of rats with dimethylhydrazine-induced intestinal tumors. *Cancer Treat. Rep.* 1980;64:1323-1327.
9. Pollard M., Luckert P. H. Effects of piroxicam in primary intestinal tumors induced in rats by N-methylnitrosourea. *Cancer Lett.* 1984;25:117-121.
10. Waddell W. R., Loughry R. W. Sulindac for polyposis of the colon. *J. Surg. Oncol.* 1983;24:83-87.
13. Isomaki H.A., Hakulinen T., Joutsenlahti U. Excess risk of lymphomas, leukemia, and myeloma in patients with rheumatoid arthritis. *J. Chron. Dis.* 1978 ;31 :691-696.
14. Kune A.S., Kune S., Watson L. F. Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations and medications. Case control results from the Melbourne colorectal cancer study. *Cancer res.* 1988;48:4399-4404.
15. Paganini-Hill A., Chao A., Ross R. K., Henderson B. E. Aspirin use and incidence of large-bowel cancer in a California retirement community (Correspondence). *J. Natl. Cancer Inst.* 1991;83:1182-1183.
18. Rosenberg L., Palmer J. R., Zauber A. G., Warshauer M. E., Stolley P. D., Shapiro S. A hypothesis: Non-steroid antiinflammatory drugs reduce the risk of large bowel cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1991;83:355-358.
19. Thun M. J., Namboodiri M. M., Heath C. W Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N. Engl. J. Med.* 1991;325:1593-1596.
21. Thun M. J., Calle E. E., Namboodiri M. M., Flanders W.D., Heath C. W. Jr. Aspirin use and the risk of fatal cancer. *Cancer Res.* 1993. 1993;53:1322-1327.
23. Gann P. H., manson J. E., Glynn R. J., Buring J. E., Hennekens C. H. Low-dose aspirin and incidence of colorectal tumors in a randomized trial. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993;85:1220-1224.
27. Schrienemachers D. M., Everson R. B. Aspirin use and lung, colon, and breast cancer incidence in a prospective study. *Epidemiology* 1994;5:138-146.
32. Giovannucci E., Egan K. M., Hunter D. J., Stampfer M. J., Colditz G. A., Willet W. C., Speizer F. E. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *New. Engl. J. Med.* 1995;333:609-614.
35. Reeves M. J., newcomb P. A., Trentham-Dietz A., Stoner B. E., Remington P. L. Nonsteroidal anti.inflammatory drug use and protection against colorectal cancer in women. *Cancer Epidemiol. Bio. Prev.* 1996;955-960.
37. Kauppi M., Pukkala E., Isomaki H. Low incidence of colorectal cancer in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 1996;14:551-558.

38. La Vecchia C., Negri E., Franceschi S., Conti E., Montella M., Giacosa A., Falcini A., Decarli A. Aspirin and colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 1997;76(5):675-7.
39. Sandler R. S., Galanko J. C., Murray S. C., Helm J. F., Woosley J. T. Aspirin and nonsteroid anti-inflammatory agents for colorectal adenomas. *Gastroenterology* 1998;114:441-447.
40. Sturmer T., Glynn R. J., Lee I. M., Manson J. E., Buring J. E., Hennekens C. H. Aspirin use and colorectal cancer: post-trial follow-up data from the Physician's Health Study. *Ann. Intern. Med.* 1998;128(9):713-720.
41. IARC Handbooks of Cancer Prevention. Volume 1 – Non-steroidal anti-inflammatory drugs. International Agency for research on Cancer, Lyon, 1997.
42. Mereto E., Frecia L., Ghia M. Effect of aspirin on incidence and growth of aberrant crypt foci induced in the rat colon by 1, 2-dimethylhydrazine. *Cancer Lett.* 1994;76:5-9.
44. Wargovich M. J., Chen C. D., Harris C., Yang E., Velasco M. Inhibition of aberrant crypt growth by non-steroidal anti-inflammatory agents and differentiation agents in the rat colon. *Int. J. Cancer* 1995;60:515-519
45. Craven P. A., DeRubertis F. R. Effect of aspirin on 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1992;13:541-546.
47. Davis A. E., Patterson F. Aspirin reduces the incidence of colonic carcinoma in the dimethylhydrazine rat model. *Aust. N.Z J Med.* 1994;24:301-303.
48. Narisawa T., Kusaka H., Yamazaki Y., Takahashi Y., Takahashi M., Koyama H., Fukuara Y., Wakizaka A. Relationship between blood plasma, prostaglandin E2 and liver and lung metastases in colorectal cancer. *Dis. Colon Rectum* 1991;33:840-845.
49. Yamaguchi A., Ishida T., Nishimura G., Katoh M., Miyazaki I. Investigation of colonic prostaglandins in carcinogenesis in the rat colon. *Dis. Colon Rectum* 1991;34:572-576.
50. Boolbol S. K., Dannenberg A. J., Chadburn A., Martucci C., Guo X-J., Ramonetti J. T., Abreu-Goris M., Newmark H. L., Lipkin M. L., DeCosse J. J., Bertagnolli M. M. Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Res.* 1996;56:2556-2560.
51. Pugh S., Thomas G. A. O. patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E2. *Gut* 1994;35:675-678.
52. Dubois R.N., Radhika A., Reddy B. S., Entigh A. J. Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors. *Gastroenterology* 1996;111:1134-40.
53. Sano H., Kawahito Y., Wilder R. L., Hashiramoto A., Mukai S., Asai K., Mimura S., Kato H., Kondo M, Hla T. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1995;55:3785-3789.

54. Kargman S. L., O'Neill G. P., Vickers P. J., Evans J. F., Mancini J. A., Jothy S. Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and-2 protein in human colon cancer. *Cancer Res.* 1995;55:2556-2559.
55. Ruffin M. T., Krishnan K., Rock C. L., Normolle D., Vaerten M. A., Peters-Golden M., Crowell J., Kelloff G., Boland C. R., Brenner D. E. Suppression of human colorectal mucosal prostaglandins: Determining the lowest effective dose. *J. Natl. Cancer Inst.* 1997;89(15):1152-60.
56. Eling T. E. Thompson D. C., Foureman G. L., Curtis J. F., Hughes M. F. Prostaglandin H synthase and xenobiotic oxidation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1990 ;30 :1-45.
57. Levy G. N. Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. *FASEB J.* 1997;11:234-247.
58. Marnett L. J. Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer, *cancer Res.* 1992;52:5575-5589.
59. Shiff S. J., Koutsos M. I., Qiao L., Rigas B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects of cell cycle and apoptosis. *Exp. Cell. Res.* 1996;222:179-188.
60. Elder D. J. E., Hague A., Hicks D. J., Paraskeva C. Differential growth inhibition by the aspirin metabolite salicylate in human colorectal tumour cell lines: Enhanced apoptosis in carcinoma and in-vitro transformed adenoma relative to adenoma cell lines. *Cancer res.* 1996;56:2273-2276.
61. Aoki T., Boland C. R., Brenner D. E. Aspirin modulation of premalignant biomarkers in rectal mucosa of high-risk subjects (abstr). *Gastroenterology* 1996;110:A484.
62. Hunt M. D., Neuenschwander U. H., Delaney T. P., Weymann K. B., Friedrich L. B., Lawton K. A., Steiner H. Y., Ryals J. A. Recent advances in systemic acquired resistance research- A review. *Gene* 1996;179:691-696.
65. Rumore M.M, Aron S. M., Hiross E. J. A review of the mechanism of aspirin an its potential as an immunomodulating agent. *Med. Hypothesis* 1987;22:387-400.

CAPÍTULO X

1. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, et al. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature.* 1999;400:464-468.
2. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, et al. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989;244:207-211.

3. Ino Y, Peinado MA, Malkhosyan A, et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*. 1993; 363:558-561.
4. Boland CR, Ricciardello L. How many mutations does it take to make a tumor? *Proc. Natl Acad Sci U.S.A.* 1999;96:14675-14677.
5. Chang DK, Metzgar D, Wills C, Boland CR. Microsatellites in the eukaryotic DNA mismatch repair genes as modulators of evolutionary mutation rate. *Genome Res*. 2001;11:1145-1146.
6. Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res*. 1999;51:3075-3079.
7. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996;87:159-170.
8. Kinzler KW, Vogelstein B. Gatekeepers and caretakers. *Nature*. 1997;386:761-763.
9. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988;319:525-532.
10. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61:759-767.
11. Boland CR, Sato J, Appelman HD, et al. Microallelotyping defines the sequence and tempo of allelic losses at tumor suppressor gene loci during colorectal cancer progression. *Nat Med*. 1995;1:902-909.
12. Laghi L, Randolph AE, Chauhan DP, et al. JC virus DNA is present in the human colon and in colorectal cancers. *Proc. Natl Acad Sci U.S.A.* 1999;96:7484-7489.
13. Ricciardiello L, Laghi L, Ramamirthan P, et al. JC virus DNA sequences are frequently present in the human upper and lower gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 2000;119:1228-1235.
14. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. genetic instability in colorectal cancers. *Nature*. 1997;386:623-627.
15. Kern SE, Fearon ER, Tersmette KWF, et al. Allelic loss in colorectal carcinoma. *JAMA*. 1989;261:3099-3103.
16. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-819.
17. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993;260:812-816.
18. Fischel R, Lescoe MK, rao MRS, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer cell. 1993;75:1027-1038.
19. Leach FS, Nicolaides NC, Padadopoulos N, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell*. 1993;75:1215-1225.

20. Boalnd CR, Thibodeau SN, Hamilton SR et al. A national Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998;58:5248-5257.
 21. Toyota M, Othe-Toyota M, Ahuja N, Issa JP. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc. Nat Acad Sci USA.* 2000;97:710-715.
-

CAPÍTULO XI

1. Preventive Services Task Force. Recommendations and raionale:Screening for colorectal cancer.2nd ed. Baltimore, Md: Williams and Wilkins;1996:89-103.
2. American Cancer Society. Cancer statistics 2003. CA:A Cancer Journal for Clinicians 2003;53(1):7-10.
3. National Cancer Institute. SEER Cancer statistics rewiw 1973-1999. Washington, DC;2000. http://seer.cancer.gov/csr/1973_1999/rates_by_race.pdf.
4. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61759-767.
5. Mandel JS, Bond JH, Church TR, et al. Reducing mortality from colorectal cancer by screening with fecal occult blood. Minnesota Colon Cancer Control Study. *N Engl J Med* 1993;328(19):1365-1371.
6. Mandel JS, Church TR, Bond JH, et al. The effect of fecal occultblood screening on the incidence of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000;343(22):1603-1607.
7. Centers for disease Controland Prevention. Trends in screening for colorectal cancer. *Morbidity an Mortality Weekly Report* 2001;50(9):162-166.
8. Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson MHE, et al. Randomised controlled trial of fecal-occult-blood screening for colorectal cancer. *Lancet* 1996;348(9040):1472-1477.
9. Jörgensen OD, Kronborg O, Fenger C. A randomised study of screening for colorectal cancer using fecal occult blood testing:Results after 13 years and seven biennial screening rounds. *Gut* 2002;50(1):29-32.

10. Lurie JD, Welch HG. Diagnostic testing following fecal occult blood screening in the elderly. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(19):1641-1646.
11. Levin B, Hess K, Johnson C. Screening for colorectal cancer. A comparison of three fecal occult blood tests. *Arch Intern med* 1992;157:970-976.
12. Bibi EJ, Rajapaksa RC, Weinshel EH. The finding and impact of non-rehydrated guaiac examination of the rectum (FINGER) study. *Arch Intl med* 1999;159:2022-202.
13. Winawer SJ, Stewart ET, Zauber AG, et al. (The National Polyp Study Work Group) A comparison of colonoscopy and double-contrast barium enema for surveillance after polypectomy. *N Engl J Med* 2000;342(24):1766-1722.
14. Wallace MB, Kemp JÁ, Meyer E, et al. Screening for colorectal cancer with flexible sigmoidoscopy by nonphysician endoscopists. *Am J Med* 1999;107(3):214-218.
15. Selby JV, Friedman GD, Quesenberry CP, Weiss NS. A case-control study of screening sigmoidoscopy and mortality from colorectal cancer. *N Engl J Med* 1992;326(10):653-657.
16. Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, et al. Colorectal cancer screening: Clinical guidelines and rationale. *Gastroenterol* 1997;112(2):594-642.
17. Wallace MB, Kemp JA, Trnka YM, Donovan JM, Farraye FA. Is colonoscopy indicated for small adenomas found by screening flexible sigmoidoscopy? *Ann Int med* 1998;129(4):273-278.
18. O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG, et al. The rational polyp study: patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterol* 1990;98(2):371-379.
19. Lieberman DA, Weiss DG, Bond JH, Ahnen DJ, Garewal H, Cheifec G for the Veterans Affairs Cooperative Study Group 380. Use of colonoscopy to screen asymptomatic adults for colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000;343(3):162-168.
20. Imperiale TF, Wagner DR, Lin CY, Larkin GN, Rogge JD, Ransohoff DF. Risk of advanced proximal neoplasms in asymptomatic adults according to the distal colorectal findings. *N Engl J Med* 2000;343(3):169-174.
21. Levin, TR, Zhao W, Habel L, et al. Mutation analysis of tumors found after a negative screening flexible sigmoidoscopy. Presented at Digestive Disease Week, May 2002;abstract 00270.
22. Frazier AL, Colditz GA, Fuchs CS, Kuntz KM. Cost-effectiveness of screening for colorectal cancer in the general population. *JAMA* 2000;284(15):1954-1961.
23. Rex DK. Current colorectal cancer screening strategies: Overview and obstacles to implementation. *Gastro Dis (Suppl)*2002;2(Suppl 1):S2-S11.

24. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends genet* 1993;9:138-41.
 25. Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, et al. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool :Feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterol* 2000;119(5):1219-1227.
 26. Dong SM, Traverso G, Johnson C, et al. Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic target. *JNCI* 2001;93(11):858-865.
 27. Berger BM, Kann LM, Whitney DH, Shuber AP. Common DNA mutation sites in colorectal cancer (CRC): selection of candidate sites for a stool-based human DNA mutation assay for colorectal cancer screening. Presented at the American Society of Clinical Chemistry, Oak Ridge Conference, April 2002;abstract A183174296.
 28. Berger BM, Glickman JN. Potential use of a DNA mutation marker panel as an adjunct to flexible sigmoidoscopy (FS) to enhance the detection of proximal colon cancers (CRC). *Digestive Disease Week*, May 2002;abstract A107147.
 29. Berger BM, Ditelberg JS. Gene mutations in advanced colonic polyps:Potential marker selection for stool-based mutated human DNA assays for colon cancer screening. *Digestive Disease Week*, May 2002;abstract A107495.
 30. Ahlquist DA, Shuber AP. Stool screening for colorectal cancer: Evolution from occult blood to molecular markers. *Clin Chim Acta* 2002;315(1-2):157-168.
 31. Brand RE, Shuber AP, Laken SJ, Young CM, Urbanowski J, et al. Stool DNA mutation testing for colorectal cancer detection: Sensitivity and reproducibility. *Am J Gastroenterol* 2001;96:5144.
-

CAPÍTULO XII

1. Cancer facts & figures 2000. Atlanta (GA): American Cancer Society; 2000.
2. Mandel JS, Bond JH, Church TR, Snover DC, Bradley GM, Schuman LM, et al. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. Minnesota Colon Cancer Control Study [published erratum appears in *N Engl J Med* 1993;329:672]. *N Engl J Med* 1993; 328:1365-71.
3. Byers T, Levin B, Rothenberger D, Dodd GD, Smith RA. American Cancer Society guidelines for screening and surveillance for early detection of colorectal polyps and cancer: update 1997. American cancer Society Selection and Treatment Advisory Group on Colorectal Cancer. *CA Cancer J Clin* 1997;47:154-60.

4. Markowitz AJ, Winawer SJ. Screening and Surveillance for colorectal cancer. *Semin Oncol* 1999;26:485-98.
5. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends genet* 1993; 9:138-41.
6. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159-70.
7. Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med genet* 1999 ;36 :801-18.
8. Perucho M. cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biol Chem* 1996;377:675-84.
9. Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Wilson JK, Markowitz SD, Kinzler Kw, et al. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer res* 1995;55:5548-50.
10. Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Levin B, Frost P, et al. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 1992;256:102-5.
11. Nollau P, Moser C, Weinland G, Wagener C. Detection of K-ras mutations in stools of patients with colorectal cancer by mutant-enriched PCR. *Int. J cancer* 1996;66:332-6.
12. Smith-Ravin J, England J, Talbot IC, Bodmer W. Dtection of cKi-ras mutations in faecal samples from sporadic colorectal cancer patients. *Gut* 1995;36:81-6.
13. Eguchi S, Kohara N, Komuta K, Kanematsu T. Mutations of the p53 gene in the stool of patients with resectable cancer. *Cancer* 1996;77:1707-10.
14. Deuter R, Muller O. detection of APC mutations in stool DNA of patients with colorectal cancer by HD-PCR. *Hum Mutat* 1998; 11:84-9.
15. Minamoto T, Mai M, Ronai Z. K-ras mutation : early detection in molecular diagnosis and risk assessment of colorectal, pancreas, and cancers a review. *Cancer Detect prev* 2000;24:1-12.
16. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-767.
17. 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(5053):102-105.
18. Dong SM, Traverso G, Johnson C, et al. Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic targets. *J Natl cancer Inst*. 2001;93(11):858-865.
19. Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, et al. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool : feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology*. 2000;119(5):1219-1227.

20. Syngal S, Chung D, Willett C, et al. Stool DNA analysis for the detection and follow-up of colorectal cancer (CRC) and advanced adenomas (AA):sensitivity in a prospective series. *Am J Gastroenterol.* 2002;97(suppl):S109.
21. Traverso G, Shuber A, Levin B, et al. Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors. *N Engl J Med.* 2002;346(5):311-320.
22. Traverso G, Shuber A, Olsson L, et al. Detection of proximal colorectal cancers through analysis of faecal DNA. *Lancet.* 2002;359(9304):404-406.
23. Brunton S, Anderson R, Foxhall L, et al. Colorectal cancer screening: a renewed imperative for primary care clinicians-consensus recommendations from an expert panel. *Illinois Academy of Family Physicians*,2003.
24. Song, K, Ladadaum, U. Potential cost-effectiveness of molecular stool marker testing compared to conventional colorectal cancer (CRC) screening methods. *Gastroenterology.* 2003;124:A603.
25. Ness R, Klein R, Dittus R. The cost-effectiveness of fecal DNA testing for colorectal cancer. *Gastrointest Endosc.* 2003;57(5):622.
26. Trends in screening for colorectal cancer-United States, 1997 and 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2001; 50:162-166.
27. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. Cancer statistics ; 2004. *CA cancer J Clin* 2004 ; 54 :8-29.
28. Smith RA, Von Eschenbach AC, Wender R, et al. American Cancer Society Guidelines for the early detection of cancer: update of early detection guidelines for prostate, colorectal, and endometrial cancers. Also: update 2001-testing for early lung cancer detection. *CA Cancer J Clin* 2001; 51:38-75.
29. U.S. Preventive Services Tasks Force. Screening for colorectal cancer: recommendation and rationale. *Ann Intern Med* 2002; 137:129-131.
30. Winawer S, Fletcher R, Rex D, et al. Colorectal cancer screenong and surveillance: clinical and rationale update based on new evidence. *Gastroenterology* 2003; 124:544-560.
31. Simmang CL, Senatore P, Lowry A, et al. Practice parameters for detection of colorectal neoplasms. The standards Comitee, the American Society of colon and rectal surgeons. *Dis colon rectum* 1999; 42:1123-1129.
32. From the centers for Disease Control and prevention. Colorectal cancer test use among persons aged > or = 50 years – United States, 2001. *JAMA* 2003; 289: 2492-2493.
33. Sirovich BE, Schwartz LM, Woloshin S. Screening men for prostate and colorectal cancer in the United States. *JAMA* 2003; 289: 1414-1420.
34. Deber RB. Shared decision making in the real world. *J gen Intern Med* 1996; 11:377-378.

35. Leard LE, Savides TJ, Ganiats TG. Patient preferences for colorectal cancer screening. *J Fam Pract.* 1997; 45:211-218.
36. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319: 525-532.
37. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
38. Muto T, Bussey HJ, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1975; 36:2251-2270.
39. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 368:558-561.
40. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260:816-819.
41. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260:812-816.
42. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, et al. Mutations of a muts homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; 75:1215-1225.
43. Traverso G, Shuber A, Olsson L, et al. Detection of proximal colorectal cancers through analysis of faecal DNA. *Lancet* 2002; 359:403-404.
44. Dong SM, Traverso G, Johnson C, et al. Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic targets. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:858-865.
45. Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, et al. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool : feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* 2000; 119:1219-1227.
46. De la chapelle A. testing tumors for microsatellite instability. *Eur J Hum genet* 1999 ; 7 :407-408.
47. Elsaleh H, Joseph D, Grieu F, Zeps N, Spry N, Lacopetta B. Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet* 2000; 355:1745-1750.
48. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75:1027.1038.
49. Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, Issa JP. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Nat Acad Sci USA* 2000; 97:710-715.

50. Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, et al. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 1992; 256:102-105.
51. Ahlquist DA, Shuber AP. Stool screening for colorectal cancer: evolution from occult blood to molecular markers. *Clin Chim Acta* 2002; 315:157-168.
52. Syngal S, Chung D, Willett C, et al. Stool DNA Analysis for the detection and follow-up of colorectal cancer (CRC) and advanced adenomas (AA): sensitivity in a prospective series. *Am J gastroenterol* 2002; 97(Suppl):S109.
53. Traverso G, Shuber A, Levin B, et al. Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors. *N Engl J Med* 2002; 346:311-320.
54. Brand RE, Shuber AP, Laken SJ, et al. Stool-based DNA mutation testing for colorectal cancer detection: sensitivity and reproducibility. Poster # 117 presented at the 66th Annual Scientific meeting of the American College of Gastroenterology; October 19-24, 2001; Las Vegas, NV.
55. Tagore K, Ross M, Shuber A, et al. Stool-based DNA Multi-target assay for the detection of colorectal cancer (CRC) and advanced adenomas [abstract]. *Gastroenterology* 2002; 122:A481.
56. Ahlquist DA, Harrington JJ, Burgart LJ, Roche PC. Morphometric analysis of the “molecular layer” overlying colorectal cancer and normal mucosa: relevance to exfoliated stool screening markers. *Hum pathol* 2000; 31:51-57.
57. Schroy PC, Heeren, TC. A comparative study of patient perceptions and screening preferences for stool-based DNA testing (SBDNA), fecal occult blood testing (FOBT), or colonoscopy (CS) [Abstract]. *Gastroenterology* 2003; 124:A481.
58. Vanness DJ, Ahlquist DA. Discrete event simulation of the cost-effectiveness of colorectal cancer screening by a DNA-based stool test relative to current screening practice [abstract]. *Gastroenterology* 2001; 120:A406.
59. Ness R, Klein R, Dittus R. The cost-effectiveness of fecal DNA testing for colorectal cancer [abstract]. *Gastrointest endoc* 2003; 57(5):622.
60. Song K, Ladabaum U. Potential cost-effectiveness of molecular stool marker testing compared to conventional colorectal cancer (CRC) screening methods [abstract]. *Gastroenterology* 2003; 124:A603.